

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEKİK [*Thymus revolutus* Célak (LAMIACEAE)] BİTKİSİNDEN ELDE
EDİLEN UÇUCU YAĞIN ANTiOKSiDAN ÖZELLİĞİNİN VE HEPATOMA G2
HÜCRELERİNDE MEMBRAN ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2010

**KEKİK [*Thymus revolutus* Célak (LAMIACEAE)] BİTKİSİNDEN ELDE
EDİLEN UÇUCU YAĞIN ANTiOKSiDAN ÖZELLİĞİNİN VE HEPATOMA G2
HÜCRELERİNDE MEMBRAN ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2008.02.0121.019 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEKİK [*Thymus revolutus* Célak (LAMIACEAE)] BİTKİSİNDEN ELDE
EDİLEN UÇUCU YAĞIN ANTİOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN VE HEPATOMA G2
HÜCRELERİNDE MEMBRAN ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 16/6/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından ...100... (yüz) not
takdir edilerek Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Aysun ÖZKAN (Danışman) 

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN 

Doç. Dr. Birsen Ş. OKSAL 

ÖZET

KEKİK [*Thymus revolutus* Célak (LAMIACEAE)] BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN ANTİOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN VE HEPATOMA G2 HÜCRELERİNDE MEMBRAN ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe ERDOĞAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aysun ÖZKAN

Haziran 2010, 87 sayfa

Bu çalışmada, Antalya florasında endemik olarak yetişen *Thymus revolutus* Célak'dan (*T. revolutus* C.) elde edilen uçucu yağın antiradikal ve antioksidan aktiviteleri ile Hepatoma G2 (Hep G2) hücrelerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağın hücrelerde oluşturduğu membran hasarı ve güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı uçucu yağın membran koruyucu etkisi ise MDA miktarlarının belirlenmesiyle ortaya konmuştur.

T. revolutus C.'in toprak üstü organlarının uçucu yağı Clevenger (su buharı distilasyon) cihazı ile izole edilmiş, bileşenler ise gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) yöntemi ile analiz edilmiştir. Uçucu yağın antiradikal aktivitesi DPPH testi ile ölçülürken antioksidan aktivitesi β-karoten/linoleik asit renk açılım testi ile ölçülmüştür. Uçucu yağın ve H₂O₂'in Hep G2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı uçucu yağın koruyucu (antioksidan) etkisi Hücre Canlılık Testi (Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti) kullanılarak gösterilmiştir. Uçucu yağın membran üzerine etkileri, hücrelerde oluşan MDA miktarının floresan spektrofotometrik ölçülmesiyle gözlenmiştir. Kantitatif protein miktarları Bradford metodu ile ölçülmüştür.

Uçucu yağın en önemli üç bileşeni sırasıyla simen (%32.57), γ-terpinen (%17.18) ve karvakrol (%11.89) olarak tanımlanmıştır. Uçucu yağın ortamda bulunan DPPH radikallerinin %50'sini ortadan kaldıran konsantrasyonu (IC₅₀) 250

$\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Linoleik asit oksidasyonunu inhibe etme oranı ise %72.8'dir. Uçucu yağın Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Hücrelerin uçucu yağ ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu IC_{50} değerleri sırasıyla 70.15, 61.2 ve 35 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin güçlü bir oksidan olan H_2O_2 ile inkübasyonundan sonra IC_{50} değeri 384 μM bulunmuştur. Uçucu yağın 20 $\mu\text{g/ml}$ 'den daha düşük konsantrasyonları hücrelerde H_2O_2 sitotoksitesine karşı koruyucu (antioksidan) etki göstermiştir. Hücreler IC_{50} ve IC_{70} uçucu yağ konsantrasyonlarında inkübe edildiklerinde MDA miktarı artmıştır. Bu da uçucu yağın membran hasarına neden olduğunu göstermiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda ($\text{IC}_{2.5}$, IC_5 , $\text{IC}_{7.5}$ ve IC_{10}) uçucu yağ ile ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde azalan MDA miktarları uçucu yağın H_2O_2 'e karşı membran koruyucu (antioksidan) etkisi olduğunu göstermiştir.

Uçucu yağ sitotoksik ve koruyucu (antioksidan) etkilere sahiptir ve bu etkileri, konsantrasyona bağlı olarak göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Thymus revolutus* Célak, uçucu yağ, Hep G2 hücresi, antioksidan, sitotoksitesite, membran hasarı, MDA

JÜRİ: Doç. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç. Dr. Birsen Ş. OKSAL

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THYME ESSENTIAL OIL'S [*Thymus revolutus* Célak (LAMIACEAE)] ANTIOXIDANT PROPERTIES AND EFFECTS ON HEPATOMA G2 CELL'S MEMBRANE

Ayşe ERDOĞAN

M. Sc. Thesis in Biology

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

June 2010, 87 pages

In this study, antiradical and antioxidant activities and cytotoxic effect of essential oil from *Thymus revolutus* Célak (*T. revolutus* C.), which is an endemic species grown in Antalya flora, on Hep G2 cells were investigated. Membrane damage which was induced by essential oil and essential oil's membrane protective effect against strongly oxidant H₂O₂ were examined by determining MDA amounts.

The aerial parts of *T. revolutus* C.'s essential oil was isolated by Clevenger-type apparatus (hydrodistillation) and its components were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). While antiradical activity of essential oil was measured by DPPH assay, antioxidant activity was measured by β -carotene/linoleic acid assay. Cytotoxic effects of essential oil and H₂O₂ on Hep G2 cells and essential oil's protective effect against strongly oxidant H₂O₂ were demonstrated by using Cell Viability Assay (Cell Titer-Blue^R Cell viability assay reagent-kit). The essential oil's effect on the membrane was observed measuring of MDA amounts by using floresan spektrofotometer. The quantitative protein amount was measured by Bradford method .

The three major constituents of the essential oil were described as cymene (32.57%), γ -terpinene (17.18%) and carvacrol (11.89%) respectively. Essential oil's concentration providing 50% inhibition of DPPH radical (IC₅₀) was calculated 250 μ g/ml. Inhibition rate of linoleic acid oxidation was 72.8%. It was demonstrated that essential oil had cytotoxic effect on Hep G2 cells. IC₅₀ values of essential oil after 24, 48 and 72 hours incubation were calculated 70.15, 61.2 and 35 μ g/ml respectively.

After incubation cells with strongly oxidant H₂O₂, IC₅₀ value was found 384 µM. Less than 20 µg/ml concentrations of essential oil showed protective (antioxidant) effect on the cells against H₂O₂ cytotoxicity. When cells incubated with IC₅₀ and IC₇₀ essential oil concentrations, MDA amounts increased. It demonstrated that essential oil caused membrane damage on the cells. The decreasing MDA amounts in cells which were pre-incubated with lower essential oil concentrations (IC_{2.5}, IC₅, IC_{7.5} and IC₁₀) then exposed to H₂O₂, demonstrated that essential oil had membrane protective (antioxidant) effects against H₂O₂.

Essential oil had cytotoxic and protective (antioxidant) effects and it was showed those effects were depending on concentration.

KEY WORDS: *Thymus revolutus* Célak, essential oil, Hep G2 cells, antioxidant, cytotoxicity, membrane damage, MDA

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Assoc. Prof. Dr. Birsen Ş. OKSAL

ÖNSÖZ

Hepatosellüler karsinoma (HCC), dünyada en çok görülen kanser türleri arasında beşinci sırada, ölüm oranında ise üçüncü sırada yer almaktadır. Karaciğer tümörleri primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer tümörler içinde de en sık görüleni hepatosit hücrelerinden köken alan hepatosellüler karsinomadır. Ayrıca safra kanalları epitelinden köken alan kolanjiokarsinomlar da sık görülür. Karaciğerin en sık görülen sekonder tümörleri ise akciğer, göğüs ve kalın bağırsaktan karaciğere yayılan metastatik tümörlerdir. Bu konuda pek çok çalışma yapılmasına rağmen, ileri evredeki hastalarda henüz etkili standart bir tedavi yöntemi belirlenememiştir.

Yapısında çok sayıda bileşeni bulunduran uçucu yağların antioksidan özelliklerini ortaya koyan çalışmalar devam etmektedir. Oksidasyon reaksiyonları üzerine farklı antioksidan konsantrasyonlarının etkisi pek çok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler sayılabilir. Fenolik antioksidanların, antioksidan aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda etkinliğini yitirmektedir. Bunlar pro-oksidan yapı kazanırlar. Antioksidan olarak görev yaparken diğer oksidan ajanlara karşı hücre zarını koruyabilir ya da yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında pro-oksidan gibi davranarak membran oksidasyonuna neden olabilir ve hücrelerde hasar meydana getirebilirler. Ayrıca çeşitli kanser hücre dizileri ile yapılan *in vitro* deneyler, yağ asidi bileşenlerinin farklı hücrelerde farklı etkiler ortaya koyarak hücre dizilerine özgü etkiler yarattığını göstermiştir. Ancak detoksifikasyon mekanizmasına ait enzimlerin en fazla bulunduğu karaciğer kanseri hücrelerinde *Thymus revolutus* Célak'ın (*T. revolutus* C.) toprak üstü organlarından elde edilen uçucu yağının sitotoksik etkisini, H₂O₂'e karşı koruyucu etkisini, hücre membranında yarattığı etkileri ve H₂O₂'e karşı membran koruyucu etkisini ortaya koyan literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın pro-oksidan/oksidan özelliği ile yeni antikanser ilaçlarının, antioksidan özelliğiyle ise yeni antioksidan ilaçlarının üretilmesinde doğal kaynak olarak önerilmesine yardımcı olmasını dilerim.

Bana bu çalışmada araştırma olanağı sağlayan ve çalışmalarım aşamasında önerileri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Doç.Dr. Aysun Özkan'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Bilgilerinden yararlandığım Prof.Dr. Kayahan Fıskın (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve Yrd.Doç.Dr. Mehmet Akif Kılıç'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü), bitki materyalinin toplanmasında yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Orhan Ünal'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve topladığımız bitkilerin teşhisini yapan Prof.Dr. Hüseyin Sümbül'e (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen arkadaşım Uzman Biyolog Ezgi Başar'a, tez yazım aşamasında emeği geçen Araş.Gör. Sezgi Şeref Gün (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü), Dr. Özge Tufan Çetin (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve Yrd.Doç.Dr. Hüseyin Çetin'e (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü), yüksek lisans eğitimim boyunca 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programından yararlandığım TÜBİTAK'a ve bana her konuda destek olan ve fedakarlıklarını esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Projemi destekleyen (2008.02.0121.019 no'lu proje) Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hepatosellüler Karsinoma.....	1
1.1.1. Hepatokarsinogenezin içerdiği hücresel sinyal yolları.....	4
1.2. <i>Thymus revolutus</i> Célak Bitkisi	7
1.3. Serbest Oksijen Türleri	8
1.4. Lipid Peroksidasyonu ve Etki Mekanizması.....	10
1.4.1. Lipid peroksidasyonunun zararlı etkileri ve önlenmesi	12
1.5. Antioksidanlar	13
1.5.1. Çeşitli <i>Thymus</i> türleri ile yapılan antioksidan aktivite çalışmaları	16
1.6. Uçucu Yağlar	18
1.6.1. Uçucu yağların bulunduğu bitkiler ve bitkide bulunduğu bölgeler	19
1.6.2. Uçucu yağların kullanıldıkları alanlar.....	19
1.6.3. Uçucu yağ elde etme yöntemleri.....	20
1.6.4. Uçucu yağlar ve Hep G2 hücreleri ile yapılan kanser araştırmaları	22
2. MATERYAL ve METOT	25
2.1. Bitkilerin Toplanması ve Uçucu Yağın Elde Edilmesi	25
2.2. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesi.....	26
2.2.1. Antiradikal aktivite ölçümü (DPPH Testi).....	26
2.2.2. Antioksidan aktivite ölçümü (β -karoten/linoleik asit renk açılım testi) 27	
2.3. Hepatoma G2 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması	29
2.4. Sitotoksikite Ölçümleri.....	29
2.5. Uçucu Yağın Hücre Membranı Üzerine Etkisi	30
2.5.1. Hücre supernatantının hazırlanışı.....	31

2.5.2. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	31
2.5.3. Malondealdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesi	32
2.6. İstatistiksel Analizler.....	32
3. BULGULAR.....	34
3.1. <i>T. revolutus</i> C. Bitkisinden Uçucu Yağın Eldesi ve Bileşenlerinin Belirlenmesi	34
3.2. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesi.....	36
3.2.1. Antiradikal aktivite ölçümü (DPPH Testi).....	36
3.2.2. Antioksidan aktivite ölçümü (β -karoten/linoleik asit renk açılım testi) 39	
3.3. Sitotoksik Etkilerin Belirlenmesi	41
3.4. Uçucu Yağın Hücre Membranı Üzerine Etkisi	49
4. TARTIŞMA.....	56
5. SONUÇ.....	69
6. KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
O ₂ ·	Süperoksit radikali
·OH	Hidroksil radikali
¹ O ₂	Tekil oksijen
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ONOO ⁻	Peroksinitrit
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
Cu-Zn	Bakır-Çinko
%	Yüzde
ml	Mililitre
β	Beta
p	Para
γ	Gama
M	Molar
mM	Milimolar
α	Alfa
gr	Gram
lt	Litre
m	Metre
Fe ²⁺	Fe (II) iyonu
°C	Santigrat Derece
H	Hidrojen
nm	Nanometre
μl	Mikrolitre
mg	Miligram
km	Kilometre

O ₂ -H ₂ O	Oksijenli Su
Mg	Magnezyum
cm ²	Santimetrekare
K ₂ HPO ₄	Potasyum di fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum mono fosfat
nmol	Nanomol
δ	Delta
NaCl	Sodyum Klorür
Na	Sodyum
CO ₂	Karbondioksit

Kısaltmalar

HCC	Hepatosellüler Karsinoma
HCV	Hepatit C Virüs
HBV	Hepatit B Virüs
MDA	Malondealdehit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Hep G2	Hepatoma G2
TBAM	Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
LPO	Lipid Peroksidasyonu
4-HNE	<i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonenal
TBARS	Tiyobarbiturikasit Reaktif Türleri
dRib	2-Deoxy-D-riboz
CAT	Katalaz
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
S.H.	Standart Hata
SOD	Süperoksit Dismutaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
DPPH·	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

BHT	Butil Hidroksitoluen
BHA	Butillenmiş Hidroksiyanozil
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
<i>T. revolutus</i> C.	<i>Thymus revolutus</i> Célak
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
BAA	Bağıl Antioksidan Aktivite
BSA	Bovine Serum Albumin
TBA	Tiyobarbiturik Asit
LS	<i>Lindera strychnifolia</i> (Lauraceae)
TP	<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>caucasicus</i> var. <i>caucasicus</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MEM	Minimum Essential Medium
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Karaciğer sirozunda HCC riski (Blum 2005) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.2. HCC’de yer alan hücrel sinyal yolları (Aravalli vd 2008) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.3. *Thymus revolutus* Célak **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.4. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması (Thomas 1999) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.5. 4-HNE’nin kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991, Uchida 2003) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.6. MDA’nın kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 1.7. Clevenger cihazı (www.glasscolabware.com/.../products.php?p=eea 247- 30.10.2009) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 2.1. Antioksidan aktivite ölçümünün (β -karoten/linoleik asit renk açılım testi) etki mekanizması..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.1. *T. revolutus* C.’in uçucu yağının kromatogramı **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.2. *T. revolutus* C. uçucu yağının başlıca bileşenlerinin kimyasal yapıları (commons.wiki.media.org/wiki/File:p-cymen.svg, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol1/terpinene.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol1/carvacrol.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol1/borneol.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol1/thymol.html>)... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.3. *T. revolutus* C’den elde edilen uçucu yağın ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.4. DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki BHT, BHA, askorbik asit ve α - tokoferollün DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%) **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.5. *T. revolutus* C.’den elde edilen uçucu yağın ve BHT’nin linoleik asit inhibisyonu..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.6. *T. revolutus* C.’in uçucu yağının Hep G2 hücre dizisinde zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.7. H_2O_2 konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

- Şekil 3.8. *T. revolutus* C. uçucu yağ konsantrasyonlarının ($<IC_{50}$) Hep G2 hücre dizisi üzerindeki koruyucu (antioksidan) etkisi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.9. MDA standart grafiği **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.10. BSA standart grafiği..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.11. IC_{10} , IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında uçucu yağa maruz bırakılan Hep G2 hücrelerindeki MDA düzeyleri **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.12a. Hep G2 hücrelerinde H_2O_2 oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 3.12b. Hep G2 hücrelerinde H_2O_2 oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.4**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	HCC'nin başlıca etiyolojileri (Blum 2005).....	2
Çizelge 1.2.	Çeşitli risk faktörlerinin neden olduğu HCC'de etkili olduğu bilinen hücrel sinyal yolları.....	5
Çizelge 1.3.	HCC'ye neden olan çeşitli risk faktörleri ile ilgili potansiyel biyobelirteçler ve hücrel sinyal yolları ile olan ilgileri.....	6
Çizelge 1.4.	<i>Thymus revolutus</i> Célak'ın sistematikteki yeri (http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp -27.1.2010).....	8
Çizelge 2.1.	<i>T. revolutus</i> C.'in toplandığı bölge ve özellikleri (Ünal ve Gökçeoğlu 2003).....	25
Çizelge 2.2.	GC/MS sisteminin çalışma şartları	26
Çizelge 3.1.	<i>T. revolutus</i> C. bitkisinin uçucu yağının GC/MS yöntemiyle belirlenen kimyasal bileşenleri.....	34
Çizelge 3.2.	<i>T. revolutus</i> C.'dan elde edilen uçucu yağın ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini süpürücü kapasitesi	37
Çizelge 3.3.	Uçucu yağın ve pozitif kontrollerin DPPH testi sonucu IC ₅₀ değerleri	38
Çizelge 3.4.	DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki BHT, BHA, askorbik asit ve α - tokoferollün DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%).....	39
Çizelge 3.5.	<i>T. revolutus</i> C.'dan elde edilen uçucu yağın, BHT'nin, Askorbik asittin, BHA'nın ve α -tokoferollün linoleik asit inhibisyon yüzdeleri.....	40
Çizelge 3.6.	<i>T. revolutus</i> C. uçucu yağ konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisine sitotoksik etkisi	43
Çizelge 3.7.	H ₂ O ₂ konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi	45
Çizelge 3.8.	Uçucu yağ konsantrasyonlarının (<IC ₅₀) Hep G2 hücre dizisi üzerindeki koruyucu (antioksidan) etkisi	48
Çizelge 3.9.	IC ₁₀ , IC ₅₀ ve IC ₇₀ konsantrasyonlarında uçucu yağa maruz bırakılan Hep G2 hücrelerindeki MDA düzeyleri.....	51

Çizelge 3.10. Hep G2 hücrelerinde H ₂ O ₂ oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi.....	555
---	-----

1. GİRİŞ

Fizyolojik koşullarda, organizmada oksidan etkenler ve antioksidan mekanizmalar bir denge halinde bulunmaktadır. Serbest radikallerin artması veya antioksidanların azalması sonucu serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olmaktadır (Altıntaş 2006). Oksidatif stres ve oksidatif hasarın yaşlanma, karsinogenez, mutagenез, immünolojik, nörolojik, ürolojik hastalıklar ve sindirim sistemi, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır (Moskovitz vd 2002, Pong 2003).

Serbest radikallerin en iyi bilinen zararlı etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincir reaksiyonunu başlatmasıdır. Lipid peroksidasyonunun ürünleri ilerki aşamalarda membran proteinlerinde hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Membran oksidasyon ürünlerinden biri olan malondealdehit (MDA), biyomoleküllerle etkileşerek sitotoksik ve genotoksik etki gösterebilmektedir (Ammar vd 2009).

1.1. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HCC), bütün dünyada görülen en yaygın malign tümörlerden bir tanesidir (Okuda 2000). Bu tümörle karşılaşma sıklığı ülkelere göre büyük değişiklikler göstermektedir. Güneydoğu Asya'da ve Orta Afrika'da sık görülmekle beraber, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerin (ABD)'de daha seyrek olarak görülmektedir. Ülkemizde de sık görülen tümörler arasında yer almaktadır (Bosch vd 2004, Parkın vd 2005). Hepatit C virüs'ün (HCV) artan yaygınlığını yansıtan HCC'nin insidansı ve ölüm oranındaki artış, ileri derecede sanayileşmiş ülkelerde daha yüksektir (Taylor-Robinson vd 1997, Deuffic vd 1998, El-Serag ve Mason 1999, El-Serag vd 2003).

HCC'nin en belirgin etiyolojileri çizelge 1.1'de verilmiştir. Özellikle erkeklerdeki gelişmiş vücut kütle indeksi (Calle vd 2003) ve diabetes mellitus iyi bilinen faktörler arasında yer almaktadır (El-Serag 2004). HCC'nin moleküler patogeneğinin kapsadığı

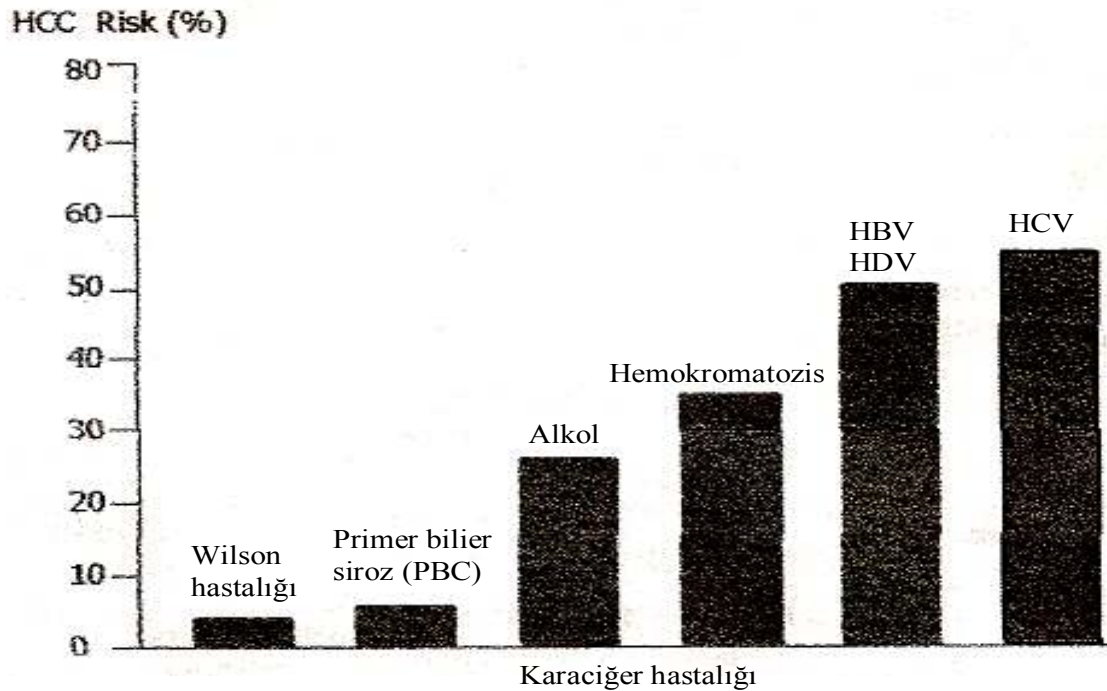
bazı basamaklar geçmiş yıllardaki çalışmalarla açıklanmıştır. Hepatokarsinogenez, hepatositlerin en sonunda malign transformasyonuna neden olan farklı genetik değişiklikleri içeren çok basamaklı bir yoldur. Diğer kanser çeşitlerinde yer alan olayların sırasını tanımlamak için önemli yollar kat edilmesine rağmen, özellikle kolorektal kanser ve bazı hematopoetik malignansilerde, hepatokarsinogenez de yer alan birçok faktörün katkısı ve bunların etkileşimi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Hepatositlerin malign transformasyonu, hücrel onkogenlerin aktivasyonu, tümör supresör genlerin inaktivasyonu, deoksiribonükleik asitlerde (DNA) yanlış eşleşme (mismatch), tamir defektleri ve zayıflamış kromozomal ayrılmasını içeren olası genomik kararsızlık, büyüme ve anjiogenik faktörlerin aşırı ekspresyonu ve telomeraz aktivasyonu gibi genetik değişikliklerle sonlanabilir. Kronik viral hepatit B, C ve D, alkol, hemokromatozis ve α -1-antitripsin eksikliği gibi metabolik karaciğer hastalığının yanı sıra alkolik olmayan yağ karaciğer hastalığı, kronik karaciğer hasarı, rejenerasyon ve siroz yolakları vasıtasıyla baskın olarak etki edebilir. Buna göre, HCC'lerin %70-90'nı sirotik karaciğer geliştirdiğinden, HCC'nin gelişimi için en büyük klinik risk faktörü karaciğer sirozudur. HCC'lerin büyük çoğunluğu, hepatositlerin malign transformasyonu ve HCC gelişimi ile sonuçlanan rastgele oluşan genetik değişikliklere neden olan mitojenik ve mutajenik çevre sağlayan kronik hepatitten sonra meydana gelmektedir (Blum 2005).

Çizelge 1.1. HCC'nin başlıca etiyolojileri (Blum 2005)

Kronik viral hepatitleri B, C, D
Toksinler (ör: alkol, aflatoksin)
Kalıtsal metabolik karaciğer hastalıkları (ör: kalıtsal hemokromatozis, α -1-antitripsin eksikliği)
Otoimmün hepatit
Özellikle erkeklerde kilo ve diabetes mellitus; alkolik olmayan yağ karaciğer hastalığı (NAFLD)

Karaciğer sirozlu hastalardaki HCC riski, altında yatan karaciğer hastalığının aktivitesine, süresine ve etiyolojilerine bağlıdır (Şekil 1.1). Klinik ve biyolojik değişiklikler, HCC gelişiminin en büyük riskini taşıyan sirozlu hasta gruplarının daha

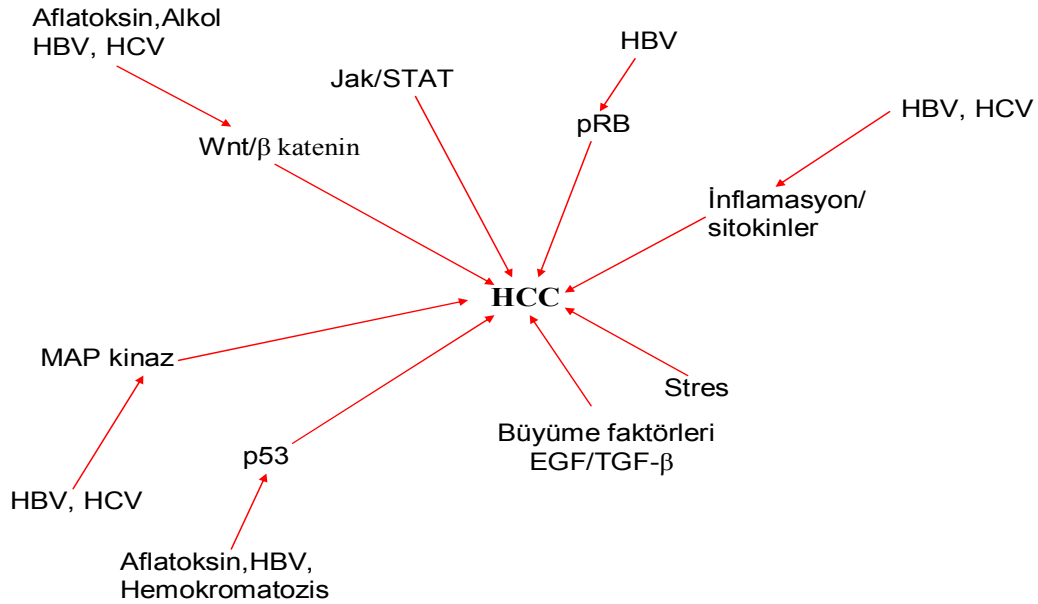
ileri düzeyde incelenmesine izin verir (Velazquez vd 2003). Hepatit B virüsü (HBV) ve HCV enfeksiyonu, HBV enfeksiyonu ve aflatoksin B1 (Ming vd 2002, Yu ve Yuan 2004), HBV/HCV enfeksiyonu ve alkol ya da diabetes mellitus (Hassan vd 2002) ya da HCV enfeksiyonu ve karaciğer yağlanması gibi etiyolojilerin bir arada bulunması HCC gelişiminin nispi oranını arttırmaktadır. Genel olarak, HCC erkeklerde kadınlara göre daha yaygındır ve insidansı yaşla beraber artmaktadır. Aflatoksinler, p53 tümör baskılayıcı gen mutasyonlarını uyarabilmekte, bu da çevresel bir faktörün tümör gelişimini moleküler seviyede etkilediğini göstermektedir. Ayrıca, transgenik fare modellerinde çevresel ya da enfekte edici ajanlar olmadan kronik immün aracılı karaciğer hücre hasarı HCC'ye neden olmaktadır (Nakamoto vd 1998). Sitotoksik T lenfositlerin inhibisyonu, apoptozisin ve Fas ligandının nötralizasyonu ile kronik inflamasyonu uyarmaktadır (Nakamoto vd 2002). İlave olarak, transgenik fare modelinde NF- κ B'nin, inflamasyon ve HCC gelişimi arasındaki bağlantı olabileceği gösterilmiştir. Son olarak sitokrom P450 oksidaz, N-asetil transferaz ve glutatyon-S-transferaz gibi ilaç metabolize edici enzimlerin özel polimorfizmleri HCC gelişiminin genetik hassasiyetine katkıda bulunabilmektedir (Chen ve Chen 2002).



Şekil 1.1. Karaciğer sirozunda HCC riski (Blum 2005)

1.1.1. Hepatokarsinogenezin içerdği hücresel sinyal yolları

Kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar yıllardır, HCC'nin başlıca risk faktörlerini tanımlamakta ve HCC'nin patogenezi anlamak için birçok çalışma yapılmaktadır. Buna rağmen, karsinogeneze neden olan moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Viral enfeksiyon ya da hepatotoksik ajanlara maruz kalmasından dolayı karaciğer dokusunda meydana gelen değişimler hücresel sinyal yollarında önemli değişimlere neden olmakta ve gen ekspresyonunu değiştirerek tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. HCC'de yer alan hücresel sinyal yolları (Aravalli vd 2008)

Sinyal iletim yolunun HCC ile olan ilişkisi çizelge 1.2'de kısaca özetlenmiştir. Bu yollar üzerindeki potansiyel biyobelirteçleri ve moleküler hedefleri belirlemek için çalışmalar yapılmaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.2. Çeşitli risk faktörlerinin neden olduğu HCC’de etkili olduğu bilinen hücrel sinyal yolları

Risk faktörü	Etki ettiği sinyal yolu	Kaynak
Aflatoksin	Wnt/ β -Katenin	Hsu vd 1991
	p53	Hsia vd 1994, Weinberg 1995, Azechi vd 2001
Alkol	Wnt/ β -Katenin	Colnot vd 2004
HBV	Wnt/ β -Katenin	Colnot vd 2004
	p53	Azechi vd 2001
	pRb	Satoh ve Kazi 1992, Yoshida vd 2006,
	MAP kinaz	Bai vd 2003
	Sitokin sinyali	Budhu vd 2006
Hemokromatozis	p53	Pimienta ve Pascual 2007
Kimyasal karsinojenler	Ras	Nonomura vd 1987, Jagirdar vd 1989, Liao vd 1997, Liao vd 2000, Calvisi vd 2006

Çizelge 1.3. HCC'ye neden olan çeşitli risk faktörleri ile ilgili potansiyel biyobelirteçler ve hücrel sinyal yolları ile olan ilgileri

Risk faktörü	Biyobelirteç	Kaynak
Aflatoksin	B-kateninde olan mutasyonlar	Hickman vd 2002
	P53'ün 249. kodonunda olan mutasyonlar	Weinberg 1995
HBV	B-kateninin defosforilasyonu	Colnot vd 2004
	Friszzled-7'nin aşırı üretimi	Colnot vd 2004
	pRb nin az üretimi	Satoh ve Kaziro 1992, Yoshida vd 2006
	P16 nın az üretimi	Satoh ve Kaziro 1992
HCV	B-kateninin defosforilasyonu	Colnot vd 2004
	β -kateninde olan mutasyonlar	Hickman vd 2002
	Friszzled-7'nin aşırı üretimi	Colnot vd 2004
Hemokromatozis	p53'ün 249. ve 250. kodonunda olan mutasyonlar	Pimienta ve Pascual 2007
Kimyasal karsinogenler	N-ras ın kodon 12 de olan nokta mutasyon	Jagirdar vd 1989
	K-ras ın kodon 61 de olan nokta mutasyon	Jagirdar vd 1989
	H-ras ın kodon 13 de olan nokta mutasyon	Nonomura vd 1987, Calvisi vd 2006
	K-ras ın kodon 64 de olan nokta mutasyon	Liao vd 1997

1.2. *Thymus revolutus* Célak Bitkisi

Çoğunlukla kuzey ılıman bölgelerde bulunan *Thymus* cinsleri dayanıklı, uzun ömürlü, aromatik ve yaprak dökmeyen ya da ara sıra döken yaklaşık 400 türden oluşan otsu bitkilerdir (Safaei-Ghomi vd 2009). Genellikle kekik olarak bilinen bu aromatik bitkiler için kullanılan *Thymus* ismi, çok eski bir yunan ismidir (Bhattacharjee 2005). Bu bitkiler güney Avrupa'ya ve Asya'ya özgü olup, birçok biyolojik ve farmokolojik özelliklerinden dolayı tıbbi bitkiler olarak iyi bilinmektedirler. 51 taksona ait 181 örneğin, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezinde (TBAM) uçucu yağları çalışılmıştır. Türkiye *Thymus* taksonlarının %85' ini meydana getiren bu 181 örnek, yağ bakımından araştırılmıştır. Çalışmalar, bütün taksonlarının %49'unun yağ bakımından zengin (>%1) olduklarını göstermektedir. % 0.1-1.0 yağ veren %23'ünün orta-zengin olduğu ve sadece %18'inin %0.1'den daha az yağa sahip olduğu belirtilmektedir (Başer 2002). Bazı *Thymus* türlerinin uçucu yağları, izomerik fenolik monoterpenler timol ve/veya karvakrolün yüksek konsantrasyonlarının varlığı ile karakterizedir (Baser 1995), ayrıca *Thymus caramanicus* Jalas ve Cezayirin farklı bölgelerinden toplanan *Thymus pallescens* ve *Thymus algeriensis* gibi *Thymus* türlerinde *p*-simen ve γ -terpinen gibi bileşenler de yüksek oranlarda bulunmaktadır (Safaei-Ghomi vd 2009, Hazzit vd 2009). *Thymus* cinsleri, dünya çapında ünlü bitkiler arasında yer almakta ve genellikle bitki çayı, tatlandırıcı madde (sos ve baharat), aromatik ve tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Stahl-Biskup 2002).

Thymus cinslerinin, Türkiye'de 41 türü bulunmakta ve bunların 24'ü endemiktir (Orhan vd 2009). Sistematikteki yeri çizelge 1.4'te verilen *Thymus revolutus* Célak, açık kayalıklarda ve çakıllı topraklarda büyüyen Türkiye'deki endemik türlerden biridir. Çalışmamızda kullandığımız *Thymus revolutus* C. Haziran 2008 döneminde Akdeniz Üniversitesinin Ziraat Fakültesinin güneyinde bulunan açık kayalık ve çakıllı alandan toplanmıştır.

Çizelge 1.4. *Thymus revolutus* Célak'ın sistematikteki yeri (<http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp-27.1.2010>)

Alem	Plantae
Alt Alem	Tracheobionta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Asteridae
Takım	Lamiales
Familya	Lamiaceae
Cins	<i>Thymus</i> L.



Şekil 1.3. *Thymus revolutus* Célak

1.3. Serbest Oksijen Türleri

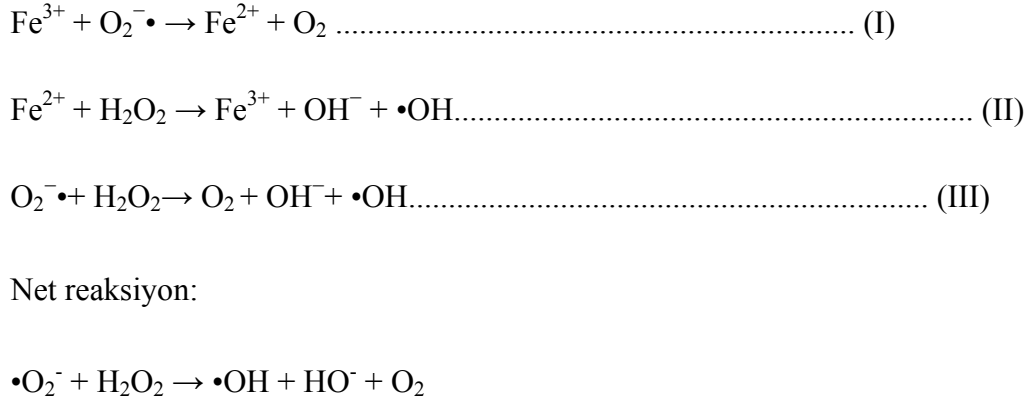
Serbest oksijen türleri; süper oksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksi radikali, tekil (singlet) oksijen radikali (1O_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar arasında değişmektedir

(Yeh vd 2005). Ayrıca bazı enzim reaksiyonları da reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna neden olmaktadır (Altıntaş 2006).

Süperoksit radikali, moleküler oksijenin oksidatif fosforilasyon esnasında enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir. $O_2^{\cdot-}$ 'nin yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır (Altıntaş 2006). Ayrıca indirgeyici moleküler oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken $O_2^{\cdot-}$ oluşur.

Süperoksit radikalının, yüksek katalitik etkiye sahip SOD enziminin etkisiyle konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell 1984).

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. $\cdot OH$, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi H_2O_2 molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir (Altıntaş 2006). Demir ve bakır gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması (Thomas 1999)

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.

Tekil oksijen, moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında oluşmaktadır. 1O_2 'nin yarılanma

ömrü çok kısa olup karbon-karbon çift bağları ile tepkimeye girme eğilimi yüksek olduğu gösterilmiştir (Altıntaş 2006).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin, enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında $\cdot OH$ 'inin öncülü olarak davranmasıdır. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Altıntaş 2006).

ROT'ların DNA, hücresel proteinler ve lipidler üzerinde zararlı etkileri vardır (Ammar vd 2009). Aynı zamanda kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi serbest kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine ve dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da ölmesine sebep olmaktadır (McCormick vd 2000).

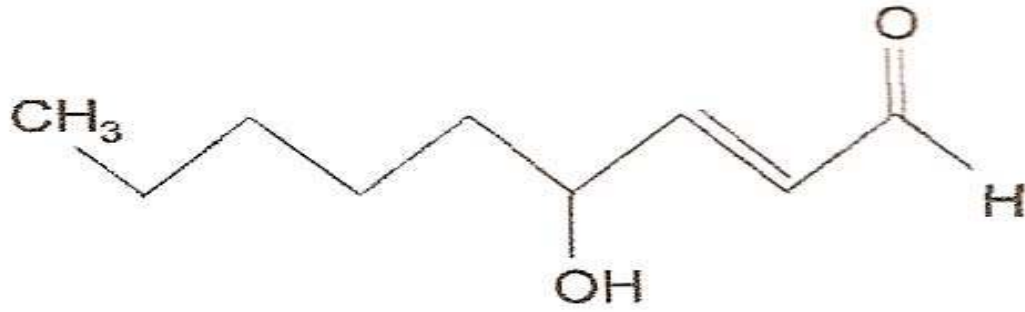
1.4. Lipid Peroksidasyonu ve Etki Mekanizması

Lipid peroksidasyonu, zar fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Mateos vd 2005).

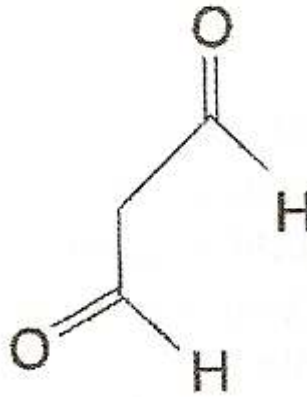
Lipid peroksidasyonu kimyasal bir süreç olup serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar (Canoruç vd 2001).

Hücre içi aldehitler, çoğunlukla endojen olarak oksidatif hasar altında oluşturulurlar (Esterbauer vd 1991, Bartsch 1999, Marnett ve Plataras 2001). Oksidatif stres, fosfolipidlerle ve yağ asitleri ile etkileşerek aldehitleri de içeren birçok ürün meydana getiren ROT'ni üretir. Bu yol genel olarak lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir (Feng vd 2006). LPO normal fizyolojik koşullarda meydana gelmesine rağmen, viral ya da bakteriyel enfeksiyon sırasında, ksenobiyotik ve radyasyona maruz kalındığında ve enflamasyon sırasında oluşması önemlidir (Esterbauer vd 1991, Bartsch 1999, Marnett ve Plataras 2001, Uchida 2003). Aldehit meydana getiren iki yol olan, oksidatif stres ve LPO karsinogeneze de oynadıkları önemli rol ile ilişkilendirilmiştir. Aldehitlerin, mutageneze ve karsinogeneze neden oldukları asıl mekanizmalar hala

anlaşılamamıştır (Feng vd 2006). LPO tarafından üretilen iki önemli hücre içi aldehit, malondealdehit (MDA) (Şekil 1.6) ve *trans*-4-hydroxy-2-nonenal'dır (4-HNE) (Şekil 1.5) (Esterbauer vd 1991, Bartsch 1999, Marnett ve Plataras 2001, Uchida 2003). MDA ve 4-HNE hücreye girmek yerine hücre membranında toplanırlar. 4-HNE uygulaması birçok sitotoksiteye neden olmuştur. Bu faktörler, deneysel modellerde 4-HNE ve MDA'nın neden zayıf ekzojen mutajen ve karsinojen olduklarını açıklamıştır (Feng vd 2006).



Şekil 1.5. 4-HNE'nin kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991, Uchida 2003)



Şekil 1.6. MDA'nın kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991)

MDA, hücrelerde en çok bulunan LPO ürünlerinden bir tanesidir ve ayrıca prostaglandin biyosentezinde de üretilir (Dicafalusy vd 1977, Esterbauer vd 1991, Marnett 1999-a, 1999-b). MDA'nın insan ve memeli hücrelerinde mutajenik (Tau 1979,

Bird vd 1982, Niedernhofer vd 2003), fare ve ratlar da karsinojenik olduğu gösterilmiştir (Feng vd 2006). MDA, diğer LPO ürünleri ile karşılaştırıldığında fazla reaktif bir bileşik değildir, 4-HNE' den daha az aktiftir (Esterbauer vd 1991).

1.4.1. Lipid peroksidasyonunun zararlı etkileri ve önlenmesi

Lipid peroksidasyonunun başlıca ürünü olan MDA uzun ömrü ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açmaktadır (Rio vd 2005). Bunun yanı sıra membran akıcılığının azalmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca^{+2} iyonlarının membran geçişlerinin artmasına neden olmaktadır (Canoruç vd 2001).

Aldehitlerin hem karbonil grubu hem de olefinik bağları sadece DNA ile etkileşmezler. Aynı zamanda sistein ve histidin gibi amino asitlerle de etkileşirler (Esterbauer vd 1991, Bartsch 1999, Marnett ve Plastaras 2001, Uchida 2003). MDA, proteinlerin ilk olarak lizin kalıntıları ile etkileşirken aynı zamanda histidin, tirozin, arjinin ve dokulardaki metiyonin kalıntıları ile de etkileşir (Buttkus 1967, Esterbauer vd 1991, Slatter vd 2000). Dokulardaki MDA'nın en az %80'inin proteinlere geri dönüşümlü (reversible) bağlandığı gösterilmiştir (Slatter vd 2000, 2004). Oksidatif stres altında hücrelerde oluşan aldehit-protein ve aldehit-DNA oluşumunun seviyesine bakıldığında, aldehitlerin büyük çoğunluğunun DNA dan çok proteinlerle etkileştiği görölmektedir. Bu aldehit protein etkileşimi DNA tamirinde görev alan proteinlerin fonksiyonunu da etkiler (Feng vd 2006).

Aldehitlerin güçlü mutajen oldukları ve DNA hasarı meydana getirerek karsinogenezi başlattıkları ortaya konmuştur (Esterbauer vd 1991, Bartsch 1999, Marnett ve Plastaras 2001, Uchida 2003). Aldehitler, DNA tamirini de içeren protein fonksiyonlarını zayıflatabilirler. Eğer böyle bir durum oluşmuş ise, tamir proteinleriyle aldehitlerin etkileşimi, mutagenesi ve karsinogenezi arttırabilir ve DNA tamir kapasitesini azaltabilir. Yakın zamanda 4-HNE'nin insanlardaki en önemli DNA tamir mekanizmalarından olan nükleotid kesip çıkarma mekanizmasını oldukça inhibe ettiği ve bu inhibisyonun, 4-HNE'nin tamir proteinleriyle doğrudan etkileşimi sonucu oluştuğu gösterilmiştir (Feng vd 2004).

Piper gaudichaudianum'un yapraklarından elde edilen uçucu yağın V79 hücrelerine uygulanması, tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS) üretilmesinin, uçucu yağın konsantrasyonundaki artışa paralel olarak arttığı gösterilmiştir. Bu artış, uçucu yağın 0.5 µg/ml ve yukarısındaki konsantrasyonlarda uygulanmalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Péres vd 2009).

Origanum vulgare ve *Satureja montana*'nın yapraklarından elde edilen uçucu yağların Wistar rat karaciğerlerinden elde edilen mikrozomlarda MDA oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Oluşan MDA'nın %50'sinin azaltılması için gereken *O. vulgare* uçucu yağının konsantrasyonu 17.0 µg/ml olarak bulunurken, bu değer *S. Montana*'nın uçucu yağı için 27.2 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca karvakrol ve timolünde karaciğer mikrozomlarında MDA oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Oluşan MDA'nın %50'sinin azaltılması için gereken karvakrol konsantrasyonu, 10.5 µg/ml (70.1 µM) olarak bulunurken, bu değer timol için, 6.6 µg/ml (43.9 µM) olarak bulunmuştur. 300 µg/ml konsantrasyonda kullanılan *p*-simen ve γ -terpinen karaciğer mikrozomlarında MDA oluşumunu azaltıcı hiçbir etki göstermemiştir (Prieto vd 2007).

Murin osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinde, redükleyici şeker olan 2-Deoxy-D-ribozun (dRib) 30 mM konsantrasyonunda uygulanmasından sonra MDA oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Daha sonra doğal bir flavonoid olan kaempferolün 10^{-9} - 10^{-5} M konsantrasyonlarında dRib'in bulunduğu ortama eklenmesinden sonra MDA oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (Suh vd 2009).

1.5. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikaller gibi vücuda zarar veren, metabolizmanın kimyasal aktif ürünlerini nötralize eden bileşiklerdir. Oksidatif stres ile ilgili olduğu düşünülen kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumların önlenmesinde önemli rol oynarlar (Losso vd 2007). Hem bitkisel hem de hayvansal kaynaklı antioksidanlar vardır. Bitki fenoller, bitkisel antioksidanların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Ayrıca antitümöral, antiviral ve antibiyotik özellik göstermektedirler (Apak vd 2007).

Serbest radikallerin oluşumu, yaşamın başlangıcında ve biyolojik evrimde önemli rol oynar (McCord 2000). Örnek olarak oksijen radikalleri, sinyal iletiminde ve hücrelerdeki çözünür guanilil siklaz aktivitesinin regülasyonu gibi kritik olaylarda kullanılır (Lander 1997, Zheng ve Storz 2000). Bununla birlikte, serbest radikaller ve diğer yakın türler, hücre hasarına ve ölümüne neden olan biyomoleküllerin (protein, amino asit, lipid, DNA) oksidasyonuna neden olurlar (Lander 1997, Freidovich 1999, Ignarro vd 1999, McCord 2000, Zheng ve Storz, 2000). Örneğin, hücrede oksidatif hasarı arttıran ROT, SOD'un fiziksel, kimyasal ve immünolojik özelliklerini dikkate değer bir biçimde değiştirir. Serbest radikallerin sitotoksik etkileri memeli hücreleri için zararlıdır (Tepe vd 2005a).

Hücreler, normal olarak ROT'un neden olduğu zararlardan, çeşitli reaktif oksijen türlerini süpürücü proteinler, enzimler ve kimyasal bileşikler tarafından korunur (Ozgunes vd 1995, Gambhir vd 1997, Cimen vd 2000).

Farklı aktivitelere sahip birçok antioksidan sistem gösterilmiştir. $O_2\cdot$ ve H_2O_2 süpürme yeteneğine sahip olan enzimler; SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). SOD, süperoksit anyonunun H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyerek, ROT'lara karşı ilk savunma hattıdır (Sarban vd 2005). H_2O_2 , H_2O ve O_2 'e CAT tarafından dönüştürülür. GSH-Px, glutatyonu okside ederken H_2O_2 gibi lipidik ya da lipidik olmayan hidroperoksitleri azaltan bir selenoproteindir (Michiels vd 1994). Eğer ROT'lar süpürülmezse, lipid, protein ve DNA hasarının artmasına öncülük ederler. Plazma lipid peroksidasyonunun, antioksidan savunma sisteminin azalmasından dolayı arttığı bulunmuştur (Sarban vd 2005). Hücre içinde bulunan Cu-Zn SOD, GSH-Px ve CAT, ROT'ları ortadan kaldırarak antioksidan enzim olarak görev yaparlar (Michiels vd 1994).

Sentetik antioksidanların kararlı olmamasından ve yüksek oranda uçucu olmasından dolayı yiyecek endüstrisinde kullanılan bu antioksidanların güvenilirliği ve koruyucu etkisi sık sık sorgulanmaktadır (Sokmen vd 2004). Bu yüzden oksidatif zararlardan insanları korumakla ilgili çalışmalar, doğal olarak oluşan antioksidanları bulmak üzerine yoğunlaşmıştır (Scalbert vd 2005). Aromatik bitkilerin doğal antioksidan olarak önemleri açıklanmıştır (Dapkevicius vd 1998, Kahkönen vd 1999, Parejo vd 2002).

Antioksidanlar genel olarak yağ asitlerinin oksidasyonunun inhibitörleri olarak kullanılırlar. Yağ asitlerinin parçalanması, bozulmalarının ana nedenlerinden biridir ve yağ asidi oksidasyonu gıda endüstrisinde önemli bir sorundur (Kartal vd 2007).

Birçok çalışma, fenolik bileşiklerin, serbest radikal süpürme kapasitelerinin sonucu olarak antioksidan aktivite gösterdiklerini ortaya koymuştur (Seyoum vd 2006). Fenolik bileşikler, metal iyonları şelatörü olarak, radikal oluşumunu önleyerek ve antioksidan endojen sistemini güçlendirerek antioksidan olarak davranırlar (Al-Azzawie ve Mohamed-Saiel 2006). Bu bileşikler, sadece hidrojen ve elektron verme yeteneklerinden dolayı antioksidan olarak davranmazlar aynı zamanda, kararlı radikal aracılırlar (Ammar vd 2009). Flavonoidler, antioksidan ve serbest radikal süpürme aktivitelerinden dolayı en önemli doğal fenoliklerdir (Kahkönen vd 1999). Flavonoidler, antioksidan olarak ROT'ların büyük bir kısmını süpürücü ve LPO'nun inhibitörleri olarak açıklanmıştır (Williams vd 2004). Birçok çalışma da, flavonoidlerin antioksidan kapasitelerini ortaya koymuştur (Cotelle vd 1996, Bors vd 2001, Cai vd 2006).

Fenollerin kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip oldukları kanıtlanmıştır (Ruberto ve Baratta 2000). Oksijenize monoterpenlerden, özellikle iyi bilinen iki fenolik bileşik (timol ve karvakrol), bunları içeren bitki yağlarının antioksidan aktivitelerinden sorumludurlar (Laguori vd 1993, Aeschbach 1994, Barata vd 1998). Monoterpen hidrokarbonları; özellikle terpinolen, α ve γ terpinenin antioksidan etkileri olduğu gözlenmiş, fakat net bir şekilde hiçbirisi oksijenize monoterpenlerden güçlü değildir. Bu aktivite farkının nedeni, moleküllerdeki güçlü aktif metilen gruplarıdır. Diğer taraftan seskiterpen hidrokarbonları ve onun oksijenize türevleri çok düşük antioksidan aktiviteye sahiptirler (Ruberto ve Barata 2000).

Thymus türlerinin uçucu yağları *p*-simen, γ -terpinen, timol ve karvakrol gibi fenolik monoterpenlerce zengindir (Pank vd 2004). Akdeniz bölgesinde yaygın bir şekilde bulunan adaçayı, biberiye ve kekik gibi bazı aromatik bitkilerin antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir. Birçok bitki türü günümüzde, antioksidan özelliklerinden dolayı gıda katkı maddelerinin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Safaei-Ghomi vd

2009). Aromatik bitkilerdeki doğal antioksidanların araştırılması, yiyecek ve ilaç sanayinde sentetik antioksidanlara alternatiftir (Parejo vd 2002).

1.5.1. Çeşitli *Thymus* türleri ile yapılan antioksidan aktivite çalışmaları

Bitkilerdeki antioksidan bileşiklerin varlığı, antioksidanların farklı mekanizmalarla etki etmelerinden dolayı birçok metotla belirlenir (Kartal vd 2007). Bu tip bileşikler, birincil antioksidanlar olarak adlandırılırlar ve bunlar serbest radikallerin süpürülmesinde ve zincir kırılmalarının önlenmesinde önemli rol oynarlar. Ayrıca metal deaktivatörleri olarak, lipid hidroperoksit bozulmalarının inhibitörleri olarak, birincil antioksidanların yeniden oluşturulmasında ve $^1\text{O}_2$ süpürücü olarak davranırlar (Gordon 1990, Koleva vd 2002).

Bitkilerin antioksidan özelliklerini belirlemek için birçok metot bulunmaktadır. Antioksidan aktivite belirleme çalışmalarında sık olarak kullanılan ve bizim de çalışmamızda kullandığımız iki metot; 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH $\cdot$) testi ve β -karoten/linoleik asit renk açılım testidir (Halliwell vd 1987, Halliwell ve Gutteridge 1990, Halliwell 1990, Gordon 1990, Koleva vd 2002). DPPH $\cdot$ testi, serbest radikal süpürme aktivitesinin değerlendirilmesi için iyi bilinen bir metottur. Polariteden bağımsız, çok hızlı, kolay ve tekrar edilebilir bir metottur (Koleva vd 2002). DPPH radikal süpürme aktivitesi ile toplam polifenoller arasında güçlü bir ilişki vardır (Lu ve Foo 2000, Siriwardhana vd 2003).

Antioksidanlar genel olarak yağ asitlerinin oksidasyon inhibitörleri olarak kullanılırlar. Bu yüzden linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu, belirteç olarak kullanılan β -karoten varlığında ölçülebilmektedir (Dapkevicius vd 1998). Linoleik asit oksidasyonu, β -karotene saldıran ve karakteristik rengini açan (açık sarı sulu emülsiyonlarında) konjuge dienleri ve diğer uçucu ürünleri üretir. Genel olarak hem serbest radikal süpürme aktivitesi olan hem de linoleik asit oksidasyon inhibisyon özelliği olanlar gıda endüstrisinde tercih edilmektedir (Kartal vd 2007).

Thymus praecox subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* (TP) un çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ ile yapılan DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite testinde, 0.5 mg/ml uçucu yağ konsantrasyonunda %7.66'lık inhibisyon, 1.0 mg/ml konsantrasyon

da %12.27'lik inhibisyon ve 2 mg/ml konsantrasyon da %20.37'lik inhibisyon elde edilmiştir. Aynı bitkinin yapraklarından elde edilen uçucu yağ ile yapılan DPPH radikal süpürücü aktivite testinde ise, 0.5 mg/ml uçucu yağ konsantrasyonunda %6.44'lük inhibisyon, 1.0 mg/ml konsantrasyon da %10.36'lük inhibisyon ve 2 mg/ml konsantrasyon da %16.19'lük inhibisyon değerleri ortaya konmuştur (Orhan vd 2009).

Thymus spathulifolius bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ile yapılan çalışmada ise %50 inhibisyon sağlayan (IC₅₀) değer 242.2 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı bitkinin uçucu yağı ile yapılan linoleik asit oksidasyon inhibisyon değeri %92'dir (Sokmen vd 2004).

Thymus caramanicus Jalas bitkisinden elde edilen uçucu yağın IC₅₀ radikal süpürücü aktivitesi 263.09 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı bitkinin uçucu yağı ile yapılan linoleik asit oksidasyon inhibisyon değeri %79.03'dür (Safaei-Ghomi vd 2009).

Thymus sipyleus subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağlar ile yapılan çalışmalarda, *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*'un IC₅₀ radikal süpürücü aktivitesi 2670 µg/ml olarak bulunurken, *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*'ın radikal süpürücü aktivitesi diğer varyetelere göre daha yüksek çıkmış ve IC₅₀ değeri 220 µg/ml olarak bulunmuştur (Tepe vd 2005b). Aynı bitkilerin uçucu yağları ile yapılan linoleik asit oksidasyon inhibisyon testinde ise *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*'un uçucu yağının bir aktivite göstermediği bulunurken, *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*'ın uçucu yağının linoleik asit oksidasyon inhibisyon değeri %92 bulunmuş ve sentetik antioksidan butil hidroksitoluen'in (BHT) linoleik asit oksidasyon inhibisyon değerine (%96) yaklaşmıştır (Tepe vd 2005b).

1.6. Uçucu Yağlar

Birçok bitkiden elde edilen uçucu yağlar son zamanlarda bilimsel ilgi kazanmıştır (Tepe vd 2005a). Günümüzde, uçucu yağlar değişik amaçlara yönelik, özellikle bilimsel ve ticari olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi gelmektedir (Rao-Rajeswara vd 2005). Uçucu yağlar, geniş bir kullanım alanına sahip olduğu için son zamanlarda birçok bilim adamının ilgisini çekmiş ve bu yağların kimyasal yapıları incelenmiş, biyolojik aktiviteleri merak konusu olmuştur (Barocelli vd 2004). Bitki uçucu yağları, bitkinin korunmasında, adaptasyonunda ve tozlaşmasında görev alırlar (Kartal vd 2007). Günümüzde tıbbi bitkilerin ve bu bitkilere ait uçucu yağların saf ve özellikle ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik açıdan oldukça önemlidir.

Uçucu yağlar, bitkilerden genellikle distilasyon ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı olan, bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır (Tanker vd 1990). Bitkiye özgü bir koku ve tat verirler. Çeşitlilikleri ve oranları bitki türüne göre değişir. Su buharı ile sürüklenir, suda çözünmez, organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler (Baytop ve Başer 1995, Safaei - Ghomi vd 2009).

Uçucu yağlar oldukça kompleks bir içeriğe sahip olup yapılarında monoterpenler, seskiterpenler, alkoller, aldehitler, ketonlar, fenoller, eterler, peroksitler, ve oksitlerini içerirler. Bitkinin uçucu yağ bileşenleri ve kalitesi, bitkinin türüne, coğrafik durumuna, yetiştiği toprak yapısına, iklim koşullarına, hasat zamanına, seçilen organ ve ekstraksiyon yöntemine göre değişebilmektedir (Perry vd 1999, Congiu vd 2002, Zrira vd 2003). Genellikle yağ kompozisyonunu farklı bileşenler oluşturmaya rağmen birçok türde bir bileşen daha fazla miktarda bulunur. Ana bileşenler yağ içerisinde yüksek oranda (%20-70) bulunurken diğer bileşenler ise eser seviyede bulunmaktadır. Ancak eser seviyede olan birçok bileşenin, uçucu yağın biyolojik aktivitesine önemli seviyede etkisi olabileceği de belirtilmektedir (Yu vd 2004).

Günümüzde tıbbi, aromatik ve baharat bitkileri dünya ticaretinde önemli bir yere sahiptir. Dünyada tedavide en fazla tıbbi bitki kullanan ve bunları belgeleyen ülke Çin olup onu bazı Avrupa ülkeleri izlemektedir. ABD’de doğal olarak geniş bir alana

yayılmış aromatik bitkiler içerisinde uçucu yağ bitkileri, en yüksek ekonomik öneme sahip olanıdır (Simon 1993).

Türkiye'nin ekolojisindeki büyük farklılıklar sayesinde yurdumuzda tıbbi ve aromatik bitkilerin çoğu bulunmaktadır. Sert ve ılıman iklim bitkilerinden yarı tropik bitkilere kadar pek çok bitki ülkemizde yetişme olanağı bulmaktadır. Anadolu'nun, üç fitocoğrafik bölgenin (Avrupa-Sibiry, Akdeniz ve İran-Turan) kesiştiği bölgede bulunması ve tür endemizminin yüksek oluşu bu bitki çeşitliliğini sağlamaktadır. Türkiye florasına ait türlerin %30'u aromatik bitkilerdir. Aromatik bitkiler uçucu yağların esas kaynaklarıdır (Yaşar 2005).

1.6.1. Uçucu yağların bulunduğu bitkiler ve bitkide bulunduğu bölgeler

Uçucu yağlar en çok Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Coniferae, Compositae, Umbelliferae ve Graminae familyalarında bulunurlar. Bitkilerin bağlı bulunduğu familyalara göre salgı tüyünde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde uçucu yağlar bulunabilirler (<http://ogrenci.hacettepe.edu.tr/~serkan02/kognozi/UCUCUYAG.pdf>- 9.10. 2009).

1.6.2. Uçucu yağların kullanıldıkları alanlar

Bitkiden elde edilen doğal ürünlerin birçoğu biyolojik aktivite gösterirler ve bazıları da gıda katkı maddesi olarak kullanılırlar. Sentetik antioksidanlar 1940'lerden beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Kartal vd 2007). Fakat, toksikoloji ve gıda alanında uzman kişiler gıdalarda kullanılan sentetik antioksidanlardan olan BHT ve butillenmiş hidroksiyanozillün (BHA) yan etkilerini göstermişlerdir (Tepe vd 2005b). Örnek olarak, bu maddeler canlı organizmalarda karsinojenik etki gösterebilirler (Ames 1983, Baardseth 1989). Bu gibi nedenlerden dolayı günümüzde doğal kaynaklar tercih edilmektedir. Bu yüzden son yirmi yıldan beri araştırmacılar doğal antioksidanların araştırılması üzerine yoğunlaştıkları için bitkileri antioksidan özellikleri bakımından incelemektedirler (Kartal vd 2007). Uçucu yağlardaki fenolik bileşiklere (fenolik asit, polifenol ve flavonoidler) antioksidan ve tatlandırıcı gibi özelliklerinden dolayı ilgi artmaktadır (Lagouri vd 1993, Tsimidou ve Boskou 1994, Lagouri ve Boskou 1995, Sacchetti vd 2005, Issa vd 2006). Yapılan çalışmalarda birçok bitki türünden elde

edilen uçucu yağların antimikrobiyal (Sokmen vd 2004, Hazzit vd 2009) ve antioksidan aktiviteleri ortaya konmuştur. *In vitro* çalışmalarla, birçok *Thymus* türünün uçucu yağının ve ekstraktının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır (Zygadlo vd 1995, Dapkevicius vd 1998, Hazzit vd 2009). Aromatik bitki ekstraktı veya doğal uçucu yağ içeren yiyeceklerin tüketiminin serbest radikalın neden olduğu hastalıkların tehlikesini azaltması beklenmektedir (Young ve Woodside 2001, Milan 2006).

Peroksidasyon, birçok hastalığın etiyolojisi ve patogenezi ile ilgilidir (Halliwell ve Gutteridge 1999a). Serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan hücrel bileşenleri koruyan çeşitli savunma mekanizmalarının olmasına rağmen (Halliwell ve Gutteridge 1999b) bunlar oksidatif stres sırasında etkisiz olabilirler. Belirli içecek, meyve ve sebzenin, patolojisinde serbest radikallerin rol oynadığı hastalıkların ilerleyişine etki edebilirler. Bu yüzden uçucu yağlar, yararlı anti-peroksidatif özelliğe sahip olan fitokimyasalların zengin kaynağı olabilirler.

Birçok uçucu yağın böceklerle karşı kuvvetli toksik etki gösterdiği de ortaya konmuştur. Bu çalışmalar uçucu yağların insektisidal özelliğini göstermiştir (Shalaby 1998, Zaridah vd 2006, Knio vd 2008).

Birçok *Thymus* türünün uçucu yağı ve ekstraktı eczacılıkta, kozmetikte, parfüm endüstrisinde ve birçok gıda ürününün tatlandırılmasında ve korunmasında kullanılmaktadır (Bauer vd 1997).

1.6.3. Uçucu yağ elde etme yöntemleri

Uçucu yağ eldesi için 1300'lü yılların başında İspanya ve Fransa'da distilasyon metodu geliştirilmiş, 1550'li yıllara gelindiğinde farmakoloji gibi farklı dalların ihtiyacına cevap verebilmek amacıyla yeni teknikler uygulanmaya başlanmıştır. Bugün klasik distilasyon yöntemlerinin yanı sıra ileri teknolojiyi kullanan modern yöntemlerde uygulanmaktadır (Kılıç 2008).

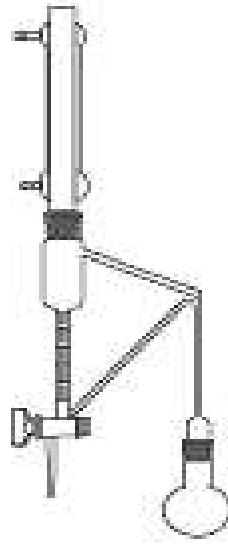
Distilasyon, sıvıların kaynama noktalarındaki farklardan yararlanılarak gerçekleştirilen bir ayırma işlemidir. Bu yöntem ile elde edilen uçucu yağlar:

- Yüksek oranda kaynama noktası düşük bileşikler,

- Az miktarda kaynama noktası yüksek ve suda çözünen bileşikler içermektedir.

Distilasyon yöntemleri, su distilasyonu, buhar distilasyonu ve vakum distilasyonu olmak üzere 3'e ayrılmaktadır:

Su distilasyonu, uçucu bileşiklerin eldesin de yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Küçük ölçekli üretimlerde, Clevenger tipi (Şekil 1.7) bir aparatla yapılan distilasyon işlemi, endüstriyel uygulamalarda büyük distilasyon kazanlarında gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1.7. Clevenger cihazı (www.glasscolabware.com/.../products.php?p=eea247-30.10.2009)

Yöntemin esası; soğutucu ile irtibatlandırılan bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılması esasına dayanmaktadır. Uçucu yağların bileşimi pH'a bağlı olarak değişse de su distilasyonu yönteminde genellikle sıvının pH değeri kontrol edilememektedir (Fakhari vd 2005).

Buhar distilasyonu yönteminde, cam kap içerisine yerleştirilen taze bitki materyaline basınç yardımıyla uygulanan buhar, yağ damlacıklarını da beraberinde

sürükleyerek toplama kabına getirmekte ve yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmaktadır (Linskens ve Jackson 1997).

Vakum distilasyonu yönteminde, bazı bileşiklerin kaynama noktaları oldukça yüksektir. Bu bileşikleri elde etmek amacıyla sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürmek daha etkilidir. Basıncı bir kez bileşiğin buhar basıncının altına indirilirse, kaynama ve distilasyon işlemi başlamaktadır (Kılıç 2008).

1.6.4. Uçucu yağlar ve Hep G2 hücreleri ile yapılan kanser araştırmaları

Hep G2, insan karaciğer tümöründen elde edilen hücre dizisidir. Bu hücre dizisi ksenobiyotik-metabolize edici birçok aktivitesinin olması ile karakterizedir ve insan karaciğerindeki kimyasalların metabolizması ve sitotoksitesi hakkında bilgi vermesi bakımından kullanışlı bir sistem olduğu açıklanmaktadır (Rueff vd 1996).

Doğa, daktinomisin ve doksorubisin gibi mikroorganizmalardan ya da vinblastin, irinotekan, topotekan, vinkristin gibi bitkilerden elde edilen bugün kullandığımız birçok etkili antikanser ilacının kaynağını sağlamıştır (Ruffa vd 2002). Flora üzerinde devam eden çalışmalara rağmen yüksek yapılı yaklaşık 250.000 tür bitkinin sadece %10'u kimyasal ve farmakolojik olarak değerlendirilmiştir. Doğal kaynaklardan yeni sitotoksik etmenlerin araştırılması dünya genelinde bulunan bilim adamları arasındaki işbirliği ile devam etmektedir (Cragg ve Newman 1999).

Antikanser aktivite için klinik denemelerdeki ilaçların yaklaşık %50 si doğal kaynaklardan ya da bunlarla ilişkili olanlardan izole edilmiştir (Cragg ve Newman 2000). Uçucu yağların ana bileşenlerinin belirlenmesi, güvenilirliklerinin test edilmesi ve hastalık tedavisindeki tıbbi değerinin ortaya çıkarılması ilaç geliştirilmesi ve ilaç hedefleyen terapiler için önemli bir adım sağlayacaktır (Usta vd 2009).

Uçucu yağlar plazma membranını geçebilirler ve etkilerini intrasellüler proteinler ve/veya intra-organel bölgelerle etkileşerek gösterirler. Birçok çalışma, uçucu yağlar için mitokondrilerin olası hedef olması ile, enzim inhibisyonundan hücre ölümüne kadar birçok kimyasal olayı başlatması arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Ka vd 2003, Duchen 2004).

Coriandrum sativum'un tohumundan elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin Hep G2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Hep G2 hücrelerinin *C. sativum*'un tohumundan elde edilen uçucu yağda en yüksek oranda bulunan linalool bileşiğine karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Linalool Hep G2 hücrelerinin %50'sini (IC₅₀) 0.4 µM'da öldürürken, %100'ünü (IC₁₀₀) 2 µM'da öldürmüştür (Usta vd 2009). *C. sativum*'un tohumundan elde edilen uçucu yağda bulunan diğer bileşiklerin de Hep G2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmış ve yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğu bulunmuştur. 100 µM konsantrasyonda uygulanan bileşiklerden, mirsen ve D- nerolidol uygulamasında hücrelerin %26'sı, dekanal uygulamasında hücrelerin %47'si, γ-terpinen, kamfor, terpineol-4, estragol, geraniol ve timol uygulamasında hücrelerin %60-69'unun, limonen, karvaserol ve geranil asetat uygulamasında hücrelerin %70-78'inin ve α-pinen ve β-pinen uygulamasında hücrelerin %82-85'inin yaşadığı ortaya konmuştur (Usta vd 2009).

Aristolochia mollissima Hance (Aristolochiaceae) rizomlarından ve toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın Hep G2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Rizomlardan elde edilen yağla yapılan sitotoksite çalışmasında IC₅₀ değeri 33.2 µg/ml bulunurken, yapraklardan elde edilen yağla yapılan sitotoksite çalışmasında IC₅₀ değeri 40.7 µg/ml olduğu gösterilmiştir (Yu vd 2007).

Lindera strychnifolia (Lauraceae) (LS) bitkisinin yapraklarından ve köklerinden elde edilen uçucu yağın Hep G2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisi araştırılmıştır. LS'nin köklerinden elde edilen yağla yapılan sitotoksite çalışmasında IC₅₀ değeri 38 µg/ml bulunurken, yapraklardan elde edilen yağla yapılan sitotoksite çalışmasında IC₅₀ değeri 22.7µg/ml olduğu gösterilmiştir (Yan vd 2009).

Bu tezin amacı, Antalya florasında endemik olarak yetişen *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın, *in vitro* koşullarda antioksidan özelliklerini ortaya koyarak, pek çok toksik maddenin ve karsinojenik etkili bileşenlerin biyotransformasyonunun gerçekleştiği insan karaciğer kanseri hücrelerinde (Hepatoma G2) sitotoksik etkisini araştırmak, uçucu yağın prooksidan/oksidan etkisini, uçucu yağa maruz bırakılan hücrelerin membranlarında meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondealdehit miktarının hesaplanmasıyla ortaya koymak, uçucu yağın antioksidan

(koruyucu) özelliğini ise, güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e maruz bırakılmış hücrelerde oluşturulacak olan membran hasarına karşı koruyucu etki göstermesiyle açıklamaktır.

Çalışmalarımızın sonunda *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağların, *in vitro* olarak antioksidan aktivitesinin ortaya konması yeni antioksidan ilaçların üretiminde, hepatoma G2 hücrelerinde sitotoksik etkilerinden ve membran hasarına neden olmasından dolayı da yeni antikanser ilaçların üretiminde doğal bitkisel kaynak olarak önerilmesi ulusal ekonomiye önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Doğal olarak elde edilen uçucu yağların kullanılması ile sentetik katkı maddelerinin kullanımı azalacak, böylece insan sağlığının korunmasına katkı sağlayacaktır. *T. revolutus* C. uçucu yağının prooksidan/oksidan ve antioksidan özelliklerinin ortaya konmasıyla ilaç sanayinde kullanılması, doğal kaynaklarımızın değerlendirebilecek yetkinliğe erişmemize katkıda bulunacaktır.

2. MATERİYAL ve METOT

2.1. Bitkilerin Toplanması ve Uçucu Yağın Elde Edilmesi

Thymus revolutus Célak (*T. revolutus* C.) Haziran 2008 döneminde Akdeniz Üniversitesinin Ziraat Fakültesinin güneyinde bulunan açık kayalık ve çakıllı alandan toplandı (Çizelge 2.1) ve Prof. Dr. Hüseyin Sümbül tarafından teşhisi yapıldı. *T. revolutus* C. toplandıktan sonra ışık almayan, havadar bir ortamda, oda sıcaklığında kurutuldu. *T. revolutus* C. bitkisinin toprak üstü organlarının uçucu yağı, Clevenger (su buharı distilasyon) cihazı (Europen Pharmacopoeia1975) ile elde edildi. Oda sıcaklığında kurutulmuş *T. revolutus* C. bitkisinden 100 gram (gr) tartılıp üzerine 1.9 litre (lt) su ilave edilip iki saat su distilasyonuna tabi tutularak elde edilen uçucu yağlar deneylerde kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

Uçucu yağın bileşenlerinin analizi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinde, gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) yöntemi ile yapılmıştır. Sistemin çalışma şartları çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *T. revolutus* C.’ın toplandığı bölge ve özellikleri (Ünal ve Gökçeoğlu 2003)

Tür adı	Toplandığı Yer	Bulunduğu yerin Özellikleri	Yükseklik (m)	Çiçeklenme zamanı (ay)
<i>Thymus revolutus</i> Célak	C3-Ziraat Fakültesinin Güneyi	Açık kayalık, çakıllı alan	50-60	5-7

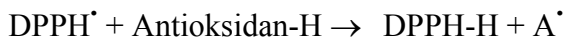
Çizelge 2.2. GC/MS sisteminin çalışma şartları

Enjeksiyon Bloğu	240°C
Dedektör	250°C
Akış Hızı(psi)	10
Dedektör	70 eV
İyonlaştırma Türü	EI
Kullanılan Gaz	Helyum
Kullanılan Kolon	Cp WAX 52 CB 50 m * 0,32 mm, 1,2 µm
Sıcaklık Programı	60°C den 220°C'e dakikada 2°C'lik artışla ulaşıyor. 220°C'de 20 dakika bekliyor.
Kullanılan Kütüphaneler	Wiley, Nist, Tutor
Kullanılan GC/MS'in Özellikleri	QP 5050 GC/MS

2.2. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.1. Antiradikal aktivite ölçümü (DPPH Testi)

Kararlı organik radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH[•]), bitki uçucu yağları ve yiyecek maddelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kararlı serbest radikal DPPH[•]'ın, elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahipse metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisinin renginin o kadar açık olması beklenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilebilir:



30 dakika inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH[•] derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Polariteden bağımsız, çok hızlı, kolay ve tekrar

edilebilir bir metottur (Koleva vd 2002). Ayrıca çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmedikinden dolayı da tercih edilmektedir.

T. revolutus C.'dan elde ettiğimiz uçucu yağın antiradikal (elektron veya hidrojen transferi) özelliği DPPH radikal çözeltisi kullanılarak 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bu yöntem ile test edilen *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın metanol içerisinde çözülerek hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki örneklerinden 50 µl alınarak tüplere kondu. Her bir tüpe %0.004'lük (w/v) metanol de hazırlanmış olan DPPH (Sigma) çözeltisinden 5 ml eklendi. 30 dakikalık karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçüldü. Farklı konsantrasyondaki uçucu yağ örneğinin absorbans değeri boş kontrole (50 µl metanol) karşı değerlendirildi. Örnek ve kontrol için beş tekrarlı seriler hazırlandı ve ölçümler beş tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Farklı konsantrasyonlardaki yağ örneğinin ve boş kontrol testlerinin absorbans değerleri kullanılarak uçucu yağ % inhibisyon değerleri aşağıda verildiği şekliyle hesaplandı (Burits ve Bucar 2000).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri uçucu yağ derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek %50 renk açılımını sağlayan derişim %50 inhibisyon (IC₅₀) değeri olarak hesaplandı. Karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılan BHT, askorbik asit, BHA ve α-tokoferol içinde aynı işlemler uygulanmıştır.

2.2.2. Antioksidan aktivite ölçümü (β-karoten/linoleik asit renk açılım testi)

β-karoten renk açılımı yöntemi, linoleik asit ve oksijenle doygun sulu ortamda linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienler ve diğer uçucu bozunma ürünlerinin β-karotenin rengini açması temeline dayanır (Şekil 2.1). Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden β-karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

Linoleik asit + (O₂-H₂O) → Konjuge dienler ve diğer bozunma ürünleri

↓

β-karoten → renk açılımı

Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β-karoten + antioksidan → rengin korunumu

Şekil 2.1. Antioksidan aktivite ölçümünün (β-karoten/linoleik asit renk açılım testi) etki mekanizması

Uçucu yağ örneği ve pozitif kontrol butil hidroksi toluen (BHT) (Merck) çözeltileri 2 mg/ml olacak şekilde etanol de çözülerek test örnekleri hazırlandı. Spektrofotometri de kullanılacak olan β-karoten-linoleik asit karışımı şu şekilde hazırlandı: 0.5 mg β-karoten 1 ml kloroformda çözüldü. 25 µl linoleik asit 200 mg Tween 80 (Sigma) ile emülsiyon haline getirilerek β-karoten çözeltisine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra evaporatör de 50°C’de kuvvetli vakum uygulanarak kloroformu uçuruldu. Karışım üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak olan önceden 30 dakika boyunca oksijenle doyurulmuş (akış hızı 100 ml dak⁻¹) distile sudan 100 ml eklendi ve 1 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sonunda berrak, sarı renkli β-karoten-linoleik asit test karışımı elde edildi. Bu karışımdan 2500 µl’lik kısımlar tüplere alındı. 350 µl’lik uçucu yağ test çözeltileri, ilgili serilere ilave edildi. Aynı miktar etanol kontrol serisine uygulandı. Örnek ve kontrol için beş tekrarlı seriler hazırlandı ve ölçümler beş tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Daha sonra tüplerin ağzları kapatılarak oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletildikten sonra 490 nm’de absorbansları ölçüldü.

T. revolutus C.’dan elde edilen uçucu yağın antioksidan aktivitesi, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT’nin antioksidan aktivitesine oranlanarak, yüzde bağlı antioksidan aktivite (BAA) hesaplandı (Dapkevicius vd 1998). Ölçümler 490 nm’de spektrofotometrik olarak yapıldı.

$$\%BAA = \frac{\text{Uçucu yağın Absorbansı}}{\text{BHT' nin Absorbansı}} \times 100$$

2.3. Hepatoma G2 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması

Çalışmada kullanılan olan Hepatoma G2 (insan karaciğer kanseri hücresi) hücre dizisi Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

Hepatoma G2 hücreleri (Hep G2), 200 mM L-Glutamin (Gibco), %10 foetal bovin serum (Sigma) ve %1 antibiyotik-antimikotik (Biological Industries) karışımı içeren steril Minimum Essential Medium (MEM) (Biological Industries) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler hücre yoğunluğuna göre 2-3 günde bir beslendi ve çok yoğunlaşan hücrelerin tripsinizasyon işlemi, Tripsin-EDTA (Biological Industries'den) çözeltisi kullanılarak yapıldı. Hücreler yapıştıkları flasktan kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 1000xg'de 6 dakika çevrildi. Supernatant kısmı steril bir şekilde uzaklaştırıldı ve elde edilen pellet steril MEM ile süspanse edildikten sonra flasklara bölündü ve çoğaltılmaya devam edildi. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere 1.5 ml hücre dondurma çözeltisi (%10 gliserol, %50 serum ve %40 serum içermeyen besiyeri) içinde cryo tüpe alındı ve -80°C' de saklandı.

2.4. Sitotoksosite Ölçümleri

Hücreler tripsinize edilerek yapışmış oldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı. Hücrelerin, kuyucuklu plaklara (96 well plate) aktarılması sırasında hücreleri saymak için Tripan mavisi (1/1 oranında) (Biological Industries) testi uygulandı. Canlı hücrelerin boyayı almayıp, ölü hücrelerin boyayı alması esasına dayanan yöntemde canlı ve ölü hücreler hemositometre lamı kullanılarak sayılarak ml'deki hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu mikropklara (96 well plate), her kuyuya 1x10⁴ hücre olacak şekilde 200 µl hücre süspansiyonu dağıtıldı. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası kuyucuklarda kullanılan besiyerleri atılarak yenilendi. Uçucu yağ, dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma) ile seyreltilip, konsantrasyonları 0-200 µg/ml'ye ayarlanarak içerisinde hücre bulunan kuyucuklara eklendi. Kontrol grupları olarak, hiç bir şeyle muamele edilmemiş hücreler ve DMSO (%0.5) ile muamele edilmiş hücreler kullanıldı. Ayrıca, hücre içermeyen ancak MEM içeren kuyucuklarda kullanıldı. Her bir kontrol

grubu için beş tekrar kullanıldı. Hücreler 37°C’de inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübe edildiler. İnkübasyon sonrasında hücrelerin canlılığı Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti (Promega) ile ölçüldü. Bu metodun esası, canlı hücrelerin resorurini, floresan bir ürün olan resorufine çevirme yeteneğine dayanır. Ölü hücreler ise metabolik kapasitelerini çok çabuk kaybetmelerinden dolayı floresan sinyali oluşturan ürün üretemezler.

Hücrelerin canlılığı (IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀) 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra her bir kuyuya Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kitinden 20 µl/100 µl besiyeri eklenerek 1 saat 37°C’de bekletilerek, hücrelerin resozurini resorufine redüksiyonunun 560 nm’de eksitasyon ve 590 nm’de emisyon değerlerinin floresan spektrofotometrede (PerkinElmer LS 55) ölçülmesiyle hesaplandı (Gloeckner vd 2001). Yaşayan hücre yüzdesi; sadece hücre içeren kontrol grubunun ortalama absorbans değerlerinin farklı uçucu yağ konsantrasyonlarıyla inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlı hücre olarak ifade edildi.

Çok güçlü bir oksidan olan H₂O₂’in, hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi (IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀) de aynı test ile hücrelerin farklı konsantrasyonlarda H₂O₂’e (Merck) 24 saat maruz bırakılmasıyla hesaplandı. Uçucu yağın hücreler üzerine koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymak için, hücreler 2.5-30 µg/ml konsantrasyon aralığında farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağa (<IC₅₀) bir saat ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 24 saat H₂O₂’e (IC₅₀, IC₇₀) maruz bırakılarak sitotoksik etki sonuçları hesaplandı. Kontrol grubu olan; hiç bir şeyle muamele edilmemiş hücreler, DMSO ile muamele edilmiş hücreler ve hücresiz besiyeri içerenler beş tekrarlı çalışıldı. Ayrıca, her bir farklı yağ konsantrasyonu için de beş tekrar yapıldı.

2.5. Uçucu Yağın Hücre Membranı Üzerine Etkisi

Hep G2 hücreleri DMSO içerisinde çözünmüş farklı konsantrasyonlardaki (IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀) uçucu yağa 24 saat maruz bırakıldıktan sonra MDA miktarının ölçülmesiyle hücre membran hasarı ortaya kondu. Uçucu yağın farklı konsantrasyonlarıyla (<IC₅₀) ön uygulamaya maruz bırakılmış Hep G2 hücreleri IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂’e 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MDA miktarındaki değişimler, güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı uçucu yağın

hücre membranı koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koydu. Ölçümler beş tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

2.5.1. Hücre supernatantının hazırlanışı

Yeterli hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra hücreler tripsinize edilerek flasktan ayrıldı ve santrifüj edildi. Elde edilen pelletlerin tümü birleştirildi ve her bir flaska 150.000 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Hücreler 24 saat 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin bir kısmı kontrol olarak ayrıldı, bir kısmı ise DMSO içerisinde çözülmüş farklı konsantrasyonlardaki (IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀) uçucu yağa maruz bırakılarak 24 saat 37°C’de inkübe edildi.

Uçucu yağ uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra uçucu yağ uygulanan ve kontrol flasklarındaki hücreler tripsinlenerek alındı. 600xg’de çevrilerek elde edilen pellet PBS (fosfat tamponlu tuz, pH 7) çözeltisi ile 3 kez yıkandı. 300 µl tampon (100 mM K₂HPO₄ ve 100 mM KH₂PO₄ çözeltileri pH 7), 1180 µl distile su ve 20 µl proteaz inhibitör kokteyl (Sigma) karıştırılarak homojenizasyon tamponu hazırlandı. En son yıkamadan kalan pellet, homojenizasyon tamponuyla seyreltilerek ependorf tüplerine aktarıldı. Branson Sonifier 250 marka ultrasonik parçalayıcıda 3x15’er saniye buz içerisinde homojenize edildikten sonra 32 000xg’de 45 dakika 4°C da santrifüj edildi. Protein kaynağı olarak kullanılacak olan supernatant, ependorf tüplerine bölünerek – 80°C de saklandı. Protein miktarı tayini Bradford yöntemine göre yapıldı (Bradford 1976).

2.5.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Kantitatif protein miktarları Bradford metodu ile ölçüldü (Bradford 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brillant blue (Coomassie parlak mavisi) G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Coomassie brillant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerindeki değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir.

İlgilenilen proteinin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen standart protein ile çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden hesaplanır. Protein standardı için 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 mg/ml konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) çözeltisi kullanıldı.

Protein standart grafiği hazırlandıktan sonra örnekler 1:75 oranında dilüe edilerek, 20 µl örnek üzerine 200 µl renklendirme reaktifi ilave edildi. On dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Standart grafikten yararlanılarak örneklerin protein miktarları belirlendi.

2.5.3. Malondealdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesi

MDA düzeyleri Wasowicz, Neve ve Peretz’in yöntemine göre yapıldı (Wasowics vd 1993). Metodun temel prensibi, membran hasarı sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA’nın tiyobarbiturik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazında ekstrakte edilerek 525 nm (eksitasyon) ve 547 nm (emisyon)’de floresan spektrofotometrik (PerkinElmer LS 55) olarak okunması esasına dayanır.

10 µl hücre supernatantı, 200 µl distile su ve 200 µl TBA (29 mM; 8.75 M Asetik asit içerisinde) iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat boyunca 100°C’de kaynatıldı. 1 saat sonunda tüpler musluk suyu altında soğutulduktan sonra 5 µl 5M HCl (Merck) ve 600 µl n-bütanol (Sigma) eklenerek tüm tüpler 3-4 dakika boyunca kuvvetle karıştırıldıktan sonra 10 dakika 3000xg’de sentrifüj edilerek üst faz ayrıldı ve floresan spektrofotometrede (PerkinElmer LS 55) yukarıda belirtilen dalga boylarında okundu.

Numunelerin MDA içerikleri standart grafiğinden [1,1,3,3-tetrametoksipropan (Merck) standart solüsyonu, 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4 nmol/ml konsantrasyonlarında] hesaplandı. Aynı numunelerden Bradford metodu ile protein ölçümü yapılarak MDA seviyesi nmol/mg protein olarak verildi.

2.6. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Minitab 15.0 ve SAS (V7) paket programları kullanılarak yapıldı. Öncelikle, varyans analizi (ANOVA) için

gerekli olan normalliğin ve homojenliğin sağlanabilmesi için 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksosite verileri karekök transformasyonuna, uçucu yağın hücreler üzerine koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koyan deneyin verileri logaritmik transformasyona uğratıldı. H_2O_2 'nin sitotoksik etkisini, membran hasarı ve H_2O_2 oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koyan veriler ise herhangi bir transformasyona ihtiyaç duyulmadan olduğu gibi kullanıldı. Uygulama grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olup olmadığını belirlemek için öncelikle Varyans Analizi (ANOVA) (Snedor ve Cochran 1967) yapıldı. Uygulama grupları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli bulunması halinde uygulama grupları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (Duncan 1955) yapılarak birbirleri ile kıyaslandı (www.minitab.com/products/minitab).

3. BULGULAR

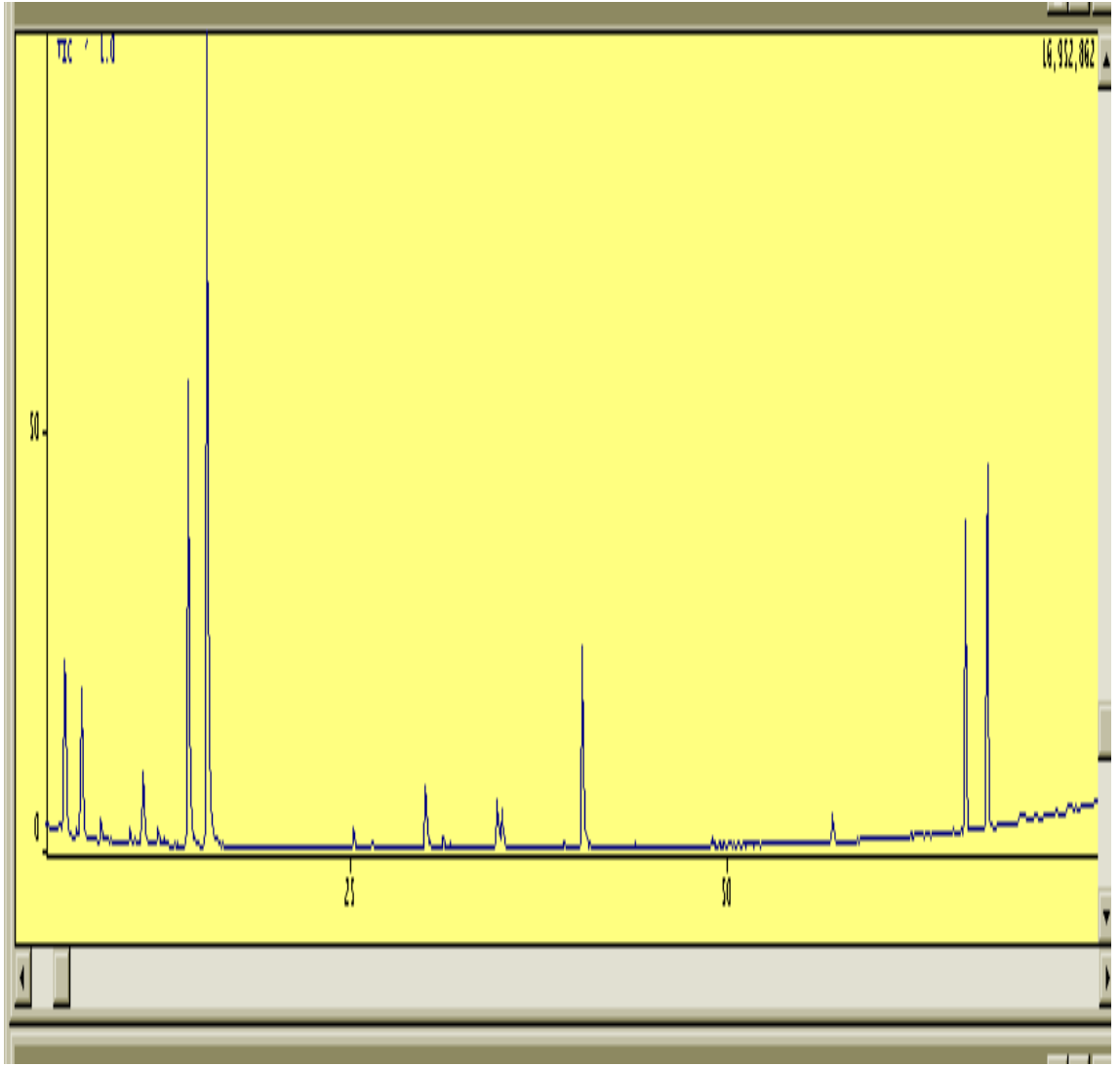
3.1. *T. revolutus* C. Bitkisinden Uçucu Yağın Eldesi ve Bileşenlerinin Belirlenmesi

Akdeniz Üniversitesi kampusundan toplanan *T. revolutus* C. bitkisinin toprak üstü organlarından uçucu yağ elde edilmiş ve kimyasal bileşenleri çizelge 3.1’de, kromotogramı ise şekil 3.1’de verilmiştir.

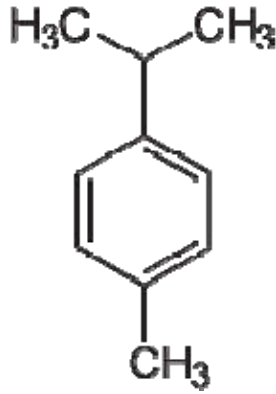
Yapılan GC/MS analizine göre *T. revolutus* C. bitkisinin uçucu yağının en önemli bileşeni %32.57’lik oran ile simen’dir. Bunu γ -terpinen (%17.18), karvakrol (%11.89), timol (%9.97) ve borneol (%7.55) takip etmektedir (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. *T. revolutus* C. bitkisinin uçucu yağının GC/MS yöntemiyle belirlenen kimyasal bileşenleri

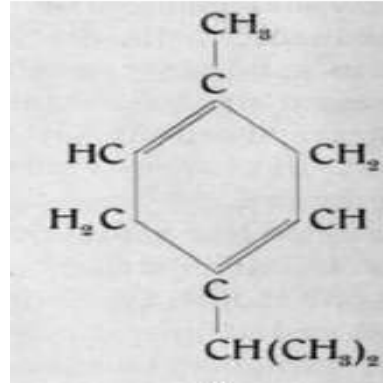
Bileşen	Alıkonma Süresi (Retention Time)	% Oran
Alfa-pinen	6,0	5.71
Kamfen	7,1	4.06
Beta-pinen	8,4	0.42
Alfa-terpinen	11,2	2.55
Gamma-terpinen	14,1	17.18
Simen	15,4	32.57
Borneol	40,3	7.55
Kamfor	29,9	2.87
Karyofillen	34,7	2.02
Terpinen-4-ol	35,0	1.40
Timol	65,8	9.97
Karvakrol	67,3	11.89



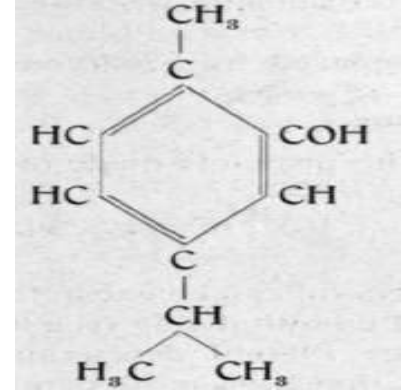
Şekil 3.1. *T. revolutus* C.'in uçucu yağının kromatogramı



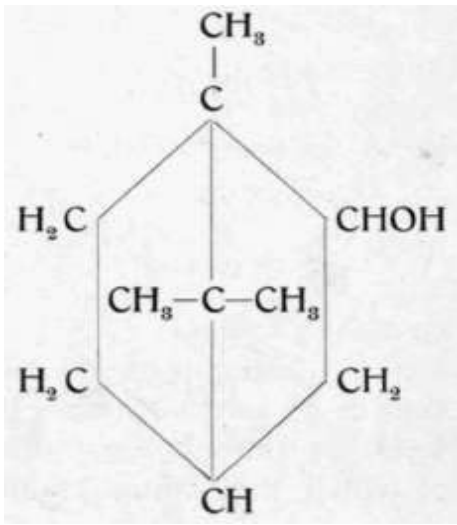
Simen



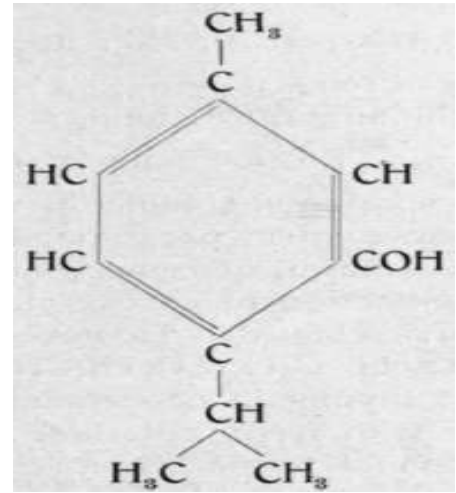
γ -terpinen



Karvakrol



Borneol



Timol

Şekil 3.2. *T. revolutus* C. uçucu yağının başlıca bileşenlerinin kimyasal yapıları (commons.wiki.media.org/wiki/File:p-cymen.svg, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol 1/terpinene.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol1/carvacrol.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy/The-volatile-oils-Vol 1/borneol.html>, <http://chestofbooks.com/healtharomatherapy / The-volatile-oils-Vol 1/thymol.html>)

3.2. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesi

3.2.1. Antiradikal aktivite ölçümü (DPPH Testi)

Örneğimizin ortamda bulunan DPPH radikalinin %50'sini ortadan kaldıran konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak kabul edilmiştir. Uçucu yağın, DPPH radikalini süpürme aktivitesi BHT, askorbik asit, BHA ve α - tokoferol gibi pozitif kontrollerle

karşılaştırılmıştır. Örneğimizin ve pozitif kontrollerin DPPH radikal süpürücü kapasiteleri çizelge 3.2’de ve IC₅₀ değerleri ise çizelge 3.3’de verilmiştir. *T. revolutus* C.’nin uçucu yağı, BHT, BHA, askorbik asit ve α -tokoferollün antiradikal aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarındaki (0.1-1 mg/ml) BHA ve askorbik asitin radikal süpürme aktiviteleri kendi içinde istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmamıştır. Ancak aynı konsantrasyonlarda BHA ve askorbik asit karşılaştırıldığında radikal süpürme aktiviteleri istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmuştur. *T. revolutus* C.’in IC₅₀ değeri BHT, BHA, askorbik asit ve α -tokoferollün IC₅₀ değerlerinden istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmuştur. DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki pozitif kontrollerin radikal süpürme kapasiteleri çizelge 3.4’de verilmiştir. DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki BHT, BHA, askorbik asit ve α -tokoferollün antiradikal aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 3.4).

Uçucu yağın ortamdaki serbest radikallerin %50’sini ortadan kaldıran konsantrasyonu yaklaşık olarak BHT’den (12 kat), askorbik asitten (52 kat), BHA’dan (13 kat) ve α -tokoferolden (37 kat) daha yüksek bulunmuştur.

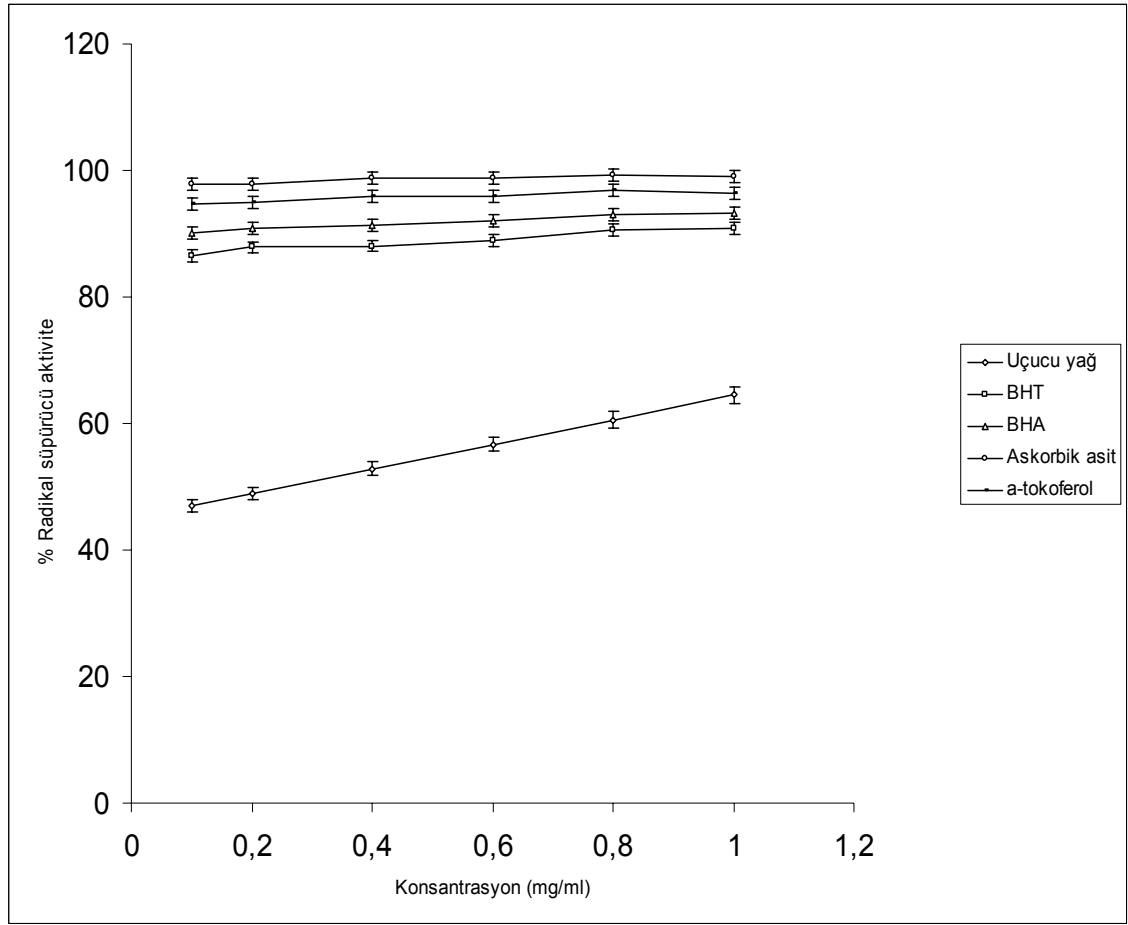
Çizelge 3.2. *T. revolutus* C.’dan elde edilen uçucu yağın ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%)

Örnek	0.1 mg/ml	0.2 mg/ml	0.4 mg/ml	0.6 mg/ml	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml
	X $\pm$ S.H.	X $\pm$ S.H.	X $\pm$ S.H.	X $\pm$ S.H.	X $\pm$ S.H.	X $\pm$ S.H.
Uçucu yağ	46.9 $\pm$ 0.2 f	48.9 $\pm$ 0.8 f	52.8 $\pm$ 0.2 e	56.7 $\pm$ 0.1 e	60.6 $\pm$ 0.2 d	64.5 $\pm$ 1.0 d
BHT	86.5 $\pm$ 0.3 c	87.9 $\pm$ 0.9 c	88.0 $\pm$ 1.2 c	88.9 $\pm$ 1.3 c	90.6 $\pm$ 1.1 b	90.9 $\pm$ 0.8 b
BHA	90.1 $\pm$ 0.1 b	90.9 $\pm$ 0.2 b	91.3 $\pm$ 0.5 b	92.1 $\pm$ 1.1 b	93.0 $\pm$ 1.0 b	93.3 $\pm$ 1.1 b
Askorbik asit	97.8 $\pm$ 0.4 a	97.9 $\pm$ 0.3 a	98.8 $\pm$ 0.3 a	98.7 $\pm$ 0.3 a	99.3 $\pm$ 0.3 a	99.1 $\pm$ 0.3 a
α -tokoferol	94.8 $\pm$ 1.1 b	94.9 $\pm$ 1.3 b	95.8 $\pm$ 0.3 a	96.0 $\pm$ 0.2 a	96.8 $\pm$ 0.0 a	96.5 $\pm$ 0.1 a

Çizelgedeki her veri (% , X $\pm$ S.H.) beş tekrarın ortalaması olup, her sütunda ayrı harflerle gösterilen veriler p<0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

S.H.: Standart Hata

X: Ortalama



Şekil 3.3. *T. revolutus* C'dan elde edilen uçucu yağın ve pozitif kontrollerin farklı konsantrasyonlarının DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%)

Çizelge 3.3. Uçucu yağın ve pozitif kontrollerin DPPH testi sonucu IC₅₀ değerleri

Örnek	DPPH Testi (IC ₅₀ , µg/ml)
	X ± S.H.
<i>T. revolutus</i> C.	250 ± 0.2 a
BHT	20.9 ± 0.3 b
Askorbik asit	4.8 ± 0.4 c
BHA	18.6 ± 0.1b
α-tokoferol	6.7 ± 1.1 c

Çizelgedeki her veri (X ± S.H.) beş tekrarın ortalaması olup, her sütunda ayrı harflerle gösterilen veriler p<0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

S.H.: Standart Hata

X: Ortalama

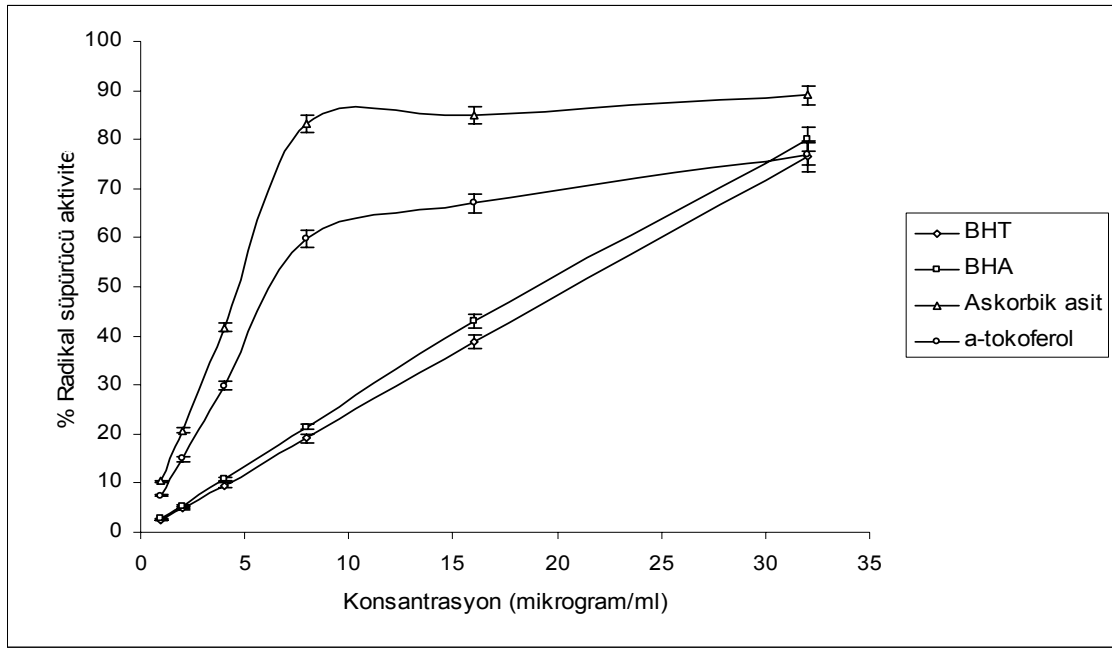
Çizelge 3.4. DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki BHT, BHA, askorbik asit ve α -tokoferollün DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%)

Örnek	1 μ g/ml X $\pm$ S.H.	2 μ g/ml X $\pm$ S.H.	4 μ g/ml X $\pm$ S.H.	8 μ g/ml X $\pm$ S.H.	16 μ g/ml X $\pm$ S.H.	32 μ g/ml X $\pm$ S.H.
BHT	2.4 $\pm$ 0.1 a	4.8 $\pm$ 0.3 a	9.6 $\pm$ 0.2 ab	19.1 $\pm$ 0.2 bc	38.3 $\pm$ 0.3 de	76.5 $\pm$ 0.3 hı
BHA	2.7 $\pm$ 0.09 a	5.4 $\pm$ 0.4 ab	10.7 $\pm$ 0.3 b	21.5 $\pm$ 0.2 c	43.01 $\pm$ 0.3 e	80.02 $\pm$ 0.5 ı
Askorbik asit	10.4 $\pm$ 0.2 b	20.8 $\pm$ 0.1 c	41.7 $\pm$ 0.4 e	83.3 $\pm$ 0.5 ı	85.0 $\pm$ 0.6 ı	89.0 $\pm$ 0.6 ıj
α -tokoferol	7.5 $\pm$ 0.1 ab	14.9 $\pm$ 0.2 b	29.8 $\pm$ 0.3 cd	59.7 $\pm$ 0.4 fg	67.0 $\pm$ 0.5 gh	77.0 $\pm$ 0.7 hı

Çizelgedeki her veri (% , X $\pm$ S.H.) beş tekrarın ortalaması olup, her sütunda ayrı harflerle gösterilen veriler p<0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

S.H.: Standart Hata

X: Ortalama

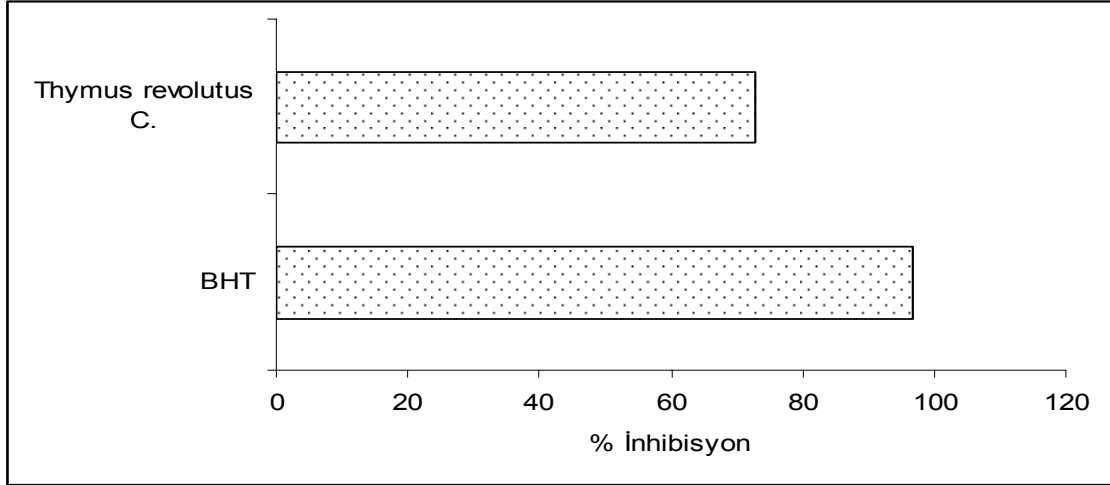


Şekil 3.4. DPPH testinde kullanılan uçucu yağ konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonlardaki BHT, BHA, askorbik asit ve α -tokoferollün DPPH radikalini süpürücü kapasitesi (%)

3.2.2. Antioksidan aktivite ölçümü (β -karoten/linoleik asit renk açılım testi)

Elde edilen sonuçlar çizelge 3.5 ve şekil 3.5’de verilmiştir. Uçucu yağın lipid peroksidasyonunun inhibisyon kapasitesi %72.8 bulunurken, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT’nin kapasitesi %96.7 bulunmuştur. Uçucu yağın, BHT’ye göre %BAA

aktivite %75.28 bulunmuştur. *T. revolutus* C.'in uçucu yağının ve BHT'nin % linoleik asit oksidasyon inhibisyon değerleri istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) bulunmuştur. Askorbik asit, BHA ve α -tokoferol uygulamaları test edilememiştir.



Şekil 3.5. *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın ve BHT'nin linoleik asit inhibisyonu

Çizelge 3.5. *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın, BHT'nin, Askorbik asitten, BHA'nın ve α -tokoferollün linoleik asit inhibisyon yüzdeleri

Örnek	β -karoten/linoleik asit testi
	(% linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu)
	$X \pm S.H.$
<i>T. revolutus</i> C.	72.8 ± 0.1 a
BHT	96.7 ± 0.0 b
Askorbik asit	Nt
BHA	Nt
α –tokoferol	Nt

Çizelgedeki veri (% , $X \pm S.H.$) beş tekrarın ortalaması olup, her sütunda ayrı harflerle gösterilen veriler $p<0.05$ olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

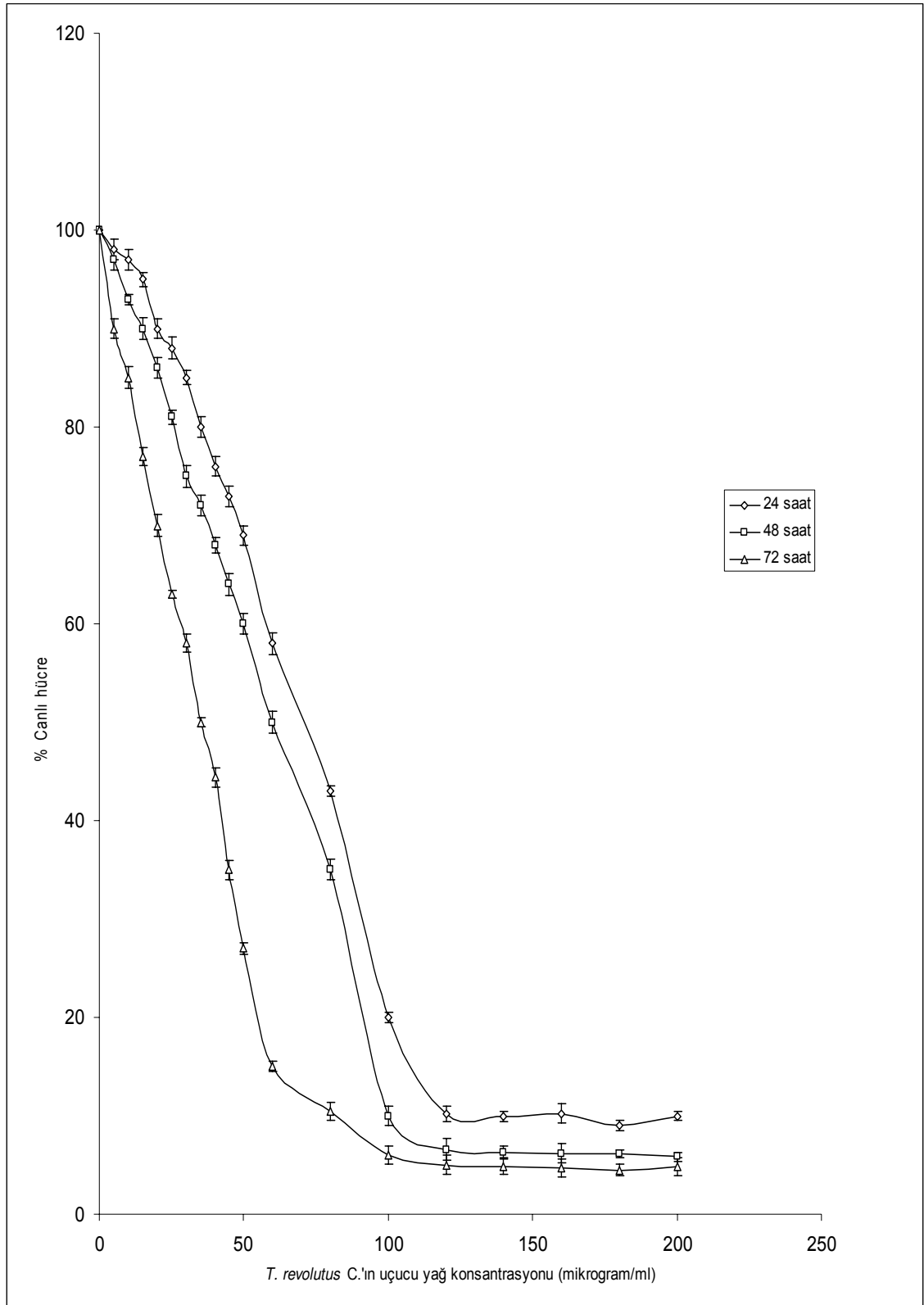
S.H.: Standart Hata

Nt: Test edilememiştir

X: Ortalama

3.3. Sitotoksik Etkilerin Belirlenmesi

T. revolutus C. bitkisinin toprak üstü organlarından elde edilen uçucu yağının Hep G2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi araştırılmış, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.6). Hep G2 hücreleri 24, 48 ve 72 saat süreyle artan konsantrasyonlarda uçucu yağa maruz bırakılarak IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren uçucu yağ konsantrasyonu) değerleri bulunmuştur. Uçucu yağ konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri çizelge 3.6'da verilmiştir. Hep G2 hücrelerinin farklı uçucu yağ konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu uçucu yağın %50 sitotoksik etki (IC₅₀) gösteren konsantrasyonu 70.15 µg/ml olarak bulunurken, aynı konsantrasyonun 48 saatlik inkübasyon sonucunda %57.5'lik sitotoksik etki ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda %99.6'lık sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. IC₅₀ konsantrasyonuna 48 saatte 61.2 µg/ml ile 72 saatte ise 35 µg/ml ile ulaşılmıştır. Ayrıca uçucu yağ ile 24 saat inkübasyon sonucu IC₁₀ değeri 20µg/ml, IC₇₀ değeri 95.3 µg/ml, 48 saat inkübasyon sonucu IC₁₀ değeri 13.4 µg/ml, IC₇₀ değeri 85.2 µg/ml olarak bulunurken 72 saat inkübasyon sonucu IC₁₀ değeri 6.1 µg/ml, IC₇₀ değeri 49 µg/ml olarak bulunmuştur. En yüksek uçucu yağ konsantrasyonunu hazırlamak için kullandığımız %0.5 DMSO konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında hücre canlılığını önemli derecede etkilemediği bulunmuştur.



Şekil 3.6. *T. revolutus* C.'in uçucu yağının Hep G2 hücre dizisinde zamana bağlı olarak sitotoksik etki

Çizelge 3.6. *T. revolutus* C. uçucu yağ konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisine sitotoksik etkisi

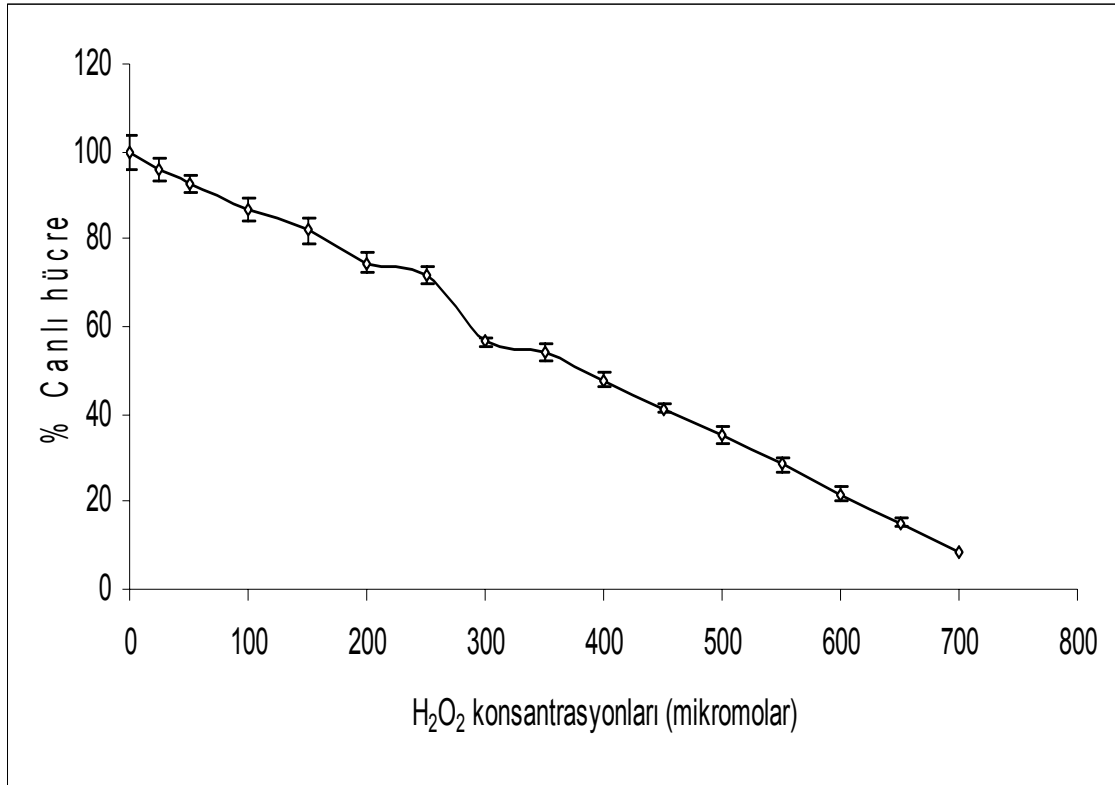
<i>T. revolutus</i> C. uçucu yağ konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlı hücre 24 saatlik inkübasyon X ± S.H.	% Canlı hücre 48 saatlik inkübasyon X ± S.H.	% Canlı hücre 72 saatlik inkübasyon X ± S.H.
5 µg/ml	98 ± 1.06 a	97 ± 1.08 a	90 ± 1.02 ab
10 µg/ml	97 ± 1.03 a	93 ± 0.52 ab	85 ± 1.09 b
15 µg/ml	95 ± 0.74 a	90 ± 1.07 ab	77 ± 0.87 c
20 µg/ml	90 ± 1.01 ab	86 ± 1.05 b	70 ± 1.07 cd
25 µg/ml	88 ± 1.09 b	81 ± 0.70 bc	63 ± 0.44 de
30 µg/ml	85 ± 0.70 b	75 ± 1.09 c	58 ± 0.91 e
35 µg/ml	80 ± 1.11 bc	72 ± 1.03 cd	50 ± 0.45 ef
40 µg/ml	76 ± 0.95 c	68 ± 0.81 d	44.4 ± 1.01 fg
45 µg/ml	73 ± 1.05 cd	64 ± 1.08 de	35 ± 0.99 g
50 µg/ml	69 ± 0.98 d	60 ± 1.01 de	27 ± 0.58 h
60 µg/ml	58 ± 1.08 e	50 ± 1.05 ef	15 ± 0.55 ı
80 µg/ml	43 ± 0.53 fg	35 ± 1.07 g	10.5 ± 0.91 ij
100 µg/ml	20 ± 0.56 hı	10 ± 1.02 ij	6 ± 0.89 j
120 µg/ml	10.2 ± 0.75 ij	6.6 ± 1.05 j	5 ± 0.98 j
140 µg/ml	9.97 ± 0.50 j	6.3 ± 0.69 j	4.9 ± 0.88 jk
160 µg/ml	10.22 ± 0.96 ij	6.2 ± 0.94 j	4.7 ± 0.90 jk
180 µg/ml	9.05 ± 0.49 j	6.13 ± 0.42 j	4.5 ± 0.59 jk
200 µg/ml	9.97 ± 0.43 j	5.84 ± 0.46 j	4.8 ± 0.89 jk
Kontrol	100 ± 0.08 a	100 ± 0.09 a	100 ± 0.08 a
%0.5 DMSO	99 ± 0.40 a	98 ± 0.52 a	99 ± 0.72 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.H.: Standart Hata

Zamana bağılı olarak artan sitotoksik etki, konsantrasyonun artmasıyla ortaya çıkan sitotoksik etkideki artış ile paralellik göstermiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p<0.05$) çizelge 3.6’da verilmiştir. 24, 48 ve 72 saat uygulamalarından elde edilen IC_{50} değerleride istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çok güçlü bir oksidan olan H_2O_2 ’in hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi hücrelerin farklı konsantrasyonlarda (25-700 μM) H_2O_2 ’e 24 saat maruz bırakılmasıyla bulunmuştur. H_2O_2 ’in farklı konsantrasyonlarının Hep G2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi konsantrasyona bağılı olarak değişim göstermiştir (Şekil 3.7). Konsantrasyonun artmasıyla ortaya çıkan sitotoksik etki de artmıştır. Uygulanan H_2O_2 konsantrasyonları çizelge 3.7’de verilmiştir. Hep G2 hücrelerinin H_2O_2 ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda IC_{50} değeri 384 μM bulunmuştur. IC_{10} değeri 76 μM bulunurken IC_{70} değeri 537 μM bulunmuştur. H_2O_2 konsantrasyonlarının uygulamalarında ortaya çıkan sitotoksik etkilerdeki istatistiksel farklılıklar ($p<0.05$) çizelge 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. H_2O_2 konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi

Çizelge 3.7. H₂O₂ konsantrasyonlarının Hep G2 hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi

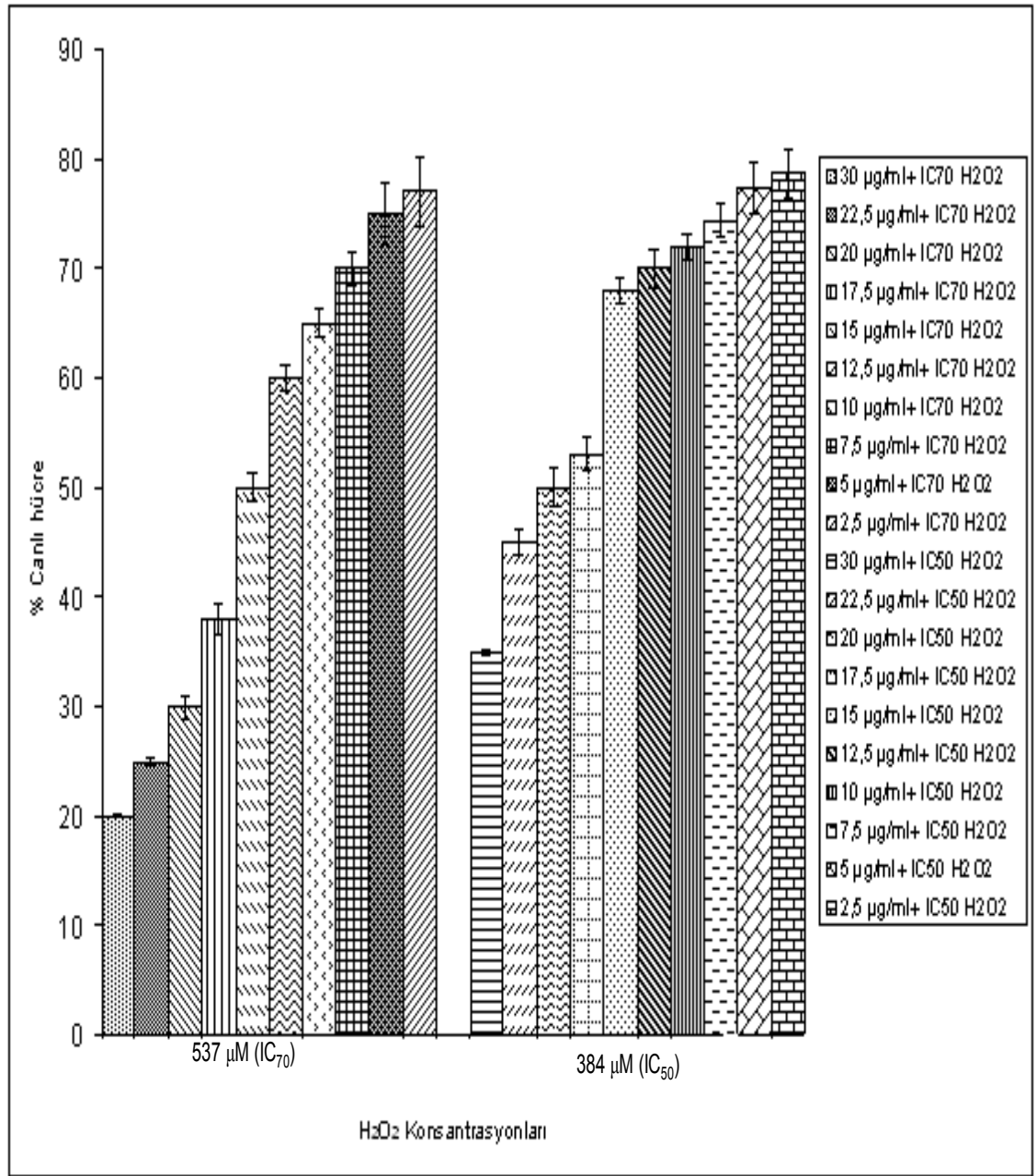
H ₂ O ₂ konsantrasyonları (µM)	% Canlı hücre X ± S.H.
25	95.9 ± 3.81 a
50	92.5 ± 2.32 ab
100	86.5 ± 1.88 b
150	81.86 ± 2.68 bc
200	74.5 ± 2.67 c
250	71.7 ± 2.23 c
300	56.5 ± 1.90 d
350	54.4 ± 1.12 de
400	47.9 ± 1.92 e
450	41.4 ± 1.43 ef
500	34.9 ± 1.28 fg
550	28.4 ± 1.96 g
600	21.8 ± 1.56 gh
650	15.3 ± 1.87 h
700	8.8 ± 1.16 ı

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.H.: Standart Hata

Uçucu yağın hücreler üzerine koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymak için, hücreler 2.5-30 µg/ml (<IC₅₀) konsantrasyon aralığında farklı konsantrasyonlardaki uçucu yağa bir saat ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 24 saat H₂O₂'e (IC₅₀, IC₇₀) maruz bırakılarak sitotoksik etki sonuçları bulundu (Çizelge 3.8). Uyguladığımız uçucu yağ konsantrasyonlarından 20 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlardaki uçucu yağın H₂O₂ sitotoksitesine karşı antioksidan (koruyucu)

özelliği olduğu ortaya çıkmıştır (şekil 3.8). Uçucu yağ ile ön uygulamaya maruz bırakılan Hep G2 hücreleride, uçucu yağın konsantrasyonu azaldıkça H₂O₂'e karşı koruyucu etkisi artmıştır. Hem IC₅₀ hem de IC₇₀ H₂O₂ konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan aktivite 2.5 µg/ml'de görölmüşür. Uygulanan 30 µg/ml ve 22.5 µg/ml konsantrasyonlarda uçucu yağ pro-oksidan gibi davranmıştır. 2.5, 5 ve 7.5 µg/ml uçucu yağla ön uygulamaya maruz bırakılan Hep G2 hücrelerinin % canlılık değerlerinde uygulanan H₂O₂'in IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. Hücreler 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 ve 30 µg/ml uçucu yağla ön uygulamaya maruz bırakıldıklarında ise ilgili konsantrasyonların kendi IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında hücre canlılığı istatistiksel açıdan farklı (p<0.05) bulunmuştur. 15 µg/ml uçucu yağ konsantrasyonunun IC₇₀ H₂O₂'e karşı antioksidan etkisi, 17.5 µg/ml uçucu yağ konsantrasyonunun IC₅₀ H₂O₂'e karşı antioksidan etkisi ve 20 µg/ml uçucu yağ konsantrasyonunun IC₅₀ H₂O₂'e karşı antioksidan etkisi istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmamıştır.



Şekil 3.8. *T. revolutus* C. uçucu yağ konsantrasyonlarının (<IC₅₀) Hep G2 hücre dizisi üzerindeki koruyucu (antioksidan) etkisi

Çizelge 3.8. Uçucu yağ konsantrasyonlarının (<IC₅₀) Hep G2 hücre dizisi üzerindeki koruyucu (antioksidan) etkisi

Uçucu yağ konsantrasyonları (µg/ml) + H ₂ O ₂ (µM) konsantrasyonları	% Canlı hücre X ± S.H.
2.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	78.7 ± 2.13 a
2.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	77 ± 3.14 a
5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	77.4 ± 2.31 a
5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	75 ± 2.66 a
7.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	74.4 ± 1.58 ab
7.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	70 ± 1.60 ab
10 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	72 ± 1.13 ab
10 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	65 ± 1.36 b
12.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	70 ± 1.73 ab
12.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	60 ± 1.20 bc
15 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	68 ± 1.13 b
15 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	50 ± 1.26 de
17.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	53 ± 1.49 de
17.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	38 ± 1.41 f
20 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	50 ± 1.71 de
20 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	30 ± 0.98 fg
22.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	45 ± 1.22 e
22.5 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	25 ± 0.246 g
30 µg/ml uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	35 ± 0.181 f
30 µg/ml uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	20 ± 0.135 gh

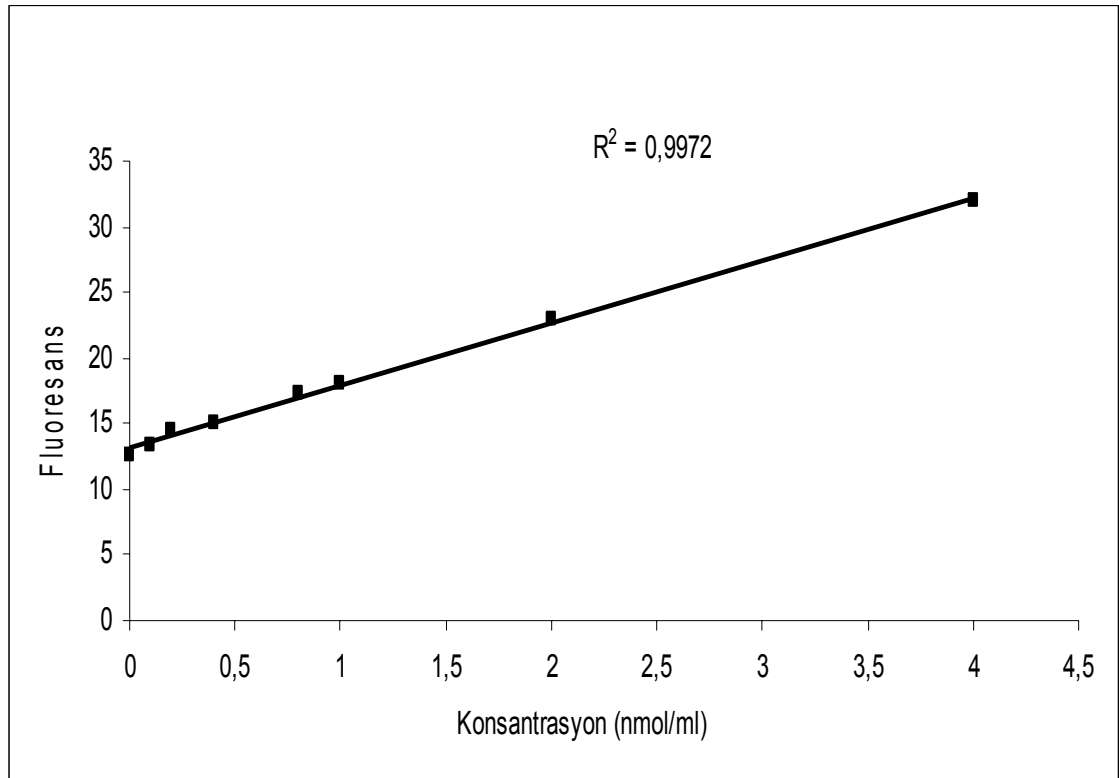
X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.H.: Standart Hata

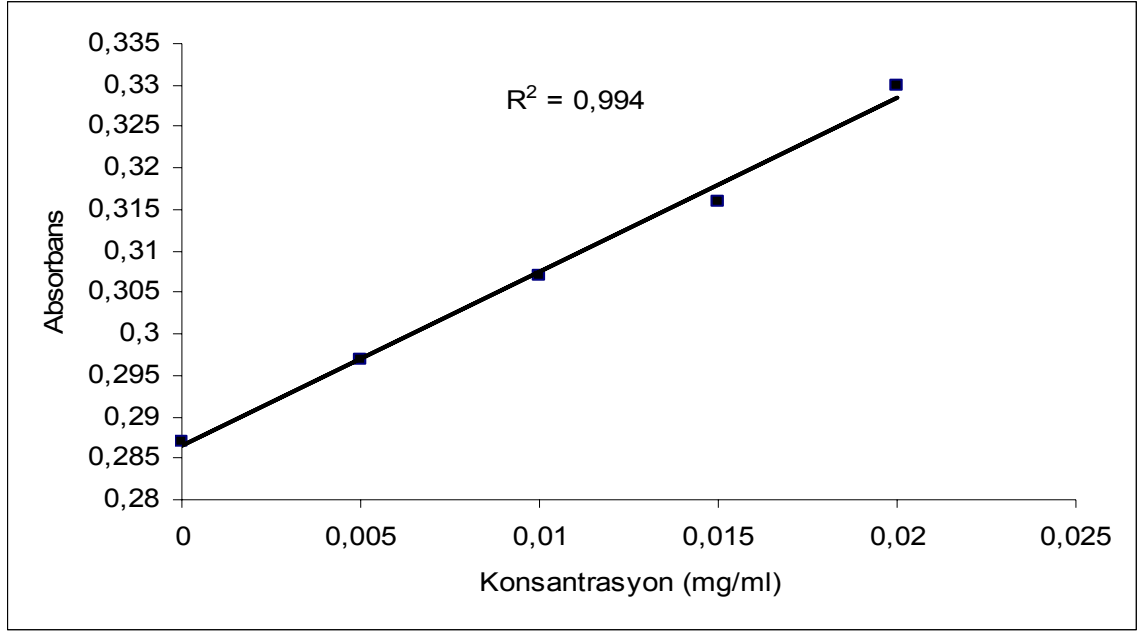
3.4. Uçucu Yağın Hücre Membranı Üzerine Etkisi

Hep G2 hücreleri IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki *T. revolutus* C. uçucu yağına 24 saat maruz bırakılarak MDA miktarı araştırılmıştır. Kullanılan en düşük uçucu yağ (IC₁₀) konsantrasyonunun uygulanması sonucu meydana gelen MDA miktarı, kontrol ve %0.5 DMSO uygulamaları sonucu meydana gelen MDA miktarlarından istatistiksel olarak farklı (p<0.05) bulunmamıştır. Uçucu yağın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla oluşan MDA miktarı konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermiştir (Çizelge 3.9). IC₅₀ ve IC₇₀ uçucu yağ konsantrasyon uygulamalarında konsantrasyonun artmasıyla MDA miktarı da artmıştır (Şekil 3.11), bu konsantrasyonlardaki artış birbirlerinden ve kontrolden farklı (p<0.05) bulunmuştur.

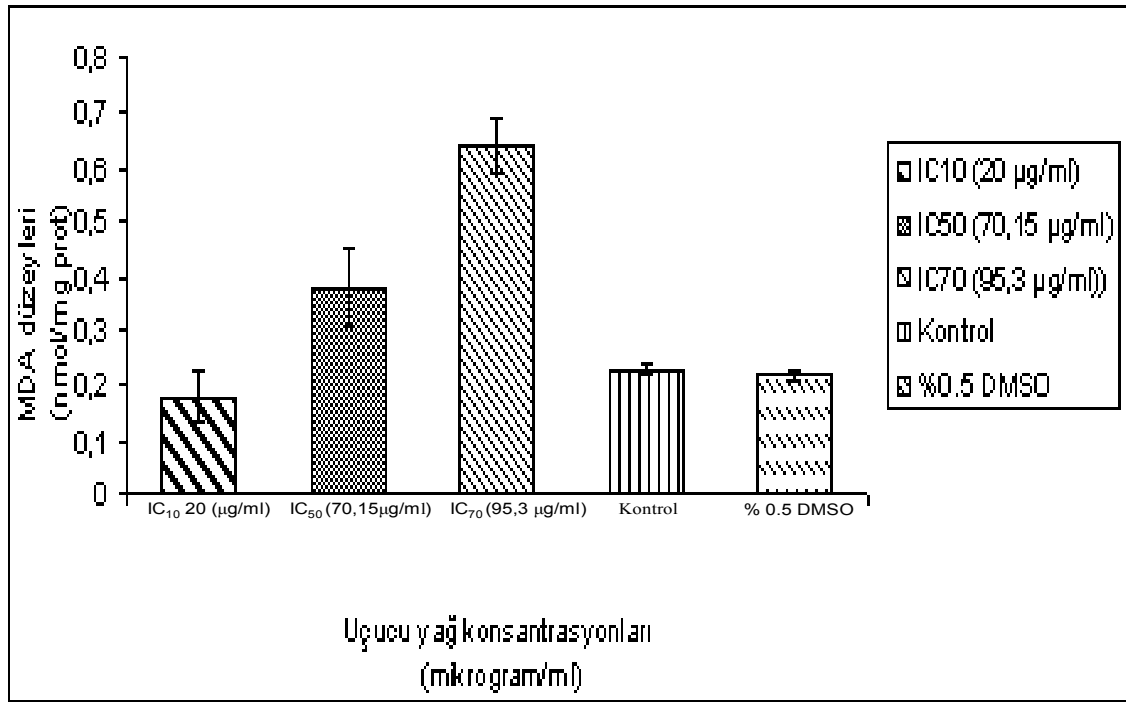
MDA standart grafiği ($y = 4.7689x + 13.171$) şekil 3.9’da verilmiştir. BSA standart grafiği ($y = 2.1x + 0.2864$) şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.9. MDA standart grafiği



Şekil 3.10. BSA standart grafiği



Şekil 3.11. IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında uçucu yağa maruz bırakılan Hep G2 hücrelerindeki MDA düzeyleri

Çizelge 3.9. IC₁₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında uçucu yağa maruz bırakılan Hep G2 hücrelerindeki MDA düzeyleri

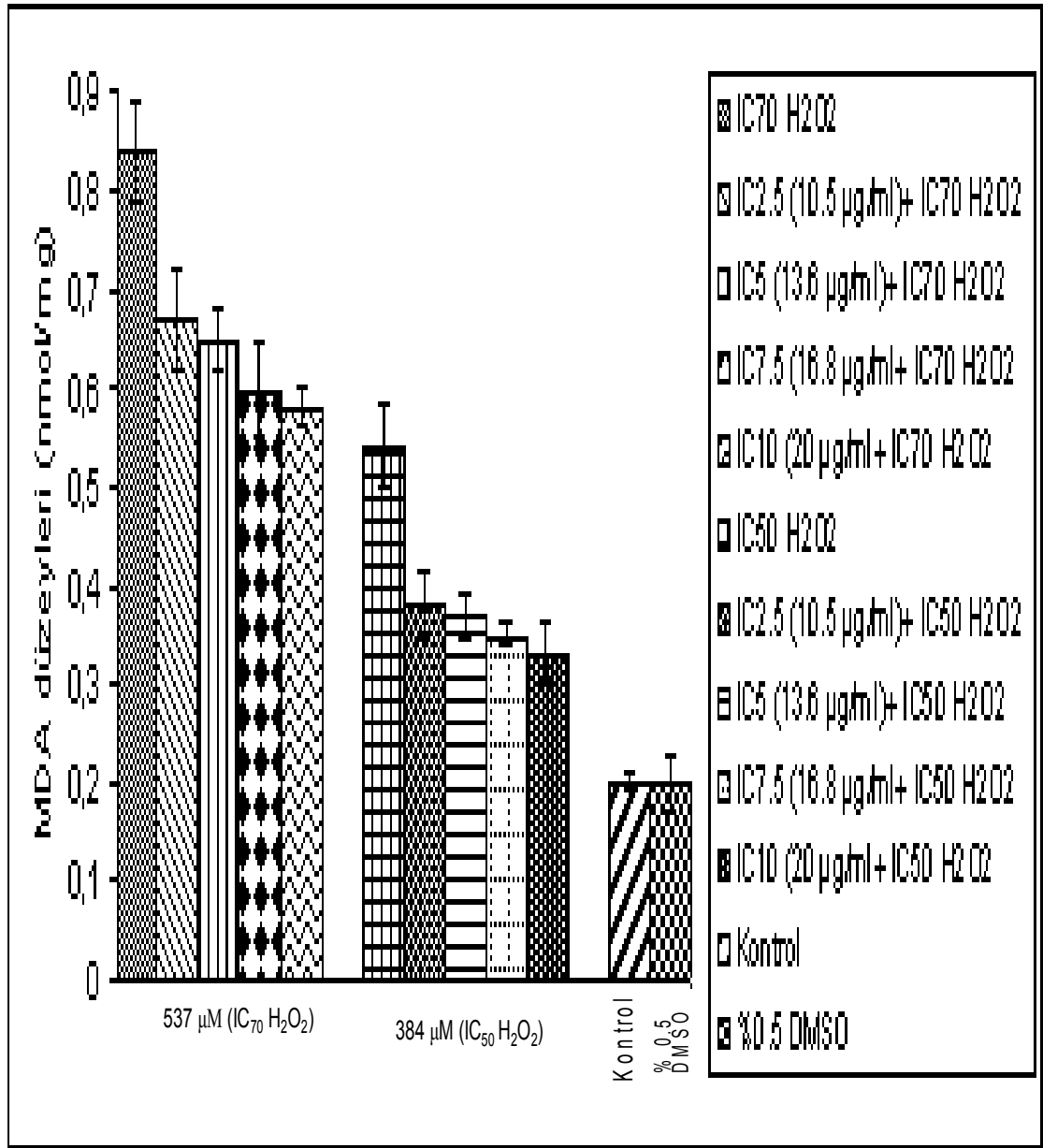
Uçucu yağ konsantrasyonları	MDA (nmol/mg prot) X ± S.H.
IC ₁₀ (20 µg/ml)	0.18 ± 0.05 a
IC ₅₀ (70.15 µg/ml)	0.38 ± 0.07 b
IC ₇₀ (95.13 µg/ml)	0.64 ± 0.05 c
Kontrol	0.23 ± 0.01 a
%0.5 DMSO	0.22 ± 0.01 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

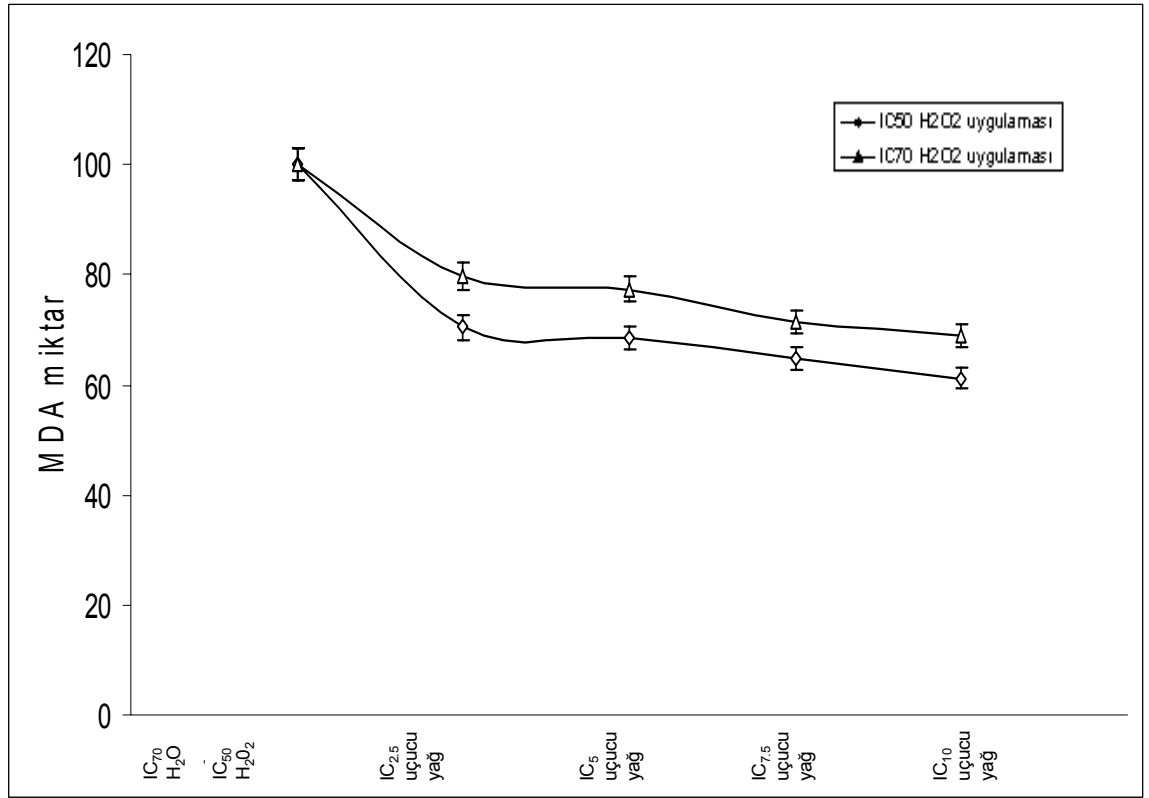
S.H.: Standart Hata

Uçucu yağın IC_{2.5}, IC₅, IC_{7.5} ve IC₁₀ konsantrasyonlarıyla (<IC₅₀) ön uygulamaya maruz bırakılmış Hep G2 hücreleri, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hücrelerdeki MDA miktarındaki değişimler, güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı uçucu yağın hücre membranı koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur (Şekil 3.12a ve Şekil

3.12b). $IC_{2.5}$, IC_5 ve $IC_{7.5}$ uçucu yağ konsantrasyonlarıyla ön uygulamaya maruz bırakılmış Hep G2 hücrelerinin, IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakıldıklarında oluşan MDA miktarları istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) bulunmamıştır. $IC_{2.5}$ ve IC_5 uçucu yağ konsantrasyonlarıyla ön uygulamaya maruz bırakılmış Hep G2 hücrelerinin IC_{70} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakıldıklarında oluşan MDA miktarları da istatistiksel olarak farklı ($p<0.05$) bulunmamıştır. Sonuç olarak, sadece H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) 24 saat maruz bırakılan Hep G2 hücrelerindeki MDA miktarı, uçucu yağ ön uygulananlara göre daha yüksek bulunmuştur ve aralarındaki fark istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlıdır (Çizelge 3.10).



Şekil 3.12a. Hep G2 hücrelerinde H₂O₂ oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi



Şekil 3.12b. Hep G2 hücrelerinde H_2O_2 oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi

Çizelge 3.10.Hep G2 hücrelerinde H₂O₂ oksidasyonuna karşı uçucu yağın membran koruyucu (antioksidan) etkisi

Uçucu yağ + H ₂ O ₂ konsantrasyonları	MDA (nmol/mg)
	X ± S.H.
IC _{2.5} (10.5 µg/ml) uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	0.38 ± 0.03 bc
IC _{2.5} (10.5 µg/ml) uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	0.67 ± 0.05 ef
IC ₅ (13.6 µg/ml) uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	0.37 ± 0.02 bc
IC ₅ (13.6 µg/ml) uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	0.65 ± 0.03 ef
IC _{7.5} (16.8 µg/ml) uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	0.35 ± 0.01 bc
IC _{7.5} (16.8 µg/ml) uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	0.60 ± 0.05 e
IC ₁₀ (20 µg/ml) uçucu yağ + IC ₅₀ H ₂ O ₂	0.33 ± 0.03 b
IC ₁₀ (20 µg/ml) uçucu yağ + IC ₇₀ H ₂ O ₂	0.58 ± 0.02 de
IC ₅₀ H ₂ O ₂	0.54 ± 0.04 d
IC ₇₀ H ₂ O ₂	0.84 ± 0.05 g
Kontrol	0.2 ± 0.009 a
%0.5 DMSO	0.2 ± 0.030 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.H.: Standart Hata

4. TARTIŞMA

Uçucu yağlar, güçlü renkleri ile karakterize edilen ve aromatik bitkiler tarafından oluşturulan uçucu, doğal ve kompleks bileşiklerdir. Uçucu yağlar ilk olarak orta çağda geliştirilen buhar ya da hidro-distilasyon ile elde edilmiştir. Uçucu yağlar bakterisidal, virüsidal, fungusidal, tıbbi özellikli ve güzel kokulu olarak bilinirler. Yiyeceklerin korunmasında antioksidan olarak kullanılan uçucu yağlar, antimikrobial, analjezik, sakinleştirici, anti-inflamatuvar, spasmolitik ve bölgesel anestezik ilaçlar olarak kullanılırlar. Uçucu yağlar, geleneksel ilaçların çok kullanıldığı tropikal ülkeler ve Akdeniz gibi genellikle ılıman-sıcak ülkelerde bulunan çeşitli aromatik bitkilerden elde edilirler. Bitkinin tomurcuklarından, çiçeklerinden, yapraklarından, gövdesinden, dallarından, meyvesinden ve köklerinden elde edilebilirler. Uçucu yağlar bitkilerde salgı hücrelerinde ya da epidermik hücrelerde depolanırlar. Uçucu yağların, bakterisidal ve fungusidal özelliklerinden dolayı yiyeceklerde sentetik kimyasal ürünlerin yerine alternatif olarak kullanılmaları ekolojik dengeyi korumak için önemlidir. Uçucu yağların kimyasal içerikleri sadece bulundurdıkları molekül sayısıyla değişmez aynı zamanda ekstraksiyon tipine göre ekstrakte edilen molekülün stereokimyasal tipi ile de değişir (Bakkali vd 2008). Uçucu yağların özellikleri, miktarları ve bileşimleri iklime, toprak bileşimine, elde edildikleri bitkisel organa, bitkinin yaşına ve vejetatif döngü basamağına göre değişiklikler gösterebilir (Masotti vd 2003, Angioni vd 2006). Günümüzde yaklaşık olarak üçbin uçucu yağ bilinmektedir. Üçyüz tanesi özellikle farmasötikte, tarımda, yiyeceklerin korunmasında ve sağlıkla ilgili kozmetik ve parfüm endüstrilerinde ticari olarak önemlidir. Bazı uçucu yağların, organ fonksiyon bozukluklarını ve sistemik hastalıkları tedavi ettiği gösterilmiştir. Geniş kullanımları ve bize güzel gelen kokuları ile tanıdık olan uçucu yağlar gibi doğal ürünlere olan ilgi, bu maddelerin insan sağlığında, tarımda ve çevrede yeni kullanımları için biyolojik faaliyetinin anlaşılmasını önemli kılmaktadır (Bakkali vd 2008).

Thymus cinsinin üyelerinin antioksidan ve antimikrobial özellikleri kapsamlı olarak çalışılmıştır. *Thymus spathulifolius*'dan elde edilen uçucu yağın GC/MS analizi sonuçları yağın %99.2'sini gösteren 28 bileşik tanımlanmıştır. Yağın %82.6'sını oluşturan, timol (%36.5), karvakrol (%29.8) ve bunların biyosentetik öncülleri *p*-simen (%10) ve γ -terpinen (%6.3) ana bileşenlerdir (Sokmen vd 2004). Çalışılan bir bitki

uçucu yağının bileşenlerinin lokal, iklimsel, mevsimsel ve deneysel koşullar gibi birçok faktörden etkilenecek, uçucu yağın biyolojik aktivitesini değiştirdiği bildirilmiştir (Vardar-Ünlü vd 2003). Timol, karvakrol ve γ -terpinenin antioksidan özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Ruberto ve Barata 2000). Uçucu yağın biyolojik aktivitesine yağda bulunan bu bileşiklerin yüksek içeriklerinin katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. *Thymus spathulifolius*'dan elde edilen uçucu yağla yapılan DPPH testinde IC₅₀ değeri 243.2 μ g/ml bulunurken, β -karoten/linoleik asit testinde %92 linoleik asit oksidasyon inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (Sokmen vd 2004).

Türkiye'de bir endemik tür olan *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS analiz sonuçlarına göre uçucu yağın %92.5'ini gösteren 71 bileşik tanımlanmıştır. α -muurolol (%9.2), germakren D-4-ol (%3.6), karyofillen oksit (%3.2), β -karyofillen (%7.6), γ -muurolen (%3.6), δ -kadinen (%3.6), γ -kadinen (%3.4), borneol (%11.2), geranial (%7.3) ve neral (%5.4) uçucu yağın başlıca bileşenleri olduğu belirtilmiştir. *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS analiz sonuçlarına göre toplam uçucu yağın %98.7'sini gösteren 47 bileşik tanımlanmıştır. Bu uçucu yağ, yüksek monoterpen fraksiyonlarıyla (%94.0) ve özellikle fenolik karvakrol (%58.1), timol (%20.5) ve bunların öncülleri *p*-simen (%4.1) ve γ -terpinenin (%4.4) varlığı ile karakterize edilmiştir (Tepe vd 2005b). *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*'un serbest radikal süpürme aktivitesi (IC₅₀ = 220 μ g/ml) diğer varyeteye (*Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus*) göre yüksek bulunmuştur. β -karoten/linoleik asit testinde, linoleik asidin oksidasyonu var. *rosulans* (%92.0) tarafından etkili bir şekilde inhibe edilirken diğer yağ örneği hiçbir aktivite göstermemiştir. Var. *rosulans*'ın inhibisyon oranı sentetik bir antioksidan olan BHT'nin inhibisyon oranına yakın olduğu gösterilmiştir (%96.0) (Tepe vd 2005b). Uçucu yağlar birçok bileşik tarafından oluşturulan oldukça karmaşık karışımlardır ve bu karmaşıklığı, aktivitesinin açıklanmasını zorlaştırmaktadır. Bazı fenolik bileşiklerin (Halendar vd 1998) ve bazı saf bileşiklerin (Aeschbach vd 1994, Madsen ve Bertelsen 1995) antioksidan aktiviteleri iyi bilinmektedir. Genel olarak, fenollerin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları doğrulanmıştır (Ruberto ve Baratta 2000). Oksijenlenmiş monoterpenler (özellikle iyi bilinen iki fenolik bileşik, timol ve karvakrol) bitki uçucu yağlarının antioksidan gücünden sorumludurlar (Laguori vd 1993, Aeschbach vd 1994,

Baratta vd 1998). Terpinolen, α - ve γ -terpinen gibi monoterpen hidrokarbonlarının gözlemlenen antioksidan aktiviteleri oksijenlenmiş monoterpenlerden daha zayıftır. Timol ve karvakrol DPPH ve β -karoten/linoleik asit test sisteminde güçlü antioksidan aktivite gösterirken, 1,8-sineol, kamfor, borneol, *p*-simen, α -pinen ve β -pinen hiçbir aktivite göstermemiştir. Seskiterpen hidrokarbonların ve bunların oksijenlenmiş türevlerinin çok düşük antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Ruberto ve Baratta 2000).

Thymus caramanicus'un farklı gelişimsel basamaklardayken (vejetatif, çiçek tomurcuklanma, tamamen çiçeklenme ve tohum dönemi) toplanıp, toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS analiz sonuçlarına göre oksijenlenmiş monoterpenlerin bütün örneklerin en büyük bölümünü oluşturdukları gösterilmiştir. Karvakrollün en yüksek oranda (%68.9) bulunduğu basamak, tamamen çiçeklenme basamağı olduğu gözlenmiştir. Karvakrolün en az oranda bulunduğu basamak, vejetatif basamağı olduğu gösterilmiştir. Fakat çiçek gelişimi sırasında miktarının arttığı (%66.9) ve tohum döneminde tekrar azaldığı gözlenmiştir. Vejetatif ve jeneratif (tohum) dönemde fenolik bileşiklerin (timol ve karvakrol) miktarı azalmış fakat bunların öncüllerinin (*p*-simen ve γ -terpinen) miktarı artmıştır (Nejad Ebrahimi vd 2008).

Cezayir'in 180 ve 300 km güneyinde bulunan sırasıyla Sidi Aissa'dan (TP1) (Kef Etna dağı) ve Bou-saada'dan (TP2), Cezayir'in 80 ve 210 km doğusunda bulunan sırasıyla Kadiria (TP4) ve El-Asnam'dan (TP5) ve Cezayir'in 250 km batısında bulunan Oued Rhiau'dan (TP3) toplanan beş *Thymus pallescens* örneği ile 800 (ALG1) ve 1500 m (ALG2) yüksekliklerde Chrea National Park'tan ve El-Asnam'dan (ALG3) toplanan *Thymus algeriensis* örnekleri, Cezayirin 180 km doğusunda bulunan Djurdjura dağlarındaki Takoucht'tan toplanan *Thymus dreatensis*'dan (TDR) elde edilen uçucu yağların GC/MS analiz sonuçlarına göre dört *Thymus pallescens* yağları (TP1, TP2, TP4 ve TP5) bazı küçük farklılıklar dışında karvakrol (%44.4-57.7), *p*-simen (%10.3-17.3) ve γ -terpinenin (%10.8-14.2) başlıca bileşikler olması ile karakterize edilen yüksek derecede benzer kimyasal bileşime sahip oldukları gösterilmiştir. Bu arada Oued Rhiau'dan (TP3) toplanan örnek, karvakrolün (%9.0) yerine timolün başlıca bileşen (%49.3) olması ile farklı olduğu gösterilmiştir. *Thymus algeriensis* yağları geniş bir çeşitlilik ve farklı kimyasal profiller göstermişlerdir, hatta farklı seviyelerden aynı

lokaliteden toplanan iki örnek olan ALG1 ve ALG2'nin de böyle olduğu gör÷lmüştür. Chrea National Park'ın 800 m yüksekliğinden toplanan örneğin (ALG1), başlıca bileşen timolün (%29.5) olması ile karakterize edilmiştir. Terpinil asetat (%18.0), nerolidol (%12.6), α -pinen (%11.1), borneol (%9.0) ve bornil asetat (%7.7) bileşenleri aynı lokalizasyondan, 1500 m'den toplanan örneği karakterize etmiştir. El-Asnam'dan toplanan örnekle (ALG3) ilgili olarak, 4-terpineol (%10.6), kamfor (%10.1), *p*-simen (%9.9), α -pinen (%6.5) ve 1,8-sineollün (%6.5) baskın bileşenler olduğu gösterilmiştir. *Thymus dreatensis*'te linalool (%30.4), timol (%20.2) ve geraniollün (%19.6) baskın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Diğer Cezayir *Thymus* türlerinde varlığı gösterilmediğinden geraniolün yüksek yüzdelerde bulunması dikkate değerdir. 0.8 ve 1.0 mg/ml'de iki sentetik antioksidana (BHT ve BHA) benzer güçlü serbest radikal süpürme aktivitesi gösteren TP1'in dışındaki, ana bileşenleri arasında timol ve karvakrol içeren diğer bütün örnekler benzer konsantrasyon-bağımlı DPPH radikal inhibisyonu göstermişlerdir (Hazzit vd 2009). ALG1 ve ALG2 daha az aktiftir ve bu *Thymus* yağlarının zayıf DPPH radikal-süpürme aktiviteleri, timol ve karvakrol gibi bazı bileşenlerin yokluğuna bağlanabilmektedir (Sokmen vd 2004, Tepe vd 2005b).

Thymus revolutus Célak'ın 1998 yılında Hatay'dan toplanıp, daha sonra toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağın GC/MS analiz sonuçlarına göre toplam uçucu yağın %98.16'sını gösteren 22 bileşik tanımlanmış ve başlıca bileşenlerinin, karvakrol (%43.13), γ -terpinen (%20.86), *p*-simen (%13.94), β -karyofillen (%5.40) ve timol (4.62%) olduğu bulunmuştur (Karaman vd 2001). Deneylerimizde kullandığımız, 2008 Haziran döneminde Akdeniz Üniversitesinin Ziraat Fakültesinin güneyinde bulunan açık kayalık ve çakıllı alandan toplandığımız *Thymus revolutus* Célak'ın toprak üstü kısımlarından elde ettiğimiz uçucu yağın GC/MS analiz sonuçlarına göre 12 bileşik tanımlandı. Uçucu yağın en önemli bileşenleri, simen (%32.57), γ -terpinen (%17.18), karvakrol (%11.89), timol (%9.97) ve borneol'dür (%7.55). Deneylerimizde kullandığımız *Thymus revolutus* Célak'tan elde ettiğimiz uçucu yağın bileşenleri ile 1998 yılında Hatay'dan toplanan *Thymus revolutus* Célak'ın bileşenlerinin bazılarının aynı olup, yüzdelikleri farklı olmakla beraber bazı bileşikler tamamen farklıdır. Uçucu yağ bileşenlerindeki farklılıklar, iklimsel, mevsimsel, coğrafik ve jeolojik birçok farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (Tepe vd 2005a). *Thymus revolutus* Célak uçucu yağının DPPH testinde IC₅₀ değeri 250 µg/ml bulunurken, β -karoten/linoleik asit

testinde %72.8 linoleik asit oksidasyon inhibisyonu sağlamıştır. DPPH testinde IC₅₀ değeri yukarıda tartışılan diğer *Thymus* türlerine yakın bir değer olarak bulunurken, β-karoten/linoleik asit testinde linoleik asit oksidasyon inhibisyonu değeri daha düşük olarak bulunmuştur. *Thymus revolutus* Célak'ın uçucu yağının β-karoten/linoleik asit testinde, linoleik asit oksidasyon inhibisyon değerinin yukarıda tartışılan çalışmalardan daha düşük çıkmasının nedeni timol ve karvakrollün uçucu yağda az miktarda bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca *Thymus revolutus* Célak'tan elde ettiğimiz uçucu yağın ana bileşeni olan simenin DPPH ve β-karoten/linoleik asit testlerinde aktivite göstermediği daha önceki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Tepe vd 2005b). Uçucu yağın ana bileşeninin antioksidan aktivite göstermemesinde, β-karoten/linoleik asit testinde linoleik asit oksidasyon inhibisyon değerinin düşük çıkması neden olabilir.

Antioksidanlar, hücre membranında bulunan lipit bileşiklerinin oksidasyonunu azaltırlar ya da karsinogenik oldukları bilinen linoleik asit oksidasyonundan ortaya çıkan konjuge dien hidroperoksitleri inhibe ederler (Kartal vd 2007).

İnsan akciğer karsinoma (A549), servikal karsinoma (HeLa), karaciğer karsinoma (Hep G2) ve umbilikal endotel hücre dizilerinin (HUVEC), *Lindera strychnifolia* (Lauraceae) (LS)'nin yapraklarından elde edilen uçucu yağa 24 saat maruz bırakılmasının ardından yapılan ölçümlerle, IC₅₀ değeri A549 için 23.1 µg/ml, HeLa için 24.1 µg/ml, Hep G2 için 22.7 µg/ml ve HUVEC için 126.1 µg/ml olarak bulunmuştur. Hep G2 hücre dizisi diğer hücre dizileri ile karşılaştırıldığında, LS'nin yapraklarından elde edilen uçucu yağın sitotoksik etkisine en hassas olan hücre dizisi olduğu, HUVEC'in ise en dirençli hücre dizisi olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, LS'nin köklerinden elde edilen uçucu yağın aynı hücre dizilerinde 24 saatlik sitotoksik etkisi araştırıldığında, IC₅₀ değeri A549 için 23.9 µg/ml, HeLa için 31.6 µg/ml, Hep G2 için 38.0 µg/ml ve HUVEC için 163.9 µg/ml olarak bulunmuştur. LS'nin uçucu yağlarının sitotoksitesisi, test edilen insan kanser hücrelerinde (IC₅₀ 22-38 µg/ml) kanser hücresi olmayan (non-cancerous) HUVEC'ten (IC₅₀ 126-163 µg/ml) çok daha güçlüdür. Bu da LS uçucu yağlarının kanser hücrelerine olan seçicilik gücünü göstermiştir. LS uçucu yağlarının sitotoksitesisi özel bileşiklere bağlanabilir (Yan vd 2009). LS'nin kökünden elde edilen uçucu yağda %26.66 oranında bulunan

zerumbonun birçok kanser hücre dizisinde anti-tümör aktivitesi gösterilmiştir (Kirana vd 2003). LS'nin yapraklarından elde edilen uçucu yağda %3.80 ve kökünden elde edilen uçucu yağda %0.04 oranında bulunan δ -elemenin ve LS'nin yapraklarından elde edilen uçucu yağda %0.64 ve kökünden elde edilen uçucu yağda %0.08 oranında bulunan γ -elemenin güçlü sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Xu vd 2005). Bu aktif kimyasalların, uçucu yağın diğer bileşenleri ile olan sinerjetik etkisi göz önüne alınmalıdır.

İnsan göğüs karsinoma (MCF-7 ve MDA-MB-435S), servikal karsinoma (HeLa), karaciğer karsinoma (Bel-7402 ve Hep G2) ve renal adenokarsinoma hücre dizilerinin (ACHN), *Aristolochia mollissima* Hance'nin (Aristolochiaceae) rizomlarından elde edilen uçucu yağa 24 saat maruz bırakılmasının ardından yapılan ölçümlerle IC₅₀ değeri ACHN için 22.3 µg/ml, MCF-7 için 20.6 µg/ml, MDA-MB-435S için 22.1 µg/ml, Bel-7402 için 33.1 µg/ml, Hep G2 için 33.2 µg/ml ve HeLa için 38.6 µg/ml olarak bulunmuştur. Aynı çalışma *A. Mollissima*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağa 24 saat maruz bırakılarak yapıldığında IC₅₀ değeri ACHN için 33.8 µg/ml, MCF-7 için 21.1 µg/ml, MDA-MB-435S için 20.3 µg/ml, Bel-7402 için 49.5 µg/ml, Hep G2 için 40.7 µg/ml ve HeLa için 50.6 µg/ml olarak bulunmuştur. Rizomlardan elde edilen yağın dört kanser hücre dizisindeki (ACHN, Bel-7402, Hep G2 ve HeLa) sitotoksitesitesi *A. Mollissima*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağdan önemli derecede daha güçlü bulunmuştur. Test edilen altı kanser hücre dizisi arasında ACHN, MCF-7 ve MDA-MB-435S diğer kanser hücre dizilerinden her iki yağa da daha duyarlı bulunmuştur (Yu vd 2007). β -elemenin güçlü sitotoksik etkisi olduğu bildirilmiştir (Xu vd 2005). Ayrıca karyofillen oksitinde sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Sibanda vd 2004). Her iki seskiterpen bileşiğin rizom yağında düşük yüzdelerde bulunduğu görülmüştür, bu yüzden rizom yağının gözlemlenen sitotoksik aktivitesinde sorumlu olan ana bileşikler olamayabilirler. Ana sitotoksik bileşikler her iki yağda da bol bulunan seskiterpenler olabilir. İki yağın biyoaktiviteleri arasındaki farklılıkları iki yağın bileşenlerindeki küçük nicel farklılıklardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Yu vd 2007).

İnsan göğüs karsinoma (MCF-7, ZR-75-30 ve MDA-MB-435S), karaciğer karsinoma (Bel-7402 ve Hep G2) ve renal adenokarsinoma hücre dizilerinin (ACHN)

Dictamnus dasycarpus Turcz'ın (Rutaceae) kök kabuğundan elde edilen uçucu yağa 48 saat maruz bırakılmasının ardından yapılan ölçümlerle, IC₅₀ değeri ACHN için 57.8 µg/ml, MCF-7 için 45.1 µg/ml, ZR-75-30 için 28.8 µg/ml, MDA-MB-435S için 37.5 µg/ml, Hep G2 için 55.7 µg/ml ve Bel-7402 için 81.1 µg/ml olarak bulunmuştur. Üç göğüs kanseri hücre dizisi üzerindeki uçucu yağın hücre büyüme inhibisyon etkisinin (IC₅₀ değerleri 28-45 µg/ml) diğer kanser hücre dizileri üzerindeki inhibisyon etkisinden oldukça güçlü olduğu gösterilmiştir. ZR-75-30 hücre dizisi üç göğüs kanser hücre dizisi arasında 28.8 µg/ml IC₅₀ değeri ile en duyarlı olanı olduğu gösterilmiştir. Çalışılan diğer kanser hücre dizilerine göre, Hep G2 hücre dizisi ve ACHN sırasıyla 55.7 µg/ml ve 57.8 µg/ml IC₅₀ değerleri ile uçucu yağın sitotoksitesine benzer duyarlılık göstermişlerdir. Bel-7402 hücre dizisi uçucu yağın sitotoksitesine 81.1 µg/ml IC₅₀ değeri ile en düşük duyarlılığı göstermiştir (Lei vd 2008). *Dictamnus dasycarpus* Turcz'ın (Rutaceae) kök kabuğundan elde edilen uçucu yağda %0.2 oranında bulunan β-elemenin ve %2 oranında bulunan palmitik asitin güçlü sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Harada vd 2002, Xu vd 2005).

İnsan servikal karsinoma (HeLa), akciğer karsinoma (A549) ve karaciğer karsinoma hücre dizilerinin (Bel-7402) *Photinia serrulata* Lindl 'ın yapraklarından elde edilen uçucu yağa 48 saat maruz bırakılmasının ardından yapılan ölçümlerle, IC₅₀ değeri HeLa için 0.0427 µl/ml, A549 için 0.0219 µl/ml ve Bel-7402 için 0.0301 µl/ml olarak bulunmuştur (Jie vd 2006). *P. Serrulata*'dan elde edilen uçucu yağın %5.87'sini oluşturan α-humulenin, MCF-7, PC3, A549, DLDD-1, M4BEU ve CT-26 hücre dizilerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Legault vd 2003). *P. Serrulata*'dan elde edilen uçucu yağda düşük konsantrasyonlarda bulunan ve sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilen γ-elemen ve δ-elemen (Duh vd 1999) *P. Serrulata*'dan elde edilen uçucu yağın yüksek sitotoksik aktivitesini tamamen açıklayamamıştır. Bu da *P. Serrulata*'dan elde edilen uçucu yağın büyük bir bölümünü oluşturan diğer seskiterpenlerin *P. Serrulata*'dan elde edilen uçucu yağın sitotoksik aktivitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ancak az miktarda bulunan uçucu yağ bileşenleri de uçucu yağın sitotoksik aktivitesine katkıda bulunabilirler (Jie vd 2006). Az miktarda bulunan bileşenler diğer aktif bileşikler ile sinerjizm oluşturabilir (Lattaoui ve Tantaoui 1994, Yu vd 2004). *Panax ginseng* (Keum vd 2000), *Xanthones* (Lee vd 2005) ve *Betula platyphylla* var. *japonica*'nın metanol ekstraktı (Ju vd 2004) gibi

antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilen bu gibi bileşiklerin sitotoksik olduğu bulunmuştur. Bazı çalışmalar, sitotoksosite ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Owen vd 2000, Dwivedi vd 2003). Bu yüzden *P. Serrulata*'nın yapraklarından elde edilen uçucu yağın antioksidan aktivitesi, konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik aktivitesine katkıda bulunabilir (Jie vd 2006).

İnsan fetal akciğer hücreleri (HFL1), parasetamol, asetilsalisilat, ferrus sülfat, diazepam, amitriptilin, etilen glikol, methanol, ethanol, fenol, NaCl, Na florid ve ksilene 24 ve 72 saat maruz bırakıldıklarında, bu maddelerin HFL1 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Yang vd 2002). İnsan kolorektal karsinoma hücre dizisi Caco-2'nin, UV ışınlaması ile okside edilen, 0-100 µg/ml konsantrasyonlarında balık yağı ve metil linoleata 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldıklarında, her iki maddenin konsantrasyonunun ve uygulama süresinin artmasıyla hücre sağ kalımının azaldığı bulunmuştur (Alghazeer vd 2008). Bu çalışmalar, sitotoksosite deneylerimizde bulduğumuz, uygulanan uçucu yağ konsantrasyonunun ve uygulama süresinin artmasıyla azalan hücre canlılığı sonucumuzu desteklemektedir.

Thymus revolutus Célak'ın toprak üstü kısımlarından elde ettiğimiz uçucu yağ ile yaptığımız 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksosite testleri sonucunda sırasıyla IC₅₀ değerleri 70.15 µg/ml, 61.2 µg/ml ve 35 µg/ml olarak bulundu. Sonuçlarımız yukarıda tartıştığımız çalışmalarla karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızda bulduğumuz 24 saatlik IC₅₀ değeri daha yüksek ve 48 saatlik IC₅₀ değeri yukarıda tartışılan çalışmalarla yakın bir değer bulunmuştur. V79 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) önemli bir uçucu yağ bileşeni olan timole 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldıklarında hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Archana vd 2009). Hücre canlılığının zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azalması bizim sitotoksosite deneylerimizde bulduğumuz sonuçları desteklemektedir. Timol ile yapılan bu çalışma ile uçucu yağ ile yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında, *Thymus revolutus* Célak uçucu yağının Hep G2 hücrelerindeki 72 saatlik sitotoksik etkisinin V79 hücrelerindeki bir uçucu yağ bileşeni olan timolün 72 saatlik sitotoksik etkisinden daha yüksek olduğu söylenebilir. Farklı uçucu yağlar ile farklı hücre dizileri kullanılarak yapılan sitotoksosite testlerinde birbirinden farklı sonuçlar bulunması, uçucu yağların farklı bileşenlerden oluşmasından, bu

bileşenlerinde her bir uçucu yağda farklı yüzdelerde bulunmasından ve her bir hücre dizisinin farklı uçucu yağlara aynı duyarlılıkta olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca uçucu yağları oluşturan farklı bileşenlerinde birbirleri ile olan etkileşimleri de (sinerjetik ya da antagonist) farklı olabileceğinden bununda sitotoksik aktiviteyi etkiliyor olabilmesi muhtemeldir.

ROT'un, yaşlanma, kanser ve bazı nörodejeneratif hastalıklarla (Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi) ilişkili olduğu gösterilmiştir. H_2O_2 , hücrede lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olan önemli bir ROT'dur. Doğal antioksidanlar, ROT üretiminin inhibisyonunu, serbest radikallerin doğrudan ya da dolaylı süpürülmesini içeren biyokimyasal aktivitelerin geniş bir bölümüne sahiptirler. Birçok antioksidan antikarsinogenik özelliğe sahiptir.

Bizim çalışmamızda, Hep G2 hücrelerinin H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılmasıyla IC_{50} değeri 384 μM bulunurken, IC_{70} değeri 537 μM bulunmuştur. Çin hamster akciğer fibroblast (V79-4) hücrelerinin H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılmasıyla IC_{50} değeri 100 μM bulunmuştur (Ju vd 2004). İnsan umbilikal vein endotel hücre dizisinin (ECV-304) H_2O_2 'e 42 saat maruz bırakılmasıyla IC_{50} değeri 750 μM 'dan daha yüksek bulunmuştur (Wang ve Huang 2005). Astrosit kültürünün H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılmasıyla IC_{50} değeri yaklaşık olarak 400 μM olarak bulunmuştur (Brera vd 2000). Bizim çalışmamızda Hep G2 hücrelerinin H_2O_2 'e 24 saat maruz bırakılmasıyla bulduğumuz IC_{50} değeri (384 μM), yukarıda tartışılan çalışmalarda bulunan IC_{50} değerlerinin bazılarında daha yüksek, bazılarında daha düşüktür. Bu farklılık her bir hücre dizisinin H_2O_2 'e olan duyarlılığının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. H_2O_2 uygulama süresi de önemlidir.

Thymus revolutus Célak'ın toprak üstü kısımlarından elde ettiğimiz uçucu yağın Hep G2 hücrelerinde, H_2O_2 'e karşı antioksidan aktivitesi, uygulanan konsantrasyonlar içinde 20 $\mu g/ml$ 'den daha düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. V79-4 hücrelerinin, *Betula platyphylla* var. *japonica*'dan elde edilen metanol ekstraktının farklı konsantrasyonları ile bir saat ön uygulamaya tutulduktan sonra 24 saat 100 μM (H_2O_2 için IC_{50} değeri) H_2O_2 'e maruz bırakılması hücre sağ kalımında artışa neden olmuştur. Ekstraktın V79-4 hücrelerinde çok düşük sitotoksik etkiye (IC_{50} değeri > 500

$\mu\text{g/ml}$) sahip olduğu gösterilmiştir. *Betula platyphylla* var. *japonica* metanolik ekstraktının antioksidan aktivitesinin konsantrasyona bağımlı bir şekilde arttığı belirtilmiştir. 100 $\mu\text{g/ml}$ *Betula platyphylla* var. *japonica* metanolik ekstraktının hücre canlılığını kontrol ile karşılaştırıldığında %85 arttırdığı gözlenmiştir. *Betula platyphylla* var. *japonica*'dan elde edilen metanol ekstraktının H_2O_2 'e karşı düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (Ju vd 2004). *Ishige okamurae*'dan elde edilen %80'lik metanol ekstraktının etil asetat fraksiyonunun güçlü radikal süpürme aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Daha sonra etil asetat fraksiyonundan, aktif bileşik olan diphlorethohydroxycarmalol izole edilmiştir. Maymun böbrek fibroblast hücre dizisi (Vero), diphlorethohydroxycarmalollün farklı konsantrasyonlarıyla (25, 100, 200 μM) 30 dakika ön uygulamaya tutulup, daha sonra 50 μM H_2O_2 'e (hücre sağ kalımı %41.31) 24 saat maruz bırakılarak diphlorethohydroxycarmalollün Vero hücrelerinde antioksidan aktivitesi ortaya konmuştur. Diphlorethohydroxycarmalollün hücre içi ROT'u süpürme aktivitesi konsantrasyona bağılı olarak artış göstermiştir. Vero hücreleri 50 μM H_2O_2 'e maruz bırakıldıklarında, H_2O_2 hücre sağ kalımını %41.31'e düşürürken, hücreler diphlorethohydroxycarmalol (25, 100, ve 200 μM) ile ön uygulamaya maruz bırakılıp daha sonra H_2O_2 'e maruz bırakıldığında, diphlorethohydroxycarmalollün H_2O_2 'in oluşturduğu hücre hasarını önlediği ve diphlorethohydroxycarmalol konsantrasyonlarının hücre sağ kalımını artan konsantrasyona bağılı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Heo ve Jeon 2009). (-) epigallokateşin-3 gallattın (EGCG) düşük konsantrasyonlarda radikal süpürücü aktivitesi varken, yüksek konsantrasyonlarda hücre hasarı uyardığı bulunmuştur (Johnson ve Loo 2000). Bizim çalışmamızda, 20 $\mu\text{g/ml}$ 'den daha düşük konsantrasyonlardaki uçucu yağıın Hep G2 hücrelerinde antioksidan aktivitesi olduğu gösterilmiştir. *Thymus revolutus* C.'dan elde ettiğimiz uçucu yağıın, 24 saatlik IC_{50} konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonlarda antioksidan özellik göstermesi yukarıda tartışılan çalışmalar ile desteklenmektedir.

Serbest radikaller, hücre yaşlanması ve kanser gibi kronik hastalıklarla ilişkili sitotoksositeye ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. ROT'lar, lipid hidroperoksitlerini meydana getirmek için çoklu doymamış yağı asitlerinin çift bağı ile etkileşirler. Peroksidize çoklu doymamış yağı asitlerinin başlıca ikincil oksidasyon ürünlerinden biride, mutagenik ve sitotoksik etkiye sahip olan MDA'dır. MDA'nın

serbest radikal hasarı ile ilgili olduğu düşünölen çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu bulunduğundan beri bu biyobelirteçin belirlenmesi biyolojik ve tıbbi bilimlerde lipoperoksidasyonunun değerdendirilmesi için en yaygın yaklaşım olarak kullanılmaktadır (Mateos vd 2005). Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu membranın yapısında, geçirgenliğinde ve akışkanlığında değışiklik, lizozomal dengenin bozulması ve apoptozisin uyarılmasına neden olmaktadır. Yağ asitleri ve diğder lipidler, membranların yapısal bileşenleri olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun, hücrenin sitoplazması içindeki lipidlerin serbest kalması ile sonuçlanan membran degradasyonundan sorumlu olduğu düşünölmektedir. MDA'nın artması lipid peroksidasyonunun oluştuğunu göstermektedir. *Tagetes minuta* L. ve *Schinus areira* L.'den elde edilen uçucu yağlar ile *T. minuta*'nın uçucu yağının ana bileşenleri olan limonen (%66.3) ve osimenon (%21.8) mısır köklerine (*Zea mays* L.) 24 ve 48 saat süreyle uygulandıklarında, oluşan MDA miktarlarının kontrollere göre arttığı gösterilmiştir (Scrivanti vd 2003). Çalışmamızda, Hep G2 hücreleri farklı konsantrasyonlarda *T.revolutus* C.'dan elde ettiğimiz uçucu yağa 24 saat maruz bırakılmasıyla, Hep G2 hücrelerinde meydana gelen MDA miktarlarının kontrollere göre artması yukarı tartışılan çalışma ile desteklenmektedir.

Antioksidan polifenollerin farklı tiplerince (çilekteki anthosiyanozit ve flavonoller, kakaodaki flavonoller ve prosiyanidinler, erikteki hidroksisinnamik asit) zengin meyve tozlarının alınmasının neden olduğu etki normal yiyeceklerle beslenen sadece sağlıklı hayvanlarda değil aynı zamanda hiperkolosterolemik ratlardaki serum MDA seviyesini azaltmada da çok etkili olduğu bulunmuştur. Bu etki sadece serumda değil, aynı zamanda yiyecek antioksidanların metabolizmasından ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumlu, serbest radikaller tarafından oksidatif hasara karşı hassas olan başlıca organlardan biri olan ve lipid metabolizmasında anahtar rolü oynayan karaciğerde de gözlenmiştir. Bu sonuçlar, fenolik antioksidanların *in vivo* oksidatif hasarı önlemede yararlı etkisini göstermiştir (Mateos vd 2005).

Peroksinitrit (ONOO⁻) lipid peroksidasyonunu, hücresel yapıların bozulmasını, enzim inaktivasyonunu ve DNA hasarını uyarabilir. MDA, *in vivo* sistemlerde ONOO⁻'in tepkimelerinden oluşan bileşiklerden biridir ve bugüne kadar patolojik stresin biyobelirteçi olarak düşünölmektedir. Karaciğer mikrozomlarında peroksinitrit

tarafından uyarılmış lipid peroksidasyonunu *Origanum vulgare* ve *Satureja montana* 'dan elde edilen uçucu yağlar ile timolün ve karvakrolün MDA oluşumunu önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda (300 µg/ml) γ -terpinen ve *p*-simenin hiçbir inhibisyon aktivitesinin olmadığı gösterilmiştir. *Origanum vulgare*'nin MDA oluşumunu inhibe etme gücünün *Satureja montana* 'dan daha güçlü olduğu bulunmuştur (Prieto vd 2007).

MDA miktarı genellikle uygulanan H₂O₂ seviyesine bağlıdır ve U87 hücrelerine 0.2 mM H₂O₂ ve trolox-C'nin (150 µM) birlikte uygulanması, sadece 0.2 mM H₂O₂ uygulanmış U87 hücreleri ile karşılaştırıldığında, meydana gelen MDA seviyesinde azalmanın meydana geldiği gösterilmiştir. Fakat 2 mM H₂O₂ ile birlikte trolox-C (150 µM) uygulandığında, kontrollere göre trolox-C, MDA miktarında herhangi bir azalmaya neden olmadığı bulunmuştur. Trolox-C aktivitesi, test edilen 2 mM H₂O₂ tarafından giderilmiş, antioksidan kapasitesini kaybetmiş ve olasılıkla endojen geçiş metallerinin varlığında pro-oksidan gibi görev yapmış olabileceği gösterilmiştir (D'Agostino vd 2009). Bu da antioksidanların, oksidan değerine bağlı olarak etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Karboksilik asite okside olan aldehit gruplarını içeren redükleyici şekerler, ROT üreterek membranlar da lipid peroksidasyonunu uyarırlar. Redükleyici bir şeker olan 2 - Deoksi-D-riboz'un (dRib) 30 mM konsantrasyonda murin osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerine iki gün uygulanması ile MDA miktarını oldukça arttığı gözlenmiştir. Tekrar 10⁻⁹-10⁻⁵ M doğal bir flavonoid olan kaemferol ile birlikte 30 mM dRib uygulamasının MDA miktarını azalttığı bulunmuştur. Bu da kaemferollün, osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerini oksidatif hücre hasarından koruduğu gösterilmiştir (Suh vd 2009).

Çalışmamızda da, *T.revolutus* C.'dan elde ettiğimiz uçucu yağın düşük konsantrasyonlarda H₂O₂'e karşı hücre membranını koruduğu ortaya konmuştur. Uçucu yağın H₂O₂ toksisitesine karşı hücre membranını koruyucu etkisi uçucu yağın konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır. Farklı uçucu yağların, MDA oluşumunu inhibe etme aktivitelerinin aynı olmaması, sitotoksosite sonuçlarımızı değerlendirirken belirttiğimiz gibi uçucu yağların farklı bileşenlerden oluşmasından ve her bileşenin her bir uçucu yağda farklı oranlarda bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca uçucu

yağı oluşturan bileşenlerinde bir biri ile olan etkileşimlerinide dikkate almak gerekmektedir.

Bu çalışmada *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağın antiradikal ve antioksidan özelliğinin olduğu ortaya konmuştur. Hep G2 hücrelerinin farklı uçucu yağ konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında hücre canlılığının azalması uçucu yağın sitotoksik etkisini göstermiştir. Uçucu yağın düşük konsantrasyonlarının H_2O_2 'e karşı hücreler üzerindeki koruyucu etkisi gösterilerek, düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak davrandığı ortaya konmuştur. Bu sonuçlar uçucu yağın membran hasarı üzerindeki etkisine bakılarak da desteklenmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki uçucu yağın Hep G2 hücrelerinde MDA miktarını arttırdığı ortaya konmuştur. Düşük konsantrasyonlardaki uçucu yağın ise H_2O_2 'in hücrelerde oluşturduğu membran hasarını azalttığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı bitkilerden elde edilen uçucu yağların antioksidan aktivitelerinin ve farklı kanser hücre dizileri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağ gibi diğer bitkilerden elde edilen uçucu yağların hücre içindeki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının kanser tedavilerine yeni stratejiler getireceğine inanıyoruz.

5. SONUÇ

Bu çalışmada *T. revolutus* C.'dan toprak üstü organlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS analizine göre en önemli bileşeni %32.57'lik oran ile simen olduğu bulunmuştur. Uçucu yağın DPPH testi ile antiradikal aktivitesinin olduğu, β -karoten/linoleik asit renk açılım testi ile de antioksidan aktivitesi olduğu *in vitro* antioksidan testleri ile ortaya konmuştur. Uçucu yağın Hep G2 hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Uçucu yağın düşük konsantrasyonlarının Hep G2 hücrelerindeki çok güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilerek, hücreler üzerindeki antioksidan aktivitesi ortaya konmuştur. Uçucu yağın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla oluşan MDA miktarı, yüksek uçucu yağ konsantrasyonlarında artmıştır. Uçucu yağın düşük konsantrasyonlarının H_2O_2 'in oluşturduğu membran hasarını azalttığı gösterilerek, hücreler üzerindeki membran koruyuculuğu özelliği ortaya konmuştur.

T. revolutus C.'dan elde edilen uçucu yağın, *in vitro* olarak antioksidan özelliğinin ortaya konması ile yeni antioksidan ilaçların üretimi, sentetik antioksidan maddelere alternatif olarak yiyecek ve içeceklerde kullanılması ile sentetik antioksidan maddelerin kullanımı ile ortaya çıkan toksik etkilerin azaltılması, uçucu yağın ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri incelenerek kozmetik alanında kullanılması ile doğal kaynakların değerlendirilmesi sağlanarak ülke ekonomisine katkı yapacaktır. Hep G2 hücrelerinde sitotoksik etkiye ve membran hasarına neden olmasından dolayı yeni antikanser ilaçların üretiminde doğal kaynak olarak önerilmesi tıp literatürüne katkı yapacaktır. Uçucu yağın biyolojik aktivitesinin konsantrasyona bağımlı bir şekilde değiştiği gösterilerek halkın doğal kaynakları bilinçli bir şekilde tüketmesine katkı yapacaktır. Bu proje, 10 Mart 2005 tarihinde Bilimsel Teknoloji Yüksek Kurulu toplantısında alınan kararlardan biri olan 'Doğal Kaynaklarımızı Değerlendirebilecek Yetkinliğe Erişme: Bitkisel ve hayvansal doğal kaynakların ve yaban hayatının değerlendirilmesi ve geliştirilmesi' hedefine katkıda bulunmuştur. *T. revolutus* C.'dan elde edilen uçucu yağ gibi diğer bitkilerden elde edilen uçucu yağların hücre içindeki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların üretilmesine yeni stratejiler getireceğine inanıyoruz.

6. KAYNAKLAR

- ADACHI, M. and ISHII, H. 2002. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(6): 487-491.
- AESCHBACH, R., LOLIGER, J., SCOTT, B. C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., and ARUOMA, O. I. 1994. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chemical Toxicology*, 32: 31-36.
- AL-AZZAWIE, H. F. and MOHAMED-SAIEL, S. A. 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, 78: 1371-1377.
- ALGHAZEER, R., GAO, H. and HOWELL, N. K. 2008. Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells). *Toxicology Letters*, 180: 202-211.
- ALTINTAŞ, S. 2006. Kahramanmaraş'ta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membranı sialik asit, glutatyon, plazma nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 62 sayfa.
- AMES, B. M. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*, 221: 1256-1263.
- AMMAR, R. B., BHOURI, W., SGHAIER, M. B., BOUBAKER, J., SKANDRANI, I., NEFFATI, A., BOUHLEL, I., KILANI, S., MARIOTTE, A. M., CHEKIRGHEDIRA, L., DIJOUX-FRANCA, M. G. and GHEDIRA, K. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, 116: 258-264.
- ANGIONI, A., BARRA, A., CORONEO, V., DESSI, S. and CABRAS, P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J.Agric. Food Chem.*, 54: 4364-4370.
- APAK, R., GUCLU, K., DEMİRATA, B., OZYUREK, M., CELİK, S. E. and BEKTASOLU, B. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12 (7): 1496-1547.
- ARAVALLI, R. N., STEER, C. J. and CRESSMAN, E. N. K. 2008. Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 48: 2047-2063.
- ARCHANA, P.R., NAGESHWAR RAO, B., BALLAL, M., SATISH RAO, B.S. 2009. Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. *Mutation Research*, 680: 70-77.
- AZECHI, H., NISHIDA, N., FUKUDA, Y., NISHIMURA, T., MINATA, M. and KATSUMA, H. 2001. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein

- pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*, 60: 346-354.
- BAARDSETH, P. 1989. Effect of selected antioxidants on the stability of dehydrated mashed potatoes. *Food Additives and Contaminants*, 6: 201-207.
- BAI, F., NAKANISHI, Y., TAKAYAMA, K., PEI, X. H., INOUE, K. and HARADA, T. 2003. Codon 64 of K-ras gene mutation pattern in hepatocellular carcinomas induced by bleomycin and 1 nitropyrene in A/J mice. *Teratog Carcinog Mutagen*, 161-170.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- BALLINGER, S.W. 2005. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(10): 1278-1295.
- BARATTA, M. T., DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G., BIONDI, D. M. and RUBERTO, G. 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10: 618-627.
- BAROCELLI, E., CALCINA, F., CHIAVARINI, M., IMPICCIATORE, M., BRUNI, R., BIANCHI, A. and BALLABENI, V. 2004. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon 'Grosso' essential oil. *Life Sciences*, 76: 213-223.
- BARTSCH, H. 1999. Exocyclic adducts as new risk markers for DNA damage in man. In: B. Singer, H. Bartsch (Editors.), *Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis*, IARC Scientific Publications, pp. 1–16, Lyon.
- BASER, K. H. C. 1995. Essential oils from aromatic plants which are used as herbal teas in Turkey. In: Baser K. H. C. (Editor), *Flavours, Fragrance and Essential Oils*. Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, AREP, pp. 67-79, Istanbul.
- BAŞER, K. H. C. 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl. Chem*, 74: 527-545.
- BAUER, K. D., GARBE, H. and SURBURG, H. 1997. *Common fragrance and flavor materials*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, Germany.
- BAYTOP, T. ve BASER, K. H. C. 15-19 October 1995. Essential oils and aromatic waters used as medicine in Istanbul between 17th. and 19th. centuries. In: K.H.C. Başer, (editor.), *Flavours Fragrances and Essential Oils-Proceedings of the 13th. International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*. Istanbul.
- BHATTACHARJEE, S. K. 2005. *Handbook of aromatic plants*, Pointer Publishers, pp. 190-192, Jaipur.
- BIRD, R. P., DRAPER, H. H. and BASRUR P. K. 1982. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells: production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 101: 237-246.

- BLUM, H. E. 2005. Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World J Gastroenterol*, 11(47): 7391-7400.
- BORS, W., MICHEL, C. and STETTMAIER, K. 2001. Structure–activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335: 166-180.
- BOSCH, F. X., RIBES, J., DIAZ, M. and CLERIES, R. 2004. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, 127: 5-16.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254.
- BRERA, B., SERRANO, A. and CEBALLOS, M. L. 2000. β -Amyloid Peptides Are Cytotoxic to Astrocytes in Culture: A Role for Oxidative Stres. *Neurobiology of Disease*, 7: 395-405.
- BUDHU, A., FORGUES, M., YE, Q.H., HE, P., ZANETTI, K. A. and KAMMULA, U.S. 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*, 10: 99-111.
- DUH, C. Y., WANG, S. K., WENG, Y. L., CHIANG, M. Y. and DAI, C. F. 1999. Cytotoxic terpenoids from the Formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Journal of Natural Products*, 62: 1518-1521.
- BURITS, M. and BUCAR, F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Resear.*, 14: 323-328.
- BUTTKUS, H. 1967. The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.*, 32: 432–434.
- CAI, Y. Z., SUN, M., XING, J., LUO, Q. and CORKE, H. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.
- CALLE, E.E., RODRIGUEZ, C., WALKER-THURMOND, K. and THUN, M.J. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 348: 1625-1638.
- CALVISI, D., LADU, S., GORDEN, A., FARINA, M., CONNER, E. A. and LEE, J. S. 2006. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, 130: 1117-1128.
- CANORUC, N., CİCEK, R., ATAMER, A., DURSUN, M., TURGUT, C., GUNELI, E. and CANORUC, F. 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats. *Turk J med Sci*, 31: 199-203.
- CERIELLO, A. and MOTZ, E. 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24(5): 816-823.

- CHEN, C. J. and CHEN, D. S. 2002. Interaction of hepatitis B virus, chemical carcinogen, and genetic susceptibility: multistage hepatocarcinogenesis with multifactorial etiology. *Hepatology*, 36: 1046-1049.
- CIMEN, M. Y., CIMEN, O. B., KACMAZ, B., OZTURK, H. S., YORGANCIOGLU, R. and DURAK, I. 2000. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes form patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 19:275-277.
- CLARK, G., QUILLIAM, L. A., HISAKA, M. M. and DER, C. J. 1993. Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4887-4897.
- COLNOT, S., DECAENS, T., NIWA-KAWAKITA, M., GODARD, C., HAMARD, G. and KAHN, A. 2004. Liver targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 17216-17221.
- CONGIU, R., FALCONIERI, D., MARONGIU, B., PIRAS, A. and PORCEDDA, S. 2002. Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal*, 17:239-244.
- COTELLE, N., BERNIER, J., CATTEAU, J., POMMERY, J., WALLET, J. and GAYDOU, E. M. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 35-43.
- CRAGG, G. M. and NEWMAN, D. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, 17: 153-163.
- CRAGG, G. M. and NEWMAN, D. J. 2000. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9: 1-15.
- CUI, K., LUO, X.L., XU, K.Y. and MURTHY, M.R.V., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(5): 771-799.
- D'AGOSTINO, D. P., OLSON, J. E. and DEAN, J. B. 2009. Acute hyperoxia increases lipid peroxidation and induces plasma membrane blebbing in human U87 glioblastoma cells. *Neuroscience*, 159: 1011-1022.
- DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., VAN BEEK, T. A. and LINSSEN, P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 140-146.
- DEVEREUX, T. R., STERN, M. C., FLAKE, G. P., YU, M. C., ZHANG, Z. Q. and LONDON, S.J. 2001. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog*, 31: 68-73.
- DEUFFIC, S., POYNARD, T., BUFFAT, L. and VALLERON, A-J. 1998. Trends in primary liver cancer. *Lancet*, 351: 214-215.
- DICAFALUSY, U., FALARDEAU, P. and HAMMARSTROM, S. 1977. Conversion of

- prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase. *FEBS Lett.* 84: 271–274.
- DUCHEN, M.R. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.*, 25: 365-451.
- DUNCAN, D.B. 1955. Multiple Range and Multiple F Test. *Biometrics*, 11: 1-14.
- DWIVEDI, C., MULLER, L. A., GOETZ-PARTEN, D. E., KASPERSON, K. and MISTRY, V. V. 2003. Chemopreventive effects of dietary mustard oil on colon tumor development. *Cancer Letter*, 196: 29-34.
- DYNLACHT, B. D., FLORES, O., LEES, J.A. and HARLOW, E. 1994. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev*, 8: 1772-1786.
- EL-SERAG, H. B., MASON, A. C. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, 340: 745-750.
- EL-SERAG, H.B., DAVILA, J.A., PETERSEN, N. J. and MCGLYNN, K. A. 2003. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med*, 139: 817-823.
- EL-SERAG, H. B. 2004. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*, 127: 27-34.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. and ZOLLNER, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 11: 81-128.
- FAKHARI, A. R., SALEHI, P., HEYDARI, R., EBRAHIMI, S. N. and HADDAD, P. R. 2005. Hydrodistillation-Headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*, 1098: 14-18.
- FATTOVICH, G., STROFFOLINI, T., ZAGNI, I. and DONATO F. 2004. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127: 35-50.
- FENG, Z., HU, W. and TANG, M. S. 2004. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 8598-8602.
- FENG, Z., HUA, W., MARNETT, L. J. and TANG, M.-S. 2006. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 601: 125–136
- GAMBHIR, J. K., LALI, P. and JAIN, A. K. 1997. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 30: 351– 355.
- GIACCIA, A. J. and KASTAN, M. B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*, 12: 2973-2983.

- GIBSON, G.E. and HUANG, H. M. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(5): 575-578.
- GLOECKNER, H., JONULEIT, T. and LEMKE, H. D. 2001. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar BlueTM. *J. Immunol. Methods*, 252: 131-138.
- GOODRICH, D.W. 2006. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene*, 25: 5233-5243.
- GORDON, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In B. J. F. Hudson (Editor), *Food Antioxidants*, Elsevier, pp.1-18, London.
- HALENDAR, I. M., ALAKOMI, H. L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOM, T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M. and VON WRIGHT, A. 1998. Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590-3595.
- HALLIWELL, B. 1984. Oxygen radicals: A common sense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62: 71-77.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. and ARUOMA, O. I. 1987. The deoxyribose method: A simple 'test tube' assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165: 215-219.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press., pp. 416-494 (2nd ed.), Oxford.
- HALLIWELL, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Community*, 9: 13-14.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C 1999-a. Free radicals, other species and disease. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn, Clarendon, pp. 617-783, Oxford.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C 1999-b. Free radicals, other species and disease. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn, Clarendon, pp. 105-245, Oxford.
- HARADA, H., YAMASHITA, U., KURIHARA, H., FUKUSHI, E., KAWABATA, J and KAMEI, Y. 2002. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substances in a marine red alga. *Anticancer Research*, 22: 2587-2590
- HASSAN, M. M., HWANG, L. Y., HATTEN, C. J., SWAIM, M., LI, D., ABBRUZZESE, J. L., BEASLEY, P., PATT, Y. Z., ZAGHLOUL, A. S., EL-SERAG, H. B., SOLIMAN, O., CHAPPELL, C. L. and BEASLEY, R. P. 2002. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*, 36: 1206-1213.
- HAZZIT, M., BAALIOUAMER, A., VERISSIMO, A. R., FALEIRO, M. L. and MIGUEL, M. G. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, article in pres.

- HEO, S.-J. and JEON, Y.-J. 2009. Evaluation of diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae* for radical scavenging activity and its protective effect against H₂O₂-induced cell damage. *Process Biochemistry*, 44: 412-418.
- HERBST, A. and KOLLIGS, F. T. 2007. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol*, 361: 63-91.
- HICKMAN, E. S., MORONI, M. C. and HELIN K. 2002. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 12: 60-66.
- HSIA, C. C., DI BISCEGLIE, A. M., KLEINER, D. E. JR, FARSHID, M. and TABOR, E. 1994. RB tumor suppressor gene expression in hepatocellular carcinomas from patients infected with the hepatitis B virus. *J Med Virol*, 44: 67-73.
- HSU, I. C., METCALF, R. A., SUN, T., WELSH, J. A., WANG, N. J. and HARRIS, C. C. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350: 427-428.
- HSU, I., TOKIWA, T., BENNETT, W., METCALF, R. A., WELSH, J. A. and SUN, T. 1993. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 14: 987-992.
- HUANG, X., YU, C., JIN, C., KOBAYASHI, M., BOWLES, C. A. and WANG, F. 2006. Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Cancer Res*, 66: 1481-1490.
- <http://ogrenci.hacettepe.edu.tr/~serkan02/kognozi/UCUCUYAG.pdf>
- HUSSAIN, S. P., RAJA, K., AMSTAD, P. A., SAWYER, M., TRUDEL, L. J. and WOGAN, G.N. 2000. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12770-12775.
- ISSA, A. Y., VOLATE, S. R. and WARGOVICH, M. J. 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 405-419.
- JAESCHKE, H., GORES, G. J., CEDERBAUM, A. I., HINSON, J. A., PESSAYRE, D. and LEMASTERS, J. J. 2002. Forum-mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2): 166-176.
- JAGIRDAR, J., NONOMURA, A., PATIL, J., THOR, A. and PARONETTO, F. 1989. Ras oncogene p21 expression in hepatocellular carcinoma. *J Exp Pathol*, 4: 37-46.
- JIE, H., TAO, S., JUN, H., SHUANGYANG, C., XIAOQIANG, C. and GUOLIN, Z. 2007. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. *Food Chemistry*, 103: 355-358.
- JOHNSON, K. and LOO, G. 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat. Res.*, 459: 211-218.
- JU, E. M., LEE, S. E., HWANG, H. J. and KIM, J. H. 2004. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sciences*, 74: 1013-1026.

- KA, H., PARK, H. J., JUNG, H. J., CHOI, J. W., CHOK, S., HA, J. and LEE, K. T. 2003. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukaemia HL-60 cell. *Cancer Lett.*, 196: 143-152.
- KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J. P., PIHLAJA, K. and KUJALA, T. S. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- KARAMAN, S., DIGRAK, M., RAVID, U. and ILCIM, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Célak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 183-186.
- KARTAL, N., SOKMEN, M., TEPE, B., POLISSIOU, M. and SOKMEN, A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. Using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100: 584-589.
- KEUM, Y. S., PARK, K. K., LEE, J. M., CHUN, K. S., PARK, J. H. and LEE, S. K. 2000. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat processed ginseng. *Cancer Letter*, 150: 41-48.
- KILIÇ, A. 2008. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10: 37-45.
- KIRANA, C., MCLINTOSH, G.H., RECORD, I.R. and JONES, G.P. 2003. Antitumor activity of extract of *Zingiber aromaticum* and its bioactive sesquiterpenoid zerumbone. *Nutrition and Cancer*, 45: 218-225.
- KLAUNIG, J. E. and KAMENDULIS, L. M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44: 239-267.
- KNIO, K. M., USTA, J., DAGHER, S., ZOURNAJIAN, H. and KREYDIYYEH, S. 2008. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresour. Technol.*, 99 (4): 763-768.
- KOLEVA, I. I., VAN BEEK, T. A., LINSEN, J. P. H., DE GROOT, A. and EVSTATIEVA, L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- KULEVANOVA, S. and PANOVSKA, T. K. 2002. Inhibition of thermal autooxidation of lard by antioxidative action of *Thymus* extracts. *Acta Pharm.*, 52: 29-35.
- LAGOURI, V., BLEKAS, G., TSIMIDOU, M., KOKKINI, S. and BOSKOU, D. 1993. Composition and anti-oxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 197(1): 20-23.
- LAGOURI, V. and BOSKOU, D. 1995. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. In G. Charalampous (Editor.). Food flavors: Generation, Analysis and Process Influence, Elsevier, 1, pp. 869-874, Amsterdam.

- LANDER, H. M. 1997. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb Journal*, 11: 118-124.
- LATTAOUI, N. and TANTAOUI-ELARAKI, A. 1994. Individual and combined oils. *Rivista Italoana EPPOS*, 13: 13-19.
- LEE, B. W., LEE, J. H., LEE, S. T., LEE, H. S., LEE, W. S. and JEONG, T. S. 2005. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15: 5548-5552.
- LEGAULT, J., DAHL, W., DEBITION, E., PICHETTE, A. and MALDEMONT, J. C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -Humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, 69: 402-407.
- LEI, J., YU, J., YU, H. and LIAO, Z. 2008. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. *Food Chemistry*, 107: 1205-1209.
- LI, H., LEE, G. H., LIU, J., NOMURA, K., OHTAKE, K. and KITAGAWA, T. 1991. Low frequency of ras activation in 2-acetylaminofluorene and 3'-methyl-4-(dimethylamino) azobenzene-induced rat hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett*, 56: 17-24.
- LIAO, Y., TANG, Z. Y., LIU, K. D., YE, S. L. and HUANG, Z. 1997. Apoptosis of human BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells released by antisense H-ras DNA-*in vitro* and *in vivo* studies. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123: 25-33.
- LIMA, C. F., FERNANDES-FERREIRA, M. and PEREIRA-WILSON, C. 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79: 2056-2068.
- LINSKENS, H. F. and JACKSON, J. F. 1997. Modern Methods of Plant Analysis, Essential Oils and waxes. Springer, 12, Germany.
- LOGUERCIO, C. and FEDERICO, A. 2003. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(1): 1-10.
- LONGARAY DELAMARE PAULA, A., MOSCHEN-PISTORELLO, I. T., ARTICO, L., ATTI-SERAFINI, L., ECHEVERRIGARAY, S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100: 603-608.
- LOSSO, J. N., SHAHIDI, F. and BAGCHI, D. 2007. Anti-angiogenic functional and medicinal foods. Boca Raton, FL: Taylor and Francis.
- LU, Y. and FOO, Y. L. 2000. Antioxidant and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Journal of Life Science*, 66: 725-735.
- LUK, J. M., LAM, C. T., SIU, A. F., LAM, B. Y., NG, I. O. and HU, M. Y. 2006. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heatshock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics*, 6: 1049-1057.

- LUNN, R. M., ZHANG, Y. J., WANG, L. Y., CHEN, C. J., LEE, P. H. and LEE, C. S. 1997. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res*, 57: 3471-3477.
- MADSEN, H. L. and BERTELSEN, G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 271-277.
- MALUMBRES, M. and BARBACID, M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1: 222-231.
- MARNETT, L. J. and PLASTARAS, J. P. 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.*, 17: 214-221.
- MARNETT, L. J. 1999-a. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.*, 424: 83-95.
- MARNETT, L. J. 1999-b. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. In: B. Singer, H. Bartsch (Editors), *Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis*, IARC Sci Publ., pp. 17-28, Lyon.
- MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIE'RE, J.M. and VIANO, J. 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7115-7121.
- MATEOS, R., LECUMBERRI, E., RAMOS, S., GOYA, L. and BRAVO, L. 2005. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, 827: 76-82.
- MCCORD, J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108: 652-659.
- MCCORMICK, M., DENNING, G. M., RESZKA, G. M., BILSKI, P., BUETTNER, G. R., RASMUSSEN, G. T., RAILSBACK, M. A., BRITIGAN, B. E. 2000. Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production. *Biochem J*, 350: 797-804.
- MCGEE, S. A., WIGGINS, S. A. and PIERCE, J. D. 2003. What advanced practice nurses to know about free radicals. *The internet journal of advanced nursing practice*, 6: 1-10.
- MICHELIS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O. and REMACLE, J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 17: 235-48.
- MILAN, S. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 531-537.
- MING, L., THORGEIRSSON, S. S., GAIL, M. H., LU, P., HARIS, C.C., WANG, N., SHAO, Y., WU, Z., LIU, G., WANG, X. and SUN, Z. 2002. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology*, 36: 1214-1220.

- MOSKOVITZ, J., YIM, K. A. and CHOKE BOON, P. 2002. Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397: 354-359.
- MOYLER, D. A. 1993. Extraction of essential oils with carbon dioxide. *Flavour and Fragrance J.*, 8. 235-247.
- NAGAI, H., KIM, Y. S., KONISHI, N., BABA, M., KUBOTA, T. and YOSHIMURA, A. 2002. Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett*, 186: 59-65.
- NAKAMOTO, Y., GUIDOTTI, L., KUHLEN, C., FOWLER, P. and CHISARI, F. 1998. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med*, 188: 341-350.
- NAKAMOTO, Y., KANEKO, S., FAN, H., MOMOI, T., TSUTSUI, H., NAKANISHI, K., KOBAYASHI, K. and SUDA, T. 2002. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp Med*, 196: 1105-1111.
- NEJAD EBRAHIMI, S., HADIAN, J., MIRJALILI, M. H., SONBOLI, A. and YOUSEFZADI M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, 110: 927-931.
- NELSON, W. J. and NUSSE, R. 2004. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303: 1483-1487.
- NIEDERNHOFER, L. J., DANIELS, J. S., ROUZER, C. A., GREENE R. E. and MARNETT, L. J. 2003. Malondialdehyde a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 31426-31433.
- NONOMURA, A., OHTA, G., HAYASHI, M., IZUMI, R., WATANABE, K. and TAKAYANAGI, N. 1987. Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 82: 512-518.
- OKUDA, K. 2000. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32: 225-237.
- ORHAN, I., SENOL, F.S., GULPINAR, A.R., KARTAL, M., SEKEROGLU, N., DEVECI, M., KAN, Y. and SENER, B. 2009. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox subsp. caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1304-1310.
- OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A. and DEEMER, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3122-3128.
- OWEN, R. W., GIACOSA, A., HULL, W. E., HAUBNER, R., WURTELE, G. and SPIEGELHALDER, B. 2000. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, 1: 107-112.

- OYAIKU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44: 307-315.
- OZGÜNES, H., GÜRER, H. and TUNCER S. 1995. Correlation between plasma malondialdehyde and ceruloplasmin activity values in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 28:193-194.
- PANK, F., PFEFFERKORN, A. and KRÜGER, H. 2004. Evaluation of summer savory collection (*Satureja hortensis* L.) with regards to morphology, precocity, yield components and essential oil and carvacrol content. *Zeitschrift für Arznei Gewürzpflanzen*, 9(2): 72-79.
- PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., ROSAS-ROMERO, A., FLERLAGE, N., BURILLO, J. and CODINA, C. 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6882-6890.
- PARKIN, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(29): 74-108.
- PÉRES, V. F., MOURA, D. J., SPEROTTO, A. R. M., DAMASCENO, F. C., CARAMÃO, E. B., ZINI, C. A. and SAFFI, J. 2009. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2389-2395.
- PERRY, N. B., ANDERSON, R. E., BRENNAN, N. J., DOUGLAS, M. H., HEANEY, A. J., MCGIMPSEY, J. A. and SMALLFIELD, B. M. 1999. Essential oils from Dalmation Sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2048-2054.
- PIMIENTA, G. and PASCUAL, J. 2007. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*, 6: 2628-2632.
- PONG, K. 2003. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opinion in Biological Therapy*, 3: 127-139.
- PORTA, G. D., PORCEDDA, S., MARONGIU, B. and REVERCHON, E. 1999. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance J.*, 14: 214-218.
- PRIETO, J. M., IACOPINI, P., CIONI, P. and CHERICONI, S. 2007. *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, 104: 889-895.
- RAGHUNAND, N., GATENBY, R. A. and GILLIES, R. J. 2003. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol*, 76: 11-22.
- RAO RAJESWARA, B. R., KAUL P. N., SYAMASUNDAR K. V. and RAMESH S. 2005. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.) *Industrial Crops and Products*, 21: 121-127.

- RAWLINGS, J. S., ROSLER, K. M. and HARRISON, D. A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*, 117: 1281-1283.
- REN, W., QIAO, Z., WANG, H., ZHU, L. and ZHANG, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519-534.
- RIO, D. D., STEWART, A. J. and PELLEGRINI, N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, 15: 316-328.
- RUBERTO, G. and BARATTA, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69: 167-174.
- RUEFF, J., CHIAPELLA, C., CHIPMAN, J. K., DARROUDIF., SILVA, I. D., BOGAERT, M. D., FONTI, E., GLATT, H. R., ISERN, P., LAIRES, A., LEONARD, A., LLAGOSTERA, M., MOSSESSO, P., NATAAJAN, A. T., PALITTI, F., RODRIGUES, A. S., SCHINOPPI, A., TURCHI, G. and SCHNEIDER, G. W. 1996. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutat. Res.*, 353: 151-176.
- RUFFA, M. J., FERRARO, G., WAGNER, M. L., CALCAGNO, M. L., CAMPOS, R.H. and CAVALLARO, L. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 335-339.
- SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S. and RADICE, M. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- 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: 1524-1528.
- SARBAN, S., KOCYIGIT, A., YAZAR, M. and ISIKAN, U. E. 2005. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochemistry*, 38: 981-986.
- SATOH, T. and KAZIRO, Y. 1992. Ras in signal transduction. *Semin Cancer Biol*, 3: 169-177.
- SATOH, S., DAIGO, Y., FURUKAWA, Y., KATO, T., MIWA, N. and NISHIWAKI, T. 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*, 24: 245-250.
- SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., REMESY, C. and JIMENEZ, L. 2005. Dietary of polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4): 287-306.
- SCRIVANTI, L. R., ZUNINO, M. P. and ZYGADLO, J. A. 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 563-572.

- SEYOUM, A., ASRES K. and EL-FIKY, F. K. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- SHALABY, A. A., ALLAM, K. A. M., MOSTAFA, A. A. and FAHMY, S. M. E. 1998. Insecticidal properties of citrus oils against *Culex pipens* and *Musca domestica*. *J. Egypt. Soc. Parasitol*, 28: 595-606.
- SIBANDA, S., CHIGWADA, G., POOLE, M., GWEBU, E.T., NOLETTO, J.A., SCHMIDT, J.M., REA, A.I. and SETZER, W.N. 2004. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J. Ethnopharmacol.*, 92: 107-111.
- SIMON, J. E. 1993. New crop introduction: Exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. The first world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare- WOCMAP. *Acta Horticulturae*, 331: 209-221.
- SIRIWARDHANA, N., LEE, K. W., KIM, S. H., HA, J. W. and JEON, Y. J. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Science Technology International*, 9: 339-347.
- SLATTER, D. A., BOLTON, C. H. and BAILEY A. J. 2000. The importance of lipid derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 43: 550-557.
- SLATTER, D. A., AVERY, N. C. and BAILEY A. J. 2004. Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde. *J. Biol. Chem.*, 279: 61-69.
- SNEDOCOR, G. W. and COCHRAN, W. G. 1967. Statistical Methods. 6th ed. Ames, U.S.A. Iowa State University Pres, Iowa, 150 pp.
- SOKMEN, A., GULLUCE, M., AKPULAT, H. A., DAFERERA, D., TEPE, B., POLISSIOU, M., SOKMEN, M. and SAHİN, F. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627-634.
- SORIANO, M. C., SOTOMAYOR, J. A., SANCHEZ-GOMEZ, P. and CORREAL, E. 1996. Antioxidant components of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia lavandulifolia* ssp. *vellerea* from south-eastern Spain. In: Proceedings of the 18th International Conference on Polyphenols, pp. 331-332, Bourdeaux, France.
- SPENCER, J. P., ABD-EL-MOHSEN, M. M. and RICE-EVANS, C. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423(1): 148-161.
- STAHL-BISKUP, E. 2002. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* -a global view. In: E. Stahl-Biskup and F. Sáez (Editors), *Thyme: The Genus Thymus*, Taylor and Francis, pp. 75-124, London and New York.
- STANNER, S. A., HUGHES, J., KELLY, C. N. M. and BUTTRISS, J. 2004. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public Health Nutrition*, 7(3): 407-422.

- SUH, K. S., CHOI, E. M., KWON, M., CHON, S., OH, S., WOO, J.-T., KIM, S. W. KIM, J.-W. and KIM, Y. S. 2009. Kaempferol attenuates 2-Deoxy-D-ribose-induced oxidative cell damage in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biol. Pharm. Bull.*,32(4): 746-749.
- SURESH KUMAR, K., GANESAN, K. and SUBBA RAO, P. V. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty-An edible seaweed. *Food Chemistry*, 107: 289-295.
- TANKER, M., TANKER, N., ŞARER, E., ATASU, E., ŞENER, B., KURUCU, S. and MERİÇLİ, F. 26-30 May 1990. Result of certain investigation on the volatile oil containing plants of Turkey. In: Essential oils for perfumery and flavours. International Conference , pp.16-29 Antalya.
- TAU, T. M. 1979. Mutagenicity and cytotoxicity of malonaldehyde in mammalian cells, *Mech. Ageing Dev.*, 11: 37-144.
- TAYLOR-ROBINSON, S. D, FOSTER, G. R, ARORA, S., HARGREAVES, S. and THOMAS, H.C. 1997. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-1994. *Lancet*, 350: 1142-1143.
- TEPE, B., DAFERERA, D., SOKMEN, A., SOKMEN, M. and POLISSIOU, M. 2005-a. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90: 333-340.
- TEPE, B., SOKMEN, M., AKPULAT, H. A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M. and SOKMEN, A. 2005-b. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp. sipyleus var. rosulans. *Journal of Food Engineering*, 66: 447-454.
- THOMAS, J. A. 1999. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stres. Iowa Stata University. <http://www.bb.iastate.edu.tr/~jat/glutchp.html>
- TIWARI, A. K. 2004. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, 86(8): 1092-1102.
- TSIMIDOU, M. and BOSKOU, D. 1994. Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In G. Charalampous (Editor), Spices, Herbs and Edible Fungi, Elsevier, pp. 273–284, Amsterdam.
- UCHIDA, K. 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stres. *Progress in Lipid Research*, 42: 318-343.
- USTA, J., KREYDIYYEH, S., KNIO, K., BARNABE, P., BOU-MOUGHLABAY, Y. and DAGHER, S. 2009. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chemico-Biological Interactions*, 180: 39-46.
- UZUN, K., VURAL, H., OZTURK, T., OZER, F. and IMECIK, I. 2000. Diagnostic value of lipid peroxidation in lung cancer. *Eastern Journal of Medicine*, 5(2): 48-51.
- ÜNAL, O. ve GÖKÇEOĞLU, M. 2003. Akdeniz Üniversitesi kampus florası. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16(2): 143-154.

- VARDAR-UNLU, G., CANDAN, F., SOKMEN, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, M., DONMEZ, E. and TEPE, B. 2003. Antibacterial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 63-67.
- VAS, G. and VEKEY, K. 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. of Mass Spectrometry*, 39: 233-254.
- VELAZQUEZ, R. F., RODRIGUEZ, M., NAVASCUES, C. A., LINARES, A., PEREZ, R., SOTORRIOS, N. G., MARTINEZ, I. and RODRIGO, L. 2003. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*, 37: 520-527.
- VITAGLIONE, P., MORISCO, F., CAPORASO, N. and FOGLIANO, V. 2004. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8): 575-586.
- WANG, Y.-K. and HUANG, Z.-Q. 2005. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ *in vitro*. *Pharmacological Research*, 52: 174-182.
- WASOWICS, W., NEVE, J. and PETRETZ, A. 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum; importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin. Chem.*, 39: 2522-2526.
- WEINBERG, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.
- WILLCOX, J. K., ASH, S. L. and CATIGNANI, G. L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4): 275-295.
- WILLIAMS, R. J., SPENCER, J. P. AND RICE-EVANS, C. 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 838-849.
- WIMAN, K. G. 2006. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ*, 13: 921-926.
- WORMALD, S. and HILTON, D. J. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*, 279: 821-824.
- WU, D. and CEDERBAUM, A. I. 2003. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 27(4): 277-284.
- XU, Y.H., DONG, B., LUO, Q.Z., ZHOU, H.Y., JIA, Y.C., YANG, Y.F. and WANG, Y.Z. 2005. Influence of elemene on the expression of Bcl-2 family genes in rat C6 glioma cells. *Natl. Med. J. China*, 85: 1700-1703.

www.minitab.com/products/minitab

- YAN, R., YANG, Y., ZENG, Y. and ZOU, G. 2009. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 121: 451-455.
- YANG, A., CARDONA, D. L. and BARILE, F. A. 2002. Subacute cytotoxicity testing with cultured human lung cells. *Toxicology in Vitro*, 16: 33-39.
- YAŞAR, S. 2005. Çukurova Üniversitesi kampusunda doğal olarak yetişen bazı çok yıllık tıbbi bitkilerin toprak özellikleri ile sabit ve uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 43 ss.
- YEH, C.C., HOU, M.F., TSAI, S.M., LIN, S.K., HSIAO, J.K., HUANG, J.C., WANG, L.H., WU, S.H., HOU, L.A., MA, H. and TSAI, L.Y. 2005. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 361: 104-111.
- YOON, S. and SEGER, R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24: 21-44.
- YOSHIDA, T., HISAMOTO, T., AKIBA, J., KOGA, H., NAKAMURA, K. and TOKUNAGA Y. 2006. Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene*, 25: 6056-6066.
- YOSHIJI, H., NOGUCHI, R., KURIYAMA, S., YOSHII, J., IKENAKA, Y. and YANASE, K. 2005. Different cascades in the signaling pathway of two vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors for the VEGF-mediated murine hepatocellular carcinoma development. *Oncol Rep*, 13: 853-857.
- YOSHIKAWA, H., MATSUBARA, K., QIAN, G. S., JACKSON, P., GROOPMAN, J. D. and MANNING, J. E. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28: 29-35.
- 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 free radical scavenger. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 210-215.
- YOUNG, I. S. and WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54 (3): 176–186.
- YU, M. C., YUAN, J. M. 2004. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127: 72-78.
- YU, J. Q., LEI, J. Q., YU, H. D., CAI, X. AND ZOU, G. L. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry*, 65: 881–884.
- YU, J. Q., LIAO, Z. X., CAI, X. Q., LEI, J. C. and ZOU, G. L. 2007. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 162-167.
- ZARIDAH, M. Z., NOR AZAH, M. A. and ROHANI, A. 2006. Mosquitocidal activities of Malaysian plants. *J. Trop. Forest. Sci.* 18 (1): 74-80.

- ZHAO, L. J., WANG, L., REN, H., CAO, J., LI, L. and KE, J. S. 2005. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res*, 305: 23-32.
- ZHENG, M. and STORZ, G. 2000. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 59:1-6.
- ZRIRA, S., ELAMRANI, A. and BENJILALI, B. 2003. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco – A seasonal variation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 475-480.
- ZYGADLO, J. A., LAMARQUE, A. L., MAESTRI, D. M. and GROSSO, N. R. 1995. Use of essential oils as natural antioxidants. *Grasas Aceites*, 46: 285–288.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Erdoğan 1984 yılında Korkuteli/ Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Alanya’da tamamladı. 2003 yılında burslu olarak Haliç Üniversitesi Fen & Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne girdi. 2007 yılında Moleküler Biyolog olarak ikincilik ile mezun oldu. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.