

**MONOSİKLİK VE BİSİKLIK MONOTERPEN
UYGULAMASININ DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ
ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Elanur AYDIN

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

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MONOSİKLİK VE BİSİKLIK MONOTERPEN
UYGULAMASININ DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ
ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Elanur AYDIN

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

MONOSİKLİK VE BİSİKLIK MONOTERPEN
UYGULAMASININ DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ
ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN *İN VİTRO*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Elanur AYDIN tarafından hazırlanan bu çalışma 13/09/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Abdulgani TATAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Elif ÖZTETİK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2010/274

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

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MONOSİKLİK VE BİSİKLİK MONOTERPEN UYGULAMASININ DENEYSSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Elanur AYDIN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Nöroblastoma beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen ve çocukluk çağında en sık görülen ölümcül tümör çeşididir. Buna rağmen, nöroblastomanın etiyojisi hala tam olarak bilinmemektedir. Cerrahi ve radyoterapi gibi yöntemlerin yanı sıra, nöroblastoma tedavisi için tercih edilen bir başka etkili yol da kemoterapötik ajanların kullanımınıdır. Bu nedenle, özellikle son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek doğal ve biyolojik etkili kemoterapötik ajanların keşfedilmesi ve geliştirilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu açıdan bakıldığında monoterpenler, bitkilerin koku ve rengini sağlayan temel bileşenler olmalarının yanı sıra insan sağlığına katkıları açısından da önemli biyoaktif bileşenlerdir. Monoterpenlerin yararlı etkileri antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanserijen, anti-inflamatuvar ve anti-ülser özellikler olarak sıralanabilir. Bu nedenlerle, tez kapsamında bazı önemli monosiklik ve bisiklik monoterpen bileşiklerin normal ve kanserli sıçan beyin hücre hatları (N2a) üzerine *in vitro* sitolojik, biyokimyasal ve genetik etkilerinin ilk defa araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca literatürde tez kapsamında test edilen olan farklı monoterpenlerin beyin tümörü hücrelerinde çoğalmayı baskılayıp baskılamadığı konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda yer alan monosiklik (karvakrol, karvon, terpinolen ve timol) ve bisiklik (alfa-pinen) monoterpenlerin çeşitli konsantrasyonlarda kültür ortamına ilave edilerek hücre çoğalması üzerine etkileri 3-(4,5 dimetylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücre kültürlerinde oksidatif etkilerin değerlendirilmesinde toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılmıştır. Aynı zamanda, monoterpenlerin normal ve kanserli beyin hücreleri üzerine olan genetik etkileri tek hücre jel elektroforezi (Comet testi) yöntemi ile ilk kez değerlendirilmiştir. Bulgularımız sözkonusu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitelerinin varlığını ve yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduklarını ortaya koydu. Test edilen tüm bileşiklerin genotoksik etkili olmadığı bulundu. Başta terpinolen olmak üzere tüm monoterpenlerin nöroblastoma hücrelerine karşı farklı düzeylerde antikanserijenik aktivite gösterdi. Tez kapsamında elde edilen bulgular ışığında farklı yapıda monoterpenlerin N2a beyin tümörü hücre hatlarında antikanserijenik aktivitelerinin multidisipliner yaklaşımlar ile belirlenmesiyle, beyin kanseri tedavisi gören hastaların tedavi etkinliklerinin desteklenebileceğini umut etmekteyiz.

2013, 132 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nöroblastoma, MTT, monoterpen, N2a, *in vitro*, oksidatif durum, tek hücre jel elektroforezi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF POTENTIAL EFFECTS OF MONOCYCLIC AND BICYCLIC MONOTERPENES ON EXPERIMENTAL BRAIN TUMOUR MODEL USING BY *IN VITRO* METHODS

Elanur AYDIN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Neuroblastoma could invade into brain tissues quickly and is the most common fatal tumour species of childhood. But, the etiology of neuroblastoma is still exactly unknown. Besides the methods such as surgery and radiotherapy, another effective way that preferred for the treatment of neuroblastoma is the use of chemotherapeutic agents. Thus, discovering and developing of the naturel and biologically effective chemotherapeutic agents in treatments of various cancer types becomes one of the most popular research topics. At this point, monoterpenes are important biologically active compounds in terms of health benefits besides their role in providing the flavour, and colour. They have beneficial effects on health such as antioxidant, antibacterial, antifungal, anticarcinogenic, anti-enflamatuar and anti-ulser, etc. For these reasons, it was aimed to search the cytological, biochemical and genetic effects of some important monocyclic and bicyclic monoterpen compounds on healthy neuron cells and N2a neuroblastoma cells in relation with the dose and time in the extent of thesis firstly. Notwithstanding, there were no investigation on whether different monoterpenes, which were tested in this thesis, supressed the cell proliferation in brain tumour cells. The effects of selected monocyclic (carvacrol, carvone, terpinolene and thymol) and bicyclic (alpha-pinene) monoterpenes at various concentrations on cell proliferation were determined by 3-(4,5 dimethylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) assay. And total antioxidant capacity (TAC) and total oxidative stress (TOS) parameters were used for the assesments of oxidative effects in cell cultures. Besides, the genetic effects of monoterpenes on healthy and cancerous brain cells were assessed by singel cell gel electrophoresis (Comet test) firstly. Our results revealed that the monoterpenes exhibited antioxidant activities at their low doses and cytotoxic at high doses. All tested compounds were found to be non-genotoxic. Primarily terpinolene and all tested monoterpenes showed moderate and weak anticarcinogenic activities against neuroblastoma cells. We hope that, it will possible to support of treatment activities in patients undergoing treatment for brain cancer by the multidisciplinary establishment of the anticarcinogenic effects of different monoterpen compounds on N2a brain tumour cells within the light of the findings of this thesis.

2013, 132 pages

Keywords: Neuroblastoma, MTT, monoterpen, N2a, *in vitro*, oxidative status, single cell gel electrophoresis

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Doktora eğitimimin her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösteren, öğrencisi olmaktan hayatım boyunca onur ve gurur duyacağım saygıdeğer hocam, danışmanım Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Abdulgani TATAR'a ve Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım esnasında deneyimlerinden faydalandığım ve yardımlarıyla destek olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Damla ÇETİN'e, Başak TOĞAR'a, Arş. Gör. Kübra ÇELİK'e ve Tıbbi Genetik laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca, uzakta olsalar da destek ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili abim Selim AYDIN'a ve kardeşim Ahmet AYDIN'a yürekten teşekkür ederim. Son olarak, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan, eğitimim süresince maddi ve manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her koşulda benim yanımda olan sevgili babam Samih AYDIN'a ve annem Nurcan AYDIN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu - 2010/274 no'lu projenin maddi destekleriyle gerçekleştirilmiştir.

Elanur AYDIN

Eylül 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Uçucu Yağlar.....	1
1.2. Terpenler.....	2
1.3. Terpenlerin Biyosentezi.....	2
1.4. Terpenlerin İzolasyonları.....	6
1.5. Terpenlerin Sınıflandırılması.....	7
1.5.1. Hemiterpenler.....	7
1.5.2. Monoterpenler.....	7
1.5.2.a. Asiklik monoterpenler.....	8
1.5.2.b. Siklik monoterpenler.....	8
1.5.2.c. Düzensiz monoterpenler.....	9
1.5.3. Seskiterpenler.....	9
1.5.4. Diterpenler.....	9
1.5.5. Triterpenler.....	10
1.5.6. Tetraterpenler.....	10
1.6. Aromatik bileşikler.....	10
1.7. Tez Kapsamında Test Edilen Monoterpenler.....	11
1.7.1. Karvakrol.....	11
1.7.2. Karvon.....	14
1.7.3. Terpinolen.....	17
1.7.4. Timol.....	18
1.7.5. Alfa-Pinen.....	21
1.8. Hücre Döngüsü.....	23

1.9. Neoplazi.....	24
1.9.1. Kanser biyolojisi.....	25
1.9.2. Beyin tümörleri.....	27
1.9.3. Nöroblastoma	32
1.10. Oksidatif Stres	33
1.10.1. Serbest radikaller	34
1.10.2. Serbest radikal kaynakları	35
1.10.2.a. Serbest radikallerin endojen (hücre içi) kaynakları	35
1.10.2.b. Serbest radikallerin ekzojen (hücre dışı) kaynakları	37
1.10.3. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen metabolitleri	38
1.10.4. Reaktif azot türleri.....	38
1.10.5. Serbest radikallerin hücrel hasarları.....	39
1.10.5.a. Membran lipidlerine etkileri (lipid peroksidasyonu).....	40
1.10.5.b. Proteinlere etkileri (protein oksidasyonu)	41
1.10.5.c. Karbonhidratlara etkileri.....	41
1.10.5.d. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri.....	41
1.10.6. Oksidatif stres ve kanser ilişkisi	43
1.10.7. Kanser dışındaki hastalıklarda oksidatif stresin rolü.....	45
1.10.8. Beyin metabolizmasında serbest radikallerin rolü	46
1.11. Antioksidan Savunma Sistemleri	46
1.11.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar	48
1.11.1.a. Enzimatik antioksidanlar	48
1.11.1.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar	50
1.11.2. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar	51
1.11.2.a. Doğal antioksidanlar	51
1.11.2.b. Doğal olmayan (sentetik) antioksidanlar.....	51
1.12. Genetik Toksikite.....	52
1.12.1. Kromozom mutasyonları	52
1.12.1.a. Kromozom sayısı mutasyonları	52
1.12.1.b. Kromozom yapısı mutasyonları	53
1.12.2. Nokta (gen) mutasyonları	53
1.12.3. DNA tamir mekanizmaları	54

1.13. Genotoksisite Testleri.....	55
1.13.1. Tek hücre jel elektroforez testi (Comet testi, SCGE).....	56
1.13.2. Diğer genotoksisite testleri.....	58
1.14. Sitotoksisite Testleri.....	59
2. KAYNAK ÖZETLERİ	61
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	68
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	68
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	68
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	70
3.4. Deney Hayvanları.....	72
3.5. Nöron Kültürlerinin Kurulması	72
3.6. N2a Nöroblastoma Kültürlerinin Kurulması	74
3.7. MTT Analizi.....	75
3.8. Toplam Antioksidan Kapasitesi	76
3.9. Toplam Oksidan Durum.....	78
3.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi	79
3.11. İstatiksel İşlemler	81
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	82
4.1. Test Edilen Monoterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu TAK Değerleri	82
4.2. Test Edilen Monoterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu TOD Değerleri	86
4.3. Test Edilen Monoterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Toplam Hasar Puan Değerleri	90
4.4. Test Edilen Monoterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu MTT Analiz Değerleri.....	94
5. TARTIŞMA	98
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	133

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
Gy	Gray
H_2O_2	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum hidrojen fosfat
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
NaH_2PO_4	Sodyum hidrojen fosfat
OH^\cdot	Hidroksi radikal

Kısaltmalar

ALP	Alanin transaminaz
ALT	Alkalın fosfataz
AST	Aspartat transaminaz
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Bütil hidroksi anizol
BHT	Bütil hidroksi tolüen
CAT	Katalaz
CDI	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri

CDK	Serin/treonin protein kinazlar
CoA	Koenzim A
D-GaIN	D-Galaktozamin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doxorubicin
DPPH	2,2-difenil-1-pikrihidrazil
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FISH	Hibridizasyon tekniği
G-6-PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-GP _x	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon-S-transferaz
HBSS	Hank's blanced salt solution
KA	Kromozom aberasyonları testi
KKD	Kardeş kromatid değşimi
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Lipoprotein
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
M	Mitoz
MÇ	Mikroçekirdek testi
MMC	Mitomisin C
MTT	3-(4,5dimetylthiazol-2-yl)-2,5 diphenltetrazolium bromide
N2a	Nöroblastoma hücre hattı
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMA	Normal erime noktalı agaroz
ORAC	Oksijen radikal abzorban kapasitesi
PBS	Fosfat tamponlu salin
PUFAs	Poliansature yağ asitleri
RNA	Ribonükleik asit

ROT	Reaktif oksijen türleri
RSC	Serbest radikal salınım kapasitesi
SCGE	Tek hücre jel elektroforez testi
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TAR	Toplam antioksidan reaktivitesi
TAS	Total antioxidant status
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TBHQ	Tert-bütül hidrokinon
TEAC	Trolox eşdeğer antioksidan kapasite
TGSH	Toplam glutatyon
TOD	Total oksidan durum
TOS	Total oxidant status
TRAP	Toplam radikal yakalama antioksidan parametresi
WHO	Dünya sağlık örgütü
γ GT	Gamma glutamil transpeptidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İzopren molekülü	2
Şekil 1.2. Mevalonik asitin sentezi	3
Şekil 1.3. İzopentil pirofosfatın sentezi	4
Şekil 1.4. Geranil pirofosfatın sentezi.....	4
Şekil 1.5. Farnesil pirofosfatın sentezi.....	5
Şekil 1.6. Geranil-geranil pirofosfatın sentezi	5
Şekil 1.7. Terpen bileşiklerinin meydana gelişi.....	6
Şekil 1.8. Karvakrolün kimyasal yapısı	11
Şekil 1.9. Karvonun kimyasal yapısı	15
Şekil 1.10. Terpinolenin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.11. Timolün kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.12. α -Pinenin kimyasal yapısı	21
Şekil 1.13. Kanserin oluşum safhaları	26
Şekil 1.14. Lipit peroksidasyonunun aşamaları	40
Şekil 1.15. Oksidatif stres ve mutasyonların oluşumu.....	42
Şekil 1.16. Oksidatif stres ile kanser arasındaki ilişki	43
Şekil 1.17. Comet analizinin aşamaları.....	57
Şekil 3.1. Nöron kültürü hazırlama aşamaları	74
Şekil 3.2. MTT analizi	76
Şekil 3.3. TAK analiz prosedürü	77
Şekil 3.4. TOD analiz prosedürü	79
Şekil 3.5. Elektroforez tampon solüsyonunda yürütme aşaması	80
Şekil 3.6. DNA hasar tespitinde kullanılan analiz metodu	81
Şekil 4.1. <i>In vitro</i> koşullarda karvakrolün oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	82
Şekil 4.2. <i>In vitro</i> koşullarda karvonun oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	83
Şekil 4.3. <i>In vitro</i> koşullarda terpinolenin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	83

Şekil 4.4. <i>In vitro</i> koşullarda timolün oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	84
Şekil 4.5. <i>In vitro</i> koşullarda α -pinenin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	84
Şekil 4.6. <i>In vitro</i> koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri (karşılaştırmalı)	85
Şekil 4.7. <i>In vitro</i> koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri (karşılaştırmalı)	85
Şekil 4.8. <i>In vitro</i> koşullarda karvakrolün oluşturduğu total oksidan durum değerleri ..	86
Şekil 4.9. <i>In vitro</i> koşullarda karvonun oluşturduğu total oksidan durum değerleri	87
Şekil 4.10. <i>In vitro</i> koşullarda terpinolenin oluşturduğu total oksidan durum değerleri.....	87
Şekil 4.11. <i>In vitro</i> koşullarda timolün oluşturduğu total oksidan durum değerleri	88
Şekil 4.12. <i>In vitro</i> koşullarda α -pinenin oluşturduğu total oksidan durum değerleri ...	88
Şekil 4.13. <i>In vitro</i> koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu total oksidan durum değerleri (karşılaştırmalı)	89
Şekil 4.14. <i>In vitro</i> koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu total oksidan durum değerleri (karşılaştırmalı)	89
Şekil 4.15. <i>In vitro</i> koşullarda karvakrolün konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	90
Şekil 4.16. <i>In vitro</i> koşullarda karvonun konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	91
Şekil 4.17. <i>In vitro</i> koşullarda terpinolenin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	91
Şekil 4.18. <i>In vitro</i> koşullarda timolün konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	92
Şekil 4.19. <i>In vitro</i> koşullarda α -pinenin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	92

Şekil 4.20. <i>In vitro</i> koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri (karşılaştırmalı)	93
Şekil 4.21. <i>In vitro</i> koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri (karşılaştırmalı)	93
Şekil 4.22. Karvakrol maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	94
Şekil 4.23. Karvon maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	95
Şekil 4.24. Terpinolen maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	95
Şekil 4.25. Timol maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	96
Şekil 4.26. α -Pinen maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	96
Şekil 4.27. Sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin maruziyeti	97
Şekil 4.28. N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri (karşılaştırmalı).....	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karsinogenlerin hücrese hedefleri	27
Çizelge 1.2. Belirli beyin tümörlerinin görülme sıklığı.....	28
Çizelge 1.3. Beyin tümörlerinin sınıflandırılması	29
Çizelge 1.4. Reaktif oksijen türleri	38
Çizelge 1.5. Reaktif azot türleri	38
Çizelge 1.6. Serbest radikallerin hücrese hedefleri.....	39
Çizelge 1.7. Bazı kanser vakalarında tespit edilmiş olan DNA hasarı ölçümleri	44
Çizelge 1.8. Antioksidanların sınıflandırılması	48
Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar	69
Çizelge 3.2. Test edilen monotermenler ve uygulanan konsantrasyonları	70

1. GİRİŞ

1.1. Uçucu Yağlar

Son yıllarda oksidatif hasarı engelleyen ve dolayısıyla iltihabi durumları önleyen, yaşlanmaya karşı etkili ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan bitki, baharat ve uçucu yağları içeren doğal antioksidanların kullanımına yönelik ilgi her geçen gün artmaktadır (Fusco *et al.* 2007; Khanna *et al.* 2007).

Uçucu yağ terimi ilk kez 16. yüzyılda İsveçli bir tıp reformcusu olan Paracelsus von Hohenheim tarafından *Quinta essentia* bitkisinin etken maddesi için kullanılmıştır (Guenther 1948). Uçucu yağlar aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen ve güçlü bir koku ile karakterize edilen doğal kompleks bileşiklerdir. Genellikle bu yağlar Akdeniz ve tropikal ülkeler gibi sıcak iklime sahip bölgelerde yetişen bitkilerden elde edilir. Uçucu yağlar sıvı, berrak (nadiren renkli), genellikle sudan daha düşük yoğunluğa sahip, lipit veya organik çözücüler içerisinde çözünebilir karışımlardır. Bu yağlar bütün bitki organlarından (çiçek, tomurcuk, tohum, meyve, yaprak, dal, kök, ağaç kabuğu ve ağaç) sentezlenebilir ve salgı hücreleri, salgı kanalları, boşluklar ve epidermal hücrelerde depolanırlar (Bakkali *et al.* 2008).

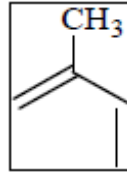
Günümüzde kimyasal olarak tanımlanmış yaklaşık 3000 tane uçucu yağ bilinmektedir ve bunların 300 tanesi özellikle ilaç, parfüm, kozmetik, sağlık, gıda ve tarım endüstrisi için önem taşımaktadır (Bakkali *et al.* 2008). Uçucu yağlar ve bu yağların bazı bileşenleri kozmetik ve sağlık endüstrisinde, diş hekimliğinde, gıda koruyucusu ya da katkı maddesi olarak gıda endüstrisinde ve doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca uçucu yağlar aromaterapide masaj yağı olarak da kullanılmaktadır. Bazı uçucu yağların ise tıbbi özellikleri dolayısıyla bir organ disfonksiyonu ve sistemik düzensizliğin tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Silva *et al.* 2003; Perry *et al.* 2003; Hajhashemi *et al.* 2003; Bakkali *et al.* 2008). Geçmişten günümüze kadar uçucu yağların antimikrobiyal (El Bouzidi *et al.* 2012), antibakteriyel (Sienkiewicz *et al.*

2011), antiviral (Wu *et al.* 2010), antimikotik (Oliva Mde *et al.* 2011), anti-toksigenik (Ultee and Smid 2001; Juglal *et al.* 2002), anti-parazitik (Pessoa *et al.* 2002), antioksidan (Wang *et al.* 2011; Boligon *et al.* 2012) ve antikanser (Jo *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012) etkileri çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir.

Uçucu yağlar C₁₀ veya C₁₅ ihtiva eden, oksijen molekülü taşıyabilen düşük moleküler ağırlıklı ve biyolojik özelliklerine göre farklı konsantrasyonlarda yaklaşık 20-60 bileşen içeren kompleks doğal karışımlardır. Bu bileşenler terpenler, terpenoidler, aromatik ve alifatik bileşenlerdir (Vokou 2005; Bakkali *et al.* 2008).

1.2. Terpenler

Terpenler izopren olarak isimlendirilen değişik sayıdaki 5 karbonlu (C₅) moleküllerin kombinasyonundan meydana gelmektedir (Koyunoğlu 2008). İzopren molekülünün kimyasal yapısı Şekil 1.1'deki gibidir.



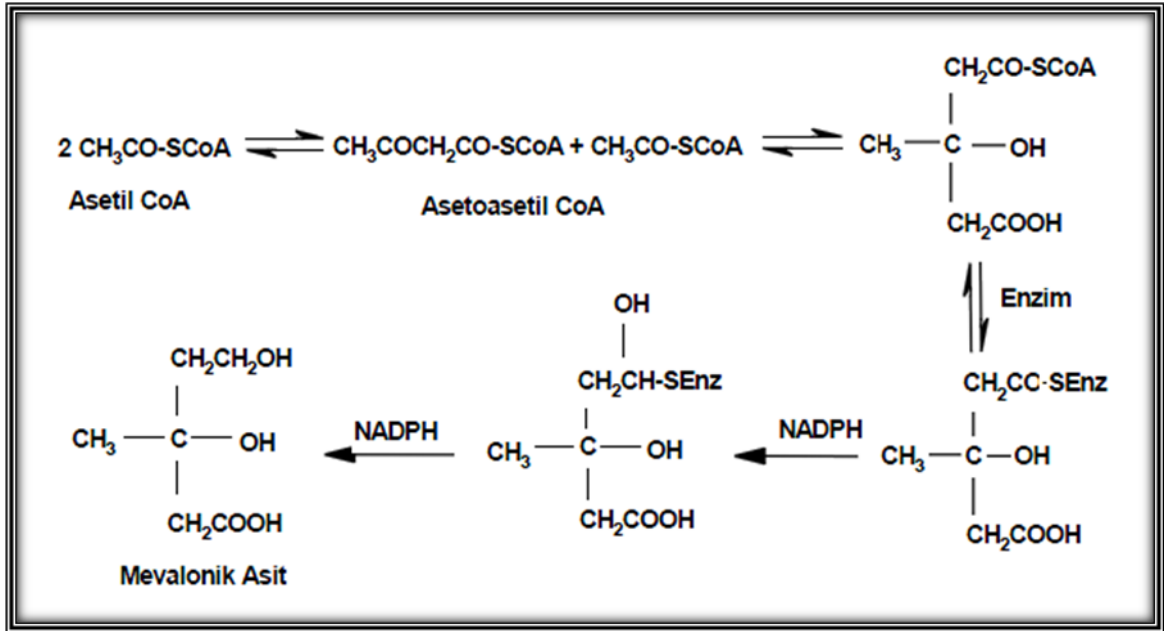
Şekil 1.1. İzopren molekülü

Oksijen atomu içeren terpenler terpenoid olarak adlandırılır. Terpenler yapısal ve işlevsel bakımdan hemiterpenler (C₅), monoterpenler (C₁₀), seskiterpenler (C₁₅), diterpenler (C₂₀), triterpenler (C₃₀), tetraterpenler (C₄₀) ve politerpenler (C₅)_n olarak sınıflandırılırlar (Karabacak 2007; Bakkali *et al.* 2008; Koyunoğlu 2008).

1.3. Terpenlerin Biyosentezi

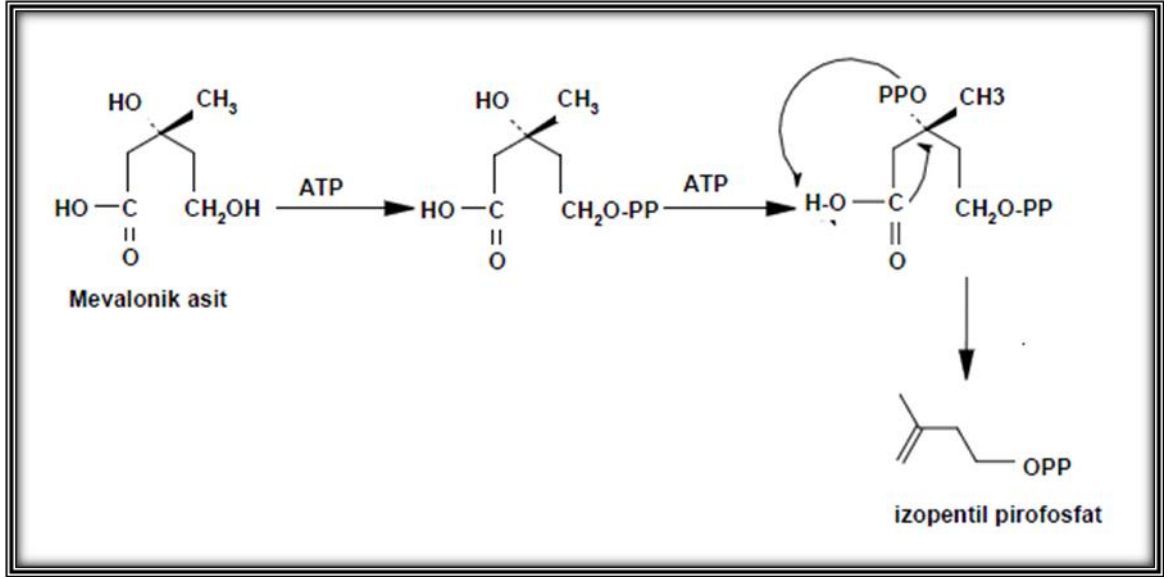
Terpenlerin biyosentezi 3 mol asetil koenzim A'nın (CoA) kondenzasyonu sonucu mevalonik asitin (3-metil-3,5-dihidroksi pentanoik asit) meydana gelmesiyle başlar.

Terpenleri oluşturan izopren (2-metil-1,3-butadien) birimleri mevalonik asidin su ve karbondioksit kaybetmesi ile oluşur. Mevalonik asit sentezinin öncül maddesi olarak şekerlerin oksidasyonu sonucu oluşan asetil CoA kullanılır. İki mol asetil CoA molekülünün kondenzasyonundan elde edilen asetoasetil CoA'nın başka bir mol asetil CoA ile birleşmesiyle 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA meydana gelir. Bu reaksiyonun devamında enzimatik heterolitik bölünme ve geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan tiyol ester grubunun NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ile indirgenmesi sonucunda mevalonik asit elde edilir. Şekil 1.2'de mevalonik asidin oluşumu gösterilmektedir (Karabacak 2007).



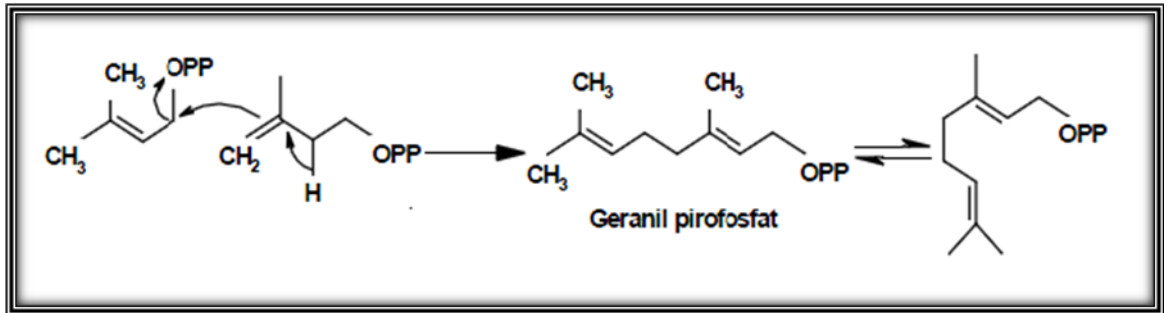
Şekil 1.2. Mevalonik asitin sentezi

Mevalonik asidin 2 ATP molekülü (Adenosin trifosfat) ile fosfatlanması sonucu mevalonik asit-5-pirofosfat bileşiği meydana gelir. Mevalonik asit-5-pirofosfat bileşiği, yapısında yer alan tersiyer hidroksil grubunun 1 ATP molekülü ile fosfatlanması sonucu daha kolay ayrılabilir hale gelir. Bu bileşikten su ve karbondioksit çıkışıyla izopentil pirofosfat molekülü oluşur. Şekil 1.3'de izopentil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir (Karabacak 2007).



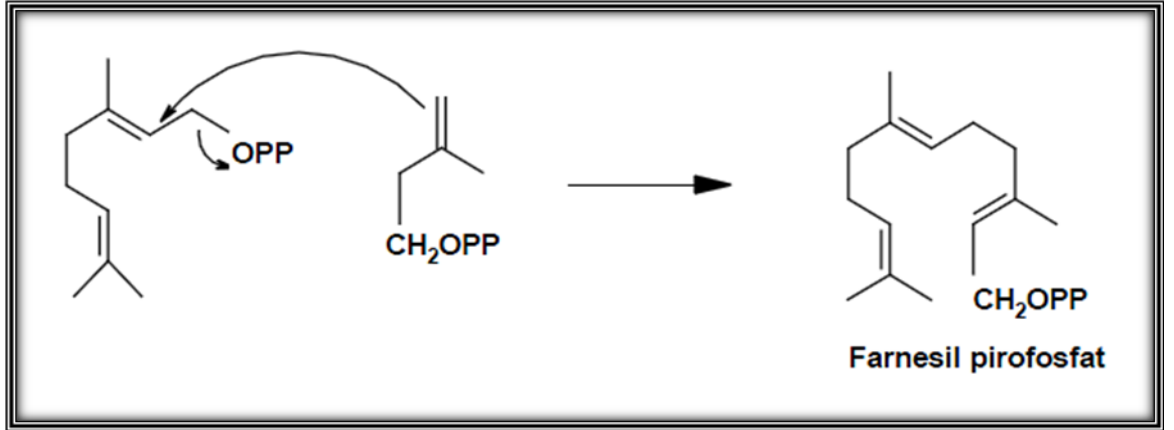
Şekil 1.3. İzopentil pirofosfatın sentezi

İzopentil pirofosfat molekülünün enzim izomerizasyonu sonucu dimetil allil ester oluşur. İzopentil pirofosfat ve dimetil allilin birbiriyle kondenzasyonu sonucu geranil pirofosfat oluşur. Oluşan bu bileşik de monoterpenleri meydana getirir. Şekil 1.4'de geranil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir (Karabacak 2007).



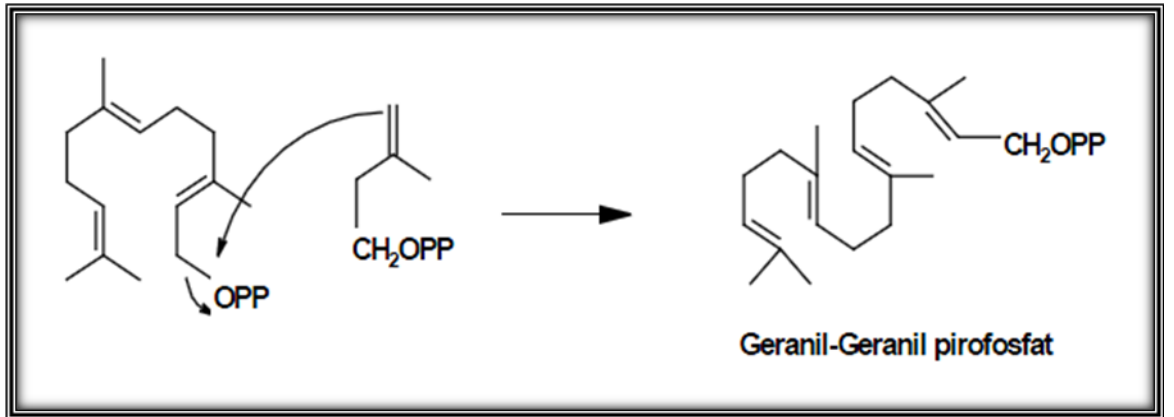
Şekil 1.4. Geranil pirofosfatın sentezi

Geranil pirofosfat ile izopentil pirofosfat molekülünün kondenzasyonu sonucu farnesil pirofosfat meydana gelir. Oluşan bu bileşik seskiterpenlerin geçiş bileşiğidir. Şekil 1.5'de farnesil pirofosfatın oluşması gösterilmektedir (Karabacak 2007).



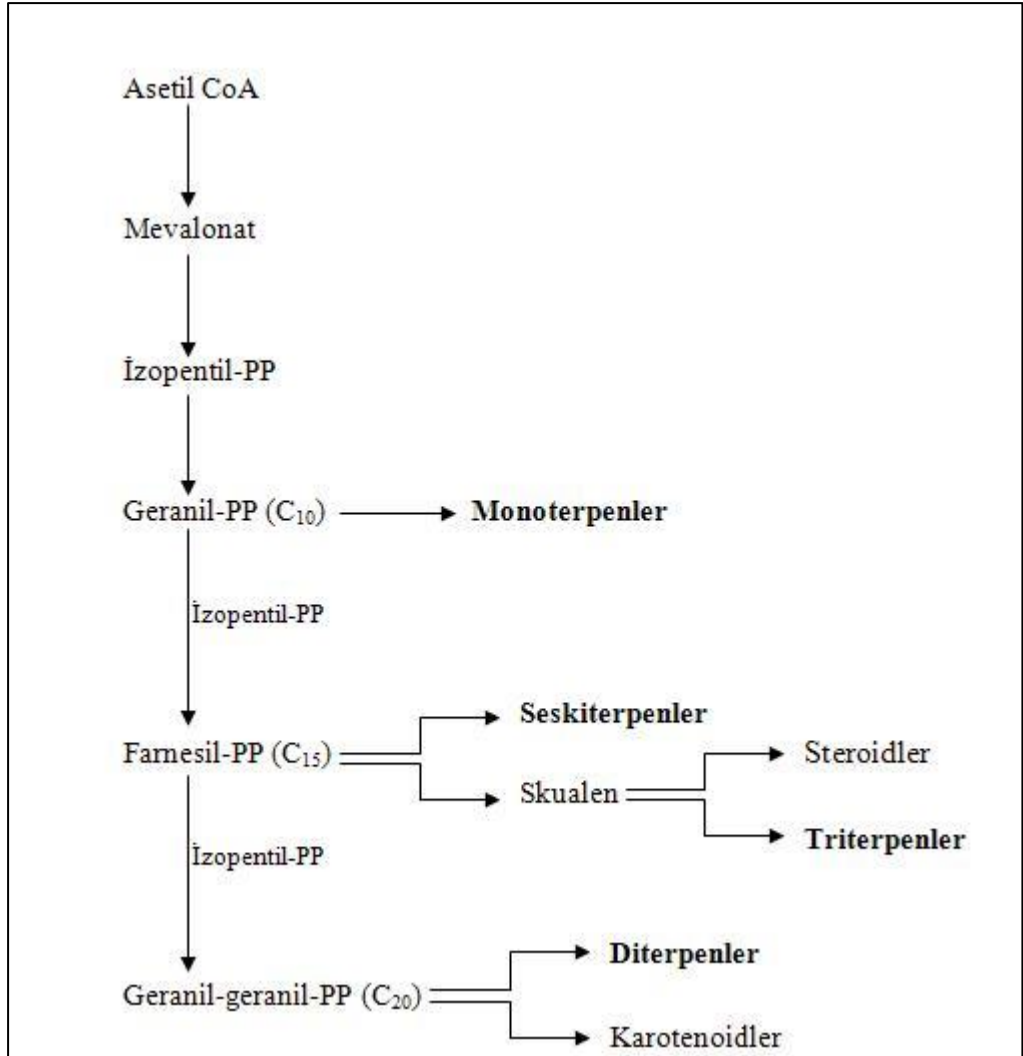
Şekil 1.5. Farnesil pirofosfatın sentezi

Farnesil pirofosfatın tekrar izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu diterpenlerin ve karotenoidlerin yapı taşı olan geranyl-geranyl pirofosfat bileşiğini oluşturur. Şekil 1.6'da geranyl-geranyl pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir (Karabacak 2007).



Şekil 1.6. Geranyl-geranyl pirofosfatın sentezi

Geranyl-geranyl pirofosfat molekülünün başka bir geranyl-geranyl pirofosfat molekülü ile kondenzasyonu sonucunda ise triterpenler meydana gelir (Karabacak 2007).



Şekil 1.7. Terpen bileşiklerinin meydana gelişi

1.4. Terpenlerin İzolasyonları

Küçük moleküler ağırlığa sahip terpenler (monoterpenler ve seskiterpenler gibi) su buharı destilasyonu ile, daha büyük molekülü terpenler ise ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılabilirler. Terpenlerin elde edilecekleri ilgili materyal kurutulmuş toz haline getirildikten sonra farklı polaritedeki organik çözücüler kullanılarak ekstrakte edilir. Bu işlemin sonunda uygun kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemi gerçekleştirilir. Saflaştırmada en çok kullanılan kromatografik yöntemler kolon ve preparatif ince tabaka yöntemleridir (Karabacak 2007).

1.5. Terpenlerin Sınıflandırılması

1.5.1. Hemiterpenler

Hemiterpenler (C₅) 5 karbonlu izopentan iskeletine sahip bileşiklerdir. Önemli hemiterpenler arasında izoamil alkol, izovaleraldehit, tiglik asit, anjelik asit ve β -furoik asit sayılabilir (Kumar and Chobra 2005; Koyunoğlu 2008).

1.5.2. Monoterpenler

Monoterpenler iki izopren veya izopentan biriminin birleşmesi sonucu meydana gelmektedirler. Bunlar belirli sınıflardaki bazı hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmelerine rağmen genellikle bitkilerin yaprak ve meyvelerinin (nadir olarak da kabuk ve köklerinin) distilasyonu ya da çözücülerde çözündürülmesi sonucu elde edilen uçucu yağlardan izole edilen sekonder metabolizma ürünleridirler (Simonsen and Owen 1949; Florkin and Mason 1962; Davies *et al.* 1964; Whiting and Harper 1968).

İzopren birimlerden şematize edilerek bileşiklerin oluşturulabileceğini tasarlayan Wallach 1887 yılında monoterpenlerin de bu yöntemle şematize edilebileceğini ilk kez ileri sürmüştür. Yaklaşık 30 yıl kadar sonra Robinson, limonen ve kafur monoterpenleri üzerinde gösterdiği baş-kuyruk modeline “izopren kuralı” ismini vermiştir. Ancak birçok yüksek yapılı terpen ve bazı monoterpenler bu kurala uymadığından Ruzicka ve arkadaşları günümüzde de geçerliliğini koruyan “biyogenetik izopren kuralı” nı ileri sürmüşlerdir (Ruzicka *et al.* 1953; Ruzicka 1959).

Monoterpenler genellikle asiklik, siklik ve düzensiz olmak üzere 3 ana başlık altında incelenmektedirler.

1.5.2.a. Asiklik monoterpenler

Asiklik monoterpenlerin genellikle geranil pirofosfat ve neril pirofosfattan türediği rapor edilmiştir (Valenzuela and Cori 1967). Bu grupta yer alan monoterpenlerin yapılarında halka yoktur ve üç çifte bağ taşırlar (Demirçakmak 1994). Trienler (mirsen), osimenler, geraniol, nerol, sitrenelol, linalol gibi alkoller önemli asiklik monoterpenlerdendir (Başer ve Demirci 2007).

1.5.2.b. Siklik monoterpenler

Siklik monoterpenlerin ikincil esterlerden sentezlendiği kaydedilmiştir (Valenzuela and Cori 1967). Siklik monoterpenler kimyasal yapıları bakımından 3 farklı grup altında incelenmektedirler (Başer ve Demirci 2007). Bunlar; monosiklik, bisiklik ve trisiklik monoterpenler.

Monosiklik monoterpenler: Monosiklik monoterpenler yapılarında bir halka ve iki çifte bağ taşırlar. 1-metil-4-isopropil-sikloheksan skelon içeren p-mentan monoterpenleri doğal olarak meydana gelen monoterpenlerin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Limonen, α -terpinen, β -terpinen, terpinolen ve fellandren p-mentan monoterpenlerindendir (Başer ve Demirci 2007). p-simen ve p-simeninin hidroksil türevi olan timol, karvakrol ve γ -terpinen aromatik monoterpenlerdir. α -terpineol, mentol, isoplegol ve cis-hekzahidroksiminil alkol de monoterpen alkollerindendir. Karvon, dihidrokarvon, izomenton, piperiton, piperitenon ve izoplegon da bu grupta yer alan aldehitlerdir (Başer ve Demirci 2007).

Bisiklik monoterpenler: Bisiklik monoterpenler yapılarında iki halka ve bir çifte bağ taşırlar. α -pinen ve β -pinen gibi pinen monoterpenleri bisiklik monoterpenlerdir. Bu gruba ait diğer önemli monoterpenler arasında sabinen, sabinol, kafur ve kamfen sayılabilir (Başer ve Demirci 2007).

Trisiklik monoterpenler: Trisiklik monoterpenler yapılarında üç halka taşırlar ancak çifte bağları yoktur. Trisiklin ya da 1,7,7-trimentiltrisikloheptan bu grubun en iyi bilinen örnekleridir (Başer ve Demirci 2007).

1.5.2.c. Düzensiz monoterpenler

Düzensiz monoterpenler iki büyük grup altında incelenir. Birinci grup troponen olarak da isimlendirilen sikloheptan monoterpenleridir. Ökarvon, nezukon ve γ -tujaplisin sikloheptan monoterpenlerindedir. Düzensiz monoterpenlerin ikinci grubundaki monoterpenlerin alt birimeri olan izopren moleküllerinde baş-kuyruk eşleşmesi yoktur. Bu grubun en önemli üyeleri artemisia keton, santolinatrin, krizantemol, yomogialkol ve lavanduloldür (Başer ve Demirci 2007).

1.5.3. Seskiterpenler

Seskiterpenler (C_{15}) iki izopren birimi içeren bir monoterpen molekülüne bir tane daha izopren biriminin bağlanması sonucu meydana gelmektedirler. Bu bileşikler lineer, dallı ve siklik formlarda bulunurlar. Siklik seskiterpenler monosiklik, bisiklik ve trisiklik olarak bulunabilirler. Örnek olarak β -farnesen (asiklik), zingiberen (monosiklik) ve kadinen (bisiklik) verilebilir (Başer ve Demirci 2007).

1.5.4. Diterpenler

Diterpenler (C_{20}) dört izopren biriminden meydana gelen bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle bitkiler ve mantarlar tarafından üretilirler. En önemli ve en bol bulunan diterpen türevleri abietik asit, d-pimarik asit ve levopimarik asit gibi karboksilik asit türevleridir. Diterpenlerin alkol, eter, lakton ve diğer oksijenli türevleri de doğada bulunmaktadır (Kumar and Chobra 2005; Karabacak 2007).

1.5.5. Triterpenler

Triterpenler (C_{30}), altı izopren biriminden oluşurlar ve biyosentetik olarak skualenden meydana gelirler. Triterpenler steroidler, saponinler, steroller, kardiyak glikozitleri, limoninler ve kukurbitasinleri içerirler. Bazı önemli triterpenler arasında α -amirin, ursolik asit, limoninen, kukurbitasin D ve skualen sayılabilir (Kumar and Chobra 2005; Koyunoğlu 2008).

1.5.6. Tetraterpenler

Tetraterpenler (C_{40}) sekiz izopren biriminin birleşmesi ile meydana gelirler. En yaygın olarak bilinen tetraterpenler karotenoidlerdir. α -karoten, β -karoten, lutein ve riiodoksantin tetraterpenoidlerin iyi bilinen örneklerindedir (Kumar and Chobra 2005; Koyunoğlu 2008).

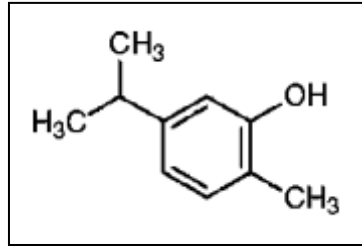
1.6. Aromatik bileşikler

Aromatik bileşikler uçucu yağların içerisinde terpenlerden daha az miktarlarda bulunurlar ve fenilpropandan türevlenirler. Fenilpropanik türevler ve terpenler bazı bitkilerde birlikte bulunurken, bazı bitkilerde ise farklı biyosentez yollarıyla ayrı ayrı bulunurlar. Aromatik bileşikler arasında çeşitli aldehitler (sinnamaldehit), alkoller (sinnamik alkol), fenoller (şavikol, öjenol), metoksi türevleri (anethol, elemisin, estragol, metileugenol) ve metilen dioksi bileşikleri (apiol, miristisin, safrol) bulunur. Bu bileşiklerin bulunduğu bitkisel kaynaklar arasında anason, tarçın, karanfil, rezene, küçük hindistan cevizi, maydanoz ve tarhun sayılabilir (Bakkali *et al.* 2008).

1.7. Tez Kapsamında Test Edilen Monoterpenler

1.7.1. Karvakrol

Karvakrol [2-metil-5-(1-metiletil)-fenol]; *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Corydthymus* cinslerini içeren Labiatae familyasının pek çok üyesinin esansiyel (uçucu) yağında doğal olarak meydana gelen monoterpenik bir fenol öncüsüdür. Karvakrol keskin kokulu olup ve oda şartlarında sıvıdır (Krimer *et al.* 1995; Jayakumar *et al.* 2012). *Origanum vulgare* bitkisinden elde edilen uçucu yağın %80'i karvakrol olup kimyasal yapısı Şekil 1.8'deki gibidir (Jayakumar *et al.* 2012).



Şekil 1.8. Karvakrolün kimyasal yapısı

Kekiğin biyolojik aktiviteye sahip etken maddesi olan karvakrol uzun yıllardır gıda endüstrisinde gıda ve gıda katkı maddesi (tatlılar ve içeceklerde tatlandırıcı) olarak kullanılmasının yanısıra günümüzde kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır (Baser 2008; Liang and Lu 2012).

Libya'da yetişen *Satureja thymbra* bitkisinin esansiyel yağlarından elde edilen karvakrol ve timolün güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Giweli *et al.* 2012). Karvakrolün hücre canlılığı üzerine olan etkisi insan glioblastoma hücrelerinde tetrazolium yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda karvakrolün artan konsantrasyona bağlı olarak (200-800 μ M) 24 saatte hücre canlılığını azalttığı ve 1000 μ M konsantrasyonda ise bütün hücreleri öldürdüğü kaydedilmiştir (Liang and Lu 2012). Fare modelinde bir orta serebral arter tıkanıklığında serebral iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine karvakrolün koruyucu etkisi

araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda karvakrolün anti-apoptotik etki gösterdiği ve infarkt hacim üzerine nöro-koruyucu etki yaptığı kaydedilmiştir (Yu *et al.* 2012). Karvakrolün sitotoksik etkileri domuz epitel hücreleri üzerinde (IPEC-J2) yapılan deneylerle değerlendirilmiştir. Karvakrolün artan konsantrasyona bağlı olarak toksik etki yaptığı ve hücrelerin ölümüne neden olduğu gözlemlenmiştir (Inamuco *et al.* 2012).

Yapılan bir çalışmada karvakrol ve timolün demir (III) ve askorbat varlığında fosfolipit lizozomlarının peroksidasyonunu azalttığı ve ışığın neden olduğu peroksil radikallerinin temizlenimini arttırdıkları rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada bu iki bileşiğin DNA hasarı üzerine olumsuz etki yapmadığı tespit edilmiştir (Aeschbach *et al.* 1994). *Origanum onites* bitkisinden elde edilen karvakrolün bir insan N-RAS onkogeni taşıyan fare miyoblast hücrelerinde (CO₂₅) mutasyona uğramış olan N-RAS onkogeninin aktive olduktuktan sonra bile hücre büyümesini inhibe ederek antitümör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Zeytinoğlu vd 2003). Büyük hücreli insan akciğer kanseri (NSCLC) hücreleri (A549) üzerine karvakrolün artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre sayısını azalttığı rapor edilmiştir (Koparal ve Zeytinoglu 2003).

Ratlarda dietilnitrozaminin neden olduğu hepatosellular karsinoma hücreleri üzerine karvakrolün etkisini araştırıldığı bir çalışmada karvakrol; seviyeleri artmış olan aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), alkalın fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH) ve gamma glutamil transpeptidaz (γ GT) gibi serum enzimlerinin, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-GP_x) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi doku enzimlerinin ve lipit peroksidlerinin seviyelerini düşürerek hem antioksidan hem de antikanser etki göstermiştir (Jayakumar *et al.* 2012). Wistar ratlarından elde edilen leiomyosarkoma hücreleri üzerine karvakrolün antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada; karvakrolün 24 ve 48 saatlik kültürlerde artan konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Karkabounas *et al.* 2006). Metilen mavisi ile etkisi arttırılmış olan görünür ışığın indüklemesi sonucu DNA hasarı oluşmuş olan rat hepatosit ve testiküler hücrelerinde karvakrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Karvakrolün sadece hepatosit hücrelerinde okside baz seviyesini azalttığı ve sağlıklı

hepatosit hücrelerinde ise genotoksik olmadığı kromozom aberasyonları testi ile tespit edilmiştir. Aynı çalışmada karvakrolün antioksidan aktivite sergilediği 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) yöntemi ile gözlemlenirken oksidatif DNA hasarına karşı güçlü hepatoprotektif aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Slamenova *et al.* 2011).

Thymus caramanicus bitkisinden elde edilen karvakrolün yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu DPPH yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (Safaei-Ghomi *et al.* 2009). Yine karvakrolün antioksidan etkisinin DPPH yöntemi ile araştırıldığı başka bir çalışmada da karvakrolün salınmış serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Chen *et al.* 2009). Çin hamsteri akciğer fibroblast hücrelerinde (V79) timol ve karvakrolün antioksidan etkileri Trolox eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) yöntemiyle, genotoksik etkileri ise Comet yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda timol 1, 2.5, 5 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda, karvakrol ise 1, 2.5, 5, 10 ve 15 μM 'lık konsantrasyonlarda güçlü antioksidan etki göstermiştir. Comet yönteminin sonuçlarına göre de timolün 1 ve 5 μM 'a kadar, karvakrolün ise 25 μM 'a kadar DNA zincir kırıklarında önemli bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir (Undeğer vd 2009). İpek ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında kekiğin ana aromatik bileşeni olan karvakrolün insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etki yapmadığını kardeş kromatid değişimi (KKD) yöntemi kullanarak ortaya koyarken mitomisin C (MMC) tarafından indüklenen KKD frekansını inhibe ederek antigenotoksik etki yaptığını kaydetmişlerdir (İpek vd 2003).

Karvakrolün antidepresan etkisi farelerde zorlu yüzme ve kuyruk süspansiyon testleriyle araştırılmıştır. Araştırma sonucunda oral yolla uygulanan 12.5, 25 ve 50 mg/kg'lık karvakrolün söz konusu iki testte de hareketsizlik süresini azaltarak antidepresan etki gösterdiği rapor edilmiştir (Melo *et al.* 2011). Türkiyede yetişen *Origanum acutidens* bitkisinden izole edilen karvakrolün antifungal, fitotoksik ve insektisidal etkileri farklı deney modelleri üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada bu monoterpenin *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* ve *Verticillium* cinslerine ait bazı fitopatojenik mantar türlerinin büyümelerini inhibe ederek antifungal aktivite sergilediği tespit edilirken; *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* ve

Rumex crispus cinsi bitkilerin tohum çimlenmesini ve fide büyümesini tamamen inhibe ederek potansiyel bir fitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, karvakrolün *Sitophilus granarius* ve *Tribolium confusum* erginlerine karşı insektisidal etki gösterdiği kaydedilmiştir (Kordali vd 2008).

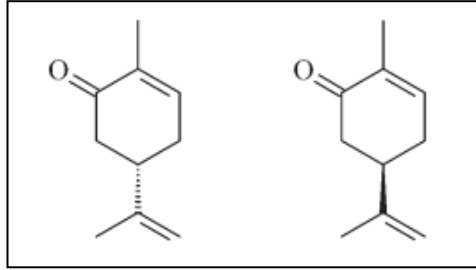
Rat pankreas adacık hücrelerinde hidrojen peroksitin (H₂O₂) indüklediği hücresel hasara karşı karvakrolün koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada karvakrol muamelesinin H₂O₂'nin indüklediği lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna karşı hücreleri koruduğu gözlemlenmiştir (Dagli vd 2013). Karvakrolün anti-inflamatuvar ve anti-ülser etkileri deneysel modeller üzerinde değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda karvakrolün 12-O-tetradekanoylphorbol ve araşidonik asit tarafından indüklenen ödemi azalttığı gözlemlenirken, asetik asit tarafından indüklenen gastrik lezyonlar üzerine de iyi bir iyileşme etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Silva *et al.* 2012).

Yapılan çeşitli çalışmalarda karvakrol ve timolün *Bacillus cereus*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Juven *et al.* 1994; Kim *et al.* 1995; Horvath *et al.* 2002; Nostro *et al.* 2004; Xu *et al.* 2008; Pei *et al.* 2009; Morento *et al.* 2010). Çetin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karvakrolün *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae) erginlerine karşı akarisidal etkiye sahip olduğunu kaydetmişlerdir (Çetin vd 2010).

1.7.2. Karvon

Karvon (p-mentha-6,8-dien-2-on) nane (*Mentha spicata* L.), dereotu (*Anethum graveolens* L.), kimyon (*Carum carvi* L.) ve zencefil otu (*Lippia alba*) gibi bitkilerde bulunan çeşitli uçucu yağların ana etken maddesi olan monoterpenik bir ketondur (Gonçalves *et al.* 2010). Yaklaşık 70 bitki tarafından üretilen bu bileşik ortak bir tat ve kokuya sahiptir (Burdock 1995). Karvon bitkilerden genellikle hidrodistilasyon, buhar distilasyon ve ekstraksiyon yoluyla elde edilir (Kallio *et al.* 1994). İki farklı

enantiomere ((R)-(-)-karvon ve (S)-(+)-karvon) sahip olan karvon oda şartlarında sıvıdır ve kimyasal konfigürasyonu Şekil 1.9'daki gibidir (Hannah *et al.* 1999; Morrish and Daugulis 2008).



Şekil 1.9. Karvonun kimyasal yapısı

Her iki karvon enantiomeride (özellikle (R)-karvon) çeşitli gıda (turşu, ekmek, dondurma, şekerleme, unlu mamuller, et, peynir, bal, alkolsüz içecekler ve alkollü içecekler), ilaç ve parfüm endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Welsh *et al.* 1989; Baysal and Starmans 1999). Ayrıca karvon Hollanda'da "Talent" adı altında patates filiz inhibitörü olarak tarım sanayinde de kullanılmaktadır (Hartmans *et al.* 1995).

Karvonun antioksidan aktivitesi DPPH ve oksijen radikal abzorban kapasitesi (ORAC) yöntemleri ile araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre karvonun yüksek konsantrasyonlarının (60, 80 ve 100 mg/L) DPPH radikallerini temizlediği ve ORAC metodu ile de antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada karvonun 250 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda meme adenokarsinom (MCF-7) ve kolon adenokarsinom hücrelerinin (HT-29) büyümesini %50 oranında inhibe ederek antiproliferatif etkiye sahip olduğu da rapor edilmiştir (Bicas *et al.* 2011). Dişi A/J fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada karvonun ön mide tümörlerinin oluşumunu %60 oranında, akciğer adenom oluşumunu ise %35 oranında azalttığı kaydedilmiştir (Wattenberg 1989). Karvonun antiproliferatif etkisi insan prostat kanser hücreleri (LNCaP) üzerinde MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda karvonun artan konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2006). Yapılan bir çalışmada d-karvonun A/J farelerinin 5 farklı

dokusunda (karaciğer, ince bağırsak mukozası, kalın bağırsak mukozası, ön mide ve akciğer) glutatyon-S-transferaz (GST) enziminin aktivitesini indükleyerek güçlü antikarsinogenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Zheng *et al.* 1992). HL-60 (insan promiyelositik lösemi) hücreleri üzerine yapılan bir araştırmada d-karvonun 6, 12 ve 24 saatlik muamelelerde artan konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği ve 100, 200 ve 140 μM 'lık konsantrasyonlarda ise hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir. Aynı araştırmada tripan mavisi boyama yöntemi ile d-karvonun 100 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu da tespit edilmiştir (Yu *et al.* 2008). Karvon ve türevlerinin sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise bu tür bileşiklerin artan konsantrasyonuna bağlı olarak insan serviks epiteloid kanser hücreleri (HeLa hücre hattı ATCC, CCL-2) ve *Cercopithecus aethiops* (Afrika yeşil maymunu) böbrek hücrelerinin (Vero hücre hattı ATCC, CCL-81) büyümelerini inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Mesa-Arango *et al.* 2009). *In vitro* yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada S(+)-karvon, timol, karvakrol ve sinnamaldehit monoterenlerinin insan epidemoid kanser hücreleri (Hep-2) üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Tüm monoterenlerin doza bağlı olarak hücre canlılığını ve proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Stammati *et al.* 1999).

Beslenme sonucu hiperlipidemi (kolesterol yüksekliği) oluşmuş ratlarda *Carum carvi* bitkisinin tohumlarının sulu ekstrelerinin hipolipidemik etkisini araştırılmıştır. Araştırma sonucunda bu bitki ekstresinin hipolipidemi sonucu kanda seviyeleri artmış olan serum trigliserid, LDL (lipoprotein) ve total kolesterolün seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca *Carum carvi* bitkisinin bileşenlerinin (özellikle flavonoidler ve karvon) hem hipolipidemili hem de sağlıklı ratlarda güçlü antioksidan etki gösterdiği kaydedilmiştir (Saghir *et al.* 2012). *Drosophila melanogaster* üzerine 10 farklı esansiyel yağ içeriğinin mutajenik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada S(+)-karvonun herhangi bir mutajenik etki yapmadığı gözlenirken R(-)-karvonun düşük dozlarda bile mutajenik olduğu rapor edilmiştir (Mademtzoglou *et al.* 2011).

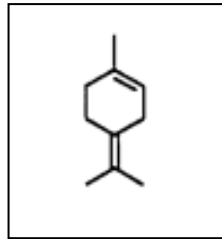
Epoksi-karvonun anti-ülser etkisinin ratlar üzerinde araştırıldığı bir çalışmada bu bileşiğin 1 mg/kg'lık dozunun etanol tarafından indüklenen ülser üzerine etki yapmadığı

gözlemlenirken; 10, 30 ve 50 mg/kg'lık dozlarının hem etanol hem de indometazin tarafından indüklenen ülserle karşı antiülser etki sergilediği gözlemlenmiştir (Siqueira *et al.* 2012)

Bir karvon türevi olan S-karvonun bir mantar türü olan *Botrytis cinerea*'e karşı antifungal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Hu *et al.* 2009). Yine, yapılan bir diğer araştırmada karvon ve timolün mikotoksigenik bitki patojenleri olan *Fusarium subglutinans*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata* ve *Penicillium* sp. mantarlarına karşı antifungal aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Morcia *et al.* 2012).

1.7.3. Terpinolen

Terpinolen (1-izoprofenil-4-metilsikloheks-3-ene) *Manilla elemi*, *Nectranda elaiophora* ve *Dacrydium colensoi* gibi bazı köknar ve çam türlerinin uçucu yağlarında bulunan monoterprenik bir bileşiktir (Burdock 1995; Bravss *et al.* 1999). Bu bileşik bazı oda ve temizlik spreyleri ile parfümlerde kullanılabilir (Ma and Marston 2009). Terpinolenin kimyasal yapısı Şekil 1.10'daki gibidir (Corchnoy and Atkinson 1990).



Şekil 1.10. Terpinolenin kimyasal yapısı

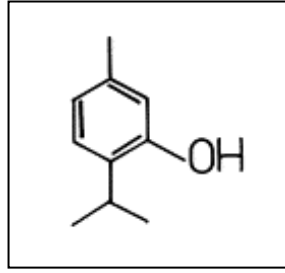
Pinus mugo bitkisinden izole edilen terpinolenin düşük yoğunluklu LDL-oksidasyonunu etkili bir şekilde önlediği rapor edilmiştir (Grassmann *et al.* 2005). Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemi kullanılarak bazı esansiyel yağlar ve onların etken maddelerinin antioksidan kapasitelerinin araştırıldığı bir çalışmada terpinolenin güçlü

antioksidan etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (Dorman *et al.* 2000). Yine Avustralya çay ağacından (*Melaleuca alterifolia*) izole edilen ve bir terpinolen türevi olan α -terpinolenin antioksidan aktivitesi DPPH ve hekzanal/hekzanoik asit yöntemleri ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda α -terpinolenin 1800 mM konsantrasyonda DPPH serbest radikallerinin salınımını güçlü bir şekilde önleyici aktivite gösterdiği rapor edilirken, hekzanal/hekzanoik asit oksidasyonuna karşı da güçlü inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2004). Ruberto and Baratta (2000) yaptıkları bir çalışmada tiyabarbitürik asit (TBA) yöntemini kullanarak terpinolenin artan konsantrasyona bağlı olarak güçlü antioksidan aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir. *Satureja montana* L. bitkisinden izole edilen terpinolenin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu beta karoten ağartma ve TBA yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir (Radonic and Milos 2003).

Hyptis suaveolens (Lamiaceae) bitkisinin esansiyel yağının etken maddesi olan terpinolenin *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) türü larvalarına karşı güçlü larvasidal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Conti *et al.* 2012). Terpinolenin bitki patojeni *Botrytis cinerea* ve *Cladosporium herbarum* mantarlarına karşı güçlü antifungal aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Faroog *et al.* 2002).

1.7.4. Timol

Timol (5-metil-2-izopropifenol) *Carum copticum* ve *Thymus vulgaris* gibi turunçgil bitkilerinin uçucu yağlarında bulunan, simen monoterpeninin türevi olan bir çeşit monosiklik monoterpen fenolüdür (Shan *et al.* 2005; Bera *et al.* 2009; Zahin *et al.* 2010; Archana *et al.* 2011). Kekik ve keklik otunun ana bileşeni olan timol antibiyotik, damar büzücü ve ağız bakım ürünü gibi tıbbi kullanımının yanı sıra tarım, kozmetik ve gıda sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Manou *et al.* 1998; Szentandrassy *et al.* 2003; Sanchez *et al.* 2004; Burt *et al.* 2004; Kabouche *et al.* 2009; Pandey *et al.* 2009). Timolün kimyasal yapısı Şekil 1.11'deki gibidir (Yanishlieva *et al.* 1999).



Şekil 1.11. Timolün kimyasal yapısı

Archana ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 4,5 gamma (Gy) radyasyona maruz bırakılmış İsviçre albino farelerinde timolün GSH, GST, CAT ve SOD seviyelerini azaltarak antioksidan etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Archana *et al.* 2010). 24 saatlik memeli hücre kültürlerinde (insan hepatoma hücreleri (HepG₂), insan kolon hücreleri (Caco2) ve hamster akciğer hücreleri (V79)) karvakrol ve timolün sitotoksik, genotoksik ve DNA-koruyucu etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda tripan mavisi testi kullanılarak karvakrolün timolden sitotoksikite bakımından daha az etkili olduğu gözlemlenirken, bu iki bileşiğe karşı Caco2 hücrelerinin HepG₂ ve V79 hücrelerine göre daha dayanıklı oldukları gözlemlenmiştir. Çalışılan bileşiklerin ne HepG₂ ne de Caco2 hücrelerinde DNA kırıklarına neden olmadığı kaydedilmiştir. Ayrıca, HepG₂ ve Caco2 hücrelerinde kuvvetli bir oksidan H₂O₂ tarafından indüklenen DNA zincir kırıklarına karşı bu bileşiklerin koruyucu etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (Slamenova *et al.* 2007). Timolün hücre canlılığını inhibe edici etkisi kit-8 [WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-disulfophenyl) -2H-tetrazolium], monosodyum tuzu] metodu kullanılarak akut promiyelotik lösemi hücreleri (HL-60) hücreleri üzerinde çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler sonucunda 24 saatlik kültürlerde timolün artan konsantrasyonuna bağlı olarak (25, 50, 75 ve 100 µM) hücre canlılığını azalttığı, 12 saatlik kültürlerde ise timolün 5 ve 25 µM'lık konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, timolün çalışılan tüm dozlarının 24 saatlik kültürlerde apoptozisi indüklediği kaydedilmiştir (Deb *et al.* 2011).

Nigella sativa bitkisinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağlarının etken maddesi olan timolün antikanser etkisi insan lorinks epidrmoid kanser hücreleri (Hep2) üzerinde

araştırılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik timol muamelesinden sonra 24 saatlik kültürlerde inhibisyonun başladığı ve 48 saatlik kültürlerde inhibisyonun en yüksek düzeye ulaştığı gözlemlenirken, 72 saatlik kültürlerdeki inhibisyonun ise 48 saatlik kültürlerden farklılık göstermediği rapor edilmiştir (Gany and Mahdi 2008). Timolün antiinflamatuvar etkisinin araştırıldığı bir çalışmada uygulanan tüm konsantrasyonların (0,1, 1, 10, 100 μM) prostaglandin E_2 (PGE_2) oluşumunu katalizleyen siklooksijenaz 1 (COX-1) ve PGE_2 üretimini katalizleyen siklooksijenaz 2'yi (COX-2) istatistiksel olarak önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Marsik *et al.* 2005). Bir diğer araştırmada, radyasyona bağlı sitotoksosite oluşturulmuş Çin hamsteri akciğer fibroblastlarında (V79) timolün koruyucu etkisi çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda timolün artan konsantrasyona bağlı olarak DPPH, ABTS ve süperoksit anyonu gibi salınmış olan serbest radikalleri temizleme aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada V79 hücreleri önce çeşitli konsantrasyonlarda timol ile muamale edilmiş, daha sonra ise 10 Gy radyasyona maruz bırakılmıştır. Bu işlemler sonucunda yapılan MTT analizlerinde timolün hücre canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir (Archana *et al.* 2009). Timolün artan dozlarına bağlı olarak insan glioblastoma hücrelerinde canlılığı azalttığı, 800 μM 'lık dozda ise hücreleri tamamen öldürdüğü tetrazolium yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Hsu *et al.* 2011).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada timolün rodent pençelerindeki ödem oluşumunu azaltarak antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu kaydedilmiştir (Riella *et al.* 2012).

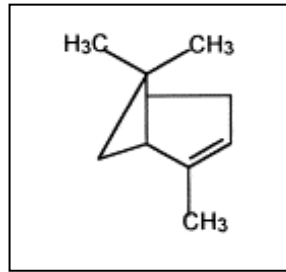
Yapılan bir çalışmada timol ve karvakrolün *Candida* izolatlarına (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei*) karşı güçlü fungisidal etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (Ahmad *et al.* 2011). Zarrini ve arkadaşları timolün *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Zarrini *et al.* 2010).

Timol ve karvakrolün *Culex quinquefasciatus* Say larvaları ve *Musca domestica* L. erginlerine karşı insektisidal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Pavela 2011). Mendes

ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında timolün *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) türünün larva ve nimflerine karşı akarisidal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Mendes *et al.* 2011).

1.7.5. Alfa-Pinen

Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan çam ağaçlarının (*Pinus*) uçucu yağlarında bulunan α -pinen aynı zamanda turunçgiller gibi pek çok aromatik bitki ve çiçeklerde de doğal olarak meydana gelen dünyanın en bol üretilen uçucu yağı olarak bilinen terebentinin etken maddesi olan monoterpendir. α -pinen bisiklik ve hidrofobik yapıda olan bir monoterpendir (Mallavarapu *et al.* 1999; Rana *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007; Bakkali *et al.* 2008). α -pinen günümüzde parfüm, ilaç, gıda ve kimya sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır (Wu *et al.* 2011). α -pinenin kimyasal yapısı Şekil 1.12'deki gibidir (De-Oliveira *et al.* 1997).



Şekil 1.12. α -Pinenin kimyasal yapısı

Rosmarinus officinalis L. bitkisinden izole edilen α -pinenin antioksidan aktiviteye sahip olduğu DPPH yöntemi ve β -karaten beyazlatma testi kullanılarak ortaya konmuştur (Wang *et al.* 2008). Yapılan bir araştırmada α -pinenin mutajenik etkisi *Salmonella typhimurium* suşları (TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538) üzerinde Salmonella/mikrozom yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda α -pinenin 1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 'lik konsantrasyona kadar mutajenik etki yapmadığı tespit edilmiştir (Gomes *et al.* 2005). *Satureja montana* bitkisinden izole edilen α -pinenin insan eritrolökemik hücreleri (K562) üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir

(Lampbronti *et al.* 2006). Gminski ve arkadaşları α -pinenin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin insan karaciğer adenokarsinoma hücreleri (A549) üzerinde araştırmaları sonucunda bu bileşiğin 1800 mg/m³ konsantrasyona kadar DNA hasarına yol açmadığını COMET yöntemi ile tespit ederken; hücre canlılığı oranının değişmediğini eritrozin-B yöntemini kullanarak ortaya koymuşlardır (Gminski *et al.* 2010). *Eucalyptus tereticornis* bitkisinin yapraklarından izole edilen α -pinenin antioksidan aktivite sergilediği DPPH, serbest radikal salınım kapasitesi (RSC) ve hidroksi radikal (OH[•]) salınım aktivitesi metotları kullanılarak rapor edilmiştir (Singh *et al.* 2009). Bir diğer araştırmada, α -pinenin antibakteriyal ve antikanser etkisi değerlendirilmiştir. İnsan yumurtalık kanseri (SK-OV-3 ve HO8910) ve hepatosellular karaciğer kanseri (Bel-7402) hücreleri üzerinde yapılan MTT analizleri sonucunda α -pinenin güçlü sitotoksik etki gösterdiği ve artan konsantrasyonu ile birlikte hücre canlılığını azalttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda α -pinenin gram pozitif bakterilere (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) gram negatif (*Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) bakterilere göre daha güçlü anti-bakteriyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Wang *et al.* 2012). Russin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada α -pinenin 7,12-dimetillbenz[a]anthrasenin indüklediği sıçan meme kanserine karşı potansiyel bir kemopreventif ajan olabileceğini rapor etmişlerdir (Russin *et al.* 1989).

Serulein tarafından indüklenen akut pankreatitli farelerde α -pinenin koruyucu etkisini araştırıldığı bir çalışmada, araştırmacılar α -pinen muamelesinin serumdaki amilaz ve lipaz enzimlerinin seviyesini azalttığını ve pankreas ile karaciğerlerdeki histolojik hasarı ve miyeloperoksidaz aktivitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada α -pinen ön muamelesinin akut pankreatitli farelerde pankreatik tümör nekroz faktörü- α , interlökin-1 β ve interlökin-6 üretimini azalttığı; ayrıca α -pinenin serulin ile muamele edilen pankreastan izole edilen pankreas asinar hücrelerinde sitokinin üretimini ve serulinin indüklediği hücre ölümünü inhibe ettiği rapor edilmiştir (Bae *et al.* 2012)

α -Pinenin *Citrobacter freundii*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium suaveolens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella* sp., *Proteus vulgaris*, *Salmonella*

pullorum, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* bakterilerine karşı antibakteriyal aktivite sergiledikleri rapor edilmiştir (Dorman *et al.* 2000).

1.8. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü diğer bir ifadeyle hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücreden bir seri biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliğin meydana gelmesi sonucu, genetik ve morfolojik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücrenin oluşumuyla tamamlanan bir döngüdür (Engin ve Özyardımcı 2001; Er 2010). Genellikle hücre döngüsü interfaz ve mitoz (M) olmak üzere iki ana bölüm halinde incelenmektedir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt fazlardan oluşur. Dolayısıyla, bir hücre döngüsü sırasıyla G1, S, G2 ve M fazlarından oluşmaktadır. Hücre döngüsünün en uzun evresi olan G1 fazında (9-16 saat) hücre protein ve RNA sentezler. S fazında (6 saat) protein ve RNA sentezi devam ederken DNA sentezi başlar. G2 fazında (3-4 saat) ise DNA sentezi tamamlanmış olur, fakat RNA ve protein sentezi devam eder. M fazında, kardeş kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli basamaklardan geçilerek (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) hücre ikiye bölünür. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir. Ayrıca hücreler, M fazından sonra hücre döngüsünden çıkarak çoğalmanın olmadığı dinlenme fazı olan G0'a girmektedir. Bölünme uyarısı alan hücre G0 fazından ayrılarak G1 fazına girer ve döngüye katılır (Klug and Cummings 2002; Türkez 2007).

Hücre döngüsünde G1/S, G2/M ve metafaz/anafaz geçişlerinde kontrol noktaları vardır. Her üç kontrol noktasında da hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğinin kararı verilmektedir (Cabadak 2008). Hücre döngüsü, döngüye özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilmektedir. Hücre döngüsünün çeşitli basamaklarında siklinlerin, CDK ve CDI'lerin düzeyleri farklılık gösterir ve oldukça karışık bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler (Engin ve Özyardımcı 2001). M kontrol noktasında görev yapan proteinler ise iğ ipliklerinin

oluşumu ve bunların kromozom sentromerlerinin kinetoruyla yaptığı bağlanmayı engelleyerek hücrelerin anafaza girişini inhibe eder (Klug and Cummings 2002).

Apoptosis (programlı hücre ölümü) hücrelerin programlanmış ölüm mekanizmasıdır. Doku homeostazisinin bir düzen içinde oluşu, proliferasyon/apoptoz dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Turner *et al.* 2004). Apoptosis, hücrenin canlı kaldığı süre boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamanın yanısıra organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev almaktadır. Hasarlı DNA da apoptosis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar, kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptosis yolu ile yok edilmesi büyük önem taşımaktadır (Akşit ve Bildik 2008). Çünkü bu süreçteki herhangi bir bozukluk ölmesi gereken bir hücrenin ölmemesine, genetik bozukluğa ve mutasyonlu hücrelerin çoğalmasına yol açar (Andreeff *et al.* 2000; Turner *et al.* 2004).

1.9. Neoplazi

Neoplazi yani tümör herhangi bir sınırlanma veya sonlanma göstermeyen, konak canlıının kontrol mekanizmalarının etkisinde kalmayan, hızlı, sınırsız ve anormal bir hücre çoğalması ile oluşan doku kütlesi olarak tarif edilmektedir (Altman and Sarg 1992; Kumar *et al.* 1992). Neoplaziler biyolojik davranışları bakımından iki gruba ayrılır; selim (non-kanser, iyi huylu) ve habis (kanser, kötü huylu) tümörler.

a. Selim tümörler

Köken aldıkları dokunun hücrelerine benzer şekilde farklılaşmış hücrelerden oluşan selim tümörler, genellikle yavaş büyürler ve belirli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra durur veya gerilerler (Kumar *et al.* 1992). Selim tümörler, kaynaklandığı dokuda sınırlı kalır, invazyon (çevre dokulara yayılma), infiltrasyon (yabancı madde birikimi) ve metastaz (uzak dokulara yayılma) yapmazlar (Kumar *et al.* 1992; Ruddon 1995).

b. Habis tümörler

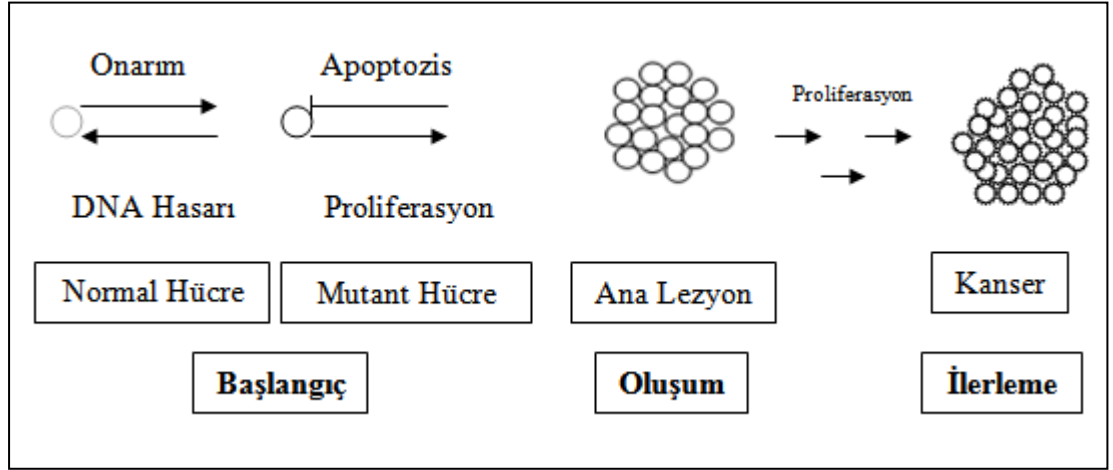
Değişik dokuların özelliklerini taşıyabilen, farklılaşmış veya hiç farklılaşmamış hücrelerden oluşan habis tümörler, genellikle çok hızlı büyüme yeteneğine sahiptirler. Bu tip tümörler ileri infiltrasyon, invazyon ve metastaz ile çevre dokulara yayılmaktadırlar. Habis tümörlerin tümü “kanser” olarak adlandırılmaktadır. Bölünme yeteneğine sahip hücre içeren tüm dokularda ortaya çıkabilen kanser hücrelerinin morfolojileri de oldukça değişkendir. Kanser hücrelerinin çekirdekleri normal hücrelere oranla daha büyüktür, kromatinleri daha belirgindir ve nukleus/sitoplazma oranı genellikle artmıştır. Ayrıca, hücre siklusunda mitoz giren hücre sayısı, normal hücrelere göre daha fazladır ve mitoz anomalileri sık görülmektedir (Kumar *et al.* 1992; Ruddon 1995).

Hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık olan kanser günümüzde birçok toplumda kalp ve damar hastalıklarından sonra en fazla ölüme yol açan hastalık grubudur (Klug and Cummings 2002; Ruacan 2003). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) son verilerine göre, Dünyada 2000 yılında 10 milyon yeni vakada kanser hastalığı tespit edilirken, bu rakamın 2020 yılında 15 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir (Güzey 2007). Sağlık Bakanlığınca yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, Türkiye’de yıllık kanser insidensinin yüz binde yaklaşık 150 olduğu ve her yıl yaklaşık 90.000-100.000 civarında yeni kanser vakalarının görüleceği bildirilmiştir. Tüm bu verilere göre kanser günümüzün en önemli sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (Kayaalp 2009).

1.9.1. Kanser biyolojisi

Kanser oluşumu (karsinogenez) üç aşamalı bir süreçtir. Başlangıç, oluşum ve ilerleme. Bu süreç genellikle gen mutasyonu, onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi genetik değişiklikler sonucu başlamaktadır. Başlangıç safhasında hücre bölünmesinin artışı ve hücre ölümünün azalması ile hücre popülasyonu genişler. Oluşum safhasında hücrede ölümcül olmayan fakat kalıtsal

olan mutasyonlar meydana gelir. Son safha olan ilerleme de ise iyi huylu lezyonlardan habis tümörler gelişir. Karsinogenezin oluşum safhaları Şekil 1.13’de gösterilmiştir (Klauning *et al.* 1998).



Şekil 1.13. Kanserin oluşum safhaları

Bu süreçte meydana gelen hücrelerin bölünmesi, farklılaşması ve apoptozis olayları normal hücrelerle kanserli hücreler arasında benzerlik göstermektedir. Ancak, kanserli hücreleri normal hücrelerden ayıran, bu aşamaların düzenlenmesi ile ilgilidir. Kanserli dokuda dört hücresel fonksiyon düzensizdir. Bunlar;

- 1) Hücresel çoğalmayı sınırlayan faktörler inaktiftir.
- 2) Farklılaşma olayı düzensizdir. Kanser hücreleri farklılaşmanın belli bir noktasında bloke olurlar veya anormal hücre tipine dönüşürler.
- 3) Kromozomal ve genetiksel stabilite bozulması sonucu anormal hücreler oluşur.
- 4) Apoptozis denetlenemez hale gelmiştir (McPhee *et al.* 2000; Klug and Cummings 2002).

Kanserin ana nedeni hala açık olmamakla birlikte karsinojen adı verilen etkenlerin hücrede çeşitli hasarlara neden olarak kanser oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Karsinojenler, kimyasal, fiziksel veya viral kaynaklı olabilirler. Tütün, alkol, boya, gıda katkı maddeleri, atmosfer ve su kirleticileri kimyasal karsinojen grubuna dahildir.

Radyasyon günümüzde en iyi bilinen fiziksel karsinojendir (Baloğlu 2001). Çok sayıda DNA ve RNA virüslerinin canlılarda bazı kanserlere neden olduğu tespit edilmiştir (Cortan *et al.* 1999; Ruacan 2003). Hücredeki proteinler, lipitler ve en önemlisi hücrenin genetik materyali olan nükleik asitlerle etkileşim yeteneğine sahip olan karsinojenler 2 gruba ayrılırlar; Başlatıcı (initiator) karsinojenler ve Artırıcı (promoter) karsinojenler. Başlatıcı karsinojenler genetik değişikliklere sebep olurken, artırıcı karsinojenler mutasyona uğramış olan hücrelerin çoğalmasını uyarırlar. Ayrıca, DNA'nın genetik istikrarsızlığı, DNA metilasyonu gibi epigenetik faktörler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar da kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Sinici 2004). Karsinojenlerin başlıca hücrenel hedefleri protoonkogenler, onkogenler ve tümör-baskılayıcı genlerdir. Çizelge 1.1'de bu hücrenel hedefler ve değişimlerinde meydana gelen hasarlar özetlenmiştir (McPhee *et al.* 2000; Dalay 2003; Junqueira 2003).

Çizelge 1.1. Karsinojenlerin hücrenel hedefleri

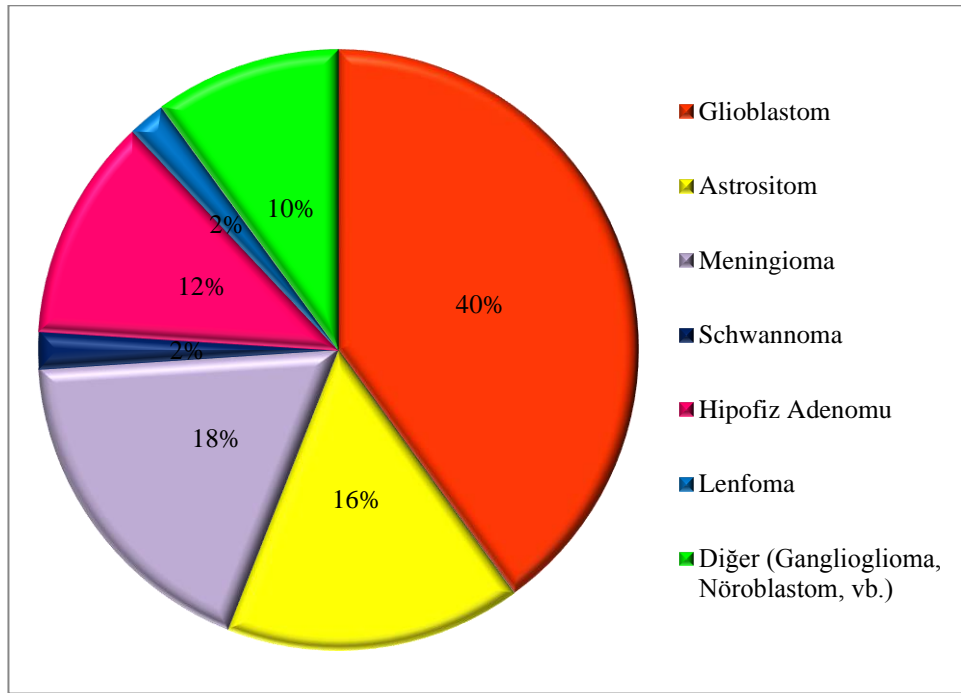
Hücrenel Hedef	Normal Hücredeki Görevleri	Karsinojenlerin Oluşturduğu Hasar
Protoonkogenler	Normal hücre çoğalmasını uyaran proteinleri kodlayan gen grubudur.	KontROLSÜZ proliferasyon ve farklılaşma
Onkogenler	Hücre çoğalmasını baskılayan, durduran veya kısıtlayan proteinleri kodlayan gen grubudur.	Hücre siklusunda kontrol kaybı
Tümör-baskılayıcı genler	KontROLSÜZ hücre çoğalmasını durduran gen grubudur.	Mutasyon

1.9.2. Beyin tümörleri

Bir sinir sistemi tümörü olan beyin tümörleri, tüm kanserler arasında %1,4'lük ve kanserlerle ilgili ölümler arasında ise %2,4'lük gibi çok küçük bir paya sahip olmasına rağmen bu tümörlerin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar verdiği için günlük yaşamı olumsuz şekilde etkilemektedir

(Güneş 2009). Beyin tümörlerinin etiyolojisi hakkında kesin bir şey söylenememekle beraber çeşitli çevresel faktörlerin (radyasyon, pasif veya aktif sigara içiciliği, vb.) ve genetiksel faktörlerin rol aldığı multifaktöriyel bir durum olduğu gerçeği şüphesizdir (Akyol 1994; Kubota *et al.* 2001). Sinir sistemi tümörleri genel olarak 3 grup altında toplanmaktadır: 1-Merkezi sinir sistemi parankim hücrelerinden gelişen primer kafa içi tümörleri, 2-Kökene kafa boşluğu olmakla beraber beyin parankiminden gelişmeyen primer kafa içi tümörleri, 3-Metastatik tümörler (Kumar *et al.* 1992). Belirli beyin tümörlerinin insanlarda görülme sıklığı Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Laws and Thapar 1993).

Çizelge 1.2. Belirli beyin tümörlerinin görülme sıklığı



Beyin tümörlerinin histolojik, patolojik ve morfolojik açıdan çok çeşitlilik göstermesi nedeni ile herkes tarafından kabul görmüş bir sınıflama gerçekleştirmek oldukça zordur. Günümüzde hala geçerliliğini devam ettiren sınıflandırma sistemi WHO tarafından 1993’de yayınlanmış olan, 2000 yılında ise yeniden düzenlenerek yayınlanan, tümörlerin iyi huyludan kötü huyluya doğru sıralandığı WHO 2000 sınıflandırmasıdır (Tuğcu 2004). Beyin tümörlerinin sınıflandırılması Çizelge 1.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Beyin tümörlerinin sınıflandırılması

A. NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ	
1. Astroitik Tümörler	
a. Diffüz astroitoma	<ul style="list-style-type: none"> → 1. Fibriler astroitoma → 2. Protoplazmik astroitoma → 3. Gemiositik astroitoma
b. Anaplastik astroitoma	
c. Glioblastoma multiforme	<ul style="list-style-type: none"> → 1. Dev hücreli glioblastoma → 2. Gliosarkom
d. Piloitik astroitoma	
e. Pleomorfik ksantroastroitom	
f. Subependimal dev hücreli astroitom	
2. Oligodendroglial Tümörler	
a. Oligodendroglom	
b. Anaplastik oligodendroglom	
3. Mixed Gliomalar	
a. Oligoastroitom	
b. Anaplastik oligoastroitom	
4. Ependimal Tümörler	
a. Ependimoma	<ul style="list-style-type: none"> → 1. Sellüler → 2. Papiller → 3. Clear cell → 4. Tanisitik
b. Anaplastik ependimoma	
c. Miksopapiller ependimoma	
d. Subependimoma	
5. Koroid Plexus Tümörleri	
a. Koroid pleksus papillomu	
b. Koroid pleksus karsinomu	
6. Nöronal ve Mixt Nöroglial Tümörler	
a. Gangliositom	
b. Serebellumun displastik gangliositomu	
c. Desmoplastik infantil astroitomu	
d. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	
e. Gangliogliom	
f. Anaplastik gangliogliom	
g. Santral nörositom	
h. Serebellar liponörositom	
i. Filum terminalenin paragangliomu	
7. Nöroblastik Tümörler	
a. Olfaktor nöroblastom (estesionöroblastom)	
b. Olfaktor nöroepitelyom	
c. Adrenal gland ve sempatik sinir sistemi nöroblastomu	
8. Pineal Parenkimal Tümörler	
a. Pineasitom	

Çizelge 1.3 (devam)

b. Pineablastom

c. Orta derecede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör

9. Embriyonal Tümörler

a. Medullaepitelyom

b. Ependimoblastom

c. Medullablastom → 1. Desmoblastik medullablastom

→ 2. Large cell medulloblastom

→ 3. Medullomyoblastom

→ 4. Melanositik medulloblastom

d. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler → 1. Nöroblastoma

→ 2. Ganglionöroblastom

e. Atipik teratoid/rabdoid tümör

10. Orijini Belirsiz Glial Tümörler

a. Astroblastom

b. Gliamatosis serebri

c. 3. ventrikül koroid gliomu

B. MENİNGEAL TÜMÖRLER**1. Meningotelyal Hücre Tümörleri**

a. Meningioma

b. Meningotelyal

c. Fibröz

d. Transisyonal

e. Psammatöz

f. Anjiyomatöz

g. Mikrokistik

h. Sekretuar

i. Metaplastik

j. Lenfoplazmasit zengin

k. Clear cell

l. Kordoid

m. Atipik

n. Papiller

o. Rabdoid

p. Anaplastik meningiom

2. Mezenkimal Meningotelyal Hücre Kökenli Olmayan Tümörler

a. Lipom

b. Anjiolipom

c. Hibernom

d. Liposarkom

e. Soliter fibröz tümör

f. Fibrosarkom

g. Malign fibröz histiositom

h. Leiomyom

i. Leiomyosarkom

j. Rabdomyom

k. Rabdomyosarkom

l. Kondrom

m. Kondrosarkom

n. Osteom

o. Osteosarkom

p. Osteokondrom

q. Hemanjiyom

r. Epiteloid hemanjiyoendotelyom

s. Hemanjiyoperisitom

t. Anjiyosarkom

u. Kaposi sarkomu

3. Primer Melanositik Doku Tümörleri

a. Diffüz melanositosis

b. Melanositom

c. Malign melanom

d. Meningeal melanomatosis

4. Belirsiz Histogenez Tümörleri

Çizelge 1.3 (devam)

Hemanjiblastom
C. PERİFERİK SİNİR TÜMÖRLERİ
1. Schwannoma
a. Sellüler
b. Pleksiform
c. melanositik
2. Nörofibrom
a. pleksiform
3. Perinörom
a. İntranöral perinörom
b. Yumuşak doku perinöromu
4. Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörleri (MPSNT)
a. Eiteloid
b. Diverjant mezenkimal ve / veya eiteloid farklılaşma gösteren MPSNT
c. Melanotik
d. Melanotik psammomatöz
D. LENFOMALAR VE HEMOPOETİK TÜMÖRLER
1. Malign Lenfoma
2. Plazmositom
3. Granülositik Sarkom
E. GERM HÜCRELİ TÜMÖRLER
1. Germinom
2. Embriyonal Karsinom
3. Yolk Sac Tümör
4. Koriyokarsinom
5. Teratom
a. Matür
b. İmmatür
c. Malign transformasyon gösteren teratom
6. Mixt Germ Hücreli Tümör
F. SELLAR BÖLGE TÜMÖRLERİ
1. Kraniofaringeom
a. Adamantinomatöz
b. Papiller
2. Granüler Hücreli Tümör

1.9.3. Nöroblastoma

Bebeklik çağının en sık rastlanan tümörü olan nöroblastoma, tüm çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %15'lik bir kısmını oluşturmaktadır (Heck *et al.* 2009; Mueller and Matthay 2009). Görülme sıklığı her yıl 7000 canlı doğumda 1 olmakla beraber, bu oran tüm Dünyada benzerlikler göstermektedir (Carlsen 1992). Ulusal Kanser Enstitüsü'nün verilerine göre nöroblastoma, her bir milyon çocuktan 9,5'inde görülecek bir insidans göstermektedir. Ayrıca, Amerikan Kanser Derneği'nin verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çocukluk çağı tümörlerinin %7,8'inden sorumlu olan nöroblastomaya, her yıl yaklaşık 650 yeni çocuk yakalanmaktadır (National Cancer Institute SEER Pediatric Monograph 2002; Lacayo 2008; Cingöz 2013). Nöroblastoma, çoğu ülkede erkeklerde kızlara oranla biraz daha fazla görülmektedir (Martin *et al.* 1997; Ries *et al.* 1999; Wiangnon *et al.* 2003).

Nöroblastoma (ya da nöroblastom) sempatik sinir sisteminin primitif nöral krest hücrelerinden orjinlenen ekstrakraniyal bir solid tümördür. Genellikle adrenal bezlerde görülen nöroblastoma boyun, göğüs, karın veya pelvis bölgelerindeki sinirlerde de görülebilmektedir. Primer tümörlerin %60'ından fazlası adrenal medulladan veya abdomendeki Paraspinal Ganglia'lardan kaynaklanabilir (Kushner 1988; Cingöz 2013).

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda nöroblastomaya neden olan herhangi bir çevresel faktör (kimyasal madde, virüs veya radyasyon gibi) tanımlanmamıştır. Bu yüzden, nöroblastomanın etyolojisi bilinmemektedir (Bunin *et al.* 1990; Mueller and Matthay 2009). Ancak erken yaş dağılımı olması nedeniyle prenatal dönemde olan olayların tümörün patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ebeveynlerin mesleği (elektronik, tarım, paketleme işlerinde çalışanlar ile mesleğinden ötürü böcek zehiri, elektromanyetik alan, boya ve radyasyona maruz kalanlar), annenin yaşı, gebelik sırasında kullanmış olduğu çeşitli ilaçlar ve hormonlar, alkol alımı, sigara içimi, düşük öyküsü, tekrarlayan sezeryan doğum ile bebeğin düşük doğum ağırlığı da nöroblastoma ile ilişkilendirilmiştir (Aydın 2006). Ayrıca, çok nadir olarak bazı nöroblastoma

vakalarında yapılan incelemelerde bu hastalığın otozomal dominant olarak kalıtılabildiği de rapor edilmiştir (Maris *et al.* 1997).

Nöroblastoma tümörlerinden izole edilen ve *in vitro* kültür ortamlarında çoğaltılan primer tümör hücreleri nöronal (N-tip), stromal (S-tip) ve intermediate (I-tip) olmak üzere üç farklı fenotip sergilemektedirler. Mevcut tez çalışmasında da tercih edilen N-tip hücreler yavaş tutunma gösterip, kümeler halinde çoğalırlar ve nörotik bir süreç izleyerek, nörotransmitterlerin sentezlenmesiyle ilişkili enzimleri eksprese ederler. S-tip hücreler diğerlerinin aksine tabanda yayılarak çoğalırlar ve nörotransmitter sentezinden sorumlu değildirler. I-tip hücreler ise N ve S tipin ortak özelliklerini gösterirler (Ross 1995; Cingöz 2013). N-tip hücreler S-tiplere göre daha iyi bir prognoz sergilerler ve MYCN onkogenini, anti-apoptotik Bcl-2 proteinini daha sıklıkla overeksprese ederler. Bu özelliklerinin yanısıra, immun sistemi baskılanmış farelerde yapılan çalışmalarda N-tip hücrelerin S-tiplere göre daha tümörojenik oldukları gösterilmiştir (Piacentini 1996; Cingöz 2013).

1.10. Oksidatif Stres

Aerobik organizmalar hayatlarını sürdürebilmek için moleküler oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Temel enerji üretim süreçlerinin vazgeçilmez elemanı olan bu molekülün yararlı işlevlerinin yanı sıra, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türlerinin (ROT) de vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahip olduğu kaydedilmiştir (Packer 1984; Diplock 1998; Pekmez 2004). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların elimine edilme hızı bir denge içerisinde ve bu durum “oksidatif denge” olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızındaki bir artış ya da ortadan kaldırılma hızındaki bir düşüş bu dengenin bozulmasına yol açarak oksidatif strese neden olmaktadır (Serafini and Del Rio 2004). Gerek radikal gerekse radikal olmayan ROT’lar başta proteinler, lipitler ve DNA olmak üzere tüm biyomoleküllerin zarar görmesine, böylece hücre fonksiyonlarının aksamasına ve sonu ölümle biten yıkım olaylarının başlamasına neden olmaktadır (Lee *et al.* 1999).

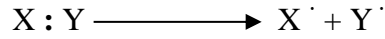
Oksidatif stres toksisitenin muhtemel bir mekanizması olarak son yıllarda toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (Mercan 2004).

1.10.1. Serbest radikaller

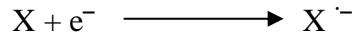
Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, Alzheimer, Huntington ve Parkinson gibi nörolojik hastalıklar, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, astım, diabet, hepatit B, iskemi ve reperfüzyon, vitamin E eksikliği, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz ve kanser benzeri birçok hastalık ile yaşlanma gibi fizyolojik süreçlerin patogenezinde rol aldığını göstermektedir (Cross *et al.* 1987; Özdem ve Sadan 1994; Hasanoğlu vd 1994; Özenirler vd 1994; Engin ve Altan 2000, Engin vd 2003; Yardım vd 2004; Engin vd 2005; Yardım vd 2006; Padurariu *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012; Xun *et al.* 2012). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve reaktif özellik taşıyan moleküller olarak tanımlanmaktadır (Abdollahi *et al.* 2003; Abdollahi *et al.* 2004). Serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküller oldukları için stabil değildirler ve elektron konfigürasyonlarını pozitif yükle dengelemeleri gerekli olduğundan çok reaktiftirler. Oksijen radikali serbest elektronunu eşleştirmek için başka bir molekülden elektron aldığında diğer molekülü anstabil hale getirir. Zira o molekülün de elektronik düzenini sağlaması için komşu bir molekülden elektron alması gerekir. Bunun sonucunda da serbest radikaller canlı vücudunda önemli moleküllerde hasar oluşturan zincirleme bir seri reaksiyonun başlamasına neden olabilmektedirler (Oksidan stres ve hücre hasarı kurs notları 1993; Özdemir 1993; Girgin 1996).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşabilmektedirler (Halliwell and Gutteridge 2001):

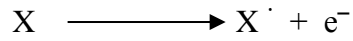
1. Kovalent bağın homolitik yarılmaması: Kovalent bağa sahip olan normal bir molekülün, kovalent bağının homolitik yarılmaması sonucu eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile serbest radikaller meydana gelmektedir.



2. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu oluşmaktadır.



3. Bir molekülün elektron kaybetmesi: Normal bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ya da bir molekülden tek bir elektronun kaybı ile oluşmaktadır. Heterolitik bölünme sonucunda kovalent bağ oluşturarak her iki elektron, atomlardan birisinde kalmaktadır.



1.10.2. Serbest radikal kaynakları

1.10.2.a. Serbest radikallerin endojen (hücre içi) kaynakları

Küçük moleküllerin otooksidasyonu

Nötral sıvı ortamında oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre bileşenlerinden birçoğu intrasellüler olarak serbest radikalleri açığa çıkartmaktadır (Kavas Özelçi 1989).

Enzimler ve proteinler

Birçok enzim katalitik reaksiyonları esnasında serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Örneğin; ksantin oksidaz enzimi oksijenin H_2O_2 'e redüksiyonu sırasında süperoksit radikalini ortaya çıkarmaktadır (Kavas Özelçi 1989).

Mitokondriyal elektron transport zinciri

Hücrelerin normal yaşam sirkülasyonunda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD, FAD, Koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek O_2 salınımına neden olmaktadır. Bu tek değerlikli oksijen kaçağı olarak tanımlanmaktadır. Bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda bu kaçak hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidatif stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondrielerde hasar oluşmaktadır. Bu hasar sonucu hücrenin enerji sisteminin etkilenmesi ile ATP kullanımındaki artışa ve ATP sentezindeki azalmaya bağlı olarak hücrede ATP düzeyi hızla düşmektedir (Kavas Özelçi 1989; Özdemir 1993; Akkuş 1995).

Endoplazmik retikulum

Birçok hayvan ve bazı bitki dokularında endoplazmik retikulumlar içerdikleri sitokrom P450 enzim sistemi sayesinde ksenobiyotikleri okside edebilmekte ve moleküler oksijeni indirgeyebilmektedirler. Ksenobiyotiklerin mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonu sonucu meydana gelen, serbest radikal olan bu elektrofilik ürün pek çok endojen makromolekülle (DNA, RNA ve enzimler vb.) kovalent bağlanarak toksisiteye yol açmaktadır (Eken 2003).

Araşidonik Asit Metabolizması

Doymuş yağ asitleri ile karşılaştırıldığında, poli-doymamış yağ asitlerinin hidrojen koparılması sonucu oluşan serbest radikalın çift bağ konjugasyonu ile kararlı hale getirilmesi ve böylece hidrojenin daha kolay koparılabilir olması nedeniyle, otooksidasyona daha yatkın oldukları belirtilmektedir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinaz aktivasyonu ile plazma membranında araşidonik asit salınımına yol açar. Yağ asitlerinden biri olan araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu sonucu membran lipidlerinin farklı serbest radikal ara ürünleri meydana gelmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Eken 2003; Mavi 2005).

Peroksizomlar

Güçlü bir H₂O₂ kaynağı olan peroksizomların D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz ve L-alfa hidroksiasit oksidazca zengin oldukları ve H₂O₂ açığa çıkarma yeteneğine sahip oldukları rapor edilmiştir (Kavas Özelçi 1989).

1.10.2.b. Serbest radikallerin ekzojen (hücre dışı) kaynakları

Serbest radikal oluşumuna neden olan başlıca ekzojen kaynaklar arasında organizmanın radyasyona (X ışınları, gama ışınları) maruz kalması, bazı antibiyotikler (adriyamisin, doksorubisin), alışkanlık yapıcı maddeler (alkol, uyuşturucular ve sigara), inhale edilen ksenobiyotik maddeler (CCl₄ gibi), çevresel ajanlar ve hava kirliliği yapan maddeler (pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar) sayılmaktadır. Bu tür maddeler homeostaziyi bozarak aşırı oksidan oluşumuna neden olarak doğal antioksidanların tüketimini arttırmaktadırlar (Özdemir 1993; Akkuş 1995).

1.10.3. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen metabolitleri

Oksijen atomu yapısında iki tane eşleşmemiş elektron bulundurduğundan serbest radikallerle radikal olmayanlara oranla daha kolay reaksiyona girer. Bu sebeple biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen atomundan oluşan radikallerdir. Moleküler O₂'nin H₂O'ya indirgenmesi reaksiyonu esnasında kısmi redüksiyonla çok sayıda reaktif ürünler oluşabilir (Onat vd 2002; Alp 2005). Reaktif oksijen türleri Çizelge 1.4'de verilmiştir (Halliwell 1996).

Çizelge 1.4. Reaktif oksijen türleri

Reaktif Oksijen Türleri	
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit	Hidrojen Peroksit
Hidroksil	Singlet Oksijen
Peroksil	Hipoklorik Asit
Alkoksil	Hipobromik Asit
Perhidroksi	Ozon

1.10.4. Reaktif azot türleri

Reaktif oksijen türlerinin yanı sıra vücudumuz içerisinde reaktif azot türleri de teşekkül etmektedir. Bunlardan biri olan nitrik oksit, vasküler endotelde, fagositlerde ve beyin dokusunda üretilen “relaksin faktör” olarak bilinen ve önemli fizyolojik fonksiyonları olan bir serbest radikaldir. Fakat bu radikalın fazlası toksik etkiler göstermektedir. Biyolojik sistemlerde bütün reaktif azot türlerinin temel kaynağı nitrik oksittir (Patel *et al.* 1999; Alp 2005). Reaktif azot türleri Çizelge 1.5'de verilmiştir (Halliwell 1996).

Çizelge 1.5. Reaktif azot türleri

Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Nitrik oksit	Nitröz Asit
Azot dioksit	Peroksi nitrit
	Nitrozil Katyonu
	Nitrozil Anyonu
	Diazot trioksit
	Diazot tetraoksit
	Peroksinitröz Asit
	Alkilperoksi nitrit

1.10.5. Serbest radikallerin hücrel hasarları

Reaktif oksijen ve azot türleri pek çok hücrel yapıyı etkileyerek hücre hasarlarına yol açmaktadırlar. Serbest radikaller, hücrel savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak seviyeye ulaştıkları zaman organizmada farklı hasarlara yol açmaktadırlar. Serbest radikallerin hücrel hedefleri Çizelge 1.6'da özetlenmiştir (Slater and Del maestro 1980; Freeman and Crapo 1982; Slater 1984; Rangan and Bulkley 1993).

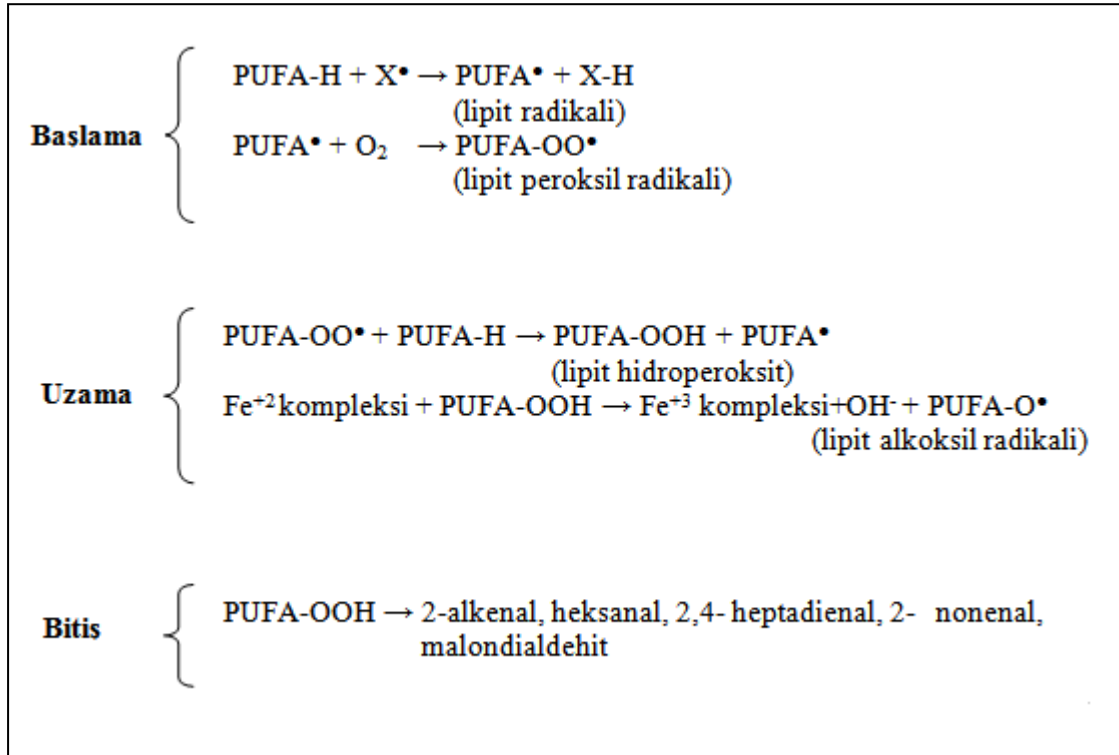
Çizelge 1.6. Serbest radikallerin hücrel hedefleri

Hücrel Hedef	Etki Mekanizması
Doymamış yağ ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu ve hücre zarı geçirgenliğinde değişiklik
Nükleik asit bazları	Baz hidroksilasyonu, mutasyon, hücre siklusunda değişiklik
Karbonhidratlar	Hücre zarı reseptör duyarlılığında değişiklik
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu, lipid çapraz bağ oluşumu, organel ve hücre zarı geçirgenliğinde değişiklik
Kofaktörler	Nikotinamid ve filavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve β karoten ile katalaz ve SOD enzimlerinin inhibisyonu, GSH-Px aktivitesinde değişiklik olmaması
Proteinler	Peptid zincirinde kopma, denatürasyon
DNA	Zincir kopması, baz değişikliği
Hiyalüronik asit	Sinoviyal sıvı akışkanlığında değişiklik

1.10.5.a. Membran lipidlerine etkileri (lipid peroksidasyonu)

Hücre membranları serbest radikaller tarafından kolaylıkla etkilenebilen poliansatur yağ asitlerince (PUFAs) zengindir. Lipid peroksidasyonu temelde PUFAs'nin otokatalitik bir süreçle oksidasyona uğramalarından kaynaklanır (Costa and Moradas-Ferreira 2001). Bu süreçle birlikte yağ asitlerinin hidroperoksitleri meydana gelir ve bunlar da parçalanarak, epoksitler, aldehitler ve alkanlar gibi yan ürünlere dönüşür. Bu ürünlerden bazıları çok reaktiftir. DNA ve proteinleri hasara uğratarak başlangıç serbest radikal olaylarını artırır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Candan 2002; Lambeth 2004; Mavi 2005).

Lipit peroksidasyon süreci başlama, uzama ve bitiş olmak üzere üç bölümden oluşur (Shewfat and Purvis 1995). Lipit peroksidasyonunun temel aşamaları ve bu sırada oluşan bazı toksik bileşikler Şekil 1.14'de görülmektedir (Pekmez 2004).



Şekil 1.14. Lipit peroksidasyonunun aşamaları

1.10.5.b. Proteinlere etkileri (protein oksidasyonu)

Proteinler, tüm reaktif oksijen türleri tarafından hasar görebileceği gibi, peroksidasyon ürünleriyle reaksiyona girerek de değişikliğe uğrayabilirler (Pekmez 2004). Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri amino asit içeriklerine, amino asitlerin yapılarındaki kompozisyonlarına ve oluşan hasarın onarılabiliğine göre değişiklik göstermektedir. Doymamış yağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktiviteleri yüksektir. Bundan dolayı, yapısında triptofan, sistein, tirozin, fenil alanin, metiyonin ve histidin aminoasitlerini bulunduran proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenmektedirler. Reaksiyon sonucunda oluşan sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller, yapısında disülfür bağı taşıyan IgG ve albumin gibi pek çok proteinin üç boyutlu yapısını bozarlar. Yapısı bozulan bu proteinler artık normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Serbest radikallerden olumsuz etkilenen bir diğer protein grubu da hemo proteinlerdir. H_2O_2 , hemoglobinin degradasyonuna neden olarak serbest demir iyonunun oluşmasına ve sonuçta OH teşekkülüne neden olmaktadır (Kavas Özelçi 1989; Halliwell and Gutteridge 1989; Akkuş 1995; Yıldırım 2003).

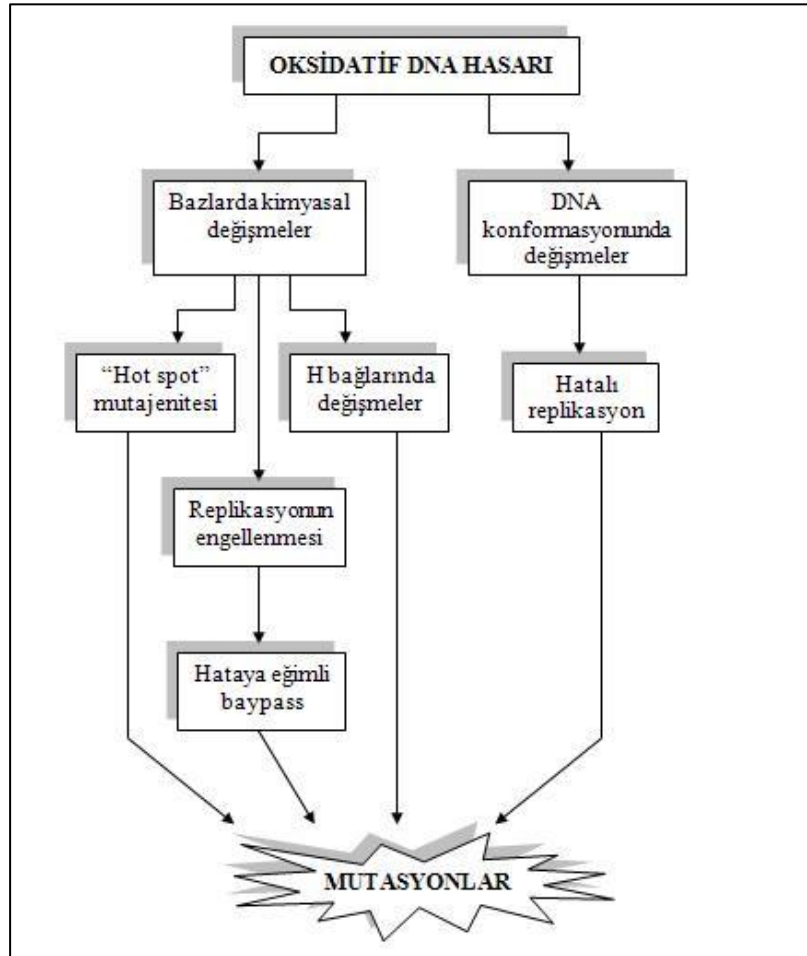
1.10.5.c. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelmektedir. DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliğine sahip olan okzoaldehidler, antimitotik aktivite göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol almaktadır (Halliwell and Gutteridge 1989; Yıldırım 2003).

1.10.5.d. Nükleik asitler ve DNA üzerine etkileri

Her bir insan hücresinin günde yaklaşık 1.5×10^{15} kez serbest radikallerin oksidatif saldırısına maruz kaldığı tahmin edilmektedir (Beckman and Ames 1997). DNA molekülünün tüm bileşenleriyle kolayca reaksiyona girebilen hidroksil radikalının, hem pürin hem de pirimidin bazları ile deoksiriboz iskeletinde hasarlara neden olduğu

bilinmektedir (Dizdaroğlu vd 2002). Oksidatif stres sonucu genetik materyalde oluşan bu kalıcı değişimlerin mutajenez, karsinojenez ve yaşlanmada ilk basamaklar olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda çeşitli kanser dokularında serbest radikal maruziyeti sonucu oluşmuş DNA hasarları gözlenmiştir. DNA'nın oksidasyonu sonucu oluşmuş olan 100'den fazla ürün tespit edilmiştir. Reaktif oksijen metabolitleri DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına, pürin-pirimidin bazlarında ve deoksiriboz şekerde modifikasyonlara ve zincirler arasında çapraz bağlanmalara neden olarak genetik hasar oluşturmaktadırlar. Genetik hasar sonucu genomik kararsızlık, replikasyon hataları, transkripsiyon ve haberleşme mekanizmalarındaki aksamalar gibi kanser oluşumu ile ilgili olan pek çok durum ortaya çıkabilmektedir (Marnett 2000; Cooke *et al.* 2003). DNA'da oluşan yapısal değişimlerin hangi yollarla mutasyonlara neden olduğu şekil 1.15'de gösterilmiştir (Willcox *et al.* 2004; Türkez 2007).

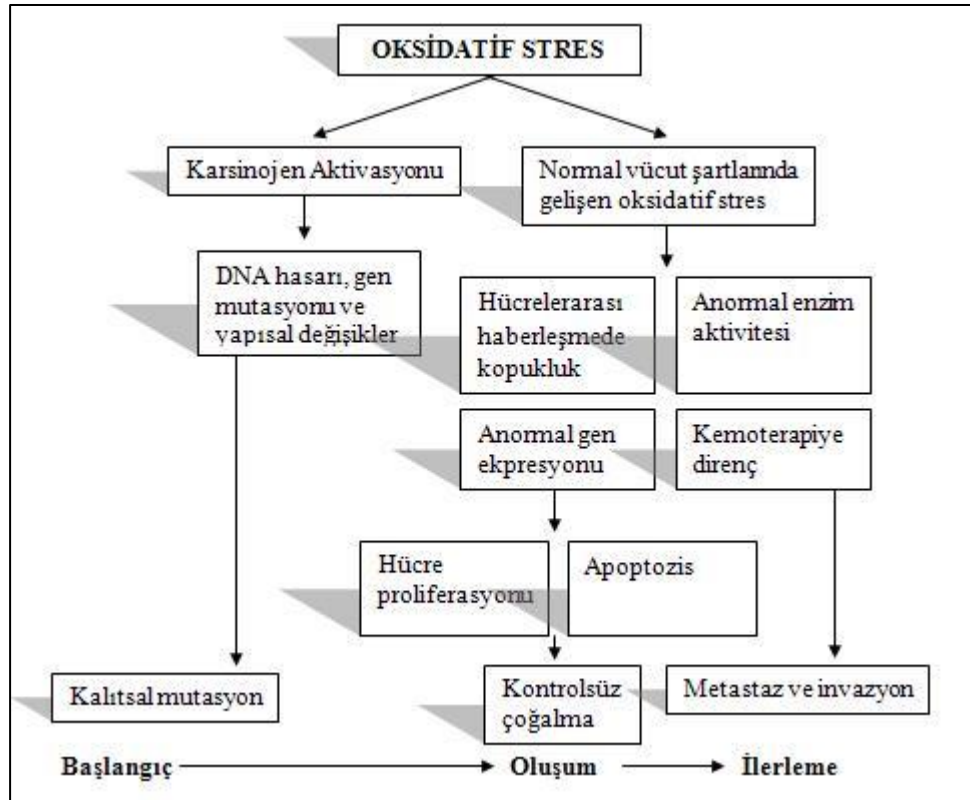


şekil 1.15. Oksidatif stres ve mutasyonların oluşumu

Yapılan bir çalışmada, serbest radikallerin mitokondriyal DNA'da da hasara neden olduğu ve mitokondriyal DNA'nın çekirdek DNA'sına göre oksidasyona daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Inoue *et al.* 2003).

1.10.6. Oksidatif stres ve kanser ilişkisi

Kanser, oksidatif stresin neden olduğu en önemli hastalıktır. Karsinogenezin gelişim safhalarında (başlangıç, oluşum ve ilerleme) oksidatif mekanizmaların potansiyel bir role sahip olduğu bilinmektedir. Karsinogenezin son aşamasında (ilerleme) oksidatif stres, kanserli hücrelerin karakteristik özelliklerinin (kontrolsüz büyüme, genomik kararsızlık, kemoterapi direnci, invazyon ve metastaz) gelişmesinde doğrudan rol almaktadır (Schulte-Hermann *et al.* 1990; Trush and Kensler 1991; Toyokuni *et al.* 1995; Ames and Gold 1992; Klauning *et al.* 1998). Oksidatif stres ile kanser aşamaları arasındaki ilişki Şekil 1.16'da gösterilmiştir.



Şekil 1.16. Oksidatif stres ile kanser arasındaki ilişki

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalar kanser oluşumunda serbest radikallerin ve diğer reaktif metabolitlerin çok etkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Nitekim oksidatif stresin bir işaretçisi olan 8-OH-dG'nin memeli hücrelerinde mutajeniteye yol açtığı tespit edilmiştir. Bu veriyi destekleyen *in vivo* bir çalışmada ise akciğer ve karaciğer kanseri p53 ile ras baskılayıcı genlerinde 8-OH-dG'den türevlenen GC→TA transversiyonlarının olduğu rapor edilmiştir (Cooke *et al.* 2003). Buna karşın, reaktif metabolitlerin neden olduğu mutasyonların CC→TT transversiyonları olduğu bir diğer çalışmada rapor edilmiştir (Feig *et al.* 1994). Oksidasyon sonucu DNA'da gözlenen modifikasyonlar sadece baz ve şeker seviyesinde kalmayıp, kromozomlar seviyesinde de meydana gelebilmektedir. Bazı kanser türlerinde rapor edilmiş olan oksidatif DNA hasarı ölçümleri Çizelge 1.7'de verilmiştir (Cooke 2003; Evans *et al.* 2004).

Çizelge 1.7. Bazı kanser vakalarında tespit edilmiş olan DNA hasarı ölçümleri

Kanser Türü	Bulgular
Akut lenfoblastik lösemi	Lenfosit DNA'larında 8-OH-G, 8-OH-Ade, 5-OH-Cyt, 5-OH-5-MeHyd ve 5-OHHyd miktarlarında yükselme
Göğüs kanseri	DNA'daki 8-OH-G seviyesinde kontrollere oranla yükselme
Kolon kanseri	DNA'daki 8-OH-G seviyesinde kontrollere oranla yükselme
Jinekolojik kanserler	Üriner 8-OH-G seviyesinde kontrollere oranla yükselme
Servikal kanser	DNA'daki 8-OH-G seviyesinde kontrollere oranla yükselme
Böbrek kanseri	Kanserli ve kanserli olmayan dokulardaki 8-OH-G seviyelerinin önemli derecede farklı olması
Akciğer kanseri	Lenfosit DNA'larındaki ve kanserli hücrelerdeki 8-OH-G seviyesinin kontrollere oranla yüksek olması
Karaciğer kanseri	Kanserli hastaların 8-OH-G, 8-OH-Ade, 8-OH-G, 8-OHAde, 5-OH-Cyt, 5-OH-5-MeHyd ve 5-OH-Hyd miktarlarında yükselme
Mide kanseri	Atrofik gastrit ve <i>Helicobacter pylori</i> ile enfekte olmuş dokuların DNA'larında 8-OH-G seviyelerinin yüksek olması
Beyin kanseri	Kanserli hastaların üriner 8-OH-G ve diğer lezyonların seviyelerinde önemli yükselmeler

1.10.7. Kanser dışındaki hastalıklarda oksidatif stresin rolü

Alzheimer, Huntington ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde oksidatif stres etkin bir biçimde rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarda belirtilen bu nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif DNA hasarı seviyelerinin yüksek olduğunu rapor edilmiştir (Padurariu *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012; Xun *et al.* 2012). Buna karşılık Koppele *et al.* (1996) ile Alam *et al.* (2000), bu hastalıklarda oksidatif DNA hasarının etkili olmadığını kaydetmişlerdir. Kardiyovasküler hastalıklarda oksidatif DNA hasarının etkili olduğunu kanıtlayan az sayıda rapor olmakla birlikte atheroskleroz, koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon, kalp yetmezliği, kardiyomiyopati ve kalp krizi gibi hastalıklarda oksidatif stresin etkili olduğu rapor edilmiştir (Holvoet *et al.* 1995; Collins *et al.* 1998). Yine deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabet hastalıklarının patojenezinde oksidatif stres önemli roller üstlenmektedir (Maritim *et al.* 2003). Genel olarak yaşlanma üzerine iki teori vardır: gelişimsel programlanmış yaşlanma ve hasar birikimi sonucu yaşlanma (Cooke *et al.* 2003). İkinci teoriyi destekler nitelikte, Harman (1956) yaptığı çalışmasında yaşlanmanın biyomoleküllerde serbest radikal hasarlarının birikerek artması sonucunda meydana geldiğini ve yaşlanma ile antioksidan savunmanın da azaldığını önesürmüştür. Hamilton *et al.* (2001), nükleer ve mitokondriyal DNA'da 8-OH-G seviyelerinde yaşa bağlı artışların olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca, Down sendromu ve Fankoni anemisi gibi genetiksel hastalıkları taşıyan bireylerde de oksidatif DNA hasarı düzeyinin yüksek olduğu kaydedilmiştir (Evans *et al.* 2004).

Organizmalarda meydana gelebilen zararlı oksidatif reaksiyonlar sonucu üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri metabolik ve fizyolojik süreçlerde organizmaların bünyelerindeki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalarla yok edilir. Belirli koşullar altında oksidanların artışı ve antioksidanların azalışı önlenemez ve bunun sonucunda çeşitli hasarlara neden olurlar (Halliwell and Gutteridge 2000). Farklı oksidan ve antioksidan türlerinin serum (ya da plazma) konsantrasyonları ayrı ayrı laboratuarda ölçülebilir. Ancak bu ölçümler hem çok zaman alır, hem fazla iş gücü

gerektirir hem de çok pahalı ve oldukça karmaşık teknikler gerektirir (Tarpey *et al.* 2004). Yani farklı oksidan ve antioksidan moleküllerinin ayrı ayrı ölçümü pratik değildir. Bir örneğin toplam oksidan durumu (TOD) hazırlanan kitlerle ölçülür ve bu total peroksit (TP), serum oksidasyon aktivitesi (SOA), reaktif oksijen metabolitleri (ROM) vb. şeklinde isimlendirilir (Nakamura *et al.* 1897; Halliwell and Gutteridge 2000; Harma vd 2003; Yanik vd 2004; Ceylan vd 2005; Yeni vd 2005). Aynı şekilde bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi (TAK) hazırlanan kitlerle ölçülür ve bu total antioksidan kapasite (TAK), toplam antioksidan aktivite (TAA), toplam antioksidan güç (TAOP), toplam antioksidan yanıt vb. şekilde isimlendirilir (Benzie and Strain 1996; Koracevic *et al.* 2001; Erel 2004; Ayçiçek vd 2006).

1.10.8. Beyin metabolizmasında serbest radikallerin rolü

Sinir sisteminin merkezi olan beyin, vücudun diğer organlarına göre ROT'ların hasarlarına biyokimyasal, fizyolojik ve anatomik açıdan aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı daha çok maruz kalmaktadır (Evans 1993):

- Beyinde oksidatif metabolik aktivite hızının yüksek olması.
- Beyinde PUFAs gibi kolayca okside olabilen substratların yüksek konsantrasyonda bulunması.
- Spesifik bazı nörokimyasal reaksiyonlarda ROT'ların endojen olarak üretilmesi.
- Membran yüzey alanının sitoplazmik hacme oranla daha fazla olması.
- Sinir hücrelerinin akson morfolojisinin periferel hasara uygunluğu.
- CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin üretiminin az olması.
- Nöron hücrelerinde çoğalmanın olmaması.

1.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

Biyolojik sistemlerdeki hücreler herhangi bir nedenle üretimi artan serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir (Pekmez 2004). Canlı hücrelerin yapıtaşlarından

olan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi serbest radikallerin açık hedefi olan moleküllerin oksidasyonunu engelleyen veya geciktirebilen maddelere “antioksidan”, bu olaya da “antioksidan savunma sistemi” denir (Çavdar vd 1997). Tüm antioksidanlar 4 farklı etki mekanizması sayesinde serbest radikaller ile mücadele etmektedirler. Bu etkiler;

-Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme işlemine “toplayıcı etki” denmektedir.

-Bastırıcı (quencher) etki: Serbest radikallerle etkileşip onlara bir H⁺ aktararak etkilerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemine “baskılayıcı etki” denmektedir.

-Onarıcı (repair) etki: Molekülde oluşan hasar onarılarak serbest radikallerin etkisinin ortadan kaldırılması işlemine “onarıcı etki” denmektedir.

-Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest radikalleri kendilerine bağlama suretiyle reaksiyon zincirini kırma işlemine “zincir kırıcı etki” denmektedir (Akkuş 1995; Yıldırım 2003).

İyi bir antioksidanın taşınması gereken özellikler; ortamdaki serbest radikalleri giderebilmeli, redoks metallerinin şelatörü olarak görev yapabilmeli, antioksidan sistemdeki diğer antioksidanlarla etkileşimler yapabilmeli, gen ekspresyonu üzerinde olumlu etkileri olmalı, emilimi oldukça hızlı olmalı, dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonları fizyolojik açıdan uygun seviyelerde olmalı, hem membranlarda hem de su içeren ortamlarda fonksiyonel olmalıdır (Valko *et al.* 2006).

Antioksidanlar endojen kaynaklı ve ekzojen kaynaklı olanlar şeklinde sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.8) (Halliwell and Gutteridge 1989; Candan 2002; Eken 2003; Devasagayam *et al.* 2004; Willcox *et al.* 2004; Alp 2005; Mavi 2005; Valko *et al.* 2006).

Çizelge 1.8. Antioksidanların sınıflandırılması

Endojen Kaynaklı Antioksidanlar		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz	Lipid fazda bulunanlar	
Glutatyon peroksidaz	α - tokoferol	
Katalaz	β -karoten	
Glutatyon-S-transferaz	Sıvı fazda bulunanlar	
Glutatyon redüktaz	Glutatyon	Seruloplazmin
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz	Albumin	Transferrin
Mitokondrial sitokrom oksidaz	Askorbik asit	Ürat
Hidroperoksidaz	Hemoglobin	Laktoferrin
Epoksit hidrolaz	Melatonin	Bilirubin
NADPH-kinon oksidoredüktaz	Miyogloblin	
UDP-glukuronil transferaz	Sistein	
Sülfonil transferaz	Ferritin	
İzositrat dehidrojenaz	Metiyonin	
Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar		
Doğal Antioksidanlar	Doğal	Olmayan (Sentetik)
Vitamin A	Bütil hidroksi tolüen	
β -karoten	Bütil hidroksi anizol	
Vitamin C	Tert-bütil hidrokinon	
Vitamin E	Propil galat	
Flavonoidler	Oktil galat	
Diğer fenolik bileşikler	Dodesil galat	
	Sodyum benzoat	
	Etoksikin	
	Troloks	
	3-oksi piridin	
	Antabuse	
	Diğer sentetik antioksidanlar	

1.11.1. Endojen kaynaklı antioksidanlar

1.11.1.a. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Oksijeni metabolize edebilen bütün hücrelerde bulunan ve süperoksitin H_2O_2 'e dismütasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (Halliwell and Gutteridge 1989). Bu enzim süperoksit radikallerine karşı hücrenin enzimatik antioksidan savunmasında en önemli rolü oynamaktadır (Powers and Lennon 1999).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Dört selenyum atomu ihtiva eden, H_2O_2 ve lipit peroksitlerinin redüksiyonunu katalizleyen bir antioksidan enzimdir (Girgin 1996).

Katalaz (CAT): Hayvan, bitki ve aerobik bakteri hücrelerinde bulunan H_2O_2 'in dismütasyonunu katalizleyebilen enzimdir (Girgin 1996; Mates *et al.* 1999).

Glutasyon-S-transferaz (GST): Vücutta en fazla karaciğerde bulunan GST'in hem detoksifikasyon hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır (Akkuş 1195; Candan 2002).

Glutasyon redüktaz (GR): Hücrede mitokondri ve sitozolde bulunan, glutatyonda oluşan disülfid bağının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesinde görev yapan enzimdir (Shan *et al.* 1990; Candan 2002; Onat vd 2002).

Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PDH): G-6-PDH pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonunu katalizleyen kilit bir enzimdir. Bu fonksiyonu ile antioksidan savunma sisteminde rol almaktadır (Gülçin 2002; Mavi 2005)

Mitokondrial sitokrom oksidaz: Hücredeki oksijenin %95'ini detoksifiye ederek antioksidan sistemde rol oynayan bir enzimdir (Girgin 1996).

Hidroperoksidaz: Zararlı peroksitlere (H_2O_2 veya organik peroksidler) karşı vücudun korunmasında görev alan bir enzimdir (Anonymus 1993; Bairoch 2000).

NADPH-kinon oksidoreduktaz: $NADPH + \text{kinon} \rightleftharpoons NADP(+) + \text{semikinon}$ reaksiyonu yoluyla oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerinin gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır (Anonymus 1993; Bairoch 2000).

UDP-glukuronil transferaz: $UDP\text{-glukuronat} + \text{akseptor} \rightleftharpoons UDP + \text{akseptor}$ beta-D glukuronosit reaksiyonu yoluyla pek çok substratın (fenol, alkol, amin, yağ asidi vb.) kullanmasında görev almaktadır (Anonymus 1993; Bairoch 2000).

Sülfonil transferaz: Tiyol, ditiyoller ve alkoller kapsayan çok sayıda grubun substrat olarak kullanılabilmesini sağlayan enzimdir (Anonymus 1993; Bairoch 2000).

İzositrat dehidrojenaz: Mitokondri ve sitoplazmada $\text{izositrat} + NAD(+) \rightleftharpoons 2\text{-oksoglutarat} + CO(2) + NADH$ reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (Anonymus 1993; Bairoch 2000).

1.11.1.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Lipit fazda bulunanlar

α -tokoferol: Hücre membranlarının lipid tabakaları arasında bulunan ve yağda eriyebilen bir vitamin olan α -tokoferol, otooksidasyonun başlatıcısı olan peroksit ve hidroperoksit radikallerini inhibe etmektedir (Burlakova *et al.* 1998; Ünalacak vd 2005).

β -karoten: Yağda eriyebilen bir başka vitamin olan β -karoten, DNA'yı oksidatif hasara karşı korumaktadır (Astley *et al.* 2002; Aydılek ve Aksakal 2003).

Sıvı fazda bulunanlar

Glutasyon (GSH): Birçok canlı türünün hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan GSH ya da indirgenmiş GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korumaktadır (Meister 1994; Ulakoğlu 1998).

Albumin: Protein yapısındaki albumin, serbest radikal gidericisidir (Girgin 1995).

Askorbik asit: Suda eriyebilen bir vitamin olan askorbik asitin antioksidan özellik taşımasının yanı sıra peroksidasyon reaksiyonlarına karşı diğer antioksidanların da aktifleşmesinde etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Halliwell and Gutteridge 1986; Çolakoğlu 2005).

Hemoglobin: Oksidanları bağlayarak antioksidatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Girgin 1995).

Melatonin: Karanlıkta epifizden salgılanan antioksidan özellikte bir nörohormon olan melatonin çeşitli organların fonksiyonlarını düzenlemektedir (Özbakış-Dengiz ve Banoğlu 2001).

Metiyonin: Tiyol (sülfür) içeren bir aminoasit olan metiyonin, çeşitli oksidanları indirgeyerek biyolojik sistemleri oksidatif strese karşı korumaktadır (Atmaca 2003).

Sistein: Tiyol (sülfür) içeren bir başka aminoasit olan sistein organik bileşikleri indirgemektedir (Kurt 2003).

Ferritin, Transferrin ve Laktoferrin: Bu üç aminoasit demir iyonlarını bağlayarak antioksidan mekanizmada görev almaktadırlar (Kurt 2003).

Seruloplazmin: %7-8 oranında karbonhidrat içeren bu proteinin lipid peroksidasyonuna karşı antioksidatif etki gösterdiği rapor edilmektedir (Gökmen vd 2004).

Ürat, Bilirubin ve Miyogloblin: Bu bileşiklerinde antioksidatif özelliklerinin bulunduğu kaydedilmiştir (Girgin 1995; Kurt 2003).

1.11.2. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar

1.11.2.a. Doğal antioksidanlar

A, C ve E Vitamini: Bu vitaminlerin bağışıklık sisteminin uyarılması, radikal oluşumunun inhibe edilmesi (radikal zincirlerini kırarak) ve oksidatif DNA hasarının önlenmesi ile karsinojenlerin metabolik aktivasyonlarının değiştirilmesi gibi pek çok önemli biyolojik olayda aktif bir şekilde rol aldığı bilinmektedir (Azzi *et al.* 2002; Ray and Husain 2002; Catani *et al.* 2005).

β -karoten: Yapılan araştırmalarda insanlar tarafından besin yolu ile alınan β -karotenin oksidatif DNA hasarını ve kanser oluşumunu önleyebileceği tespit edilmiştir (Anonymus 1993; Krajcovicova and Dusinska 2004).

Fenolik bileşikler ve Flavonoidler: Fenolik bileşikler ile flavanol, flavanon, flavon ve antosiyanidinler gibi flavonoidlerin de süperoksit, nitrik oksit, lipid alkoksil ve peroksil radikallerini temizleyerek oksidatif stres oluşumunu engelledikleri rapor edilmiştir (Burak ve Çimen 1999).

1.11.2.b. Doğal olmayan (sentetik) antioksidanlar

Günümüzde sentetik antioksidanlar gıda endüstrisinin vazgeçilmez katkı maddeleri arasında yer almaktadır. Bütil hidroksi tolüen, bütil hidroksi anizol, tert-bütil hidrokinon ve propil galat başta olmak üzere bu amaçla kullanılan çok sayıda bileşik sentezlenmiştir (Çizelge 1.8) (Kahl 1984; Rossing *et al.* 1985; Kling *et al.* 1987; Weinke *et al.* 1987; Braginskaia *et al.* 1992; Shahidi 2000). Ayrıca, doğal

antioksidanların yanı sıra sentetik antioksidanların da oksidatif stresi engelleyebildiği ve yaşlanmayı geciktirdiği kaydedilmiştir (Zinoveva and Spasov 2004).

1.12. Genetik Toksikite

Gelişen dünyada çeşitli endüstri alanında kullanılmakta olan doğal veya sentetik kimyasallar organizmalar üzerinde genetik hasarlara sebep olabilmektedir. İşte, herhangi bir organizmada genetik hasar oluşturan bu tür maddeler “genotoksik madde” olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik maddeler hücrelerin kromozomlarında veya genlerinde değişmeye (mutasyona) yol açmaktadır (Paralı 1994; Tokyay 1999). Mutasyonlar kromozom ve nokta (gen) mutasyonları olmak üzere 2 grup altında incelenmektedir.

1.12.1. Kromozom mutasyonları

1.12.1.a. Kromozom sayısı mutasyonları

İnsan eşey hücrelerinde 23 adet kromozom bulunmaktadır ve bu sayı insan için haploid ($n=23$) sayıdır. Somatik hücrelerde ise diploid sayıda ($2n=46$) kromozom bulunur. Kromozom sayısındaki artış ya da azalışın temel kromozom sayısının (n) tam katları kadar olması durumuna öploidi denir. Hücrede temel kromozom sayısının üç katı kromozom bulunması ($3n=69$) olarak bilinen triploidi ve dört katı kromozom bulunması ($4n=92$) olarak bilinen tetraploidi durumları başlıca öploidi tiplerindedir. Farazi olarak temel kromozom sayısını daha fazla artırmak olasıdır, ancak bu -ploidler insanlarda henüz gösterilememiştir. Temel kromozom sayısının katları dışında olan artma ya da azalmalara ise anöploidi denmektedir. Anoplidi durumları öploidi durumlarına oranla daha sık görülmektedir. Kromozom ayrılmaması (non-disjunction) ve kromozomların anafazda geri kalması (anaphase lagging) sonucu anöploidi durumları oluşur. Anöploidi, kromozomlardaki artma ya da azalma durumuna göre hiperploidi ve hipoploidi olmak üzere ikiye ayrılır. Diploid sayıdan bir ya da daha fazla sayıda kromozom bulunması durumuna hiperploidi adı verilir. Trizomi ($2n+1$) ve tetrazomi ($2n+2$) en sık rastlanan

hiperploidi durumlarıdır. Hipoploidi ise diploid kromozom sayısından bir ya da daha çok kromozom eksilmesidir. Monozomi ($2n-1$) ve nullizomi ($2n-2$) bilinen hipoploidi türleridir.

1.12.1.b. Kromozom yapısı mutasyonları

Kimyasal maddeler, radyasyon ve X ışınları gibi farklı etmenlerin neden olduğu kromozom yapısındaki değişimler genellikle kromozomların kırılması ve anormal şekilde tekrar kaynaşması sonucu ortaya çıkar. Bu yapısal anormalliklere hem somatik (vücut) hücrelerde hem de eşey (üreme) hücrelerinde rastlanabilir. Kromozomlarda görülen başlıca yapısal anormallikler aşağıda sıralanmıştır.

-Translokasyon: İki kromozomun kolları arasındaki parça değişimidir.

-Delesyon: Kromozomdan kopan parçanın kaybolması ve genlerin eksilmesi olayıdır.

-Duplikasyon: Bir DNA diziliminde olması gerekenden fazla sayıda kopyasının parçasının mevcut olması durumudur.

-İnversiyon: Bir kromozomun herhangi bir bölgesinden kopan parçasının 180 derece dönerek aynı bölgeye yapışması sonucu meydana gelir.

-İzokromozom: Bir kromozomal aberasyon tipi olup kromozom kollarından birinin dublikasyonu, diğer kolun ise kaybolması sonucu meydana gelir.

1.12.2. Nokta (gen) mutasyonları

DNA molekülü üzerindeki bazların değişimi ile meydana gelen mutasyonlardır. Nokta mutasyonları aşağıdaki şekillerde meydana gelmektedir:

-Transisyon: Bir pürin bazının başka bir pürin bazı ile veya bir pirimidin bazının başka bir pirimidin bazı ile yer değiştirmesi olayıdır.

-Transversiyon: Bir pürin bazının yerini bir pirimidin bazının veya bir pirimidin bazının yerini bir pürin bazının alması durumudur.

-Delesyon: Bir veya daha fazla nükleotit çiftinin DNA molekülünden koparak eksilmesidir (Şaylı 1975, Zoller and Michael 1982, Rooney and Czepulkowski 1986, Tanrıverdi 1991, Başaran 1999, Öztaş 2000, Bahçeci 2002, Eken 2003, Başaran 2003, Türkez 2007) .

1.12.3. DNA tamir mekanizmaları

DNA molekülü, kromozomlar içerisinde sıkı sıkıya paketlenmiş ve protein kılıflarla sarılmış olarak korunuyor olsa da bazı iç ve dış etkenlerin bozucu ve yıkıcı etkileri sonucu hasar görmektedir. Canlı organizmalarda bu tür DNA hasarlarını onaran tamir mekanizmaları mevcuttur (Tokyay 1999; Bahçeci 2002). Bu mekanizmaların yeterli bir koruma sağlayamadığı durumlarda genotoksik maddeler zararlı mutasyonlara hatta hücre ölümlerine yol açmaktadırlar (Mahmoudi *et al.* 2006).

Herhangi bir nedenle DNA’da hasar meydana geldiği zaman bu durum DNA hasarı cevap yolu olarak bilinen ve kompleks bir haberleşme ağına sahip olan sistem tarafından çok hızlı bir şekilde algılanır. Bu sistemde rol alan üç farklı protein grubu (sensörler, transdüserler ve efektörler) DNA’dan gelen hasar sinyallerine karşı spesifik hücresel yanıtın oluşturulmasını sağlar. Hücre DNA hasarlarına farklı metabolik yollarla cevap vermektedir. Geri dönüşümü mümkün olmayan DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktif hale getirerek hücreyi ölüme götürür. Hücre DNA hasarlarını tamir mekanizmaları ile onarabilir. DNA’daki hasar eğer replikasyon esnasında tamir edilemez ise hücrede genomik kararsızlık meydana gelir. Genomik kararsızlık hem kanserin hem de yaşlanmanın temel nedeni olarak kabul edilmektedir. Memeli hücrelerinde farklı DNA hasarları farklı tamir mekanizmaları ile onarılmaktadır. Bunlar:

- Hasarı doğrudan geriye çevirme: DNA’da meydana gelen mutasyonların doğrudan doğruya uzaklaştırılabildiği bir tamir mekanizmasıdır, ancak her mutasyon bu yolla onarılamamaktadır.

- **Eksizyon tamir mekanizmaları:** Kimyasal olarak değişikliğe uğramış veya yanlış eşleşmiş bazların genomdan kesilerek yerlerine doğru bazların eklenmesi şeklindeki tamir mekanizmasıdır.
- **Mismatch tamir sistemi:** DNA replikasyonundan sonra görev yapan bu sistem hatalı baz eşleşmelerini düzeltmektedir.
- **Translezyon sentez tamir sistemi:** Bu sistemde görev alan enzimlerin apürinik veya apirimidinik (AP-yerleri) bölgelerin giderilmesi ile oksidatif DNA lezyonların by pass işleminde rol oynadıkları bilinmektedir.
- **Rekombinasyon tamir sistemi:** DNA da dönüşümsüz hasarlara, kromozom kırıklarına hatta hücre ölümüne yol açabilen DNA'daki çift zincir kırılmaları tamir edilemediği durumlarda kanser vakaları ortaya çıkmaktadır. Hata eğilimli onarım sistemi olarak da bilinen bu tamir sisteminde hasar çok ağırsa replikasyon hasar giderilmeden tamamlanmaktadır (Şaylı 1975; Seeberg *et al.* 1995; Chu 1997; Prakash and Prakash 2002; Bahçeci 2002; Schärer 2003, Müftüoğlu 2003; Kunkel *et al.* 2003; Schofield and Hsieh 2003; Christmann *et al.* 2003; Larsen *et al.* 2005; Turkez 2007).

1.13. Genotoksisite Testleri

Canlılarda geri dönüşümsüz hasarlara neden olan mutajen ve kanserojen maddelerin en önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkilerinin gözlemlenebilmesidir. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin tespit edilmesi mümkün olmadığı için, biyolojik yöntem ve indikatör canlı dokularında kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler oldukça önem kazanmıştır.

Son yıllarda yapılan pek çok araştırma ile mutajenik olan maddelerin genellikle kanserojen, kanserojen olan maddelerin de mutajenik olduğu ortaya konmuştur. Yaşanılan çevreye bağlı olarak maruz kalınan ve biyolojik etkileri hakkında yeteri kadar bilgi bulunmayan pek çok sentetik veya doğal maddenin mutajenik/kanserojenik potansiyel bakımından çeşitli biyolojik ve kimyasal test yöntemleri ile değerlendirilmesi sağlık açısından çok gereklidir. Ancak *in vivo* koşullar altında laboratuvar hayvanları ile

yapılan deneyler hem çok pahalı hem de çok zaman almaktadır. Bu nedenle, hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik ve mutajenik potansiyellerini ölçebilmek için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Kısa zaman içinde sonuçlanan bu testler sayesinde, test edilen kimyasal maddenin belirli genetik yapılarda oluşturduğu etkiler ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddenin mutajenik veya kanserojenik potansiyeli arasında ilişki kurulmaktadır (Boyacıoğlu 2004).

Genetik toksikoloji alanında kullanılan başlıca testler,

- Tek Hücre Jel Elektrophorez testi (SCGE)
- Kardeş-Kromatid Değişimi testi (KKD)
- Kromozom Aberasyonları testi (KA)
- Mikroçekirdek testi (MÇ)
- Diğer testler (Ames ve FISH)

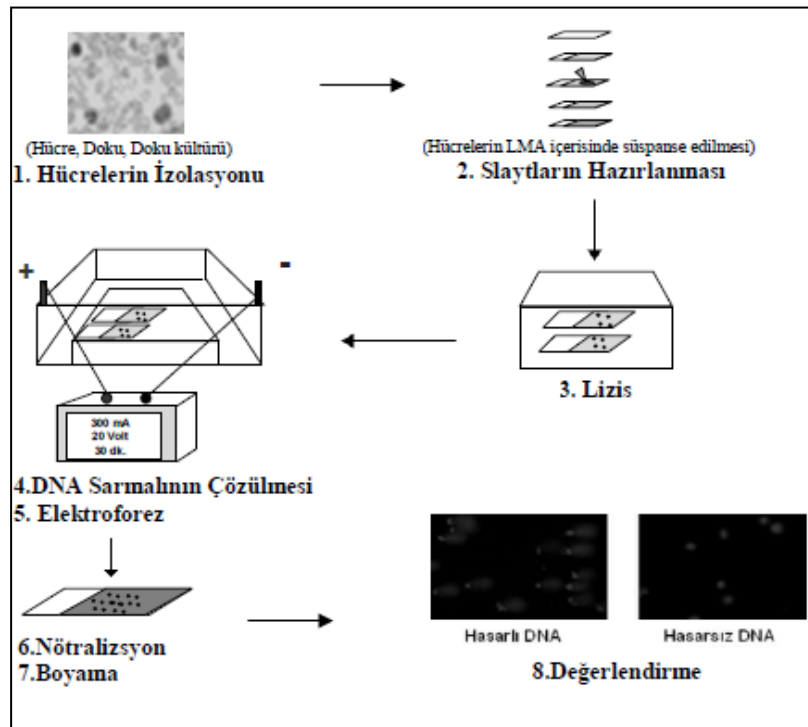
1.13.1. Tek hücre jel elektrophorez testi (Comet testi, SCGE)

Son yıllarda geliştirilen [Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)] tekniği DNA sarmal kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. SCGE tekniği “Comet Assay” ya da “Microgel Electrophoretic Technique” olarak da isimlendirilmektedir (Fairbain *et al.* 1995).

Comet yöntemi düşük düzeydeki DNA hasarlarının tespit edilebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, fazla donanım gerektirmemesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre ve doku grupları ile çalışılabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilebilmesi, güvenli ve ekonomik olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh *et al.* 1990). SCGE yöntemi insan, hayvan ve bitki dahil olmak üzere tüm organizma hücrelerinde uygulanabilmektedir. En yaygın olarak kullanılan insan hücreleri lökositler ve lenfositler olmakla birlikte, nasal veya gastirik mukoza hücreleri, lens, deri, reproduktif hücreler, kolon hücreleri, neonatal fibroblastlar,

pankreas hücreleri, nöron hücreleri ve adenokarsinomlu hücreler gibi birçok doku hücresinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Fairbain *et al.* 1995; Martin and Liu 2002).

Comet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip DNA moleküllerini tek tek inceleyerek tespit etmektir. Tek hücreler veya çekirdekçikler agaroz gömüldükten sonra yüksek tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonunda hücrelerin parçalanmaları sağlanır. Daha sonra DNA'lar elektroforezde yürütülür. Bu sırada hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden yürür ve comet denilen kuyruk oluşmaz. Oysa hasarlı DNA'ların fragmentleri oluşan hasardan dolayı farklı molekül ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. İncelemeler sonrasında elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilerek bir sonuca varılır (Ostling and Johanson 1984; Singh *et al.* 1988; Horoz vd 2006). Comet analizinin aşamaları Şekil 1.17'de gösterilmiştir (Koçyiğit vd 2005).



Şekil 1.17. Comet analizinin aşamaları

1.13.2. Diğer genotoksisite testleri

Genetik toksikolojide kimyasalların mutajenite veya karsinojenite potansiyellerinin belirlenmesinde Comet testinin dışında farklı testlerde kullanılmaktadır. Bunlarda biri olan KKD tekniği, gerek *in vivo* gerekse *in vitro* şartlarda mutajen veya karsinojenlerin DNA'da oluşturacağı harabiyetin tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. KKD, kromozomlarda yapısal değişimle sonuçlanmayan, replike olan kromozomlarda kromatidler arasında homolog bölgelerin karşılıklı değişimidir (Carrona and Natarajan 1988; Tucker *et al.* 1993; Paralı 1994).

Memeli sistemlerinde kromozom aberasyonları incelenebilen hemen hemen her hücre ve doku tipinde tespit edilebilmiştir. Kromozom aberasyonlarının çeşitli etkenlere (kimyasallara, iyonize ve iyonize olmayan radyasyona vb.) maruz kalma sonucunda meydana geldiği pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırmalarla ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar tümör hücrelerinin yapısal ve sayısal kromozom değişiklikleri içerdiğini göstermiştir (Lando *et al.* 1998; Emri *et al.* 2000; Demiroğlu 2003; Sugai *et al.* 2005; Pasha *et al.* 2006).

Mikroçekirdekler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. İnsan hücrelerinde DNA hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesini sağlayan mikroçekirdek yöntemi genetik toksikoloji alanında çok yoğun olarak kullanılmaktadır. MÇ sayısındaki artış çeşitli kimyasalların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Fenech 1993; Lando *et al.* 1998).

Hızlı uygulanabilirliği ve düşük maliyetli olması nedeniyle sıklıkla tercih edilen testlerden biri olan Ames testinin kanserojenik maddeleri tespit etme konusundaki hassasiyeti oldukça yüksektir. Bu testin esası, etkinliği araştırılan kimyasal maddenin varlığında veya yokluğunda, histidine gereksinim duyan mutant bakterili (*Salmonella*

thphimurium mutant suşları) ortamda geri mutasyon (revertants) sonucu oluşan histidine bağımsız bakteri çoğalmasına dayanmaktadır (Eken 2003; Boyacıoğlu 2004).

Floresans in situ hibridizasyon (FISH) tekniği de genetik toksikoloji alanında yaygın olarak kullanılmakta olup DNA hasarının sadece mitoz safhasında değil interfaz safhasında da tespitini mümkün kılmaktadır (Maluszynska *et al.* 2003).

1.14. Sitotoksosite Testleri

Hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler membran bütünlüğüne dayanan ve metabolik aktiviteye dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır (Er 2010). Membran bütünlüğüne dayalı yöntemlerin ana esası; hücrelerin tripan mavisi veya naftalin siyahı gibi boyalarla boyandıktan sonra mikroskopta hemositometre ile sayılmasıdır. Diğer bir membran bütünlüğüne dayalı yöntem ise, LDH salınım testidir. Hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzim olan LDH, hücre membran bütünlüğü bozulması sonucunda ortama salınır. Metabolik aktiviteye dayalı yöntemlerin ana esası ise, canlı hücrelerde metabolik aktivitelerinin ölü hücrelerden daha fazla olmasıdır. MTT ve XTT yöntemleri ile bu esasa dayalı metabolik aktivite ölçümü yapılabilmektedir (Şahin vd 2007).

3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yöntemi

İlk olarak 1983 yılında Mosmann tarafından tanımlanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yöntemi hücrelerin verimlilik, uygulanabilirlik ve aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Hücre canlılığını ileri derecede azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilen tetrazolium boyası (MTT), canlı hücrelere mitokondriyeler tarafından parçalanması sonucu aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazana indirgenir. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta,

ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Formazan miktarı, direk olarak hücre hatlarındaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Diğer bir ifade ile hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. (Griffiths and Doyle 1998; Freshney 2005).

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü ve Avrupa Birliği direktiflerinde de belirtildiği üzere prelinik çalışmalarda hayvan denemeleri yapılmadan önce alternatif modeller ve hücre kültürleri üzerinde toksisite ve etkinlik denemeleri yapılmaktadır. Bu şekilde etken maddelerin moleküler düzeyde oluşturdukları etkileri tespit edilerek, canlılar üzerindeki etkilerine ön-yorum getirilebilmektedir. Hücre hatları üretimlerinin kolay olması, homojen yapıya sahip olmaları ve uzun süre kullanılabilirlikleri bakımından da oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir (Halle *et al.* 1997; Yurdakök 2007). Bu nedenle mevcut tez çalışmasında hayvan tümör modeli olarak fare N2a nöroblastoma hücre hatları kullanılırken, sağlıklı hücre modeli olarak Sprague Dawley cinsi rat yavrularından elde edilen nöron hücreleri kullanılmıştır. N2a neuroblastoma hücreleri yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Günümüzde ilaç, kozmetik, gıda ve boya gibi pek çok endüstride yaygın olarak kullanılan monoterpenlere insanlar sıklıkla maruz kalmaktadır. Bu yüzden monoterpenler, farklı kullanım amaçlarıyla endüstrilere sunulmadan önce daha güvenli ve doğru kullanımlarını sağlamak amacıyla kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilmeleri gerekir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, tez kapsamında test edilen monoterpenlerin doza bağlı sitolojik, biyokimyasal ve genetik etkileri hakkında literatürde sınırlı düzeyde bilgi olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenlerle, mevcut tez çalışmasında; karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve alfa-pinen monoterpenlerinin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastoma hücreleri üzerinde antikanser, oksidan/antioksidan ve mutajenik/non-mutajenik etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ryu *et al.* (2001) *Paeonia suffruticosa* bitkisinden izole edilen monoterpenik bir glikozit olan alfa-benzoyiloksipaeoniflorinin DPPH radikalleri üzerine güçlü temizleme yeteneğine sahip olduğunu kaydetmişlerdir.

İpek *et al.* (2003) *Origanum onites* L. bitkisinden elde edilen karvakrolün mutajenik ve antimutajenik etkilerini SCE testini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda karvakrolün SCE frekansında önemli bir değişime neden olmadığı ancak MMC'nin indüklediği mutajeniteyi güçlü bir şekilde azaltarak antimutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Raphael and Kuttan (2003) 3 farklı monoterpen bileşiğinin (karvon, limonen ve perilik asit) antimetastatik aktivitelerini C57BL/6 farelerinde B16F-10 melanoma hücreleri tarafından oluşturulan akciğer metastazı üzerinde araştırmışlardır. Biyokimyasal parametrelerde dikkate alındığında limonen ve perilik asitin farelerde melanoma hücrelerinin metastatik sürecini inhibe ettiği gözlemlenirken karvonun yüksek dozlarda (100 µmol/kg) bile metastatik tümör büyümesini hiçbir şekilde etkilemediği rapor edilmiştir.

Chen *et al.* (2004) *Melaleuca alternifolia* bitkisinin uçucu yağının etken maddelerinin (α -terpinen, α -terpinolen, terpinen-4-ol ve γ -terpinen) antioksidan ve antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Antioksidan etki potansiyeli açısından α -terpinen > α -terpinolen > γ -terpinen sıralaması olduğu gözlemlenirken, α -terpinen, α -terpinolen ve terpinen-4-olün göğüs ve rahim kanser hücre hatlarına karşı güçlü antikanser etki gösterdiği kaydedilmiştir.

İpek vd (2005) *Origanum onites* L. bitkisinin esansiyel yağının ana bileşeni olan karvakrolün genotoksik/antigenotoksik etkilerini Ames Salmonella/mikrosomal testini kullanarak araştırdıkları çalışmalarında karvakrolün *Salmonella typhimurium*

bakterisine TA98 ve TA100 suşlarında (S9 metabolik aktivitesine sahip ve sahip olmayan) genotoksisiteye yol açmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca karvakrolün ilgili suşlarda 4-nitro-o-fenilendiamin ve 2-aminofluorenin indüklediği mutajeniteyi güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir.

Jagetia *et al.* (2005) monoterpenik bir indol alkaloid olan echitamin kloridin sitotoksik etkisini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak Ehrlich ascites kanserli farelerinde araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen veriler echitamin kloridin doza bağlı olarak HeLa, HepG2, HL60, KB ve MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğunu, kanserli farelerde ise zamana bağlı olarak lipid peroksidasyonunu arttırarak ve GSH konsantrasyonunu azaltarak sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Fuduka *et al.* (2006) *Baccharis dracunculifolia* bitkisinin yapraklarından izole edilen ve bir monoterpen olan p-metiloksitimol asetatın lösemi hücreleri üzerine güçlü sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Ravizza *et al.* (2008) pek çok aromatik bitkinin uçucu yağlarında bulunan ve bir monoterpen alkolü olan linalolun antikanser etkisi iki tip insan meme adenokarsinoma hücresi (MCF7 WT ve ilaca dirençli MCF Adr^R) üzerinde hem tek hem de doksوروبيسين (DOX) kombinasyonu ile araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre linalol yalnız uygulandığında hücre çoğalmasını orta dereceli olarak inhibe ederken subtoksik konsantrasyonlarının DOX'un indüklediği sitotoksisiteyi her iki hücre hattında da arttırdığı tespit edilmiştir.

Manuele *et al.* (2008) yapmış oldukları *in vitro* çalışmalarında *Tilia × viridis* bitkisinin ana bileşenlerinden olan α -pinen, β -pinen ve limonen monoterpenlerinin normal mürin lenfositlerinin proliferasyonunu stimüle ederken, insan lenfoma hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Khan and Sastry (2009) Karvon monoterpeninin *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus albus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı disk

difüzyon metodunu kullanarak iyi antibakteriyal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Miguel *et al.* (2009) *Thymus* ve *Origanum* cinslerinin esansiyel yağlarında bulunan aromatik bileşiklerden karvakrol ve timolün antioksidan aktivite sergilediğini ORAC, DPPH ve TEAC yöntemlerini kullanarak tespit etmişlerdir.

Singh *et al.* (2009) *Eucalyptus tereticornis* bitkisinin esansiyel yağının ana bileşeni olan 1,8-sineol ve α -pinen gibi monoterpenlerin antioksidan etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Roberto *et al.* (2010) Monosiklik bir monoterpen türü olan limonenin antioksidan aktivitesini fare normal mürin lenfositleri üzerinde araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, peroksidaz ve CAT enzimleri limonenin düşük konsantrasyonlarında (1, 10 ve 50 $\mu\text{g/ml}$) daha yüksek aktivite gösterirken; SOD enzimi limonenin yüksek konsantrasyonlarında (100 ve 1000 $\mu\text{g/ml}$) daha yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı araştırmada limonenin düşük konsantrasyonlarının DPPH radikallerinin tutulmasında daha yüksek aktivite gösterdiği ve artan konsantrasyona bağlı olarak bu etkinin giderek azaldığı tespit edilmiştir.

Aristatile *et al.* (2010) sunmuş oldukları *in vitro* çalışmalarında insan lenfositlerinde ultraviyole B (UVB) ışın maruziyeti sonucu oluşan oksidatif stres ve DNA hasarına karşı karvakrolün koruyucu etkisini araştırmışlardır. UVB ışını maruziyeti sonucu hücrelerde seviyeleri artmış olan TBARS, lipid hidroperoksitleri, DNA kuyruk uzunluğu ile azalmış olan hücre canlılığının ve antioksidan durumun karvakrol ilavesiyle hücrelerde tam zıttı yönünde geliştiği rapor edilmiştir.

Singh *et al.* (2010) *Citrus maxima* Burn ve *Citrus sinensis* (L.) gibi bitkilerin esansiyel yağlarının ana bileşeni olan ve bir siklik monoterpen olan DL-limonenin 5500 ppm'lik konsantrasyonda *Aspergillus flavus* mantarının büyümesini tamamen inhibe ederek

antifungal aktiviteye sahip olduğunu kaydederken, aflatoksin B₁ üretimini de tamamen inhibe ederek anti-aflatoksinogenik etkiye sahip olduğunu kaydetmişlerdir.

Mohamed *et al.* (2010) mandalina, limon ve portakalın esansiyel yağlarının içerdikleri etken maddeler (linalol, α -terpinen, α -terpinolen, limonen, α -sital ve kamfen gibi) sayesinde *Ehrlich ascites* kanser hücrelerine karşı GST aktivitesini arttırarak, GSH seviyesini arttırarak ve lipit peroksidasyonunu inhibe ederek antitümör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Sivas ve Tomsuk (2011) *Origanum onites* L. bitkisinin esansiyel yağının ve karvakrolün insan karaciğer kanser hücreleri (Hep-G2) üzerine antiproliferatif etkilerini araştırdıkları çalışmada hem esansiyel yağın hem de karvakrolün hücrelerde önemli derecede sitotoksik etki yaptığını ve apoptozisi indüklediğini rapor etmişlerdir.

Guarda *et al.* (2011) timol ve karvakrolün antimikrobiyal özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada her iki bileşiminde hem ayrı ayrı hem de beraber uygulandıklarında *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Kim *et al.* (2011) doğal bir asiklik monoterpen olan geraniolün prostat kanseri üzerine etkilerini araştırmışlardır. 72 saatlik MTT analizlerinde geraniolün artan konsantrasyona bağlı olarak PC3 prostat kanseri hücrelerinde canlılığı azalttığı kaydedilmiştir. Aynı araştırmada geraniolün yine artan konsantrasyona bağlı olarak LDH aktivitesini arttırarak antikanser etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur.

Siveen and Kuttan (2011) doğal olarak meydana gelen bir monoterpen olan thujonun antimetastazik etkisini C57BL/6 farelerindeki B16F-10 melanoma hücreleri tarafından indüklenen akciğer metastazı üzerinde araştırmışlardır. Araştırma sonucunda thujonun metastazik hayvanlarda matriks metalloproteinaz, hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz, vasküler endotelial büyüme faktörü, metalloproteinazın doku inhibitörü ile pro-

inflamatuvar sitokinlerin seviyelerini düzenleyerek ve tümör hücrelerinin çoğalmasını, adhezyonunu ve yayılmasını baskılayarak B16F-10 hücrelerinin akciğer metastazını inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Yang *et al.* (2011) *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum* alginden izole edilen ve bir monoterpen laktonu olan loliolidinin orta dereceli antioksidan aktivite sergilediğini DPPH, H₂O₂ ve hücre içi ROT tutma yöntemlerini kullanarak göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada H₂O₂'in indüklediği hücre hasarına karşı loliolidinin koruyucu etki gösterdiği ve 24 saatlik MTT analizlerinde doza bağlı olarak hücre canlılığını arttırdığı kaydedilmiştir.

Dar *et al.* (2011) yapılan deneyler sonucunda hayvan beslenmesinde önemli yer tutan doğal çimin (*Cymbopogon jawarancusa*) esansiyel yağı ile piperiton, α -pinen, β -karyopilen ve β -elemen gibi bileşenlerinin insan lösemi (THP-1), akciğer (A-549), karaciğer (HEP-2) ve ovaryum (IGR-OV-1) kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite sergilediklerini kaydetmişlerdir. Ayrıca hem esansiyel yağın hem de tüm bileşenlerin antioksidan özelliğe sahip olduğunu DPPH yöntemi ile tespit etmişlerdir.

Özkan ve Erdoğan (2011) *Origanum onites* L. bitkisinin uçucu yağının ve onun iki önemli bileşeni olan karvakrol ve timolün hücre canlılığı ve hepatoma G2 (Hep G2) hücrelerinde H₂O₂'in indüklediği sitotoksikite ve membran hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Test edilen her üç bileşiminde yüksek konsantrasyonlarda kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını gözlemlemişlerdir. Hep G2 hücrelerinin H₂O₂ uygulamasından önce, düşük konsantrasyonlarda *O. onites* uçucu yağı, karvakrol ve timol ile ön uygulamaya maruz bırakılmasının da hücreleri H₂O₂ tarafından indüklenen sitotoksikiteye karşı koruduğu rapor edilmiştir.

Wu *et al.* (2012) antitümör etkiye sahip olan terpinen-4-ol monoterpeninin sitotoksik etkilerini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak çalışmışlardır. *In vitro* çalışmalar sonucunda, MTT yöntemi (24 saatlik) kullanılarak insan akciğer adenokarsinoma (A549 ve CL₁-o) üzerine terpinen-4-olün artan konsantrasyona bağlı olarak önce hücre

proliferasyonun inhibe ettiği, sonra ise daha yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir. *In vivo* sonuçlara göre ise terpinen-4-ölün BALB/c nu/nu farelerindeki A549 hücrelerinin enjeksiyonu sonucu oluşan tümörün büyümesini doza bağlı olarak azalttığı ve baskıladığı tespit edilmiştir.

Esmaceli and Khodadadi (2012) *in vitro* olarak yaptıkları çalışmalarında timolün güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve bu özelliğinden dolayı doğal antioksidan ve katkı maddesi olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır.

Jaafari *et al.* (2012) farklı kanser hücre tipleri [P-815 (mürin mastositoma), K-562 (insan kronik miyeloid lösemi), CEM (akut lenfoblastoid lösemi), MCF-7 (insan meme kanseri) ve MCF-7 gem (genstabin)] üzerine karvakrol, karvon, timol, karveol, isopulegol ve fenil propanoid eugenol monotерpenlerinin antitümör etkilerini araştırmışlardır. Test edilen monotерpenler arasında en etkili olanın karvakrol olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen tüm monotерpenlerin en fazla P-815 ve CEM tümör hücreleri üzerine etkili olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışmada karvon özellikle P-815, K-562 ve CEM tümör hücreleri üzerine yüksek aktivite gösterirken, MCF-7 ve MCF-7 gem tümör hücreleri üzerine daha düşük aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Diğer taraftan timolün ise P-815 hücreleri üzerine etkili olduğu kaydedilmiştir.

Saverini *et al.* (2012) prokaryotik ve ökaryotik hücreler üzerinde 4 farklı monotерpenin [(±)α-pinen, (+)β-pinen, (+)3-karen ve R-(+)limonen] genotoksik etkisini araştırmışlardır. Ames testi sonucunda araştırmacılar, monotерpenlerin tek tek uygulandığında revertant frekansında artışı indüklemediğini gözlemlerken, monotерpenlerin beraber uygulanması durumunda, TA100 (metabolik aktivite varlığında) suşlarında revertant artışına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Comet testi sonuçlarına göre ise monotерpenlerin hem tek tek hem de beraber uygulandığında Çin hamster akciğer fibroblast hücrelerinde (V79) DNA hasarına neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Negi *et al.* (2013) kekik bitkisinden elde ettikleri karvakrol, timol ve türevlerinin antioksidan özelliğe sahip olduğunu DPPH yöntemini kullanarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler


- Fetal Calf Serum (100 ml) PAN Biotech® (Germany) firmasından,
- DNAaz tip 1 (120 µ/ml) Sigma® (St Louis, USA) firmasından,
- Dubbelco modifieded eagles medium, Hank's Blanced Salt Solution (HBSS), Sodyum bikarbonat (NaHCO₃), Low Melting Agarose (LMA), Normal Melting Agarose (NMA), Sodyum hidrojen fosfat (NaH₂PO₄), Potasyum hidrojen fosfat (KH₂PO₄), EDTA, Triton-X-100, Tris, DMSO Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany) firmasından,
- Penicillin-Streptomycin (10 ml) PAN Biotech® (Germany) firmasından,
- B27 GIBCO® (Grand Island, NY, USA) firmasından,
- Total antioxidant status (TAS) ve Total oxidant status (TOS) kitleri Rel Assay Diagnostics® (Gaziantep, Türkiye) firmasından,
- MTT cell proliferation assay kiti Cayman Chemical Company® (USA) firmasından,
- Sodyum klorür (NaCl) ve Potasyum klorür (KCl) Merck, Darmstadt® (Germany) firmasından,
- Karvakrol SAFC, Sigma-Aldrich® (USA) firmasından,
- Karvon Fluka, Sigma-Aldrich® (Chine) firmasından,
- Terpinolen Fluka, Sigma-Aldrich® (Japan) firmasından,
- Timol (Fluka, Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany) firmasından,
- Alfa-pinen Aldrich, Sigma-Aldrich® (USA) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlara ait bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Test bileşiklerine ait bilgiler ve mevcut literatür bilgileri (Zhou *et al.* 2004; Yu *et al.* 2008; Buyukleyla ve Rencuzogulları 2009; Aristatile *et al.* 2010) doğrultusunda belirlenmiş olan konsantrasyonları ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar

Aletler ve Cihazlar	Temin Edildikleri Firmalar
Distile su cihazı	Easypure RF compact ultarpure ws, (USA)
Karbondioksitli doku kültür etüvü	Napco 6500-Su yelekli (<i>Amityville</i> , USA)
İnverted mikroskop	Euromex-Holland, Nikon Eclips TS 100
Floresan mikroskop	Nikon Eclips E600, (Japan)
Atomik kuvvet mikroskobu	Nanomagnetics Inst. (Turkey)
Spektrofotometre	Beckman DU 500 (USA)
Santrifüj	Model HN-S, USA, Nüve NF 200, (Ankara)
Su banyosu	Nüve NB 5 (Ankara)
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 320 M, Ohaus, Ep 213 (USA)
Elektroforez seti	Wealtec ELİTE 300 Plus (Ankara)
12 ml hücre kültür tüpü	Granier Bio-one (Germany)
pH metre	Accument model 220- Fischer Scientific, Handylab 2 BNC (Germany)
Buzdolabı	Arçelik ve Bosch
ELISA okuyucu	Bio-Tek, PW XS (USA)
48 kuyucuklu plate	Costar (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany)
5 cc steril enjektör	Hayat tıbbi aletler (Turkey)
Otomatik pipet	Finpipette Labsystems (Finland)
Laminer flow bench	Ankara
Derin dondurucu	Sanyo Ultra Low (Japan)

Çizelge 3.2. Test edilen monoterpener ve uygulanan konsantrasyonları


Monoterpenler	CAS No.	Test Edilen Konsantrasyonları
Karvakrol	499-75-2	0,10, 25, 50, 100, 200, 400 mg/L
(+)-Karvon	2244-16-8	
Terpinolen	586-62-9	
Timol	89-83-8	
(+)-α-Pinen	7785-70-8	

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Fosfat tamponlu salin'in (PBS) hazırlanışı (pH:7)

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

Agaroz çözeltilisinin hazırlanışı

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

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

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

Lizis solüsyonunun hazırlanışı

146,1 gr NaCl; 37,2 gr EDTA ve 1,2 gr Tris 700 ml saf suya ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma 8 gr NaOH eklendi ve yaklaşık 20 dk karıştırıldı. pH:10 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacim saf suyla 890 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Kullanılmadan önce son olarak; 10 ml Triton X-100 (%1) ve 100 ml DMSO (%10) eklendi. Uygulamadan hemen önce en az 30 dk buzdolabında bekletildi.

Elektroforez tampon çözeltilisinin hazırlanışı

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

Nötürleştirme tamponunun hazırlanışı

48,5 gr Tris 800 ml saf suda iyice çözüldü. pH:7,5'e ayarlandıktan sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Boyama solüsyonunun hazırlanışı

10 mg EtBr 50 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı. Her kullanımda

hazırlanan bu stok çözeltilerden 1 ml alınarak hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Hank's Blanced Salt Solution (HBSS) hazırlanışı

Kalsiyum klorür (CaCl)	0,185 gr/L
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0,097 gr/L
Potasyum klorür (KCl)	0,4 gr/L
KP (Monobazik)	0,06 gr/L
NaCl	8 gr/L

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

3.4. Deney Hayvanları

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

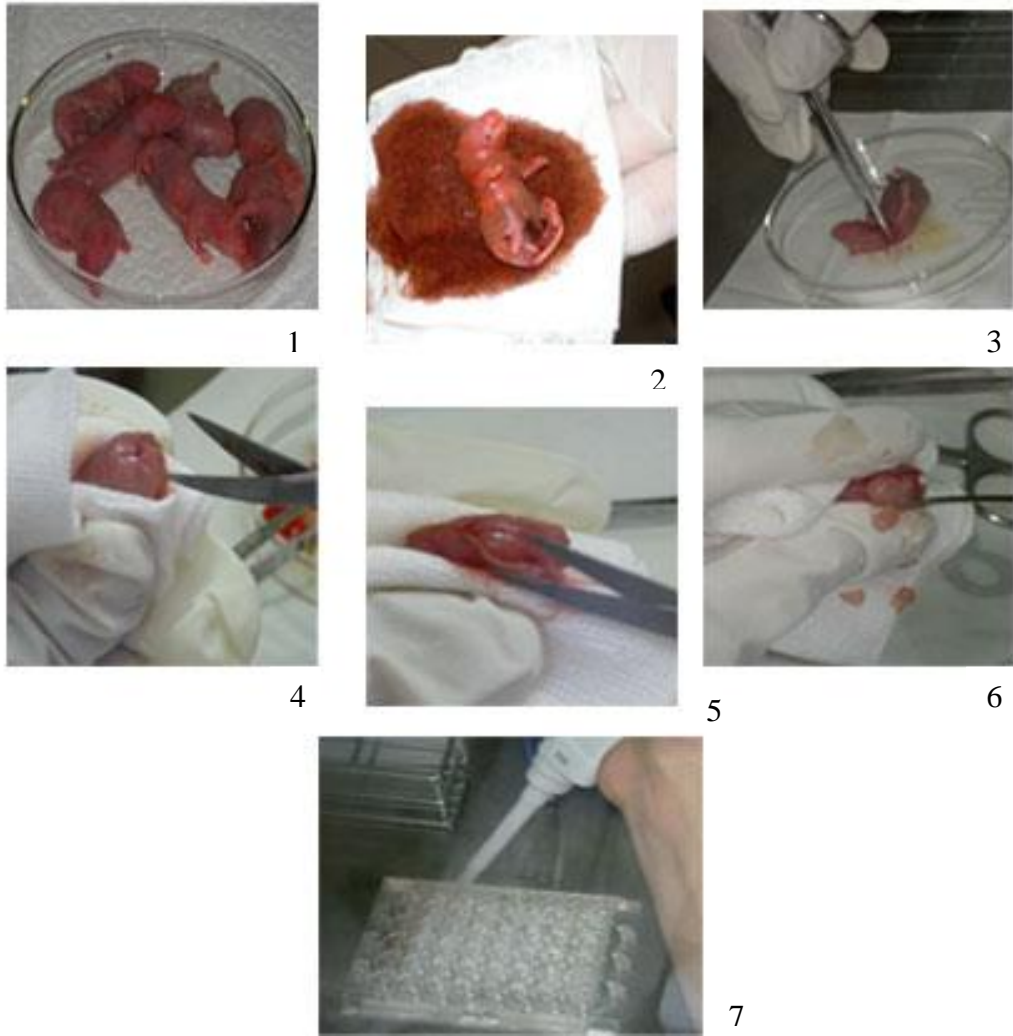
3.5. Nöron Kültürlerinin Kurulması

9 adet yeni doğmuş (24 saatini doldurmamış) Sprague Dawley cinsi rat yavrusu alındı. Batikonla yıkandıktan sonra steril ortamda dekapite edildi. Baş kısmında önce derisi ve kafatası kaldırıldı, ince beyin zarı da ayrıldıktan sonra korteks kısmı dikkatlice beyinden çıkarıldı. Korteks kısımları içinde HBSS bulunan tüplere konuldu ve tüpler etüve bırakıldı. Daha sonra tüpler sterilizasyona çok dikkat edilerek etüvden alındı. Dibe çökmüş olan korteks parçaları üzerindeki HBSS döküldü. Steril petri kabına alınan korteks parçaları 20 numaralı bistüri ile makro parçalara ayrıldı. Parçalara ayrılan

korteks parçalarının üzerine 1,5 ml HBSS ile 0,3 ml tripsin eklendi (1/4 oranında). Enjektörle çekilip 15 ml'lik tüpe konuldu. Tripsinin mikro parçalama yapabilmesi için 35 dk etüvde bekletildi.

Tripsinin parçalama etkisini durdurmak amacıyla Dnaz I'in bulunduğu kabın içine, tripsin ile muamele edilen korteksler eklendi. Daha sonra Dnaz I'in bulunduğu kabın içine %10 oranında fetal sığır serum eklendi. Dnaz I'in parçalamayı durdurarak tripsini dokulardan ayırması için 10 dk beklendi. Bu sıvının üzerine 6 ml HBSS eklendi ve 800 rpm'de 19 dk santrifüj edildi. Dibe çöken korteks parçalarının üzerindeki HBSS döküldü ve üzerine 10 ml nöronal base medium konuldu. Üzerine nöronal base medium supplementi olan B27 (1/50 oranında) ve penisilin (1/1000 oranında) ilave edildi.

48'lik plate'lerin her kuyucuğuna 180 µl kondu ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüve bırakıldı. 1 Hafta sonra hücrelerin bulunduğu her kuyucuğa hacimlerinin 1/2 oranında nörobasal medium +B27+ antibiotikden oluşan ekim ortamı eklendi ve nöron hücrelerinin plate tabanını kaplayacak ve mikroskop altında dallanma gösterecek kadar gelişmesi beklendi. Nöron kültürü hazırlama aşamaları Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Nöron kültürü hazırlama aşamaları

3.6. N2a Nöroblastoma Kültürlerinin Kurulması

N2a nöroblastoma hücre hattı Türkiye Şap Enstitüsünden temin edilmiştir. Hücre kültür deneyleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. N2a nöroblastoma hücreleri plate içinde, ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sığır serum ve antibiyotikler (penisilin ve streptomisin) içeren medyum içinde 37°C'de %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü.

3.7. MTT Analizi

Hücre proliferasyonu, sinyal molekülleri ile iletişim sağlayabilme ve hücre yüzey reseptörlerince bağlanabilme yeteneğine sahip büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Hücre bölünmesi sonucunda proteinlerin üretilmesiyle form değiştirerek DNA'ya bağlanan bu moleküller aktif transkripsiyon faktörleridir. Bu düzenleyici sürecin herhangi bir adımındaki fonksiyon bozukluğu anormal hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Kanser ve yaşlanma gibi birçok patolojik durumda bu nedenden dolayı anormal hücre proliferasyonu görülmektedir. Hücre siklusu sürecindeki bu tür değişikliklere neden olan mekanizmaların tanımlanması özellikle kanser gibi hastalıkların tanı ve tedavisinde oldukça önemlidir (Sulić *et al.* 2005). Hücre proliferasyon yöntemleri büyüme faktörleri, sitokinler, mitojenler ve ilaçlar gibi hücre siklusu düzenleyici faktörlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Francoeur *et al.* 1996).

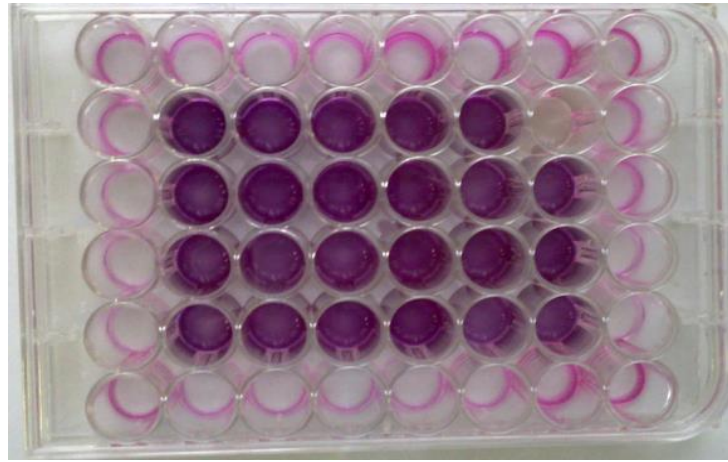
Cayman MTT proliferasyon yöntem kiti herhangi bir *in vitro* modelde hücre proliferasyonunun indüksiyonu ve inhibisyonunun çalışılabilmesi için olanak sağlamaktadır. Bu yöntemde, MTT pozitif yüklenme ve plazma membran potansiyelinden dolayı hücreler tarafından tutulur. MTT hücre içindeki NAD(P)-H-oksiredüktazlar tarafından formazana indirgenir (Berridge *et al.* 2005).

Kit Bileşenleri

- MTT reaktifi: 25 mg
- Tampon tableti: 1 adet
- Kristal çözücü solüsyon: 50 ml

Tampon tableti 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Hazırlanan bu tampon çözeltisinden 5 ml alınarak içerisinde MTT reaktifi çözüldü. Hücreler 48'lik plate'e kuyucuk başına 100 µL kültür medyumunu içerisinde 10⁵ hücre bulunacak şekilde, muamele edilecek bileşikle birlikte ve muamele edilecek bileşik olmadan ekildi. Hücrelerin CO₂ etüvünde

37°C'de 24saat süre ile kültürü yapıldı. Kùltürler sonlandırıldıktan sonra her bir kuyucuğa pipet yardımı ile 10 µL MTT reaktifi ilave edildi. Hücreler 37°C'lik CO₂ etüvünde 3-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan formazan kuyucukların dibinde koyu kristaller halinde görüldü. Kùltür medyumunu hücre tabakasını dağıtmadan dikkatli bir şekilde her bir kuyucuktan aspire edildi. Alternatif olarak dibe yapışmayan hücrelerin çökmesi için aspire edilmeden önce plate 400 x g'da 10 dakika satrifüjlendi. Her bir kuyucuğa 100 µL kristal çözücü solüsyon eklendi. Her bir numunenin absorbanısı 570 nm'de mikrolate okuyucu kullanılarak okundu (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MTT analizi

3.8. Toplam Antioksidan Kapasitesi

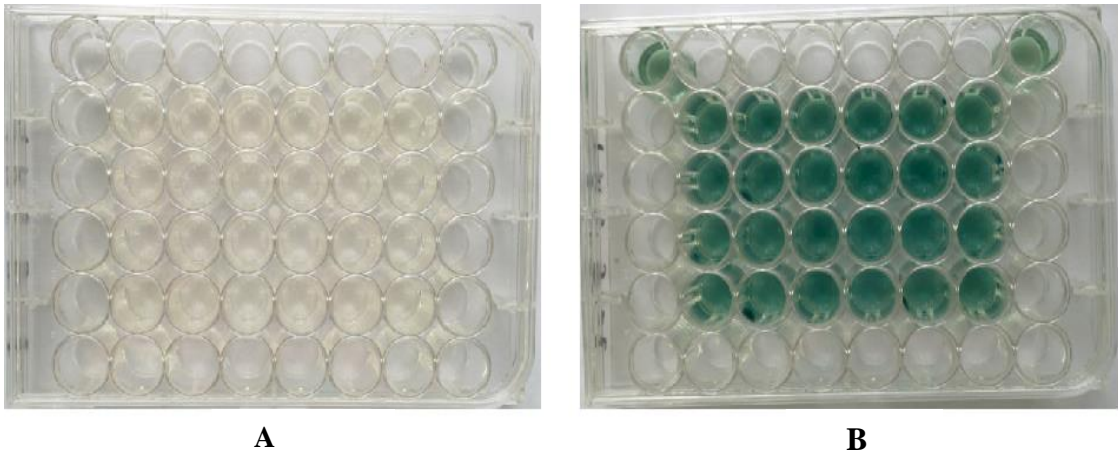
Toplam antioksidan kapasite (TAK) düzeyi tespitinde, ilk olarak Tomasch *et al.* (2001) tarafından uygulanan fotomerik yöntem kullanıldı. Bu yöntem 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır.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

Kit Bileşenleri

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

30 µl plazma örneklerinin bulunduğu 48'lik plate'in her kuyucuğuna 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm'de ilk absorbansı okundu (Şekil 3.3A). Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm'de ikinci kez absorbansı okundu (Şekil 3.3B). Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

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



Şekil 3.3. TAK analiz prosedürü (A: Birinci okuma, B: İkinci okuma)

3.9. Toplam Oksidan Durum

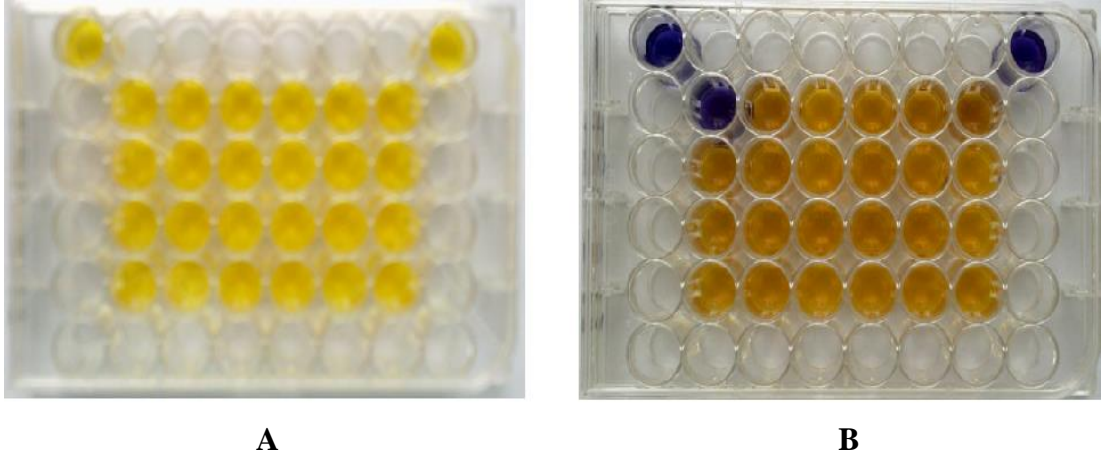
TOD (total oksidan durum), tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferik iyon oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar “ksilenol orange” ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS ticari kitleri kullanıldı.

Kit Bileşenleri

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

75 µl plazma örneklerinin bulunduğu 48'lik plate'in her kuyucuğuna 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm'de ilk absorbansı okundu (Şekil 3.4A). Daha sonra aynı kuyucuklara 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm'de ikinci kez absorbansı okundu (Şekil 3.4B). Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

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



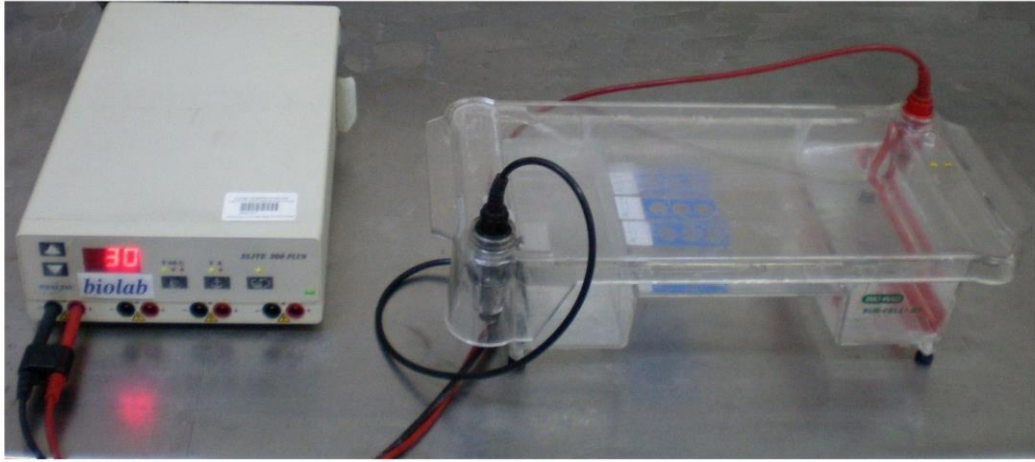
Şekil 3.4. TOD analiz prosedürü (A: Birinci okuma, B: İkinci okuma)

3.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi

- Slaytlar metanolden geçirildikten sonra ateşle steril edildi.
- Steril edilen slaytlar uygun sıcaklıkta şeffaflaştırılmış NMA ile dolu olan şaleye daldırıldıktan sonra arka tarafları temizlendi ve düz bir zemin üzerinde kurumaya bırakıldı.
- Yaklaşık 20 μ L hücre kültürü ile uygun sıcaklıkta şeffaflaştırılmış olan 70 μ L LMA karıştırıldı. Hazırlanan bu hücre kültürü ve LMA karışımı slaytlar üzerinde bulunan kuyucuklara damlatıldı ve üzerine lamel kapatılarak 5-10 dk buz aküsü üzerinde bekletildi.
- Bekleme süresi sonunda lameller yavaşça kaldırıldı ve hücre ilave edilmemiş olan LMA'dan 75 μ L kuyucuklar üzerine damlatıldıktan sonra tekrar lamel kapatıldı. 5-10 dk jelin katılaşması için buz aküsü üzerinde bekletildi.
- Jel katılaştıktan sonra üzerlerinden lameller kaldırılan slaytlar lizis solüsyonu ile dolu olan şaleye konuldu ve buzdolabında 2-4 saat kadar bekletildi.
- Yaklaşık 3 saatin sonunda slaytlar bir miktar elektroforez solüsyonu içerisine konularak 30 dk buzdolabında +4°C de bekletildi.
- Daha sonra slaytlar 24 volt (yaklaşık 0,74 V/cm) ve 300 miliamper'de elektroforezde 30 dk yürütme işlemine tabi tutuldu.
- Elektroforezde yürütme işleminden sonra elektroforez tankından çıkarılan slaytlar

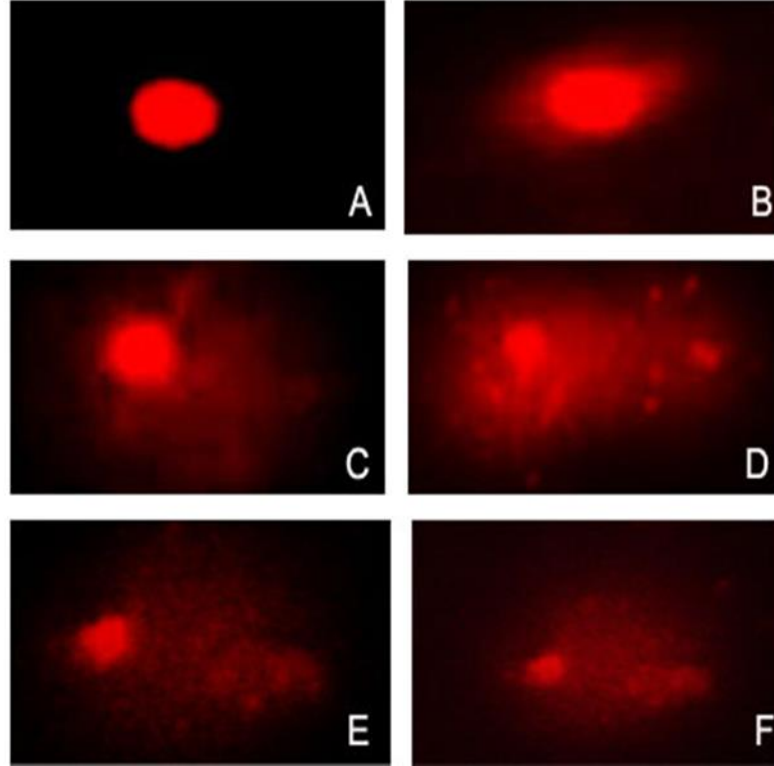
nötralizasyon solüsyonunda 5 dk bekletilerek fazla jelin giderilmesi sağlandı. Bu işlem 3 kere tekrar edildikten sonra slaytlar ısıtıcıda kurutuldu.

- Kuruyan slaytların üzerindeki her bir kuyucuğa 80 μ L etidyum bromür damlatıldı ve 5 dk bekletildi. Daha sonra soğuk su ile dolu şale içerisine yerleştirilerek fazla boyanın giderilmesi sağlandı.
- Sudan çıkarılan slaytların üzerine lamel kapatılarak hemen değerlendirildi.



Şekil 3.5. Elektroforez tampon solüsyonunda yürütme aşaması

DNA hasarı EtBr boyalı DNA'nın floresan mikroskopunda 40X'lık objektifte incelenmesiyle gözlemlendi. DNA hasarlarının tespit edilmesinde Speit and Hartmann (1999) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla olanaklarımız bünyesinde bir Comet analiz programı bulunmadığından dolayı analizler görsel olarak floresan mikroskop altında gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında, her kültür için 100 adet nükleoid DNA incelenerek DNA hasarları hesaplandı. Comet oluşumları, literatürden yararlanılarak gözlenen kuyruk uzunluklarına göre altı farklı gruba ayrılarak A'dan F'ye kadar değişen oranlarda puanlandırıldı (Şekil 3.6) (Gopalakrishna and Khar 1995; Vigreux *et al.* 1998). A: hasarsız (0), B: çok az hasarlı (1), C: az hasarlı (2), D: Hasarlı (3), E: Çok hasarlı (4), F: maksimum hasarlı (5). Böylece, 100 comet için elde edilen toplam hasar puanı 0-500 arasında yer aldı. Ayrıca, tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapıldı.



Şekil 3.6. DNA hasar tespitinde kullanılan analiz metodu

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

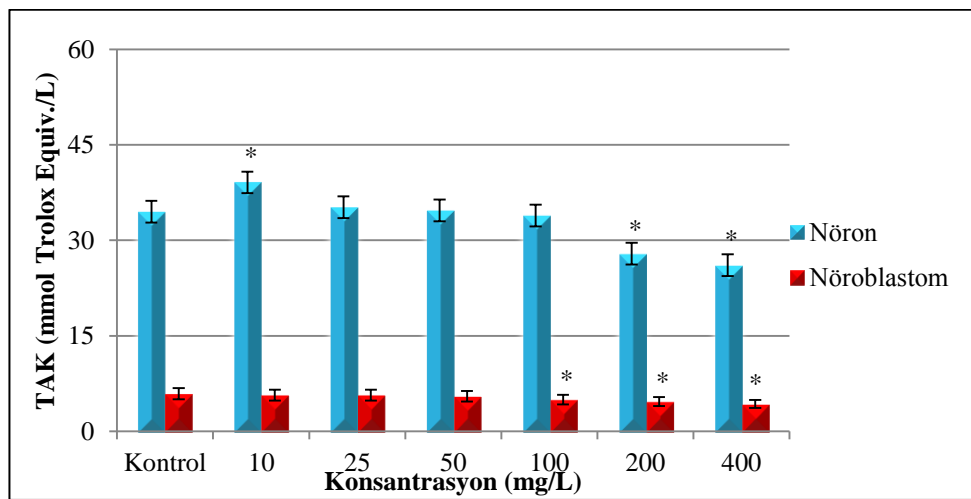
3.11. İstatiksel İşlemler

Çalışmadan elde edilen bulguların istatiksel yönden değerlendirilmesinde S.P.S.S 18 programı kullanıldı. Tespit edilen SCGE analizinde belirlenen ortalamalar ile TAK, TOD ve MTT düzeylerinin kontrol ve deney grupları arasında değişiklik gösterip göstermediği varyans analizi kullanılarak belirlendi (Seymen vd 2000; Bukowska and Kowalska 2004). Varyans analizi için one way Anova testlerinden Duncan testi kullanıldı. Elde edilen veriler $p < 0,05$ anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

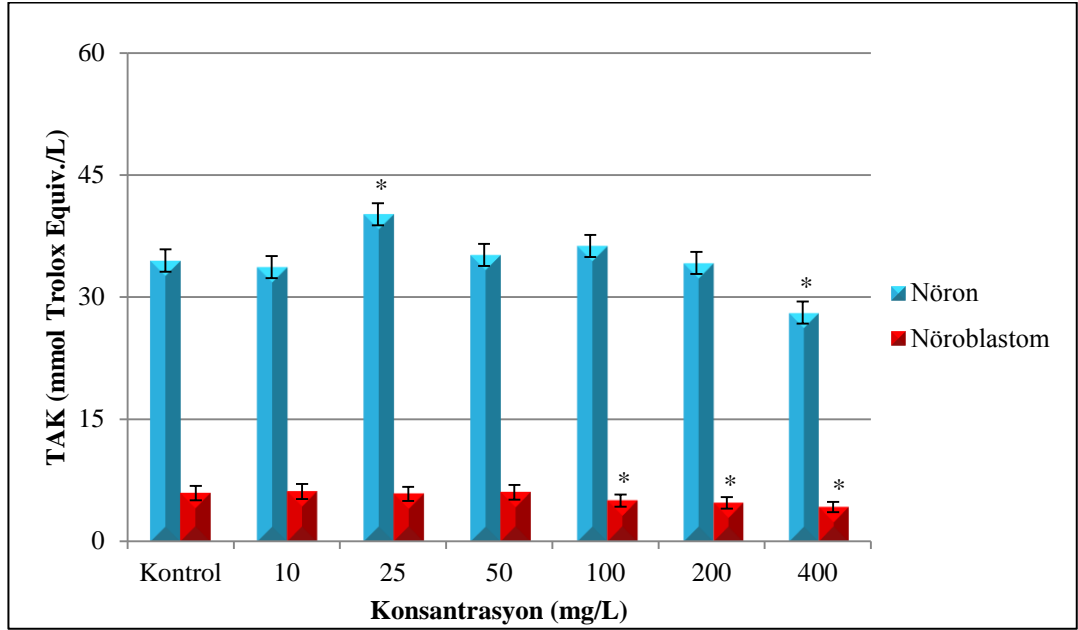
4.1. Test Edilen Monoterpenlerin *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu TAK Değerleri

Kontrol grubu TAK değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $34,5 \pm 5,0$, N2a nöroblastoma hücre kültürleri için $5,9 \pm 0,6$ olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız sağlıklı nöron hücre kültürlerinde kontrol grubuna kıyasla terpinolen ve timolün 10, 25 ve 50 mg/L konsantrasyonlarının; α -pinenin 10 ve 25 mg/L konsantrasyonlarının; karvakrolün sadece 10 mg/L ve karvonun sadece 25 mg/L konsantrasyonlarının TAK düzeyini yükselttiği tespit edilmiştir. Sağlıklı nöron hücre kültürlerinde karvakrol, timol ve α -pinenin 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları, karvon ve terpinolenin ise sadece 400 mg/L konsantrasyonları; N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde terpinolenin 50 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonları; karvakrol, karvon ve α -pinenin 100 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonları; timolün ise 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları TAK düzeylerini istatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır. Monoterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen için sırasıyla Şekil 4.1, 4.1, 4.3, 4.4 ve 4.5’de gösterilmiştir.

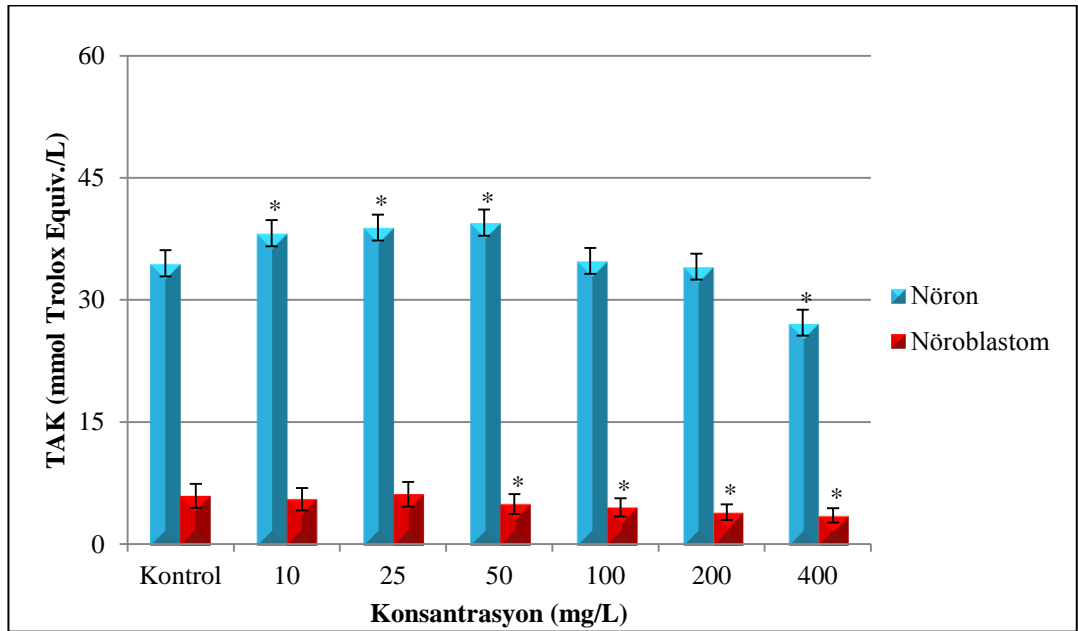


Şekil 4.1. *In vitro* koşullarda karvakrolün oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri

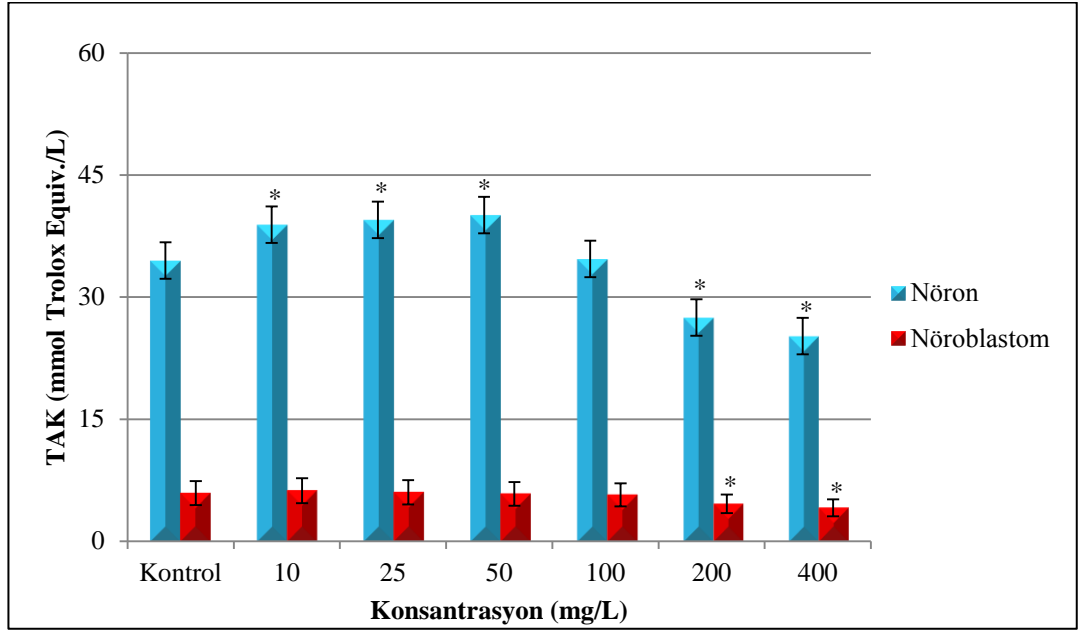
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. ($<0,05$, $n=5$).



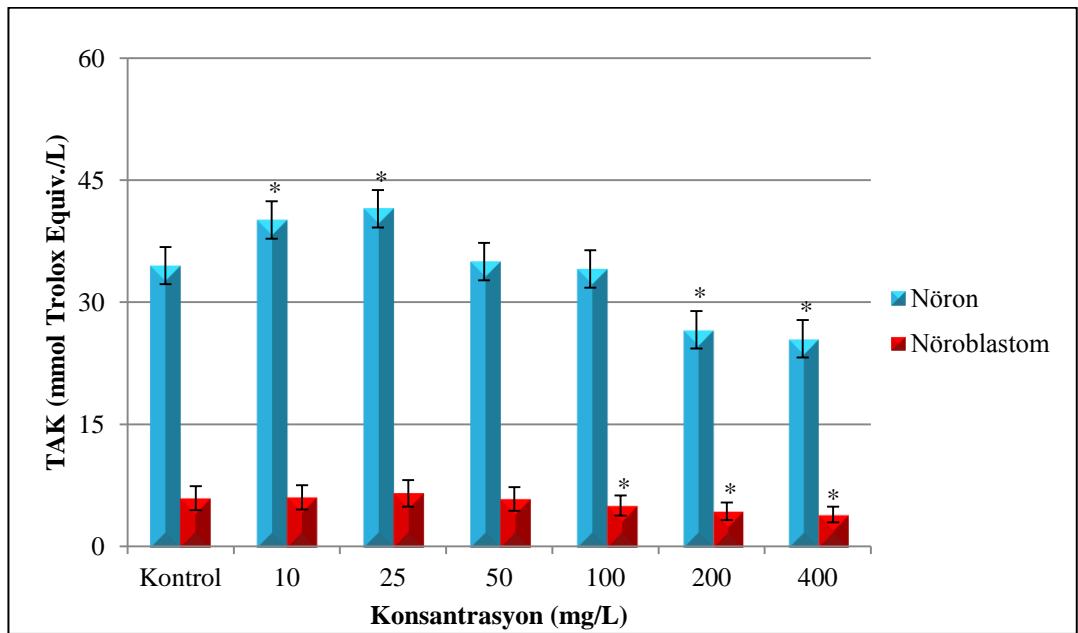
Şekil 4.2. *In vitro* koşullarda karvunun oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



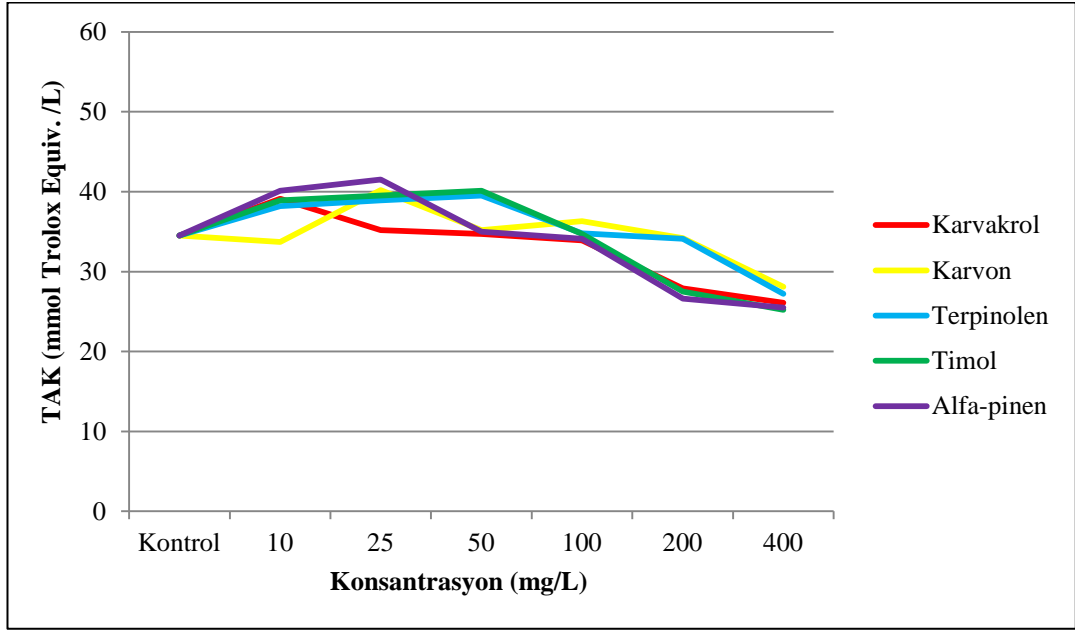
Şekil 4.3. *In vitro* koşullarda terpinolenin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



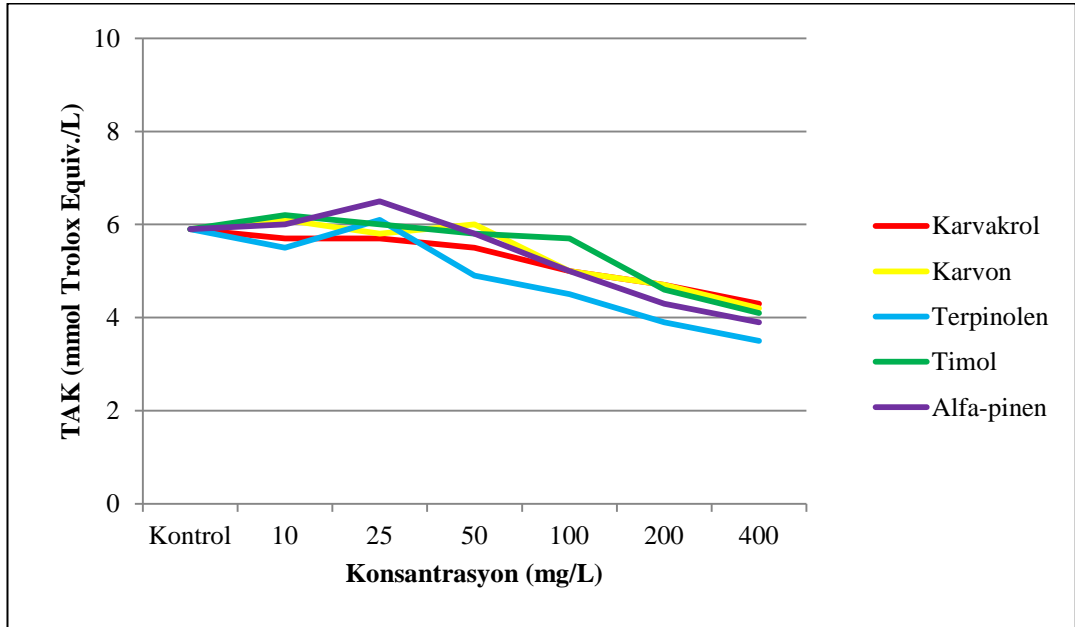
Şekil 4.4. *In vitro* koşullarda timolün oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



Şekil 4.5. *In vitro* koşullarda α -pinenin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



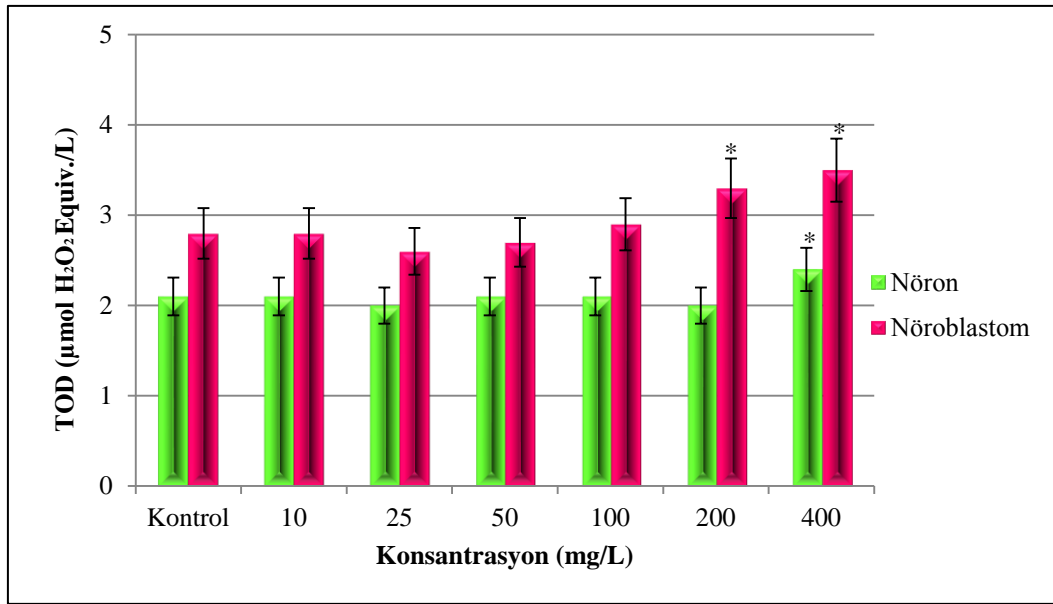
Şekil 4.6. *In vitro* koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenerin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri (karşılaştırmalı)



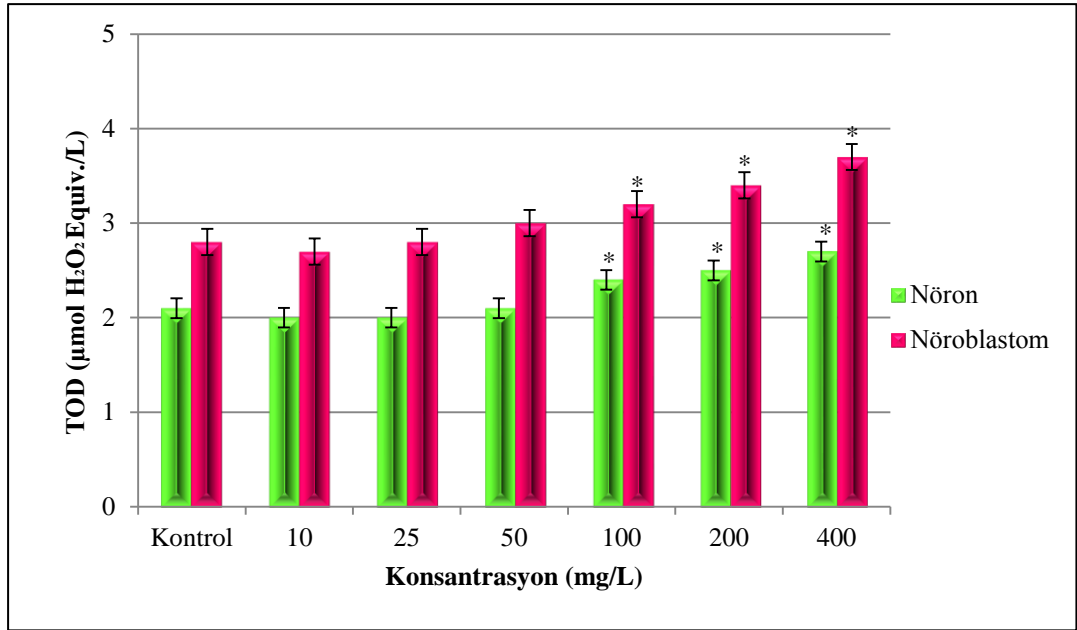
Şekil 4.7. *In vitro* koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenerin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri (karşılaştırmalı)

4.2. Test Edilen Monoterpenlerin *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu TOD Değerleri

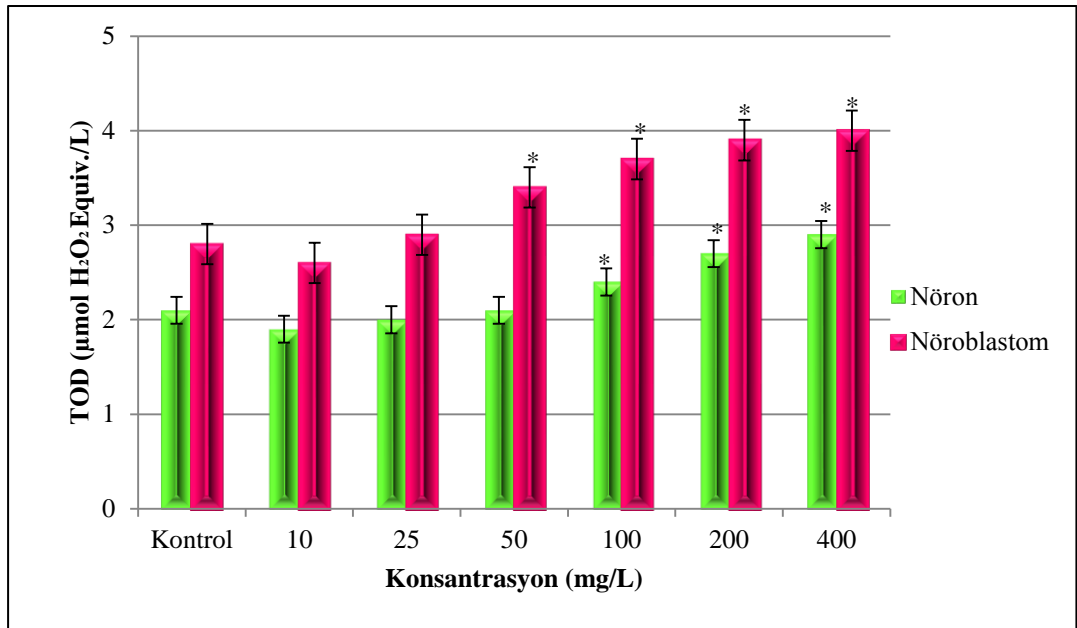
Kontrol grubu TOD değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $2,1 \pm 0,3$, N2a nöroblastoma hücre kültürleri için $2,8 \pm 0,4$ olarak saptanmıştır. Monoterpen bileşiklerinin 10 mg/L ve 25 mg/L konsantrasyonları her iki kültür ortamında TOD düzeylerini değiştirmemiştir. Ancak sağlıklı nöron hücre kültürlerinde karvon, terpinolen ve timolün 100, 200, 400 mg/L konsantrasyonları; α -pinenin 200, 400 mg/L konsantrasyonları ve karvakrolün ise sadece 400 mg/L konsantrasyonu TOD düzeyini kontrole oranla önemli derecede arttırmıştır. Diğer taraftan N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde ise terpinolenin 50 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonları; kavon, timol ve α -pinenin 100 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonları ve karvakrolün 200 ve 400 mg/L'lik konsantrasyonları TOD düzeylerini önemli derecede arttırmıştır. Monoterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu TOD değerleri karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen için sırasıyla Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.



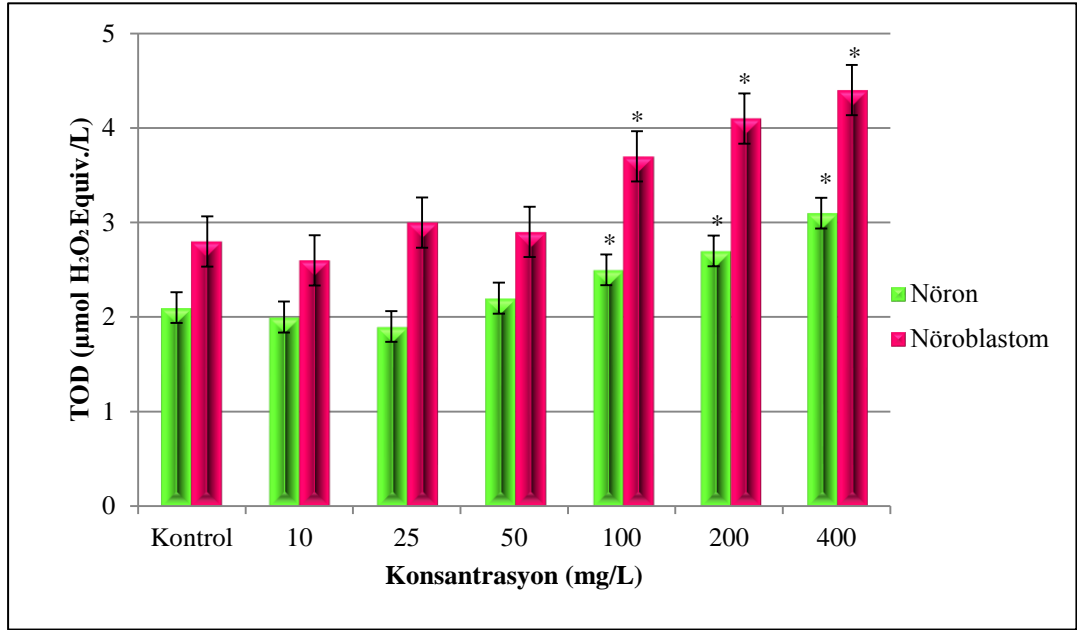
Şekil 4.8. *In vitro* koşullarda karvakrolün oluşturduğu total oksidan durum değerleri
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (< 0.05 , n=5)



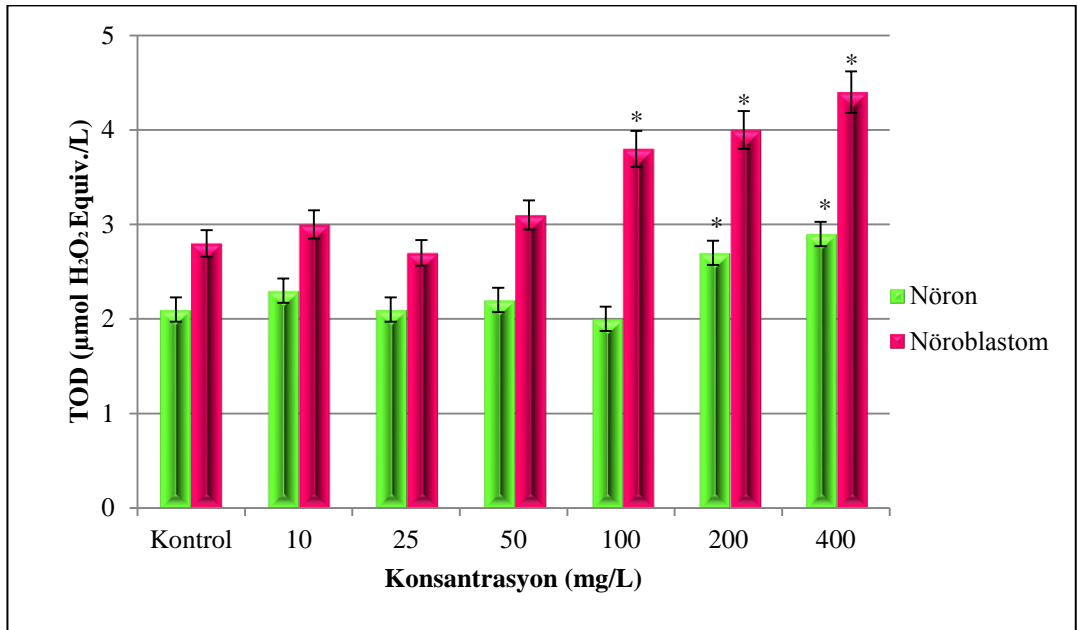
Şekil 4.9. *In vitro* koşullarda karvonun oluşturduğu total oksidan durum değerleri



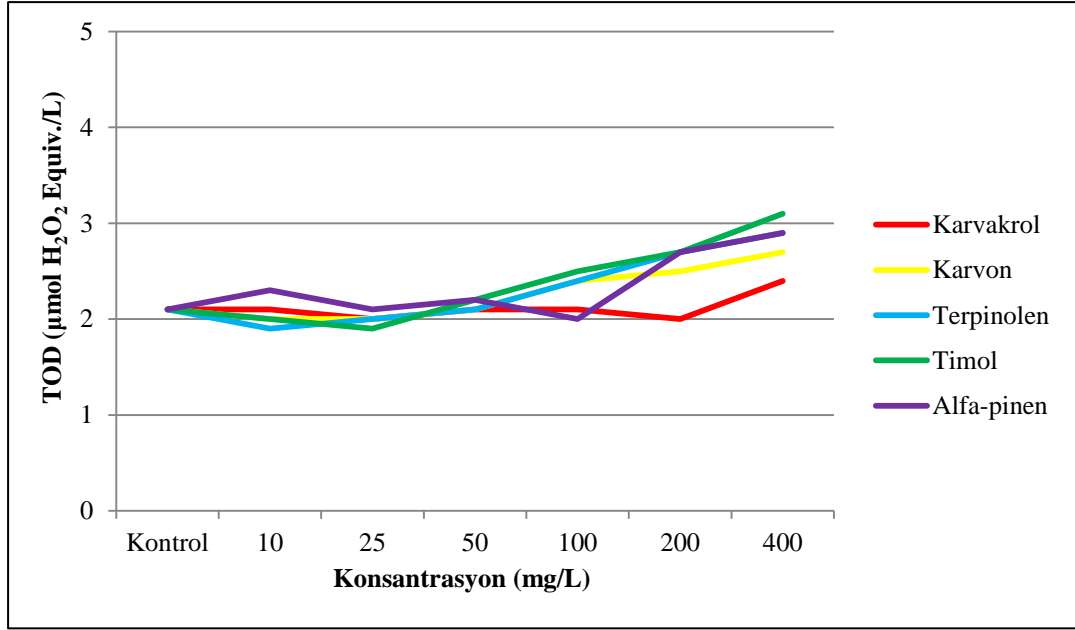
Şekil 4.10. *In vitro* koşullarda terpinolenin oluşturduğu total oksidan durum değerleri



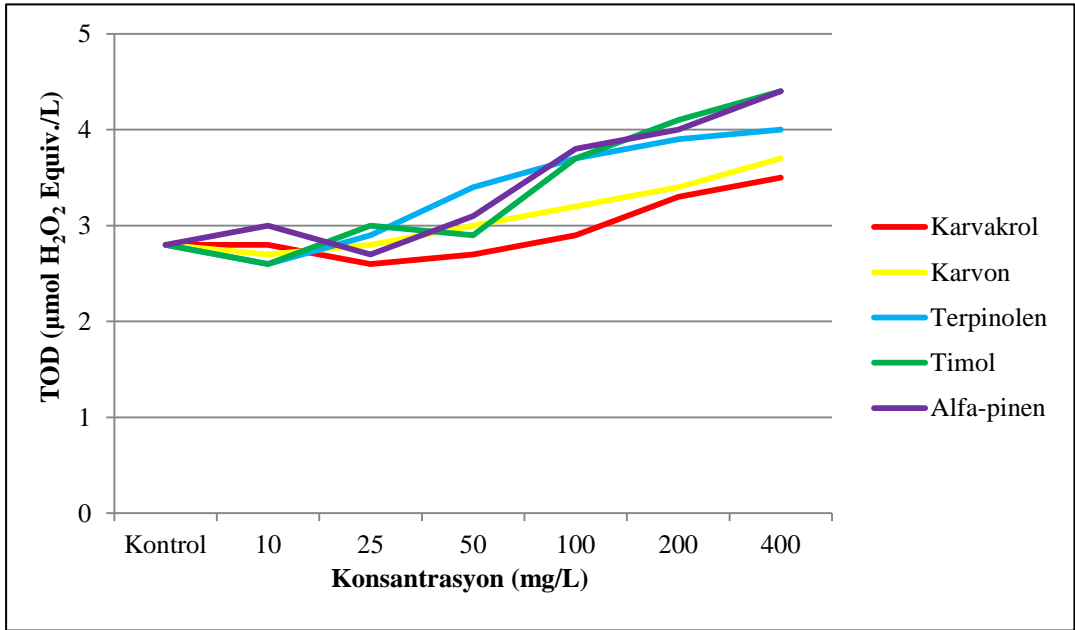
Şekil 4.11. *In vitro* koşullarda timolün oluşturduğu total oksidan durum değerleri



Şekil 4.12. *In vitro* koşullarda α -pinenin oluşturduğu total oksidan durum değerleri



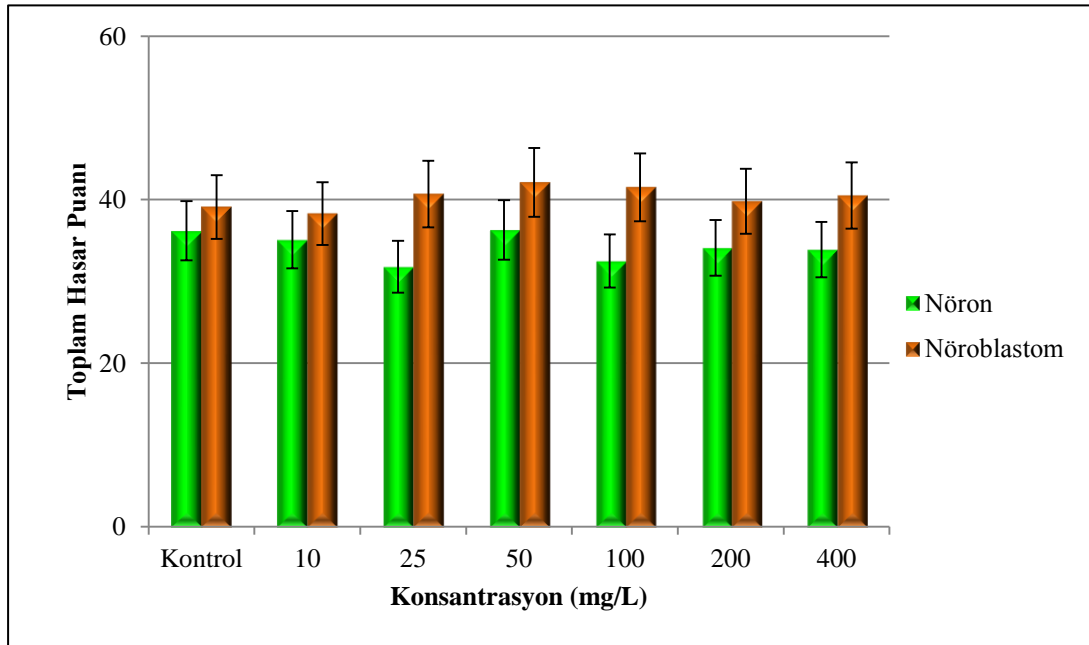
Şekil 4.13. *In vitro* koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu total oksidan durum değerleri (karşılaştırmalı)



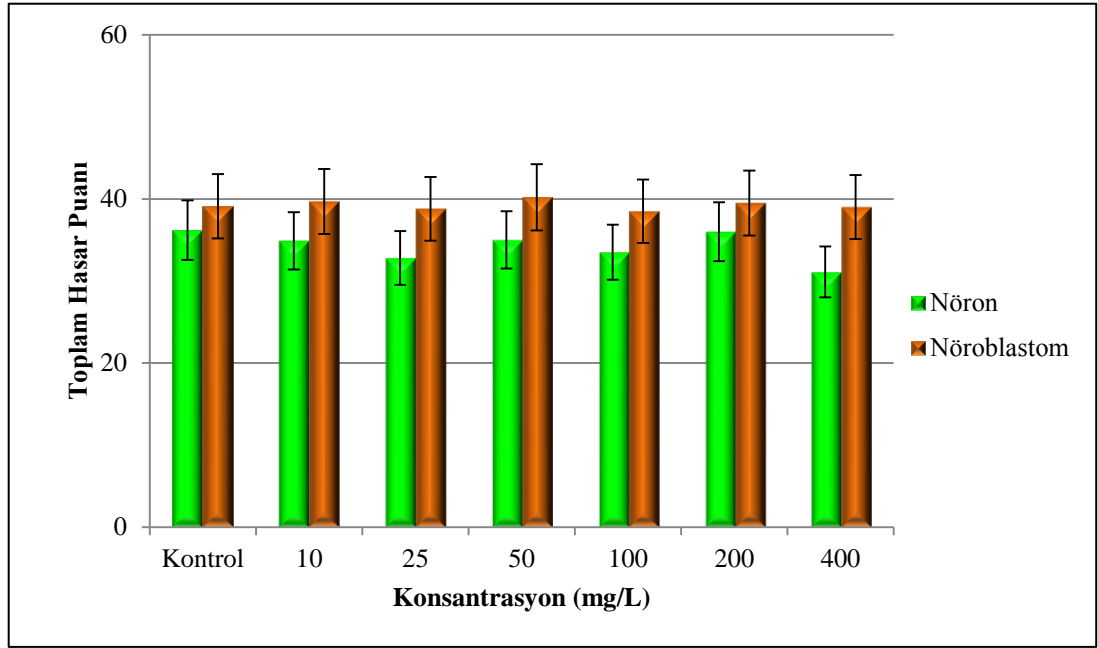
Şekil 4.14. *In vitro* koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin oluşturduğu total oksidan durum değerleri (karşılaştırmalı)

4.3. Test Edilen Monoterpenlerin *İn Vitro* Koşullar Altında Toplam Hasar Puan Değerleri

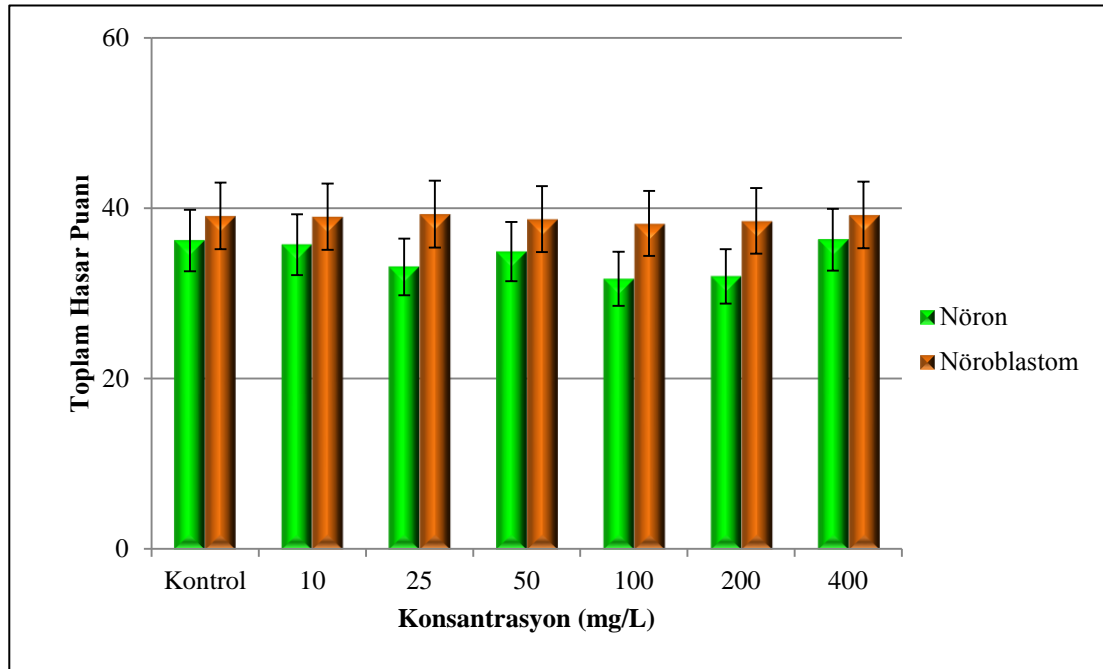
İn vitro koşullarda Comet oluşumları esas alınarak hesaplanan toplam hasar puan değerleri bütün konsantrasyonlar için $31,0 \pm 3,4$ ve $42,1 \pm 5,5$ değerleri arasında bulunmuştur. Kontrol grupları için tespit edilen toplam hasar puan değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri ($36,2 \pm 5,5$) ve N2a nöroblastoma hücre kültürleri ($39,1 \pm 3,4$) ile deney gruplarından elde edilen puan değerleri arasında istatistikî açıdan önemli bir farklılık bulunmamıştır. Farklı konsantrasyonlarda kültürlere uygulanan karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen hiçbir dozda kontrol grubuna kıyasla hasar puan değerlerinde belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Monoterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu toplam hasar puan değerleri karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen için sırasıyla Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'da gösterilmiştir.



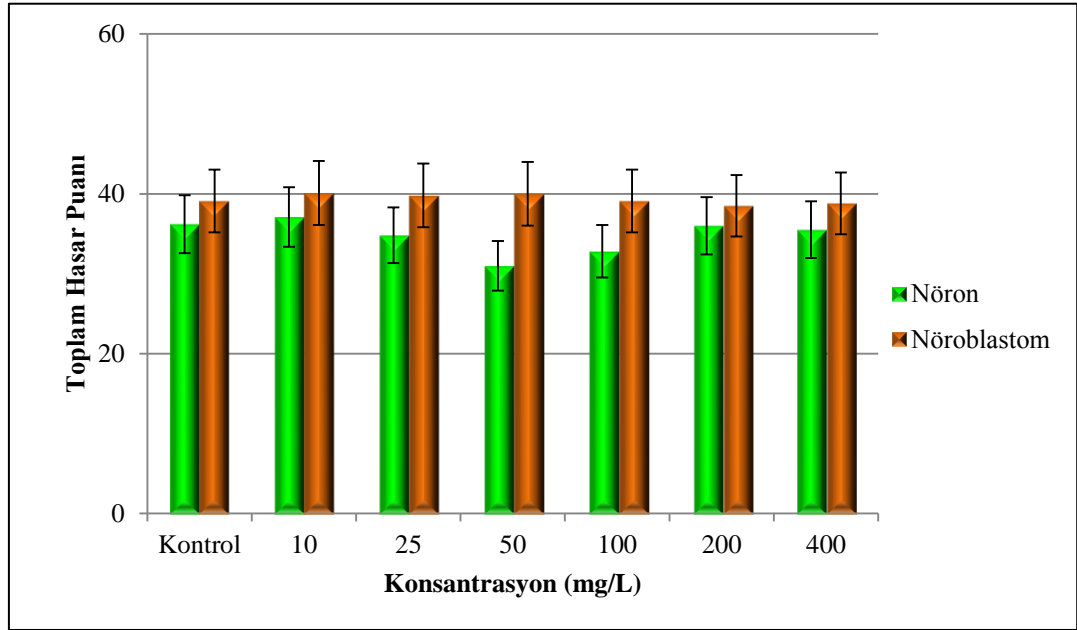
Şekil 4.15. *In vitro* koşullarda karvakrolün konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri (n=5)



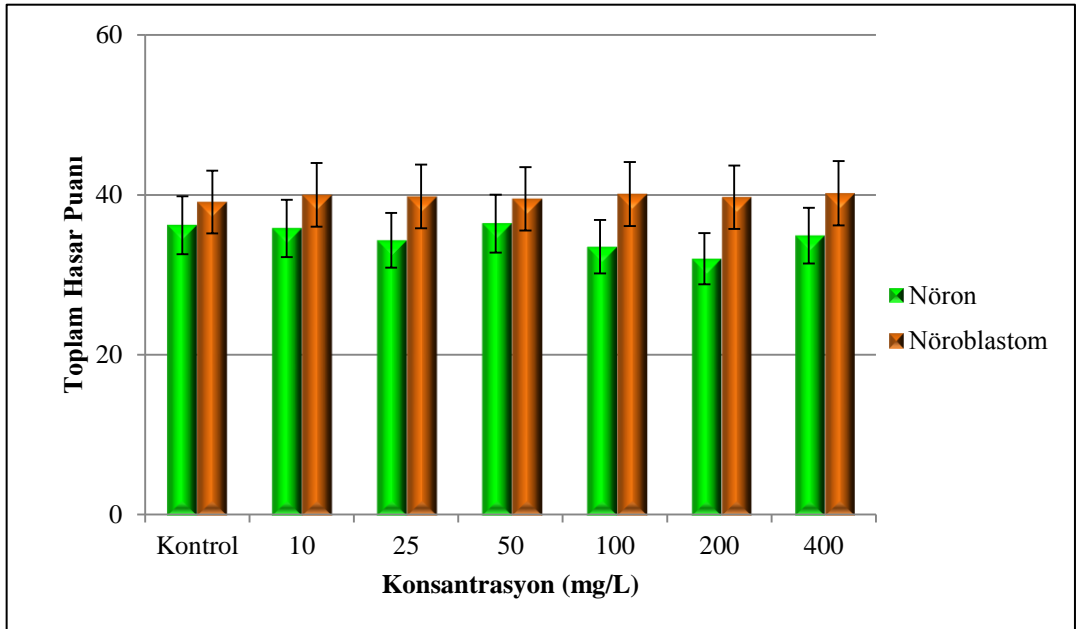
Şekil 4.16. *In vitro* koşullarda karvonun konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



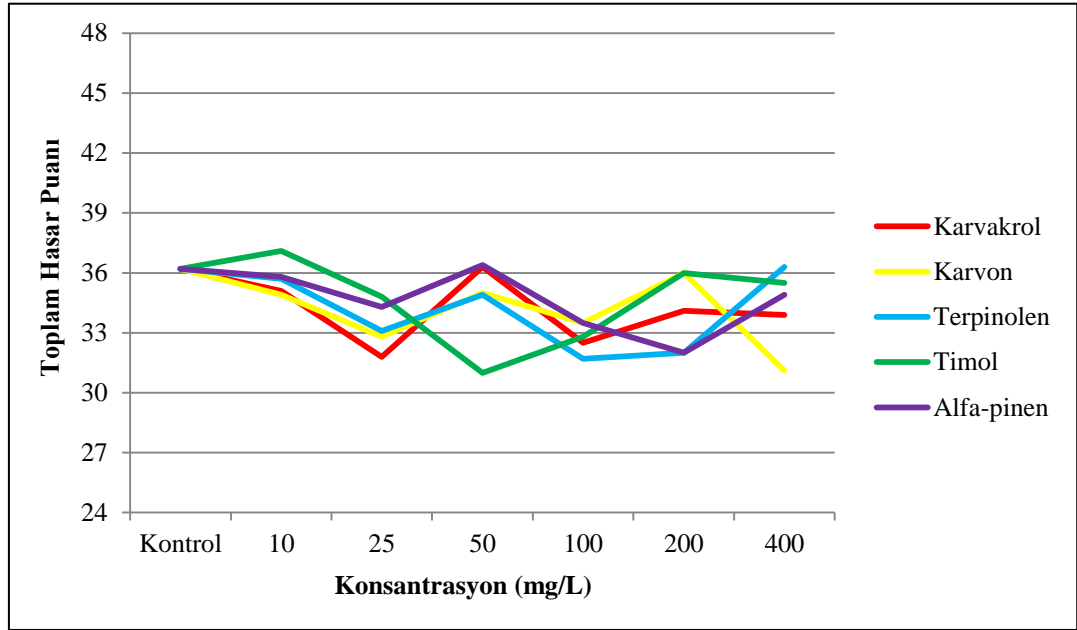
Şekil 4.17. *In vitro* koşullarda terpinolenin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



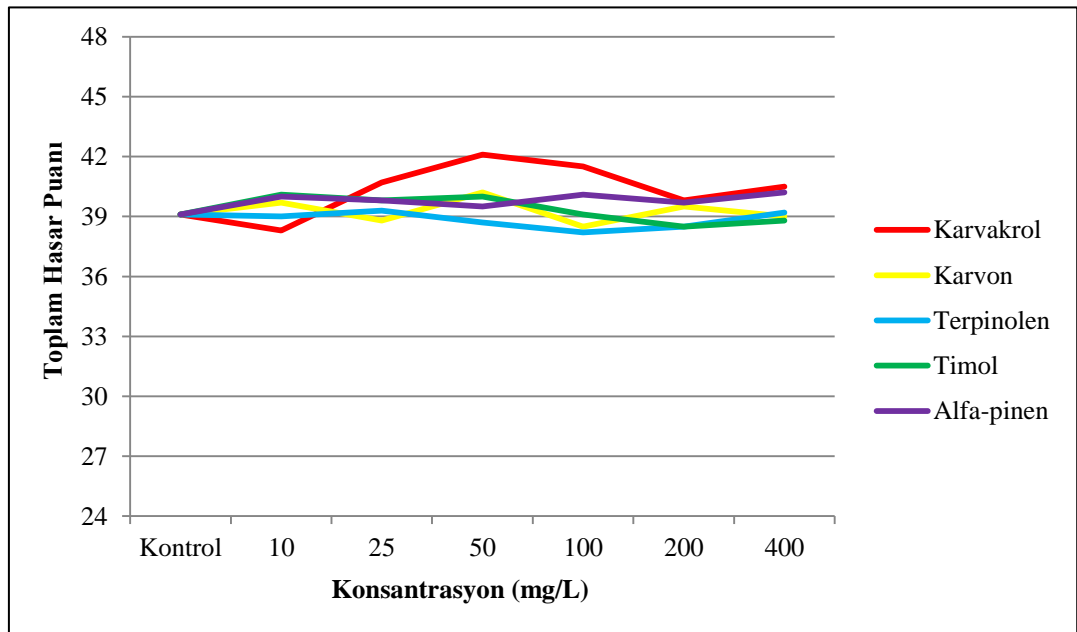
Şekil 4.18. *In vitro* koşullarda timolün konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



Şekil 4.19. *In vitro* koşullarda α -pinenin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



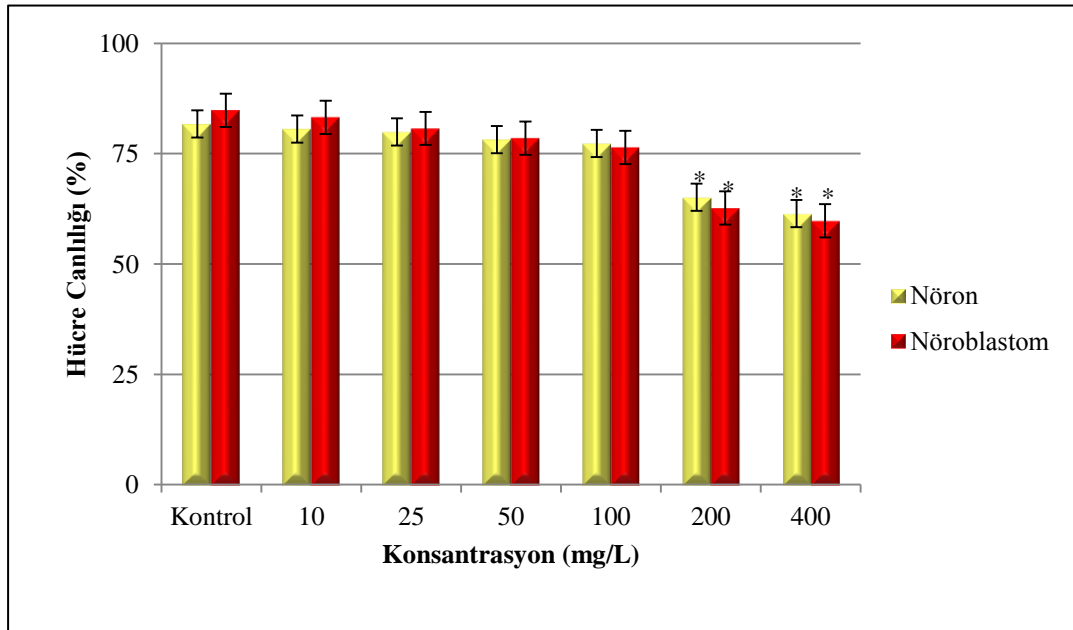
Şekil 4.20. *In vitro* koşullarda sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri (karşılaştırmalı)



Şekil 4.21. *In vitro* koşullarda N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenlerin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri (karşılaştırmalı)

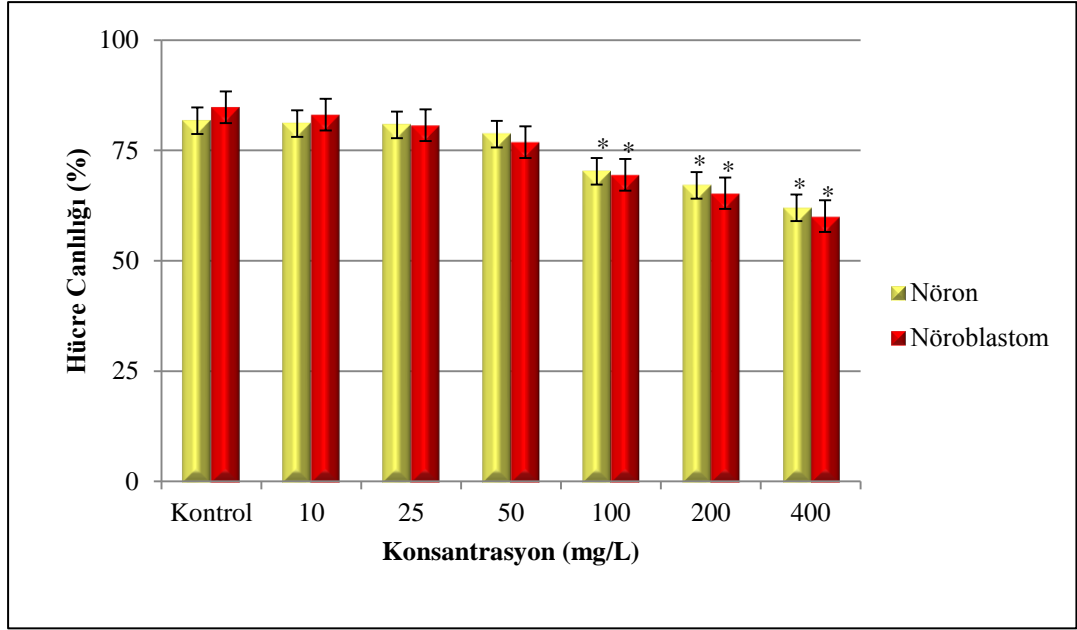
4.4. Test Edilen Monoterpenlerin *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu MTT Analiz Değerleri

In vitro koşullarda MTT analiz sonuçları bütün konsantrasyonlar için sağlıklı nöron hücre kültürlerinde $81,7 \pm 4,1$ ve N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde $84,8 \pm 5,3$ olarak bulunmuştur. Karvon ve terpinolenin 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları; karvakrolün 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları ve timol ile α -pinenin ise sadece 400 mg/L konsantrasyonu sağlıklı nöron hücre kültürlerinde hücre yaşam oranını kontrole göre azaltırken düşük dozları (10, 25 ve 50 mg/L) çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermemiştir. Ayrıca terpinolenin 50 mg/L; karvon ve α -pinenin 100 mg/L; karvakrol ve timolün ise 200 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarının nöroblastoma hücre kültürlerinde canlı hücre sayısını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Monoterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastoma hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu MTT analiz değerleri karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen için sırasıyla Şekil 4.22, 4.23, 4.24, 4.25 ve 4.26'da gösterilmiştir.

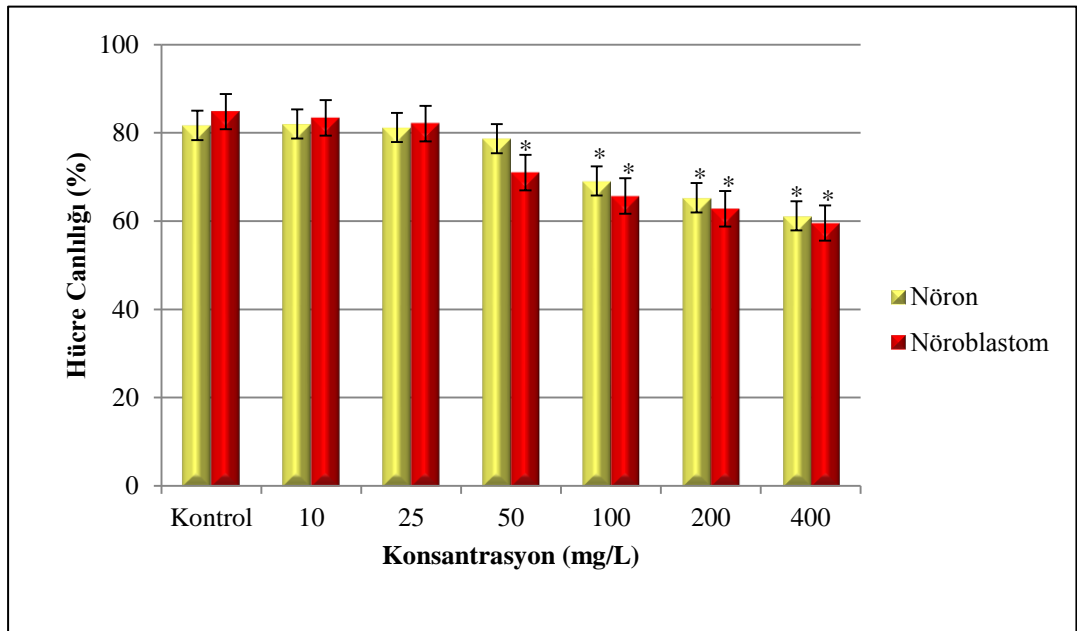


Şekil 4.22. Karvakrol maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

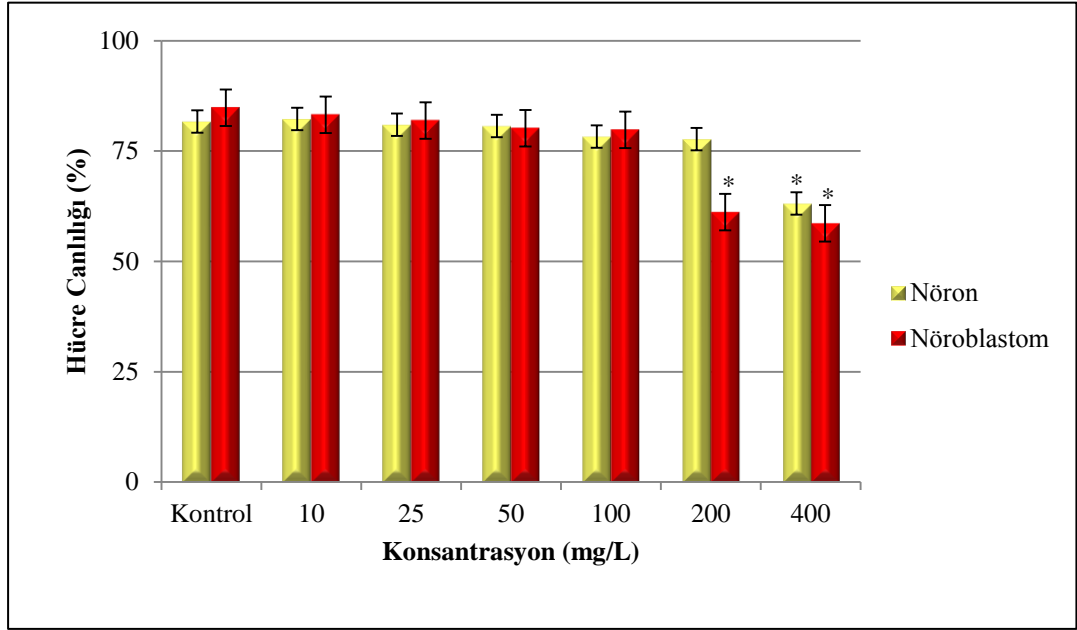
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (<0.05 , n=5)



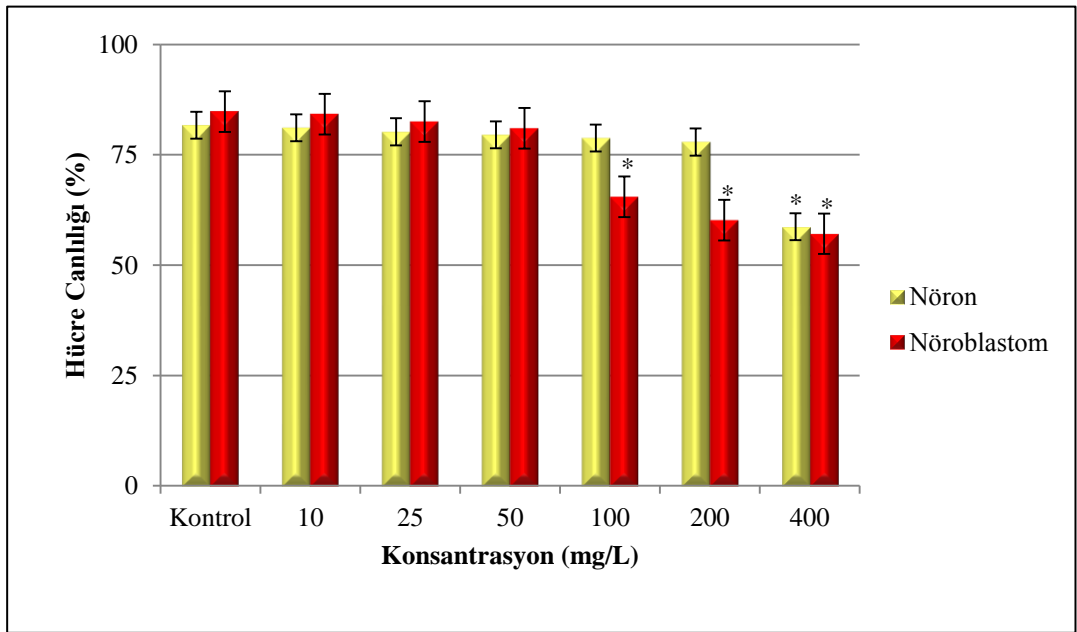
Şekil 4.23. Karvon maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



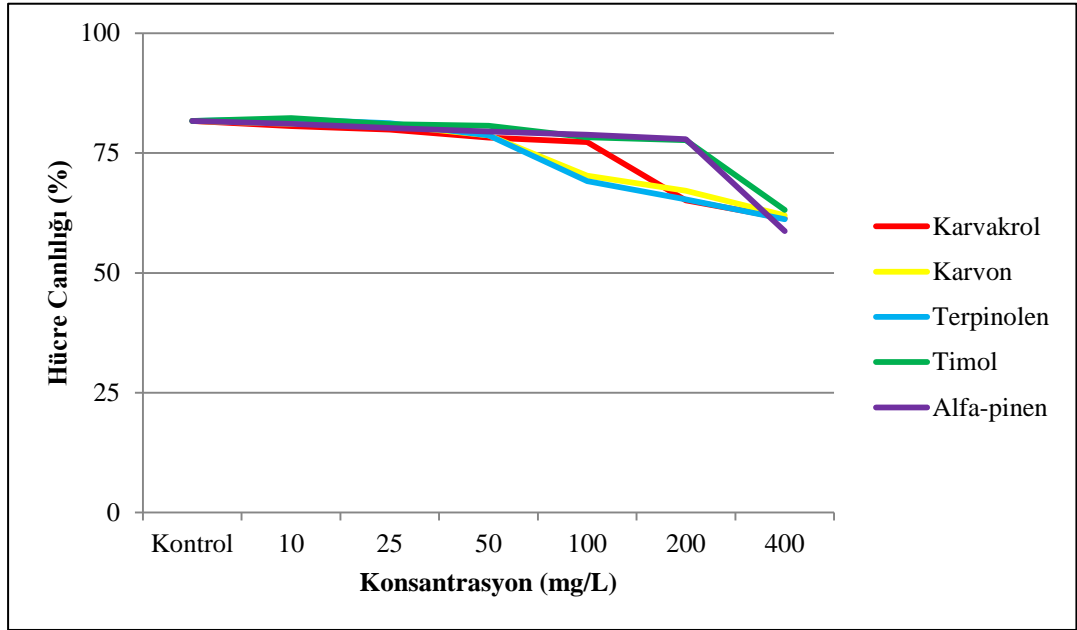
Şekil 4.24. Terpinolen maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



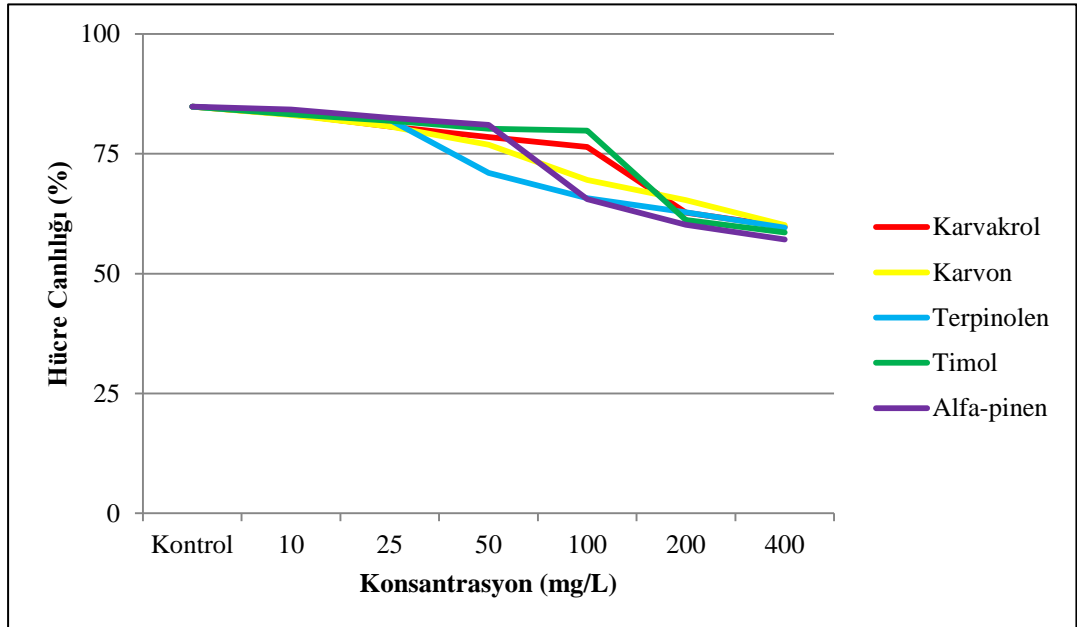
Şekil 4.25. Timol maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



Şekil 4.26. α -Pinen maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



Şekil 4.27. Sağlıklı nöron hücrelerinde test edilen tüm monoterpenerin maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri (karşılaştırmalı)



Şekil 4.28. N2a nöroblastoma hücrelerinde test edilen tüm monoterpenerin maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri (karşılaştırmalı)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sağlığın korunması ve hastalıkların tedavisinde bitkilerin oldukça önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu etkilerin bitkilerin içerdikleri doğal bileşiklerin biyolojik aktivitelerine bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Nitekim bitkilerde yer alan çeşitli doğal bileşiklerin anti-iskemik (Rump *et al.* 1995), antitrombosit (Tzeng *et al.* 1991), antiinflamatuvar (Ferrandiz and Alcaraz 1991), antikonvülzan (De Sousa *et al.* 2006), antinosiseptif (Do Amaral *et al.* 2007) ve antilipoperoksidant (Terao *et al.* 1994) aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, söz konusu bileşikler 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz, monooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi oksidasyon sistemleri ile ilgili pek çok enzimin aktivitelerini inhibe edebilmektedir (Laughton *et al.* 1991; Siess *et al.* 1995; Cotellet *et al.* 1996). Bu biyolojik etkiler farklı kimyasal gruplara ait doğal bileşiklerin antioksidatif özellikleri ile yakından ilişkilidir (Bors *et al.* 1990; Rice-Evans *et al.* 1995).

Doğal bitki bileşiklerinin en büyük grubunu oluşturan ve 30,000 den fazla çeşidinin bulunduğu tespit edilen terpenlerin %43'lük bir kısmını monoterpenlerin oluşturduğu bilinmektedir (Sacchetti and Poulter 1997; Stahl-Biskup and Saez 2002). Youdim *et al.* (2002) monoterpen yapısına sahip olan pek çok doğal bileşiğin antioksidan etkiye sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Bitki içeriklerindeki doğal bileşikler farklı mekanizmalar aracılığıyla [(I) serbest radikal oluşumu ile ilgili enzimleri inhibe etme, (II) metal iyonlarına bağlanma, (III) lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri giderme] antioksidan aktiviteler sergileyebilirler (Ben Sghaier *et al.* 2011). Mevcut tez kapsamında yürütülen biyokimyasal araştırmalar (TAK analizleri) sonucunda test edilen monoterpenler antioksidan etkinlikleri bakımından terpinolen>timol> α -pinen>karvakrol>karvon şeklinde sıralanmıştır. Test edilen bileşiklerden terpinolen ve timolün 10, 25 ve 50 mg/L; α -pinenin 10 ve 25 mg/L; karvakrolün sadece 10 mg/L ve karvonun ise sadece 25 mg/L konsantrasyonları ile muamele edilen sağlıklı nöron hücre kültürlerinde TAK düzeylerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Ayrıca tez kapsamında test edilen farklı monoterpen bileşiklerinin doza ve hücre tipine bağlı olarak sağlıklı nöron ve nöroblastoma hücre kültürlerinde TAK düzeyini etkileyebildiği ilk kez ortaya

konmuştur. Bulgularımız bu konuda literatürde kayıtlı olan sınırlı sayıdaki araştırmalara ait bulgular ile paralellik göstermektedir. Nitekim Tunus *Nigella sativa* L. bitkisinden izole edilen ve bir tepinolen türevi olan terpinolen epoksinin normal insan deri fibroblast (WS1) hücreleri üzerinde güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu 2',7'-diklorofloresken diasetat ve ORAC yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir (Bourgou *et al.* 2012). Terpinolenin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada, terpinolenin DPPH serbest radikallerinin salınımını azaltarak güçlü antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Choi *et al.* 2000). Ündeğer vd (2009) tarafından yürütülmüş olan bir çalışmada timol ve karvakrolün düşük konsantrasyonlarının (1, 2.5, 5, 10 ve 15 µM) V79 Çin hamsteri akciğer fibroblast hücreleri üzerinde güçlü antioksidan etki sergilediği TEAC yöntemi ile tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada timolün artan konsantrasyona bağlı olarak hem peroksi hem de hidroksi radikal temizleme kapasitelerini arttırdığı kaydedilirken aynı zamanda timolün TBA yöntemi kullanılarak insan hepatoma hücrelerinde membran lipid peroksidasyonunu önlediği rapor edilmiştir (Phi *et al.* 2012). DPPH yöntemi kullanılarak timol ve karvakrol bileşiklerinin doza bağlı olarak antioksidan etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur (Mastelic *et al.* 2008). Benzer şekilde karvakrolün oksidatif etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada toplam radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP) ve toplam antioksidan reaktivitesi (TAR) yöntemlerinin ölçümleri sonucunda karvakrolün güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu kaydedilmiştir (Guimares *et al.* 2010). *Mentha spicata* (Fam. Lamiaceae) bitkisinden izole edilen bir karvon türevi olan S-karvonun DPPH yöntemi kullanılarak doza bağlı olarak güçlü antioksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Elmastaş *et al.* 2006). Yine *Carum carvi* bitkisinden izole edilen karvonun zamana bağlı olarak ve antioksidan aktivite göstererek DPPH radikallerinin seviyesini azalttığı rapor edilmiştir (Samojlik 2010). Youdim *et al.* (2002) tarafından yapılan bir çalışmada *Thymus zygis* bitkisinden izole edilen timol, karvakrol ve α-pinenin sırasıyla timol>karvakrol>α-pinen şeklinde antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Faydalı biyolojik etkilerinin tanımlanmasının yanısıra monoterpen bileşiklerinin organizmaya alınan miktarına, türüne ve alınma süresine bağlı olarak olumsuz etkileri de bulunabilmektedir. Literatürde kayıtlı pek çok araştırma sonucunda monoterpen

maruziyetine bağlı olarak deney hayvanlarında hepatotoksisite (Gordon *et al.* 1982), nefrotoksisite (Lehman *et al.* 1989), embriyofoetotoksisite (Araujo *et al.* 1996), akciğer toksisitesi (Thorup *et al.* 1983) ve nörotoksisite (Millet *et al.* 1981; Hiroi *et al.* 1995; Höld *et al.* 2000) rapor edilmiştir. Mevcut tezde, bileşiklerin yüksek konsantrasyonları ile muamele edilen hücre kültürlerinde kontrol gruplarına kıyasla TOD düzeylerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Nitekim sağlıklı nöron kültürlerinde 100 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen karvon, terpinolen ve timol; 200 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen α -pinen ile sadece 400 mg/L konsantrasyonda eklenen karvakrol pro-oksidan etki göstermiştir. N2a hücre hattında ise 50 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen terpinolen; 100 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen karvon, timol ve α -pinen ile 200 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen karvakrol pro-oksidan etki göstermiştir. Bulgularımız test edilen monoterpen bileşiklerinin pro-oksidan etkilerinin uygulama dozuna ve uygulanan hücre tipine bağlı olarak değiştiiğini ve genellikle yüksek konsantrasyonlarında gözlenen nörotoksisitenin oluşmasında oksidatif stresin önemli rol üstlendiğini ilk kez ortaya koymaktadır. Bulgularımızı destekler nitelikte monoterpen bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarının primer sıçan hepatositlerinde toplam glutatyon (TGSH) seviyelerini azaltarak ve LDH üretimini arttırarak nörotoksisiteye yol açtıkları kaydedilmiştir (Lima *et al.* 2004).

Monoterpenler güvenilirlik açısından kabul edilebilir sınırların içerisinde olmasına rağmen, monoterpenoid yapıdaki bileşikleri içeren bazı bitki ekstraktlarının ve bu bitkilerden izole edilen bazı monoterpenlerin çeşitli test sistemlerinde genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (Nishida *et al.* 2005; Azirak ve Rencuzoğulları 2008; De Sant'anna *et al.* 2009). Tez kapsamında test bileşikleri olarak belirlenmiş olan karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen monoterpenlerinin genotoksisite potansiyelleri farklı nöron hücre kültürlerinde SCGE testi kullanılarak değerlendirilmiştir. SCGE tekniği ile tek zincir kırıklarının tespiti mümkün olduğu gibi nötral comet tekniği ile de çift zincir kırıklarının tespiti mümkün olmaktadır. Ayrıca, tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini de gösteren bu teknik hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle genotoksisite tayininde hemen hemen tüm hücrelerde DNA hasarı direkt olarak

belirlenebilmektedir (Aksoy vd 2008). Değerlendirilen monoterpen bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinin bulunduğu ancak mutajenite potansiyellerinin bulunmadığı ilk kez ortaya konmuştur. Nitekim monoterpen dozlarının ilave edildiği normal ve kanserli beyin hücrelerinde hesaplanan toplam hasar puanı değerleri ile kontrol grubundan elde edilen değerler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Bulgularımızı destekler nitelikte, D-Galaktozamin (D-GaIN) maruziyeti sonucu DNA hasarı oluşmuş erkek albino Wistar sıçanlarının hepatosit ve lenfosit hücreleri üzerine karvakrolün genoprotektif etki potansiyeli Comet yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda karvakrolün kontrol gruplarında (D-GaIN'e maruz kalmayan) DNA hasarına neden olmadığı ve karvakrol ilavesinin D-GaIN'in yaptığı DNA hasarını önemli oranda azalttığı gözlenmiştir (Aristatile *et al.* 2011). Liu *et al.* (2012) Beş farklı *Salmonella typhimurium* suşu üzerinde ve Chinese Hamster akciğer hücreleri üzerinde sikizonepetin monoterpeninin genotoksik potansiyelini değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda sikizonepetinin uygulanan tüm konsantrasyonlarının Ames testi kullanılarak DNA hasarı yapmadığı ve KA'ya neden olmadığı rapor edilmiştir. Gomes-Carneiro *et al.* 1998 Salmonella/mikrozom yöntemini kullanarak 6 farklı monoterpenoid yapıdaki bileşiğin (kafur, 1,-8-sineol, sitral, sitronellal, mentol ve terpineol) DNA hasarı oluşturma potansiyelini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda terpineol dışındaki monoterpenlerin mutajenik olmadığı, ancak terpineolün yüksek konsantrasyonlarda mutajenik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Yine monoterpen yapısındaki β -myrcene, α -terpinen ve α -pinenin mutajenite potansiyeli Salmonella/mikrozom yöntemi ile incelenmiş ve mutajenik etkili olmadıkları gösterilmiştir (Gomes-Carneiro *et al.* 2005). Lopez *et al.* (2011) Lippia alba bitkisinden izole ettikleri sitral, karvon ve limonen monoterpenlerinin genotoksisite ve antigenotoksisite etkilerini Escherichia coli üzerinde SOS kromotest yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda bu monoterpenlerin genotoksik olmadığını ancak limonenin yüksek konsantrasyonlarda genotoksik olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca bakteri hücrelerini bleomisinindüklediği genotoksisiteye karşı koruduklarını tespit etmişlerdir. *In vitro* olarak yürütülen bir çalışmada *Thymus* cinsine ait fenollerden olan karvakrol ve timolün insan akut miyelositik lösemi (K562) hücrelerinde güçlü oksidan olan H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını önemli derecede azalttığı Comet tekniği ile tespit edilmiştir (Horvathova *et al.* 2007).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların aksine, sıçanların kemik iliği üzerine karvakrol ve timolün genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada her iki bileşiğin de yüksek dozlarda hem yapısal hem de toplam KA frekansını indükleyerek genotoksik potansiyele sahip olduğu kaydedilmiştir (Azirak ve Rencuzoğulları 2008). Yine timolün genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde KA, MÇ ve KKD yöntemleri ile araştırılmıştır. Genetik analizler sonucunda timolün doza bağlı olarak genotoksisiteye yol açtığı tespit edilmiştir (Büyükleyla ve Rencuzoğulları 2009). Cotanzaro *et al.* (2012) α -pinenin sitogenetik etkilerini KA ve SCGE yöntemlerini kullanarak V79 Chinese hamster hücreleri üzerinde değerlendirmişlerdir. Çalışma bulguları, α -pinenin artan konsantrasyonu ile birlikte kromozom kırıklarında ve DNA hasarında artışa neden olduğu ortaya konmuştur. Bisiklik bir monoterpren olan yapısında olan 4-thujanolün insan lenfositlerinde uygulanan tüm konsantrasyonlarının (13, 26 ve 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$) MÇ ve KA oluşumunu indüklediği ancak KKD frekansında istatistiksel açıdan önemli bir değişime neden olmadığı rapor edilmiştir (Kocaman *et al.* 2011). Pek çok tıbbi ve aromatik bitkinin esansiyel yağında yaygın olarak bulunan kafur, ökaliptol ve thujon monoterprenlerinin genotoksik etkilerinin alkali comet yöntemi ile incelendiği bir başka çalışmada, test bileşiklerinin düşük konsantrasyonlarda önemli bir etki yapmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda DNA kırıklarının oluşmasını indükleyerek genotoksisiteye neden oldukları kaydedilmiştir (Nikolic *et al.* 2011).

Mevcut tezde sağlıklı nöron ve N2a nöroblastomalı hücre kültürlerinde monoterpren maruziyeti sonrasında canlılığın belirlenmesi amacıyla MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlamakta olup sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Nilay 2009). Tez kapsamında test edilen beş farklı monoterpren bileşiğinin sitotoksik etkileri hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Üstelik bu bileşiklerin sağlıklı nöron hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etki potansiyeli ilk kez bu tez ile ele alınmıştır. MTT analiz sonuçlarımız karvon ve terpinolen (>100 mg/L), timol ve α -pinen (>400 mg/L) ile karvakrol (>200 mg/L) monoterprenlerinin yüksek konsantrasyonlarının sağlıklı nöronlarda sitotoksik etkili olduğunu ortaya

koymuştur. Bu doz seviyelerinde TOD düzeylerinin de yükselmiş olması ilgili bileşiklerin sitotoksitesinde oksidatif stresin oldukça etkili olduğunu işaret etmektedir. Oksidatif stresin yanı sıra, önceki raporlarda bitkilerdeki doğal bileşikler tarafından ortaya konan sitotoksitenin (I) proteozom inhibisyonu, (II) yağ asit sentezi inhibisyonu, (III) topoizomeraz inhibisyonu, (IV) fosfatidil-inozitol 3-kinaz inhibisyonu, (V) hücre siklusunun engellenmesi, (VI) p53 birikimi, (VII) c-fos ve c-myc ekspresyonlarının artışı gibi farklı mekanizmalar aracılığı ile de gerçekleşebileceği kaydedilmiştir (Constantinou *et al.* 1995; Lepley *et al.* 1996; Plaumann *et al.* 1996; Agullo *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998; Kazi *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Brusselmans *et al.* 2005). Karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen bileşiklerinin sitotoksitesinin tam olarak anlaşılabilmesi söz konusu mekanizmaların *in vitro* veya *in vivo* model sistemlerde detaylı olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Zira karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen sitotoksitesinin çoklu mekanizmalar ile araştırılması, bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerinin ortaya çıkarılmasına ve bu yolla da kanser tedavisinde etkin adaylar olarak kullanılabilmelerine olanak sağlayacaktır.

In vivo ve/veya *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olan önceki araştırmalarda vallesiachotamin (Soares *et al.* 2012), geraniol (Kim *et al.* 2012), sitolosin (Rassouli *et al.* 2011), terpinen-4-ol (Wu *et al.* 2012), peril alkol (Boon *et al.* 2000; Garcia *et al.* 2010), linalool (Ravizza *et al.* 2008), vinblastin ve vinkristin (Voss *et al.* 2009), kamfotetisin (Lorence and Nessler 2004), myrtenol ve nerol (Yamamoto *et al.* 2008), echitamin (Jagetia *et al.* 2005), thujon (Siveen and Kuttan 2011) ve limonen (Haag *et al.* 1992) gibi monoterpen yapısındaki doğal bileşiklerin antikanser aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Mevcut tezde MTT testi kullanılarak söz konusu monoterpen bileşiklerinin N2a nöroblastoma hücre kültürleri üzerindeki antikanser aktivitelerinin varlığı incelenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri ayrıca sağlıklı nöron kültürleri üzerinde de araştırılmıştır. Tez kapsamında yürütülen araştırmalar sonucunda antikanser etkileri bakımından terpinolen>karvon> α -pinen>karvakrol>timol şeklinde sıralanmıştır.

Tez kapsamında elde edilen önemli ve orijinal bulgulardan biri de terpinolen, timol ve α -pinen bileşiklerinin N2a kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere oranla daha düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu etkilemesidir. Diğer bir ifade ile karvakrol ve karvon her iki hücre kültüründe aynı konsantrasyonlarda sitotoksositeye yol açarken terpinolen (50 mg/L), timol (200 mg/L) ve α -pinen (100 mg/L) daha düşük konsantrasyonlarda kanser hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu tespit edildi. Ayrıca bu bileşiklerin nöron kanser hücre hatlarında etkili antikanserojenler olarak kullanılabilmesi ilk kez rapor edildi. Bulgularımıza benzer şekilde karvakrolün antikanser potansiyeli insan hepatosellüler karsinom hücreleri üzerinde MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 24 saatlik MTT analizinde karvakrolün artan konsantrasyona bağlı olarak apoptosizi indüklediği ve hücre büyümesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (Yin *et al.* 2012). *Malalencia alternifolia* bitkisinden izole edilen terpinolenin meme ve servikal kanserine karşı güçlü antikanserojen etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kim *et al.* 2004). Satooka and Kubo (2012) melanoma hücreleri üzerine timolün antikanser aktivitesinin MTT yöntemini kullanarak değerlendirmişlerdir. Değerlendirme bulguları timolün doza bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığı ve 1200 μ M'lık konsantrasyonda ise hücre büyümesini tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında test edilen söz konusu monoterpenlerin sitoprotektif antikanser etkilerini sitokrom P-450 enzim sistemini inhibe ederek ya da enzimlerin izoformlarını uyararak sergilediği ve bu yolla endojen kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu azaltmış olabileceği teklif edilmiştir. İlaveten tirozin kinaz ve siklin bağımlı kinazlar ile etkileşimi, apoptozun teşviki ve mutant p53 seviyesinin düzenlenmesi gibi biyolojik etkilerin kombinasyonlarında bu bileşiklerin antiproliferatif aktivitelerine katkı sağlayabileceği kaydedilmiştir (Jirtle *et al.* 1993; Gould 1995; Ravizza *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010; Farazuddin *et al.* 2012). Bu bulguyu destekler nitelikte Arunasree (2010) metastazik meme kanserine karşı karvakrolün konsantrasyona bağlı olarak kaspaz aktivasyonunu artırması ve mitokondrilerden sitokrom c'lerin salınımı sonucunda hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasıyla apoptosizi indüklediği rapor edilmiştir. Yine, Okumura *et al.* (2012) yaptıkları çalışmalarında terpinolenin insan akut miyelositik lösemi (K562) hücrelerinde protein kinaz B ekspresyonu azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) bitkisinden

izole edilen α -pinenin insan melanoma hücrelerinde mitokondriyal potansiyeli bozarak, ROT üretimine yol açarak ve kaspaz-3 aktivitesini arttırarak apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (Matsuo *et al.* 2011).

Mevcut tezde farklı kimyasal yapılara sahip beş farklı (karvakrol, karvon, terpinolen, timol ve α -pinen) monoterpen bileşiğinin pro-oksidan, antioksidan, genotoksisite ve sitotoksisite potansiyelleri sırasıyla TOD, TAK, SCGE ve MTT testleri ile değerlendirildi. Elde edilen bulgular düşük konsantrasyonlarda başta terpinolen olmak üzere timol, α -pinen, karvakrol ve karvonun antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduklarını ortaya koydu. Test edilen tüm bileşiklerin genotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edildi. Başta terpinolen olmak üzere çalışılan tüm bileşikler nöroblastoma hücrelerine karşı orta ve zayıf dereceli antikanser aktivite gösterdi. Sonuç olarak, nöroblastoma hücrelerinde çalışılan tüm monoterpenler yüksek nörotoksik etkili olmamasına rağmen önemli derecede sitotoksik aktivite göstermiştir. Bu nedenle söz konusu bileşiklerin bir antikanser ajan olarak beyin kanserlerinin tedavi potansiyeline sahip olduklarını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam A., Emmami B., Fooladian F. and Zafarlet K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 135, 331-336.
- Abdollahi, M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S. and Rezaie A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10, 141-147.
- Aeschbach, R., Löliger J., Scott B.C., Murcia A., Butler J., Halliwell B. and Aruoma O.I., 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32 (1), 31-36.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H. and Payraastre B., 1997. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 53 (11), 1649-1657.
- Ahmad, A., Khan A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A. and Manzoor N., 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30 (1) 41-50.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, Türkiye.
- Aksoy, H., Yılmaz S., Çelik M., Yüzbaşıoğlu D. ve Ünal F., 2008. Moniliformin mikotoksininin *in vitro* genotoksik etkileri, SAÜ Fen Edebiyat Dergisi.
- Akşit, H. ve Bildik A., 2008. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19 (1), 55-63.
- Akyol, Ö., 1994. Beyin Tümörlerinde Doku Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Alam, Z.I., Halliwell B. and Jenner P., 2000. No evidence for increased oxidative damage to lipids, proteins, or DNA in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 75, 840-846.
- Alp, H.H., 2005. Hiper ve Hipotroidili Hastalarda Homosistein S-Adenozilmetiyonin ve Antioksidan Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Altman, R. and Sarg M.J., 1992. The cancer dictionary. Facts on File, New York.
- Ames, B.N. and Gold L.S., 1992. Animal cancer tests and cancer prevention. National Cancer Institute Monograph, 12, 125-132.
- Andreeff, M., Goodrich D.W. and Pardee A.B., 2000. Cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cancer Medicine*, e.5, R. C. Bast (Ed.), B. C. Decker Inc., London, UK, 17-19, 24-26.
- Anonymus, 1993. Harper'in Biyokimyası. Murray K.R., Granner K.D., Mayes P.A. and Rodwell V.W. Çevirenler Menteş G. ve Ersöz B. Barış Kitabevi, İstanbul.
- Araujo, I.B., Souza C.A., De-Carvalho R.R., Kuriyama S.N., Rodrigues R.P., Vollmer R.S., Alves E.N. and Paumgarten F.J., 1996. Study of the embryofetotoxicity of alpha-terpinene in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 34 (5), 477-482.

- Archana, P.R., Nageshwar Rao B., Ballal M. and Satish Rao B.S., 2009. Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 680 (1-2), 70-77.
- Archana, P.R., Nageshwar Rao B. and Satish Rao B.S., 2011. *In vivo* radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Mutation Research*, 726 (2), 136-145.
- Aristatile, B., Al-Numair K.S., Al-Assaf A.H., Veeramani C. and Viswanathan P.K., 2010. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, (DOI: 10.1002/jbt.20355).
- Aristatile, B., Al-Numair K.S., Al-Assaf A.H. and Pugalendi K.V., 2011. Pharmacological effect of carvacrol on D:-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Natural Medicines*, 65, 568-577.
- Arunasree, K.M., 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17 (8-9),581-588.
- Astley, S.B., Elliott R.M., Archer D.B. and Southon S., 2002. Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge. *Nutrition and Cancer*, 43 (2), 202-213.
- Atmaca, G., 2003. Sarımsağın ve bazı tiol içeren bazı bileşiklerin antioksidatif etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20 (1-3), 54-60.
- Aycicek, A., Iscan A., Erel O., Akcali M. ve Selek S., 2006. Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatric Neurology (Chippewa Falls, WI)*, 35 (6), 382-386.
- Aydın, G.B. 2006. Nöroblastom: Klinik Özellikler ve Tedavi Sonuçları. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- Aydilek, N. ve Aksakal M., 2003. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14 (2), 22-25.
- Azirak, S. ve Rencuzogullari E., 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23 (6), 728-735.
- Azzi, A., Ricciarelli R. and Zingg J.M., 2002. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Letters*, 519, 8-10.
- Bae, G.S., Park K.C., Choi S.B., Jo I.J., Choi M.O., Hong S.H., Song K., Song H.J. and Park S.J., 2012. Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis. *Life Science*, 91 (17-18), 866-871.
- Bahçeci, Z., 2002. Moleküler Biyoloji. Öğrenci Kitabevi, Kırşehir.
- Bairoch, A., 2000. The enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28, 304-305.
- Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446-475.
- Baloğlu, E., 2001. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs. Doktor of philosophy in chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Baser, K.H., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14 (29), 3106-3119.
- Başaran, A., 1999. Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı, Bursa Nobel&Güneş Tıp Kitap Evi, Bursa.

- Başaran, N., 2003. Tıbbi Genetik Ders Kitabı, Nobel&Güneş Tıp Kitap Evi, Bursa.
- Başer, K.H.C. ve Demirci F., 2007. What is an essential oil? : Chemistry of essential oil. Springer Berlin Heidelberg, Newyork, 4, 42-67.
- Baysal, T. and Starmans D.A.J., 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed. *Journal of Supercritical Fluids*, 14 (3), 225-234.
- Beckman, K.B. and Ames B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19633-19636.
- Ben Sghaier, M., Skandrani I., Nasr N., Franca M.G., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K., 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32 (3), 336-348.
- Benzie, I.F. and Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* (New York, NY), 239, 70-76.
- Bera, D., Lahiri D. and Nag A., 2009. Novel natural antioxidant for stabilization of edible oil: the ajowan (*Carum copticum*) extract case. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 81 (2), 169-172.
- Berridge, M.V., Herst P.M. and Tan A.S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Bicas, J.L., Neri-Numa I.A., Ruiz A.L., De Carvalho J.E. and Pastore G.M., 2011. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (7), 1610-1615.
- Boligon, A.A., Schwanz T.G., Piana M., Bandeira R.V., Frohlich J.K., Brum T.F., Zadra M. and Athayde M.L., 2012. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. leaves. *Natural Product Research*, (in press) (DOI: 10.1080/14786419.2011.653971).
- Boon, P.J.M., Van der Boon D. and Mulder G.J., 2000. Cytotoxicity and biotransformation of the anticancer drug perillyl alcohol in PC12 cells and in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 167 (1), 55-62.
- Bors, W., Hellers W., Michel C. and Saran M., 1990. Radical chemistry of flavonoids antioxidant. in: emerit (ed.), antioxidants in therapy and preventive medicine. Plenum Press, 1, 165-170.
- Bourgou, S., Pichette A., Lavoie S., Marzouk B. and Legault J., 2012. Terpenoids isolated from Tunisian *Nigella sativa* L. essential oil with antioxidant activity and the ability to inhibit nitric oxide production. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 69-74.
- Boyacıoğlu, M., 2004. İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21 (1-2), 23-27.
- Braginskaia, F.I., Zorina O.M., Molochkina E.M., Nikiforov G.A. and Burlakova E.B., 1992. Synthetic bioantioxidants--inhibitors of acetylcholinesterase activity. *Izvestiia Akademii Nauk SSSR. Serii Biologicheskaya*, 5, 690-698.
- Brauss, M.S., Linforth R.S.T., Cayeux I., Harvey B. and Taylor A.J., 1999. Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5), 2055-2059.

- Brusselmans, K., Vrolix R., Verhoeven G. and Swinnen J.V., 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (7), 5636-5645.
- Bukowska, B. and Kowalska, S., 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters (Amsterdam)*, 152 (1), 73-84.
- Bunin, G.R., Ward E., Kramer S., Rhee C.A. and Meadows A.T., 1990. Neuroblastoma and parental occupation. *American Journal of Epidemiology*, 131, 776-780.
- Burak, M. ve Çimen Y., 1999. Flavonoids and their antioxidant properties. *Journal of Medical Sciences*, 19 (5), 296-304.
- Burdock, G.A., 1995a. Fenaroli's Handbook of Flavor In- Kubo I. (1992). Antimicrobial terpenes from oleoresgredients: Adapted from the Italian Language Works ins of Ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A deof Giovanni Fenaroli. 3rd Edition, CRC Press, Boca fense mechanism against microbial invasion.
- Burdock, G.A., 1995b. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 3rd Edition. FL: CRC Press, Boca Raton.
- Burlakova, E.B., Krashakov, S.A. and Khrapova, N.G., 1998. The role of tocopherol in biomembrane lipid peroxidation. *Membrane and Cell Biology*, 12, 173-211.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253.
- Buyukleyla, M. ve Rencuzogullari E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (3), 943-947.
- Cabadak, H., 2008. Hücre siklusu ve kanser. *Adü Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51-61.
- Candan, S., 2002. Nikel ve Oksidatif Stres. *Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya anabilim Dalı, Ankara*.
- Carlsen, N.L., 1992. Neuroblastoma: epidemiology and pattern of regression. *Problems in interpreting results of mass screening. The American Journal of Pediatric Hematology/oncology*, 4 (2), 103-110.
- Carrona, A.V. and Natarajan A.T., 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Catani, M.V., Savini I., Rossi A., Melino G. and Avigliano L., 2005. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutrition Reviews*, 63 (3), 81-90.
- Catanzaro, I., Caradonna F., Barbata G., Saverini M., Mauro M. and Sciandrello G., 2012. Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. *Mutagenesis*, (in press) (DOI: 10.1093/mutage/ges005).
- Ceylan, E., Gulsun A., Gencer M. ve Aksoy N., 2005. A new parameter in the detection of tuberculosis activitiy: reactive oxygen metabolites. *Respiration*, 72 (2), 156-159.
- Chen, Z.P., Schell J.B., Ho C.T. and Chen K.Y., 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters*, 129 (2), 173-179.
- Chen, D., Daniel K.G., Chen M.S., Kuhn D.J., Landis-Piowowar K.R. and Dou Q.P., 2005. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 69 (10), 1421-1432.
- Chen, J., Lu M., Jing Y. and Dong J., 2006. The synthesis of L-carvone and limonene derivatives with increasedantiproliferative effect and activation of ERK pathway

- in prostate cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14 (19), 6539-6547.
- Chen, F., Shi Z., Neoh K.G. and Kang E.T., 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 104 (1), 30-39.
- Chen, Z., Jin K., Gao L., Lou G., Jin Y., Yu Y. and Lou Y., 2010. Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line. *European Journal of Pharmacology*, 643 (2-3), 170-179.
- Choi, H.S., Song H.S., Ukeda H. and Sawamura M., 2000. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 4156-4161.
- Christmann, M., Tomicic M.T., Ross W.P. and Kaina B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193, 3-34.
- Chu, G., 1997. Double strand break repair. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24097-24100.
- Cingöz, A., 2013. Nöroblastoma Tümör Hücrelerine Karşı Adipoz Doku Kaynaklı İnsan Kök Hücrelerinin Apoptoz Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Collins, A.R., Gedik C.M., Olmedilla B., Southon S. and Bellizzi M., 1998. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB Journal*, 12, 1397-1400.
- Constantinou, A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A. and Moon R., 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 58 (2), 217-225.
- Conti, B., Benelli G., Flamini G., Cioni P.L., Profeti R., Ceccarini L., Macchia M. and Canale A., 2012. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 110 (5), 2013-2021.
- Cooke, M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. and Lunec J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, 17 (10), 1195-214.
- Corchnoy, S.B. and Atkinson R., 1990. Kinetics of the gas-phase reactions of OH and NO₃ radicals with 2-carene, 1,8-cineole, p-cymene, and terpinolene. *Environmental Science and Technology*, 24 (10), 1497-1502.
- Costa, V. and Moradas-Ferreira P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217-246.
- Cotelle, N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. and Gaydou E.M., 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (1), 35-43.
- Cotran, R.S., Kumar V. and Collins T., 1999. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6. Edition, W. B. Saunders Company, USA, 4, 330.
- Cross, C.E., Halliwell B., Borish E.T., Pryor W.A., Ames B.N., Saul R.L., McCord J.M. and Harman D., 1987. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.

- Çavdar, C., Sifil A. ve Çamsarı T., 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türkiye Klinikleri Journal of Nephrology*, 3-4, 92-95.
- Çetin, H., Cilek J.E., Oz E., Aydın L., Deveci O. ve Yanıkoglu A., 2010. Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and gamma-terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 170 (3-4), 287-290.
- Çolakoğlu, N., Ozan, E., Sönmez, M. F., Yılmaz, S. ve Ozan, G., 2005. Sigaranın karaciğerde oluşturduğu yapısal değişiklikler üzerine melatonin ve C vitamininin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 10 (3), 108-112.
- Dagli Gul, A.S., Fadillioğlu E., Karabulut I., Yesilyurt A. ve Delibasi T., 2013. The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*, 5 (4).
- Dalay, N., 2003. Onkogenler ve tümör supresör genler. *Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri*, XV. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya.
- Dar, M.Y., Shah W.A., Rather M.A., Qurishi Y., Hamid A. and Qurishi M.A., 2011. Chemical composition, *in vitro* cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chemistry*, 129, 1606-1611.
- Davies, D.D., Giovanelli J. and Ap Rees T., 1964. *Plant Biochemistry*. Blackwell, p 309, Oxford.
- De Sant'anna, J.R., Da Silva Franco C.C., Miyamoto C.T., Cunico M.M., Miguel O.G., Cocco L.C., Yamamoto C.I., Junior C.C. and De Castro-Prado A.A., 2009. Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phytotherapy Research*, 23 (2), 231-235.
- De Sousa, D.P., Gonçalves J.C., Quintans-Júnior L., Cruz J.S., Araújo D.A. and de Almeida R.N., 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neuroscience Letters*, 401 (3), 231-235.
- Deb, D.D., Parimala G., Saravana D.S. and Chakraborty T., 2011. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-Biological Interactions*, 193 (1), 97-106.
- Demirçakmak, B., 1994. *Cedrus libani* Uçucu Yağının Bileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Demiroğlu, C., 2003. Ereğli Demir-Çelik Fabrikası Kok Fırını İşçilerinde Genotoksik Hasarın Mikroçekirdek ve Kromozomal Aberasyon Teknikleri ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- De-Oliveira, A.C., Ribeiro-Pinto L.F. and Paumgarten J.R., 1997. *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpene compounds. *Toxicology Letters*, 92 (1), 39-46.
- Devasagayam, T.P., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S. and Lele R.D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*, 52, 794-804.
- Diplock, A.T., 2000. Introduction: markers of oxidative damage and antioxidant modulation. *Free Radical Research*, 33, 21-26.
- Dizdaroglu, M., Jaruga P., Birincioglu M. ve Rodriguez H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 1102-1115.

- Do Amaral, J.F., Silva M.I., Neto M.R., Neto P.F., Moura B.A., de Melo C.T., de Araujo F.L., de Sousa D.P., de Vasconcelos P.F., de Vasconcelos S.M. and de Sousa F.C., 2007. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30 (7), 1217-1220.
- Dorman, H.J.D., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Deans S.G., 2000. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 15 (1), 12-16.
- Eken, A., 2003. Hiberbarik oksijen tedavisi, oksidatif stres ve genetik toksisite arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- El Bouzidi, L., Abbad A., Hassani L, Fattarsi K., Leach D., Markouk M., Legendre L. and Bekkouche K., 2012. Essential oil composition and antimicrobial activity of wild and cultivated moroccan *Achillea ageratum* L.: a rare and threatened medicinal species. *Chemistry and Biodiversity*, 9 (3), 598-605.
- Elmastas, M., Dermirtas I., Isildak O. ve Aboul-Enein H.Y., 2006. antioxidant activity of s-carvone isolated from spearmint (*Mentha Spicata* L. Fam Lamiaceae). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29 (10), 1465-1475.
- Emri, G., Wenczl E., Van Erp P., Jans J., Roza L., Horkay I. and Schothorst A.A., 2000. Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 115 (3), 435-440.
- Engin, A. ve Altan N., 2000. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia*, 30 (2), 91-96.
- Engin, K. ve Özyardımcı N., 2001. Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, Bölüm 3, Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Türkiye.
- Engin, A., Bozkurt B.S., Altan N., Memiş L. ve Bukan N., 2003. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery*, 27 (3), 253-255.
- Engin, A., Altan N. ve Işık E., 2005. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs in R and D*, 6 (1), 35-40.
- Er, S., 2010. *Camellia sinensis* (Çay) Ekstrelerinin *In Vitro* Antioksidan, Yara İyileştirici ve U2OS Osteosarkom Hücrelerinde Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (2), 112-119.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (4), 277-285.
- Esiashvili, N., Goodman M., Ward K., Marcus R.B. Jr. and Johnstone P.A., 2007. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer*, 49, 41-46.
- Evans, P.H., 1993. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin*, 49 (3), 577-587.
- Evans, M.D., Dizdaroğlu M. and Cooke M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567, 1-61.

- Fairbain, D.W., Olive P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Farazuddin, M., Sharma B., Khan A.A., Joshi B. and Owais M., 2012. Anticancer efficacy of perillyl alcohol-bearing PLGA microparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 35-47.
- Farooq, A., Choudhary M.I., Rahman A., Tahara S., Başer K.H. and Demirci F., 2002. Detoxification of terpinolene by plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57 (9-10), 863-866.
- Feig, D.I., Reid T.M. and Loeb L.A., 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Research*, 54, 1890-1894.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis blocks micronucleus technique. A detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research*, 285, 35-44.
- Ferrandiz, M. and Alcaraz M.J., 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Actions*, 32 (3-4), 283-288.
- Florkin, M. and Mason H.S., 1962. In "Comparative Biochemistry". Ed., W. Sandermann, Academic Press, 3, p 503, New York, USA.
- Francoeur, A.M. and Assalian A., 1996. Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. *Biochemica*, 3, 19-25.
- Freeman, B. and Crapo J., 1982. Biology of disease; free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, 47 (5), 412-426.
- Freshney, R.I., 2005. Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique, 5th Edition, 359-372p.
- Fukuda, M., Ohkoshi E., Makino M. and Fujimoto Y., 2006. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54 (10), 1465-1468.
- Fusco, D., Colloca G., Lo Monaco M.R. and Cesari M., 2007. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging*, 2 (3), 377-387.
- Gallis, H.E., Van Ekeren P.J., Van Miltenburg J.C. and Oonk H.A.J., 1999. Mixtures of *d*- and *l*-carvone: IV. Transformation from a solid solution to a racemic compound. *Thermochimica Acta*, 326 (1-2), 83-90.
- Gany, Z.S.A. and Mahdi M.F., 2008. Cytotoxic assay of *Nigella sativa* leaf callus extract (thymol) on hep-2 cell line using ELISA assay. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (2), 63-67.
- Garcia, D.G., Amorim L.M., de Castro Faria M.V., Freire A.S., Santelli R.E., Da Fonseca C.O., Quirico-Santos T. and Burth P., 2010. The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345 (1-2), 29-34.
- Girgin, K.F., 1996. Yaşlanmada Monoamin Oksidaz inhibitörlerinin Sıçan Kalp Dokusunda Oksidan Stres ve Antioksidan Sistemlere Etkileri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Giweli, A., Džamić A.M., Soković M., Ristić M.S. and Marin P.D., 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. *Molecules*, 17 (5), 4836-4850.

- Gminski, R., Tang T. and Mersch-Sundermann V., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicology Letters*, 196, 33-41.
- Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb I. and Paumgarten FJ., 1998. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research*, 416 (1-2), 129-136.
- Gomes-Carneiro M.R., Viana M.E., Felzenszwalb I. and Paumgarten F.J., 2005. Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the Salmonella/ Microsome assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 247-252.
- Gonçalves, J.C., Alves A.M., De Araújo A.E., Cruz J.S. and Araújo D.A., 2010. Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. *European Journal of Pharmacology*, 645 (1-3), 108-112.
- Gopalakrishna, P. and Khar A., 1995. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 30 (1), 69-73.
- Gordon, W.P., Forte A.J., Mc Murtry R.J., Gal J. and Nelson S.D., 1982. Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituent terpenes in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65 (3), 413-424.
- Gould, M.N., 1995. Prevention and therapy of mammary cancer by monoterpenes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 22, 139-144.
- Gökmen, S.S., Sunar B., Kazezoğlu C., Özçelik F., Yorulmaz F. ve Gülen Ş., 2004. Akut myokard infarktüsünde inflamasyona duyarlı protein düzeyleri. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29 (4), 256-261.
- Grassmann, J., Hippeli S., Spitzenberger R. and Elstner E.F., 2005. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with alpha-tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine*, 12 (6-7), 416-423.
- Griffiths, J.B. and Doyle A., 1998. Cell and tissue culture. *Laboratory procedures in Biotechnology*, 62-64.
- Guarda, A., Rubilar J.F., Miltz J. and Galotto M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2), 144-150.
- Guenther, E., 1948. *The essential oils*. D. Van Nostrand, New York, USA.
- Guimarães, A.G., Oliveira G.F., Melo M.S., Cavalcanti S.C., Antonioli A.R., Bonjardim L.R., Silva F.A., Santos J.P., Rocha R.F., Moreira J.C., Araújo A.A., Gelain D.P. and Quintans-Júnior L.J., 2010. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 107 (6), 949-957.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan Otuunun Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Oksidatif Enzimlerin Karakterizasyonu ve Bazı *In Vivo* Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Güneş, E.G., 2009. Bir Türk Populasyonunda Beyin Kanseri ve Axin2 Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas.

- Güzey, G., 2007. A549, HeLa ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde *Hypericum perforatum*, *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum origanifolium* Türlerinin Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkileri. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Haag, J.D., Lindstrom M.J. and Gould M.N., 1992. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Research*, 52 (14), 4021-4026.
- Hajhashemi, V., Ghannadi A. and Sharif B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89 (1), 67-71.
- Halle, W., Liebsch M., Traue D. and Spielmann H., 1997. Reduction of the numbers of animals used for the classification of the acute oral toxicity of chemicals by taking account cytotoxicity data from the registry of cytotoxicity. *Altex*, 14, 8-15.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-624.
- Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C., 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications, p22-24.
- Hamilton, M.L., Van Remmen H., Drake J.A., Yang H., Guo Z.M., Kewitt K., Walter C.A. and Richardson A., 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 10469-10474.
- Harma, M., Harma M. and Erel O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatiform mole. *Swiss Med Wkly.*, 133 (41-42), 563-566.
- Hartmans, K.J., Diepenhorst P., Bakker W. and Gorris L.G.M., 1995. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases *Industrial Crops and Products*, 4 (1), 3-13.
- Hasanoğlu, E., Altan N., Sindel P., Ongun C.Ö., Bali M. ve Altıntaş E., 1994. The relationship between erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma levels of some trace elements (Al,Cu,Zn) of dialysis patients. *General Pharmacology*, 25 (1), 107-110.
- Heck, J.E., Ritz B., Hung R.J., Hashibe M. and Boffetta P., 2009. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 23, 125-143.
- Hiroi, T., Miyazaki Y., Kobayashi Y., Imaoka S. and Funae Y., 1995. Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils. *Xenobiotica*, 25 (5), 457-467.
- Holvoet, P., Perez G. and Zhao Z., 1995. Malonaldehyde-modified low density lipoprotein in patients with atherosclerotic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2611-2619.
- Horoz, M., Bolukbas C., Bolukbas F., Kocyigit A., Aslan M., Koylu A.O., Gumus M., Celik H. ve Koksall M., 2006. Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C

- infection mutation. *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596 (1-2), 137-142.
- Horváth, Gy., Kocsis B., Botz L. and Németh J., Hungarian L.Gy., 2002. Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. Congress on Plant Physiology, S3-P03.
- Horvathova, E., Turcaniova V. and Slamenova D., 2007. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma* 54, 478-483.
- Höld, K.M., Sirisoma N.S., Ikeda T., Narahashi T. and Casida J.E., 2000. Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (8), 3826-3831.
- Hsu, S.S., Lin K.L., Chou C.T., Chiang A.J., Liang W.Z., Chang H.T., Tsai J.Y., Liao W.C., Huang F.D., Huang J.K., Chen I.S., Liu S.I., Kuo C.C. and Jan C.R., 2011. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 670 (1), 85-91.
- Hu, J., Dinh S.Q. and Joyce D.C., 2009. S-carvone effects on *Botrytis cinerea* and harvested waxflower (*Chamelaucium*) New Zealand. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 37 (1), 79-83.
- Inamuco, J., Veenendaal A.K., Burt S.A., Post J.A., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L., Haagsman H.P. and Veldhuizen E.J., 2012. Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 157 (1-2), 200-207.
- Inoue, M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I. and Utsumi K., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 2495-2505.
- Ipek E., Tüylü B.A. ve Zeytinoğlu H., 2003. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43 (1-3), 145-148.
- Ipek, E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M. ve Baser K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93, 551-556.
- Jaafari, A., Tilaoui M., Mouse H.A., Mbark L.A., Aboufatima R., Chait A., Lepoivre M. and Zyad A., 2012. P-815 (murine mastocytoma), K-562 (human chronic myelogenous leukemia), CEM (acute T lymphoblastoid leukemia), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and its counterpart resistant to gemcitabine (MCF-7 gem). *Revista Brasileira de Farmacognosia* (in press) (doi:10.1590/S0102-695X2012005000021).
- Jagetia, G.C., Baliga M.S., Venkatesh P., Ulloor J.N., Mantena S.K., Genebriera J. and Mathuram V., 2005. Evaluation of the cytotoxic effect of the monoterpene indole alkaloid echitamine *in vitro* and in tumour-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57 (9), 1213-1219.
- Jayakumar, S., Madankumar A., Asokkumar S., Raghunandhakumar S., Gokula dhas K., Kamaraj S., Divya M.G. and Devaki T., 2012. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 360 (1-2), 51-60.
- Jirtle, R.L., Haag J.D., Ariazi E.A. and Gould M.N., 1993. Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transforming growth factor

- beta 1 levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. *Cancer Research*, 53 (17), 3849-3852.
- Jo, J.R., Park J.S., Park Y.K., Chae Y.Z., Lee G.H., Park G.Y. and Jang B.C., 2012. *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40 (4), 1238-1245.
- Juglal, S., Govinden R. and Odhav B., 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of Food Protection*, 65 (4), 683-687.
- Junqueira, L.C., 2003. *Basic Histology*, 10. Edition, Lange Medical Books McGraw-Hill Companies, 64, 65.
- Juven, B.J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76 (6), 626-631.
- Kabouche, A., Ghannadi A. and Kabouche Z., 2009. *Thymus ciliatus* the highest thymol containing essential oil of the genus. *Natural Product Communications*, 4 (9), 1251-1252.
- Kahl, R., 1984. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology*, 33 (3-4), 185-228.
- Kallio, H., Kerrola K. and Alhonmaki P., 1994. Carvone and limonene in caraway fruits (*Carum carvi* L.) analyzed by supercritical carbon dioxide extraction-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (11), 2478-2485.
- Karabacak, Ç., 2007. Bazı *Scutellaria orientalis* Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Karkabounas, S., Kostoula O.K., Daskalou T., Veltsistas P., Karamouzis M., Zelovitis I., Metsios A., Lekkas P., Evangelou A.M., Kotsis N. and Skoufos I., 2006. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Experimental Oncology*, 28 (2), 121-125.
- Kavas Özelçi, G., 1989. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 9 (1), 1-6.
- Kayaalp, O., 2009. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., p 315, Ankara, Türkiye.
- Kazi, A., Wang Z., Kumar N., Falsetti S.C., Chan T.H. and Dou Q.P., 2004. Structure activity relationships of synthetic analogs of (-)-epigallocatechin-3-gallate as proteasome inhibitors. *Anticancer Research*, 24 (2B), 943-954.
- Khan, M. and Sastry V., 2009. Antibacterial activity of carvone containing essential oils. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 2 (2), 126-127.
- Khanna, D., Sethi G., Ahn K.S., Pandey M.K., Kunnumakkara A.B., Sung B., Aggarwal A. and Aggarwal B.B., 2007. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, 7 (3), 344-351.
- Kim, J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston III J.F. and Wei C.I., 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 60 (6), 1364-1368.

- Kim, H., Wu C., Chen F., Wang X., Chung H. and Jin Z., 2004. Evaluation of antioxidant activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (10), 2849-2854.
- Kim, S.H., Bae H.C., Park E.J., Lee C.R., Kim B.J., Lee S., Park H.H., Kim S.J., So I., Kim T.W. and Jeon J.H., 2011. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407 (1), 129-134.
- Kim, S.H., Park E.J., Lee C.R., Chun J.N., Cho N.H., Kim I.G., Lee S., Kim T.W., Park H.H., So I. and Jeon J.H., 2012. Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40 (5), 1683-1690.
- Klaunig, J.E., Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E. and Walborg E.F. Jr., 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Sciences*, 1, 289-295.
- Kling, L.J., Soares J.H. and Haltman W.A., 1987. Effect of vitamin E and synthetic antioxidants on the survival rate of mercury-poisoned Japanese quail. *Poultry Science*, 66 (2), 325-331.
- Klug, W.S. and Cummings M.R., 2002. *Genetik*. 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 24, 28, p 635-651.
- Kocaman, A.Y., Rencüzoğulları E., Topaktaş M., İstifli E.S. ve Büyükleyla M., 2011. The effects of 4-thujanol on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronucleus in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 63 (5), 493-502.
- Koçyigit, A., Keles H., Selek S., Guzel S., Celik H. ve Erel O., 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis mutation. *Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585 (1-2), 71-78.
- Koparal, A.T. ve Zeytinoglu M., 2003. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology*, 43 (1-3), 149-154.
- Koppele, J., Lucassen P.J., Sakkee A.N., van Asten J.G., Ravid R., Swaab D.F. and van Bezooijen C.F.A., 1996. 8-OHdG levels in brain do not indicate oxidative DNA damage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 17, 819-826.
- Koracevic, D., Koracevic G., Djordjevic V., Andrejevic S. and Cosic V., 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology (London)*, 54 (5), 356-361.
- Kordali, S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. ve Mete E., 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99 (18), 8788-8795.
- Koyunoğlu, S., 2008. *Paeonia* türleri içerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Krajcovicova-Kudlackova, M. and Dusinska M., 2004. Oxidative DNA damage in relation to nutrition. *Neoplasm*, 51 (1), 30-33.
- Krimer, N., Baser K.H.C. and Tumen G., 1995. Carvacrol rich plants in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 31 (1), 37-42.

- Kruh, G.D. and Tew K.D., 2000. Basic Science of cancer. Current Medicine, Inc., Philadelphia.
- Kubota, H., Nishizaki T., Harada K., Harada K., Oga A., Ito H., Suzuki M. and Sasaki K., 2001. Identification of recurrent chromosomal rearrangements and the unique relationship between low-level amplification and translocation in glioblastoma. *Genes Chromosome Cancer*, 31, 125-133.
- Kumar, V., Cotran R.S. and Robbins S.L., 1992. Basic Pathology, WB Saunders Comp, Philadelphia.
- Kumar, B. and Chobra K.H., 2005. Biogenesis of Natural Products. Alfa Sciences International Ltd., p 132.
- Kunkel, T.A., Pavlov Y.I. and Bebenek K., 2003. Functions of human DNA polymerases eta, kappa and iota suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA Repair*, 2 (2), 135-149.
- Kurt, H., 2003. Sıçanlarda Karbon Tetraklorit'in (CC₁₄) Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ve Likopen ile Önlenmesi. Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kushner, B.H. and Cheung N.K., 1988. Neuroblastoma. *Pediatric Annals*, 17 (4), 269-276, 278-284.
- Lacayo, N.J., 2008. Neuroblastoma, *eMedicine*, 07-30.
- Lambeth, J.D., 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4 (3), 181-189.
- Lampronti, I., Saab A.M. and Gambari R., 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International Journal of Oncology*, 29 (4), 989-995.
- Lando, C., Hagmar L. and Bonnassi S., 1998. Biomarkers of cytogenetic damage in human and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *La Medicina del lavoro*, 89, 124-131.
- Larsen, N.B., Rasmussen M. and Rasmussen L.J., 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, 5 (2), 89-108.
- Laughton, M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Houlst J.R.C. and Halliwell B., 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability. *Biochemical Pharmacology*, 42 (9), 1673-1681.
- Laws, E.R. Jr. and Thapar K., 1993. Brain tumors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 43 (5), 263-271.
- Lee, J., Spector D., Godon C., Labarre J. and Toledano M.B., 1999, A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (8), 4537-4544.
- Lehman-McKeeman, L.D., Rodriguez P.A., Takigiku R., Caudill D. and Fey M.L., 1989. d-Limonene-induced male rat-specific nephrotoxicity: evaluation of the association between d-limonene and alpha 2u-globulin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 99 (2), 250-259.
- Lepley, D.M., Li B., Birt D.F. and Pelling J.C., 1996. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*, 17 (11), 2367-2375.
- Liang, W.Z. and Lu C.H., 2012. Carvacrol-induced [Ca⁽²⁺⁾]_i rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, 90 (17-18), 703-711.

- Lima, C.F., Carvalho F., Fernandes E., Bastos M.L., Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M. and Pereira-Wilson C., 2004. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology In Vitro*, 18, 457-465.
- Liu, D., Geng T., Zhang L., Yao W., Ding A. and Shan M., 2012. Acute and subacute toxicity and genotoxicity of schizonepetin, a naturally occurring monoterpene with antiviral activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (7), 2256-2262.
- López, M.A., Stashenko E.E. and Fuentes J.L., 2011. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 34, 479-488.
- Lorence, A. and Nessler C.L., 2004. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, 65 (20), 2735-2749.
- Ma, Y. and Marston G., 2009. Formation of organic acids from the gas-phase ozonolysis of terpinolene. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11, 4198-4209.
- Mademtzoglou, D., Akmoutsou P., Kounatidis I., Franzios G., Drosopoulou E., Vokou D. and Mavragani-Tsipidou P., 2011. Applying the *Drosophila* wing spot test to assess the genotoxic impact of 10 essential oil constituents used as flavouring agents or cosmetic ingredients. *Flavour and Fragrance Journal*, 26, 447-451
- Mahmoudi, M., Mercer J. and Bennett M., 2006. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 71 (2), 259-268.
- Mallavarapu, G.R., Ramesh S., Syamasunder K.V. and Chandrasekhara R.S., 1999. Compositions of Indian curry leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 11 (2), 176-178.
- Maluszynska, J., Juchimiuk J. and Wolny E., 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 41 (2), 101-104.
- Manou, L., Bouillard L., Devleeschouwer M.J. and Barel A.O., 1998. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (3), 368-376.
- Manuele, M.G., Ferraro G. and Anesini C., 2008. Effect of *Tilia x viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene. *Phytotherapy Research*, 22, 1520-1526.
- Maris, J.M. and Shusterman S., 2003. Neuroblastoma. In: *Cancer Medicine 6*. Editors: Kufe D.W., Holland J.F. and Frei E., American Cancer Society. Hamilton, Ont., Lewiston, NY: BC Decker, 2363-2376p.
- Maris, J.M., Kyemba S.M., Rebbeck T.R., White P.S., Sulman E.P., Jensen S.J., Allen C., Biegel J.A. and Brodeur G.M. 1997. Molecular genetic analysis of familial neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 33, 1923-1928.
- Maritim, A.C., Sanders R.A. and Watkins J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17 (1), 24-37.
- Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-370.
- Marsik, P., Kokoska L., Landa P., Nepovim A., Soudek P. and Vanek T., 2005. *In vitro* inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on

- cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Medica*, 71 (8), 739-742.
- Martin, A.A., Alert J.A., Reno J.S., Lonchong M. and Grueiro S., 1997. Incidence of childhood cancer in Cuba (1986–1990). *International Journal of Cancer*, 72, 551-555.
- Martin, L.J. and Liu Z., 2002. DNA damage profiling in motor neurons: a single-cell analysis by comet assay. *Neurochemical Research*, 27 (10), 1093-1104.
- Mastelić, J., Jerković I., Blazević I., Poljak-Blazi M., Borović S., Ivancić-Baće I., Smrecki V., Zarković N., Brcić-Kostic K., Vikić-Topić D. and Müller N., 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (11), 3989-3996.
- Mates, J.M., Perez-Gomez C. and De Castro I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
- Matsuo, A.L., Figueiredo C.R., Arruda D.C., Pereira F.V., Scutti J.A.B., Massaoka M.H., Travassos L.R., Sartorelli P. and Lago J.H.G., 2011. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411 (2), 449-454.
- Mavi, A., 2005. İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- McPhee, S.J., Lingappa V.R., Ganong W.F. and Lange J.D., 2000. Pathophysiology of disease, 3. Edition, Lange Medical Books McGraw-Hill, 79-81.
- Meister, A., 1994. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Research Supplements*, 954, 1969-1975.
- Melo, F.H., Moura B.A., de Sousa D.P., de Vasconcelos S.M., Macedo D.S., Fonteles M.M., Viana G.S. and de Sousa F.C., 2011. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25 (3), 362-367.
- Mendes, A.S., Daemon E., Monteiro C.M., Maturano R., Brito F.C. and Massoni T., 2011. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 183 (1-2), 136-139.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2), 91-96.
- Mesa-Arango, A.C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Durán C., Betancur-Galvis L. and Stashenko E., 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (6), 878-884.
- Miguel, M.G., Dandlen S.A., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Barroso J.G. and Marques M.H., 2009. Comparative evaluation of the antioxidant activities of thymol and carvacrol and the corresponding β -cyclodextrin complexes. *ISHS Acta Horticulturae*, 853, 363-368.
- Millet, Y., Jouglard J., Steinmetz M.D., Tognetti P., Joanny P. and Arditti J., 1981. Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clinical Toxicology*, 18 (12), 1485-1498.

- Mohamed, A.A., El-Emary G.A. and Ali H.F., 2010. Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-S-transferase and lipid peroxidation in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal of American Science*, 6, 820-826.
- Morcia, C., Malnati M. and Terzi V., 2012. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29 (3), 415-422.
- Morente, E.O., Abriouel H., López R.L., Omar N.B. and Gálvez A., 2010. Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. *Food Microbiology*, 27 (2), 274-279.
- Morrish, J.L.E. and Daugulis A.J., 2008. Improved reactor performance and operability in the biotransformation of carveol to carvone using a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 101 (5), 946-956.
- Mueller, S. and Matthay K.K., 2009. Neuroblastoma: biology and staging. *Current Oncology Reports*, 11, 431-438.
- Müftüoğlu, M., 2003. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28 (1), 20-24.
- Nakamura, K., Endo H. and Erel O., 1897. Serum oxidation activities and rheumatoid arthritis. *International Journal of Tissue Reactions (Geneva)*, 9 (4), 307-316.
- National Cancer Institute SEER Pediatric Monograph, 2002.
- Negi, B., Kumar D. and Rawat D.S., 2013. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23, 641-645.
- Nikolić, B., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B. and Knežević-Vukčević J., 2011. Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9), 2035-2045.
- Nilay, O., 2009. K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5 dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova.
- Nishida, N., Tamotsu S., Nagata M., Saito C. and Sakai A., 2005. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla* inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (5), 187-1203.
- Nostro, A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea V., Flamini G., Morelli I., Roccaro A.S. and Alonzo V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (2), 191-195.
- Oksidatif stres ve hücre hasarı kurs notları-TTB Tıpta Temel Bilimler Kolu, 1993, Ankara.
- Okumura, N., Yoshida H., Nishimura Y., Kitagishi Y. and Matsuda S., 2012. Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncology Letters*, 3, 321-324.

- Oliva Mde, L., Carezzano M.E., Gallucci M.N. and Demo M.S., 2011. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Natural Product Communications*, 6 (7), 1039-1043.
- Onat, T., Emerk K. ve Sözmen E.T., 2002. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Ostling, O. and Johanson K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Ozkan, A. ve Erdoğan A., 2011. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biochemistry*, 35, 735-442.
- Özbakış-Dengiz, G. ve Banoğlu Z.N., 2001. Sıçanlarda feniletilaminin neden olduğu lokomotor aktivite artışına melatoninin etkisi. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 11 (4), 225-229.
- Özdem, S.S. ve Sadan G., 1994. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11, 63-71.
- Özdemir, G., 1993. Reaktif oksijen partikülleri (ROP) (oksidan moleküller, serbest radikaller). Roche Bilimsel Eserler Serisi, 20-26, İstanbul.
- Özenirler, S., Tuncer C., Ongun C.Ö., Altan N. ve Kandilci U., 1994. Activity of superoxide dismutase in erythrocyte of nonalcoholic chronic liver diseases. *General Pharmacology*, 25 (7), 1349-51.
- Öztaş, H., 2000. Hücre Biyolojisi (Sitoloji), Bakanlar Media, Erzurum.
- Packer, L., 1984. Oxygen Radicals in Biological Systems, Academic Press Inc., 0-12-182005-X, Orlando, Florida, USA.
- Padurariu, M., Ciobica A., Hritcu L., Stoica B., Bild W. and Stefanescu C., 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 469 (1), 6-10.
- Pandey, S.K., Upadhyay S. and Tripathi A.K., 2009. Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research*, 105 (2), 507-512.
- Paralı, F., 1994. Etidyum Bromidin (EtBr) *İn Vitro* İnsan Lenfositlerine Etkisinin SCE Yöntemiyle Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Pasha Shaik, A., Sankar S., Reddy S.C., Das P.G. and Jamil K., 2006. Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of humans: *in vitro* studies. *Drug and Chemical Toxicology*, 29 (1), 111-124.
- Patel, R.P., McAndrew J., Sellak H., White C.R., Jo H., Freeman B.A. and Darley-Usmar V.M., 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411 (2-3), 385-400.
- Pavela, R., 2011. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and *Musca domestica* L.. *Parasitology Research*, 109 (6), 1547-1553.
- Pei, R., Zhou F., Ji B. and Xu J., 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74 (7), M379-M383.

- Pekmez M, 2004. Oksidatif Stres Uygulanmış *Schizosaccharomyces Pombe*'de Moleküler Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Perry, N.S., Bollen C., Perry E.K. and Ballard C., 2003. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75 (3), 651-659.
- Pessoa, L.M., Morais S.M., Bevilaqua C.M. and Luciano J.H., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 109 (1-2), 59-63.
- Phi, K.C., Kim G.N. and Jang H.D., 2012. *In vitro* and intracellular antioxidant capacity of thymyl methyl ether as a major component in *Blumea lanceolaria* (Roxb.) Druce leaf oil. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (5), 1583-1588.
- Piacentini, M., Piredda L., Starace D.T., Annicchiarico-Petruzzelli M., Mattei M., Oliverio S., Farrace M.G. and Melino G., 1996. Differential growth of N- and S-type human neuroblastoma cells xenografted into scid mice. Correlation with apoptosis. *Journal of Pathology*, 180 (4), 415-422.
- Plaumann, B., Fritsche M., Rimpler H., Brandner G. and Hess R.D., 1996. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene*, 13 (8), 1605-1614.
- Powers, S.K. and Lennon S.L., 1999. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 1025-1033.
- Prakash, S. and Prakash L., 2002. Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes and Development*, 16 (15), 1872-1873.
- Radonic, A. and Milos M., 2003. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L.. *Free Radical Research*, 37 (6), 673-679.
- Rana, V.S., Juyal J.P., Rashmi and Amparo Blazquez M., 2004. Chemical constituents of the volatile oil of *Murraya koenigii* leaves. *International Journal of Aromatherapy*, 14 (1), 23-25.
- Rangan, U. and Bulkley GB., 1993. Prospects for Treatment of free radical-mediated tissue injury. *British Medical Bulletin*, 49 (3), 701-717.
- Raphael, T.J. and Kuttan G., 2003. Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 22, 419.
- Rassouli, F.B., Matin M.M., Iranshahi M. and Bahrami A.R., 2011. Investigating the cytotoxic and apoptosis inducing effects of monoterpeneoid stylosin *in vitro*. *Fitoterapia*, 82 (5), 742-749.
- Ravizza, R., Gariboldi M.B., Molteni R. and Monti E., 2008. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 20 (3), 625-630.
- Ray, G. and Husain S.A., 2002. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40 (11), 1213-1232.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. and Pridham J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22 (4), 375-383.

- Riella, K.R., Marinho R.R., Santos J.S., Pereira-Filho R.N., Cardoso J.C., Albuquerque-Junior R.L. and Thomazzi S.M., 2012. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (2), 656-663.
- Ries, L.A.G., Smith MA, Gurney J.G., Linet M., Tamra T., Young J.L. and Bunin G.R. (eds), 1999. *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD.
- Roberto, D., Micucci P., Sebastian T., Graciela F. and Anesini C., 2010. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 106 (1), 38-44.
- Rooney, D.E. and Czepulkowski B.H., 1986. *Human cytogenetics: a practical approach*. Oxford-IRL Press-W, p1-224.
- Ross, R.A., Spengler B.A., Domènech C., Porubcin M., Rettig W.J. and Biedler J.L., 1995. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth & Differentiation*, 6 (4), 449-456.
- Rossing, D., Kahl R. and Hildebrandt A.G., 1985. Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P-450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. *Toxicology*, 34 (1), 67-77.
- Ruacan, S., 2003. Karsinogenez, klinik onkolojinin biyolojik temelleri (içinde). XV. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, Türkiye.
- Ruberto, G. and Baratta M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69 (2), 167-174.
- Ruddon, R.W., 1995. *Cancer Biology*. 3rd ed. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Rump, A.F., Schussler M., Acar D., Cordes A., Ratke R. and Theisohn M., 1995. Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *General Pharmacology*, 26 (3), 603-611.
- Russin, W.A., Hoesly J.D., Elson C.E., Tanner M.A. and Gould M.N., 1989. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis*, 10 (11), 2161-2164.
- Ruzicka, L., Eschenmoser A. and Heusser H., 1953. The isoprene rule and the biosynthesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357-396.
- Ruzicka, L., 1959. History of the isoprene rule. *Proceedings of the Chemical Society*, 341.
- Ryu, G., Park E.K., Joo J.H., Lee B.H., Choi B.W., Jung D.S. and Lee N.H., 2001. A new antioxidant monoterpene glycoside, alpha-benzoyloxypaeoniflorin from *Paeonia suffruticosa*. *Archives of Pharmacal Research*, 24 (2), 105-108.
- Sacchettini, J.C. and Poulter C.D., 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277 (5333), 1788-1789.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi A.H., Djafari-Bidgoli Z. and Batooli H., 2009. GC/MS analysis and *in vitro* antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115 (4), 1524-1528.

- Saghir, M.R., Sadiq S., Nayak S. and Tahir M.U., 2012. Hypolipidemic effect of aqueous extract of *Carum carvi* (black Zeera) seeds in diet induced hyperlipidemic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 333-337.
- Samojlik, I., Lakić N., Mimica-Dukić N., Đaković-Švajcer K. and Božin B., 2010. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and caraway (*Carum carvi* L.) (Apiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (15), 8848-8853.
- Sanchez, M.E., Turina A.V., Danial A.G., Nolan M.V. and Perillo M.A., 2004. Surface activity of thymol: implication for an eventual pharmacological activity. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 34 (2), 77-86.
- Satooka, H. and Kubo I., 2012. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (10), 2746-2752.
- Saverini, M., Catanzaro I., Sciandrello G., Avellone G., Indelicato S., Marci G. and Palmisano L., 2012. Genotoxicity of *Citrus* wastewater in prokaryotic and eukaryotic cells and efficiency of heterogeneous photocatalysis by TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 108, 8-15.
- Schärer, O.D., 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 2946-2974.
- Schofield, M.J. and Hsieh P., 2003. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology*, 57, 579-608.
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Tiener I., Barthel G. and Bursch W., 1990. DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Research*, 50, 5127-5135.
- Seeberg, E., Eide L. and Bjørås M., 1995. The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 391-397.
- Serafini, M. and Del Rio D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report*, 9 (3), 145-152.
- Seymen, P., Seymen H. O., Özdemir A., Belce A., Gümüştaş K., Türkmen F ve Barut Y. Ö., 2000. Cuprophan ve polisülfon dializörlerinin oksidan /antioksidan dengesi üzerine etkileri. *Cerrahpasa Journal of Medicine*, 31 (2), 74-81.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44 (3), 158-163.
- Shan, X., Aw T.Y. and Jones D.P., 1990. Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmacology & Therapeutics*, 47, 61-71.
- Shan, B., Cai Yizhong Z., Mei S. and Harold C., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), 7749-7759.
- Shewfat, R.L. and Purvis A.C., 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Horticultural Science*, 30 (2), 213-218.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska M., Cieciewicz J., Denys P. and Kowalczyk E., 2011. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Medicinal Chemistry*, 7 (6), 674-689.
- Siess, M.H., Leclerc J., Canivenc-Lavier M.C., Rat P. and Suschelet M., 1995. Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in

- human and rat liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 130 (1), 73-78.
- Silva, J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L. and Matos F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 89 (2-3), 277-283.
- Silva, F.V., Guimarães A.G., Silva E.R., Sousa-Neto B.P., Machado F.D., Quintans-Júnior L.J., Arcanjo D.D., Oliveira F.A. and Oliveira R.C., 2012. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *Journal of Medicinal Food*, 15 (11), 984-991.
- Simonsen, J.L. and Owen L.N., 1949. *The Terpenes*. Cambridge University Press, 1-2, London.
- Singh, H.P., Mittal S., Kaur S., Batish D.R. and Kohli R.K., 2009. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), 6962-6966.
- Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Singh, N.P., Danner D.E., Tice R.R., Brant L. and Schneider E.L., 1990. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology. *Mutation Research*, 37, P:123.
- Singh, P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra P.K. and Dubey N.K., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (6), 1734-1740.
- Sinici, İ., 2004. Genomiksin kanserdeki yeri. II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu Özet Kitabı, Bursa: Akmat Akınoğlu Matbaa San. Tic. Ltd. Şti., 110-112.
- Siqueira, B.P.J., Menezes C.T., Silva J.P., de Sousa D.P. and Batista J.S., 2012. Antiulcer effect of epoxy-carvone. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (1), 144-149.
- Sivas, H. ve Tomsuk O., 2011. Antiproliferative and apoptotic effects of the essential oil of *Origanum onites* and carvacrol on Hep-G2 cells. *Anadolu University Journal of Science and Technology - C. Life Sciences and Biotechnology*, 1, 171-180.
- Siveen, K.S. and Kuttan G., 2011. Thujone inhibits lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89 (10), 691-703.
- Slamenová, D., Horváthová E., Sramková M. and Marsáľková L., 2007. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*, 54 (2), 108-112.
- Slamenova, D., Horvathova E., Chalupa I., Wsolova L. and Navarova J., 2011. Ex vivo assessment of protective effects of carvacrol against DNA lesions induced in primary rat cells by visible light excited methylene blue (VL+MB). *Neoplasma* 58, 14-19.

- Slater, T.F. and Del maestro R.F., 1980. An Approach to Free radicals in medicine and biology. *Acta Physiologica Scandinavica*, 492, 153-168
- Slater, T.F., 1984. Free Radicals mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*, 222, 1-15.
- Soares, P.R., de Oliveira P.L., de Oliveira C.M., Kato L. and Guillo L.A., 2012. *In vitro* antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 35 (3), 565-571.
- Speit, G. and Hartmann A., 1999. The Comet assay (Single-Cell Gel Test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, 113, 203-212.
- Stahl-Biskup, E. and Saez F., 2002. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - a global view. In: *Thyme: The genus Thymus* (eds. e. Stahl-Biskup and F. Sáez), 75-124. Taylor and Francis, London and New York.
- Stammati, A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H.L. and Von Wright A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 813-823.
- Sugai, T., Habano W., Jiao Y.F., Suzuki M., Takagane A. and Nakamura S., 2005. Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers. *Oncology*, 68 (4-6), 548-557.
- Sulić, S., Panić L., Dikić I. and Volarević S., 2005. Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croatian Medical Journal*, 46 (4), 622-638.
- Szentandrassy, N., Szentesi P., Magyar J., Nanasi P.P and Csernoch L., 2003. Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacology*, 3, 9.
- Şahin, F., Avcı Ç.B., Avcu F., Ural A.U., Sarper M., Hıslı Y., Omay S.B. and Saydam D., 2007. Red grape seed extract and its compound resveratrol exert cytotoxic effect to various human cancer lines. *Turkish Journal of Hematology*, 24, 102-109.
- Şaylı, B.S., 1975. *Teorik ve Klinik Sitogenetik*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, 223 p, Ankara.
- Tanrıverdi, N., 1991. *Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)*. Bilim Uzmanlığı Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tarpery, M.N., Wink D.A. and Grisham M.B., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology (Bethesda, MD), Regul Integr Comp Physiol*, 286 (3), 431-444.
- Terao, J., Piskula M. and Yao Q., 1994. Protective effect of epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308 (1), 278-284.
- Thorup, I., Würtzen G., Carstensen J. and Olsen P., 1983. Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol. *Toxicology Letters*, 19 (3), 207-210.
- Tokyay, N., 1999. *"Helicobacter pylori" Enfeksiyonu ve Uygulanan Eradikasyon Tedavisinin Genotoksisite Üzerine Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tomasch, R., Wager K.H. and Elmadfa I., 2001. Antioxidative power of plant oils in humans: the influence of alpha- and gamma-tocopherol. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45, 110-115.

- Toyokuni, S., Okamoto K., Yodoi J. and Hiai H., 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358, 1-3.
- Trush, M.A. and Kensler T.W., 1991. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 10, 201-209.
- Tucker, J.D., Auletta A., Micheal C.C., Kerry L.D., Kram D.J., Tice R.R., Carrona A.V., 1993. Sister Chromatid exchange: Second Report of the gene-tox program. *Mutation Research*, 101-180.
- Tuğcu, B., 2004. Malign Astrositer Tümörlü Hastalarda Yaşam Süresini Etkileyen Faktörler ve Ki-67 (MIB I) Proliferasyon İndeksinin Prognoz Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Nöroşirurji Kliniği, İstanbul.
- Turner, P.C., Bates A.D. and White M.R.H., 2004. *Moleküler Biyoloji*, 2. Baskı, Nobel Yayıncılık, 312-315 p, Türkiye.
- Türkez, H., 2007. Bazı Bor Bileşiklerinin *İn Vitro* Şartlarda Periferik İnsan Kanı Üzerine Genetik ve Biyokimyasal Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tzeng, S.H., Ko F.N. and Teng C.M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*, 64 (1), 91-100.
- Ulakoğlu, E.Z., Gümüştaş M.K., Belce A., Altuğ T. ve Kökoğlu E., 1998. Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 29 (3), 115-160.
- Ultee, A. and Smid E.J., 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64 (3), 373-378.
- Undeğer, U., Başaran A., Degen G.H. ve Başaran N., 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (8), 2037-2043.
- Ünalacak, M., Atmaca H., Gürel A., Armutcu, F., Demircan N. ve Aktunç E., 2005. Hiperglisemik glukoz metabolizma bozukluğu olan hastalarda serum malondialdehit, α -tokoferol ve β -karoten düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 10 (3), 113-116.
- Valenzuela, P. and Cori O., 1967. Acid catalyzed hydrolysis of neryl pyrophosphate and geranyl pyrophosphate. *Tetrahedron Letters*, 8 (32), 3089-3094.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Mancol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Vigreux, C., Poul J.M., Deslandes E., Lebailly P., Godard T., Sichel F., Henry-Amar M. and Gauduchon P., 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutation Research*, 419 (1-3), 79-90.
- Vokou, D., 2005. Essential oils as allelochemicals. Fourth World Congress in Allelopathy held at Charles.
- Voss, M.E., Ralph J.M., Xie D., Manning D.D., Chen X., Frank A.J., Leyhane A.J., Liu L., Stevens J.M., Budde C., Surman M.D., Friedrich T., Peace D., Scott I.L.,

- Wolf M. and Johnson R., 2009. Synthesis and SAR of vinca alkaloid analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19 (4), 1245-1249.
- Wang, P., Li N. and Jiang X. F., 2007. *Technol Devel Chem Ind*, 36 (7), 10.
- Wang, W., Wu N., Zu Y.G. and Fu Y.J., 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108 (3), 1019-1022.
- Wang, J., Liu H., Gao H., Zhao J., Zhou L., Han J., Yu Z. and Yang F., 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of the flower essential oil of *Halimodendron halodendron*. *Natural Product Communications*, 6 (11), 1749-1753.
- Wang, T., Pingping Z. and Piu C., 2012. Oxidative DNA damage triggers ProNGF-Mediated apoptosis in the striatum of 6-OHDA-treated rats. *Molecular Neurodegeneration*, 7, S20,
- Wang, W., Li N., Luo M., Zu Y. and Efferth T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17 (3), 2704-2713.
- Wattenberg, L.W., Sparnins V.L. and Barany G., 1989. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Research*, 49 (10), 2689-2692.
- Weinke, S., Kahl R. and Kappus H., 1987. Effect of four synthetic antioxidants on the formation of ethylene from methional in rat liver microsomes. *Toxicol Letters*, 35 (2-3), 247-251.
- Welsh, F.W., Murray W.D. and Williams R.E., 1989. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology* 9, 105.
- Whiting, D.A. and Harper S.H., 1968. In "Chemistry of Carbon Compounds". Ed., S. Coffey, Elsevier, IIB, 153 p, Amsterdam.
- Wiangnon, S., Kamsa-Ard S., Jetsrisuparb A., Sriplung H., Sontipong S., Sumitsawan Y. and Martin N., 2003. Childhood cancer in Thailand: 1995-1997. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4, 337-343.
- Willcox, J.K., Sarah L.A. and George L.C., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (4), 275-295.
- Wu, C.S., Chen Y.J., Chen J.J., Shieh J.J., Huang C.H., Lin P.S., Chang G.C., Chang J.T. and Lin C.C., 2012. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 818261.
- Wu, S., Patel K.B., Booth L.J., Metcalf J.P., Lin H.K. and Wu W., 2010. Protective essential oil attenuates influenza virus infection: an *in vitro* study in MDCK cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 10-69.
- Wu, Y., Tian F., He M. and Cai T., 2011. Isomerization of α -pinene over immobilized AlCl₃ catalysts. *Chinese Journal of Catalysis*, 32 (6-8), 1138-1142.
- Xu, J., Zhou F., Ji B.P., Pei R.S. and Xu N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (3), 174-179.
- Xun, Z., Rivera-Sánchez S., Ayala-Peña S., Lim J., Budworth H., Skoda E.M., Robbins P.D., Niedernhofer L.J., Wipf P. and McMurray C.T., 2012. Targeting of XJB-

- 5-131 to mitochondria suppresses oxidative DNA damage and motor decline in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Reports*, 2 (5), 1137-1142.
- Yamamoto, Y., Hosokawa M., Kurihara H., Maoka T. and Miyashita K., 2008. Synthesis of phosphatidylated-monoterpene alcohols catalyzed by phospholipase D and their antiproliferative effects on human cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18 (14), 4044-4046
- Yang, X., Kang M.C., Lee K.W., Kang S.M., Lee W.W. and Jeon Y.J., 2011. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum*. *Algae*, 26 (2), 201-208.
- Yanik, M., Erel O. ve Kati M., 2004. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatr*, 16 (4), 200-203.
- Yanishlieva, N.V., Marinova E.M., Gordon M.H. and Raneva V.G., 1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64 (1), 59-66.
- Yardımcı-Akaydın, S., Sepici A., Özkan Y., Torun M., Şimşek B. ve Sepici V., 2004. Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radical Research*, 38 (6), 623-628.
- Yardımcı-Akaydın, S., Sepici A., Özkan Y., Şimşek B. ve Sepici V., 2006. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 35 (1), 61-64.
- Yeni, E., Gulum M., Selek S., Erel O., Unal D., Verit A. ve Savas M., 2005. Comparison of oxidative/antioxidative status of penil corpus cavernosum blood and peripheral venous blood. *International Journal of Impotence Research*, 17 (1), 19-22.
- Yıldırım, A., 2003. İntakt ve Adrenalektomili Sıçanların Eritrosit ve Mide Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Yin, Q.H., Yan F.X., Zu X.Y., Wu Y.H., Wu X.P., Liao M.C., Deng S.W., Yin L.L. and Zhuang Y.Z., 2012. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64 (1), 43-51.
- Youdim, K.A., Deans S.G. and Finlayson H.J., 2002. The antioxidant properties of Thyme (*Thymus zygis*L.) essential oil: an inhibitor of lipid peroxidation and a free radical scavenger. *Journal of Essential Oil Research*, 14 (3), 210-215.
- Yu, Z., Wang W., Xu L., Dong J. and Jing Y., 2008. d-Limonene and d-carvone induce apoptosis in HL-60 cells through activation of caspase-8. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 3 (4), 134-143.
- Yu, H., Zhang Z.L., Chen J., Pei A., Hua F., Qian X., He J., Liu C.F. and Xu X., 2012. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS One*, 7 (3), e33584.
- Yurdakök, B., 2007. Hayvan Deneilerine Alternatif Yöntemler. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. I. Seminer. Danışman: Prof. Dr. Emine Baydan, Ankara, 23-36.
- Zahin, M., Ahmad I. and Aqil F., 2010. Antioxidant and antimutagenic activity of *Carum copticum* fruit extracts. *Toxicology In Vitro*, 24 (4), 1243-1249.
- Zarrini, G., Delgosha Z.B., Moghaddam K.M. and Shahverdi A.R., 2010. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical Biology*, 48 (6), 633-636.

- Zeytinoğlu, H., Incesu Z. ve Baser K.H., 2003. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10 (4), 292-299.
- Zheng, G., Kenney P.M. and Lam L.K.T., 1992. Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (5), 751-755.
- Zhou, J.Y., Tang F.D., Mao G.G. and Bian R.L., 2004. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25 (4), 480-484.
- Zinoveva, V.N. and Spasov A.A., 2004. DNA protective activity of natural and synthetic antioxidants. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 50 (3), 231-242.
- Zoller Mark, J. and Smith M., 1982. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Research*, 10 (20), 6487-6500.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2008 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2008-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2011-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimini tamamladı.