

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARVAKROL TÜREVLERİNİN GLİOBLASTOMA
TEDAVİSİNDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşenur ÖZDEMİR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

2015

Her hakkı saklıdır

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**KARVAKROL TÜREVLERİNİN GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22 / 07 / 2015

Ayşenur ÖZDEMİR

Her hakkı saklıdır
T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

KARVAKROL TÜREVLERİNİN GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANIM
POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Ayşenur ÖZDEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma 21/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç.Dr. Ivana CACCIATORE

İmza :

Üye : Doç.Dr.Mesut TAŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARVAKROL TÜREVLERİNİN GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayşenur ÖZDEMİR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Glioblastoma multiforme (GBM), dünya genelinde yaygın görülen, ölümcül etkili bir beyin kanseri türüdür. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri ise hastalığın tedavisinde yeterli olamamaktadır. Diğer yandan, günümüzde kanser tedavisinde doğal bileşikler ve bu doğal bileşiklerden türevlenmiş bileşiklerin kullanılması önemli araştırma alanları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda, tez çalışmasında GBM hücre modeli olarak U87-MG hücre hattı seçilmiş ve antikanser özelliği kanıtlanmış olan karvakrolün direkt kodruğ yaklaşımı ile türevleri sentezlenerek, bu türevlerin antikanser potansiyelleri 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) ve Laktat Dehidrogenaz enzimi (LDH) analizleri ile ilk kez araştırılmıştır. Araştırmamız bulgularına göre, test edilen karvakrol türevi bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda öldürücü etki yaptığı, düşük konsantrasyonlarda ise sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Bulgularımız doğrultusunda, test edilen 8 adet karvakrol türevi bileşik içerisindeki 8. Karvakrol türevinin, moleküler yaklaşımlarla desteklenmesi durumunda GBM'ye karşı kullanılabilir yeni bir terapötik etkili bileşik olabileceği görüşündeyiz.

2015, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, Karvakrol Türevi, MTT, LDH, U87-MG

ABSTRACT

MASTER THESIS

EVALUATION OF CARVACROL DERIVATIVES ON TREATMENT OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Ayşenur ÖZDEMİR

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Associate Prof. Hasan TÜRKEZ

Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of the most common aggressive malignant cancer type that is affected deadly all over the world. Surgery, chemotherapy and radiotherapy approaches are not sufficient to treat the GBM. On the other hand, natural compounds and their derivatives are very crucial research area to treat cancer, nowadays. Taken in this context, in thesis, U87-MG cell line was chosen as GBM model and carvacrol has proved to be very effective on cancer treatment in previous studies. Some carvacrol derivatives are synthesized and their anticancer effects are first time evaluated. Anticancer effects of these carvacrol derivatives were evaluated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) and Lactate Dehydrogenase (LDH) assay. Our results demonstrated that the carvacrol derivatives exhibited cytotoxicity effects on high concentration and there is no toxic effects on low concentration. In conclusion, our results shown that 8. carvacrol derivative are the best compound for GBM between other carvacrol derivatives. Therefore, 8. carvacrol derivative can be new therapeutic agent for the treatment of GBM.

2015, 60 pages

Keywords: Glioblastoma, carvacrol derivatives, MTT, LDH, U87-MG

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tez çalışması süresince desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e ve Doç. Dr. Ivana CACCIATORE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresinde beni cesaretlendiren ve motivasyonumu sağlayan, büyük manevi yardımlarını gördüğüm hocam Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar bilgilerimi öğrendiğim ve deneyimlerinden yararlandığım arkadaşlarım Arş. Gör. Saniye Elvan ÖZTÜRK, Post. Doc. Hamid SYED, Uzman Cenk DAĞLIOĞLU, Arş. Gör. Selçuk ÖZDEMİR ve Arş. Gör. Mehmet İlyas COŞOCAK'a sonsuz minnet ve saygılarımı sunarım. Ayrıca, tez çalışmamda, birlikte çalıştığım arkadaşım Arş. Gör. Özlem ÖZDEMİR'e ve iş arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet Enes ARSLAN ve Arş. Gör. Fatma Necmiye KACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayşenur ÖZDEMİR

2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Kanser.....	1
1.2. Kanserın Moleküler Mekanizması.....	1
1.2.1. Hücre Siklusı.....	2
1.2.2. Epigenetik Değişimler.....	4
1.2.3. Apoptoz.....	4
1.2.4. RNA Metabolizması.....	6
1.3. Beyin Kanseri.....	6
1.3.1. Genetik Risk Faktörleri.....	7
1.4. Glioma.....	8
1.4.1. Glioblastoma Multiforme.....	9
1.4.1.1.Etiyoloji.....	10
1.4.1.2.Glioblastoma Multiformede Genetik Değişimler.....	10
1.4.1.3.Teşhis ve Tanı.....	12
1.4.1.4.GBM Tedavisi.....	12
1.5. Kodrug Yaklaşımı.....	13
1.6. Karvakrol ve Özellikleri.....	15
1.7. Karvakrol Türevi Bileşikler.....	17
1.7.1. Tez Kapsamında Kullanılan Karvakrol Türevi Bileşikler.....	21
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26

3.1. Materyaller.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Tez Kapsamında Test Edilecek Karvakrol Türevlerinin Sentez ve Karakterizasyonu.....	27
3.2.2. Karvakrol Türevlerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	36
3.2.3. Hücre Kültürü Şartları.....	36
3.2.4. Hücre Canlılığının Ölçülmesi ve MTT Analizi.....	36
3.2.5. LDH Analizi.....	37
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Hücre Döngüsü Şematik Gösterimi.....	3
1.2.Apoptoz Mekanizmasına Yol Açan Moleküler Yolakların Özeti.....	5
1.3.Beyin Tümörlerinin Ana Grupları.....	7
1.4.GBM'nin Primer ve Sekonder Alt Tiplerinin Oluşumları.....	9
1.5.Glioblastoma Alt Tiplerinde Meydana Gelen Mutasyonların Genel Özeti.....	11
1.6.Kodrug Uygulama Alanları.....	13
1.7.Çok Hedefli Direkt Ligand Stratejisinin Şematik Gösterimi.....	14
1.8.Karvakrolün Kimyasal Yapısı.....	15
1.9.Karvakrolün Eter ve Ester Türevleri.....	17
3.1. 1.ve 4. Karvakrol Türevlerinin Sentezi.....	35
3.2. 5. Ve 6. Karvakrol Türevlerinin Sentezi.....	35
3.3. 7. Ve 8. Karvakrol Türevlerinin Sentezi.....	35
3.4. MTT Analizinin Temel Prensibi.....	36
3.5. LDH Analizinin Temel Prensibi.....	37
4.1. 1. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	39
4.2. 1. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	39
4.3. 2. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	40
4.4. 2. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	40
4.5. 3. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	41
4.6. 3. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	41
4.7. 4. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	42
4.8. 4. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	42
4.9. 5. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	43

4.10. 5. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	43
4.11. 6. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	44
4.12. 6. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	44
4.13. 7. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	45
4.14. 7. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	45
4.15. 8. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	46
4.16. 8. Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları.....	46
4.17. Karvakrolün Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	47
4.18. Karvakrol Türevlerinin Artan Konsantrasyonlar Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	47
4.19. LDH Analizi Sitotoksosite Değerlendirmesi	48
4.20 Karvakrolün LDH Analizi Sonuçları	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Literatüre Kazandırılmış Önemli Karvakrol Türevi Bileşikler.....	19
1.2. Karvakrol Türevi Bileşikler.....	21
3.1. Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi.....	26
3.2. Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi.....	27
4.1. Karvakrol Türevlerinin İnhibitör Etkili Konsantrasyonları	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde Konsantrasyon
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre

Kısaltmalar

DISC	Ölüm İlişkili Protein Kompleksi
MRI	Magnetik Rezonans Görüntüleme
IDH1	İzositrat Dehidrogenaz 1
NF2	Nörofibromatosis Tip 2
GBM	Glioblastoma Multiforme
RB	Retinoblastoma
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Bovine Serum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium
bromide	
LDH	Laktat Dehidrogenaz

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, hücrelerin normal büyüme ve farklılaşma özelliklerini kaybetmesi sonucu kontrolsüz çoğalan hücrelerden oluşan çok yönlü bir hastalıktır. Dünya genelinde yaygın olarak görülen bu hastalık insan ölüm nedenlerinin de başında gelmektedir. Kanseri gelişimi çok basamaklı bir süreçte gerçekleşir. Başlangıç hücresinde meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz büyüme ve çoğalmayı takiben invazyon, kanser oluşumunun genel basamaklarını oluşturmaktadır (Pflaum vd., 2014).

Kanseri risk faktörleri ve hücrelerel stres nedenleri çevresel ve kalıtsal olarak iki grup altında toplanmaktadır. Çevresel nedenler arasında sigara kullanımı, alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, hareketsizlik, ultraviyole ışınlar, kömür tozları, arsenik, asbestos, benzen, kadmiyum gibi kimyasal toksinler bulunmaktadır (Pflaum vd., 2014; Vineis ve Wild, 2014). Kalıtsal risk faktörleri ise polimorfizmler, epigenetik değişimler, somatik mutasyonlar gibi nedenleri kapsamaktadır (Brokaw, 2000; Gopisetty vd., 2006).

Kanseri ile ilgili araştırmalar, İnsan Genom Projesinin tamamlanmasının ardından hız kazanmış olup, Kanseri Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas), Uluslar Arası Kanseri Genom Konsorsiyumu (The International Cancer Genome Consortium) projeleriyle devam ederek çok fazla bilgi ve örnek birikimi ile kanserin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yöneliktir. Söz konusu bu projeler aracılığıyla, mRNA ekspresyon seviyesi ve değişimi, kodlama yapan bölgelerde oluşan somatik mutasyon birikimi, kopya sayısı değişimi ve DNA metilasyon değişimleri gibi konularda önemli bilgilerin keşfedilmesi sağlanmıştır (Gao vd., 2014).

1.2. Kanseri Moleküler Mekanizmaları

Kanseri hücreleri farklı şekillerde oluşabilir. Oluşumlarının ardında ise benzer özellikler taşırlar. Bu özellikler;

1. Hücrelerel ve genomik olarak instabilite,
2. Kendi kendilerini idame ettirebilme,
3. Telomeraz enzimi üreterek, telomerlerini stabil halde tutabilme,
4. Ekstrasellüler anti-proliferatif sinyallere karşı duyarsız olma,

5. İntrasellüler kontrol mekanizmalarının kusursuzluğu,
6. Genellikle apoptozise girmeme eğilimi,
7. Metastazik özellik göstererek farklı dokulara göç etme edebilme,
8. Anjiogenesis mekanizması ile beslenebilme,
9. Stres koşullarına karşı davranış değiştirebilme.

Kanser, hüresel ve genomik instabilite sonucu meydana gelen bir çeşit hücre hastalığıdır. DNA hasarları, epigenetik değişimler, DNA tamir mekanizmasından sorumlu proteinlerde meydana gelen mutasyonlar, apoptoz yolaklarındaki mutasyonlar, RNA metabolizmasındaki bozukluklar ve hücre siklusunun kontrol noktalarındaki hatalar kanser hücresi oluşumuna neden olmaktadır (Gopisetty vd., 2006; Zhi vd., 2014; Ouadid-Ahidouch vd., 2015).

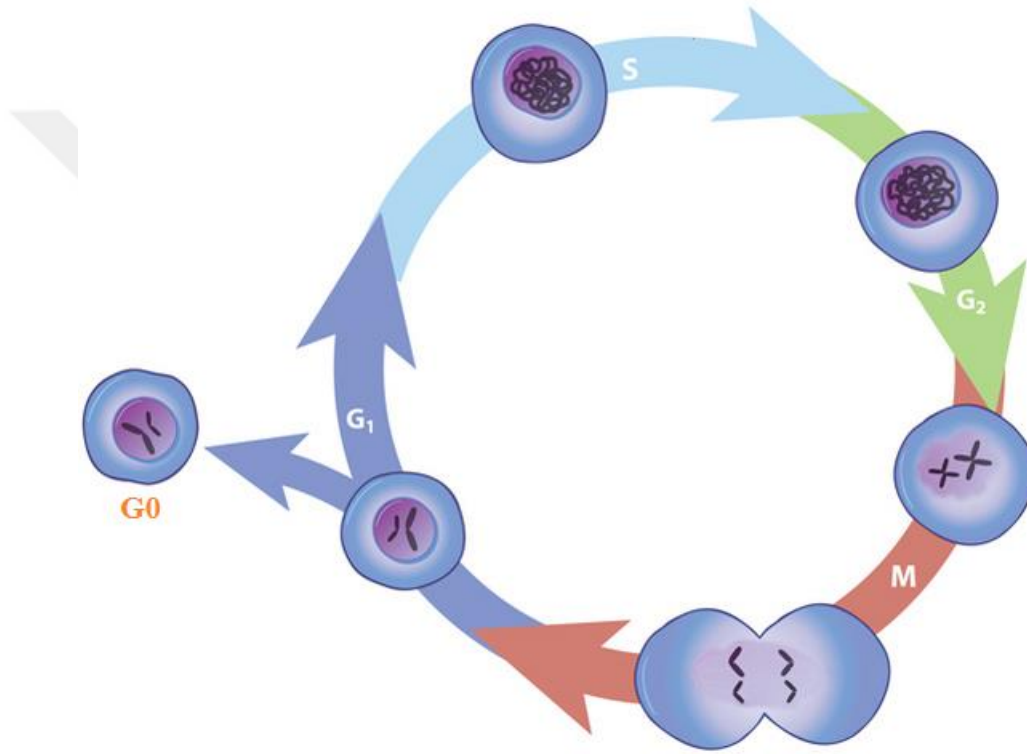
DNA hasarı ultraviyole ışınlar, iyonize ışınlar ve çeşitli kimyasallar yoluyla oluşabileceği gibi spontan bir şekilde de gelişebilmektedir. Hücrelerde oluşan DNA hasarı, DNA onarım mekanizması ile düzeltilebilmektedir. DNA hasarının kontrolü hücre siklusunun her aşamasında çok sıkı bir şekilde yapılmaktadır. DNA replikasyonu veya DNA onarımı sırasında hasar ve mutasyon meydana geldiği durumda ise genetik kararsızlık oluşmaktadır (Debeleş Bütüner ve Kantarcı, 2006).

DNA tamir mekanizmasında görevli proteinlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumunda rol oynamaktadır. DNA tamiri; apoptoz, hücre siklusu, mutasyonlar, genomik stabilite ve replikasyon hataları gibi tüm biyolojik süreçlerde görevli bir mekanizmadır. Epigenetik mekanizmalarda olduğu gibi, tümör supresör genlerde meydana gelen mutasyonlar da kanser oluşumu ile doğrudan ilişkilidir. Bir hücrede meydana gelen farklı bir çok mutasyon kanser gelişimi için önemlidir (Debeleş Bütüner ve Kantarcı, 2006).

1.2.1. Hücre Siklusu

Hücre siklusu ardışık olarak devam eden 4 aşamadan oluşur. Şekil 1.1'de gösterildiği gibi, G1 evresi; hücre bölünmesinden çıktıktan sonra, hücrenin normal metabolik faaliyetlerini sürdürdüğü, büyüme ve gelişme gösterdiği evredir. Bu evrede

RNA ve protein sentezi yapılır. G₁ evresinden sonra hücre DNA replikasyonunun gerçekleştiği S evresine girer. RNA ve protein sentezi devam ederken, hücre hatasız bir şekilde replikasyonu yapmaya çalışır. G₂ evresi, S evresinin hemen ardından ve replikasyon tamamlandıktan sonra hücrelerin girdiği evredir. RNA ve protein sentezi devam eder. Hücre bu aşamada mitoz bölünmeye hazırlanır. M evresi, hücrenin mitoz bölünme aşamasıdır. Bu aşamada karyokinez ve sitokinez gerçekleşir (Williams ve Stoeber, 2012).



Şekil 1.1: Hücre Döngüsü Şematik Gösterimi
(Nature Education, 2013'ten alınmıştır.)

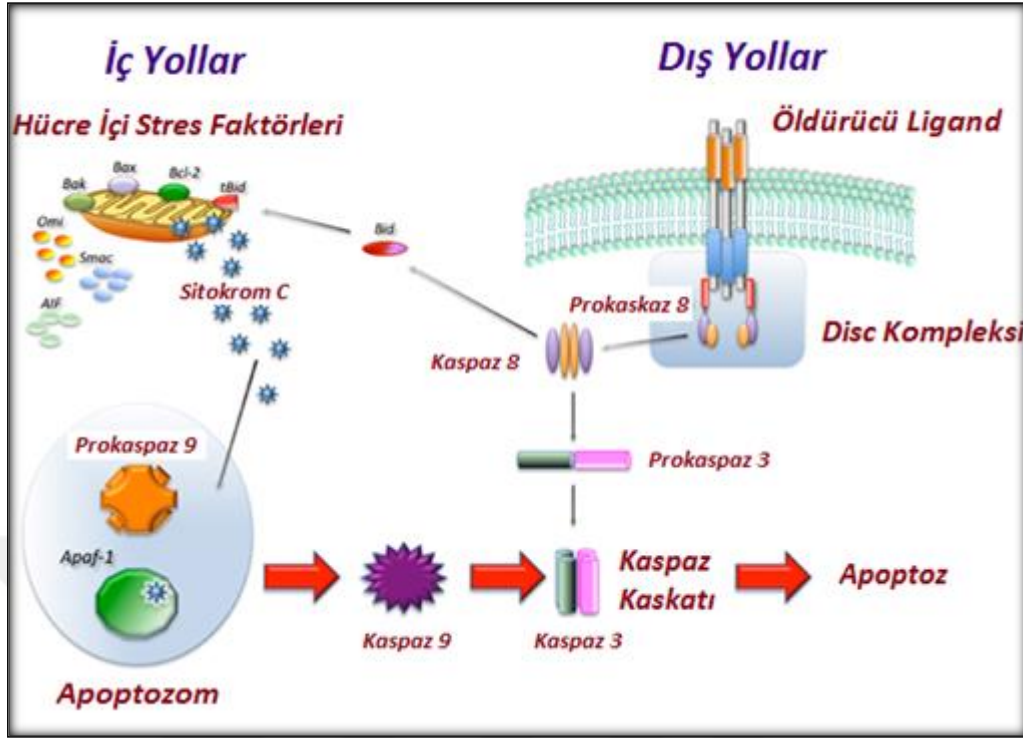
Hücre döngüsünün regülasyonu, kanserleşme sürecinde önemli rol oynar. Hücre siklusunun ilerlemesi ve kontrol aşamaları, CDK olarak adlandırılan sikkline bağlı proteinler tarafından düzenlenir. Siklusun farklı evrelerinde, farklı tipte CDK proteinleri sentezlenir. CDK proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar hücrenin apoptozdan kaçmasına ve kanserleşmesine sebep olmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

1.2.2. Epigenetik Değişimler

Epigenetik değişimler, primer DNA dizisinde değişim olmaksızın gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişimler olarak tanımlanır. Embriyonik gelişim süreci, X inaktivasyonu ve genomik imprinting gibi birçok biyolojik olayda kritik role sahiptir. Biyolojik süreçlerde 3 önemli epigenetik değişim mekanizması vardır. Bunlar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromozomun yeniden modellenmesi mekanizmalarıdır. Sitozin bazına metil grubu eklenmesi şekliyle DNA metilasyonu, histon proteinlerinin post-translasyonel değişimleri ile histon modifikasyonları ve nükleozomların pozisyonlarının değişmesidir. Normal hücrelerde bulunan bu mekanizmada meydana gelen epimutasyonlar, kanser hücresi oluşumunda kritik bir öneme sahiptir. Epimutasyonlar, tümör supressör genlerin sessizleşmesine, onkogenlerin ise aktifleşmesine yol açabilmektedir (Sharma vd., 2009)

1.2.3. Apoptoz

Apoptoz, fizyolojik olarak gerçekleşen ve önceden programlanmış olan hücre ölümüdür. Organizmada homeostasiyi ve hücreler arasındaki dengeyi sağlayan önemli bir mekanizmadır. Embriyonik gelişim sırasında ve yetişkinlerde doku turnover ile immun cevaplar sırasında meydana gelir. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi, apoptoz iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) yollar olmak üzere 2 farklı yol ile başlatılmaktadır (Gopisetty vd., 2006). Kanser hücreleri genellikle apoptoz mekanizmasından kaçış özelliği gösterirler.



Şekil 1.2: Apoptoz Mekanizmasına Yol Açan Moleküler Yolların Özeti (Favaloro vd., 2012'den uyarlanmıştır).

Apoptozis genel olarak, hücre küçülmesi, kromotin kondensasyonu, nükleer fragmentasyonu ve membran parçalanması ile karakterize edilmektedir (Su vd., 2015). Apoptozise neden olan intrinsik yollar, DNA hasarı, Ca^{++} seviyesi değişimi ve oksidatif stres gibi hücre içi uyarılar ile başlatılan bir süreçtir. Bu yolda görevli moleküller Bcl-2 protein ailesidir. Bu protein ailesinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler beraber bulunmaktadır (Gopisetty vd., 2006). Bu proteinler arasındaki denge, apoptoz oluşumunu veya hücrenin hayatta kalımını düzenlemektedir.

İntrinsik yolda pro-apoptotik proteinlerden olan Bid, anti-apoptotik Bcl-2 proteinini inaktif hale getirir. Bcl-2'nin inaktifleşmesi ile Bax ve Bak proteinleri aktifleşir. Mitokondri membran zar potansiyelinin değişmesi ile mitokondriden Sitokrom C salınımı başlatılır. Sitozole çıkan Sitokrom C, burada bulunan Apaf-1 proteinine bağlanarak onun inaktif hale gelmesine neden olur. Bu inaktifleşme olayı sitozolde apoptozom olarak adlandırılan bir protein kompleksi oluşumunu, ardından da Prokaspaz 9'un aktif Kaspaz-9'a dönüşümüne sebep olur. Bu şekilde başlatılan kaspaz kaskadı en

sonunda aktif Kaspaz-3 oluşumu ile tamamlanır ve hücrenin ölüme gitmesine yol açar (Atagün, 2011; Paul, 2002; Ozgur ve Coşkun, 2011).

Ekstrinsik yolda ise, hücre membranında bulunan TNF reseptör ailesine ölüm ligandı (Fas Ligand, TRAIL, TNF- α) bağlanması ile apoptoz başlatılır. Öncelikle hücre içinde ölüm ilişkili protein kompleksi (DISC) oluşur. DISC efektör kaspaz proteinlerini aktifleştirerek hücrenin ölüme gitmesine yol açar (Su vd., 2015).

1.2.4. RNA Metabolizması

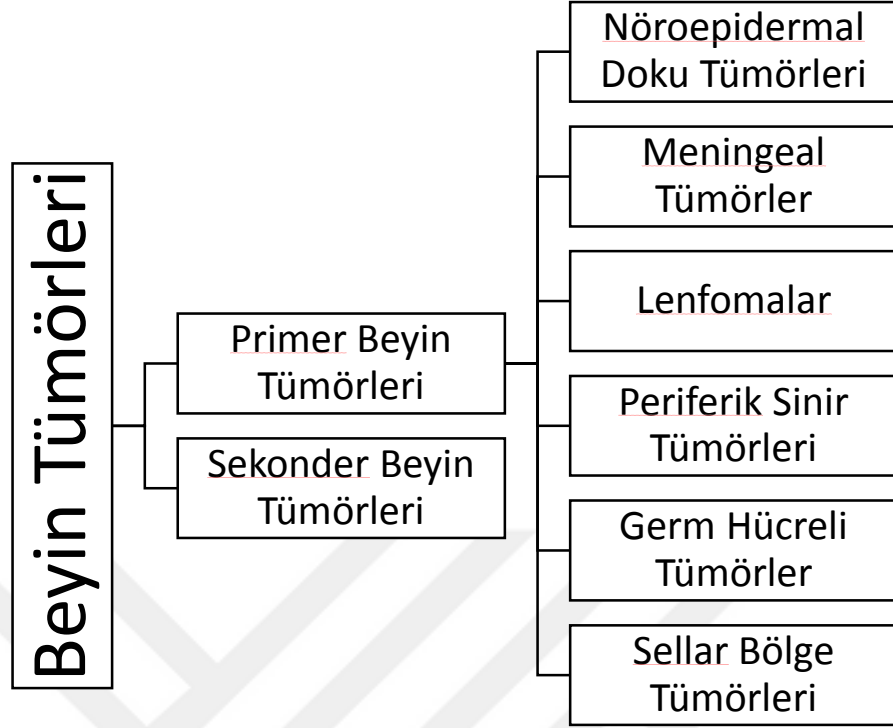
Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanserin moleküler mekanizmasında RNA moleküllerinin de önemli rol oynadığı ortaya çıkarılmaya başlanmıştır (Hauptman ve Glavac, 2013). Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak mRNA kırılma mekanizmasında değişiklikler taşımaktadır. Kanser gelişiminde kritik bir süreç olarak, özellikle hücre membran proteinlerinde farklı tipte protein meydana gelmesi, bu proteinlerin onkogenik özellik göstermesine sebep olmaktadır (Kim vd., 2009).

1.3. Beyin Kanseri

Beyin kanseri, beyin ve merkezi sinir sisteminde oluşan, glial hücrelerden astrosit, oligodentrosit, ependimal hücreleri ve nöronları içeren tümör çeşitleridir. Bazı beyin tümörlerinin kaynağı direkt beyin olup, bunlara primer beyin tümörleri denir. Bazı tümörler ise sekonder beyin tümörleridir ve başka organlardan köken alan kanserli hücrelerin metastazı sonucu oluşmaktadır (Kheirollahi vd., 2015).

Beyin kanserlerinin tanısında kullanılan en etkili yöntemler magnetik rezonans görüntüleme (MRI) ve tomografi teknikleridir. Bunun yanında bazı nörolojik hastalıklar, bilinç kaybı ve şiddetli baş ağrısı beyin kanseri teşhisinde önemli bulgulardır.

Primer beyin tümörleri her yıl dünya genelinde ortalama 200.000 kişide görülmektedir. Diğer kanser türleri ile kıyaslandığında ise oluşum sıklığı daha azdır. Yetişkinlerde görülme sıklığı çocuklara göre 4 kat daha fazladır (Hacıyakupoğlu vd., 2014).



Şekil 1.3: Beyin Tümörlerinin Ana Grupları

Dünya Sağlık Örgütü kaynaklarına göre primer beyin tümörlerinin 120 farklı grubu ve bu grupların da birbirinden farklı alt tipleri bulunmaktadır. Bu alt tipler şekil 1.3'te gösterilmiştir. Bu gruplar, malignansi özelliklerine göre grade I, II, III ve IV olmak üzere sınıflandırılırken; ayrı bir gruplandırma sistemi ile de histolojik olarak ayrılırlar. Grade I kanserleri genellikle bening özellikte olurken, Grade IV kanserleri metastazik özellikte ve en tehlikeli olanlarıdır (Huttner, 2012).

1.3.1. Genetik Risk Faktörleri

Çocukluk ve yetişkinlik dönemi beyin kanserlerinin moleküler biyolojisi birbirinden farklıdır (Hacıyakupoğlu vd.,2014). Beyin tümörlerinin moleküler yapısı incelendiğinde, primer beyin tümörlerinin % 5-10'unun genetik hasar ve mutasyon sonucu oluştuğu görülmektedir. Ayrıca, primer beyin tümörlerinin nedenleri arasında çevresel faktörler de görülmektedir (States ve Registry, 2001).

Genetik faktörlerden tümör supresör protein 53 (p53) mutasyonu, apoptoz ve sitrik asit döngüsünde görevli İzositrat dehidrogenaz 1 (*IDH1*) ve İzositrat dehidrogenaz 2 (*IDH2*) genlerindeki mutasyonlar gliomada risk faktörü oluşturmaktadır (Kheirollahi vd., 2015).

17. kromozomun uzun kolunda meydana gelen anomaliler nöroblastomada görülmektedir. Spinal kord ve beyin arasında bulunan meningeden köken alan meningiomada 22. kromozomun kısa kolunda bulunan NF2 genindeki mutasyonlar, 1, 6, 18, 14. kromozomlarda parça kayıpları ve 1, 9, 12, 15, 17 ve 20. kromozomlarda parça kazanımları ile karakterize edilmektedir (Kheirollahi vd., 2015). Meningiomada hormonlara ait metabolik yolda ve DNA tamir mekanizması proteinlerine ait genlerde meydana gelen delesyonlar gözlenmektedir (Barnholtz Sloan ve Kruchko, 2007).

1.4. Glioma

Merkezi sinir sisteminde astrosit, gliodentrosit ve ependimal hücreler glial kökenli olan hücrelerdir. Bu glial hücrelerden kökenlenen ve beyin tümörleri içerisinde en yaygın görülen malignant kanser tipleri glioma olarak adlandırılır. Glioma merkezi sinir sisteminin herhangi bir yerinde görülebilir. Fakat primer olarak görüldüğü yer beyindir (Ostrom vd., 2014). Malignant beyin tümörlerinin % 81'i Glioma'dır (Ostrom vd., 2014). Dünya sağlık örgütü tarafından yapılan histolojik sınıflandırmaya göre gliomalar, kendi içlerinde Grade I, II, III, IV olmak üzere 4 farklı alt tipten oluşmaktadır.

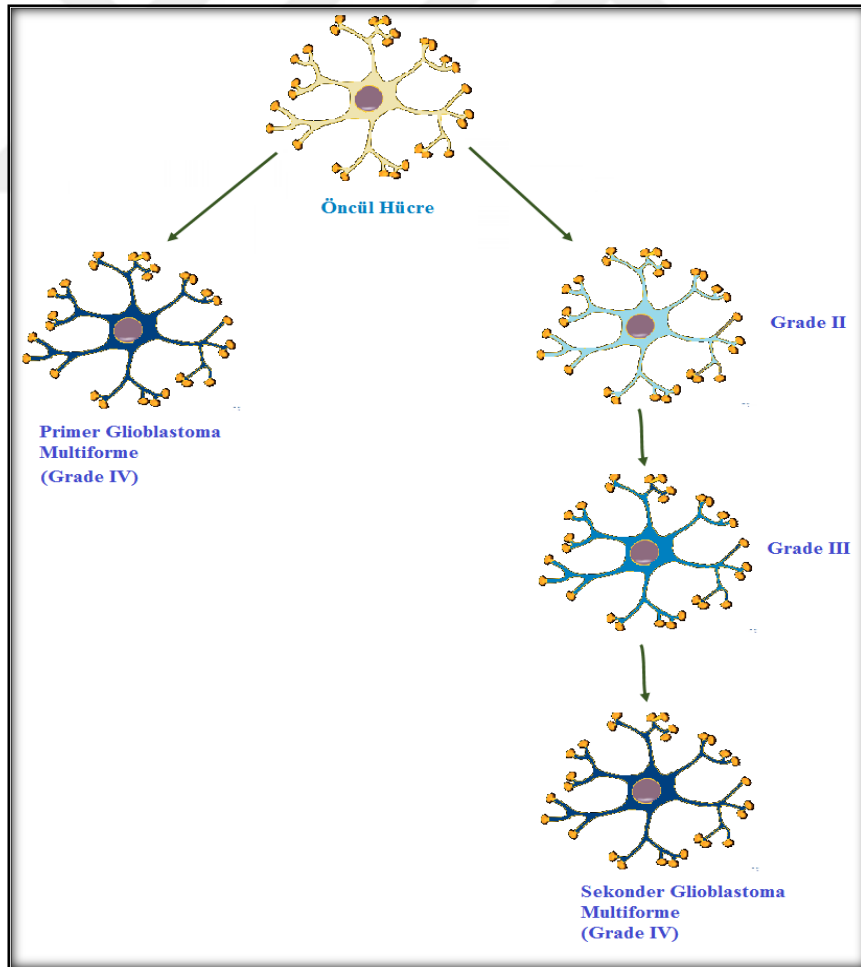
Grade I gliomalar, genellikle çocuklarda serebellum'da görülür. Bening tümör tipinde oluşur ve çok yavaş büyüme gösterir. Grade II astrosartoma, oligodentroglioma ve oligoastrosartoma kanserlerini içeren ve düşük hızda ilerleyen tümörlerdir. 20 ile 50 yaşları arasında sık görülür ve serebellum hemisferden kaynaklanır. Grade III, malignant özellik gösteren ve hızlı ilerleyen bir glioma türüdür. Çevre dokulara invazyon yapma özelliği taşır. Grade IV ise en tehlikeli ve en yaygın görülen beyin kanseri türü olan glioblastomadır. Şekil 1.4'te glioblastoma oluşumu gösterilmektedir.

1.4.1. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM), heterojenik özellikte olup, Grade IV glioma sınıfında, yaygın görülen primer beyin tümörüdür. Tüm gliomaların ortalama % 45'lik kısmını GBM oluşturmaktadır. Kanser Genom Atlası Araştırma İşbirliği (The Cancer Genome Atlas Research Network) tarafından çalışılmış ilk beyin kanseri türü olan GBM'nin belirlenmiş kesin bir etiyolojisi bulunmamaktadır. Genellikle 40 yaşlarından sonra görülür ve erkeklerde görülme sıklığı daha fazladır (Jhanwar-Uniyal vd., 2015).

GBM oluşumu teknolojik gelişmelere bağlı olarak artış göstermiştir. Japonya ve Amerika'da görülme sıklığı az gelişmiş ülkelere göre daha fazladır.

GBM tanısı koyulan hastalar genellikle 3-6 ay içerisinde hayatlarını kaybetmektedirler. Hastaların ancak % 5-10'u yaklaşık iki yıl yaşayabilmektedirler.



Şekil 1.4: Glioblastoma multifomenin primer ve sekonder alt tipinin oluşum şeması

1.4.1.1.Etiyoloji

GBM oluşumu ve gelişiminde çevresel risk faktörleri önemli bir yer tutar. İyonize radyasyon, pestisit, vinil klorit ve sigara kullanımı çevresel risk faktörleridir (Alifieris ve Trafalis, 2015). Ayrıca, GBM gelişiminde büyüme faktörü tirozin kinaz reseptör (TKR) yolağı, Ras yolağı, PTEN/AKT yolağı, PI3K yolağı, p53/MDM2 yolağı gibi hücre içi ve dışı sinyal yollarında meydana gelen genetik değişimlerde bulunur (Crespo vd., 2015).

Glioblastoma'da 3 temel sinyal yolağında değişimler söz konusudur. Bu yollar, retinoblastoma (RB) sinyal yolu, TP53 sinyal yolu ve reseptör tirozin kinaz sinyal yolağıdır. Glioblastomalarda ortak olarak görülen genetik değişimlere bakıldığında ise 6, 9, 10, 13, 17, 22 ve Y kromozomlarında kayıplar görülür. Kromozom 7, 12 ve 19'da amplifikasyonlar bulunur (Crespo vd., 2015).

1.4.1.2. Glioblastoma Multiforme'de Genetik Değişimler

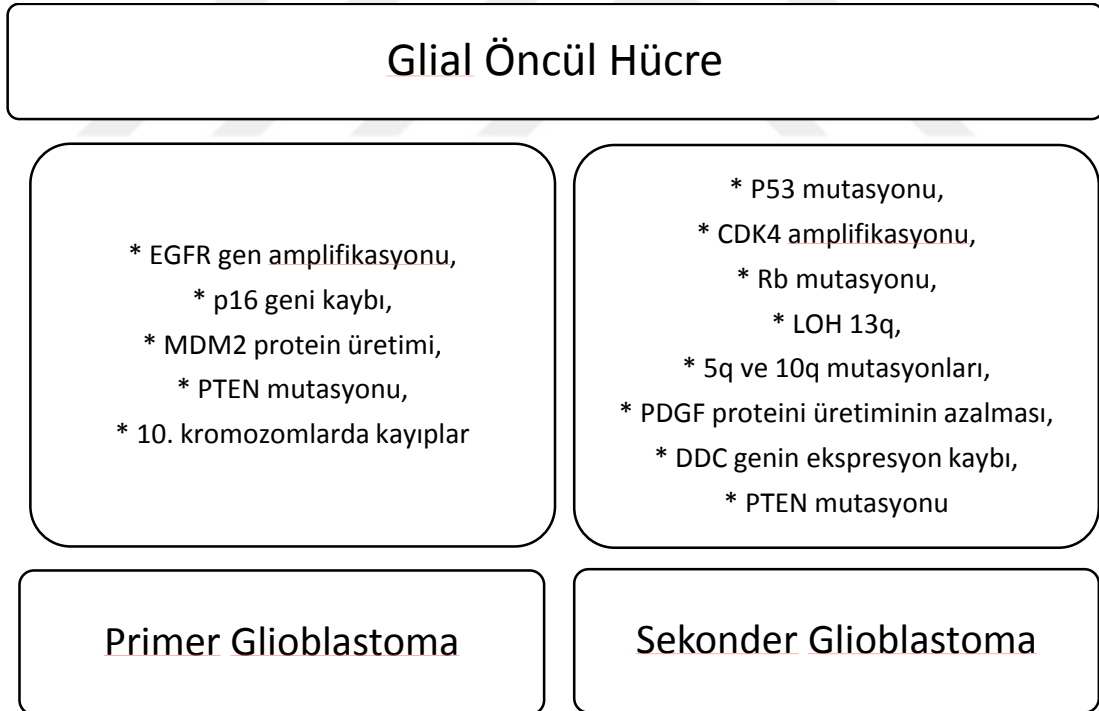
Glioblastoma multiforme çok hızlı gelişim gösteren malignant ve agresif beyin tümörüdür. Primer ve Sekonder glioblastoma olarak iki alt gruba ayrılır. Bu iki grup glioblastoma birbirinden farklı genetik profil içermektedir (Crespo vd., 2015). Şekil 1.5'te glioblastomada görülen genetik değişimler gösterilmektedir.

Büyüme Faktör Tirozin Kinaz (TKR) hedefli yolak, Ras Sarkoma yolağı, Tensin (PTEN)/Akt yolağı, Retinoblastoma (RB)/Siklin bağımlı kinaz (CDK) N2A-p16^{INK4a}, yolağı, Fosfoinositid 3 kinaz/Fosfataz yolağı ve TP53/MDM2/MDM 4/CDKN2A-p14^{ARF} yollarındaki değişimler glioblastomada görülen genetik değişimleri oluşturmaktadır (Crespo vd., 2015; Jhanwar-Uniyal vd., 2015).

Primer glioblastomada, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve Platelet Kökenli büyüme faktörü (PDGF), Tirozin kinaz hedefli yolakta ve tümör oluşumunda önemli rol oynayan proteinlerdir. EGFR amplifikasyonu, PTEN mutasyonu, p16INK4a delesyonu geç yaşta görülen glioblastomadaki genetik değişimlerdir. PI3K/PTEN/AKT yolağı, glioblastomadaki önemli bir patogenezdır. Hücre membranında PI3K birikimini, AKT ve rapamisin proteinlerini aktive eder. Bu aktivasyon hücrenin proliferasyonunu uyarır. PTEN tümör supresör geni hücre membranında PI3K birikimini düzenler. Glioblastomada PTEN geninin bulunduğu bölge olan 10q23.3'te görülen

heterozigotluğun azalması, bu genin fonksiyonunu kaybetmesine yol açarak genetik bozukluk oluşturur (Kalkan ve Atli, 2015).

Sekonder glioblastomada ise, TP53 genindeki (17p) mutasyonlar primer glioblastomaya göre daha sık görülmektedir. MGMT DNA tamir geninin promotöründe meydana gelen metilasyonlar ve IDH1-2 genlerine meydana gelen mutasyonlar sekonder glioblastomada görülen değişimlerdir. IDH1 ve IDH2 genlerinin mutasyonları genomdaki tümör supresör genlerin promotör bölgelerinin metilasyonuna yol açarak, diğer genlerde de genetik kararsızlık ve mutasyon oluşumunu tetiklemektedir (Jhanwar-Uniyal vd., 2015). Proapoptotik Bcl-2 ilişkili Harakiri (HRK) geninin bu şekilde hipermetilasyonu hücrenin apoptozdan kaçışını uyarmaktadır (Crespo vd., 2015). 10, 13, 19 ve 22. kromozomlarda heterozigotik bölgelerin azalması sekonder glioblastomada çok sık görülen değişim olayıdır (Crespo vd., 2015; Jhanwar-Uniyal vd., 2015; Parker vd., 2015).



Şekil 1.5: Glioblastoma alt tiplerinde meydana gelen mutasyonların genel özeti (Durmaz ve Vural, 2007'den uyarlanmıştır.)

1.4.1.3. Teşhis ve Tanısı

GBM'li hastalarında baş ağrısı, zihinsel karışıklık, hafıza kayıpları ve odaklanma bozuklukları görülmektedir. Hastalık tanısı ve tedaviye cevap oluşumu MRI tekniği veya bilgisayarlı tomografi ile belirlenir (Alifieris ve Trafalis, 2015).

1.4.1.4. GBM Tedavisi

GBM tedavisinde hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün büyüklüğü, tümörün olduğu yer gibi prognostik faktörler önem taşımakta ve tedavi sürecini etkilemektedir (Abacıoğlu vd., 2003). Tedavi yaklaşımı olarak cerrahi yöntem ve bunu takiben kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Fakat tümörün lokalizasyonu sebebiyle cerrahi yöntem ile tümör tamamen çıkarılamamaktadır. Bu durum tümörün tekrarlamasına yol açarak, kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerini zorunlu kılmaktadır (Bozkurt vd., 2013).

Kemoterapi ilacı olarak karmustin, 5-florourasil, prokarbazin, nitrozüre, vinkristin gibi antitümör etkiye sahip bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin kan beyin bariyerini aşmaları zor olduğundan beyinde belirli konsantrasyona ulaşmaları oldukça güçtür. Kan beyin bariyerini daha kolay geçen temozolomid ise alkilleyici ajan olarak kemoterapi ilacı şeklinde kullanılmaktadır (Mamati vd., 2006).

Kemoterapi uygulamasında tümör hücreleri zaman içerisinde ilaca direnç kazanarak, tedavi sürecinin yavaşlamasına yol açmaktadır. Özellikle, ilacın kan beyin bariyerini geçişi ve hedef bölgeye ulaşması yavaşlamaktadır. Membran transport proteinlerinde oluşan mutasyonlar da yine ilacın tümör hücrelerine geçişini engellemektedir (Bozkurt vd., 2013).

Radyoterapi yöntemi de genellikle cerrahi müdahale sonucunda kalan tümör hücrelerinin yok edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu üç tedavi yaklaşımı sonucunda hastanın yaşam süresi 1-2 ay veya daha fazla uzatılabilmektedir. Ancak tedavi yaklaşımları kesin çözüm olamamaktadır (Abacıoğlu vd., 2003).

1.5. Kodrug Yaklaşımı

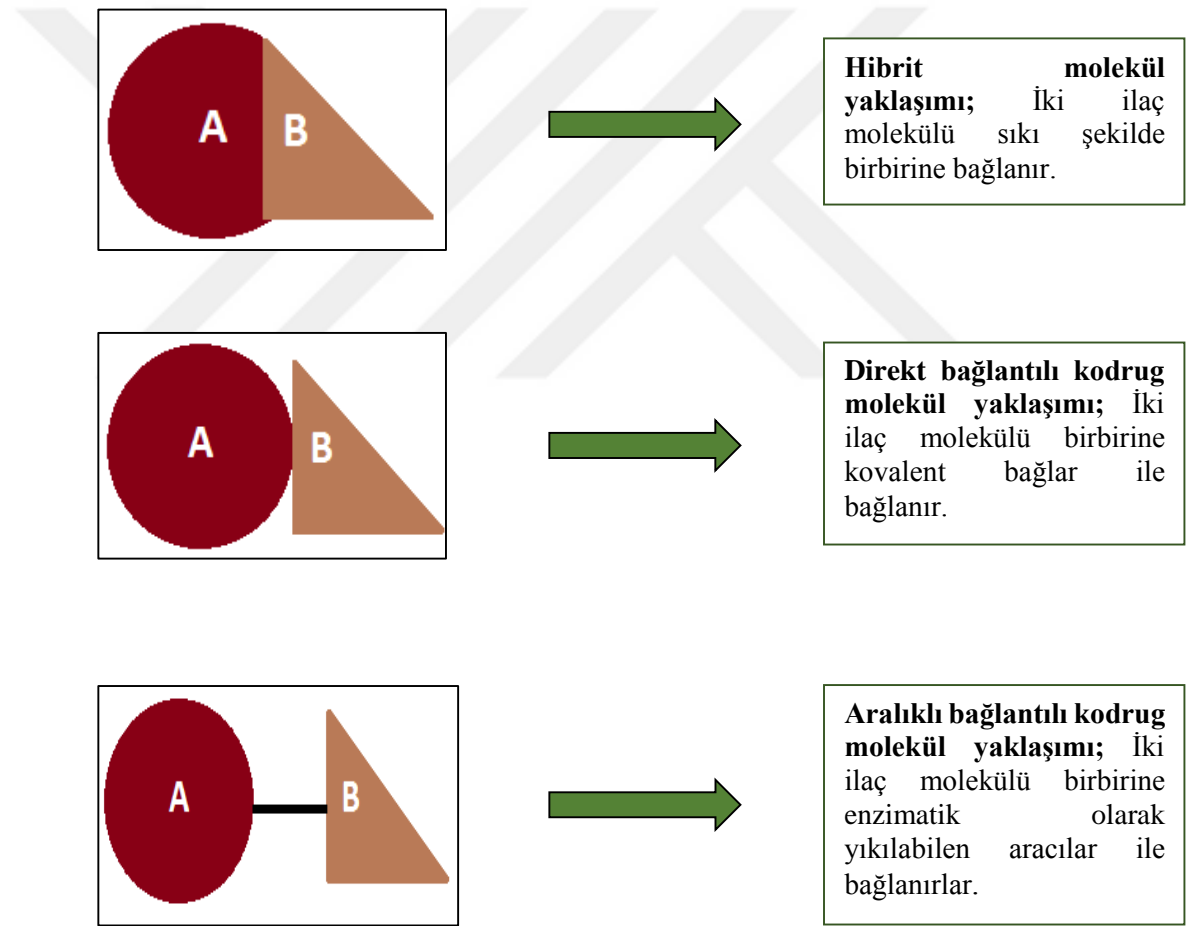
Kodrug, iki yada daha fazla terapötik bileşiğin kovalent bağlar yardımıyla birleşmesi sonucu oluşturulmaktadır (Strasinger vd., 2008). Prodrug yaklaşımından farklı olarak, bileşikler aktif gruplarını taşıırken, hedef bölgeye kolay bir şekilde taşınabilmektedir. Bu şekilde, ilacın absorpsiyonu artırılabilir. Gastrointestinal aşamada birlikte bulunan bileşikler, hedefe geldiklerinde hidroliz olarak birbirlerinden ayrılırlar ve iki farklı bileşik oluştururlar (Das vd., 2010).

Son yıllarda kodrug yaklaşımı antibakteriyal moleküllerden nörodejeneratif hastalıklara ve kansere kadar bir çok araştırma alanında ilgi çeken bir ilaç tipi olarak karşımıza çıkmaktadır (Das vd., 2010). Şekil 1.6'da kodrug uygulama alanları gösterilmiştir.



Şekil 1.6: Kodrug Uygulama Alanları (Das vd., 2010'dan uyarlanmıştır.)

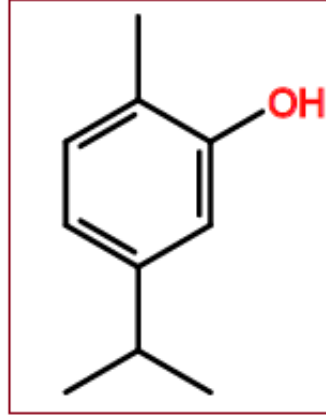
Çok Hedefli Direkt Ligand Stratejisi, iki farklı bileşiğin birlikteliği sonucu oluşur. Hibrit molekül ve kodrug olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Hibrit molekül yaklaşımında iki farklı bileşik birbirine sıkı bir şekilde bağlanarak ikili etki gösterir. Kodrug yaklaşımında ise direkt ve aralıklı bağlantılı moleküller olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta kovalent bağlarla birine bağlı iki yada daha fazla molekülden oluşur. Hedefe ulaştıklarında enzimatik olarak biyotransformasyon sonucu birbirlerinden ayrılırlar (Cacciatore vd., 2015; Strasinger vd., 2008). Şekil 1.7'de kodrug moleküllerinin oluşumları özetlenmiştir.



Şekil 1.7: Çok Hedefli Direkt Ligand Stratejisi'nin Şematik Gösterimi (Fornasari vd., 2014'den uyarlanmıştır.)

1.6. Karvakrol ve Özellikleri

Karvakrol, diğer adı ile 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, *Origanum vulgare* ve *Origanum dictamnus* gibi birçok aromatik bitkide bulunan uçucu monoterpenik bir fenoldür. (Zotti vd., 2013) Şekil 1.8’de kimyasal yapısı görülmektedir. Karvakrol’ün biyosentezi doğada γ -terpenden *p*-cymene yolu ile yapılır. Karvakrolün sentetik üretimi ise 1900’lü yılların başlarında denenmeye başlanmış olup, alkali füzyon klorilasyon reaksiyonları ile yapılmıştır (Gibbs ve Phillips, 1920; Ritter ve Ginsburg, 1950).



Şekil 1.8: Karvakrol’ün Kimyasal Yapısı

Karvakrol, Eski Mısır ve Antik Yunan dönemlerinden beri kullanılan aromatik bir bitki olan ve ülkemizde de kekik olarak bilinen bitki türünde bol miktarda bulunur. Karvakrol’ün kullanım alanlarına baktığımızda ise çok geniş bir yelpaze görmekteyiz. Gıda endüstrisinde bozulmayı önleyici paketlenme malzemesi ve ilaç endüstrisinde anti-inflamatör, anti-karsinojenik ve anti-oksidan madde olarak, aynı zamanda da anti-fungal, anti-mikrobiyal, anti-insekt ve antibiyofilm aktivitesi gibi özellikleri bakımından biyoteknoloji alanında görmekteyiz (Ramos vd., 2013) (Suntres vd., 2015).

Karvakrol, gıda paketlenme materyali olarak kullanılan yüksek yoğunluklu polietilen polimerine ek olmaktadır. Antioksidan, antimikrobiyal ve polietilen üzerinde yayılım gösterme özelliklerinden dolayı raf ömrünü uzatmak ve ürünün kalitesini arttırmak amaçlı olarak kullanılmaktadır (Peltzer vd., 2009; Ramos vd., 2013).

Karvakrol *E. coli* gibi birçok bakteri türünün üremesini inhibe etmektedir. İnsan hücrelerine olan toksisitesinin az olması (Türkez ve Aydın, 2013) nedeniyle, bakteriyel kontaminasyonu engellemek amacıyla antibakteriyel ajan olarak gıda katkı maddesi ve paketleme bileşeni olarak kullanılmaktadır.

Çevresel uyarılara karşı biyolojik sensör olarak görev yapan transient reseptör potential (TRP) kanalları, fotoreseptör, feromon hissi, tat algısı ve ağrı algısı gibi birçok önemli biyolojik olayda görev yapar. Ca^{++} iyonlarına karşı geçirgen olan bu reseptörlerin işleyişi karvakrol tarafından düzenlenir ve Ca^{++} homeostasisi dengelenir (Suntres vd., 2015).

Karvakrol insan glioblastoma hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca karvakrol intrasellüler Ca^{++} depolarını bozarak Ca^{++} seviyesini yükseltir ve ekstrasellüler ortama Ca^{++} çıkışına neden olur. Bu şekilde apoptoz ve nekroz yollarından birini uyararak hücre ölümüne yol açar (Liang ve Lu, 2012).

Karvakrol'in önemli bir özelliği de sinir sistemi üzerindedir. Alzheimer hastalığı için prodrug olma özelliği taşımaktadır. Asetilkolin, beyinde hafıza ve bellek oluşumu ile ilişkili bir nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz bu nörotransmitter molekülü parçalayan bir enzimdir ve Alzheimer tedavisinde önemli bir markır olarak kullanılmaktadır. Tedavi yaklaşımı olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Fenolik hidroksil grupları varlığından dolayı karvakrol, Asetilkolinesteraz enzimine bağlanarak fonksiyonunun kaybolmasına yol açar ve inhibitörü olarak prodrug yaklaşımında kullanılabilir (Jukic vd., 2007). Ayrıca, Karvakrol nöronal apoptosisi azaltır. Bu da beyinin serebral bölgesinde meydana gelen felçlerde, karvakrol'ün apoptosisi azaltma özelliği ve PI3K/Akt sinyal yolu ile doğrudan ilişkilidir (Yu vd., 2012).

Karvakrol, aromatik amino asitlerin sentezlendiği shikimate yolağında önemli bir rolü olan Chorismate mutaz enziminin inhibitörü olma özelliği taşır. *Mycobacterium tuberculosis*'te yapılan bir çalışmada, karvakrolün aktif bölgesi enzimin Arg134 ve Arg72 amino asitleri ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Alokam vd., 2014).

Karvakrol, biyolojik olarak aktif bir molekül olduğundan dolayı geleneksel tıpta oldukça fazla kullanılmaktadır. Modern tıpta da özellikle antimutajenik ve antikanserojen özelliklerinden dolayı ilgi çeken bir molekül durumundadır. Karvakrolün bu çok yönlü özelliği, karvakrol ve türevlerine olan ilgiyi arttırmıştır. Bu bağlamda, doğada kendiliğinden bulunan ve bunların yanında yeni karvakrol türevlerinin dizaynı, sentezi ve

karakterizasyonu çalışmaları yapılmış ve bunların biyolojik aktiviteleri incelenmeye çalışılmaktadır.

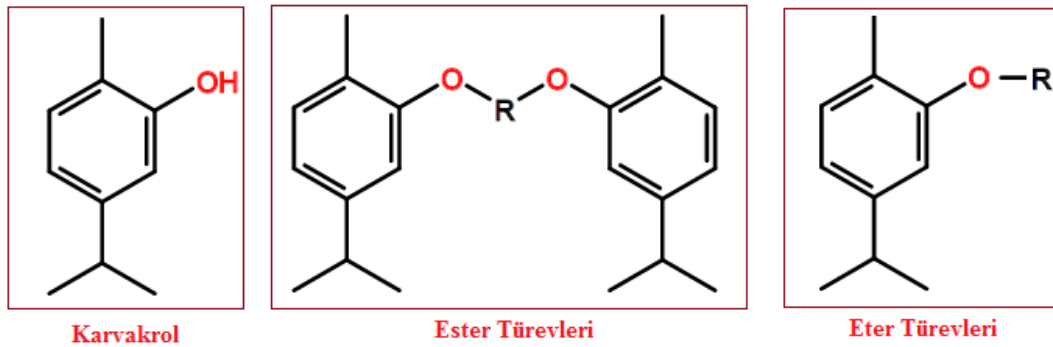
1.7. Karvakrol Türevi Bileşikler

Doğal bileşiklerin biyolojik aktivitelerindeki zenginlik, bilim insanlarını, bu bileşiklerin kimyasal modifikasyonlarını ve modifiye biyolojik aktivitelerini araştırmaya sevk etmiştir. Biyolojik aktivite açısından bakıldığında karvakrol bileşiği çok yönlüdür ve karvakrol bileşiğinin de türevleri sentezlenmiştir.

Son yıllarda karvakrolün farklı özelliklerde eter ve ester türevleri sentezlenmiştir. Karvakrolün eter ve ester türevlerinin moleküler formülleri Şekil 1.9'da gösterilmiştir. Bu bileşiklerin antibakteriyal, antifungal, antibiyofilm ve antikanser etkileri araştırılmaktadır.

Karvakrol türevlerinde karvakrole göre biyolojik potansiyelde değişiklikler mevcuttur. Çizelge 1.1'de literatüre kazandırılmış ve biyolojik aktiviteleri tespit edilmiş karvakrol türevlerinin listesi gösterilmiştir. Biyolojik aktivite bileşikteki fonksiyonel grubun bulunduğu yere göre değişiklik göstermektedir (Nikumbh vd., 2003).

Ester karvakrol türevlerinin antibakteriyal potansiyeli, eter türevlerinden daha iyi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Ester türevlerinden olan Karvakril benzoat ve Karvakril sinnemat *B. japonicum*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. polymyxa* türlerine karşı bakterisidal etki göstermiştir. Bu sonuçlar, aromatik fenil zinciri ve olefinik zinciri varlığının ester türevi karvakrol bileşiklerinde antibakteriyal özelliği arttırdığını göstermektedir (Nikumbh vd., 2003).



Şekil 1.9: Karvakrolün Eter ve Ester Türevleri

Karvakril benzil eter ve Karvakril eter bileşikleri ile yapılan çalışmalarda eter karvakrol bileşiklerinde alifatik yan zincirdeki metilen gruplarının artışı antibakteriyal özelliğe etki etmediği bildirilmiştir (Nikumbh vd., 2003).

Karvakroldeki hidroksil grubu yerine eter grubunun eklendiği Karvakrol metil eter ve ester grubunun eklendiği Karvakrol asetat ile yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin mikroorganizmaların büyümesini inhibe etmediği gösterilmiştir. *S. cerevisiae*'nin büyümesi eter grubu taşıyan Karvakrol metil eter tarafından inhibe edilmediği de aynı çalışmada bildirilmiştir (Ben Arfa vd., 2006).

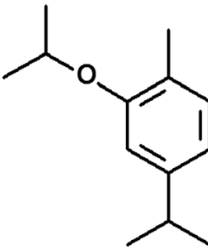
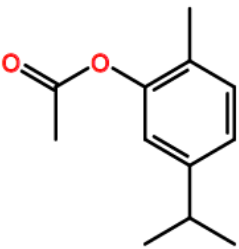
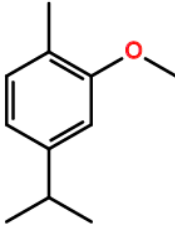
İzopropoksi karvakrol (Karvakrol izopropil eter) karvakrolden alkilleşme reaksiyonu ile üretilmiş sentetik bir karvakrol türevidir (More vd., 2007). Yapılan *in vivo* bir çalışmada bu bileşiğin antioksidan özellikte olup, farmakolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, İzopropoksi-karvakrol'un anti nosiseptif etkili olduğu da gösterilerek ağrı oluşumuna neden olan nosiseptör aracılının azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Bonfim vd., 2014).

Biyolojik aktivite bakımından özellikle inflamasyon üzerinde çalışılmış bir başka Karvakrol türevidir Karvakrol asetat (5-isopropyl-2-methyl-phenyl)'tir. Hücrel hasar veya doku yaralanmalarına karşı organizmanın geliştirdiği dinamik bir süreç olan inflamasyon, organizmayı hastalıklara karşı koruyan bir reaksiyondur. İnflamasyon makroölçekte hücrenin sitokin, büyüme faktörü, biyoaktif aminler gibi birçok moleküler kaskadın sentezini ve salınımı uyarır. Anti-inflamatör özellikteki bileşikler ise ağrı oluşumu sırasında oluşan bu moleküler kaskadın sentezini ve salınımını azaltabilirler. Bu moleküllerden birinin de Karvakrol asetat olduğu 2014 yılında yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Karvakrol asetat'ta karvakrol'un hidroksil grubu yerine ester grubu geçmiştir. Karvakrol asetat anti-nosiseptif ve anti-inflamatör özelliklere sahiptir (Damasceno vd., 2014). Başka bir çalışmada bu bileşiğin anksiyolitik benzeri aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Pires vd., 2013).

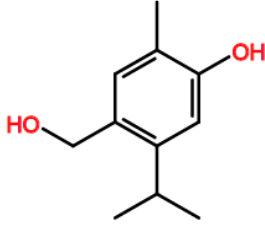
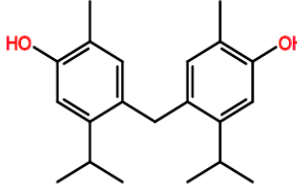
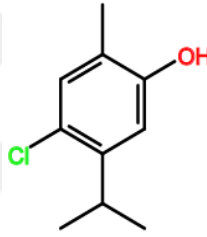
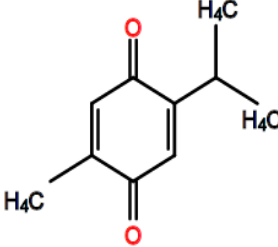
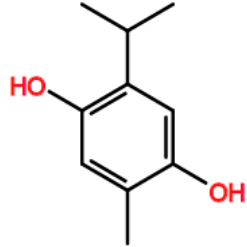
Doğada bulunan karvakrol türevi bileşiklerden olan Timokinon ve Timohidrokinon'un biyolojik aktiviteleri *in vivo* ve *in vitro* koşullar altında değerlendirilmiştir. Timohidrokinon konsantrasyona bağlı olarak, asetilkolinesteraz inhibisyon testi sonuçlarına göre, güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Ayrıca

asetilkolinesteraz inhibitörü etkilerine göre Timohidrokinon > Karvakrol > Timokinon > Timol olarak sıralanabilir. Bu bileşikler genel anti-inflamatör mekanizmasına katılırlar ve bu özelliklerinden dolayı Alzheimer hastalığı için potansiyel ilaç öncülleri (Jukic vd., 2007).

Çizelge 1.1: Literatüre Kazandırılmış Önemli Karvakrol Türevi Bileşikler

Karvakrol Türevleri	Moleküler Formülü	Biyolojik Aktivitesi	Referanslar
İzopropoksi Karvakrol (Karvakrol izopropil eter)		Merkezi ve peripherel sinir sisteminde ağrı uyarısını engelleyici özelliğe sahiptir. Ayrıca, inflammatör etkili aracı moleküllerin oluşunu azaltmaktadır.	(Bonfim vd., 2014)
Karvakril Asetat (5-isopropil-2-metil-fenil)		Davranışsal mekanizma bozukluğu olan anksiyete üzerine anksiyolitik benzeri aktiviteye sahiptir. Anksiyete hastalığına karşı alternatif bir ilaç olarak önerilmiştir. Anti-inflamatör özellik taşır.	(Damasceno vd., 2014; Pires vd., 2013)
Karvakrol metil eter (2-metoksi-1-metil-4-propan-2-benzen)		Maya büyümesini inhibe etmez. Etkili bir antimikrobiyal özellik taşımadığı rapor edilmiştir.	(Ben Arfa vd., 2006)

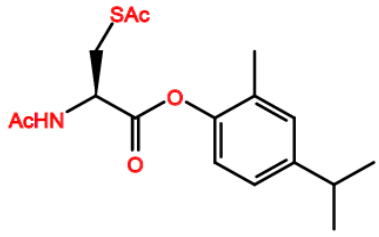
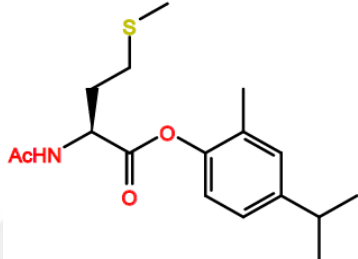
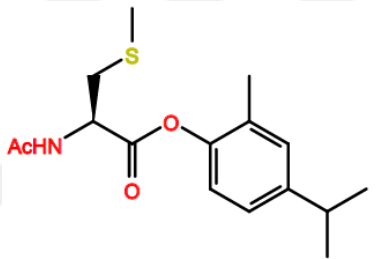
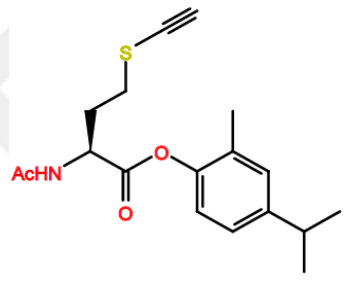
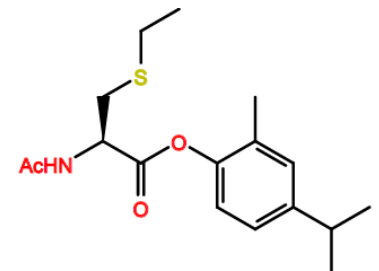
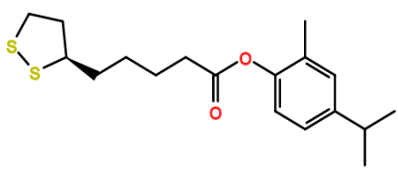
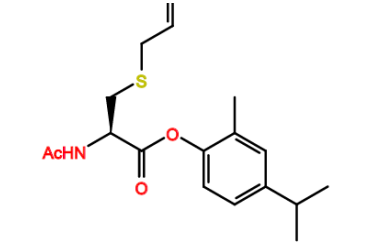
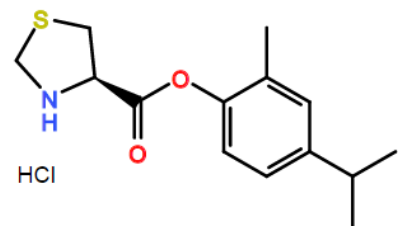
Çizelge 1.1: Literatüre Kazandırılmış Önemli Karvakrol Türevi Bileşikler (Devamı)

4-hidroksi-5-izopropil-2-metilfenol		Düşük konsantrasyonlarda (0,5-1 mM) mitokondri aktivitesini uyarır. Karvakrole göre daha az toksiktir. Antioksidan aktivitesi vardır.	(Mastelic vd., 2008)
4,4'-metilenbis(5-izopropil-2metil)fenol		Etkili antioksidan olma özelliği taşır. HeLa hücrelerinin büyümesi üzerine düşük inhibitör etki taşır.	(Mastelic vd., 2008)
4-kloro-5-izopropil-2-metilfenol		Karvakrolün Kloro Türevi Karvakrolden daha az olmak üzere anti-tüberküloz etkili bileşik olma özelliği taşır.	(Alokam vd., 2014)
Timokinon (2-metil-5-propan-2-siklohekza-2,5-dien-1,4-dion)		Genel anti-inflamatör aktiviteye katılarak, Alzheimer'a karşı koruyucu etki gösterir.	(Jukic vd., 2007).
Timohidrokinon (2-metil-5-propan-2-benzen-1,4-diol)		Güçlü Asetilkolinesteraz inhibitörüdür.	(Jukic vd., 2007)

1.7.1. Tez Kapsamında Test Edilen Karvakrol Türevi Bileşikler

Tez kapsamında 8 adet direkt kodrug yaklaşımı ile sentezlenen karvakrol türevi kullanılmıştır. Çizelge 1.2’de bu bileşiklerin kimyasal formülleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.2: Karvakrol Türevi Bileşikler

Karvakrol Türevi Bileşikler			
1		5	
2		6	
3		7	
4		8	 HCl

Bu tez çalışmasında, İnsan Glioblastoma hücre modeli olan U87MG hücre hatlarında yeni sentezlenmiş olan Karvakrol Türevi bileşiklerin antikanser özelliklerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu doğrultuda glioblastoma hastalık modeline yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirilmesi hedeflenmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Nikumbh ve arkadaşları (2003) sentezledikleri bir seri eter ve ester karvakrol türevlerinin antibakteriyal özelliklerini incelemişlerdir. Karvakril sinnemat, Karvakril benzoat ve Karvakril asetatın antibakteriyal özellikleri olduğunu bildirmişlerdir.

Koparal ve Zeytinoğlu (2003) çalışmalarında karvakrolün Akciğer hücre hattı A549 üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Artan konsantrasyonlarda A549 hücrelerinin büyümelerini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada karvakrolün hücrelerin morfolojilerini değiştirdiği ve apoptozise yol açtığı bulunmuştur.

Arfa ve arkadaşları (2006) karvakrolde bulunan serbest hidroksil grubunun antimikrobiyal özelliğe olan katkısını araştırmışlardır. Karvakrol asetat ve karvakrol metil eter ile yaptıkları karşılaştırmalar sonucu, serbest hidroksil grubu taşımayan karvakrol türevlerinin anti mikrobiyal özellik göstermediğini bildirmişlerdir.

Xu ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada, karvakrolün deri epitel hücrelerinde, dilde ve burunda bulunan TRPV3 kanalını aktive ederek G-protein ilişkili sinyal kaskatını başlattığını göstermişlerdir. Çalışmada, Karvakrole cevap olarak hücre içindeki Ca^{++} seviyesinin arttığı, ayrıca karvakrolün TRPA1 kanalını aktive ettiği bildirilirken, mentol tarafından aktive edilen kanallar ve TRPM8 kanalı ise karvakrol tarafından aktive edilemediği gösterilmiştir.

Jukic ve arkadaşları (2007) karvakrol türevleri olan Timokunin ve timohidrokinin'in güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir.

More ve arkadaşları. (2008) çalışmalarında polimer destekleyici metot (Polymer Supported methodologies) kullanarak çeşitli eter ve ester karvakrol türevlerini sentezlemişlerdir. Bu çalışmada Amberlite IRA 400'i en iyi destekleyici ajan olarak belirlemişlerdir. Aseton, asetonitril, etanol, tetrahidrofur, diklorometan gibi destekleyici resin için kullanılan solventler arasında en iyi solventin deneysel olarak aseton olduğu bulunmuştur.

More ve arkadaşları (2008) pestisitlere karşı biyolojik aktivitesi olan karvakrolün ilk defa sentezledikleri eter ve ester türevi bileşikleri aşağıdaki gibidir:

1. Ethyl-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ether
2. Butyl-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ether
3. Ethanedioic acid-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ester

4. Propanedioic acid-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ester
5. Butanedioic acid-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ester
6. Pentanedioic acid-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ester
7. Hexanedioic acid-1,2-bis[2-methyl-5-(1-methylethyl)phenyl] ester

Silva V. B ve Cavalcanti S. C. H. (2008) yapmış oldukları bir çalışmada çeşitli karvakrol türevi bileşiklerin *Aedes aegypti*'ye karşı larvacidal aktivitelerini incelemişlerdir. Eter türevi olan Metil Karvakrol'de en iyi larvasidal aktivite olduğunu bildirmişlerdir. Ester karvakrol türevlerinde ise larvasidal etki gözlememişlerdir.

Landa ve arkadaşları (2009) çalışmalarında, *in vitro* koşullarda karvakrolün anti-inhibitör etkisini göstererek prostaglandin E2 biyosentezinde görevli COX-2 enzimi ile karvakrolün ilişkisini göstermişlerdir. Karvakrol inflammatör durumda seviyesi artan COX-2 enzimini inhibe ederek, ağrıya neden olan prostaglandin E2 üretimini azaltmıştır.

Mehdi ve arkadaşları, (2011) yaptıkları bir çalışmada, karvakrolün insan serviks kanser hücrelerine olan sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Karvakrolü potansiyel antikanser ajanı olarak tanımlayıp, büyümeyi inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Yin ve arkadaşları (2012) çalışmalarında karvakrolün HepG2 hücrelerini Kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoza götürdüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, Karvakrolü karaciğer hastalıkları için potansiyel bir molekül olarak önermişleridir.

Yılmaz ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada, Glioblastoma tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin hastanın sağ kalım süresi üzerinde eşit etkili olduğunu klinik yöntemlerle göstermişlerdir (Yılmaz vd., 2012).

Damasceno ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, karvakrol asetat'ın inflamasyon oluşumunu sağlayan aracı moleküllerin miktarını azaltarak hücre içerisinde anti-inflamatör molekül olarak davrandığını bildirmişlerdir (Damasceno vd., 2014).

Pires ve arkadaşları (2013) karvakrol asetatın bir başka özelliği olan anti-anksiyetik molekül olmasını ortaya çıkarmışlardır. Karvakrol asetat, karvakrol gibi anksiyete hastalığı için yeni bir terapötik bileşik olarak önerilmiştir (Pires vd., 2013).

Türkez ve Aydın (2013) çalışmalarında, 100 mg/L üzeri konsantrasyonlarda, d-limonene, α -pinene, linalool gibi birçok monoterpenin sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstererek, karvakrolün de 150-200 mg/L konsantrasyonlarında, insan kan hücre kültürlerinde, hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını MTT ve LDH testleri ile

belirlenmişlerdir. Bu sitotoksitenin nedeninin ise oksidatif stres olduğu düşünölmüş, genotoksik ve mutajenik etkisine ise rastlanmamıştır.

Liang ve arkadaşları (2013) çalışmalarında OC2 insan oral kanser hücreleri üzerinde karvakrolün sitozolde serbest halde bulunan Ca^{++} üzerine etkilerini incelemişlerdir. Karvakrolün intrasellöler Ca^{++} stoklarını bozarak, hücre içi Ca^{++} seviyesini yükselttiğini bildirmişlerdir.

Bonfirm ve arkadaşları (2014) çalışmalarında, karvakrol türevi olan izopropoksi karvakrolün antinosisseptif ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma ile izopropoksi karvakrolü yeni bir terapötik bileşik olarak önermişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Tez kapsamındaki araştırmalarda kullanılan U87MG insan Glioblastoma hücre modeli Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan kitler ve diğeri kimyasal malzemeler Tablo 3.1’de, cihazlar ise Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Araştırmada Kullanılan Kit ve Kimyasal Listesi

Kitler	Alındığı Firma
MTT Cell Proliferation Assay Kit	Chemicon® (Germany)
LDH Assay Kit	Cell Biolabs (Chinese)
Kimyasallar	Alındığı Firma
DMEM	Sigma-Aldrich® (Germany)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco® (USA)
L-Glutamine	Gibco® (USA)
PBS	Sigma-Aldrich® (Germany)
Tripan Blue	Sigma-Aldrich® (Germany)
DMSO	Sigma-Aldrich® (Germany)
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich® (Germany)
Etanol	Sigma-Aldrich® (Germany)
Triton-X-100	Cell Biolabs (Chinese)

Çizelge 3.2: Araştırmada Kullanılan Cihaz Listesi

Cihazın Adı	Modeli
Spektrofotometre	Biotek EPOCH, Mikroplate Spectrofotometer Visible/UV
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™ Class II Biological Safety Cabinet
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Celculture CO ₂ Incubator CCL-170B-8
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
İnvert Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10

3.2. Metod

3.2.1. Tez Kapsamında Test Edilecek Karvakrol Türevlerinin Sentez ve Karakterizasyonu

Test kapsamında test edilen karvakrol türevi bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri 2015 yılında Ivana Cacciatore ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada belirlenmiştir. Aynı karvakrol türevleri, antikanser etkinliklerinin araştırılması için Ivana Cacciatore rehberliğinde yeniden sentezlenmiştir. Bileşiklerin sentezlenme metodları ve aşağıda açıklanmıştır. Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te sentezlenme basamakları gösterilmiştir.

Genel Asetilasyon Metodu

Asetik anhidrid (6,6 mmol) asetik asit içerisindeki alkilli sistein türevlerine karıştırılarak eklendi. Bu reaksiyon karışımı 1 saat oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda vakum yardımıyla solvent uzaklaştırılarak N-asetilli amino asit elde edildi.

N-Ac-Cys(Trt)-OH (16)

Verim: 59%; $R_f = 0.11$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 1.80$ (s, 3H, Ac), 2.32-2.46 (m, 2H, Cys β -CH₂), 4.05-4.18 (m, 1H, Cys α -CH), 7.20-7.34 (m, 15H, Ar), 8.22-8.24 (d, 1H, Cys NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 23.3$ (Ac), 33.91 (Cys β -CH₂), 52.34 (Cys α -CH), 66.43 (C Trt), 126.12-143.98 (Ar), 178.6 ve 178.8 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Methyl)-OH (17)

Verim: 99%; $R_f = 0.11$, $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 1.83$ (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Cys S-CH₃), 2.66-2.84 (m, 2H, Cys β -CH₂), 4.36-4.40 (m, 1H, Cys α -CH), 8.21-8.24 (d, 1H, Cys NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 15.88$ (Cys S-CH₃), 23.04 (Ac), 35.74 (Cys β -CH₂), 52.20 (Cys α -CH), 173.05 ve 178.31 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Ethyl)-OH (18)

Verim: 97%; $R_f = 0.24$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 1.11$ -1.19 (t, 3H, Cys S-CH₂CH₃), 1.82 (s, 3H, Ac), 2.51-2.55 (q, 2H, Cys S-CH₂CH₃), 2.67-2.90 (m, 2H, Cys β -CH₂), 4.32-4.36 (m, 1H, Cys α -CH), 8.22 (d, 1H, Cys NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 15.22$ (Cys S-CH₂CH₃), 23.02 (Ac), 26.06 (Cys S-CH₂CH₃), 33.10 (Cys β -CH₂), 52.70 (Cys α -CH), 169.99 ve 172.96 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Allyl)-OH (19)

Verim: 97%; $R_f = 0.62$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 1.81$ (s, 3H, Ac), 2.59-2.80 (m, 2H, Cys β -CH₂), 3.13-3.15 (d, 2H, Cys S-CH₂CHCH₂), 4.35-4.39 (m, 1H, Cys α -CH), 5.07-5.12 (m, 2H, Cys S-CH₂CHCH₂), 5.63-5.80 (m, 1H, Cys S-CH₂CHCH₂), 8.20-8.23 (d, 1H, Cys NH), 12.60 (br s, 1H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO-d_6): $\delta = 23.03$ (Ac), 32.18 (Cys β -CH₂), 34.66 (Cys S-CH₂CHCH₂), 52.35 (Cys α -CH), 118.09 (Cys S-CH₂CHCH₂), 134.88 (Cys S-CH₂CHCH₂), 169.94 ve 172.94 (2 x CO).

N-Ac-Met(Se)-OH (23)

Verim: 99%; $R_f = 0.11$, AcOEt:MeOH (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO- d_6): $\delta = 0.92$ (s, 3H, Met Se- CH_3), 1.33 (m, 2H, Met γ - CH_2), 1.84 (s, 3H, Ac), 1.95-2.15 (m, 2H, Met β - CH_2), 4.48-4.55 (m, 1H, Met α -CH), 8.05-8.08 (d, 1H, Met NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO- d_6): $\delta = 11.91$ (Se- CH_3), 22.74 (Met β - CH_2), 23.35 (Ac), 25.42 (Met γ - CH_2), 57.18 (Met α -CH), 174.57 ve 179.11 (2 x CO).

Genel Alkilasyon Metodu

Ticari olarak mevcut olan NAC (6,13 mmol) ve KOH (13,48 mmol) 1 ml Metanol içerisinde hazırlandı ve Propargalik bromid (7,36 mmol) içerisine eklendi. 1 saat reflüks edildi. Solventin uçurulmasının ardından kalan maddeler su ile alındı. Bu madde 1 N pH:2 HCl ile asitleştirilerek AcOEt ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve vakum altında buharlaştırıldı.

N-Ac-Cys(Propargyl)-OH (20)

Verim: 99%. $R_f = 0.1$, CH_2Cl_2 :MeOH (9:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO- d_6): $\delta = 1.85$ (s, 3H, Ac), 2.78 (d, 2H, Cys β - CH_2), 3.18 (s, 1H, S- CH_2CCH), 3.33 (s, 2H, S- CH_2CCH), 4.39 (m, 1H, Cys α -CH), 8.24-8.26 (d, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, DMSO- d_6): $\delta = 22.52$ (Cys S- CH_2CCH), 23.18 (Ac), 32.04 (Cys β - CH_2), 52.45 (Cys α -CH), 73.91 (Cys S- CH_2CCH), 77.03 (Cys S- CH_2CCH), 178.66 ve 178.81 (2 x CO).

Genel Coupling Reaksiyon Metodu

16-20, 23-26 ve 28 numaralı bileşikler (5,1 mmol) 2 ml DMF ve 10 ml DCM içerisinde çözüldüler. Ardından 5,1 mmol DCC eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu reaksiyon karışımına DMAP (0,16 mmol) ve karvakrol (5,1 mmol) eklendi ve bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Basınç filtrasyonun azaltılmasından sonra, solvent uçuruldu ve kalan maddeler AcOEt/NaCl ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz Na_2SO_4 ve vakum yardımıyla kurutuldu. DCM/AcOEt ile kromotografik saflaştırma gerçekleştirildi.

N-Ac-Cys(Methyl)-CAR (2)

Verim: 30%. $R_f = 0.62$, DCM:AcOEt (1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.19$ - 1.23 (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 2.04 (s, 3H, SCH_3), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.22 (s, 3H, Ac), 2.78-2.91 (m, 1H, *i*-Pr), 3.08-3.21 (m, 2H, Cys β - CH_2), 5.08-5.15 (m, 1H, Cys α -CH), 6.55-6.57 (d, 1H, NH), 6.68-7.16 (m, 3H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 15.75$ (SCH_3), 16.69 (CH_3), 23.29 (Ac), 24.13-24.29 (2x CH_3 , *i*-Pr), 33.91 (CH *i*-Pr), 36.58 (Cys β - CH_2), 52.25 (Cys α -CH), 113.26-148.50 (Ar), 169.83 ve 170.66 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Ethyl)-CAR (3)

Verim: 32%; $R_f = 0.67$, DCM:AcOEt (1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21$ (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 1.29 (t, 3H, SCH_2CH_3), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.15 (s, 3H, Ac), 2.60-2.68 (m, 2H, SCH_2CH_3), 2.82-3.07 (m, 2H, Cys β - CH_2), 5.08-5.12 (m, 1H, Cys α -CH), 6.38-6.41 (d, 1H, NH), 6.87-7.16 (m, 3H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 14.97$ (SCH_2CH_3), 16.13 (CH_3), 23.40 (Ac), 24.13 (CAR, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 27.15 (SCH_2CH_3), 33.78 (CH *i*-Pr), 34.05 (Cys β - CH_2), 52.31 (Cys α -CH), 119.67-148.46 (Ar), 162.81 ve 170.63 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Allyl)-CAR (4)

Verim: 35%; $R_f = 0.79$, DCM:AcOEt (1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.19$ - 1.21 (d, 6H, *i*-Pr), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.78-2.83 (m, 1H, *i*-Pr), 2.85-3.08 (m, 2H, Cys β - CH_2), 3.17 (d, 2H, $\text{SCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.02-5.09 (m, 1H, Cys α -CH), 5.10-5.19 (m, 2H, $\text{SCH}_2\text{CHCH}_2$), 5.71-5.82 (m, 1H, $\text{SCH}_2\text{CHCH}_2$), 6.24-6.27 (d, 1H, NH), 6.83-7.18 (m, 3H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 15.76$ (CH_3),

23.30 (Ac), 24.14-24.29 (2 x CH₃, *i*-Pr), 32.25 (CH *i*-Pr), 32.93 (Cys β-CH₂), 35.59 (S-CH₂CHCH₂), 58.62 (Cys α-CH), 118.52 (SCH₂CHCH₂), 121.44-131.33 (Ar), 133.59 (SCH₂CHCH₂), 170.95 ve 199.09 (2 x CO).

N-Ac-Met-CAR (5)

Verim: 47%; R_f = 0.74, DCM:AcOEt (1:1); ¹H-NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl₃): δ = 1.20-1.25 (d, 6H, 2 x CH₃, *i*-Pr), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, SCH₃), 2.11-2.44 (m, 2H, Met β-CH₂), 2.63-2.68 (m, 2H, Met γ-CH₂), 2.82-2.91 (m, 1H, CH *i*-Pr), 4.97-5.04 (m, 1H, Met α-CH), 6.25-6.27 (d, 1H, NH), 6.85-7.16 (m, 3H, Ar). ¹³C-NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl₃): δ = 15.81 (SCH₃), 16.10 (CH₃), 23.39 (Ac), 24.13 (2 x CH₃, *i*-Pr), 30.39 (CH *i*-Pr), 32.06 (Met γ-CH₂), 33.79 (Met β-CH₂), 51.99 (Met α-CH), 119.64-149.02 (Ar), 170.52 ve 170.90 (2 x CO).

N-Ac-Met(Se)-CAR (6)

Verim: 35%; R_f = 0.65, DCM:AcOEt (1:1); ¹H-NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl₃): δ = 1.20-1.23 (d, 6H, 2 x CH₃, *i*-Pr), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.13 (s, 3H, SeCH₃), 2.17-2.46 (m, 2H, Met β-CH₂), 2.64-2.69 (m, 2H, Met γ-CH₂), 2.85-2.90 (m, 1H, CH *i*-Pr), 4.97-5.04 (m, 1H, Met α-CH), 6.25-6.27 (d, 1H, NH), 6.85-7.16 (m, 3H, Ar). ¹³C-NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl₃): δ = 4.64 (SeCH₃), 16.12 (CH₃), 20.59 (Met β-CH₂), 23.45 (Ac), 24.12 (2 x CH₃, *i*-Pr), 33.34 (Met γ-CH₂), 33.79 (CH *i*-Pr), 52.79 (Met α-CH), 119.65-149.0 (Ar), 170.34 ve 170.79 (2 x CO).

LA-CAR (7)

Verim: 38%; R_f = 0.81, DCM; ¹H-NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl₃): δ = 1.21-1.24 (d, 6H, 2 x CH₃, *i*-Pr), 1.54-1.97 (m, 8H, 4 x CH₂), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.45-2.52 (m, 1H, CH *i*-Pr), 2.57-2.62 (t, 2H, CH₂), 2.85-2.89 (m, 1H, SCH), 3.11-3.20 (m, 2H, SCH₂),

6.84-7.15 (m, 3H, Ar). ^{13}C -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.12$ (CAR CH_3), 24.16 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 25.03 (CH_2), 29.07 (CH_2), 33.79 (CH *i*-Pr), 34.27 (CH_2), 34.87 (CH_2), 38.76 (SCH_2), 40.48 (CH_2), 56.56 (SCH), 119.99-149.43 (Ar), 171.99 (CO).

N-Ac-Cys(Propargyl)-CAR (9)

Verim: 42%; $R_f = 0.23$, DCM:AcOEt (1:1); ^1H -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21$ -1.23 (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 1.63-1.88 (m, 2H, Cys β - CH_2), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.15 (s, 3H, CH_3), 2.31-2.33 (s, 1H, SCH_2CCH), 2.84-2.89 (m, 1H, *i*-Pr), 3.13-3.38 (2H, m, SCH_2CCH), 5.14 (m, 1H, Cys α -CH), 6.49-6.51 (d, 1H, NH), 6.89-7.15 (m, 3H, Ar). ^{13}C -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.15$ (CH_3), 20.31 (SCH_2CCH), 23.36 (Ac), 24.13 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 33.78 (Cys β - CH_2), 34.14 (CH *i*-Pr), 52.11 (Cys α -CH), 72.50 (SCH_2CCH), 79.45 (SCH_2CCH), 119.68-149.04 (Ar), 169.58 ve 170.41 (2 x CO).

OTC-CAR (10)

Verim: 33%; $R_f = 0.78$, DCM:AcOEt (9:1); ^1H -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21$ -1.23 (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.85-2.89 (m, 1H, *i*-Pr), 3.77-3.87 (m, 2H, OTC β - CH_2), 4.66-4.71 (m, 1H, OTC α -CH), 6.86-7.17 (m, 3H, Ar), 6.91 (s, 1H, NH). ^{13}C -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.00$ (CH_3), 24.12 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 32.28 (CH, *i*-Pr), 33.80 (OTC β - CH_2), 56.44 (OTC α -CH), 119.47-148.82 (Ar), 168.83 ve 175.08 (2 x CO).

N-Ac-Cys(Trt)-CAR (21)

Verim:33%; $R_f = 0.18$, DCM:AcOEt (1:1); ^1H -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.20$ (d, 6H, *i*-Pr), 1.99 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.67-2.95 (m, 2H, Cys β - CH_2), 4.81-4.88 (m, 1H, Cys α -CH), 6.57 (d, 1H, NH), 6.88-7.46 (m, 18H, Ar). ^{13}C -NMR (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.15$ (CH_3), 23.34 (Ac), 24.13 (2x CH_3 , *i*-Pr), 34.16 Cys (β - CH_2), 51.48 (Cys α -CH), 67.34 (C Trt), 119.76-149.11 (Ar), 168.79 ve 170.34 (2 x CO).

Boc-TCA-CAR (27)

Verim: 40%; $R_f = 0.64$, DCM; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21-1.25$ (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 1.48 (s, 9H, Boc), 2.16 (s, 3H, CH_3), 2.85-2.90 (m, 1H, *i*-Pr), 3.43-3.49 (m, 2H, TCA β - CH_2), 4.50-4.75 (m, 2H, TCA δ - CH_2), 4.96-5.16 (m, 1H, TCA α -CH), 6.85-7.15 (m, 3H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.07$ (CH_3), 24.16 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 28.55 (Boc), 33.67 (CH *i*-Pr), 35.01 (TCA β - CH_2), 48.39 (TCA δ - CH_2), 62.02 (TCA α -CH), 81.53 (Boc), 119.44-148.39 (Ar), 153.56 (OCONH), 169.23 (CO).

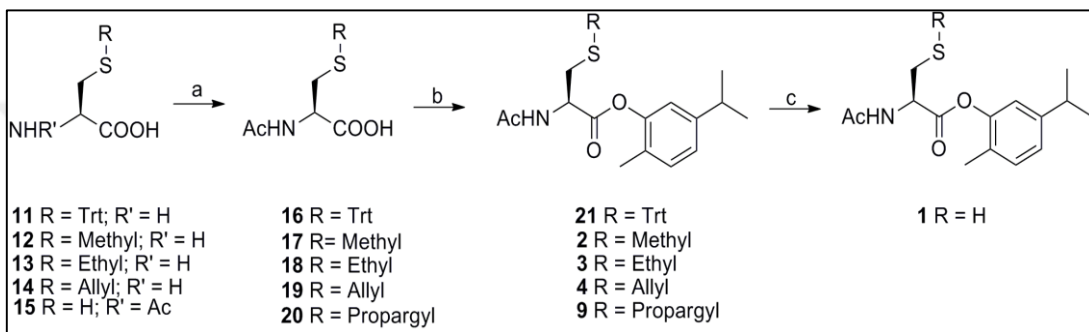
Korunmuş Grupların Çıkarılması

100 mg, 0,17 mmol olacak şekilde 21 numaralı bileşik 0,3 ml DCM içerisinde solüsyon haline getirilir. Bu solüsyon nitrojen atmosfer ortamında TIPS (0,27 ml, 0,21 mmol) ve TFA (0,52 ml, 6,8 mmol) içerisine eklendi. Oda sıcaklığında 48 saat boyunca karıştırıldı. Ardından vakum altında kurutuldu. Kalan bileşik DCM/MeOH kromatografik kolon kullanılarak pürifiye edildi.

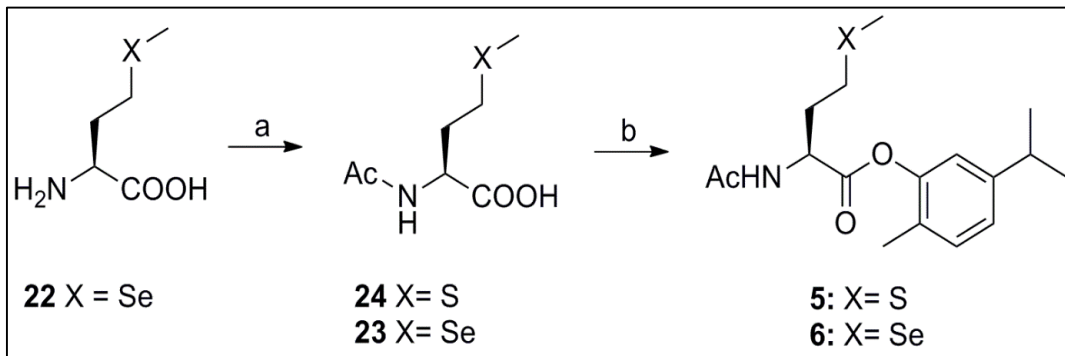
Verim: 88%; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21-1.23$ (d, 6H, *i*-Pr), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.15 (s, 3H, CH_3), 2.87 (m, 1H, *i*-Pr), 3.17-3.23 (m, 2H, Cys β - CH_2), 5.16-5.19 (m, 1H, Cys α -CH), 6.57-6.60 (d, 1H, NH), 6.87-7.17 (m, 3H, Ar). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 16.19$ (CH_3), 23.35 (Ac), 24.12 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 27.21 (CH *i*-Pr), 33.79 (Cys β - CH_2), 53.91 (Cys α -CH), 119.70-148.97 (Ar), 169.08 ve 170.32 (2 x CO).

27 numaralı bileşik 327 mg, 0,9 mmol olacak şekilde 1,35 ml TFA içerisinde solüsyon olarak hazırlandı ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

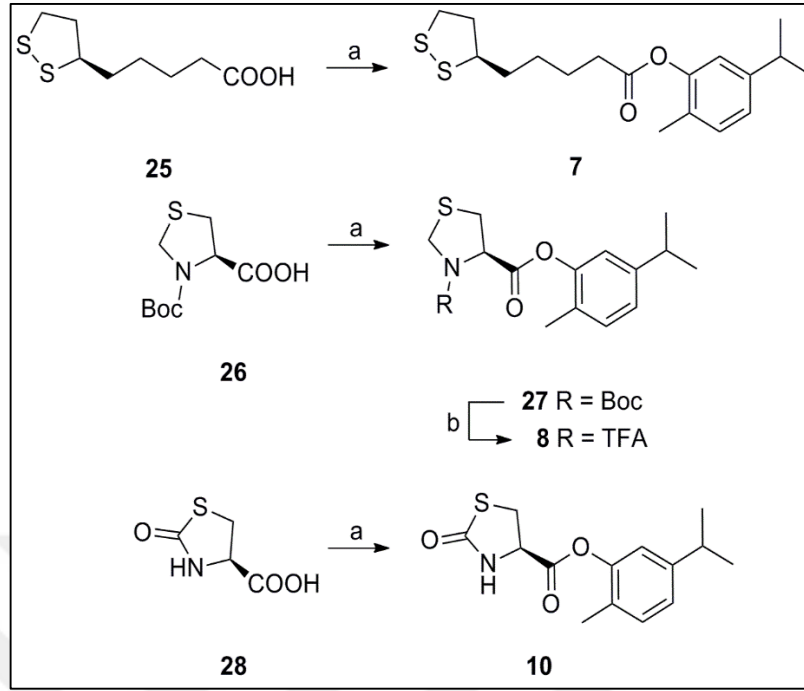
Verim: 100%; $R_f = 0.21$, DCM; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 1.21$ - 1.25 (d, 6H, 2 x CH_3 , *i*-Pr), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.84-2.90 (m, 1H, *i*-Pr), 3.54-3.64 (m, 2H, TCA β - CH_2), 4.35-4.52 (m, 2H, TCA δ - CH_2), 5.04-5.08 (m, 1H, TCA α -CH), 6.85-7.16 (m, 3H, Ar), 9.48 (s, 2H, NH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, 298.2 K, CDCl_3): $\delta = 15.69$ (CH_3), 24.00 (2 x CH_3 , *i*-Pr), 33.45 (CH *i*-Pr), 33.77 (TCA β - CH_2), 49.09 (TCA δ - CH_2), 62.82 (TCA α -CH), 119.44-148.99 (Ar), 166.24 (CO).



Şekil 3.1: 1. ve 4. Karvakrol Türevinin Sentezi (Cacciatore vd., 2015)



Şekil 3.2: 5. ve 6. Karvakrol Türevinin Sentezi (Cacciatore vd., 2015)



Şekil 3.3: 7. ve 8. Karvakrol Türevinin Sentezi (Cacciatore vd., 2015)

3.2.2. Karvakrol Türevlerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

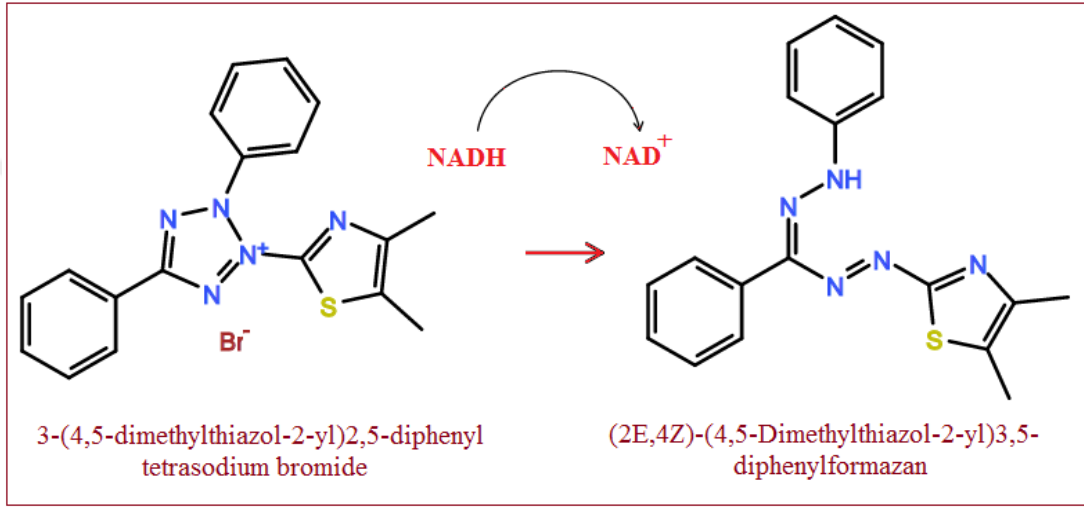
Karvakrol Türevlerinin literatür bilgisine (Aydın vd., 2014; Türkez ve Aydın, 2013b) uygun olarak 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde hücre kültürüne ekimi yapıldı. Bileşikler DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.3. Hücre Kültürü Şartları

GBM için *in vitro* model olarak U87MG hücre hattı seçilmiştir. U87MG hücreleri epitel hücre morfolojisi gösterip, yüzeye tutunma özelliği taşırlar. Bu hücreler 37 °C ve % 5 karbondioksit ortamında büyütüldüler. Bazal medyum olarak DMEM kullanıldı. Büyüme medyumunu, % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin içerecek şekilde hazırlanarak kullanıldı.

3.2.4. Hücre Canlılığının Ölçülmesi ve MTT Analizi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrasodium bromide) canlı hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazanlara [(2E,4Z)-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)3,5-diphenylformazan] dönüştürülen sarı renkli bir substrattır. Bu reaksiyon canlı hücrelerde bulunan aktif mitokondriler tarafından gerçekleştirilir ve hücre canlılığını ölçmek amacı ile kullanılır. Şekil 3.4'te MTT reaksiyonu gösterilmektedir.



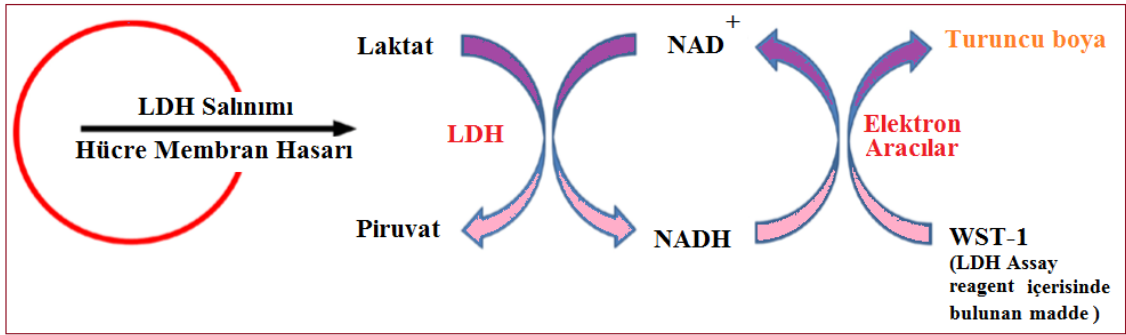
Şekil 3.4: MTT Testinin Temel Prensibi

(Şekil, Yazar Tarafından Çizilmiştir.)

Hücre canlılığı ve kullanılan karvakrol türevi bileşiklerin sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla MTT analizi Chemicon® MTT Cell Growth Assay Kit protokolüne göre yapıldı. Kısaca, 96-well plate'te büyütülen hücrelere belirlenen dozlarda bileşik uygulamasının ardından, 48 saat sonra her kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklendi. 37 °C de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her kuyuya 100 µl 0,04 N HCl içeren isopropanol eklendi ve 570 nm'de ölçüm alındı. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3.2.5.LDH Analizi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) hemen hemen her hücrede bulunan sitozolik bir enzimdir. Hücre membran bütünlüğü bozulduğu durumlarda ise ekstrasellüler ortama salınır. Şekil 3.5'te gösterildiği gibi ekstrasellüler ortamda bulunan LDH enzimi hücrelerin membran bütünlüğünün bozulduğunu ve ölüme gittiğini göstermektedir (Lynch ve Sempowski, 2013).



Şekil 3.5: LDH Analizi Temel Prensibi

(Cytoselect™ Kit Protokolünden uyarlanmıştır.)

LDH Analizi, Cell Biolabs (Chinese) Cytoselect™ kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, ml'de 1×10^6 hücre olacak şekilde 48 kuyulu platelere hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunmalarının ardından, bileşik uygulaması gerçekleştirildi. 48 saat 37° 'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerlerinin 90 µl'si yeni bir plate'e alındı. Pozitif kontrol olarak 15 µl TritonX-100 kullanıldı. Üzerine 10 µl LDH sitotoksosite testi bileşeni eklendi. Plate 30 dakika 37° 'de inkübe edildi. Süre sonunda 450 nm'de ölçüm alındı.

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Bu tez çalışmasında yapılmış olan MTT ve LDH analizi sonuçları SPSS 15.0 programı ile değerlendirilmiştir. Programda IC₂₀, IC₅₀ ve IC₈₀ değerlerinin belirlenmesi için Probit Analizi ve ortalamalar arasındaki farklılığın tayininde Duncan Testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. MTT Analizi Bulguları

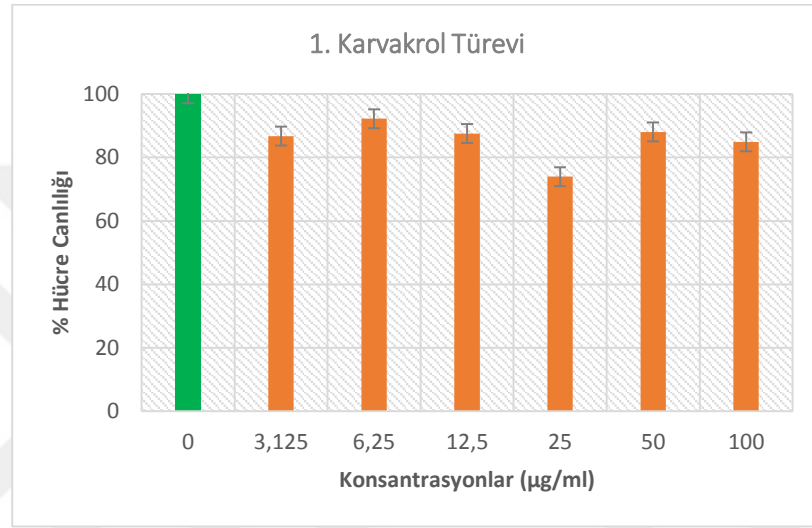
U87MG hücre hattına sekiz farklı karvakrol türevi için belirlenen doz aralıklarında MTT analizi uygulanmıştır. Azalan konsantrasyonlarda uygulanan Karvakrol Türevleri için, hücrelerin canlılıkları değerlendirilmiş ve kontrole göre karşılaştırılmıştır. Bu bileşiklerin IC₈₀, IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri çizelge 4.1’de belirtilmiştir. IC₈₀, IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri, bileşiklerin sırasıyla %80, %50 ve %20 oranlarında hücrelerin üremelerini inhibe eden değerlerdir.

Çizelge 4.1: Karvakrol Türevlerinin İnhibitör Etkili Konsantrasyonları (µg/ml)

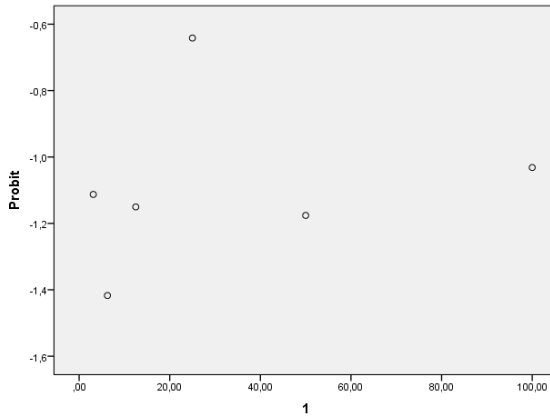
	Karvakrol Türevi 1	Karvakrol Türevi 2	Karvakrol Türevi 3	Karvakrol Türevi 4
IC₂₀	122,04	50,35	41,19	50,36
IC₅₀	367,78	129,08	105,12	125,03
IC₈₀	613,53	207,82	169,05	199,71
	Karvakrol Türevi 5	Karvakrol Türevi 6	Karvakrol Türevi 7	Karvakrol Türevi 8
IC₂₀	47,73	67,62	31,16	13,18
IC₅₀	105,65	542,07	142,67	77,66
IC₈₀	163,57	1016,51	254,17	142,14

1.Karvakrol Türevi

1.Karvakrol Türevi için konsantrasyon-% hücre canlılığı grafiği Şekil 4.1’de gösterilmiştir. % canlılık değerleri belirlemede, negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 1. karvakrol türevi artan konsantrasyonlarda belirgin bir farklılığa yol açmamıştır. Şekil 4.2’de probit analizi sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.1: 1. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.



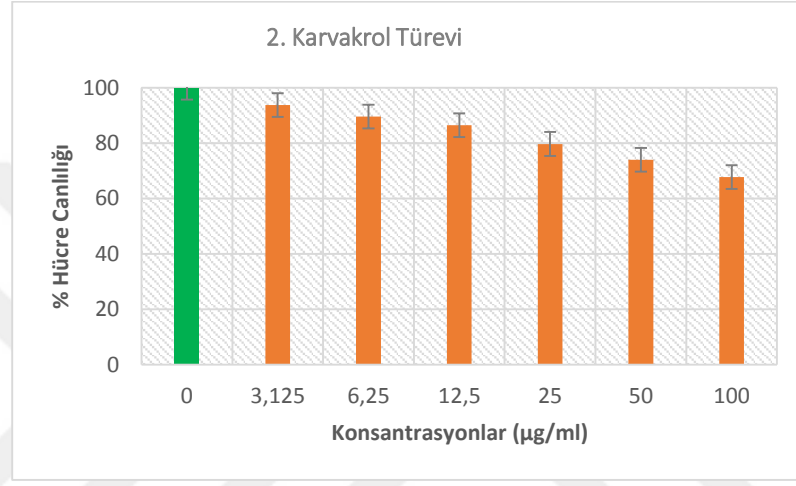
Gruplar SD

Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	91,76±1,54 ^c
6,25 µg/ml	86,82±0,38 ^b
12,5 µg/ml	86,26±1,17 ^c
25 µg/ml	73,25±0,65 ^e
50 µg/ml	87,36±0,69 ^c
100 µg/ml	83,52±1,20 ^d

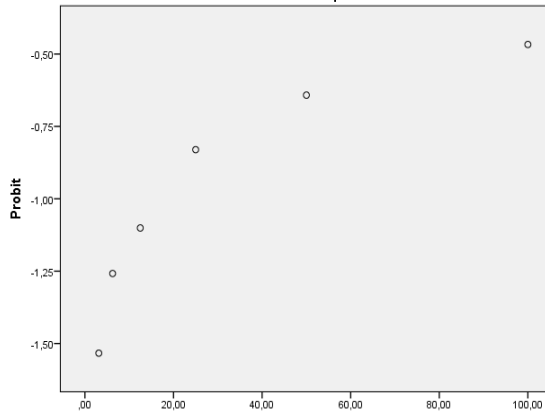
Şekil 4.2: 1.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

2.Karvakrol Türevi

2.Karvakrol Türevi için konsantrasyon-% hücre canlılığı grafiği Şekil 4.3'de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 2. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda canlılığı düşürdüğü belirlenmiştir. Şekil 4.4'te probit analizi sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.3: 2. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

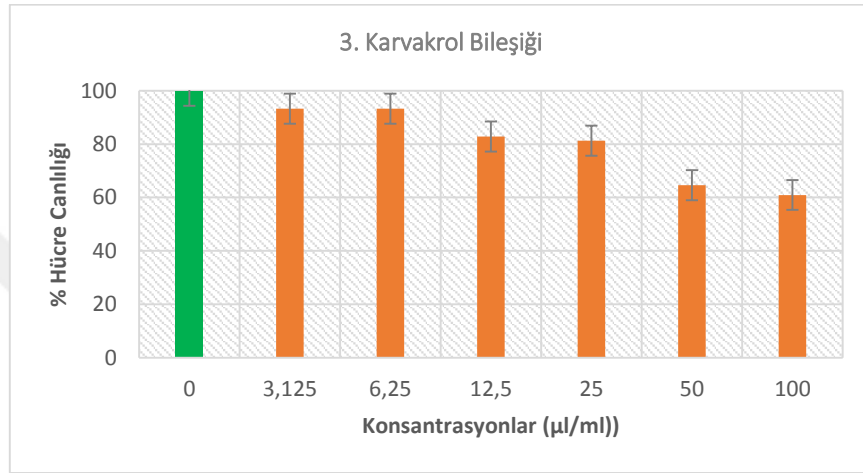


Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	94,56±0,43 ^b
6,25 µg/ml	89,24±0,34 ^c
12,5 µg/ml	86,27±0,46 ^d
25 µg/ml	79,28±0,57 ^e
50 µg/ml	73,05±0,89 ^f
100 µg/ml	66,4±1,48 ^g

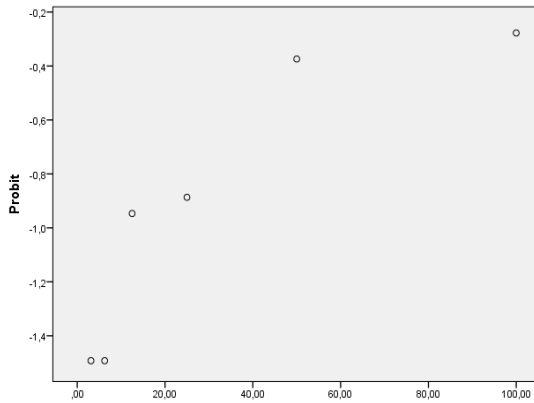
Şekil 4.4: 2.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

3.Karvakrol Türevi

3.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.5’de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 3. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda canlılığı düşürdüğü belirlenmiştir. Şekil 4.6’te probit analizi sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.5: 3. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri



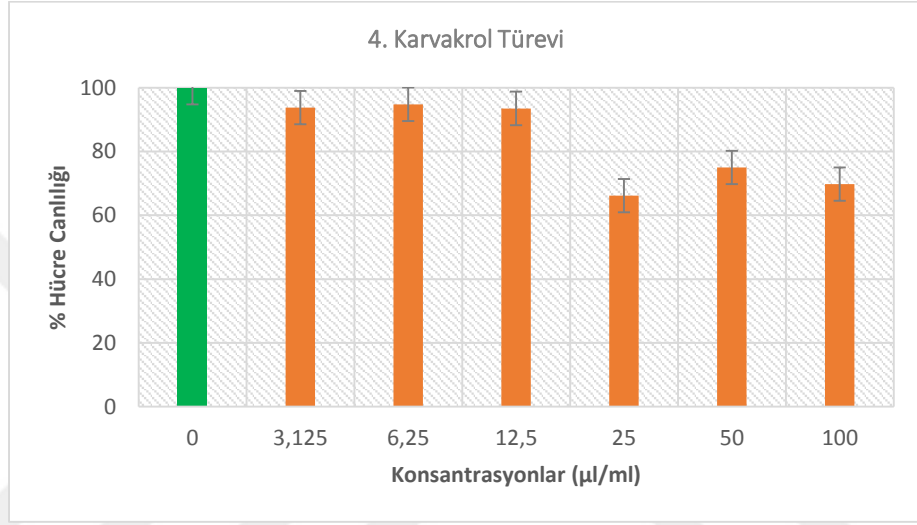
Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	93,06±0,53 ^b
6,25 µg/ml	93,22±0,48 ^b
12,5 µg/ml	82,70±0,35 ^c
25 µg/ml	81,05±0,81 ^d
50 µg/ml	63,99±0,75 ^e
100 µg/ml	60,06±0,84 ^f

Şekil 4.6: 3.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart

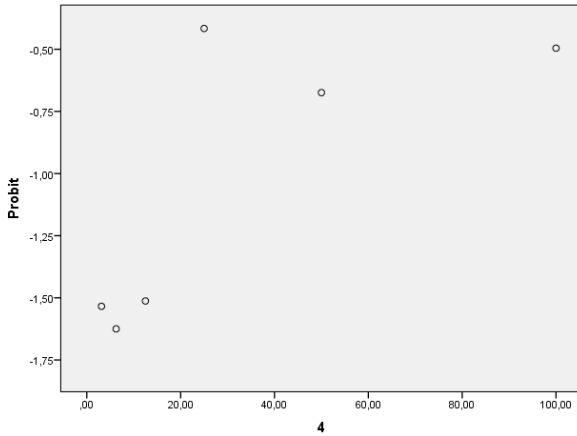
Sapma

4.Karvakrol Türevi

4.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.7’de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 4. Karvakrol türevi artan konsantrasyonlarda belirgin bir farklılığa yol açmamıştır. Şekil 4.8’de probit analizi sonucu gösterilmektedir.



Şekil 4.7: 4. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

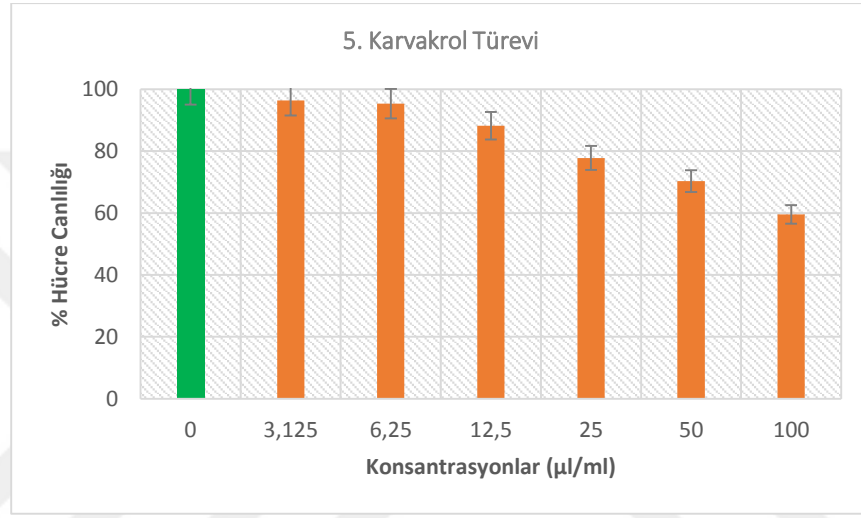


Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	93,13±0,56 ^c
6,25 µg/ml	94,22±0,79 ^b
12,5 µg/ml	93,09±0,57 ^c
25 µg/ml	65,89±0,55 ^f
50 µg/ml	75,28±0,54 ^d
100 µg/ml	70,42±0,52 ^e

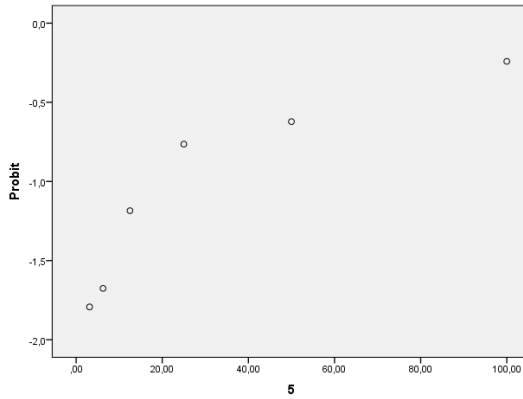
Şekil 4.8: 4.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

5.Karvakrol Türevi

5.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.9'de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 5. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda canlılığı düşürdüğü belirlenmiştir. Şekil 4.10'da probit analizi sonucu gösterilmektedir.



Şekil 4.9: 5. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

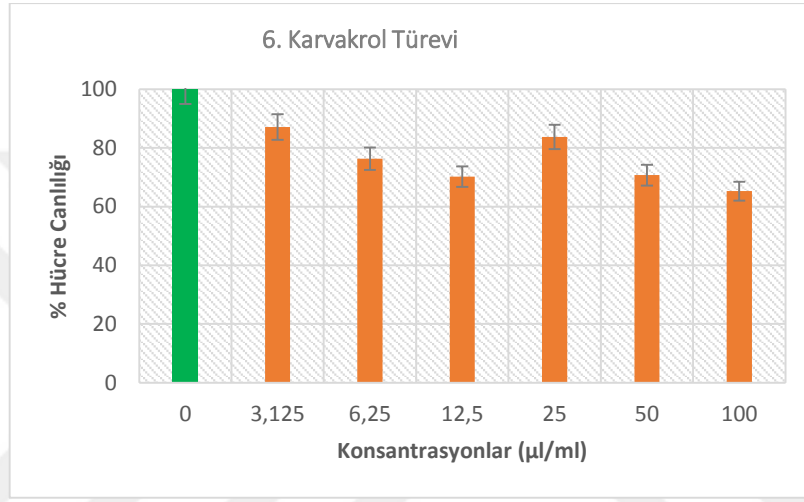


Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	96,13±1,14 ^b
6,25 µg/ml	94,96±0,73 ^b
12,5 µg/ml	88,54±0,41 ^c
25 µg/ml	77,38±0,78 ^d
50 µg/ml	70,14±0,63 ^e
100 µg/ml	57,72±2,06 ^f

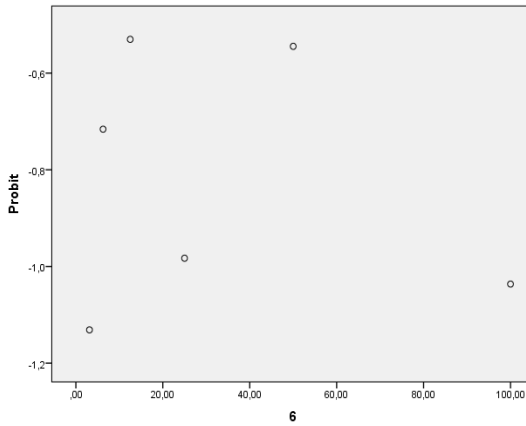
Şekil 4.10: 5.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

6.Karvakrol Türevi

6.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 6. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda belirgin bir farklılığa yol açmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.12’da probit analizi sonucu gösterilmektedir.



Şekil 4.11: 6. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri



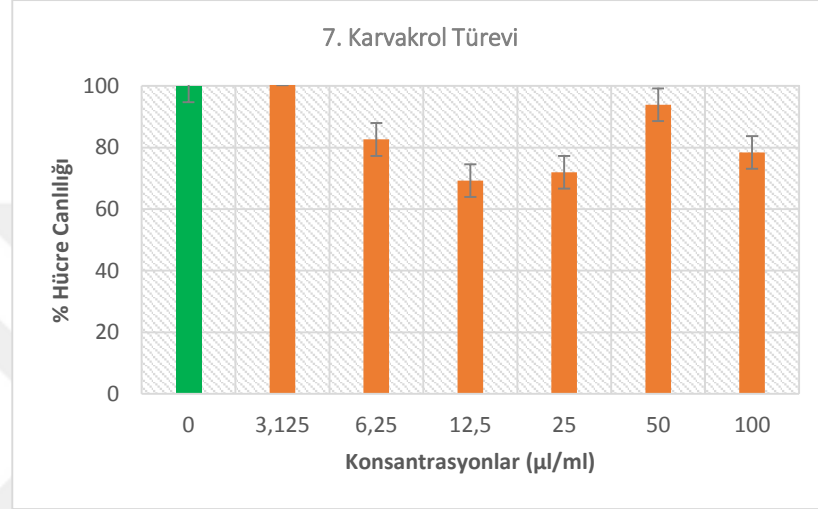
Gruplar SD

Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	86,27±0,94 ^b
6,25 µg/ml	75,86±0,42 ^d
12,5 µg/ml	70,00±0,78 ^e
25 µg/ml	83,57±0,51 ^c
50 µg/ml	69,36±1,27 ^e
100 µg/ml	65,01±0,44 ^f

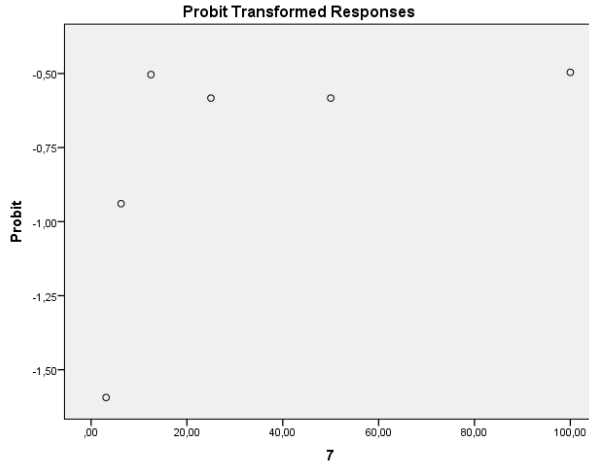
Şekil 4.12: 6.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

7.Karvakrol Türevi

7.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.13'de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 7. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda belirgin bir farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.14'da probit analizi sonucu gösterilmektedir



Şekil 4.13: 7. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

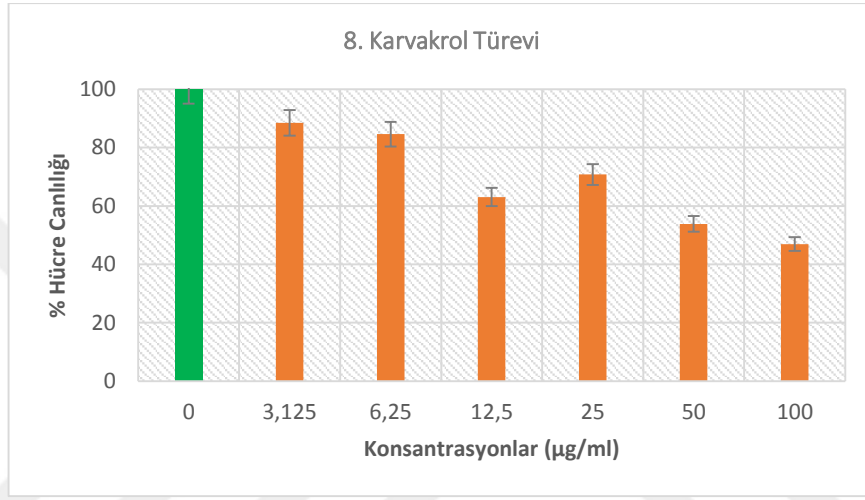


Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	99,85±0,25 ^a
6,25 µg/ml	82,25±1,64 ^b
12,5 µg/ml	68,15±2,55 ^f
25 µg/ml	72,20±0,67 ^e
50 µg/ml	93,71±0,96 ^b
100 µg/ml	76,68±1,58 ^d

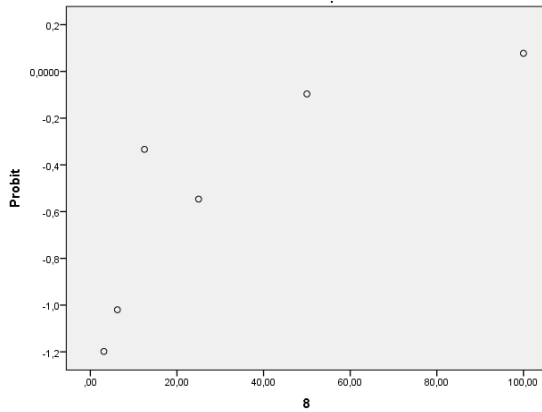
Şekil 4.14: 7.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

8.Karvakrol Türevi

8.Karvakrol Türevi için konsantrasyon / % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.15’de gösterilmiştir. % canlılık değerleri negatif kontrolün canlılığı 100 kabul edilerek belirlenmiştir. Negatif kontrol bileşik uygulanmamış deney grubudur. 8. karvakrol türevinin artan konsantrasyonlarda canlılığı düşürdüğü belirlenmiştir. Şekil 4.16’da probit analizi sonucu gösterilmektedir



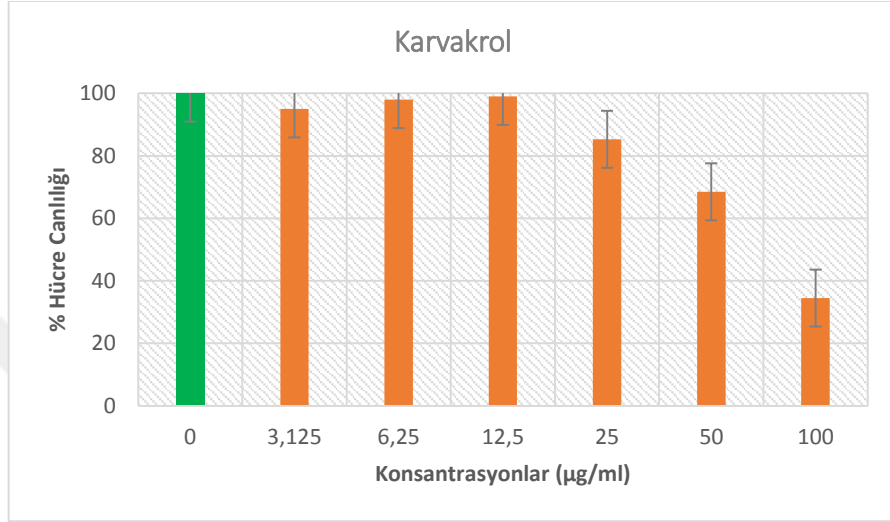
Şekil 4.15: 8. Karvakrol Türevinin Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri



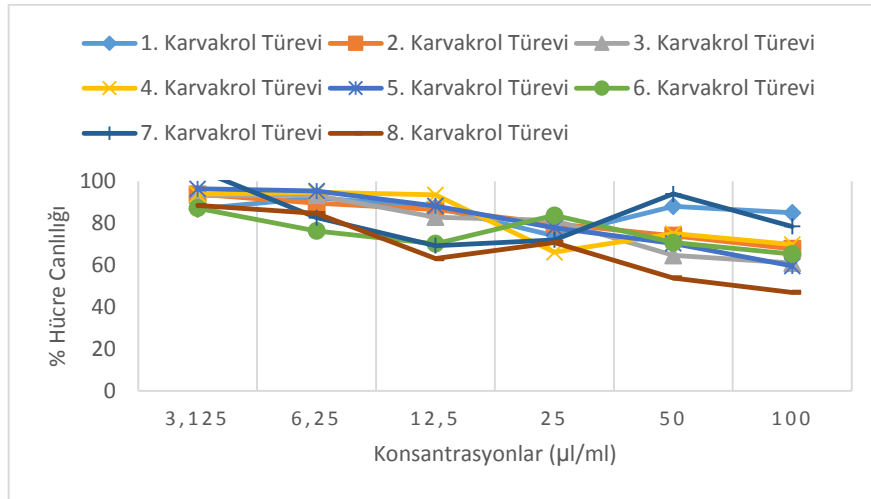
Gruplar	SD
Kontrol	100 ^a
3,125 µg/ml	88,51±0,12 ^b
6,25 µg/ml	84,27±0,31 ^c
12,5 µg/ml	63,27±0,15 ^e
25 µg/ml	70,79±0,43 ^d
50 µg/ml	52,62±1,23 ^f
100 µg/ml	46,19±0,65 ^g

Şekil 4.16: 8.Karvakrol Türevinin Probit Analizi Sonuçları, Duncan Testine Göre Hesaplanan Ortalama Değerler. P<0,05 değerine göre belirlenmiştir. SD: Standart Sapma

Karvakrolün sitotoksik etkilerinin karvakrol türevleri ile karşılaştırılması amacıyla artan konsantrasyonlardaki karvakrol, U87MG hücreleri üzerine uygulanmıştır. Şekil 4.17'deki MTT analizi grafiğinde görüldüğü gibi karvakrol artan konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermiştir. Şekil 4.18'de karvakrol türevlerinin karşılaştırılması verilmiştir.



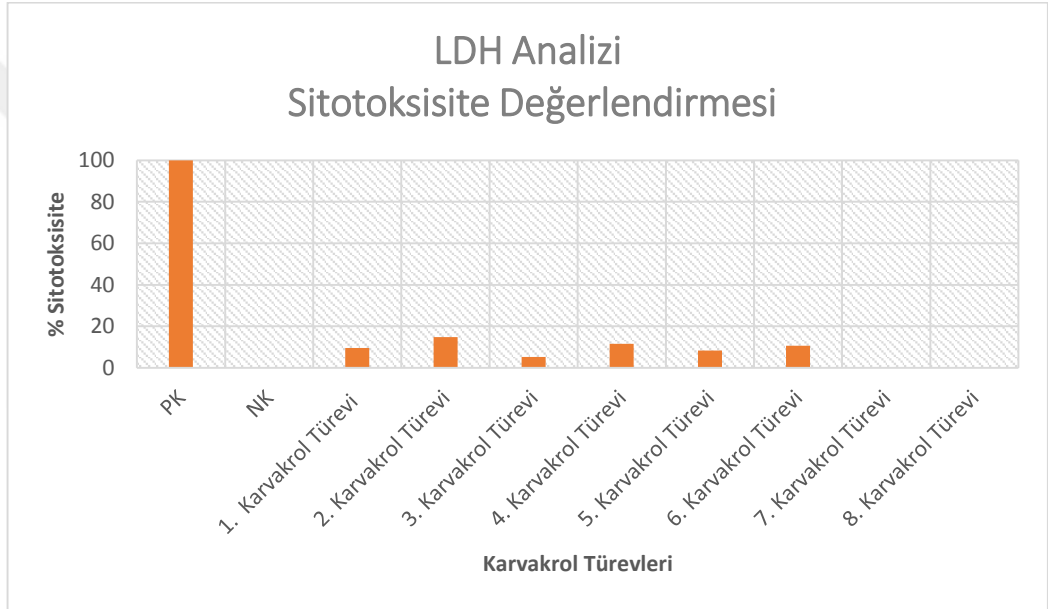
Şekil 4.17: Karvakrolün Artan Konsantrasyonlarda Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri



Şekil 4.18: Karvakrol Türevlerinin Artan Konsantrasyonlar Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

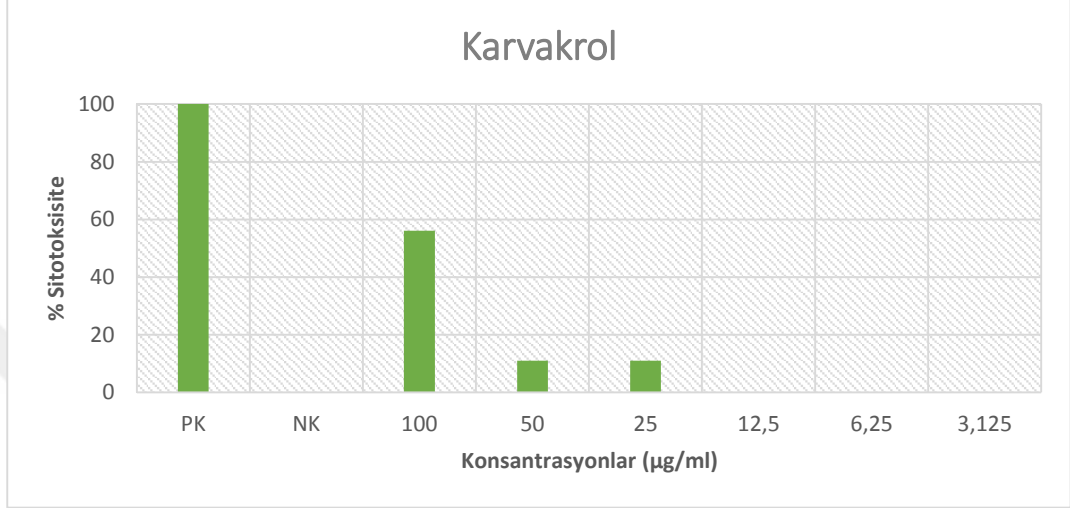
4.2. LDH Analizi Bulguları

LDH analizi hücre membran hasarını gösteren hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Ekstrasellüler ortamda bulunan LDH enzimi seviyesi bu yöntemde indikatör olarak kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006). MTT analizi bulgularına göre belirlenen IC₂₀ değerlerine için, karvakrol türevlerinin sitotoksik ve hücre membran bütünlüğü üzerine etkileri LDH analizi ile doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19’de bulunan grafikte LDH analizi sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.19: LDH Analizi Sitotoksosite Değerlendirmesi. Pozitif kontrol olarak Triton X-100 ile muamele edilmiş örnek kullanılmıştır. Pozitif kontrolün sitotoksik etkisi % 100 kabul edilmiştir. (PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol)

Karvakrole ait LDH Analizi sonucuna göre, Karvakrol konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Şekil 4.20’da görüldüğü gibi, 100 µg/ml konsantrasyonda karvakrol uygulandığında hücre canlılığını %50’nin üzerinde bozduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.20: Karvakrolün LDH Analizi Sonuçları. Pozitif kontrol olarak Triton X-100 ile muamele edilmiş örnek kullanılmıştır. Pozitif kontrolün sitotoksik etkisi % 100 kabul edilmiştir. (PK: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, kanser büyük bir sağlık problemidir. Dünyada insan ölüm nedenlerinin de başında gelmektedir. Genetik bir hastalık olan kanserin tedavisinde, bitkisel bileşikler, hayvansal kaynaklar, mineraller ve çeşitli bileşikler terapötik bileşik olarak önemli araştırma alanlarıdır (Sawadogo vd., 2015). Son yıllarda doğal bileşikler ve doğal bileşiklerden türevlenmiş bileşikler tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal bileşiklerden biri olan karvakrol ile yapılan çalışmalarda, karvakrolün antimikrobiyal, antikanser ve antiinflamator özellikleri bulunan önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir (Baser, 2008).

Güçlü bir antimikrobiyal özellikte olan karvakrolün hidroksil grubunda oluşturulan değişimlerle elde edilen eter ve ester türevlerinin de karvakrole benzer antimikrobiyal, antinosiseptif, antiinflamatuvar ve asetilkolinesteraz inhibitörü olma özellikleri, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir Paul, 2002; Nikumbh vd., 2003; Pires vd., 2013; 2005).

Tez kapsamında, antimikrobiyal ve antibiyofilm özellikleri bilinen direkt kodrug yaklaşımı ile sentezlenmiş sekiz farklı karvakrol türevinin antikanser aktivitelerinin varlığı ilk kez araştırılmıştır. Bu bileşiklerin antikanser aktiviteleri U87MG hücre hattında gösterilerek GBM'ye karşı antikanser aktiviteye sahip bileşik bulunması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, araştırılan karvakrol türevleri ile kanser tedavilerine yeni bir terapötik etkili bileşik geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca çalışmamızda sekiz farklı karvakrol türevi ile karvakrolün sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması amaçlanarak bileşikler arasındaki biyolojik farklılık tespit edilmeye çalışılmıştır.

Tez kapsamında çalışılan karvakrol türevlerinin önceki çalışmalarda, antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri incelenmiştir (Cacciatore vd., 2015). 4. Karvakrol Türevinin en iyi antimikrobiyal özellik taşıdığı aynı çalışmada tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, MTT ve LDH analizleri sitotoksisite belirlemede araştırma metodu olarak seçilmiştir. Nitekim bu testler, hücre canlılığının ölçülmesi için kullanılan hızlı ve güvenilir metodlardır.

MTT analizi ilk kez 1983 yılında T. Mosmann tarafından uygulanmıştır. Radyoizotop gibi zararlı maddelerin kullanımına gerek kalmadan hızlı bir şekilde kolorimetrik olarak hücre canlılığı bu yöntem ile belirlenmektedir (Mosmann, 1983).

MTT analizi ile beyin kanserleri için yapılmış olan sitotoksikite analizleri 1990'lı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Çeşitli çalışmalarda, U251, U87, T98 ve LN229 glioblastoma hücre hatlarında çeşitli maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT analizi ile tespit edilmiştir (Shang vd., 2015; Shidfar vd., 2015; Wang vd., 2014). Bizim çalışmamızda da U87-MG glioblastoma hücre hattı kullanılarak hücre canlılığı MTT analizi ile tespit edilmiştir.

Hücre membran bütünlüğünün belirlenmesi için yapılan diğer yöntem LDH analizidir. LDH analizi, nekrotik hücre varlığının belirlenmesi amacıyla kullanılan hızlı ve radyoaktif olmayan bir yöntemdir. Nekroz, moleküler yöntemler ve plazma membranı hasarı ile tespit edilebilen bir hücre ölüm yoludur. Bu bağlamda, sitozolik olan LDH enziminin, hücre besiyerinin içerisinde tespit edilmesi hücrelerin nekroza bağlı ölümünü göstermektedir (Lynch ve Sempowski, 2013). Bizim çalışmamızda da, sentezlenmiş karvakrol türevlerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi LDH analizi ile tespit edilmiştir.

Kanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilen MTT ve LDH analizi yöntemleri hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi bakımından tez çalışmasında tercih edilmiştir. Ayrıca bu tez çalışması, test edilen sekiz karvakrol türevi için ön çalışma niteliği taşımaktadır. Bu bakımdan, MTT ve LDH analizleri sitotoksikite belirleme ve doğrulama bakımından sıklıkla kullanılan metodlardır. Oldukça popüler olan bu yöntemler dışında karvakrol türevlerinin biyolojik aktivitelerine ve hücrede etki ettiği moleküler yollara ilişkin ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

MTT ve LDH analiz yöntemleri sonucunda karvakrol türevi bileşikler U87-MG hücre hattında büyük metabolik değişikliğe yol açmadan, hücre proliferasyonunu etkilediği bulunmuştur. Ayrıca bu durum, LDH analizi ile doğrulanmıştır.

2, 3, 5 ve 8. karvakrol türevlerin artan konsantrasyon değerlerinde (3,125 µg/ml; 100 µg/ml) sitotoksik etkili olduğu ve hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, U87MG hücre hattına uygulanan karvakrol türevleri arasında IC₅₀ değerlerine göre en iyi antikanser özellikte olan 8. Karvakrol Türevi olduğu belirlenmiştir. Yine IC₅₀ değerlerine göre 3. ve 5. karvakrol türevleri yakın antikanser özellikte olduğu bulunmuştur. Diğer karvakrol türevlerinin ise antikanser özellikleri olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada, karvakrol türevlerinin sitotoksik aktivitelerinin, karvakrol ile karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışılan karvakrol türevleri

arasında 100 µg/ml konsantrasyonunda karvakrolden daha etkili antikanser özellikte olan karvakrol türevi ise tespit edilememiştir.

Mevcut tez çalışmasında, farklı kimyasal yapılara sahip sekiz karvakrol türevinin sitotoksisite potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre test edilen 2, 3, 5 ve 8. Karvakrol türevlerinin artan konsantrasyonlarda sitotoksik etkili olduğu, diğer karvakrol türevlerinin ise zayıf etkili sitotoksik potansiyellerinin olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında ortaya konulan bulgular doğrultusunda, 8. karvakrol türevinin, moleküler yaklaşımlarla desteklenmesi durumunda, GBM'ye karşı kullanılabilir yeni bir terapötik bileşik olabileceği görüşündeyiz.



KAYNAKLAR

- Abacıoğlu U., Çetin İ., Akgün Z., ve Şengöz M., 2003, Erişkin Glioblastoma Multiforme Tanılı Hastalarda Radyoterapi Sonuçları ve Prognostig Faktörler, *Türk Onkoloji Dergisi*, 112–118.
- Alifieris, C., ve Trafalis, D.T., 2015, Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and Treatment. *Pharmacol. Ther.*
- Alokam, R., Jeankumar, V.U., Sridevi, J.P., Matikonda, S.S., Peddi, S., Alvala, M., Yogeewari, P., ve Sriram, D., 2014, Identification and structure-activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 29, 547–554.
- Atagün, G. Zafer E. ve Gürkanlı İ., 2011, Apoptosiste Mitokondrinin Rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 4, 49–53.
- Aydın, E., Türkez, H., ve Keleş, M.S., 2014, The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology* 66, 149–157.
- Ben Arfa, a, Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., ve Chalier, P., 2006, Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 149–154.
- Barnholtz-Sloan, J.S., ve Kruchko, C. 2007, Meningiomas: causes and risk factors. *Neurosurg. Focus* 23, E2.
- Baser, K.H.C., 2008, Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3106–3119.
- Bilge Debeleç-Bütüner, ve Kantarcı, G., 2006, Mutasyon , DNA Hasarı ,Onarım Mekanizmaları ve Kanserle İlişkisi. *J. Fac. Pharm,* 35, 149–170.
- Bonfim, R.R., Paiva-Souza, I.O., Moraes, J.P., Pereira, D.S., Santos, C. a., Santana, D.G., Thomazzi, S.M., Ferro, J.N.S., Barreto, E.O., Sousa, D.P., et al., 2014, Isopropoxy-Carvacrol, a Derivative Obtained from Carvacrol, Reduces Acute Inflammation and Nociception in Rodents. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 115, 237–243.
- Bozkurt, E., Atmaca, H., ve Uzunođlu, S., 2013, Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. *Genel Tıp Dergisi.* 133–143.
- Cacciatore, I., Di Giulio, M., Fornasari, E., Di Stefano, A., Cerasa, L.S., Marinelli, L., Turkez, H., Di Campli, E., Di Bartolomeo, S., Robuffo, I., et al., 2015, Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *PLoS One* 10, e0120937.

- Crespo, I., Vital, A.L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M.D.C., Otero, A., Lopes, M.C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A., ve Taberner, M.D., 2015, Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* 1–14.
- Coşkun G., ve Özgür H, 2011, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Tıp Fakültesi Arşivi*, 20 145–158.
- Damasceno, S.R.B., Oliveira, F.R. a M., Carvalho, N.S., Brito, C.F.C., Silva, I.S., Sousa, F.B.M., Silva, R.O., Sousa, D.P., Barbosa, A.L.R., Freitas, R.M., et al., 2014, Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. *Life Sci.* 94, 58–66.
- Das, N., Dhanawat, M., Dash, B., Nagarwal, R.C., ve Shrivastava, S.K., 2010, Codrug: An efficient approach for drug optimization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 571–588.
- Dewick P M, 2002, *Medicinal Natural Product: A biosynthetic Approach*, Second Edition.
- Duesberg P ve Rasnick D., 2000, Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 81–107.
- Durmaz R. ve Vural M, 2007, Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2, 80-90.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., ve De Laurenzi, V., 2012, Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany. NY)*. 4, 330–349.
- Fornasari, E., A, D.S., ve Cacciatore, I., 2014, Direct- And Spacer-Coupled Codrug Strategies for the Treatment of Alzheimer ' s Disease. *1*.
- Fotakis, G., ve Timbrell, J.A., 2006, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177.
- Gao, J., Ciriello, G., Sander, C., ve Schultz, N., 2014, Collection, integration and analysis of cancer genomic profiles: from data to insight. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 24, 92–98.
- Gibbs, H., ve Phillips, M., 1920, Alkali Fusions. I—The Fusion of Sodium p-Cymene Sulfonate with Sodium Hydroxide for the Production of Carvacrol. *Ind. Eng. Chem.*
- Gopisetty, G., Ramachandran, K., ve Singal, R., 2006, DNA methylation and apoptosis. *Mol. Immunol.* 43, 1729–1740.
- Hacıyakupoğlu, E., Oktay, K., Kıvanç, S., Mustafa, O., Saraç, E., Yılmaz, D.M., ve Hacıyakupoğlu, S., 2014, Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri, *Archives Medical Review Journal* 23, 367–386.

- Hauptman, N., ve Glavač, D., 2013, Long non-coding RNA in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 4655–4669.
- Huttner, A., 2012, Overview of Primary Brain Tumors: Pathologic Classification, Epidemiology, Molecular Biology, and Prognostic Markers. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *26*, 715–732.
- Jhanwar-Uniyal, M., Labagnara, M., Friedman, M., Kwasnicki, A., ve Murali, R., 2015, Glioblastoma: Molecular Pathways, Stem Cells and Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. *7*, 538–555.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., ve Milos, M., 2007, Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *261*, 259–261.
- Kalkan, R., ve Atli, E.İ., 2015, Geçmişten Günümüze Glioblastoma Genetiği, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, *3*, 239-249
- Kheirollahi, M., Dashti, S., Khalaj, Z., Nazemroaia, F., ve Mahzouni, P., 2015, Brain tumors: Special characters for research and banking. *Adv. Biomed. Res.* *4*, 4.
- Kim, M.Y., Hur, J., ve Jeong, S., 2009, Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *BMB Rep.* *42*, 125–130.
- Koparal, A.T. ve Zeytinoğlu, M., 2003, Effects of Carvacrol on human non small cell lung cancer cell line A549. *Cytotechnology* *43*, 149-154.
- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., Marsik, P., 2009, In vitro Antiinflammatory Activity of Carvacrol: Inhibitory Effect on COX-2 Catalyzed Prostaglandin E2 Biosynthesis. *Arch Pharm Res.* *32*, 75-78.
- Liang, W.Z., ve Lu, C.H., 2012, Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sci.* *90*, 703–711.
- Lynch, H., ve Sempowski, G.D., 2013, Immune Homeostasis. *Methods Mol Biol* *979*, 1–12.
- Mamati, T.T., 2006, Glioblastoma Multiforme'de Konkominat ve Adjuvant Temozolomid'in Radyoterapiye Katkısı, *Uzmanlık Tezi*.
- Mastelic J, Jerkovic I, ve Blazevic I, 2008, Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol. *3989–3996*.
- Mehdi, S.J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., ve Rivzi M. M. V., 2011, Cytotoxic Effect of Carvacrol on Human Cervical Cancer Cells. *Biology and Medicine* *3*, 307-312.

- More, U.B., Narkhede, H.P., Dalal, D.S., ve Mahulikar, P.P., 2007, Synthesis of Biologically Active Carvacrol Compounds using Different Solvents and Supports. *Synth. Commun.* *37*, 1957–1964.
- More, U.B., Narkhede, H.P., ve Mahulikar, P.P., 2008, Synthesis of new dimeric carvacrol compounds. *4*, 69–75.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* *65*, 55–63.
- Nikumbh, V.P., Mahulikar, P.P., 2003, Eco-friendly Pest Management Using Monoterpenoids-III: Antibacterial Efficacy of Carvacrol Derivatives. *62*, 1086–1089.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al., 2014, The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro. Oncol.* *16*, 896–913.
- Parker, N.R., Khong, P., Parkinson, J.F., Howell, V.M., ve Wheeler, H.R., 2015, Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Potential Clinical Implications. *Front. Oncol.* *5*, 1–9.
- Peltzer M, Wagner J, Jimenez A, 2009, Migration Study of Carvacrol as a Natural Antioxidant in High Density Polyethylene for Active Packaging, Food Additive & Contaminant.
- Pflaum, J., Schlosser, S., ve Martina, M., 2014, p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front. Oncol.* *4*, 1–15.
- Pires, L.F., Costa, L.M., Silva, O.A., de Almeida, A.A.C., Cerqueira, G.S., Sousa, D.P., ve Freitas, R.M., 2013, Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *112*, 42–48.
- Ramos, M., Beltran, A., Valdes, A., Peltzer, M.A., Jimenez, A., Garrigos, M.C., ve Zaikov, G.E., 2013, Carvacrol and Thymol for Fresh Food Packaging. *5*, 154–160.
- Sawadogo, W.R., Boly, R., Cerella, C., Teiten, M.H., Dicato, M., ve Diederich, M., 2015, A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivatives with Anti-cancer Activity Reported in 2012. *Molecules* *20*, 7097–7142.
- Shang, C., Hong, Y., Guo, Y., Liu, Y.-H., ve Xue, Y.-X., 2015, Influence of the MACC1 gene on sensitivity to chemotherapy in human U251 glioblastoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *16*, 195–199.

- Sharma, S., Kelly, T.K., ve Jones, P., 2009, Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36.
- Shidfar, F., Ghaffari, S.H., Tavoosidana, G., Hosseini, E., Alimoghaddam, K., ve Ghavamzadeh, A., 2015, Arsenic trioxide Alters the MicroRNA Expression Profile of U87 glioblastoma. *Anticancer. Agents Med. Chem.*
- Silva, V. B. ve Cavalcandi, S. C., 2008, Synthesis and Larvicidal activity of Carvacrol Derivatives against *Aedes aegypti*. 4. Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry.
- States, U., ve Registry, C., 2001, Brain Tumors. *English J.* 344, 114–123.
- Strasinger, C.L., Scheff, N.N., ve Stinchcomb, A.L., 2008, Prodrugs and codrugs as strategies for improving percutaneous absorption. *Expert Rev. Dermatol.* 3, 221–233.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., ve Yu, Q., 2015, Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer* 14, 1–14.
- Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., ve Alipour, M., 2015, The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 304–318.
- Türkez, H., ve Aydin, E., 2013, Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicol. Ind. Health.*
- Xu, H., Delling, M., Jun, Janice, ve Clapham, D., 2006, Oregano, thyme and Clove Derived flavors and Skin sensitizers activate Specific TRP Channel. *Nature Neuroscience.*
- Vineis, P., ve Wild, C.P., 2014, Global cancer patterns: Causes and prevention. *Lancet* 383, 549–557.
- Wang, Y.-X., Xu, S.-Q., Chen, X.-H., Liu, R.-S., ve Liang, Z.-Q., 2014, Autophagy involvement in olanzapine-mediated cytotoxic effects in human glioma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 8107–8113.
- Williams, G.H., ve Stoeber, K., 2012, The cell cycle and cancer. *J. Pathol.* 226, 352–364.
- Yin Q. H., Yan, F. X., Zu, X. Y., Wu, Y. H., Wu, X. P., Liao, M. C., Deng S. W., Zhuang Y. Z., 2012, Antiproliferative and antiapoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology.* 64, 43-51.
- Yilmaz, A., Altug, F., Duz, E., ve Cirak, B., 2012, Treatment options and effects of survival in glioblastoma multiforme. *J. Kartal Train. Res. Hosp.* 23, 25–29.

Yokuş, B., ve Çakır, D.Ü., 2012, Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg. 1, 7–18.

Yu, H., Zhang, Z.-L., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., He, J., Liu, C.-F., ve Xu, X., 2012, Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. PLoS One 7, e33584.

Zhi, F., Wang, R., Wang, Q., Xue, L., Deng, D., Wang, S., ve Yang, Y., 2014, MicroRNAs in neuroblastoma: small-sized players with a large impact. Neurochem. Res. 39, 613–623.

Zotti, M., Colaianna, M., Morgese, M.G., Tucci, P., Schiavone, S., Avato, P., ve Trabace, L., 2013, Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. Molecules 18, 6161–6172.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Manisa’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Çanakkale’de tamamladı. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Programını ve İstanbul Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Felsefe Bölümü, Yandal Programını başarı ile bitirdi. 2012 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde başladığı Yüksek Lisans Eğitimini, 2015 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde bitirdi.

