



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE TİMOKİNON VE
KARVAKROLÜN KOMBİNE UYGULAMASININ
ANTİKARSİNOJEN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Melis BULUT TUNÇAY

**Danışman
Doç. Dr. Durkadın DEMİR EKŞİ**

**ALANYA
2025**

T.C
ALANYA ALADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE TİMOKİNON VE KARVAKROLÜN
KOMBİNE UYGULAMASININ ANTİKARSİNOJEN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Melis BULUT TUNÇAY

Anabilim Dalı: Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Program Adı: Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

Danışman

Doç. Dr. Durkadin DEMİR EKŞİ

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2025-04-01-LTP01 nolu proje
kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA
(2025)

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Melis BULUT TUNÇAY

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecince bana rehberlik eden, bilimsel düşüncüyü benimsememde ve araştırma disiplini kazanmamda büyük katkıları olan, her zaman bilgi, destek, anlayış ve teşvikini esirgemeyen değerli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Durkadın DEMİR EKŞİ'ye,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, çalışmamın bilimsel niteliğini artırmamda ve deneylerimde önemli katkıları olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre EKŞİ'ye,

Çalışmam süresince bilimsel sürece katkı sağlayan değerli materyal ve kaynakları benimle paylaşma nezaketi gösteren, desteğini esirgemeyen kıymetli hocalarım sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN'e, sayın Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN'a ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Dilara NEMUTLU SAMUR'a

Her anımda yanımda olan, sınırsız sabrıyla ve sevgisiyle bana güç veren, bu zorlu yolun yaratmış olduğu stresle baş etmemde, motivasyonumu korumamda ve umudumu kaybetmeden ilerlememde bana destek olan sevgili eşim Mehmet Furkan TUNÇAY'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu akademik süreçte de bana inanılan ve eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen daima arkamda duran annem Fahriye POLATÇI, babam Halil BULUT, kardeşim Pelin BULUT ve annem Şengül TUNÇAY'a,

Moleküler Tıp yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte yol aldığım, çalışmaktan mutluluk duyduğum, samimiyeti ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Ebru Büşra UĞUR ve Aybüke BOYACI'ya,

Projemizi destekleyen Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi'ne,

Yüksek lisansın bana kazandırdığı tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, bütün samimiyetimle teşekkürümü bir borç bilirim.

ÖZET

SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE TİMOKİNON VE KARVAKROLÜN KOMBİNE UYGULANMASININ ANTİKARSİNOJEN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melis BULUT TUNÇAY

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,

Ekim, 2025 (78 Sayfa)

Servikal kanser, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. Konvansiyonel tedavilerin sınırlılıkları nedeniyle doğal bileşiklere yönelik alternatif yaklaşımlar önem kazanmaktadır. Bu çalışma, *Nigella sativa* kaynaklı timokinon ile kekik türlerinden elde edilen karvakrolün HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki bireysel ve kombine etkilerini incelemiştir. Kontrol hücre grubu olarak, insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293T hücreleri kullanılmıştır. Deney gruplarında hücre canlılığı analizi ve sitotoksik etkinin belirlenmesi MTT assay testiyle, hücre migrasyonu yara deneyi ile ve bu ajanların apoptotik etkileri immunositokimyasal yöntemle Bax/Bcl-2 analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8 programı kullanılarak yapılmıştır. 125 µM ve üstü konsantrasyonlarda timokinon HeLa ve 293T hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Timokinonun yüksek dozlarda hücre migrasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Karvakrolün fiziksel olarak muamele edilmediği ancak karvakrol eklenen hücrelere komşu kuyularda hücre canlılığının belirgin derecede azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek karvakrol dozlarına komşuluk hücre canlılığını daha da azaltmıştır ($p<0,05$). Aynı etki timokinon ve karvakrolün kombine uygulamasında da belirlenmiştir. Karvakrolün buhar formu ve timokinon+karvakrolün kombine uygulamasının, HeLa hücrelerinde migrasyonu kontrollere göre azalttığı belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyama skorlamalarına göre karvakrolün buhar halinde HeLa hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı gözlenmiştir ($p<0,0001$). Mevcut veriler gerek timokinon ve karvakrolün tek başlarına gerekse kombine uygulamalarının servikal kanserin tedavisi açısından umut vaadedici niteliktedir. Diğer taraftan çalışmamız sonucunda belirlenen karvakrolün buhar fazının antikarsinojenik etkileri ileri çalışmalar ile detaylı incelenmelidir.

Anahtar Sözcükler: Servikal kanser, HeLa, Timokinon, Karvakrol

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF COMBINED APPLICATION OF THYMOQUINONE AND CARVACROL APPLICATION OF THYMOQUINONE AND CARVACROL IN CERVICAL CANCER CELLS

Melis BULUT TUNÇAY

Department of Molecular Medicine

Graduate School of Alanya Alaaddin Keykubat University,

October, 2025

Cervical cancer is a significant public health concern, particularly in low- and middle-income countries. Due to the limitations of conventional treatments, alternative approaches based on natural compounds have gained increasing importance. This study investigated the individual and combined effects of thymoquinone derived from *Nigella sativa* and carvacrol obtained from *Origanum* species on HeLa cervical cancer cells. The human embryonic kidney cell line 293T was used as the control group. In the experimental groups, cell viability and cytotoxicity were evaluated using the MTT assay, cell migration was assessed with the scratch assay, and apoptotic effects were analyzed by immunocytochemical Bax/Bcl-2 staining. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. Thymoquinone exhibited cytotoxic effects on both HeLa and 293T cells at concentrations of 125 μ M and above, and high doses were found to reduce cell migration. Although carvacrol was not directly applied to the cells, a marked decrease in cell viability was observed in wells adjacent to carvacrol-treated wells, which became more pronounced at higher doses ($p < 0.05$). A similar effect was observed in the combined thymoquinone–carvacrol treatment. Both vapor-phase carvacrol and the combined application of thymoquinone and carvacrol were found to reduce migration in HeLa cells compared with controls. Immunocytochemical scoring demonstrated that vapor-phase carvacrol significantly increased the Bax/Bcl-2 ratio in HeLa cells compared with the control group ($p < 0.0001$). Overall, the present findings indicate that both thymoquinone and carvacrol, individually or in combination, hold promise as potential therapeutic agents for cervical cancer. However, the anticancer effects of vapor-phase carvacrol identified in this study warrant further detailed investigation.

Keywords: Cervical cancer, HeLa, Thymoquinone, Carvacrol

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR.....	4
2.1. Servikal Kanser.....	4
2.1.1. Servikal Kanserin Etiyolojik Faktörleri.....	7
2.1.2. Servikal Kanserde Tarama ve Tanı.....	11
2.1.3. Servikal Kanserin Tedavisi.....	12
2.1.3.1 Cerrahi.....	12
2.1.3.2 Radyoterapi.....	13
2.1.3.3 Kemoterapi.....	13
2.1.3.4 Servikal Kanserin Önlenmesi.....	14
2.2. Kanser Tedavisinde Bitkisel Kökenli Bileşikler.....	15
2.2.1. Timokinon.....	18
2.2.2. Timokinonun Antioksidan Etkisi.....	20
2.2.3. Timokinonun Anti-inflamatuar ve İmmünomodülatör Etkisi.....	21
2.2.4. Timokinonun Hücre Döngüsü, Proliferasyonu ve Apoptoz Üzerine Etkileri.....	23
2.2.5. Timokinonun Servikal Kansere Üzerindeki Etkileri.....	28
2.3. Karvakrol.....	30
2.3.1. Karvakrolün Antioksidan Etkisi.....	30
2.3.2. Karvakrolün İmmünomodülatör Etkisi.....	33
2.3.3. Karvakrolün Antikanser Etkisi.....	34
2.3.4. Karvakrolün Servikal Kansere Üzerindeki Etkileri.....	38
2.4. Çalışmamızın Amacı.....	40
3. YÖNTEM.....	42

3.1. Hücre Kültürü ve Deney Grupları.....	42
3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanması.....	42
3.1.2. Timokinonun ve Karvakrolün Hazırlanması.....	42
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	43
3.3. MTT Assay.....	44
3.4. Hücre Yara Deneyi.....	46
3.5. İmmünotokimyasal Boyama ve Skolama.....	47
3.6. İstatiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. HeLa Hücreleri.....	50
4.1.1. MTT Assay Bulguları.....	50
4.1.2. Hücre Yara Deneyi Bulguları.....	54
4.1.3. İmmünotokimya Boyama Bulguları.....	55
4.2. 293T Hücreleri.....	57
4.2.1. MTT Assay Bulguları.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	78

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 HPV viral proteinleri ve fonksiyonları	9
Tablo 3.1 Timokinon, Karvakrol ve Timokinon + Karvakrol deney grupları ve uygulanan dozlar.....	45
Tablo 3.2 Hücre yara deneyi grupları Timokinon, Karvakrol ve Timokinon+ Karvakrol konsantrasyonları.....	47



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 A) Servikal kanserin anatomik kökeni ve B) normal serviksten HPV aracılığıyla gelişen invaziv skuamöz hücreli karsinoma dönüşüm süreci.....	5
Şekil 2.2 HPV'nin genom organizasyonu.....	8
Şekil 2.3 Uçucu yağların antikanser etkinliğinde rol oynayan hücresel hedefleri.....	17
Şekil 2.4 A) Timokinon moleküler yapısı B) Timokinonun üç boyutlu moleküler yapısı.....	19
Şekil 2.5 Timokinonun anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri.....	23
Şekil 2.6 Timokinonun hücre döngüsü üzerindeki etkisi.....	24
Şekil 2.7 A) Karvakrolün moleküler yapısı B) Karvakrolün üç boyutlu moleküler yapısı.....	30
Şekil 2.8 Karvakrolün genel etki mekanizmaları.....	35
Şekil 2.9 Karvakrol tarafından indüklenen antikanser mekanizmasının şematik gösterimi.....	36
Şekil 4.1 HeLa hücrelerinde Timokinon, Karvakrol ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Timokinon, Karvakrol ve Timokinon+Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri. B) Timokinon, C) Karvakrol, D) Timokinon +Karvakrol grupları için istatistiksel analiz grafikleri (One way ANOVA, Welch çoklu karşılaştırma doğrulaması ile, * $p<0,001$).....	50
Şekil 4.2 A) Timokinon doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Timokinon plate doz gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, *** $p<0,0001$).....	51
Şekil 4.3 A) Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Karvakrol plate istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli).....	52
Şekil 4.4 A) Timokinon+Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Timokinon+Karvakrol plate doz gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,01$). Timokinon+Karvakrol plate istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli).....	52

Şekil 4.5 Timokinon (T Kontrol), Karvakrol (K Kontrol), Timokinon+Karvakrol (T+K Kontrol) platelerdeki kontrol grupları ile Kontrol plate verilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analiz garfiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,005$).....	53
Şekil 4.6 HeLa hücrelerinde Evaporasyon-Karvakrol gruplarının karşılaştırmalı istatistiksel analiz analiz grafiği. A) Uygulama gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimlerini gösteren diyagram. Dördüncü kuyularına üçlü olarak B) 3,125 μ M C) 6,25 μ M, D) 12,5 μ M, E) 25 μ M Karvakrol eklenen platelerin karşılaştırılması (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,005$).....	54
Şekil 4.7 HeLa hücre yara deneyi sonucunda yara bölgesinde 0., 6, 12 ve 24. saatlerde gözlenen değişimler. (Sadeliği koruyabilmek için yalnızca kontrol grubuna ait görseller verilmiştir.) A) Kontrol grubuna ait mikroskopi görüntüleri , mavi gölgeli alanlar taranan alanı göstermektedir. B) Yara bölgesinde gözlenen iyileşmenin grafiksel gösterimi.....	55
Şekil 4.8 Bax/Bcl-2 immünositokimyasal boyama görüntüleri. A) Değişen dozlarda evaporasyon yolu ile Karvakrole maruz bırakılan HeLa hücrleri, B) Karvakrole maruz bırakılmayan Kontrol HeLa hücreleri (AbD; primer antikor yerine Antibody diluent eklenen grup).....	56
Şekil 4.9 Evaporasyon yolu ile Karvakrolün Bax/Bcl-2 ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi. A) Bax/Bcl-2 immünositokimya skorlamalarını gösteren tablo. B) Skorumla değerlerinin istatistiksel analizi (One way ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma testi, *** $p<0,0001$).....	57
Şekil 4.10 293T hücrelerinde Timokinon, Karvakrol ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Deneyde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki Timokinon (25-100 μ M), Karvakrol (3,125-25 μ M) ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarının (T+K) 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerleri. İstatistiksel grafikler B) Timokinon grubu, C) Karvakrol grubu, D) Timokinon+Karvakrol grubu (One way ANOVA, Tukey post-hoc testi, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).....	59
Şekil 4.11 Timokinon'un 293T hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Farklı Timokinon konsantrasyonlarında (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M) ve kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Timokinon uygulanan hücrelerde absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi. Artan Timokinon konsantrasyonları ile birlikte hücre canlılığında kademeli bir azalma	

gözlenmiştir. 100 μ M Timokinon uygulaması, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltmıştır (One way ANOVA, * $p < 0,05$).....60

Şekil 4.12 Karvakrol'ün 293T hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) Farklı Karvakrol konsantrasyonlarında (3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M ve 25 μ M) ve kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Karvakrol uygulanan hücrelerde absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi (One way ANOVA, *** $P < 0,001$).....61

Şekil 4.13 Timokinon+Karkakrol'ün 293T hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) Farklı konsantrasyonlarında ve Kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi (One way ANOVA, **** $p < 0,0001$).....62

Şekil 4.14 293T hücrelerinde Evaporasyon-Karkakrol gruplarının karşılaştırılmalı istatistiksel analiz grafiği. A) Uygulama gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimlerini gösteren diyagram. Dördüncü kuyularına üçlü olarak B) 3,125 μ M, C) 6,25 μ M, D) 12,5 μ M, E) 25 μ M Karvakrol eklenen platelerdeki kuyucuklardaki hücre canlılıklarının karşılaştırılması (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, ** $p < 0,005$).....63

KISALTMALAR

ADV5	Adenovirüs 5
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
Akt	Protein Kinaz B
ALT	Alanin Amintransferaz
AP-1	Aktivatör Protein-1
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma 2
BG-1	İnsan Adenokarsinomu
BT	Bilgisayarlı Tomografi
BRCA1	Meme Kanseri Tip 1 Duyarlılık Proteini
CAT	Katalaz
CACC	Kolit İle İlişkili Kolorektal Kanser
C4-2B	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
CIN	Servikal İntraepilyal Neoplazi
COS31	Osteosarkomu Hücre Hattı
COS31/rCDDP	Sisplatin Dirençli Varyantı
COX-2	Siklooksijenaz-2
CPT-11	İrinotekan Hidroklorür
CSF1R	Koloni Uyarıcı Faktör-1 Reseptörü
DMH	1,2-Dimetilhidrazin
DSS	Dekstran Sodyum Sülfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E	Erken Bölge
EAE	Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit
EBRT	Dıştan Işınlı Radyoterapi
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinazlar
ERK-1	Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz-1
EMT	Epitel Mezokimal Geçiş
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
GLI1	Çinko parmak proteini 1
GSH	Glutasyon

GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HeLa	İnsan Servikal Hücre Hattı
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HH/GLI	Hedgehog
H1N1	İnfluenza Virüsü
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HSIL	Yüksek Dereceli Skuamöz İntraepitelyal Lezyon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IgE	İmmünoglobulin E
I-kB α	I Kappa B Alfa
IFN- γ	İnterferon γ
IL-4	İnterlökin 4
IL-5	İnterlökin 5
IL-6	İnterlökin 6
IL-10	İnterlökin 10
IL-13	İnterlökin 13
IL-17	İnterlökin 17
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IMRT	Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi
IRF-3	İnterferon Düzenleyici Faktör-3
iNOS	Nitrik Oksit Sentaz
JAK2	Janus Kinaz 2
JNK/SAPK	C-jun N-Terminal Kinazları veya Stresle Aktive Olan Protein Kinazlar
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MAPK/ERK	Mitojenler Aktive Edilen Protein Kinaz
MCF7	İnsan Meme Adenokarsinomu
MDA	Lipid Peroksidasyon Markeri Malondialdehit
MDCK	Madin-Darby Köpek Böbrek Hücresi
MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi
mL	Mililitre

MMP	Matriks Metalloproteinaz
MMP-2	Matriks Metalloproteinaz-2
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
MPO	Miyeloperoksidaz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Haberci RNA
MS	Multiple Skleroz
mTOR	Rapamisin'in Memeli Hedefi
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
Nrf-2	Nükleer Faktör 2
NO	Nitrik Oksit
N. Sativa	Nigella Sativa
L	Geç Bölge
LACC	Laparoskopik Yaklaşım Serviks Kanseri
LDH	Laktik Asit Dehidrogenaz
LEEP	Halka Tipi Elektrocerrahi Eksizyon Prosedürü
LCR	Uzun Kontrol Bölgesi
LLETZ	Transformasyon Zonunun Büyük Halka Eksizyonu
LPO	Lipid Peroksit
LSIL	Düşük Dereceli Yassı Hücreli Hücreler
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
8-OhdG	8-Hidroksi-2' -Deoksiguanozin
PARP	Poli ADP-Riboz Polimeraz
PAHO	Pan Amerikan Sağlık Örgütü
PBD	Polo-Box Domain
PC-3	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
PDA	Pankreas Duktal Adenokarsinomu
PDGFRB	Platelet-Türevli Büyüme Faktörü- β Reseptörü
Plk1	Polo Benzeri Kinaz 1
PPAR- γ	Peroxisom Proliferatör- Aktive Edici Reseptör- γ
PI3K/Akt	Fosfoinozid 3-Kinaz
pRB	Retinoblastoma
PTCH	Patched
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu

p38 MAPK	p38 Protein Kinazları
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	Niceliksel Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
SMO	Smoothened
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT3	Sinyal İletici ve Transkripsiyon Faktörü 3
TBK-1	TANK-bağlayıcı kinaz 1
TGF- β	Transforme Edici Faktör-Beta
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TRAIL	Tümör Nekroz Faktörü İle İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
TRPA1	Transient Reseptör Potansiyeli Katyon Kanalı, A Alt Ailesi, 1.
Üye	
TSA	Trikostatin A
URR	Yukarı Düzenleyici Bölge
VEGF	Endotelyal Büyüme Faktörü
VLP	Virüs Benzeri Partikül

1. GİRİŞ

Servikal kanser, uterusun serviks adı verilen ve endoservikal kanal aracılığıyla vajinaya açılan dar bölgesinde gelişen malign bir hastalıktır (Burmeister ve ark., 2022). Dünya genelinde kadın üreme sistemi kanserleri arasında en yaygın malignitelerden biri olan servikal kanser, meme, kolorektal ve akciğer kanserlerinin ardından kadınlarda en sık rastlanan dördüncü kanser türü olarak bildirilmektedir (Burmeister ve ark., 2022). Servikal kanserin etiyolojisinde en önemli risk faktörü, yüksek riskli insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonudur. HPV, tüm servikal kanser olgularının yaklaşık %97'sinden sorumlu tutulmakta olup; tiplerine göre düşük ve yüksek riskli suşlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli suşlar genellikle asemptomatik seyrederken, yüksek riskli olanlar onkojenik potansiyele sahiptir ve malign transformasyona neden olabilmektedir (Volkova, Pashov, & Omelchuk, 2021; Bedell, Goldstein, Goldstein, & Goldstein, 2020). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan verilere göre, 2018 yılında dünya genelinde servikal kanser vaka sayısı 570.000'e ulaşmış, aynı yıl 311.000 kişi hastalığa bağlı olarak yaşamını yitirmiştir (IARC, 2018). 2020 yılına ait daha güncel verilere göre ise 604.100 yeni vaka ve 341.800 ölüm kaydedilmiştir (Volkova ve ark., 2021). Bu veriler, özellikle gelişmiş ülkelerdeki etkili tarama ve aşılama programlarının servikal kanser yükünü azalttığını, ancak düşük ve orta gelirli ülkelerde hâlen yüksek oranda yeni vaka ve ölüm görüldüğünü ortaya koymaktadır. Nitekim, tüm yeni servikal kanser vakalarının %83'ü ve servikal kansere bağlı ölümlerin %88'i bu ülkelerde meydana gelmektedir (Burmeister ve ark., 2022). Modern onkolojik tedavilerde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi stratejilerde önemli gelişmeler yaşanmış olsa da bu yöntemler bağışıklık sistemi baskılanması, ilaç direnci ve yüksek maliyet gibi önemli sınırlılıklar taşımaktadır (Quintero-Rincon, Caballero-Gallardo, & Olivero-Verbel, 2025). Bu durum, daha etkili, güvenli ve ekonomik alternatif tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyacı artırmaktadır. Bu bağlamda, tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen doğal bileşikler; kimyasal çeşitlilikleri, yüksek biyoyararlanımları ve düşük toksisiteleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Özellikle geleneksel tıpta kullanımı bilinen bitki ekstraktlarının sistematik olarak taranması, karsinojenik süreçleri engelleyebilecek veya geriletebilecek potansiyele sahip yeni antikanser ajanların keşfi açısından önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Quintero-Rincon ve ark., 2025).

Nigella sativa, halk arasında çörek otu olarak bilinen ve *Ranunculaceae* (dügün çiçeğigiller) familyasına ait olan yıllık çiçekli bir bitkidir. Bu bitkinin tohumlarından elde edilen başlıca biyoaktif bileşen olan timokinon (TQ), hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda çeşitli terapötik etkileri nedeniyle kapsamlı biçimde araştırılmıştır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019). Timokinonun antikanser özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada, Li ve arkadaşları, bu bileşiğin epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreçleri üzerindeki düzenleyici rolünü ve metastatik potansiyel üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. SiHa ve CaSki servikal kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen deneylerde, timokinonun zamana ve doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği, hücre göçü ve invazyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Moleküler düzeyde ise, timokinon uygulamasının EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden Twist1 ve Zeb1'in ekspresyonunu azalttığı, buna karşılık E-Cadherin seviyesini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca timokinonun apoptozu kısmen indüklediği ancak test edilen apoptotik belirteçlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir. Bu bulgular, timokinonun Twist1/E-Cadherin/EMT ve Zeb1/E-Cadherin/EMT eksenleri üzerinden servikal kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini baskılayabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla timokinon, servikal kanser tedavisinde potansiyel bir antimetastatik ve tamamlayıcı ajan olarak değerlendirilme potansiyeline sahiptir (J. Li ve ark., 2017). Karvakrol, birçok aromatik bitkide yüksek oranda bulunan ve esansiyel yağların temel bileşenlerinden biri olan doğal bir monoterpen fenoldür. Antibakteriyel, anti-inflamatuvar, antioksidan ve antikanser özellikler dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri iyi belgelenmiştir (İmran ve ark., 2022). Ahmad ve Ansari (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada, karvakrolün HPV18 pozitif HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki biyolojik etkileri incelenmiştir. Çalışmada, HeLa hücreleri farklı dozlarda karvakrol ile muamele edilerek kültüre edilmiş, hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testiyle değerlendirilmiştir. Apoptozun belirlenmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama teknikleri uygulanmış, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri ise 2',7'-diklorodihidroflüorescein diasetat (DCFDA) boyası ile ve akım sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca hücre döngüsü dağılımı ve apoptoz analizleri yine akım sitometrisi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, karvakrolün servikal kanser hücrelerinin proliferasyonunu kaspaz-bağımlı apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsünün durdurulması yoluyla baskıladığını ortaya koymuştur. Ayrıca, karvakrolün, yaygın kemoterapötik ajanlardan 5-fluorourasil (5-FU) ve karboplatin ile birlikte uygulandığında sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, karvakrolün kemoterapiye eşlik

eden toksisiteleri azaltma potansiyeline sahip olabileceğini ve servikal kanserin önlenmesi ve destekleyici tedavisinde umut verici bir doğal ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Ahmad & Ansari, 2021; Imran ve ark., 2022).

Daha önce yürüttüğümüz ve bulgularını *10. Uluslararası Tıp Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar Kongresi (2025)*'nde sunduğumuz çalışmada, timokinonun 100 µM konsantrasyonda HepG2 hepatosellüler karsinoma hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, yara iyileşme deneyi sonucunda, timokinon ve karvakrolün hem bireysel hem de kombine uygulamalarının, 12. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre migrasyonunu anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, sıvı formda kültüre eklenen karvakrolün buharlaşarak komşu kuyularda bulunan ve doğrudan karvakrol ile muamele edilmemiş hücreler üzerinde de yüksek derecede sitotoksik etki oluşturduğu, özellikle 24. saatten itibaren belirgin hücre ölümü ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Literatürde timokinon ve karvakrolün servikal kanser hücreleri üzerindeki etkileri çoğunlukla ayrı ayrı incelenmiş olup, bu iki bileşiğin kombine etkilerine dair çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, mevcut çalışmamızda, timokinon ve karvakrolün tek başlarına ve birlikte uygulamalarının, servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinin canlılığı, apoptoz süreci ve hücre migrasyonu üzerindeki etkileri ile buharlaşan karvakrolün apoptoza olası katkısı araştırılmıştır. Elde edilecek bulguların, bu doğal bileşiklerin servikal kanser tedavisinde destekleyici ajanlar olarak kullanım potansiyelinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

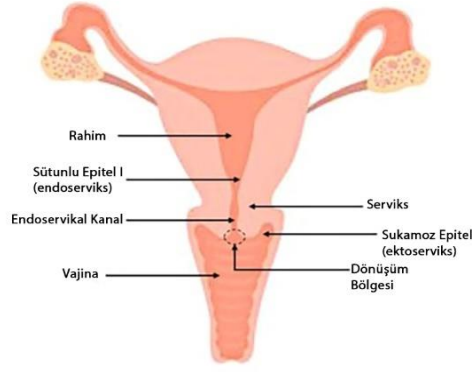
2. LİTERATÜR

2.1. Servikal Kanser

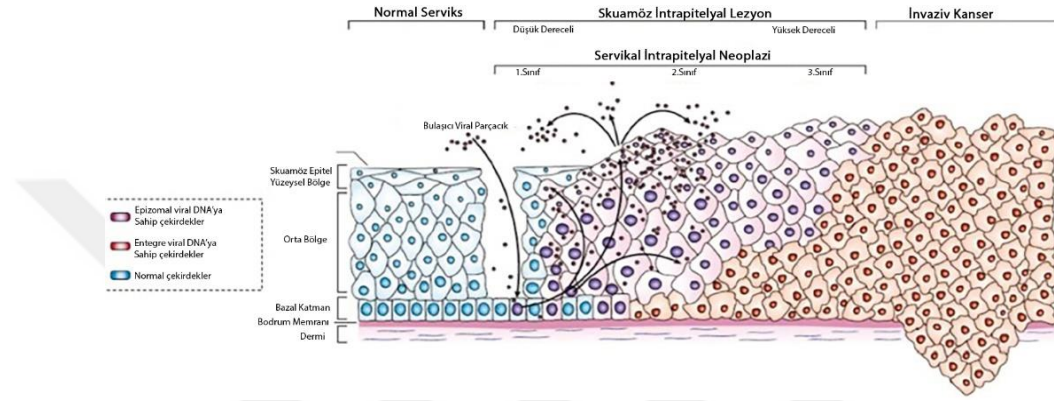
Servikal kanser, uterusun dar açıklığı olan ve endoservikal kanal aracılığıyla vajinaya bağlanan servikte gelişmektedir (Burmeister ve ark., 2022). Morbidite ve mortalite yapısı itibarıyla dünya genelinde kadın üreme sisteminin en yaygın malignitelerinden biri olup, meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra kadınlar arasında en sık görülen dördüncü kanser türüdür. Servikal kanserin gelişiminde en önemli etiyolojik faktör, yüksek riskli insan papilloma virüsüdür (HPV). Bu virüs, servikal kanseri vakalarının %97'sinden sorumludur. HPV tipleri onkojenik potansiyellerine bağlı olarak düşük riskli veya yüksek riskli suşlar olarak kategorize edilmektedir. Düşük riskli HPV suşları asemptomatik olabilir veya anogenital siğillere neden olabilir ancak, yüksek riskli suşlar onkojeniktir (Volkova, Pashov, & Omelchuk, 2021), (Burmeister ve ark., 2022), (Bedell, Goldstein, Goldstein, & Goldstein, 2020).

Anatomik olarak serviks, ektoserviks ve endoserviks olmak üzere iki ana bölüme ayrılır. Ektoserviks çok katlı yassı epitel hücreleriyle örtülüyken, endoserviks tek katlı kolumnar epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Bu iki epitel tipi, endoservikal kanal içinde "skuamokolumnar birleşim" olarak adlandırılan geçiş bölgesinde karşılaşır. Söz konusu birleşim bölgesinin yer aldığı ve endoservikste ki kolumnar epitelin yerini metaplastik epitelin aldığı alan, transformasyon zonu olarak tanımlanır. Bu zon, HPV enfeksiyonunun neden olduğu premalign değişimlerin en sık görüldüğü bölge olması nedeniyle, servikal kanserin gelişiminde başlıca odak noktasıdır (Burmeister ve ark., 2022). Şekil 2.1 A' da servikal kanserin anatomik kökeni ve Şekil 2.1 B'de normal serviksten HPV aracılığıyla gelişen invaziv skuamöz hücreli karsinoma dönüşüm süreci sunulmuştur.

A)



B)



Şekil 2.1 A) Servikal kanserin anatomik kökeni ve B) Normal serviksten HPV aracılığıyla gelişen invaziv skuamöz hücreli karsinoma dönüşüm süreci (Burmeister ve ark., 2022)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), servikste epitel tümörleri üç ana kategori altında sınıflandırmaktadır: skuamöz, glandüler (adenokarsinom) ve adenoskuamöz karsinom, nöroendokrin tümörler ile farklılaşmamış karsinomlar gibi diğer epitel tümörleri. Skuamöz hücreli karsinomlar, servikal kanserlerinin yaklaşık %70–80’ini oluştururken, adenokarsinomlar %20–25 oranında görülmektedir. Skuamöz hücreli karsinomlar, skuamöz özellikler taşıyan ancak büyüme paternleri ve sitolojik morfolojileri bakımından farklılık gösteren hücrelerden oluşan tümörlerdir. Başlangıçta Broders’in sınıflandırma sistemiyle derecelendirilmiş olan bu tümörler, daha sonra keratinize, keratinize olmayan ve küçük hücreli alt tipler şeklinde sınıflandırılmıştır. Ancak, güncel DSÖ sınıflamasında “küçük hücreli karsinom” terimi yalnızca nöroendokrin tümörleri tanımlamak için kullanılmaktadır.

Keratinize skuamöz karsinomlar, keratin incileri ile karakterize olup düşük mitotik aktivite gösterirler. Buna karşılık, keratinize olmayan formda keratin incileri bulunmaz; ancak hücresel düzeyde keratinizasyon izlenebilir. Servikal adenokarsinomlar, invaziv bez yapılarının düzenlenişi açısından yüksek derecede morfolojik çeşitlilik gösterir; bazı tümörlerde papiller yapılar kısmen ya da yaygın olarak izlenebilir.

Vakaların yaklaşık %80'i endoservikal (yaygın) tiptedir ve bu tümörler, normal endoservikal müsinöz epitelyumdan farklı olarak belirgin müsin içermeyen, eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. En yaygın alt tip, müsinöz adenokarsinom olup, endoservikal, intestinal ve gastrik varyantları içerir. Endoservikal tipler yapısal olarak iyi diferansiye olmalarına rağmen, sitolojik olarak genellikle orta veya yüksek derecelidir (derece 2–3). Saf formda izlendiğinde iyi prognoz sergileyen papiller ve villoglandüler adenokarsinomlar, sınırlı bir alt grubu oluşturur; klasik adenokarsinom bileşeni içeren olgular ise yaygın tip gibi davranış göstermektedir. Erken invaziv adenokarsinomların, kompleks mimariye sahip adenokarsinoma *in-situ* lezyonlarından ayrımı tanısal zorluk oluşturabilir. Müsinöz adenokarsinomlarda, müsin açısından zengin hücreler baskın olup, bazıları gastrik tip özellik taşır; bazıları ise minimal deviasyon tipi (adenoma malignum) olarak sınıflanır. Diğer servikal karsinomlar, nöroendokrin tümörler, karsinoid, atipik karsinoid ve nöroendokrin karsinomları kapsamaktadır. Tanı, histolojik inceleme ile konulmakta ve nöroendokrin belirteçlerin pozitifliği ile doğrulanabilmektedir (Marth ve ark., 2017).

HPV ile enfekte olmuş servikal epitel hücreleri transformasyona uğradıkça, iyi organize yapılarından saparak ileri derecede displastik özellikler kazanır ve displazi derecesi şiddetine göre sınıflandırılır. Servikal intraepitelyal neoplazi (CIN1), perinükleer halo ile çevrili, büyümüş ve düzensiz çekirdeklere sahip koilositlerin, çift çekirdekli hücrelerin ve bireysel hücre düzeyinde keratinizasyon gösteren diskeratotik hücrelerin varlığı ile karakterize edilen hafif dereceli displazi olarak tanımlanır. CIN2, epitelin yaklaşık üçte ikisini etkileyen heterojen lezyonlardan oluşurken, CIN3 daha ileri düzeyde displazi gösterir ve epitel dokunun üçte ikisinden fazlasını etkiler (Small ve ark., 2017). Servikal kanserin invaziv evresi, kötü prognoz ile ilişkilidir ve kanser hücrelerinin parametrial doku, vajina, uterus ve çevre organlara doğrudan yayılımını içerir. Prekanseroz durumu tanımlayan CIN evrelemesinin aksine, invaziv servikal kanser için en yaygın olarak kullanılan evreleme sistemi, evre I'den IV'e kadar sınıflandırılan Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) kılavuzudur. Kanser, serviksin iç yüzeyinden dışa doğru yayılım göstermesine rağmen hâlâ serviks ile sınırlı ise evre I olarak tanımlanır. Serviks dışına yayılan ancak pelvik duvar ve vajinanın alt üçte birine ulaşmamış ise evre II; bu alanlara da yayılım göstermiş ise evre III olarak sınıflandırılır. Evre IV, serviks kanser hücrelerinin hematogen yol ile mesane, rektum (evre IVA) ve akciğer, karaciğer, iskelet gibi uzak organlara (evre IVB) metastaz yapmasıyla

karakterizedir. Ayrıca, preinvaziv CIN evresinden invaziv servikal kanser gelişimine kadar geçen süre 10 ila 30 yıl arasında değişim göstermektedir (Burmeister ve ark., 2022).

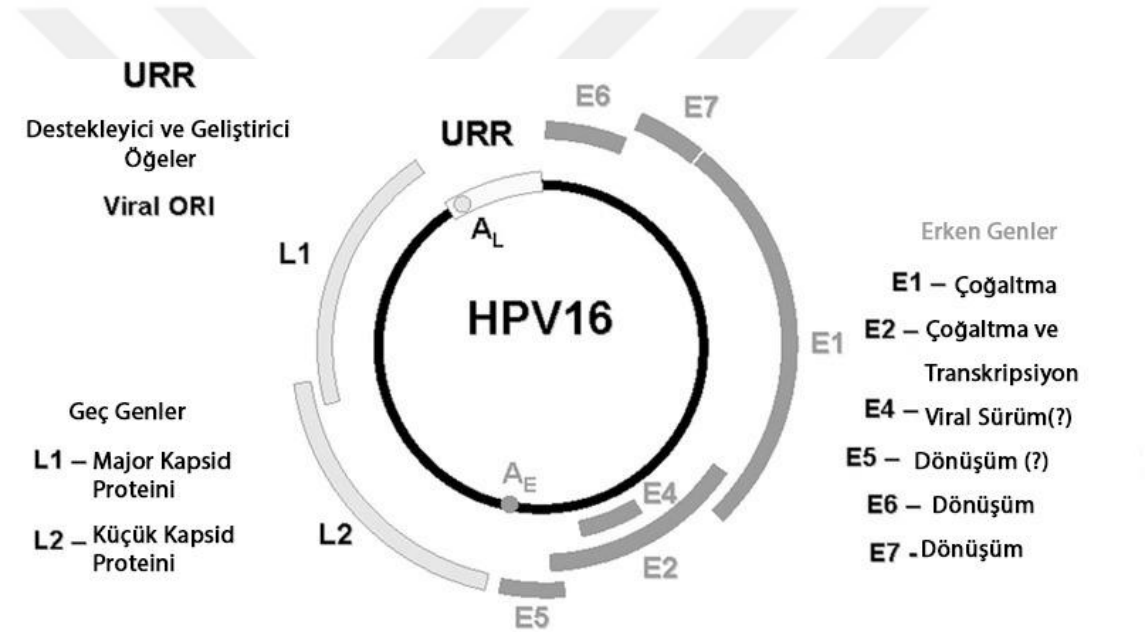
Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından 2018 yılında yayımlanan verilere göre, dünya genelinde servikal kanserli hasta sayısı 570.000'e ulaşmış ve son on yılda %7,8 oranında artış göstermiştir. Aynı yıl, servikal kansere bağlı ölüm sayısı ise 311.000 olarak bildirilmiştir. Yine Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından yayımlanan verilere göre, dünya genelinde 2020 yılında 604.100 yeni servikal kanser vakası belirlenmiş ve mortalite oranı 341.800 olmuştur (Volkova ve ark., 2021). Gelişmiş ülkelerde tarama yöntemlerindeki ve aşılama programlarındaki sürekli iyileşmelerle birlikte, bu ülkelerdeki kadınlar ile kaynak açısından yetersiz bölgelerde yaşayan kadınlar arasındaki hastalık yükünde belirgin farklar gözlenmektedir. Oranlara bakıldığında tüm yeni servikal kanser vakalarının yaklaşık %83'ü ve tüm ölümlerin %88'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir (Burmeister ve ark., 2022). Düşük gelirli ülkelerde en yüksek ölüm oranları, yaklaşık 100.000 kişide 20 ölüm olarak Afrika, Asya ve Güney Amerika'da görülürken, Japonya'da bu oran 100.000 kişide 11 ila 16 ölüm olarak görülmektedir. Dünya genelinde servikal kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin temel nedenlerinden biri, bölgesel düzeyde tarama sistemlerine ve HPV aşısına erişimdeki eşitsizliklerdir. HPV aşısı uygulanma oranları bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermekle birlikte, Doğu Akdeniz bölgesinde %0, Batı Pasifik Bölgesi'nde %10, Amerika kıtasında ise %80 civarında aşılanma oranları görülmektedir. Bu farklılıklar doğrultusunda, Dünya geneline bakıldığında HPV aşısı uygulanma oranı yaklaşık %40 seviyesindedir. Servikal kanserin potansiyel olarak önlenabilir bir hastalık olarak anlaşılmasında önemli ilerlemelere rağmen, hasta sağkalımında büyük bir iyileşme sağlanamamış olması ve dolayısıyla hastalık yükünün yüksek seyretmeye devam etmesi endişe verice olmaya devam etmektedir (Kobayashi ve ark., 2024).

2.1.1. Servikal Kanserinin Etiyolojik Faktörleri

HPV, yaklaşık olarak 8 kilobaz uzunluğunda çift sarmallı DNA içeren, zarfsız bir yapıya sahip küçük DNA virüsleridir (de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004). Günümüzde 200'den fazla HPV suşu tanımlanmış olup, bu suşlardan yaklaşık 40 tanesi anogenital bölgenin enfekte olmasına neden olmaktadır. Bu HPV suşlarından 15 ila 18 tanesi yüksek riskli genotipler olarak belirlenmiştir. Servikal kanser vakalarının yaklaşık olarak %70'inden tip 16 ve tip 18 sorumlu olmaktadır. Tip 16 suşu, tüm servikal kanserlerinin %55-60'ından sorumlu olmakla birlikte bu oran skuamöz

hücreli karsinomlarında için %50 olmaktadır. Tip 18 suşu ise, servikal adenokarsinomların nedenidir ve oranı yaklaşık %20'dir. Tip 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 onkojenik HPV suşlarından bazılarıdır ve bu suşlarda servikal karsinomların %25'inden sorumludur. Bunlara ek olarak, klinik olarak HPV enfeksiyonlarının birçoğu iyi huylu olmaktadır ve doğal olarak temizlenmektedir, fakat %3-10 oranında kadınlarda HPV enfeksiyonu atılamamaktadır. Bu durumun gözlemlendiği kadınlar HPV taşıyıcısı olmakta ve servikal kanser görülmesi açısından yüksek risk altında bulunmaktadır (Balasubramaniam, Balakrishnan, Oon, & Kaur, 2019).

HPV genomu üç ana işlevsel bölgeye ayrılmaktadır: erken (early - E) bölge, geç (late - L) bölge ve uzun kontrol bölgesi (long control region - LCR) (Okunade, 2020). HPV'nin genom organizasyonu Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 HPV'nin genom organizasyonu (Okunade, 2020)

Erken bölgede bulunan E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 genleri, viral DNA replikasyonu, transkripsiyon regülasyonu, hücre transformasyonu ve hücre döngüsünün kontrolü gibi temel işlevleri yerine getirmektedir. Geç bölgede bulunan L1 ve L2 genleri ise virüsün yapısal kapsid proteinlerini kodlamaktadır. Kodlama gerçekleştirilmeyen LCR bölgesi ise, replikasyon başlangıç noktası ve transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini içeren bir düzenleyici olup, viral gen ekspresyonunun kontrolünde görev almaktadır. HPV viral proteinlerinin listesi ve fonksiyonları Tablo 2.1 'de gösterilmiştir (Balasubramaniam ve ark., 2019; Jain ve ark., 2023).

Tablo 2.1 HPV viral proteinleri ve fonksiyonları

Viral Protein	Protein Fonksiyonları
E1	Viral DNA replikasyonu ve transkripsiyonu
E2	Viral DNA replikasyonu, apoptoz, E6/E7 transkripsiyonun baskılanması
E4	Viral DNA replikasyonu
E5	Bağıışıklık tanınması (MHC üzerinden)
E6	P53 yıkımı, hücre döngüsü düzenlenmesinin bozulması, apoptoza karşı direnç
E7	Retinoblastoma proteininin (pRb) yıkımı, hücre döngüsünün S fazına yeniden giriş, p16 aşırı ifadesi
L1	Ana viral kapsid proteini
L2	İkincil viral kapsid proteini

Bu proteinler hem viral yaşam döngüsünün sürdürülmesinde hem de konak hücrelerin kanserli hücrelere transformasyonunda önemli işlevlere sahiptirler. Viral partiküller bazal epitel hücrelerine girdikten sonra, genomun konak DNA'sına entegrasyonu çeşitli hücresel yolların bozulmasıyla gerçekleşerek, onkojenik süreci başlatmaktadır (Balasubramaniam ve ark., 2019). Servikal kanser için en önemli etiyolojik faktör HPV enfeksiyonu olmakla birlikte, yapılan çalışmalarla servikal kanserde rol oynayabilecek diğer faktörler de belirlenmiştir. Bu faktörler, sigara kullanımı, çoklu gebelikler, oral kontraseptif kullanımı, herpes simpleks virüsü-2 enfeksiyonlarıdır (Ellenson & Wu, 2004).

Kalıcı enfeksiyonun gelişmesiyle birlikte, HPV genomu konak hücre genomuna entegre olabilir; nitekim HPV 16 pozitif servikal karsinomların yaklaşık %80'inde ve HPV 18 pozitif vakaların tamamında viral entegrasyon gözlenmektedir. Bununla birlikte, HPV pozitif kadınların küçük bir kısmında viral DNA entegrasyonu gerçekleşmeksizin de servikal kanser gelişebilmektedir; bu durumlarda HPV DNA'sı hücre içinde episomal formda kalmaktadır. Viral E5, E6 ve E7 proteinleri, konak hücre mekanizmalarını hedef alarak servikal kansere özgü malign fenotipin oluşumu ve devamlılığında kilit rol oynamaktadır. Örneğin, E5 proteini, başta epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), platelet-türevli büyüme faktörü- β reseptörü (PDGFRB) ve koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü (CSF1R) olmak üzere çeşitli konak büyüme faktörü reseptörleri ile etkileşime girerek ve bunları düzenleyerek tümör gelişimini desteklemektedir. Ayrıca, E5'in, konak hücredeki FAS reseptörünü inhibe ederek ve proapoptotik BAX proteinini degradasyona

uğratarak DNA hasarı sonrası apoptozu engellediği gösterilmiştir. E5 aynı zamanda, majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I ve II molekülleri ile CD1d yüzey reseptörlerinin ekspresyonunu azaltarak, enfekte hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçışına katkı sağlamaktadır. E6 ve E7 proteinleri ise, hücresel kontrol noktalarını bozarak ve başta tümör baskılayıcılar olmak üzere çeşitli konak faktörlerle etkileşime girerek servikal karsinogenez sürecini ilerletmektedir. E6 proteini, tümör baskılayıcı p53 proteinini hedef alarak degradasyonunu sağlarken; E7 proteini, retinoblastoma (pRb) proteinini inaktive ederek hücre döngüsünün düzensiz ilerlemesine neden olmaktadır. HPV DNA'sının konak genomuna entegrasyonu sırasında genellikle viral genomun belirli bölgelerinde kayıplar meydana gelir ve bu durum sıklıkla E5 kodlayıcı dizisinin silinmesiyle sonuçlanır. Ancak, entegrasyon süreci sonucunda, viral E6 ve E7 genlerinin konstitutif (sürekli) ekspresyonu sağlanmaktadır. Bu durum, E2 baskılayıcı proteininin viral yukarı düzenleyici bölgelere (upstream regulatory region - URR) metilasyon nedeniyle bağlanamaması ya da açık okuma çerçevesinin (open reading frame - ORF) bozulmasıyla ilişkilidir. Sonuç olarak, HPV'nin konak genomuna entegre olduğu servikal kanser vakalarında E5 proteini patogeneze açısından belirleyici bir rol oynamamakta; buna karşın E6 ve E7 proteinleri, malign fenotipin sürdürülmesinde temel işlev görmektedir (Burmeister ve ark., 2022).

Servikal kanserin invaziv evresi, kötü prognoz ile ilişkilidir ve kanser hücrelerinin parametrial doku, vajina, uterus ve çevre organlara doğrudan yayılımını içerir. Prekanseroz durumu tanımlayan CIN evrelemesinin aksine, invaziv servikal kanser için en yaygın olarak kullanılan evreleme sistemi, evre I'den IV'e kadar sınıflandırılan Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) kılavuzudur. Kanser, serviksin iç yüzeyinden dışa doğru yayılım göstermesine rağmen hâlâ serviks ile sınırlı ise evre I olarak tanımlanır. Serviks dışına yayılan ancak pelvik duvar ve vajinanın alt üçte birine ulaşmamış ise evre II; bu alanlara da yayılım göstermiş ise evre III olarak sınıflandırılır. Evre IV, serviks kanser hücrelerinin hematogen yol ile mesane, rektum (evre IVA) ve akciğer, karaciğer, iskelet gibi uzak organlara (evre IVB) metastaz yapmasıyla karakterizedir. Ayrıca, preinvaziv CIN evresinden invaziv servikal kanser gelişimine kadar geçen sürenin 10 ile 30 yıl arasında değişebileceği tespit edilmiştir (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.2. Servikal Kanserde Tarama ve Tanı

Erken evre servikal kanser genellikle belirti vermemekte ve çoğunlukla rutin tarama programlarında veya pelvik muayene sırasında tesadüfen saptanmaktadır. Belirtiler ortaya çıktığında, en sık karşılaşılan bulgu, özellikle cinsel ilişki sonrası meydana gelen yoğun veya anormal vajina kanamadır. Bazı olgularda, sulu, mukoid, pürülan ya da kötü kokulu vajinal akıntı gözlemlenebilmekte; ancak bu semptom genellikle diğer bulgularla birlikte görülmekte ve nadiren izole olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ileri evrelerinde ise alt ekstremitte ödemi, pelvik veya bel ağrısı gibi semptomlar gelişebilir. Bunlara ek olarak, basınç hissinde değişiklikler ile birlikte idrarın veya dışkının vajinal yoldan geçişi gibi mesane ve bağırsaklara ilişkin semptomlar, sırasıyla mesane ve rektum invazyonunun göstergesi olabilmektedir. Servikal kanser açısından semptomatik olan hastalarda pelvik muayene yapılması gereklidir. Bu muayene kapsamında serviks ve vajinal mukoza görsel olarak değerlendirilir ve herhangi bir anormal görünüm saptandığında biyopsi ile örnekleme yapılır. Mikro-invaziv hastalık ya da endoservikal kanal yerleşimli lezyonlarda serviks normal görünüme sahip olabilirken; büyük tümörler, serviksin tamamına yayılmış şekilde izlenebilir ve metastatik yayılım, palpasyonla tespit edilebilen büyümüş lenf nodları aracılığıyla değerlendirilebilir (Burmeister ve ark., 2022). Pap smear testi, serviksten elde edilen hücre örneklerinin mikroskopik incelemesine dayanan sitoloji temelli bir tarama yöntemidir ve bu inceleme kapsamında skuamöz ve glandüler hücrelerdeki olası anormallikler ayrı kategoriler halinde değerlendirilir (Nalbantoğlu ve ark., 2023). Pap smear sonucunda yüksek dereceli skuamöz intraepitelyal lezyon (high-grade squamous intraepithelial lesion - HSIL) ya da tekrarlayan düşük dereceli yassı hücreler (low-grade squamous intraepithelial lesion - LSIL) sitolojik bulgular saptanan hastalarda, kesin tanı amacıyla kolposkopik değerlendirme yapılmalı ve şüpheli alanlardan biyopsi alınmalıdır. Kolposkopi veya biyopsi ile prekarsinojenik lezyon doğrulanması durumunda, bu hücreleri çıkarmak ve kanseri önlemek amacıyla, transformasyon zonunun büyük halka eksizyonu (large loop excision of the transformation zone - LLETZ) adı verilen girişim uygulanabilmektedir. Servikal kanserin evreleri, tümör büyüklüğüyle ve pelvik yayılım derecesine bağlı olarak klinik değerlendirmeye ve görüntüleme yöntemleriyle belirlenmektedir. Hastalığın evresi, tanı anında belirlenmekte olup, doğru evreleme; tedavi planlaması, hasta bilgilendirme ve prognoz değerlendirmesinin yanı sıra araştırma çalışmalarına uygunluğun belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.3. Servikal Kanserin Tedavisi

Servikal kanserin evresi ve yayılım derecesi, uygulanacak tedavi stratejisini belirlemekte olup; tedavi cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi yöntemlerinden biri ya da bunların kombinasyonlarını içermektedir (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.3.1 Cerrahi

Cerrahi, kanserli dokuların fiziksel olarak çıkarılmasına dayandığı için, erken evre çeşitli kanser türlerinde sıklıkla başvurulmuş ve başarılı sonuçlar veren bir tedavi yöntemidir. Bununla birlikte, metastatik dokuların çıkarılmasında da kullanılabilir. Günümüzde servikal kanserin tedavisinde uygulanan cerrahi yöntemler arasında total histerektomi, radikal histerektomi, halka tipi elektrocerrahi eksizyon prosedürü (loop electrosurgical excision procedure-LEEP), konizasyon, trakelektomi ve kriyocerrahi yer almaktadır. Uygulanacak cerrahi yöntemin seçimi, büyük ölçüde hastalığın evresine ve yayılım derecesine bağlıdır. Doğurganlık dönemi tamamlanmış kadınlarda, salpingo-ooforektomi (tek ya da her iki overin çıkarılması) uygulanıp uygulanmamasına bakılmaksızın, total histerektomi tercih edilen tedavi yöntemidir. Radikal histerektomi ise genellikle 4 cm'ye kadar olan daha büyük servikal lezyonlarda uygulanmakta olup, uterus, serviks, parametrium ve üst vajenin bir kısmının tamamen çıkarılmasını içermektedir. Servikal kanserde laparoskopik yaklaşım (laparoscopic approach to cervical cancer-LACC) ile ilgili çalışmalarda elde edilen bulgular, laparoskopik yolla gerçekleştirilen radikal histerektominin daha yüksek nüks oranı, doğurganlığın kaybı ve uzun vadede olası üriner disfonksiyon ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, 2 cm'den büyük tümörlerde açık teknikle yapılan radikal histerektomi tercih edilmektedir. Doğurganlık çağındaki kadınlarda ve erken evre hastalıkta ise daha konservatif bir tedavi yaklaşımı benimsenmekte olup; doğurganlık koruyucu cerrahi seçenekler arasında LEEP, konizasyon ve trakelektomi yer almaktadır. LEEP, ince bir tel yardımıyla servikste anormal dokunun çıkarılmasını sağlar ve düşük maliyetli klinik ortamlarda, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde, lokal anestezi altında uygulanabilir. Konizasyon, transformasyon zonunu ve endoservikal kanalın tamamını ya da bir kısmını içerecek şekilde serviksten koni biçiminde bir doku parçasının çıkarılmasını içerir ve genellikle hastane yatışı gerektirir, bu da maliyeti önemli ölçüde artırmaktadır. Radikal trakelektomi ise serviksin, çevresindeki doku (parametrium) ve üst vajinanın çıkarılmasını kapsar ve bu işlem vajinal, laparoskopik ya da robot destekli yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.3.2 Radyoterapi

Radyoterapi, yüksek enerjili X-ışınları kullanılarak uygulanan ve servikal kanserin tedavisinde temel yaklaşımlardan biri olan bir tedavi yöntemidir. Günümüzde servikal kanserin tedavisinde kullanılan başlıca üç radyoterapi türü; dıştan ışınli radyoterapi (external beam radiation therapy – EBRT), yoğunluk ayarlı radyoterapi (intensity-modulated radiotherapy – IMRT) ve brakiterapi (içten uygulanan radyoterapi) şeklindedir. Bilgisayarlı tomografi (computed tomography - BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (magnetic resonance imaging - MRG) gibi ileri düzey görüntüleme yöntemleri, primer tümörün değerlendirilmesi, invazyon derecesi ve metastaz varlığının belirlenmesinde önemli katkılar sağlamış; bu da radyoterapi planlamasında önemli iyileşmelerle sonuçlanmıştır. EBRT, yüksek enerjili ışınları vücut dışından tümöre yönlendirerek etki gösterir ve kanser tedavisinde en yaygın kullanılan radyoterapi yöntemidir. IMRT ise daha gelişmiş bir radyoterapi tekniği olup, foton ve proton ışınlarının tümörün şekline uyum sağlayacak şekilde yönlendirilmesini içerir ve hem malign hem de benign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. IMRT'ye benzer şekilde, brakiterapi de çevre dokuları koruyarak ya doğrudan tümöre yüksek doz radyasyon verilmesini ya da tümör bölgesine radyoaktif implant yerleştirilmesini içermektedir. Radyoterapide sağlanan önemli gelişmelere rağmen, bu tedaviye bağlı olarak ishal, abdominal kramplar, pelvik ağrı, cilt toksisitesi, lenfödem ve cinsel işlev bozukluğu gibi çeşitli yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Evre II–III servikal kanseri olan hastaların %68,3'ünde tam yanıt elde edilmesine rağmen, kadınların %20–50'sinde radyoterapi tek başına lokal olarak ilerlemiş hastalığın kontrolünde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, özellikle 4 cm'den büyük servikal lezyonlarda radyoterapinin etkinliğini artırmak amacıyla sıklıkla kemoterapi ile kombine bir şekilde uygulanmaktadır (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.3.3 Kemoterapi

Kemoterapi, serviks kanserinin standart tedavi protokolünün vazgeçilmez bir bileşenidir. Genellikle, cerrahi sonrası kötü prognostik tümör özelliklerinin nüks riskini artırdığı durumlarda adjuvan tedavi olarak; daha önce belirtildiği üzere radyoterapi ile birlikte veya lokal ileri evre hastalıkların tedavisinde tek başına uygulanmaktadır. Son otuz yıldır serviks kanserinin tedavisinde kullanılan en etkili kemoterapötik ajan, platin bazlı bir bileşik olan sisplatindir. Ancak, tedavinin başlangıcında sisplatine karşı alınan olumlu yanıtlara rağmen, tedavi sürecinde gelişen ilaç direnci, ikinci basamak platin bazlı

kemoterapötiklerin etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle, sisplatinin diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyonu, tek ajan kullanımına kıyasla daha üstün terapötik etkiler sunabilmektedir. Nitekim, Long ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, yalnızca sisplatin ile elde edilen %20'lik yanıt oranının, topotekan ile kombinasyon halinde %39'a yükseldiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, sisplatinin paklitaksel ile birlikte kullanımının da klinik sonuçları iyileştirdiği rapor edilmiştir. Günümüzde topotekan, paklitaksel ve 5-fluorourasil ile bleomisin gibi platin dışı kemoterapötikler, sisplatin ile kombinasyon halinde serviks kanseri tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu kombinasyon tedavileri, sağkalım süresinde anlamlı ve klinik olarak önemli düzeyde iyileşmeler sağlamaktadır. Kemoterapi, aynı zamanda radyoterapi ile birlikte uygulandığında (kemoradyoterapi), özellikle lokal ileri evre serviks kanseri vakalarında sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır. Bu tedavi protokolü, hastalığın nüks etme riskini azaltmayı hedeflese, ciddi yan etkiler ve kronik morbidite ile ilişkilendirilebilmektedir. Sistematik derleme ve meta-analizler, kemoradyoterapinin genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım oranlarını artırdığını; ayrıca lokal ve uzak nüks risklerini azalttığını ortaya koymuştur. Öte yandan, palyatif kemoterapi her ne kadar tümör hacmini küçültmede her zaman etkili olmasa da, yaşam kalitesini artırmak ve hastalıkla ilişkili semptomları hafifletmek amacıyla yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kemoterapiye karşı gelişen çoklu ilaç direnci, tedavinin başarısını olumsuz etkileyebildiğinden, daha etkili ve yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir (Burmeister ve ark., 2022).

2.1.3.4 Servikal Kanserın Önlenmesi

Servikal kanser insidansının kontrolünde birincil önleme, prekanseröz lezyonların oluşumunun engellenmesini hedeflerken; ikincil önleme, mevcut prekanseröz lezyonların invaziv kansere dönüşmeden önce erken dönemde tespit edilmesini amaçlamaktadır. Birincil önleme stratejisi olarak, HPV enfeksiyonuna karşı aşılama uygulanmaktadır. Günümüzde DSÖ tarafından onaylanan dört profilaktik HPV aşısı mevcuttur ve bu aşılar, servikal kanserlerin yaklaşık %70-80'inden sorumlu HPV tipleri 16 ve 18'e karşı etkin koruma sağlamaktadır. Ayrıca, 9-valanlı HPV aşısı; HPV 16 ve 18'in yanı sıra HPV 6, 11, 31, 33, 45, 52 ve 58 tiplerine karşı da koruyucu etkide bulunmaktadır. Tüm aşılar, viral DNA içermeyen ve enfeksiyona yol açmayan virüs benzeri partiküllerden (VLP'ler) oluşan rekombinant aşılar olup, güvenlik profilleri yüksektir. Aşının en yüksek etkinliğe ulaşabilmesi için HPV'ye maruz kalınmadan önce uygulanması gerekmektedir. Bu

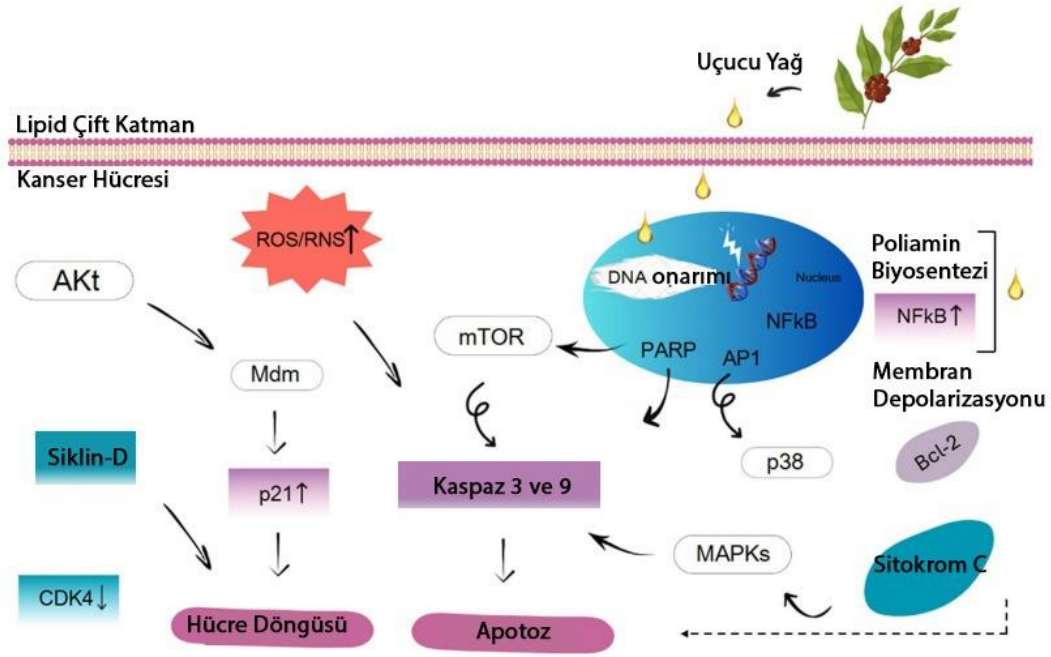
nedenle DSÖ, 9-14 yaş arasındaki kız çocuklarının iki doz halinde aşılmasını; 15 yaş ve üzerindekilerde ise üç doz aşı yapılmasını önermektedir. HPV aşısı, erkeklerde de HPV kaynaklı diğer kanserler ve genital siğillerin önlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır. Birçok gelişmiş ülkede HPV aşısı, ulusal aşılama programları kapsamında ücretsiz olarak sunulmasına rağmen, ülkemizde henüz ulusal programda yer almamakta ve ücretli, isteğe bağlı olarak uygulanmaktadır. İkincil önleme ise, servikal kanser tarama programları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Pap smear ve HPV-DNA testleri ile düzenli aralıklarla yapılan taramalar, servikal kanser gelişimini önleyebilmektedir. Tarama programlarına 30 yaşından itibaren başlanması önerilmekte olup, beşer yıllık düzenli taramalar sayesinde servikal kanserden kaynaklanan mortalite riski %85'ten fazla azaltılabilmektedir. Tarama programlarını uygulayan ülkelerde ortaya çıkan servikal kanser vakalarının büyük çoğunluğu, taramaya katılmayan kadınlarda görülmektedir (Nalbantoğlu ve ark., 2023).

2.2. Kanser Tedavisinde Bitkisel Kökenli Bileşikler

Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi antikanser stratejilerde ilerlemeler olmasına rağmen, bağışıklık sistemi baskılanması, tedavideki yüksek maliyetler ve ilaç direnci gibi problemler devam etmektedir. Konvansiyonel tedavilerin yüksek ölüm oranları ile ilişkilendirilmesi, yenilikçi tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyacı arttırmaktadır. DSÖ ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre, Dünya genelinde, kanser, ölümün en önemli ikinci nedeni olup önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Ayrıca, Rajappa ve arkadaşlarının analizine göre, Asya ülkelerinde kanser insidansı ve ölüm oranının sosyoekonomik gelişme ile ilişkili olarak düzensiz dağılım gösterdiği ve tedavi maliyetlerinin yüksekliği nedeniyle etkili tedavilere erişimin sınırlı olduğu görülmektedir. Pan Amerikan Sağlık Örgütü (PAHO)/DSÖ tarafından yapılan tahminlere göre, kanser vakalarının yaklaşık %40'ı temel risk faktörlerinin azaltılması ile önlenabilir niteliktedir. Bu risk faktörlerinin önemli bir bölümü enfeksiyonlara atfedilmektedir. Başlıca etkenler arasında HPV, hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), Helikobakter pilori gibi bakteriler ve diğer mikrobiyal ajanlar yer almaktadır. Alkol tüketimi, obezite ve ultraviyole radyasyona maruz kalınması diğer risk faktörleri arasında gösterilmektedir. PAHO/DSÖ tarafından önerilen stratejiler arasında, toplumun uygun maliyetli kematerapötik ilaçlara erişiminin artırılması ve semptom yönetimine yönelik programları içeren palyatif bakım politikalarının teşvik edilmesi yer almaktadır. Bu küresel sağlık ihtiyacına yanıt olarak,

kanserin kemoprevansiyonu veya kemoterapi ile ilişkili risk faktörlerine yönelik yeni doğal alternatiflerin araştırılması, PAHO stratejileriyle doğrudan ilişkilendirilmektedir. Bu bağlamda, tıbbi ve aromatik bitkilere ilişkin bilgiler, hastalığın yol açtığı zararların hafifletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Literatür verileri, bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik ve antiproliferatif potansiyelini ortaya koyan *in-vitro* çalışmalara dikkat çekmektedir. Farklı kökenlere sahip çeşitli tıbbi bitkiler, geleneksel uygulamalarda gösterdikleri biyolojik aktiviteleri nedeniyle araştırma konuları olmuşlardır. Tüm bitkiler, fitokimyasallar veya bunların ekstraktları kullanılarak yapılan *in-vivo* deneyler ve kanser hastaları üzerinde yürütülen klinik çalışmaların sonuçları, bu bileşiklerin kemopreventif ya da kemoterapötik etkiler gösterebildiğini ve antikanser ilaçlara bağlı yan etkileri ile hastalıkla ilişkili sorunları azaltabildiğini ortaya koymuştur (Quintero-Rincon, Caballero-Gallardo, & Olivero-Verbel, 2025).

Uçucu yağlar, kanser tedavisinde, hücre zarından geçebilme özellikleri sayesinde çeşitli hücresel hedefler üzerinde etkili olurlar ve farklı sinyal iletim yollarında rol oynarlar. DNA onarımı, hücre döngüsü durdurulması, apoptoz, metastaz inhibisyonu ve çoklu ilaç direnci gibi mekanizmaları etkilemektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS), normal koşullar altında dış uyaranlara veya strese yanıt olarak hücrelerin içinde üretilmektedir. Normal hücrelerdeki artmış ROS seviyeleri, hücreleri apoptoza girmeye teşvik etmektedir. Uçucu yağlar, hücre içi ROS ve reaktif azot türleri seviyelerini artırarak kanser hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca, tümör baskılayıcı bir protein olan p53'ü düzenleyen protein kinaz B (Akt) proteinini, Rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yollarının farklı basamaklarındaki aktivitelerini inhibe ederek, birçok önemli biyomolekülün yukarı veya aşağı yönde düzenlenmesine neden olur. Nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) ekspresyonunu değiştirir ve DNA'ya bağlanmasını sağlayarak kanser hücrelerinde apoptoz sürecini tetikler. Akt'nin uçucu yağlar aracılığıyla defosforilasyonu, p21'in aşırı ekspresyonuna yol açar; bu durum, kaspaz seviyelerinin artması yoluyla apoptozu indükleyebilir ya da p21'in siklinlere bağlanmasıyla hücre döngüsünde duraklama meydana getirebilmektedir. Bu mekanizmalara ek olarak, uçucu yağların neden olduğu mitokondriyal stres, B hücreli lenfoma 2'nin (Bcl-2) aktivasyonuna ve membran depolarizasyonuna neden olur. Bu süreç, sitoplazmaya salınan sitokrom-c miktarının artmasına ve bunun sonucunda kanser hücrelerinde apoptozla hücre ölümüne yol açar. Uçucu yağların antikanser etkinliğinde rol oynayan hücresel hedefleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir (Gautam, Mantha, & Mittal, 2014).



Şekil 2.3 Uçucu yağların antikanser etkinliğinde rol oynayan hücresel hedefleri (Quintero-Rincon ve ark., 2025)

Uçucu yağlar aynı zamanda DNA tamir mekanizmalarını modüle ederek DNA polimeraz inhibitörleri gibi davranır ve poli ADP-riboz polimeraz (PARP) parçalanmasına neden olarak apoptozu destekler. Çoklu ilaç direnci, kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biridir ve bu durum, rutin olarak kullanılan antikanser ilaçların büyük bir bölümünü etkisiz hale getirmektedir. Bu problemin aşılmasına yönelik çok sayıda araştırma yürütülmektedir. Çoklu ilaç direncinin ortaya çıkışı; ilaca karşı hasar gören DNA'nın onarımının indüklenmesi, ilacın hücreye alım yeteneğinde değişiklikler ve hedef enzimlerin düzeylerinde meydana gelen değişiklikler gibi çeşitli mekanizmalara dayanmaktadır. Adenozin trifosfat bağlayıcı kaset taşıyıcı protein (ABC) ailesinin artan aktiviteside, çoklu ilaç direncinin gelişimine katkı sağlamaktadır. Uçucu yağlar, tümörlerin sitotoksik ilaçlara karşı gösterdiği dirençli yanıtı aşmada etkili olabilmektedir. Kekik uçucu yağı, Adriamisin, Vinkristin ve Sisplatin gibi yaygın kullanılan ilaçlara dirençli over kanseri hücre hatlarında etkili olmuş, ayrıca *in-vivo* modellerde tümör boyutunda azalma gözlemlenmiş ve bu durum, uçucu yağın memeli sistemlerindeki etkinliğini ortaya koymuştur. Çoklu ilaca dirençli P-glikoprotein eksprese eden CEM/ADR5000 lösemi hücrelerinde, *Juniperus excelsa* uçucu yağının etkili olduğu gözlenmiş ve bu hücrelerde direnç mekanizmasını tersine çevirerek, çoklu ilaç direnci

tedavisinde uçucu yağların kullanımına işaret etmektedir. Kanser hastaları, hastalık ve tedavi sürecine bağlı olarak çeşitli yan etkiler yaşamaktadır ve bu etkiler, tercihi olarak alternatif yöntemler kullanılarak hafifletilebilmektedir. Uçucu yağlar, beyin kanseri görülen hastaların yaşadığı sorunların azaltılması amacıyla aromaterapide kullanılmakta, aynı zamanda kanser hastalarında depresyonun hafifletilmesi ve anksiyete düzeylerinin azaltılmasında da etkili olmaktadır. Hastalık tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan kemoterapide, bulantı ve kusma en sık görülen yan etkilerdendir; *Mentha spicata* ve *Mentha piperita* uçucu yağlarının, bu yan etkilerinin giderilmesinde etkili olduğu belirlenmiş, ayrıca kemoterapi gören hastalarda tedavi maliyetlerini azalttığı gözlenmiştir (Gautam ve ark., 2014).

Tıbbi ve aromatik bitki özleri, çeşitlilik, yüksek erişilebilirlik ve düşük toksisite özellikleriyle, izole bileşiklerin elde edilmesinde umut verici sonuçlar göstermektedir. Antikanser potansiyele sahip yeni ilaçların keşfi sürecinde, kimyasal tarama analizleri ve biyolojik aktivite testleri, yeni moleküllerin elde edilmesinde hızlı ilerleme sağlanabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Geleneksel tıpta kullanımları temel alınarak seçilen bitki ekstrelerinin taranması, karsinojenik süreci engelleyebilecek, yavaşlatabilecek veya geri çevirebilecek potansiyel antikanser ajanların belirlenmesine olanak tanıyabilmektedir (Quintero-Rincon ve ark., 2025).

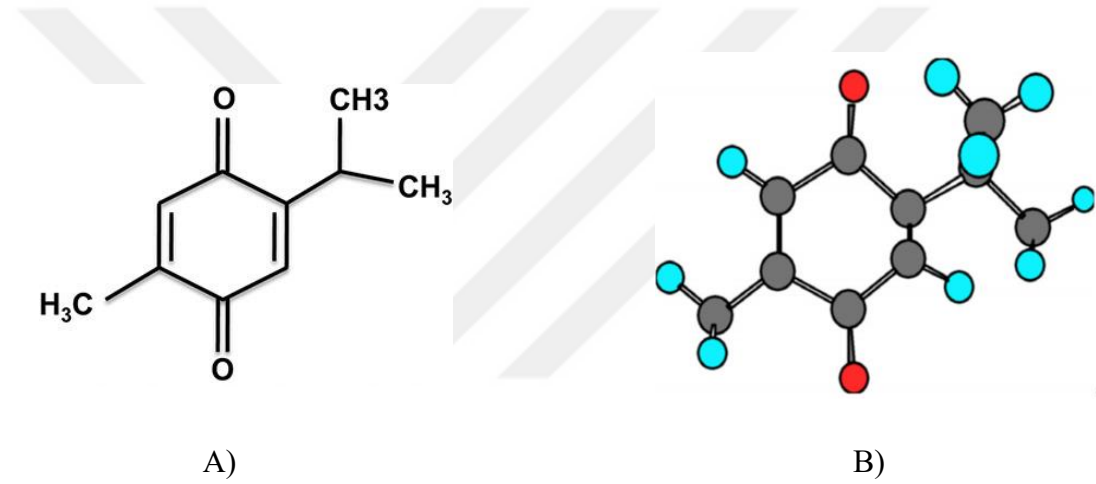
2.2.1. Timokinon

Son yirmi yıl içerisinde geliştirilen ilaçların %25'inden fazlası doğrudan bitkisel kaynaklardan elde edilirken, başka bir %25'i ise kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal ürünlerden oluşmaktadır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019). Tümör baskılanması alanında en dikkat çekici ve kapsamlı biçimde araştırılan bitkilerden biri *Nigella sativa* (*N. Sativa*)'dır. Son yıllarda, *N. Sativa*'nın belirgin antikanser etkilerini ortaya koymaya yönelik ilgi ve bilimsel çalışmalar kayda değer biçimde artış göstermektedir. Ancak, bu etkilerin altında yatan özgül moleküler mekanizmalarla ilgili araştırmalar henüz erken aşamadır (Majdalawieh, Fayyad, & Nasrallah, 2017).

Çörek otu olarak da bilinen *N. sativa*, Ranunculaceae (dügün çiçeğigiller) familyasına ait yıllık çiçekli bir bitkidir. Bu bitki, Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yaygın olarak yetiştirilmekte ve tarımı yapılmaktadır. *N. sativa*, farklı kültürlerde sağlık koruma ve çeşitli hastalıkların tedavisinde mucizevi bir bitki olarak kullanılmasıyla zengin bir dini ve tarihi geçmişe sahiptir. Ayrıca, çörek otu tohumları Arap ve İslam toplumlarında pek çok hastalığın tedavisinde destekleyici olarak kullanılmakta olup, zamanla bütüncül

yaklaşım ile sağlık koruma amacıyla benimsenmiş ve yaygın bir besin takviyesi haline gelmiştir. Bu tohumlar; amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, temel yağ asitleri, ham lif ve sodyum, kalsiyum, çinko, demir, magnezyum ve potasyum gibi minerallerin yanı sıra saponinler ve alkaloidler gibi çeşitli besleyici maddeler yönünden oldukça zengindir. *N.sativa* tohumlarının biyolojik etkilerinin temelinde yer alan başlıca bileşen olan timokinonun, hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda terapötik potansiyeli kapsamlı biçimde araştırılmıştır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

Kimyasal olarak timokinon, moleküler formülü $C_{10}H_{12}O_2$ olan 2-izopropil-5-metil-1,4-benzoquinon bileşiğidir. Timokinonun moleküler ve 3 boyutlu moleküler yapısı Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 A) Timokinon moleküler yapısı B) Timokinonun üç boyutlu moleküler yapısı (Asaduzzaman Khan, Tania, Fu, & Fu, 2017; Pal, Rajpal, Singh, & Saraf, 2021)

Moleküler ağırlığı 164,204 g/mol’dür. Timokinon, geniş bir yelpazeye yayılan biyolojik ve farmakolojik yararları ile dikkat çekmektedir. Bu bileşik; belirgin antioksidan, hipoglisemik, anti-inflamatuvar, antikanser, nöroprotektif, kardiyoprotektif, nefroprotektif ve hepatoprotektif özelliklerinin yanı sıra bağışıklık sistemi düzenleyici (immünomodülatör) etkilere de sahiptir. Bu doğrultuda timokinon, diyabet mellitus, ateroskleroz, kalp hastalıkları, astım, artrit, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi çok sayıda patolojik durumun kontrolünde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmektedir (Mahmoud & Abdelrazek, 2019). Ek olarak, hücre proliferasyonunu inhibe etme, apoptozu indüklemeye, hücre göçünü ve invazyonunu engelleme gibi tümörögenезle ilişkili çeşitli süreçlerde antikanser etkiler de göstermektedir. Sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi bildirilmemiştir (Almajali ve ark., 2021). *N.sativa* tohumlarının ve

timokinonun faydalı özellikleri, büyük ölçüde yapısında bulunan lipofilik kinon bileşiğine atfedilmektedir. Timokinonun lipofilik doğası, molekülün hücresel ve hücre altı yapılara etkin ve hızlı şekilde ulaşımını kolaylaştırmakta ve bu sayede tümör oluşumunda rol oynayan hücre içi transkripsiyon faktörleri ile kinazları hedef almasına olanak tanımaktadır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

2.2.2. Timokinonun Antioksidan Etkisi

Timokinonun en önemli biyolojik özelliklerinden biri, sahip olduğu yüksek antioksidan kapasite olarak değerlendirilmektedir. Mevcut literatür ve araştırmalar, timokinonun oksidatif stresle mücadelede umut vadeden antioksidan etkilerini ortaya koymuştur. Staniek ve Gille, timokinonun antioksidan etkilerinde mitokondriyal elektron taşıma zincirinin önemli bir rol oynadığını bildirmiştir (Alsaffar, Fang, & Walters, 2023). Bu sistem, sınırlı antioksidan aktiviteye sahip oksitlenmiş timokinon formunu, serbest radikalleri etkili bir şekilde uzaklaştırabilen indirgenmiş formu olan timohidrokinona çevirmektedir. Timokinon, hücre koruyucu enzimlerin indüksiyonunu sağlayarak, oksidatif stres kaynaklı hücresel hasarlara karşı hücrelerin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar, timokinonun başta katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonunu ve enzimatik aktivitelerini artırdığını göstermektedir (Badary, Taha, Gamal el-Din, & Abdel-Wahab, 2003; Unsal & Belge-Kurutas, 2017). Bu enzimler, özellikle hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerinin uzaklaştırılması ile lipid peroksidasyonunun önlenmesi gibi kritik görevler üstlenerek, hücresel düzeyde oksidatif hasarın azaltılmasında kilit rol oynamaktadır. Timokinonun antioksidan potansiyeli; pestisitler, ağır metaller, aflatoksinler, diyabet ve karsinojenler gibi çeşitli ajanların neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler göstermesiyle de doğrulanmıştır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

Timokinonun antioksidan özelliğinin, kimyasal kaynaklı karsinogenez sürecini önlemede rol oynadığı da çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sayed-Ahmed ve arkadaşları, Wistar albino erkek sıçanlar üzerinde, timokinonun, karaciğer kanseri başlatıcısı ve güçlü bir heptokarsinojen olan dietilnitrozamin ile indüklenen heptatokarsinogenez sürecinin başlangıcını önleyip önlemeyeceğini araştırmışlardır. Sonuç olarak, dietilnitrozaminin, heptatokarsinogenez sürecinin başlangıcında GSH-Px, CAT ve glutatyon-S-transferaz gen ekspresyonunu azalttığını; buna karşılık, timokinon takviyesinin oksidatif stresi azaltarak

ve ilgili antioksidan enzimlerin hem aktivitesini hem de gen ekspresyonunu koruyarak dietilnirozamin ile indüklenen karaciğer kanseri başlangıcını önleyebileceğini ortaya koymuşlardır (Unsal & Belge-Kurutas, 2017). Ek olarak, Nagi ve Almakki, farelerde timokinonun oral yolla uygulamasının detoksifikasyon enzimleri olan kinon redüktaz ve glutatyon transferazın aktivitelerini arttırıp arttırmayacağı araştırmışlardır. Timokinonun bu enzimleri kimyasal olarak indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu durum, timokinonun karsinojen maddelerin detoksifikasyonu ve eliminasyonunda etkili olabilecek olası mekanizmalardan biri olduğunu ve profilaktik ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Nagi & Almakki, 2009).

2.2.3. Timokinonun Anti-inflamatuar ve İmmünomodülatör Etkisi

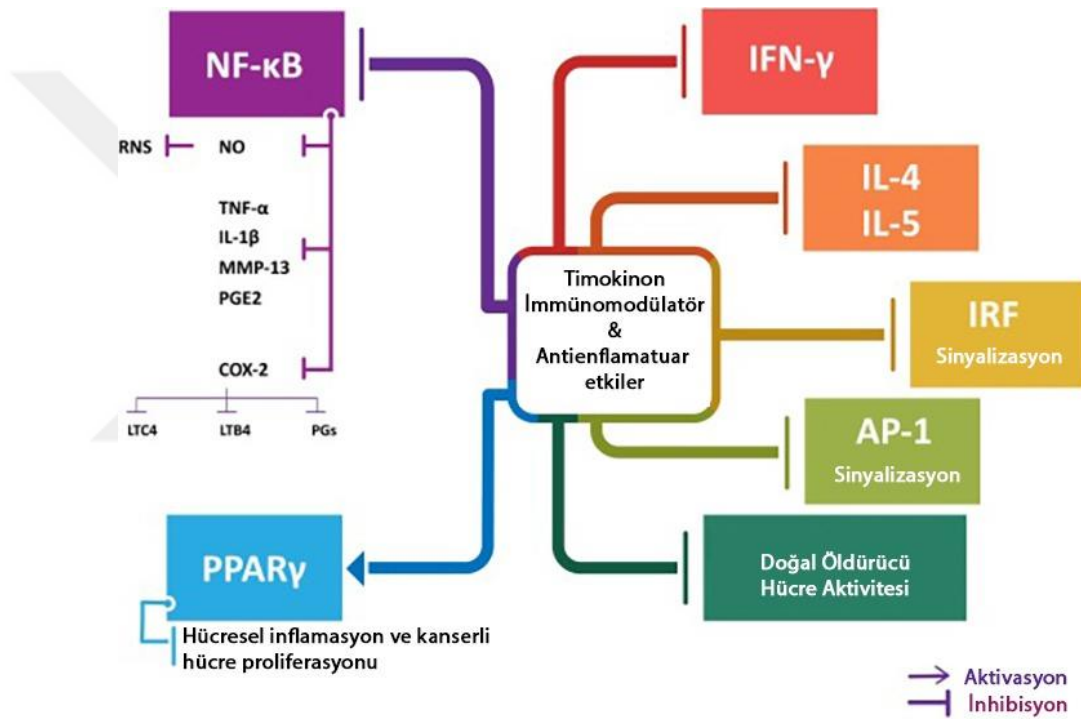
İnflamasyon, zararlı uyarıcılara karşı gelişen ve bu uyarıcıların elimine edilmesiyle birlikte doku onarımını sağlayarak doku homesostazını korumayı amaçlayan hayati bir fizyolojik yanıttır. Ancak inflamasyonun kronikleşmesi durumunda, ROS üretimi, DNA onarım mekanizmalarının bozulması ve buna bağlı mutasyon gelişimi, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı ile hasarlı hücrelerde apoptoz oranının azalması gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücrel homeostaz ciddi şekilde bozulabilmektedir. Kronik inflamatuvar yanıt, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde merkezi bir rol oynamaktadır. İnflamasyon, kanserin başlaması, ilerlemesi, malign dönüşüm, invazyon ve metastaz gibi evrelerini desteklemenin yanı sıra, tedaviye verilen yanıtları da etkilemektedir. İnflamasyon aracılı kanser patogeneğinde rol oynayan başlıca moleküler faktörler arasında nitrik oksit (NO), aktivatör protein-1 (AP-1), NF-kB, siklooksijenaz-2 (COX-2), oksidatif stres ve DNA onarımını sekteye uğratan lipid peroksidasyonu yer almaktadır. İnflamasyon etkisi altındaki dokularda, hücrel proliferasyon için gerekli olan çeşitli gen ve sitokin transkriptlerinin ekspresyonunu tetikleyen bir hayatta kalma faktörü olan NF-kB'nin aktivasyonu gözlemlenmektedir. NF-kB'nin bu aktivasyonu sonucunda, makrofajlar aracılığıyla indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üretimi uyarılmakta ve buna bağlı olarak NO sentezi artmaktadır. NO, ROS oluşumunu tetikleyebilmekte ve oksijen ile birleşerek peroksinitrit anyonu ile N- nitrozaminleri oluşturmaktadır. Peroksinitrit, DNA'da tek sarmallı kırıklara neden olmasının yanı sıra, aşırı lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres oluşturarak hücrel düzeyde ciddi hasarlara yol açmaktadır. Prostaglandinler, NF-kB ve proinflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilen COX-2 enzimi aracılığıyla, plazma zarı fosfolipidilerinden türeyen araşidonik asitten

sentezlenmektedir. Bu moleküller, immün yanıtların modülasyonu, yeni damar oluşumu ve lipid peroksidasyonu yoluyla DNA hasarına neden olarak tümöröenez sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, AP-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu, inflamatuvar sitokinler ile birlikte kanser progresyonunu destekleyen lökotrienlerin üretimini artırmaktadır (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

Çörek otu bileşeni olan timokinonun, anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkileri sayesinde kanser ilerlemesini kontrol etme potansiyeline sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu biyojik etkilerin gerçekleşmesinde birden fazla hücresel sinyal yolunun etkin rol oynadığı belirlenmiştir. Aziz ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada, timokinonun, lipopolisakkarit ile uyarılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde interferon düzenleyici faktör-3 (IRF-3) sinyal yolunu, TANK-bağlayıcı kinaz 1 (TBK1) aktivasyonunu baskılayarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Timokinon, IRF-3'ün transkripsiyonel aktivitesini azaltarak interfereon-alfa ve interferon-beta üretimini düşürmüş ve bu yolla inflamatuvar yanıtı kontrol altına almıştır. Bu bulgular, timokinonun IRF-3 yolakları üzerinden gösterdiği anti-inflamatuvar etkilerine dair yeni bilgiler sunmaktadır (Aziz, Son, & Cho, 2018). Çehl ve arkadaşları, kronik pankreatitin pankreas duktal adenokarsinomu (PDA) gelişiminde inflamasyonun önemli rolünü belirterek, timokinonun PDA hücreleri üzerindeki anti-inflamatuvar etkilerini incelemişler, spesifik bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olan trikostatin A (TSA) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirmesini yapmışlardır. Sonuç olarak, timokinonun, PDA hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve NF-kB yolaklarını baskılayarak güçlü bir anti-inflamatuvar etki gösterdiğini; bu etkilerin TSA ile kıyaslandığında daha belirgin olup, timokinonun inflamasyon aracılı tümör gelişimini önlemede potansiyel bir terapötik ajan olabileceği sonucuna varmışlardır (Chehl, Chipitsyna, Gong, Yeo, & Arafat, 2009).

Timokinonun immünomodülatör aktivitesi, antikanser etkisinin bir diğer önemli mekanizmasıdır. Mevcut bilgiler, timokinonun tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ile indüklenen NF-kB aktivasyonunu baskıladığını ve buna bağlı olarak I kappa B alfa (I-kB α) kinaz aktivasyonunu, I-kB α fosforilasyonunu, I-kB α degradasyonunu, p65 fosforilasyonunu, p65'in nükleer translokasyonunu ve NF-kB'ye bağımlı rapor gen ekspresyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Timokinon ayrıca, NF-kB tarafından düzenlenen anti-apoptotik gen ürünleri (IAP1, IAP2, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, survivin), proliferatif gen ürünleri (siklin D1, COX-2, c-Myc) ve anjiyojenik gen ürünleri (matriks metalloproteinaz-9, VEGF) ekspresyonunu da down-regüle etmektedir (Asaduzzaman Khan ve ark., 2017). Ashour ve arkadaşları çalışmalarında, çocukluk çağında en yaygın

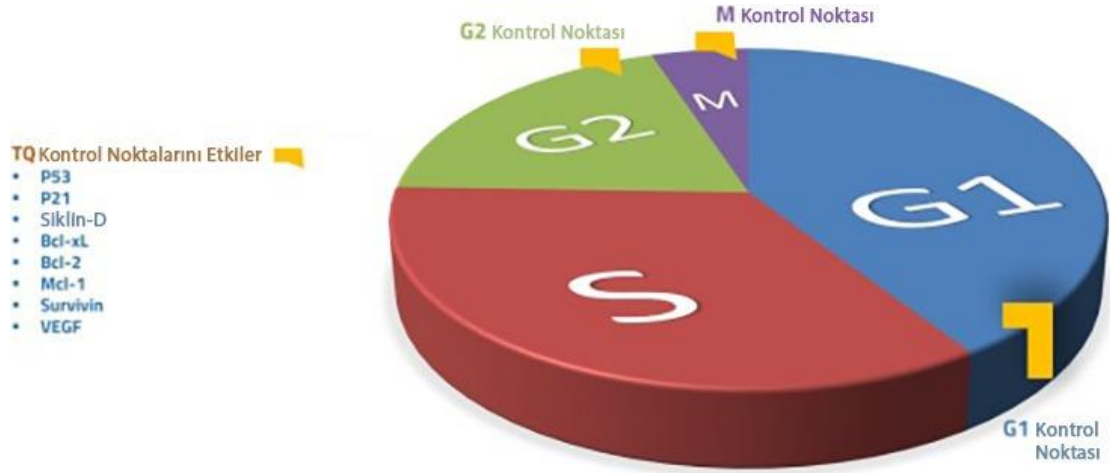
görülen beyin malign tümörü olan medulloblastoma hücrelerinde, timokinonun, NF- κ B sinyal yolunu inhibe ederek hücre büyümesini baskıladığını, G2/M hücre döngüsü duraksamasına neden olduğunu ve hem ekstrinsik hem de intrinsik yolla apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Timokinonun, bu etkilerinin, ROS üretimi ve kaspaz aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği ortaya konmuştur. Bulgular, timokinonun, medulloblastoma tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir (Ashour ve ark., 2016). Timokinonun anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Timokinonun anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkileri (Mahmoud & Abdelrazek, 2019)

2.2.4. Timokinonun Hücre Döngüsü, Proliferasyonu ve Apoptoz Üzerine Etkileri

Hücre döngüsü, hücrelerin bölünerek genetik olarak özdeş iki yavru hücre oluşturduğu, düzenli ve kontrol edilen bir süreçtir. Bu döngü G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur; G1, S ve G2 fazları birlikte interfazı oluştururken, M fazı mitoz bölünmeyi ifade etmektedir. Hücre, döngü sonunda hücre dinlenme evresi olan G0 fazına geçebilir (Mahmoud & Abdelrazek, 2019). Timokinonun hücre döngüsü üzerine etkisi Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Timokininonun hücre döngüsü üzerindeki etkisi (Mahmoud & Abdelrazek, 2019)

Hücre döngüsü boyunca yer alan kontrol noktaları, DNA hasarını tespit ederek onarım mekanizmalarını devreye sokar; onarımın mümkün olmaması durumunda ise hücre apoptoza yönlendirilir (Mohammad ve ark., 2015). Bu düzenleyici mekanizmaların bozulması, kanser ve metastaz gelişimine yol açabilir. Apoptoz, hücre yaşlanma ve hastalık durumlarında organizma homeostazını koruyan temel bir mekanizma olup, kansere karşı önemli bir savunma aracı olarak kabul edilmektedir (Sun, Hail, & Lotan, 2004). Apoptozun düzenlenmesinde görev alan Bcl-2 ailesi, *p53*, kaspaz-3 ve *PTEN* gibi genlerdeki mutasyonlar birçok kanser türünde sık görülmekte ve apoptoza direncin tümör gelişimindeki rolünü ortaya koymaktadır. MAPK yolağı; hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde kritik işlev görmektedir. Bu yolaktaki bozukluklar, kanser hücrelerinde proliferasyonun artması, apoptozdan kaçınma, metastaz ve anjiyogenez gibi malign özelliklerin kazanılmasına neden olmaktadır. MAPK ailesi; ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK), c-jun N-terminal kinazları veya stresle aktive olan protein kinazlar (JNK/SAPK) ve p38 protein kinazları grubu (p38 MAPK) olmak üzere üç ana kinazdan oluşmakta ve özellikle ERK yolunun düzensizliği, erken evre kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Sinyal iletici ve transkripsiyon faktörü 3 (STAT3), kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen ve tümör hücrelerinin proliferasyonu, metastazı ve immün kaçışında rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. STAT3'ün baskılanması, immünoterapilerde T hücre etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Wnt proteinleri, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metastazında kritik rol oynayan zar membranına bağlı proteinlerdir. Bu proteinlerin aktivasyonu, gastrointestinal kanser, lösemi ve meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin ilerlemesiyle ilişkilidir. Wnt sinyal yolu, kanonik (β -katenin bağımlı) ve kanonik

olmayan (β -katenin bağımsız) mekanizmalarla işlev görür. Son dönemde, bu yolların bileşenleri ve işleyişi üzerine yapılan çalışmalar, Wnt sinyalinin hedeflenmesinin kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olduğunu göstermektedir (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

Timokinon, anjiyogenez, invazyon ve metastaz süreçlerinde rol oynayan çeşitli yollara müdahale ederek kanser gelişimini inhibe etmektedir. Çeşitli çalışmalarla, timokinonun farklı biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik yolları hedef alarak birçok başka hastalığın önlenmesi ve tedavisinde de dikkate değer etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Khan, Tania, & Fu, 2019). Timokinon, antikanser etkilerini kısmen DNA yapısını hedef alarak göstermektedir. Hücresel kromatin yapısında bulunan ve DNA'nın guanin bazlarıyla yakın etkileşim içinde olan bakır iyonlarına bağlanarak oksidatif DNA hasarına yol açmakta; bu durum kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetiklemektedir. Ayrıca, timokinonun G-kuadrupleks DNA yapılarının stabilizasyonunu sağlayarak telomeraz enzimini inhibe edebileceği ve bu mekanizma aracılığıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabileceği öne sürülmektedir. Nitekim, glioblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda timokinonun telomeraz aktivitesini inhibe ederek DNA hasarına ve telomer kısalmasına neden olduğu, buna bağlı olarak hücre ölümünü indüklediği; ancak normal hücreler üzerinde minimal sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Asaduzzaman Khan ve ark., 2017).

Timokinon, Bax/Bak gibi proapoptotik gen ve proteinlerin ekspresyonunu artırmakta; Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik gen ve proteinlerin ekspresyonunu ise azaltmakta ve kaspaz yollarını modüle ederek apoptoz sürecini indüklemekte ve böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu kontrol altına almaktadır. Ayrıca, timokinonun *p53*, peroksizom proliferatör- aktive edici reseptör- γ (PPAR- γ), fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*) ve STAT3 gibi çeşitli moleküler hedeflerin aktivitesine ve ekspresyonuna müdahale ederek, ROS üretimi aracılığıyla apoptozu indüklediği de kanıtlanmıştır. Bazı tümör baskılayıcı gen ve proteinlerin timokinon tarafından aşırı ekspresyona uğradığı ya da aktive edildiği gösterilmiştir. Bu moleküller arasında *p53*, *PTEN*, *p21*, *p27* ve meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (BRCA1) yer alırken; fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K)/Akt ve mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK)/ERK gibi onkogenik sinyal yollarının ise timokinon tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Timokinon, sadece kanser hücresi büyümesini baskılamakla kalmayıp, metastazı kontrol altına alma potansiyeline de sahiptir. Örneğin; timokinon, fokal adezyon kinazı (FAK) ekspresyonunu baskılayarak ERK fosforilasyonunu ve matriks

metalloproteinaz (MMP) salımını azaltmaktadır. Ayrıca, Twist1 ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerini aşağı regüle ederek epitel-mezenkimal geçişi (EMT) inhibe etmekte ve böylece kanser metastazını önlemektedir. Timokinon, anjiyogenez sürecinin temel basamaklarına etki ederek; özellikle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) aracılığıyla gerçekleşen ERK aktivasyonunu inhibe etmekte ve kapiller damar oluşumunu engellemek amacıyla neovaskülarizasyonu baskılamaktadır. Timokinonun hedef aldığı önemli moleküllerden biri de polo benzeri kinaz 1'in (Plk1) polo-box domainidir (PBD). Hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisi olan Plk1'in fonksiyonu timokinon tarafından bozulmakta ve bu durum hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmaktadır (Khan ve ark., 2019). Kolli-Bouhafs ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, timokinonun insan glioblastoma hücreleri üzerindeki anti-invaziv ve anti-migratuvar etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, timokinon uygulamasının hem U-87 hem de CCF-STTG1 hücrelerinin göç, adezyon ve invazyon yeteneklerini azalttığını göstermiştir. Bu etkiler, FAK ekspresyonunda belirgin bir azalma, buna eşlik eden ERK fosforilasyonunun azalması ve MMP-2 ile MMP-9 salınımında azalma ile birlikte gözlenmiştir (Khan ve ark., 2019).

Woo ve arkadaşları, terapötik aralığı dar olan ve direnç gelişimi gözlenen mevcut kanser tedavi ajanlarına alternatif olarak, timokinonun antitümör etkilerini meme kanseri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmışlardır. Timokinonun antiproliferatif ve proapoptotik etkilerinin, meme kanseri hücrelerinde ROS üretimi yoluyla p38 fosforilasyonunu indüklemesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Timokinon uygulaması, anti-apoptotik proteinlerin (XIAP, survivin, Bcl-xL ve Bcl-2) ekspresyonunu baskılamış; ayrıca tümör büyümesini inhibe etmiş ve bu etkinin doksorubisin ile kombinasyonunda arttığı gözlemlenmiştir. Timokinon tedavisi ile işaretli apoptoz göstergeleri artarken proliferasyon göstergesi olan Ki67 ifadesi azalmıştır. Ayrıca, fare karaciğer dokularında antioksidan enzimler olan CAT, SOD ve glutatyon (GSH) düzeylerinde, artış saptanmıştır. Sonuç olarak, timokinonunun meme kanserine karşı antiproliferatif ve proapoptotik etkilerinin ROS aracılı p38 aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği ortaya konmuştur (Woo, Hsu, Kumar, Sethi, & Tan, 2013). Li ve arkadaşları, timokinonun multipl miyelom hücrelerinde STAT3 sinyal yolunu hedef alarak hem basal hem de interlökin-6 (IL-6) uyarısıyla artan STAT3 fosforilasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Timokinonun, bu etkisini proto-onkogen c-Src ve Janus kinaz 2'yi (JAK2) baskılayarak ve SHP-2 ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca STAT3 tarafından düzenlenen proliferasyon ve hayatta kalma ile ilişkili genlerin

ekspresyonunu azaltmış, hücre proliferasyonunu baskılamış ve apoptozu indüklemiştir. Talidomid ve bortezomib ile kombinasyon tedavisinde de apoptozu anlamlı düzeyde artırdığı verisine ulaşılmıştır. Bu bulgular, timokinonun STAT3 aracılı tümör gelişimini hedefleyen potansiyel bir tedavi ajanı olabileceğini göstermektedir (F. Li, Rajendran, & Sethi, 2010).

Timokinonun, antiproliferatif ve apoptik yolları uyarabilmesinin çeşitli mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalardan birisi de ROS'dur. ROS üretiminin, hücrelerin proliferasyonunun durdurulmasında kritik bir mekanizma olduğu bildirilmektedir. Timokinonun antikanser özelliği çoğunlukla antioksidan potansiyeline atfedilmiş olsa da son çalışmalar timokinonun kanser hücrelerinde oksidatif hasara yol açarak apoptozu indüklediğine dair artan kanıtlar sunmaktadır. Birçok araştırmacı, timokinonun büyümeyi baskılayıcı etkisinin özellikle kanser hücrelerine özgü olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, timokinonun doz bağımlı olarak hem pro-oksidan hem de antioksidan özellik gösterebildiği; düşük konsantrasyonlarda antioksidan, yüksek konsantrasyonlarda ise pro-oksidan etki sergilediği rapor edilmiştir (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

Koka ve arkadaşları, timokinonun, androjen reseptörüne bağımlı olmayan prostat kanseri hücrelerinde (C4-2B ve PC-3) gösterdiği antikanser etkilerin moleküler mekanizmalarını araştırmışlardır. Timokinon, her iki hücre hattında da doz ve süreye bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiş; bu etki artmış ROS üretimi ve azalmış GSH seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. N-asetilsistein ile yapılan ön muamele, timokinonun ROS üretimini ve büyümeyi baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmıştır. Apoptozun, kaspazdan bağımsız olarak geliştiği ve Jun kinaz yollarının bu süreçte etkili olmadığı gösterilmiştir. Bunun yerine, GADD45α'nın ve apoptoz indükleyici faktör-1'in ekspresyonunun arttığı, Bcl-2 ailesine ait çeşitli anti-apoptotik proteinlerin ise baskılandığı gözlenmiştir. Ayrıca, timokinonun androjen reseptör düzeylerini ve androjen reseptörüne bağımlı transkripsiyonel aktiviteyi belirgin şekilde azalttığı, ancak bu etkinin N-asetilsistein ile geri döndürülemediği, dolayısıyla sitotoksik etkilerin androjen reseptörü sinyalizasyonundan bağımsız gerçekleştiği ortaya konmuştur. Sonuç olarak, timokinonun prostat kanseri hücrelerinde başlıca oksidatif stres yoluyla hücre ölümünü indüklediği ve bu etkinin androjen reseptör yollarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Koka, Mondal, Schultz, Abdel-Mageed, & Agrawal, 2010). Zubair ve arkadaşları, timokinonun insan periferik lenfositlerinde ve prostat kanseri hücrelerinde hücre bakırı hedef olarak ROS aracılığıyla DNA hasarı oluşturduğunu ve bu yolla pro-oksidan hücre

ölümünü indüklediğini gösterilmişlerdir. Elde edilen bulgular, timokinonun antikanser etkisinin, özellikle artmış hücrel bakır düzeylerine bağlı olarak gelişen pro-oksidan mekanizmalar üzerinden açıklanabileceğini göstermektedir (Zubair ve ark., 2013). Shoieb ve arkadaşları ise, timokinona bağlı sitotoksiteyi; köpek osteosarkomu hücre hattı (COS31), sisplatin dirençli varyantı (COS31/rCDDP), insan meme adenokarsinomu (MCF7), insan over adenokarsinomu (BG-1) ve Madin-Darby köpek böbrek hücrelerini (MDCK) kullanılarak araştırmışlardır. Timokinonun sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) proliferasyon testi ve apoptoz analizleriyle değerlendirilmiş, hücre döngüsüne etkisi ise akış sitometrisiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, timokinona en duyarlı hücre hattı sisplatin dirençli COS31/rCDDP olurken, timokinona en dirençli hücre hattı MDCK olarak bulunmuştur. Timokinonun 25 µM konsantrasyonda, uygulamadan 6 saat sonra COS31 hücrelerinde apoptozu indüklediği, S-fazındaki hücre sayısını azalttığı ve G1 fazında artışa neden olduğu, dolayısıyla G1 fazında hücre döngüsü duraklamasına yol açtığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, timokinonun kanser hücrelerini apoptoz ve hücre döngüsü duraklaması yoluyla öldürdüğünü, buna karşın kanser dışı hücrelerin timokinona karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir (Shoieb, Elgayyar, Dudrick, Bell, & Tithof, 2003).

2.2.5. Timokinonun Servikal Kanser Üzerindeki Etkileri

Servikal kanserin tedavisinde terapötik aşılarda umut verici bir alternatif oluştursada, antijen sunumundaki sınırlılıklar ve immünsupresif tümör mikroçevresi gibi engeller klinik etkinliği kısıtlamaktadır. Che ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, timokinonun, terapötik aşılarda immün yanıtlarını artırma potansiyelini incelemişlerdir. HPV16 E6/E7 ve Ras genlerini eksprese eden TC-1 hücreleri ile oluşturulan fare ksenograft modelinde, timokinon ile kombine edilen aşı uygulaması sonucu, tümör büyümesinde belirgin bir azalma ve CD4+/CD8+ T hücre infiltrasyonunda artış bulunmuştur. Aynı zamanda Treg hücrelerinde azalma ve IFN-γ üretiminde artış gözlemlenmiştir. RNA dizileme analizleri, timokinonun immün yanıtla ilişkili gen ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Bulgular, timokinonun terapötik servikal kanser aşılarda etkinliğini artıran ve potansiyel adjuvan olarak değerlendirilecek bir bileşik olduğunu göstermektedir (Che ve ark., 2025). Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, timokinonun, EMT süreçlerini düzenleyici etkileri ve metastatik potansiyel üzerindeki rolünü değerlendirmişlerdir. SiHa ve Ca Ski servikal kanser hücre hatlarında gerçekleştirilen *in-vitro* deneyler ile, timokinonun zaman ve doza bağlı sitotoksik etkiler

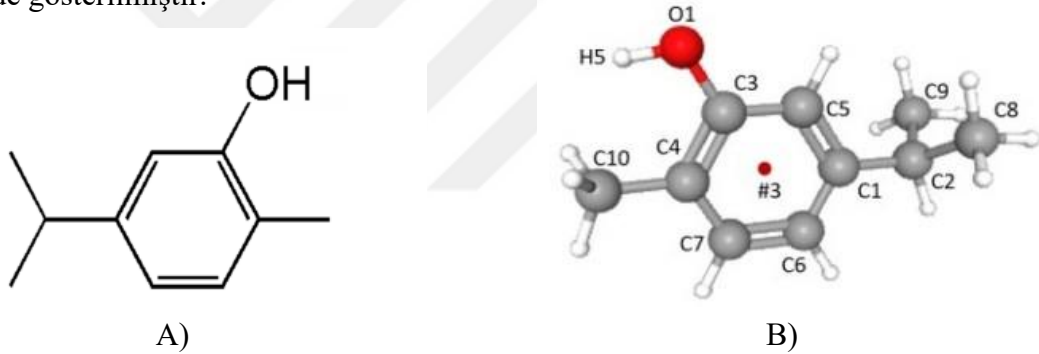
gösterdiği; ayrıca hücre göçü ve invazyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Moleküler düzeyde, timokinon uygulaması Twist1 ve Zeb1 gibi EMT transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu baskımlarken, E-Cadherin düzeyini arttırmıştır. Timokinon ayrıca kısmen apoptozu indüklenmiş, ancak test edilen apoptotik belirteçlerde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular, timokinonun servikal kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini, özellikle Twist1/E-Cadherin/EMT ve Zeb1/E-Cadherin/EMT yolları üzerinden baskılayabileceğini göstermektedir; bu yönüyle timokinonun, servikal kanser tedavisinde potansiyel bir antimetastatik ajan olabileceğini işaret etmektedir (J. Li ve ark., 2017). Yapılan bir diğer çalışmada Çelebioğlu ve arkadaşları, timokinonun servikal kanser hücrelerinde (HeLa), bir kanser ilacı olan etopozid ile kombinasyon halinde sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. MTT ve Comet testleri kullanılarak yapılan analizlerde, timokinonun etopozidin sitotoksik etkisini yüksek dozlarda arttırdığı, düşük dozlarda ise etopozid kaynaklı DNA hasarını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bulgular, timokinonun doz bağımlı olarak hem tedavi etkinliğini artırabileceğini hem de DNA hasarını azaltarak koruyucu etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır (Celebioğlu, H.G.N. ve ark., 2022). Ichwan ve arkadaşları ise, timokinonun insan servikal kanser hücre hatlarından SiHa ve C33A’da farklı apoptotik yolları uyardığını göstermişlerdir. Her iki hücre hattında da hücre döngüsü analizleri ile timokinonun belirgin şekilde apoptozu indüklediği ortaya konmuştur. Ayrıca, kantitatif PCR sonuçları, timokinonun SiHa hücrelerinde apoptozu, p53 aracılı yolağ üzerinden p53-hedefli genlerin ekspresyon seviyesinin artmasıyla indüklediğini; C33A hücrelerinde ise apoptozun esas olarak kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Ichwan ve ark., 2014). Sakalar ve arkadaşları, *N. sativa* yağı ve timokinonun insan servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirilmişlerdir. Scratch yara iyileşme analizinde, timokinonun 12.5–100 µM aralığındaki tüm konsantrasyonlarda yara iyileşmesini güçlü şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca, timokinonun apoptoz indükleyici etkisi Giemsa boyama yöntemiyle değerlendirilmiş ve özellikle 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Timokinonun apoptozla ilişkili 84 genin transkripsiyonel düzenlenmesine etkisi PCR array yöntemiyle incelenmiştir. Düşük dozda (12.5 µM) timokinon, BIK (~22.7 kat), FASL (~2.9 kat), BCL2L10 (~2.1 kat) ve CASP1 (~2 kat) gibi pro-apoptotik dört genin ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca, NF-κB sinyal yolağı ve kanserle ilişkili bir anti-apoptotik gen olan RELA’nın ekspresyonunu yaklaşık 8 kat azaltmıştır. Yüksek dozda (100 µM) timokinon uygulaması ise doğrudan

apoptozla ilişkili 6 gen, TNF sinyallemeyle ilişkili 10 gen ve NF-κB yollarıyla ilişkili 3 gen olmak üzere toplam 21 genin ekspresyonunu düzenlemiştir. Bu genler arasında BIK, BID, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNF, TRAF3, RELA ve RELB yer almaktadır (Sakalar ve ark., 2013).

Bu sonuçlar, timokinonun kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanım potansiyeline işaret etmekte olup, ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

2.3. Karvakrol

Karvakrol, aromatik bitkilerde esansiyel yağ olarak önemli miktarda bulunan başlıca doğal bir bileşiktir ve çok sayıda biyolojik aktivitesi iyi bilinmektedir (Imran ve ark., 2022). Bu bileşik, doğal olarak bulunan fenolik bir monoterpenoid ve simen türüdür. Kimyasal formülü $C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$ olup, doğal olarak dağ kekiği, yabani bergamot, *Origanum scabrum*, çörek otu, *Origanum microphyllum*, *Origanum onites*, kekik ve *Lepidium flavum* gibi bitkilerde bulunmaktadır. Karvakrolün moleküler yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 A) Karvakrolün moleküler yapısı B) Karvakrolün üç boyutlu moleküler yapısı (Mangiacapre ve ark., 2024)

Karvakrolün biyolojik aktiviteleri çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş olup; bu etkiler arasında antioksidan, antiseptik, antikanserojen, anti-inflamatuar, antidiyabetik, immünmodülatör, antimikrobiyal, antispazmodik, antibakteriyel ve büyümeyi teşvik edici özellikler yer almaktadır. Doğal bir simen türevidir olması nedeniyle güçlü bakteri inhibe edici özellikler taşımakta ve aromatik özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır (Imran ve ark., 2022).

2.3.1. Karvakrolün Antioksidan Etkisi

Bitkilerde bulunan uçucu yağlar, reaktif türlerin neden olduğu hücre hasarını azaltan ve mutajenik ile karsinojenik süreçleri önleyen doğal antioksidanlardır. Karvakrol, özellikle antioksidatif ve karaciğer koruyucu özellikleri bakımından dikkat

çekici derecede yüksek etkiye sahiptir. Bu bileşik, enzimatik antioksidanların (CAT, SOD, GSH) aktivitesini artırmakta ve enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerini yükseltmektedir. *Origanum onites* L., en yüksek miktarda karvakrol içeren tür olarak belirlenmiş ve üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde, insan glioblastoma hücre hattı U87'ye kıyasla anlamlı düzeyde antioksidan ve antikanserojen etki göstermiştir (Imran ve ark., 2022).

Karvakrol molekülünde bulunan hidroksil grubu, bileşiğin radikal süpürücü etkinliğinin temel kaynağını oluşturmaktadır. Bu grup sayesinde karvakrol; özellikle süperoksit radikalleri, NO ve hidrojen peroksit gibi ROS'a karşı etkili bir antioksidan savunma mekanizması sergilemektedir. Karvakrolün zayıf asidik yapısı, eşleşmemiş elektron içeren serbest radikalleri hidrojen atomu bağışlamasını kolaylaştırmakta; bu süreç sonucunda molekül rezonans yapısı içerisinde elektron delokalizasyonu yoluyla daha kararlı bir radikal formu oluşturmaktadır (Imran ve ark., 2022).

Bakır ve arkadaşları çalışmalarında, serulein ile indüklenen akut pankreatit modelinde karvakrolün karaciğer üzerindeki koruyucu etkilerini ve bu etkiye aracılık eden mekanizmaları *in-vivo* olarak değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Farklı dozlarda karvakrol uygulanan rat modellerinde, karaciğer hasar göstergeleri aminotransferaz, alanin aminotransferaz (ALT), laktik asit dehidrogenaz (LDH) oksidatif stres belirteçleri lipid peroksidasyon markeri malondialdehit (MDA), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (MDA, 8-OhdG) ve antioksidan enzim aktiviteleri SOD, CAT, GSH-Px analiz etmişlerdir. Elde edilen bulgular, karvakrolün doza bağlı olarak oksidatif hasarı azalttığını, antioksidan savunmayı artırdığını ve histopatolojik düzeyde karaciğer dokusunda iyileşme sağladığını göstermektedir. Sonuç olarak, karvakrol, akut pankreatit gibi karaciğer fonksiyon bozukluklarında potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmiştir (Bakır ve ark., 2016).

İntestinal mukozit, bağırsak mukozasında meydana gelen inflamatuvar bir süreç olup, irinotekan hidroklorür (CPT-11) temelli antikanser tedavi protokollerinin yaygın bir yan etkisidir. Transient reseptör potansiyeli katyon kanalı, A alt ailesi, 1. üye (TRPA1) reseptörü, intestinal mukozada yüksek düzeyde eksprese edilmekte olup, hücre hasarı sinyallerini tanıma yeteneği, bu reseptörün intestinal mukozit ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Karvakrol, TRPA1 reseptörünün bir agonisti olup, aynı zamanda anti-inflamatuvar özelliklere sahiptir. Bu bilgilerden yola çıkarak Alvarenga ve arkadaşları çalışmalarında, CPT-11 ile indüklenen intestinal mukozite karşı TRPA1 aktivasyonu aracılığıyla karvakrolün anti-inflamatuvar ve koruyucu etkilerini değerlendirmeyi

amaçlamışlardır. Deneysel model olarak fareler kullanılmış ve şu şekilde tedavi edilmişlerdir; %2 DMSO, CPT-11 (75 mg/kg, 4 gün boyunca) ya da CPT-11 uygulanmadan önce karvakrol (25, 75 veya 150 mg/kg, 8 gün boyunca). Başka bir gruba ise, karvakrol uygulamasından 30 dakika önce TRPA1 antagonisti HC-030031 ile ön tedavi yapılmıştır. Yedinci gün, hayvanların yaşam süresi ve bakteriyemi durumu değerlendirilmiş, ardından ötenazi sonrası jejunal doku örnekleri morfometrik analiz ile antioksidan ve pro-inflamatuar belirteçlerin ölçümü için toplanmıştır. Elde edilen bulgular, karvakrolün TRPA1 reseptörleri ile güçlü etkileşimler yoluyla CPT-11 kaynaklı intestinal mukozite karşı belirgin bir anti-inflamatuar etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etki, proinflamatuar sitokinlerin, interlökin-1 β (TNF- α , IL-1 β) üretiminde ve/veya salınımında azalma; enflamasyon belirteçleri MPO, NF- κ B, COX-2 ve oksidatif stres göstergeleri GSH, MDA ve NO düzeyleri üzerinde anlamlı düşüş şeklinde gözlenmiştir. Ayrıca, karvakrol uygulaması, ince bağırsakta villus ve kript yapılarının yeniden oluşumuna katkı sağlamış; hayatta kalım, vücut ağırlığı değişimi, lökogram ve kan bakteriyemi düzeyleri gibi klinik parametrelerde iyileşme sağlamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, TRPA1, intestinal mukozit tedavisinde gelecekteki terapötik yaklaşımlar için potansiyel bir hedef olabilir (Alvarenga ve ark., 2016).

Bir başka çalışmada Banik ve arkadaşları, karvakrolün kadmiyum kaynaklı apoptozis üzerindeki etkilerini, nöral krestten köken alan PC12 hücrelerini kullanılarak incelemişlerdir. Kadmiyum ile birlikte 48 saat süreyle karvakrol uygulaması, yalnızca kadmiyum maruziyetine kıyasla PC12 hücre canlılığını artırmıştır. Bu birlikte uygulama, hücre içi GSH düzeylerini yükseltmiş ve glutatyon redüktaz ekspresyonunu teşvik etmiştir. Kadmiyumun neden olduğu DNA parçalanmasının şiddeti de karvakrol tarafından azaltılmıştır. Akış sitometrisi sonuçları, kadmiyumun artırdığı apoptozis oranının karvakrol uygulamasıyla azaldığını göstermiştir. Western blot analizleri, karvakrol ve kadmiyumun birlikte uygulanmasının, kadmiyumun neden olduğu mTOR, Akt, NF- κ B, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz-1 (ERK-1) ve eritroid 2 ile ilişkili nükleer faktör 2 (Nrf2) ekspresyonlarındaki baskılanmayı hafiflettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca birlikte uygulama, kadmiyumun etkilerini tersine çevirerek kaspaz-3'ün parçalanmasını baskılamış, sitozolik sitokrom c ve apoptozis idükleyici faktör (AIF) düzeylerini azaltmıştır. Bununla birlikte, karvakrol uygulaması hücre içi metallotionein içeriğini anlamlı şekilde artırmıştır. Sonuç olarak, karvakrol, PC12 hücrelerinde kadmiyum kaynaklı oksidatif stresi ve hem kaspaz bağımlı hem de kaspazdan bağımsız apoptozisi güçlü bir şekilde azaltmıştır (Banik ve ark., 2019).

Arigesavan ve arkadaşları, karvakrolün, 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ve dekstran sodyum sülfat (DSS) ile indüklenen kolit ilişkili kolorektal kanser (CACC) üzerindeki farmakolojik etkilerini, erkek Fischer 344 sıçan modeli kullanılarak değerlendirilmişlerdir. F344 sıçanlarına uygulanan karvakrol tedavisinin, endojen antioksidan savunma sistemini aktive ettiği, kolonik inflamasyonu baskıladığı ve histolojik doku bütünlüğünü koruyarak inflamasyona bağlı hasarı azalttığı gözlenmiştir. Elde edilen biyokimyasal bulgular, karvakrolün serbest radikal birikimini azaltarak ve pro-inflamatuar mediyatörlerin ekspresyonunu inhibe ederek koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, karvakrolün SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan enzim düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı; buna karşılık lipid peroksit (LPO), MPO ve NO seviyelerini DMH/DSS ile indüklenen gruplara kıyasla azalttığı tespit edilmiştir. Bu belirgin değişiklikler, indüklenebilir iNOS ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar mediyatörlerin baskılanmasını kolaylaştırmıştır. Bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, karvakrolün DMH/DSS ile indüklenen deneysel sıçan modelinde yararlı bir rol oynayabileceği ve hem güçlü bir diyet antioksidanı hem de etkili bir anti-inflamatuar ajan olarak değerlendirilebileceği anlaşılmaktadır. Kronik inflamasyon kaynaklı kolorektal kansere karşı potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak öne çıkabileceği düşünülmektedir (Arigesavan & Sudhandiran, 2015).

2.3.2. Karvakrolün İmmünomodülatör Etkisi

Karvakrol, T hücrelerinin proliferasyonu, izole polimorfonükleer nötrofillerde IL-2 ve TNF- α sitokinlerinin üretimi ile tam kan fagositlerinden kaynaklanan ROS gibi çeşitli inflamatuvar parametreler aracılığıyla immün yanıtları modüle edebilmektedir (Imran ve ark., 2022).

Ezz-Eldin ve arkadaşlarının çalışmalarında, karvakrolün, ovalbumin ile indüklenen deneysel bronşiyal astım modeli üzerindeki koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Karvakrol tedavisi, astımlı sıçanlarda eozinofil sayısı, immünoglobulin E (IgE) düzeyi, proinflamatuar sitokinler interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5), interlökin 13 (IL-13), interferon γ (IFN- γ), indüklenebilir nitrik oksit sentaz düzeyi ve MDA gibi inflamasyon ve stres belirteçlerini anlamlı düzeyde azaltırken; antioksidan savunma mekanizmalarına ait SOD ve GSH düzeylerini artırmıştır. Histopatolojik, immünohistokimyasal ve Western blot analizleri de bu bulguları desteklemiştir. Elde edilen veriler, karvakrolün bronşiyal astıma karşı terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir (Ezz-Eldin, Aboseif, & Khalaf, 2020).

Multiple skleroz (MS) patogeneğinde inflammatuar süreçler temel bir rol oynamaktadır. Karvakrol ise literatürde çeşitli anti-inflammatuar özellikleri ile öne çıkan doğal bir bileşiktir. Mahmoodi ve arkadaşları, MS'nin deneysel modeli olarak kabul edilen deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) üzerinde karvakrolün klinik belirtiler ve proinflammatuar interlökin 17 (IL-17), IFN- γ , IL-6 ile anti-inflammatuar, tranforme edici faktör beta, interlökin 10 (IL-10), TGF- β , IL-4 sitokinlerin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Ensefalomyelit indüklenen farelere, hastalık indüksiyonundan itibaren 21. güne kadar gün aşırı 5 veya 10 mg/kg dozlarında karvakrol ya da taşıyıcı madde uygulanmıştır. 22. günde santral sinir sistemi dokularında lökosit infiltrasyonu hematoksilen-eozin boyama ile değerlendirilmiş, splenositlerin sitokin üretimleri ise miyelin oligodendrosit proteini ile *in-vitro* stimülasyon sonrasında ölçülmüştür. Bulgular, karvakrol uygulanan gruplarda klinik skorların anlamlı düzeyde düştüğünü, proinflammatuar sitokin düzeylerinde belirgin azalma (IFN- γ ve IL-6 için $p < 0.001$ ve $p < 0.01$; IL-6 için $p < 0.05$), anti-inflammatuar sitokin düzeylerinde ise artış olduğunu göstermiştir (TGF- β için $p < 0.001$; IL-10 için $p < 0.01$). Ayrıca 5 mg/kg karvakrol uygulanan grupta IL-17 düzeyleri anlamlı şekilde düşmüştür ($p < 0.01$). Bu sonuçlar, karvakrolün ensefalomyelit modelinde inflammatuar yanıtı düzenleyerek hem klinik hem de histopatolojik bulguları iyileştirebildiğini göstermektedir. Dolayısıyla, karvakrolün MS tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir (Mahmoud & Abdelrazek, 2019).

2.3.3. Karvakrolün Antikanser Etkisi

Çeşitli çalışmalar, karvakrolün, kanser hücrelerine karşı doz bağımlı şekilde güçlü sitotoksik, genotoksik ve proapoptotik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Sharifi-Rad ve ark., 2018). Karvakrolün genel etki mekanizmaları Şekil 2.8'de gösterilmiştir.

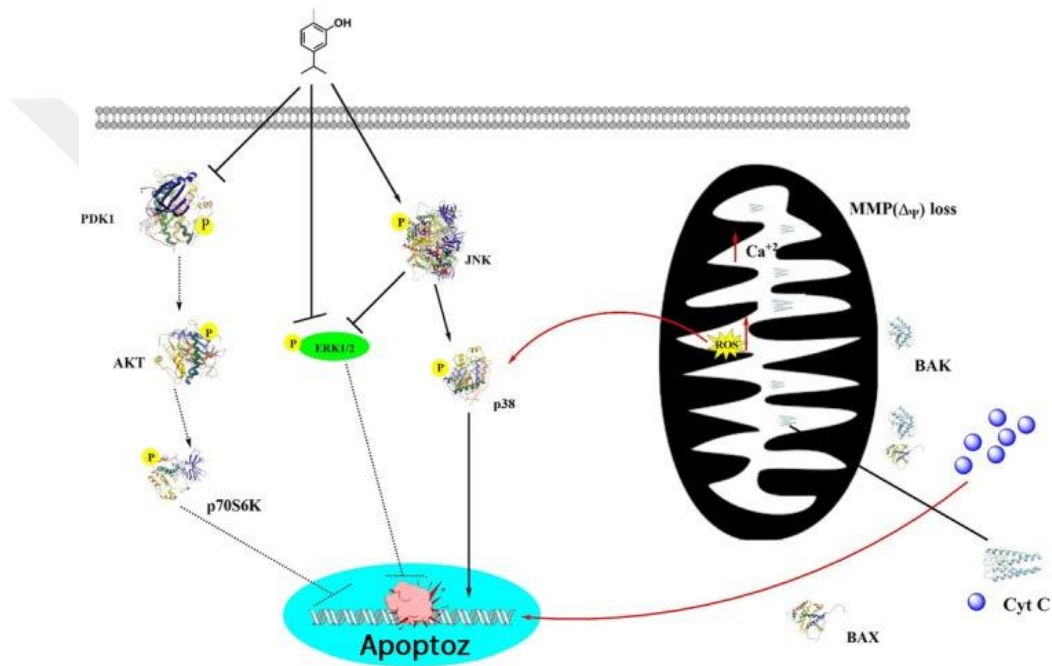


Şekil 2.8 Karvakrolün genel etki mekanizmaları (Imran ve ark., 2022)

Ayrıca, matriks metalloproteinaz 2 ve 9 (MMP-2 ve MMP-9) ekspresyonunu azaltarak hücre invazyonu üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir. Gerçekten de birçok farklı kanser hücresi hattı üzerinde bu etkiler test edilmiştir. Bunlar arasında fare B16 melanoma hücreleri, Hep-2 insan larinks karsinom hücreleri, mide karsinomu hücreleri, leiomyosarkom hücreleri, kronik miyeloid lösemi hücreleri, A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri hücreleri, MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri ve insan kolon kanseri hücreleri yer almaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2018).

Kolon kanseri, dünya genelinde en yaygın malignitelerden biri olup yüksek mortalite oranına sahiptir. Kekik ve mercanköşk uçucu yağlarının başlıca bileşenlerinden biri olan karvakrol, antitümör özellikler göstermektedir. Fan ve arkadaşları çalışmalarında, karvakrolün insan kolon kanseri hücre hatları olan HCT116 ve LoVo üzerindeki proliferasyon ve apoptoz etkileri ile antitümör özelliklerinin moleküler mekanizmalarını araştırmışlardır. Karvakrolün, her iki kolon kanseri hücre hattının proliferasyonunu ve migrasyonunu konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Karvakrol uygulaması sonrasında, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun azalmasıyla hücre invazyonunun baskılandığı gözlenmiştir. Ayrıca, karvakrol tedavisi hücre döngüsünde G2/M fazında duraksamaya neden olmuş ve siklin B1 ekspresyonunu

azaltmıştır. Karvakrol, doz bağımlı şekilde hücre apoptozunu indüklemiştir. Moleküler düzeyde, karvakrol Bcl-2 ekspresyonunu baskılarken, ekstrasellüler sinyalle düzenlenen ERK ve Akt fosforilasyonunu indüklemiştir. Buna paralel olarak, Bax ve JNK ekspresyonunu artırmıştır. Bu bulgular, karvakrolün kolon kanseri hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolak ile MAPK ve PI3K/Akt sinyal yolları aracılığıyla apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, karvakrolün kolon kanserinin önlenmesi ve tedavisinde terapötik potansiyel taşıyabileceğini düşündürmektedir (Fan ve ark., 2015). Karvakrol tarafından indüklenen antikanser etkilerin şematik gösterimi Şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Karvakrol tarafından indüklenen antikanser mekanizmasının şematik gösterimi (Imran ve ark., 2022)

Lim ve arkadaşları ise çalışmalarında, karvakrolün insan koryokarsinom hücre hatları olan JAR ve JEG3 üzerindeki biyolojik etkilerini incelemiştir. Elde edilen bulgular, karvakrolün antiproliferatif özellik gösterdiğini ve apoptozu indükleyerek proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca karvakrolün, her iki hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelini bozarak mitokondri matriksinde kalsiyum iyonu birikimine yol açtığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, oksidatif stres düzeylerinde ve lipid peroksidasyonu belirteçlerinde artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Moleküler düzeyde ise karvakrolün, PI3K/Akt ve ERK1/2 MAPK sinyal iletim yollarını baskıladığı; buna karşılık fosforile P38 ve JNK ekspresyonunu

artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, karvakrolün koryokarsinom hücreleri üzerinde çok yönlü antitümöral etkiler gösterdiğini ve bu doğrultuda potansiyel bir terapötik ajan veya tamamlayıcı tedavi unsuru olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (Lim, Ham, Bazer, & Song, 2019).

Prostat kanserinin ilerleyişinde IL-6 aracılığıyla aktive edilen hücresel sinyal iletim yolları, özellikle pSTAT3, pERK1/2 ve pAKT proteinleri, önemli bir rol oynamaktadır. Bitkisel kökenli doğal bir antioksidan olan karvakrolün antitümöral etkileri literatürde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Heidarian ve arkadaşları, bu çalışmada karvakrolün PC3 üzerindeki etkilerini araştırılmışlardır. Çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki (0–800 μ M) karvakrol uygulamalarının PC3 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiş, IL-6 gen ekspresyonu niceliksel ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile, pSTAT3, pERK1/2 ve pAKT protein düzeyleri ise Western blot analizi ile incelenmiştir. Ayrıca, karvakrolün hücre invazyonu üzerindeki etkisi invazyon testiyle belirlenmiştir. Bulgular, karvakrolün PC3 hücreleri için yarı maksimal inhibitör konsantrasyonunun (IC_{50}) 360 μ M olduğunu ve bu konsantrasyonun üzerindeki dozlarda IL-6 gen ekspresyonu ile protein düzeylerini anlamlı biçimde azalttığını ortaya koymuştur. Özellikle 360 ve 420 μ M karvakrol uygulamalarında IL-6 protein düzeylerinde sırasıyla %41.5 ve %52.7 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Aynı doz aralığında pSTAT3, pAKT ve pERK1/2 protein düzeylerinde de anlamlı azalmalar kaydedilmiştir. Bununla birlikte, karvakrol uygulaması sonrasında PC3 hücrelerinin invazyon potansiyelinde doza bağımlı olarak belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak, karvakrolün IL-6 düzeylerini düşürerek pSTAT3, pERK1/2 ve pAKT yollarını baskıladığı; böylece prostat kanseri hücrelerinde hücre yaşamı, proliferasyonu ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (Heidarian & Keloushadi, 2019).

Karvakrolün antitümör etkileri daha önce çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuş olmakla birlikte, bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Arunasree ise bu bağlamdan yola çıkarak çalışmasında, karvakrolün insan metastatik meme kanseri hücre hattı MDA-MB 231 üzerinde neden olduğu hücre ölümüne ilişkin biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları incelemiştir. Çalışmada karvakrolün apoptoz indükleyici etkisi; MTT testi, Annexin V boyaması, mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü, çoklu kaspaz aktivasyon analizi ve hücre döngüsünün akım sitometrisi ile değerlendirilmesi gibi çeşitli yöntemler aracılığıyla analiz edilmiştir. Buna ek olarak, Western blot yöntemiyle PARP proteininin parçalanması, mitokondriden sitokrom c salınımı ile Bax/Bcl-2 oranındaki değişimler araştırılmıştır. Elde edilen

veriler, karvakrolün MDA-MB 231 hücrelerinde 100 µM'lik IC₅₀ konsantrasyonunda doza bağımlı şekilde apoptozu tetiklediğini ve bu etkinin mitokondriyal membran potansiyelinde azalma, sitokrom c salınımı, kaspazların aktivasyonu ve PARP proteininin parçalanması ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu bulgular karvakrolün insan metastatik meme kanseri hücrelerinde anlamlı antitümör aktivite gösterdiğini ve bu bileşiğin gelecekte kanser tedavisinde terapötik bir ajan olarak değerlendirilme potansiyeli taşıdığını düşündürmektedir (Arunasree, 2010).

2.3.4. Karvakrolün Servikal Kanser Üzerindeki Etkileri

Servikal kanserinin gelişimindeki temel etken, kalıcı HPV enfeksiyonudur. Nüks eden ve metastatik servikal kanserin tedavisinde kullanılan standart kemoterapötiklerin yol açtığı yan etkiler nedeniyle, daha güvenilir ve etkili tedavi seçeneklerine gereksinim artmaktadır. Bu doğrultuda, doğal bileşikler, antikanser potansiyelleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu doğal bileşiklerden biri olan karvakrolün, servikal kanser üzerine etkileri çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Ahmad ve arkadaşları çalışmasında, karvakrolün HPV18 pozitif HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmış, HeLa servikal kanser hücreleri kültüre edilerek çeşitli dozlarda karvakrol ile muamele edilerek, hücre canlılığı MTT testi ile ölçülmüş, apoptotik etki için immünohistokimya boyama yöntemini uygulamışlardır. ROS seviyeleri, DCFDA boyama protokolü ve akım sitometrisi kullanılarak ölçülerek, hücre dağılımı ve apoptoz analizleri için akım sitometrisi yapılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda, karvakrolün servikal kanser hücrelerinin proliferasyonunu kaspaz-bağımlı apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulması yoluyla baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, karvakrolün 5-FU ve karboplatin gibi kemoterapötik ajanlarla sinerjistik bir etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, doğal bileşiklerin kemoterapi ilaçlarının toksik etkilerini azaltabileceğini ve karvakrolün servikal kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir destekleyici ajan olabileceğini düşündürmektedir (Ahmad & Ansari, 2021). Son yıllarda, Hedgehog (HH)/GLI sinyal yolunun servikal kanserde terapötik hedef olarak değerlendirilmesine yönelik çalışmalar artış göstermektedir. Bu yolak, servikal kanserin gelişiminde, nüksünde ve kemoterapi direncinde kritik bir rol oynamaktadır. Önceki çalışmalarda, karvakrolün prostat kanseri hücrelerinde Notch sinyal yolunu inhibe ederek antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Bu bağlamda, karvakrolün servikal kanser hücre hatlarında da benzer etkiler gösterebileceği hipoteziyle, bu alanda araştırma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, karvakrolün C33A servikal kanser hücreleri üzerindeki antikanser ve apoptotik etkileri

incelenmiş ve bu etkilerin moleküler düzeydeki yolları ortaya konulmuştur. Elde edilen bulgulara, karvakrolün hücre proliferasyonunu anlamlı biçimde baskıladığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu biyolojik etkiler; ROS artışı, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, kaspaz kaskadının aktivasyonu ve HH sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Karvakrol tedavisi, C33A servikal kanser hücrelerinde apoptozu, hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolk aracılığıyla indüklemiştir. Bu süreçte, pro-apoptotik proteinlerin, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (Bax, Bad, Fas-L, TRAIL, FADD, sitokrom c) ekspresyonu artarken; anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 ve Bcl-xL) düzeyleri azalmıştır. Ayrıca, kaspaz-9, -3 ve -8'in aktivasyonu ile birlikte PARP proteininin parçalanması gözlenmiş, böylece karvakrolün çift yönlü apoptotik sinyal yollarını aktive ettiği belirlenmiştir. Buna ek olarak karvakrol, C33A servikal kanser hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılamıştır. Bu etki, p21, p27, siklin D1 ve CDK4 gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin gen ekspresyonunun modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca karvakrol, smoothened (SMO), patched (PTCH) ve çinko parmak proteini 1 (GLI1) proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak HH/GLI sinyal yolunu inhibe etmiştir. Bu bulgular, karvakrolün HPV-negatif servikal kanser hücrelerinde antitumoral etkiler gösterdiğini ve bu etkilerin moleküler düzeydeki mekanizmalarının hem hücre döngüsü düzenlemesi hem de HH/GLI yollarının baskılanması ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Ahmad ve ark., 2022).

Karvakrolün sitotoksik etkileri daha önce bildirilmiş olsa da insan serviks kanseri hücre hatları olan HeLa ve SiHa hücreleri üzerinde bu yönde bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle, Mehdi ve arkadaşları, çalışmalarında karvakrolün servikal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Karvakrol tarafından indüklenen sitotoksiste, MTT ve LDH testleri gibi çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Apoptoz ise DNA fragmentasyonu analizi ile ölçülmüştür. Çalışma sonuçları, hem HeLa hem de SiHa hücrelerinde, her iki sitotoksiste testine göre 50 mg/L IC₅₀ değeri ile karvakrolün doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiğini açıkça ortaya koymuştur. Ölen hücrelerde DNA parçalanması gibi apoptozun karakteristik özellikleri gözlenmiştir. Elde edilen veriler, karvakrolün insan servikal kanser hücreleri üzerinde belirgin sitotoksik etkilere sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Mehdi ve ark., 2011).

Mediouni ve arkadaşları ise çalışmalarında, kekik yağının viral replikasyona karşı etkisini raporlamışlardır. Kekik yağının, virüs tropizmine bakılmaksızın, insan ve

maymun immün yetmezlik virüsleri (HIV ve SIV) gibi lentivirüsleri özgül olarak inhibe ettiği, ancak hepatit C virüsü, adenovirüs 5 (ADV5), Zika virüsü ve influenza (H1N1) virüsü üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur. Kekik yağının en bol bulunan bileşenleri olan karvakrol ve onun izomeri timolün, virüs ile hedef hücre arasındaki füzyonu engellediği, ancak virüs yaşam döngüsünün diğer evrelerini etkilemediği gösterilmiştir. Virüs partikül yoğunluğunda değişiklikler saptanmış olup, bu durum HIV-1 zarf zarından kolesterolün uzaklaştırılmasının virüs girişini azalttığını düşündürmektedir. Ayrıca, dışarıdan kolesterol eklenmesiyle enfeksiyon yeniden sağlanabilmiştir. Karvakrole karşı gelişen viral direnç, bu etki mekanizmasını desteklemiş ve kolesterol kaybını telafi eden viral gp41 füzyon proteininde mutasyonların varlığını ortaya koymuştur. Karvakrole karşı direnç, klinikte yaygın olarak kullanılan diğer ilaçlara kıyasla daha geç ortaya çıkmış olup, bu durum karvakrolün antiviral potansiyelini güçlendirmektedir. Yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları, karvakrol ve timolün HIV nötralizasyonu için gerekli olan temel yapısal motiflerini tanımlamış ve daha önce bilinmeyen etkili analogları ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, karvakrolün antiretroviral tedavilerle birlikte sinerjik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Özetle, kekik yağı ile iyileştirilmiş karvakrol ve timol analogları, mevcut HIV tedavilerine yardımcı bir takviye olarak değerlendirilebilir (Mediouni ve ark., 2020).

2.4. Çalışmamızın Amacı

Daha önce yaptığımız ve verilerini uluslararası bir kongrede (10. *Uluslararası Tıp Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar Kongresi*, 2025) sunduğumuz çalışmamızda, timokinonun, 100 µM konsantrasyonda HepG2 hepatosellüler karsinoma hücrelerine sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yara deneyi ile 12. saatte kontrol hücrelerine göre timokinon ve karvakrolün bireysel ve kombine muamele edildiği HepG2 hücrelerinin migrasyon yeteneklerinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan ve ilginç olarak hücre kültürüne sıvı formda ilave ettiğimiz karvakrolün buharlaşarak, karvakrol ile muamele edilmemiş yakın kuyulardaki hücrelere de son derece sitotoksik etki ettiği ve hücreleri özellikle 24. saatten itibaren öldürdüğü belirlenmiştir.

Daha önce timokinon ve karvakrolün servikal kanser hücreleri üzerindeki etkileri ayrı ayrı incelenmiş olsa da bu iki bileşiğin kombine etkileri henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu nedenle, mevcut literatür eksikliği göz önünde bulundurulduğunda, servikal kanser tedavisinde alternatif yaklaşımların geliştirilmesi açısından bu bileşiklerin birlikte kullanımının potansiyel etkilerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Bu

doğrultuda, çalışmamızda timokinon ve karvakrolün hem bireysel hem de kombine uygulamalarının, servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinin canlılığı, apoptozis süreci ve migrasyon yeteneği üzerindeki etkilerinin yanı sıra, buharlaşan karvakrolün apoptozis üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız gibi araştırmalarla elde edilecek veriler ve ileri çalışmalar ile bu doğal bileşiklerin servikal kanser tedavisine yönelik kullanım potansiyellerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı öngörülmektedir.



3. YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü ve Deney Grupları

3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanması

%10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyerinin hazırlanması için gerekli olan malzeme içerikleri;

500 mililitre (mL)'lik EMEM (Capricorn Scientific, MEM-A, CP25-8033)

50 mL Fetal Bovine Serum (Gibco, 2422743H)

5 mL Penisilin-Streptomisin (VivaCell Biosciences, 241334)

500 mL EMEM içerisinde 50 mL' si alınarak temiz bir falkona aktarılır. Kalan 450 mL üzerine 50 mL FBS ve 5 mL Penisilin-Streptomisin eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumunu elde edildi.

%10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinin hazırlanması için gerekli olan malzeme içerikleri;

500 mL'lik DMEM (VivaCell Biosciences, 2429262)

50 mL Fetal Bovine Serum (gibco, 2422743H)

5 mL Penisilin-Streptomisin (VivaCell Biosciences, 241334)

500 mL DMEM içerisinde 50 mL' si alınarak temiz bir falkona aktarılır. Kalan 450 mL üzerine 50 mL FBS ve 5 mL Penisilin-Streptomisin eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumunu elde edildi.

3.1.2. Timokinon ve Karvakrol Solüsyonlarının Hazırlanması

Timokinon (Sigma 274666-1G, Moleküler ağırlık:164.2 g/mol) katı olarak temin edildi. Hassa terazide (OHAUS, Prseries) 2,5 mg timokinon tartılıp 50 mL'lik falkon tüp içerisine aktarıldı. 30 mL %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin içeren EMEM besiyeri içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan solüsyon 0.22 um steril filtereden (IsoLab, 000I03217) geçirildi. 500 µM stok timokinon solüsyonu elde edildi.

Karvakrol (Sigma 224511-100G-K, Moleküler ağırlık: 150.22 g/mol) sıvı solüsyon olarak temin edildi. 1.155 µl karvakrol pipetle çekilip 50 mL'lik falkon tüp içerisine aktarıldı. 28.845 µl %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin içeren EMEM içerisinde çözüldü. Üzerine 200 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (IsoLab, LR0572102AJQ) eklendi. Hazırlanan solüsyon 0.22 um streil filtreden geçirildi. 250 µM stok karvakrol solüsyonu elde edildi.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Servikal karsinoma hücre hattı HeLa (Pasaj 16) hücreleri, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin içeren EMEM besiyeri içerisinde 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, Forma Steri-Cycle i160, 42147219) 75 cm²'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edildi. Hücreler %80-90 doygunluğa (confluent) ulaştığında hücreler ihtiyaca göre yeniden pasajlandı. Bu işlem sırasında, hücrelerin üzerlerindeki besiyeri serolijik pipetle alınarak, 2 mL steril fosfat tamponlu tuzlu solüsyon (PBS) (Lonza, BioWhittaker, 21MB027) ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin kaldırılması için 3 mL tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek inkübatörde 5 dakika bekletildi. Tüm yüzeye yapışık hücrelerin kaldırılması için inkübasyon sonrası trispin-EDTA'nın üzerine 4 mL EMEM eklenerek pipetaj yapıldı. Pipetaj ile tüm hücreler 15 mL hacimli falkon tüp içerisine alındı. Tüpe alınan HeLa hücreleri 400 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler taze EMEM ile muamele edilerek 2 adet 75 cm²'lik flaska ekimi yapıldı. Hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

HeLa hücreleri farklı dozlarda yalnızca timokinon (T), yalnızca karvakrol (K) ve kombine olarak timokinon ve karvakrol (TK) ile muamele edildi. Dozlar HepG2 hücreleri ile yaptığımız ön çalışmaya dayanarak belirlendi. Ayrıca bir önceki çalışmamızdan yola çıkarak karvakrolün evaporasyon yoluyla etkisini göstermek için de deney grupları oluşturuldu. Her bir doz üçlü olarak çalışıldı. Deney grupları ve uygulanan dozlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

İnsan embriyonik böbrek epitel hücreleri olan 293T (Pasaj 17) hücreleri kanser özelliği olmayan kontrol olarak kullanıldı. Hücreler, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besiyeri içerisinde 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, Forma Steri-Cycle i160, 42147219) 75 cm²'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edildi. Üremekte olan hücre pasajları %80-90 doygunluğa (confluent) ulaştığında yeniden pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemde, hücrelerin üzerlerindeki besiyeri serolojik pipetle alınarak, 2 mL steril PBS ile yıkandı. PBS serolijik pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin kaldırılması için 3 mL tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek inkübatörde 5 dakika bekletildi. Tüm yüzeye yapışık hücrelerin kaldırılması için inkübasyon sonrası trispin-EDTA'nın üzerine 4 mL DMEM eklenerek pipetaj yapıldı. Pipetaj ile tüm hücreler 15 mL hacimli falkon tüp içerisine alındı. Tüpe alınan 293T hücreleri 400 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek tripsin-EDTA solüsyonu

uzaklaştırıldı ve hücreler taze DMEM ile muamele edilerek 2 adet 75 cm²'lik flaska ekimi yapıldı. Hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

293T hücreleri timokinon (T), karvakrol (K), timokinon+karvakrol (TK), kontrol grubu, evaporasyon-karvakrol 25 µM, evaporasyon-karvakrol 12.5 µM, evaporasyon-karvakrol 6.25 µM, evaporasyon-karvakrol 3.125 µM olmak üzere gruplara ayrıldı.

3.3. MTT Assay

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] analizi, hücre proliferasyonun belirlenmesinde kullanılan ve MTT'nin hücrel enzimatik aktiviteler aracılığıyla formazan kristallerine indirgenmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, test edilen terapötik ajanların hücreler üzerindeki sitotoksik veya proliferatif etkileri nicel olarak değerlendirilmektedir.

Pasajlanması tamamlanan HeLa (Pasaj 17) hücreleri, otomatik hücre sayma cihazı (Biorad, TC20 Automated Cell Counter) ile sayılarak, 96 kuyucuklu platelere her bir deney grubu için üçlü olarak her kuyuya 150 µl EMEM besiyeri içerisine 1,8x10⁴ sayıda hücre ekildi. Platelere hücrelerin tutunması için 24 saat, 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün timokinon ve karvakrol farklı dozlarda (Tablo 2) ayrı ayrı ve kombine olarak HeLa hücreleri üzerine eklendi. 24.saat sonunda MTT testi uygulandı. 2,5 mg/mL MTT hassas terazide (OHAUS, PRSeries) tartılıp, 1000 µl PBS'de çözdürüldü. 24 saat 96 kuyucuklu platelerde inkübe edilen hücrelerden besiyerleri çekildi ve 20 µl PBS ile kuyucuklar yıkandı. Ardından üzerlerine 40 µl MTT eklendi. 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda MTT çekilerek kuyulara 100 µl DMSO eklendi. 15 dakikalık inkübasyon ile oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı. Süre sonunda mikropate reader cihazı (Biotek Synergy H1) kullanılarak 570 nm dalga boyunda, her bir kuyu içeriğinin absorbans değerleri belirlendi. Blank ölçüm olarak DMSO kullanıldı. Elde edilen OD değerlerinden blank ölçüm değerleri çıkarılarak sonuçlar değerlendirildi.

Pasajlanması tamamlanan 293T (Pasaj 17) hücreleri gruplara ayrılarak 96 kuyucuklu platelere her bir deney grubu için üçlü olarak toplamda 150 µl DMEM besiyeri içerisinde ortalama 1,8x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Platelere hücrelerin tutunması için 24 saat, 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 24. saatin sonunda gruplara MTT testi yapıldı. Elde edilen OD değerlerinden blank ölçüm değerleri çıkarılarak sonuçlar değerlendirildi. Deney grupları ve uygulanan doz miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Timokinon, Karvakrol ve Timokinon + Karvakrol deney grupları ve uygulanan dozlar

Deney Grupları	Kuyucuklar				
	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4. Kuyu	5. Kuyu
Timokinon Konsantrasyonu	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM	Kontrol Grubu
Karvakrol Konsantrasyonu	3,125 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM	Kontrol Grubu
Timokinon+Karvakrol (T+K) Konsantrasyonu	T+K 1: 25 µM T+ 3,125 µM K	T+K 2: 50 µM T+ 6,25 µM K	T+K 3: 75 µM T+12,5 µM K	T+K 4: 100 µM T+ 25 µM K	Kontrol Grubu

Kontrol Plate	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol
B	Kontrol	Kontrol	Kontrol
C	Kontrol	Kontrol	Kontrol

Evaporasyon-Karvakrol Plate 25 µM	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4. Kuyu
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	25 µl
B	Kontrol	Kontrol	Kontrol	25 µl
C	Kontrol	Kontrol	Kontrol	25 µl

Evaporasyon-Karvakrol 12,5 µM	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4.Kuyu
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	7,9 µl
B	Kontrol	Kontrol	Kontrol	7,9 µl
C	Kontrol	Kontrol	Kontrol	7,9 µl

Evaporasyon- Karvakrol 6,25 μM	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4. Kuyu
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	3,95 μl
B	Kontrol	Kontrol	Kontrol	3,95 μl
C	Kontrol	Kontrol	Kontrol	3,95 μl

Evaporasyon- Karvakrol 3,125 μM	1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4. Kuyu
A	Kontrol	Kontrol	Kontrol	1,98 μl
B	Kontrol	Kontrol	Kontrol	1,98 μl
C	Kontrol	Kontrol	Kontrol	1,98 μl

3.4. Hücre Yara Deneyi

Deney ve kontrol grubu hücrelerinde uygulanan yara deneyi protokolünün temel basamakları şöyledir: HeLa (Pasaj 20) hücreleri, 35x10 mm'lik (SPL Life Sciences) 13 adet steril hücre kültür kaplarına %10 FBS, %1 Penisilin- Streptomisin içeren 1350 μl EMEM + 150 μl hücre olucak şekilde ekildi. Hücreler %90-100 konfluens oluncaya kadar inkübatörde (37°C, %5 CO₂) büyütüldü. Yeterli hücre miktarına ulaşıldığında, kültür kaplarından mevcut besiyerleri çekildi. Üzerlerine 1 mL PBS eklendi. Steril bir pipet ucu (200 μL 'lik bir uç) kullanılarak hücre kültür kabı zeminine artı (+) şeklinde çizgi çekildi ve yara oluşturuldu. Yara oluşturulduktan sonra PBS dikkatlice aspire edildi. Temizlenen kültür kaplarına, her birine 1,5 mL % 4 FBS içeren EMEM eklendi. Tablo 3.2'deki konsantrasyon miktarlarına göre kültür kaplarına sırasıyla timokinon, karvakrol ve timokinon+karvakrol kombinasyonu verildi.

Tablo 3.2 Hücre yara deneyi grupları Timokinon, Karvakrol ve Timokinon + Karvakrol konsantrasyonları

Gruplar	Konsantrasyon
Timokinon Grubu	25 µM
Timokinon Grubu	50 µM
Timokinon Grubu	75 µM
Timokinon Grubu	100 µM
Karvakrol Grubu	3,125 µM
Karvakrol Grubu	6,25 µM
Karvakrol Grubu	12,5 µM
Karvakrol Grubu	25 µM
Timokinon + Karvakrol Grubu (T+K 1)	25 µM + 3,125 µM
Timokinon + Karvakrol Grubu (T+K 2)	50 µM + 6,25 µM
Timokinon + Karvakrol Grubu (T+K 3)	75 µM + 12,5 µM
Timokinon + Karvakrol Grubu (T+K 4)	100 µM + 25 µM
Kontrol Grubu	-

Tablo 3.2’de verilen dozlara göre kültür kaplarına uygulama yapıldı ve kaplar inkübatörde (37°C, %5 CO₂) tutuldu. Hücrelerin başlangıç görüntüleri (0. Saat) Zeiss Axiovert inverted mikroskop kullanılarak 5x objektifte alındı. Hücrelerin yarası kapatması 6., 12., ve 24., saatte takip edildi. Çekilen görüntülerden, başlangıç ve farklı zaman noktalarındaki yara alanlarının ölçülmesiyle, yaranın kapanma yüzdesi hesaplandı. ImageJ yazılımı kullanılarak hücre migrasyonu kantitatif olarak analiz edildi.

3.5. İmmünositokimyasal Boyama ve Skorlama

Timokinon ve karvakrolün Hela servikal kanser hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkilerinin apoptoz ile ilişkilerini belirleyebilmek için Bax ve Bcl-2 protein hedeflerine yönelik immünositokimyasal boyama yapıldı. Boyama için Thermo UltraVision Detection System Anti-Polyvalent HRP Kit ve Abcam DAB Substrate Kit (ab64238) kullanıldı. Bax (Abcam, ab7977) ve Bcl-2 (Abcam, ab7973) antikorları 1:250 olacak şekilde antikor seyreltme tamponu (Thermo, 003118) içerisinde seyreltilti. HeLa hücreleri 96 kuyucuklu platelere ortalama $1,8 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.

Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek 50 µL PBS ile yıkandı. Kuyulara 100 µL %10 formalin fiksatif eklenerek eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular üçer kez her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. 50 µL Ultra V Block eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilerek non-spesifik antijen bağlanmasının bloklanması sağlandı. Kuyular her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile 2 kez yıkandı. Gruplara uygun şekilde birer kuyularına Bax, birer kuyularına Bcl-2 primer antikorları eklendi. Negatif kontrol olarak grupların birer kuyularına yalnızca antikor seyreltme solüsyonu eklenerek 4°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün kuyular üçer kez her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. Kuyulara 50 µL Biotinylated Goat Anti-Polyvalent solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular üçer kez her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. Kuyulara Streptavidin Peroxidase solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Kuyular dörder kez her biri 5 dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. DAB solüsyonu, 1 mL DAB substrat içerisinde 50 µL DAB kromojen olacak şekilde çözündürüldü ve kuyu başına 50 µL eklenerek oda sıcaklığında renk dönüşümü gerçekleşene kadar mikroskop altında kontrol edilerek inkübe edildi. Renk değişimi tamamlandığında kuyular PBS ile yıkanarak görüntüler analiz için kaydedildi.

İmmünohistokimya görüntüleri literatürde belirtildiği gibi skorlama yolu ile değerlendirildi (Yaylın ve ark, 2012). Skorların hesaplanmasında hem boyama yoğunluğu hem de belirteç dağılımı (pozitif boyanmış HeLa hücrelerinin yüzdesi) dikkate alındı. Boyama yoğunluğu aşağıdaki şekilde değerlendirildi:

0: Negatif

1: Zayıf

2: Orta

3: Güçlü

Ayrıca, belirteç dağılımı aşağıdaki gibi hesaplandı:

0: %10’dan az

1: %10–40

2: %40–70

3: %70’den fazla

Örneğe ait yoğunluk ve belirteç dağılımı skorlarının toplamı, nihai immünohistokimyasal boyama skorunu oluşturdu.

3.6. İstatiksel Analiz

Görüntüler Image J programı ile analiz edildi. Elde edilen veriler GraphPad Prism 8 programı ile analiz edildi. Verilerin Gaussian dağılımına uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Tekli gruplar arasında karşılaştırmalarda uygunluğuna bağlı olarak Student t testi veya Mann-Whitney U testi ile; çoklu grup karşılaştırmalarında da uygunluğuna göre One way ANOVA (Welch düzeltmeli) veya Kruskal-Wallis (Dunn's çoklu karşılaştıma testi ile) testi ile değerlendirildi. Tüm değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık oranı $p < 0,05$ olarak belirlendi.

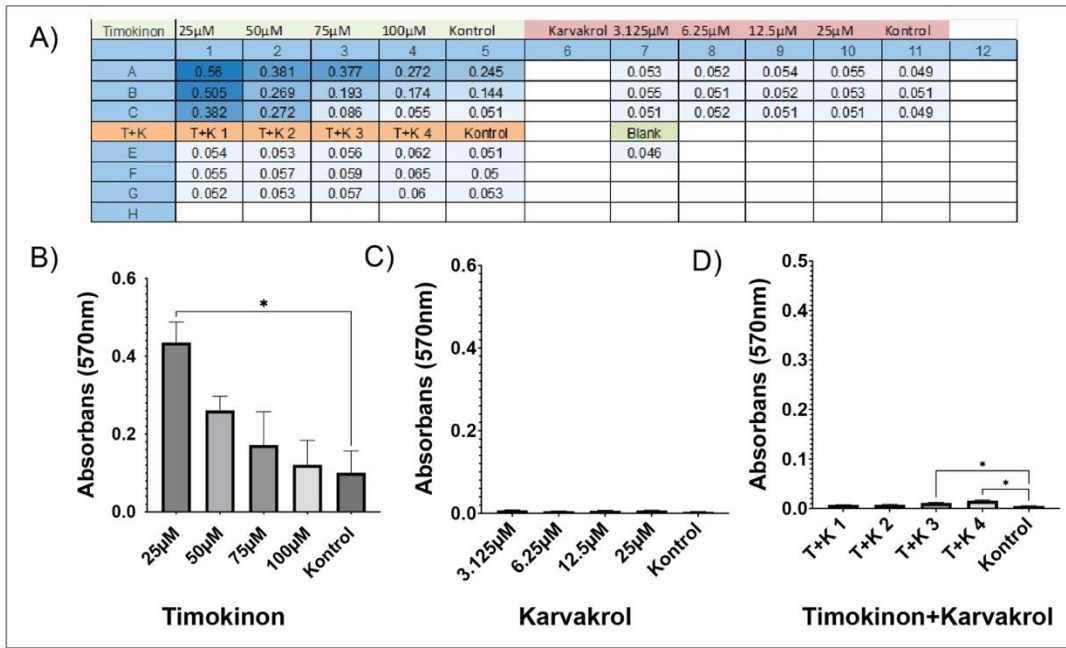


4. BULGULAR

4.1. HeLa Hücreleri

4.1.1. MTT Assay Bulguları

Tek plate üzerinde yalnızca timokinon ya da karvakrol ve timokinon+karvakrol kombine uygulaması gerçekleştirildi. MTT test bulgularına göre genel olarak hücrelerin canlılık oranlarının çok düşük olduğu gözlemlendi. En yüksek hücre canlılık oranının 25 μ M timokinon eklenen kuyularda olduğu belirlendi. 25 μ M timokinon eklenen grubun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek canlılığa sahip olduğu belirlendi ($p<0,01$). Timokinon+karvakrol grubunda da T+K 3 ve T+K 4 gruplarının T+K Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek canlılığa sahip olduğu belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.1).

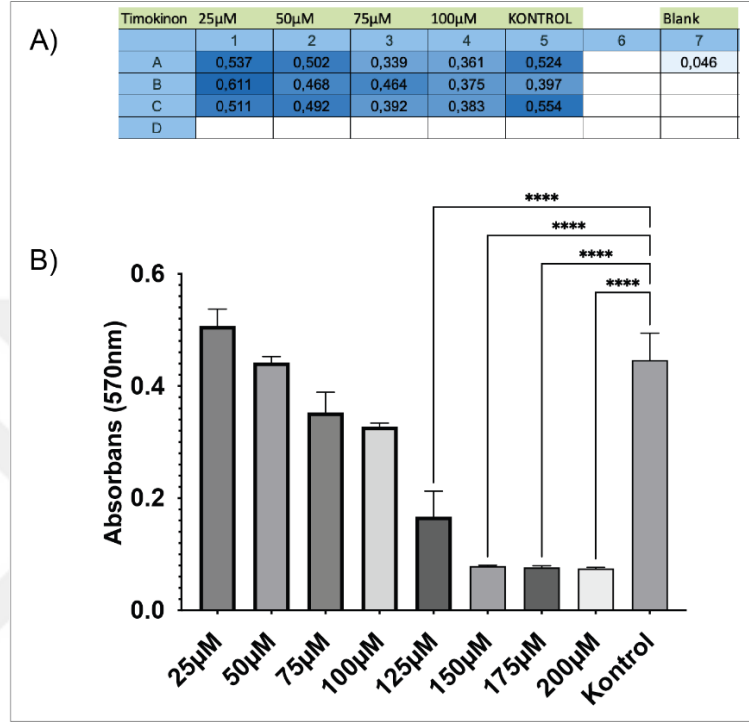


Şekil 4.1 HeLa hücrelerinde Timokinon, Karvakrol ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Timokinon, Karvakrol ve Timokinon+Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri. B) Timokinon, C) Karvakrol, D) Timokinon+Karvakrol grupları için istatistiksel analiz grafikleri (One way ANOVA, Welch çoklu karşılaştırma doğrulaması ile, * $p<0,001$)

96 kuyucuklu tek bir plate üzerinde yapılan deneylerde herhangi bir madde eklenmeyen kontrol gruplarının canlılık düzeylerinin çok düşük olması nedeniyle deneyler her bir etken madde için ayrı bir 96 kuyucuklu plate kullanılarak yeniden yapıldı.

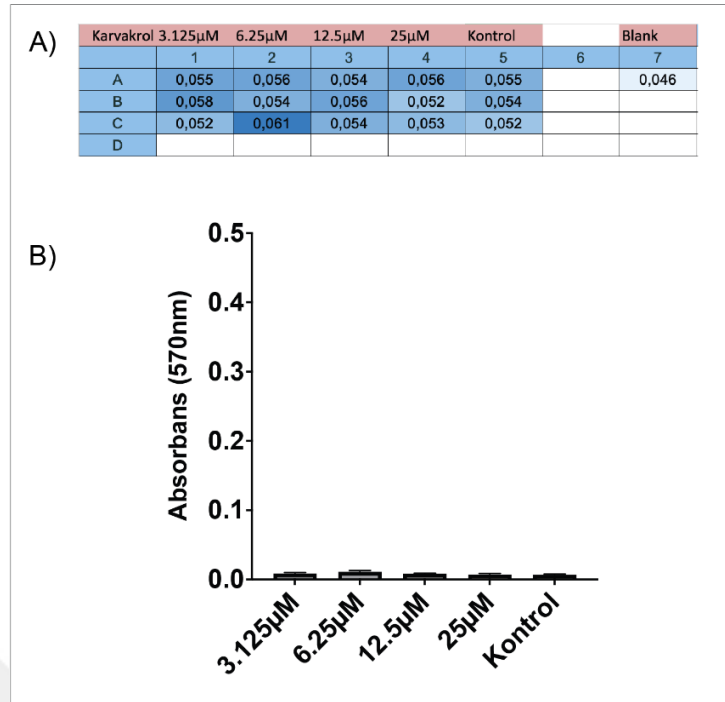
Kontrol gruplarının düşük hücre canlılığının sebebini aydınlatabilmek için ayrıca herhangi bir uygulama yapılmayan hücreleri içeren bir kontrol plate oluşturuldu.

Yeni deney setinde, kontrol grubuna göre 125 μ M, 150 μ M, 175 μ M ve 200 μ M timokinon eklenen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik etki belirlendi ($p < 0,0001$, One Way ANOVA) (Şekil 4.2).



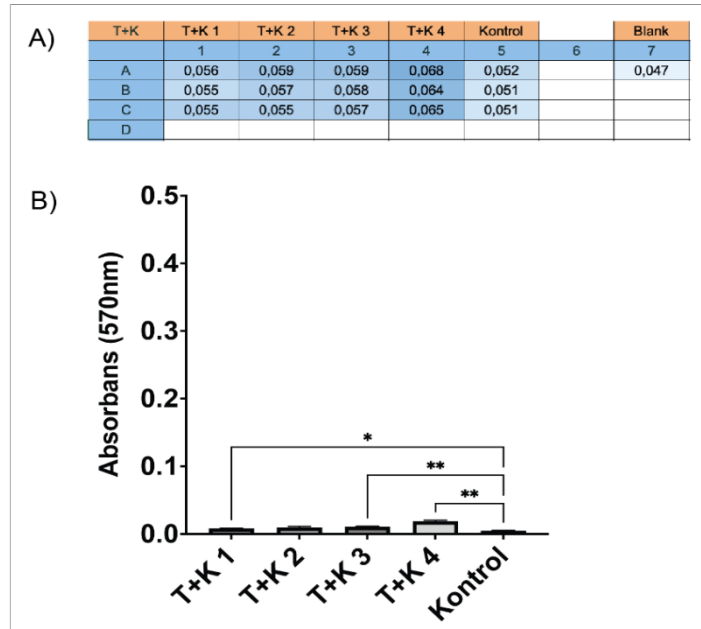
Şekil 4.2 A) Timokinon doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Timokinon plate doz gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, **** $p < 0,0001$)

Yeni deney setinde karvakrol doz denemelerinde, istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık bulunmazken, hücre canlılık oranlarının genel olarak düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



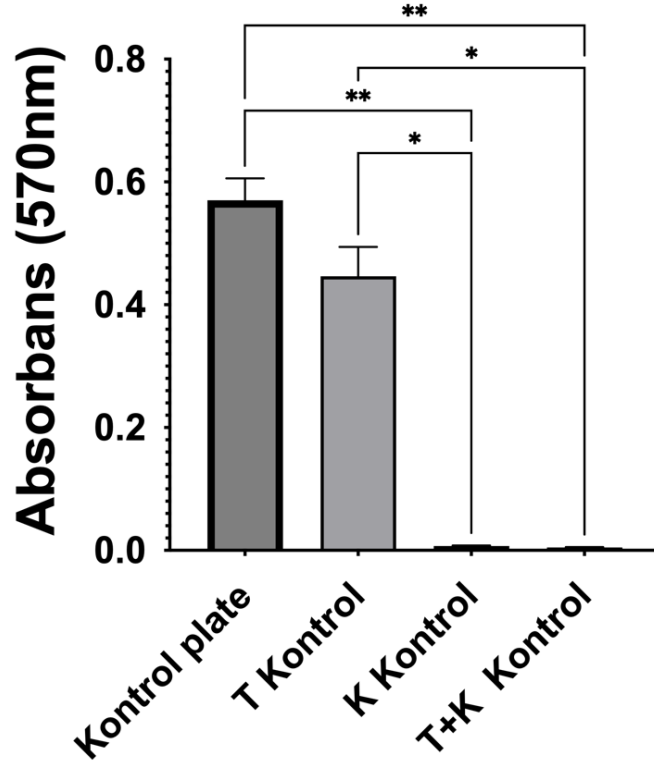
Şekil 4.3 A) Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Karvakrol plate istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli)

Ayrı 96 kuyucuklu plate ile yapılan timokinon+karvakrol doz denemelerinde kontrol grubunda istatistiksel olarak, T+K 2, T+K 3 ve T+K 4 gruplarına göre canlılık oranının düşük olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,049$; $p=0,006$; $p=0,009$) (Şekil 4.4).



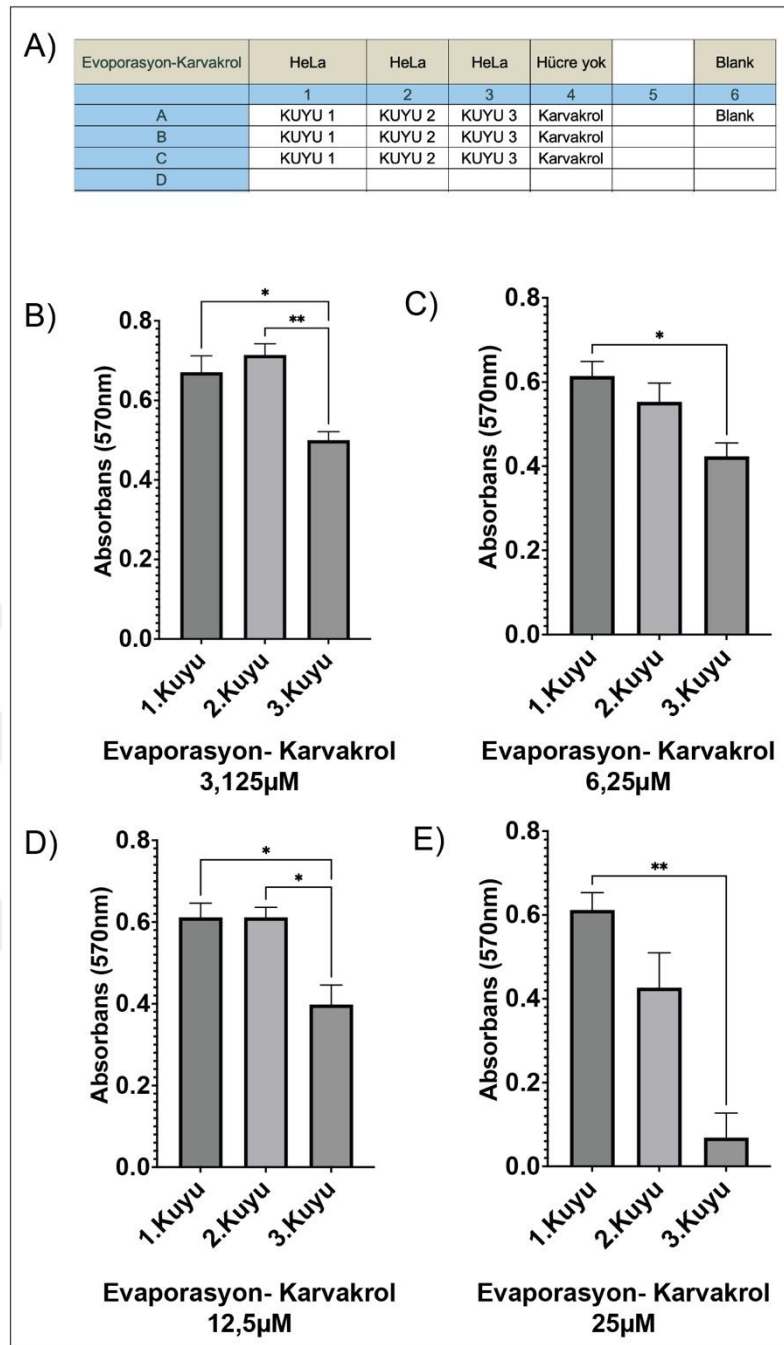
Şekil 4.4 A) Timokinon+Karvakrol doz gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimi ve MTT testi sonucunda 570 nm dalga boyunda alınan absorbans değerleri, B) Timokinon+Karvakrol plate doz gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analiz grafiği (One way anova, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,01$). Timokinon+Karvakrol plate istatistiksel analiz grafiği (Oneway ANOVA, Welch düzeltmeli)

Kontrol plate hücreleri, timokinon plate, karvakrol plate ve timokinon+karvakrol platelerinin kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kontrol ve timokinon gruplarında canlılık düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. Ancak karvakrol ve timokinon+karvakrol gruplarındaki kontrol hücrelerinin kontrol platedeki hücelere göre hücre canlılıklarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Timokinon (T Kontrol), Karvakrol (K Kontrol), Timokinon+Karvakrol (T+K Kontrol) platelerdeki kontrol grupları ile Kontrol plate verilerinin karşılaştırmalı istatistiksel analiz grafiği (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,005$)

Karvakrolün fiziksel olarak muamele edilmediği ancak karvakrol eklenen hücelere komşu kuyularda hücre canlılığının belirgin derecede azaldığı tespit edildi. Buna göre karvakrolün buhar formunun sitotoksik etkileri araştırıldı. Karvakrol eklenen kuyulara yaklaştıkça karvakrol içermeyen hücelerde hücre canlılık düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. Yüksek karvakrol dozlarına komşuluk hücre canlılığını daha da azalttı ($p<0,05$) (Şekil 4.6).



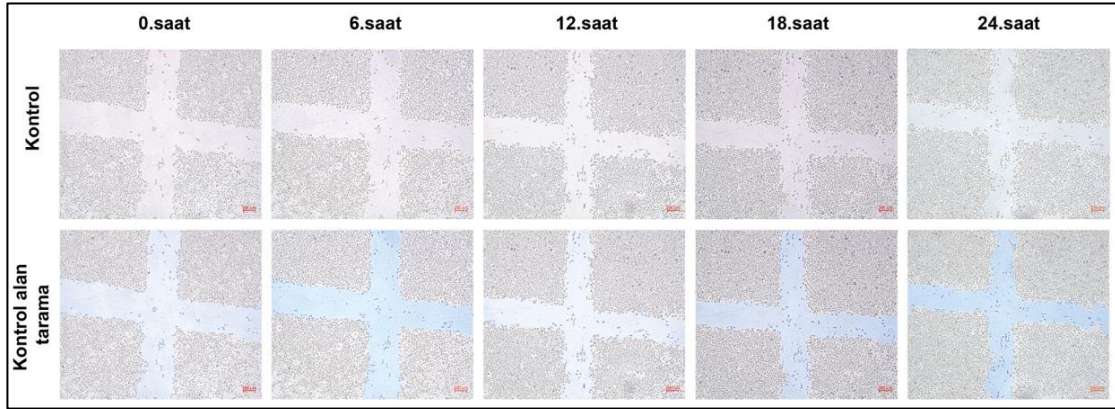
Şekil 4.6 HeLa hücrelerinde Evaporasyon-Karvakrol gruplarının karşılaştırılmalı istatistiksel analiz grafiği. A) Uygulama gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimlerini gösteren diyagram. Dördüncü kuyularına üçlü olarak B) 3,125 µM C) 6,25 µM, D) 12,5 µM, E) 25 µM Karvakrol eklenen platelerin karşılaştırılması (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, * $p<0,05$, ** $p<0,005$)

4.1.2. Hücre Yara Deneyi Bulguları

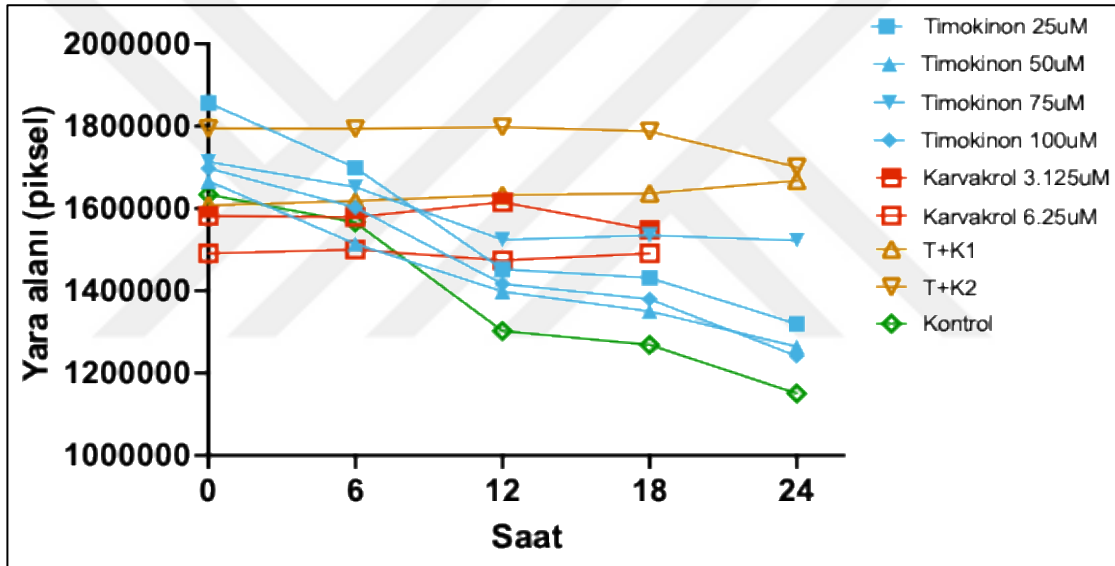
Timokinonun yüksek dozlarda hücre migrasyonunu azalttığı belirlendi. Karvakrolün buhar (evaporasyon) formu ve timokinon+karvakrolün kombine uygulaması, HeLa hücrelerinde migrasyonu kontrollere göre azaltmıştır (Şekil 4.7). Karvakrolün 12,5 ve 25 µM denemeleri 0. saat içerisinde yüksek sitotoksiste gösterdiğinden ölçüm sonlandırıldı.

Benzer bir durum timokinin +karvakrol kombine uygulamasının 3. ve 4. (T+K 3, T+K 4) gruplarında da gözlemlendi.

A)



B)

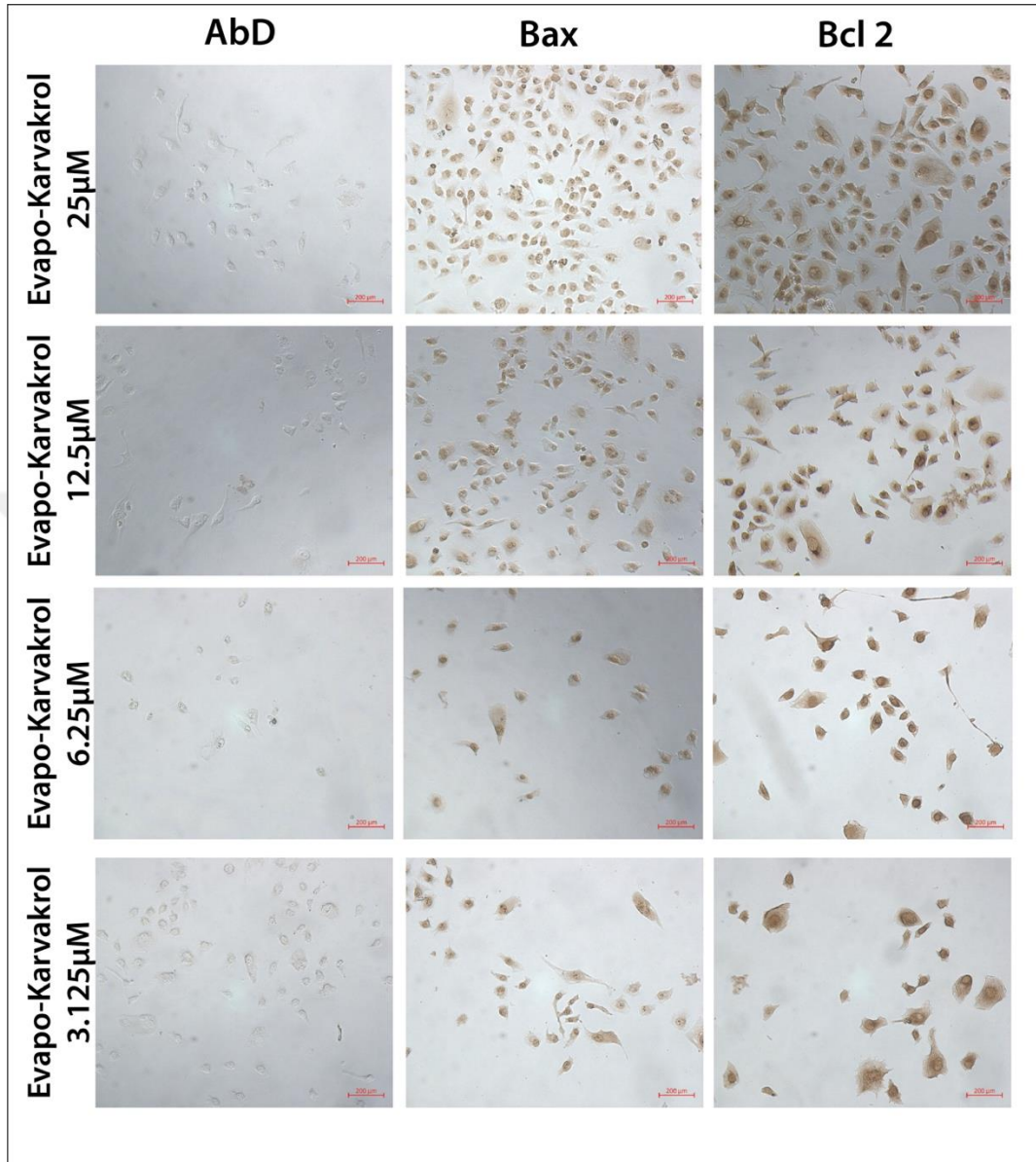


Şekil 4.7 HeLa hücre yara deneyi sonucunda yara bölgesinde 0., 6, 12 ve 24. saatlerde gözlenen değişimler. (Sadeliği koruyabilmek için yalnızca kontrol grubuna ait görseller verilmiştir.) A) Kontrol grubuna ait mikroskobî görüntüleri , mavi gölgeli alanlar taranan alanı göstermektedir. B) Yara bölgesinde gözlenen iyileşmenin grafiksel gösterimi

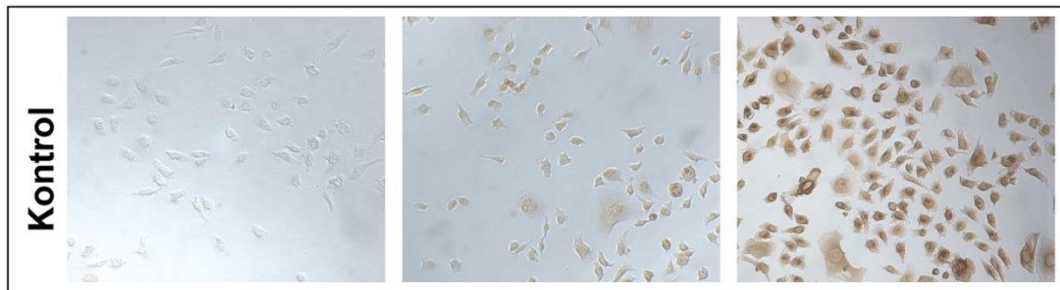
4.1.3. İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Karvakrolün evaporasyon sonucu apoptotik yollar (Bax/Bcl-2) üzerine etkisini gösteren immünohistokimya görüntüleri Şekil 4.8’de sunulmuştur.

A)



B)



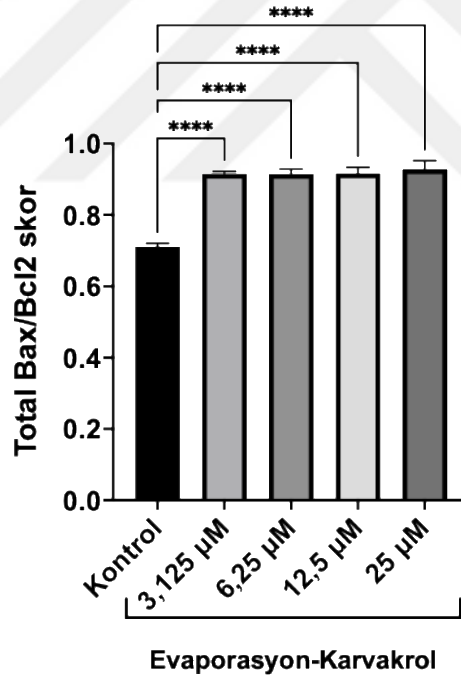
Şekil 4.8 Bax/Bcl-2 immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A) Değişen dozlarda evaporasyon yolu ile Karvakrole maruz bırakılan HeLa hücreleri, B) Karvakrole maruz bırakılmayan kontrol HeLa hücreleri (AbD; primer antikor yerine Antibody diluent eklenen grup)

İmmünohistokimyasal boyama skorlamalarına (Şekil 4.9) göre karvakrolün evaporasyon halinde HeLa hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını kontrole nazaran anlamlı düzeyde arttırdığı gözlemlendi ($p<0,0001$).

A)

	Boyama yoğunluk skoru			Belirteç Dağılım skoru			Total skor
	AbD(negatif kontrol)	Bax	Bcl-2	AbD	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
Kontrol	0	1,25	3	-	3	3	4,25/6
Evapo-Karvakrol 3,125 μM	0	2,5	3	-	3	3	5,5/6
Evapo-Karvakrol 6,25 μM	0	2,5	3	-	3	3	5,5/6
Evapo-Karvakrol 12,5 μM	0	2,5	3	-	3	3	5,5/6
Evapo-Karvakrol 25 μM	0	2,5	3	-	3	3	5,5/6

B)



Şekil 4.9 Evaporasyon yolu ile Karvakrolün Bax/Bcl-2 ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi. A) Bax/Bcl-2 immünohistokimya skorlamalarını gösteren tablo. B) Skorlama değerlerinin istatistiksel analizi (One way ANOVA, Tukey çoklu karşılaştırma testi, *** $p<0,0001$)

4.2. 293T Hücreleri

Timokon, karvakrol ve bu maddelerin kombine kullanımlarının sitotoksik etkilerinin kanser hücre hatlarına özgü olup olmadığını belirlemek amacıyla, kontrol

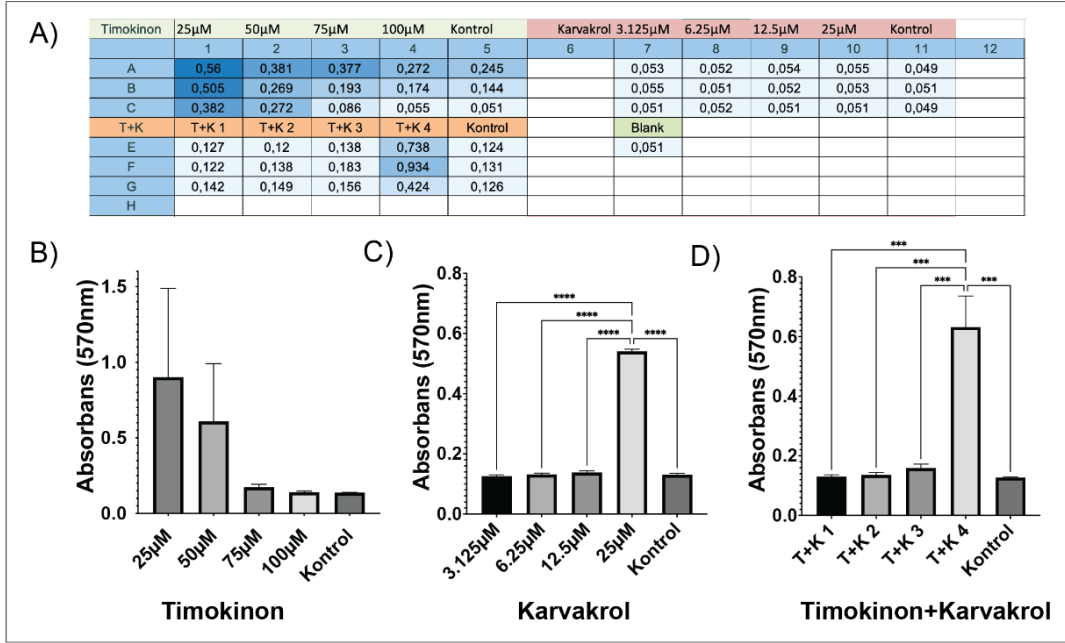
hücre grubu olarak 293T hücreleri kullanıldı. 293T hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki timokinon (25–100 μ M), karvakrol (3.125–25 μ M) ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarının (T+K) hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT ile değerlendirildi. 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerleri, hücre canlılığını yansıtmaktadır; absorbans değerinin artışı, hücre canlılığının yükseldiğini göstermektedir.

4.2.1. MTT Assay Bulguları

Timokinonun 293T hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendiğinde, 25 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında nispeten yüksek absorbans değerleri gözlenmiş, ancak konsantrasyon arttıkça (75 ve 100 μ M) hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Kontrol grubunda en düşük canlılık düzeyi tespit edildi ($p>0.05$) (Şekil 4.10).

Karvakrol uygulanan hücrelerde 25 μ M konsantrasyonunun hücre canlılığını anlamlı biçimde artırdığı gözlenmiştir ($p<0,0001$). Daha düşük konsantrasyonlarda (3.125–12.5 μ M) anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.10).

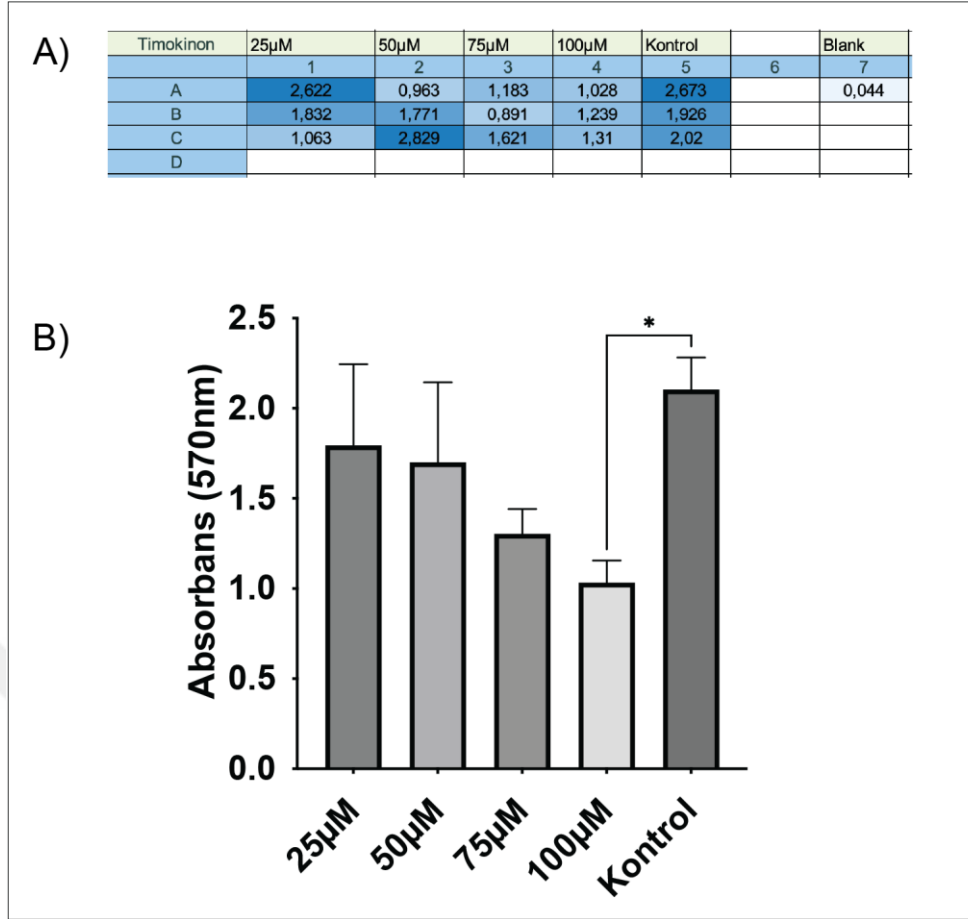
Timokinon ve karvakrol kombinasyonlarının etkisi incelendiğinde, T+K 4 grubunda (yüksek kombinasyon dozu) absorbans değerinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttığı ($p<0,001$) belirlendi. Diğer kombinasyon dozlarında (T+K 1–3) ise belirgin bir artış gözlenmedi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 293T hücrelerinde Timokinon, Karvakrol ve kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Deneyde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki Timokinon (25-100 µM), Karvakrol (3,125-25 µM) ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarının (T+K) 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerleri. İstatistiksel grafikler B) Timokinon grubu, C) Karvakrol grubu, D) Timokinon+Karvakrol grubu (One way ANOVA, Tukey post-hoc testi, ***p<0,001, ****p<0,0001)

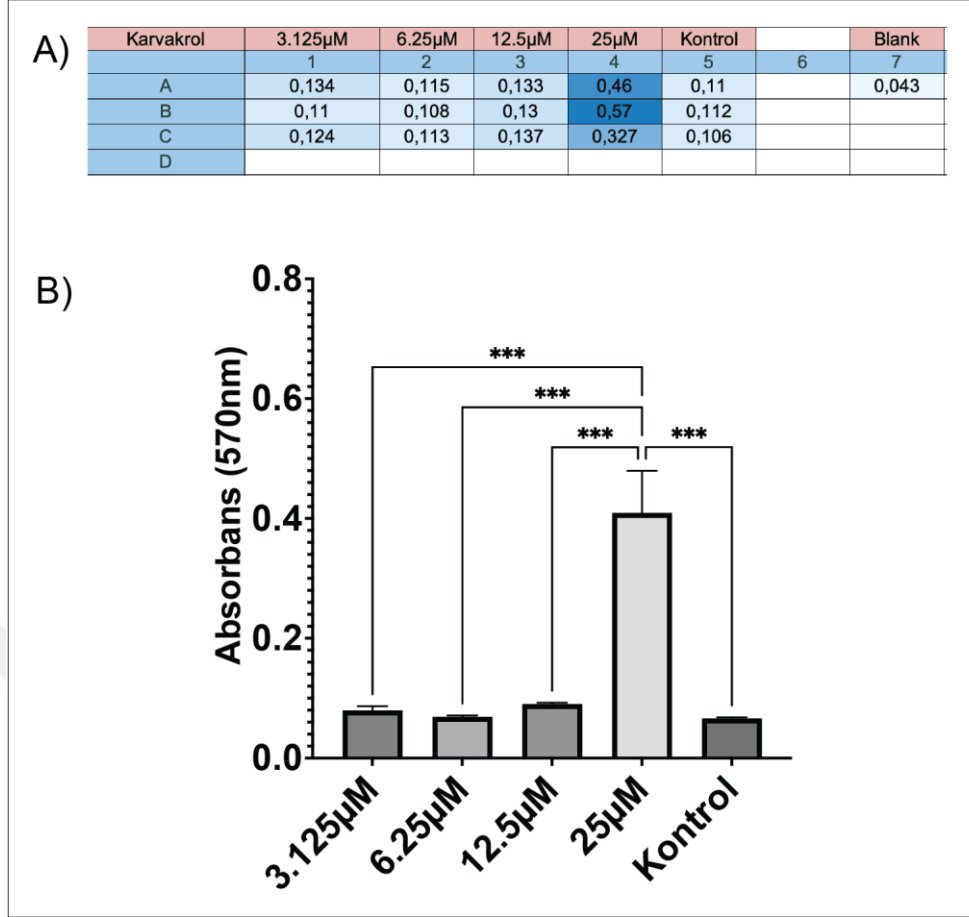
HeLa hücrelerinde elde edilen MTT assay bulgularına benzer şekilde tüm gruplar ile tek bir 96 kuyucuklu plate üzerinde yapılan deneylerde, herhangi bir madde eklenmeyen kontrol gruplarının canlılık düzeylerinin çok düşük olduğu gözlemlendi. Bu sebeple 293T hücreleri için de ayrı plate üzerinde deneyler tekrarlandı.

Ayrı plate üzerinde yapılan deneylerde, timokinonun artan konsantrasyonlarında, hücre canlılığında kademeli olarak bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.11). Özellikle 100 µM timokinon uygulaması sonrasında, absorbans değerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (*p<0.05). Düşük ve orta konsantrasyonlarda (25–50-75 µM) ise hücre canlılığında kontrol grubuna göre belirgin bir fark gözlemlenmedi.



Şekil 4.11 Timokinin'un 293T hücre canlılığı üzerine etkisi. A) Farklı Timokinin konsantrasyonlarında (25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) ve kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Timokinin uygulanan hücrelerde absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi. Artan Timokinin konsantrasyonları ile birlikte hücre canlılığında kademeli bir azalma gözlenmiştir. 100 µM Timokinin uygulaması, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltmıştır (One way ANOVA, *p<0,05)

Ayrı plate üzerinde artan karvakrol konsantrasyonları (3.125–25 µM) arasında belirgin farklılıklar gözlemlendi. Düşük konsantrasyonlarda (3.125–12.5 µM) absorbans değerlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim saptanmadı. Ancak 25 µM karvakrol uygulaması sonucunda absorbans değerinde belirgin bir artış meydana geldi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**p<0.001) (Şekil 4.14).

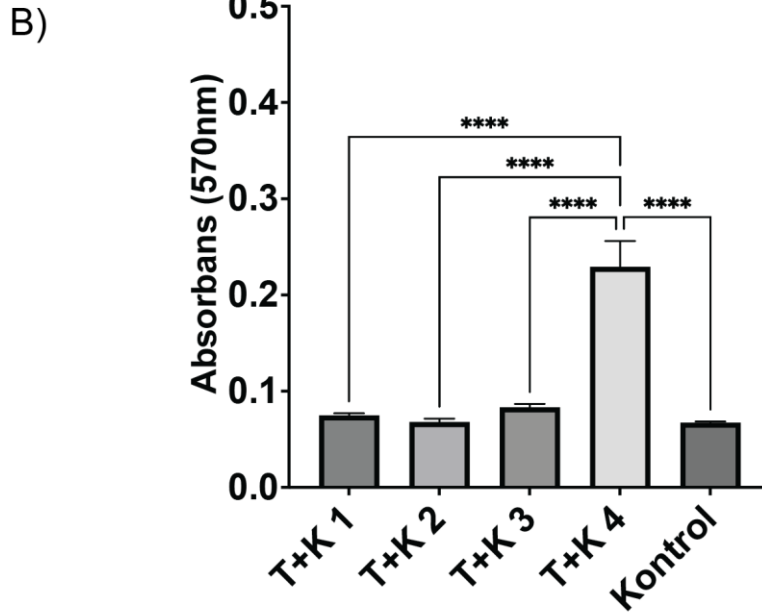


Şekil 4.12 Karvakrol'ün 293T hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) Farklı Karvakrol konsantrasyonlarında (3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM ve 25 µM) ve kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Karvakrol uygulanan hücrelerde absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi (One way ANOVA, ***p<0,001)

Ayrı plate üzerinde timokinon+karvakrol verilen gruplardan elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.13), düşük kombinasyon dozlarında (T+K 1–3) hücre canlılığı değerleri kontrol grubuna benzer düzeylerde bulundu. Ancak T+K 4 grubunda absorbans değerinde belirgin bir artış gözlemlendi ve bu artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Fakat T+K grubunda da karvakrol grubuna benzer şekilde kontrol grubu canlılık düzeyinin çok düşük olduğu gözlemlendi.

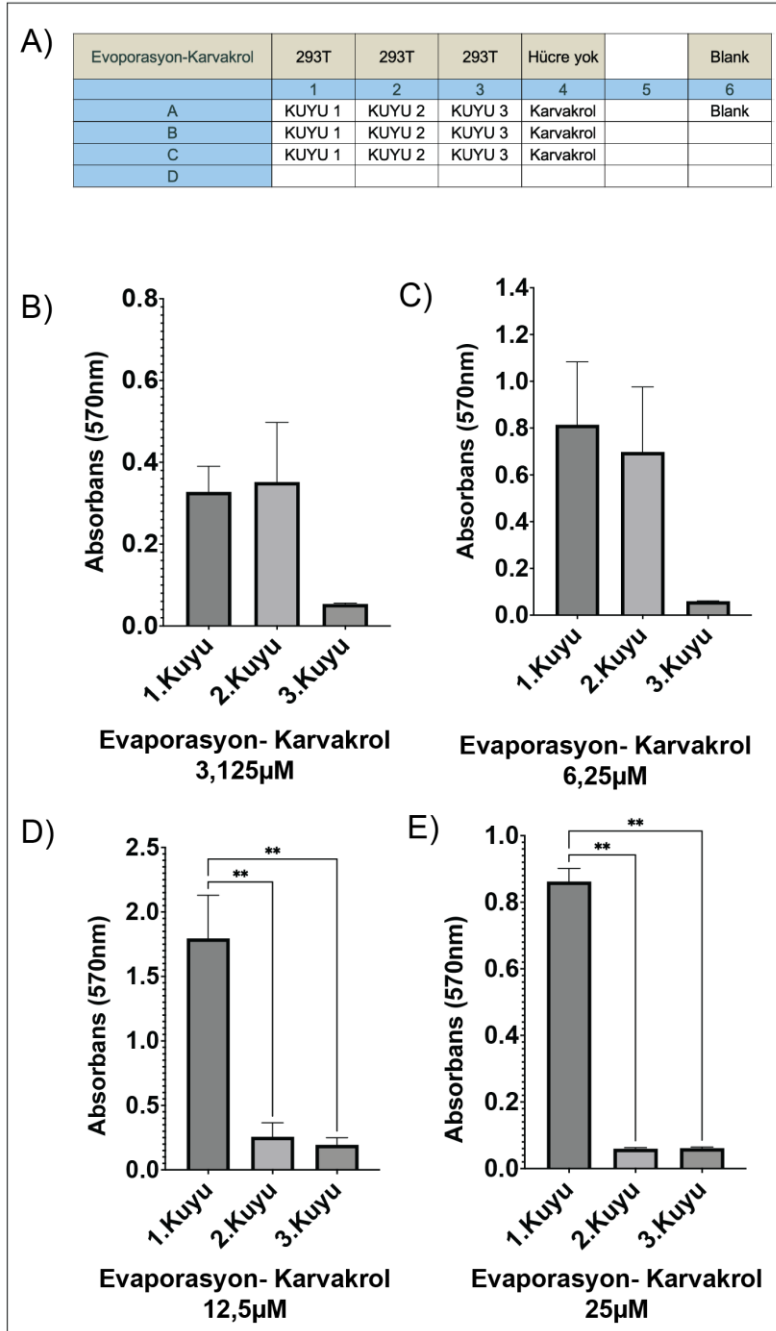
A)

Timokinin+Karvakrol (T+K)	T+K 1	T+K 2	T+K 3	T+K 4	Kontrol		Blank
	1	2	3	4	5	6	7
A	0,117	0,116	0,125	0,29	0,112		0,044
B	0,117	0,115	0,134	0,221	0,113		
C	0,123	0,105	0,123	0,309	0,109		
D							



Şekil 4.13 Timokinin+Karvakrol'ün 293T hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) Farklı konsantrasyonlarında ve kontrol grubunda 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbans (optik yoğunluk, OD) değerlerini gösteren tablo. Her koşul üç teknik tekrar (A-C satırları) şeklinde gerçekleştirilmiştir. B) Absorbans değerlerinin istatistiksel grafik gösterimi (One way ANOVA, ****p<0,0001)

Ayrı plate üzerinde Evaporasyon-Karvakrol verilen gruplardan elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.14), HeLa hücrelerine benzer şekilde 293 T hücrelerinde de karvakrolün fiziksel olarak muamele edilmediği ancak karvakrol eklenen hücelere komşu kuyularda hücre canlılığının belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Karvakrol eklenen kuyulara yaklaştıkça karvakrol içermeyen kuyulardaki hücrelerin hücre canlılık düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. Yüksek karvakrol dozlarına komşuluğun 293T hücrelerinde de hücre canlılığını daha da azalttığı belirlendi (**p<0,005).



Şekil 4.14 293T hücrelerinde Evaporasyon-Karvakrol gruplarının karşılaştırmalı istatistiksel analiz grafiği. A) Uygulama gruplarının 96 kuyucuklu plate üzerinde yerleşimlerini gösteren diyagram. Dördüncü kuyularına üçlü olarak B) 3,125 µM, C) 6,25 µM, D) 12,5 µM, E) 25 µM Karvakrol eklenen platelerdeki kuyucuklardaki hücre canlılıklarının karşılaştırılması (One way ANOVA, Welch düzeltmeli, **p<0,005)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Servikal kanser, endoservikal kanal aracılığıyla vajinaya açılan serviks bölgesinde gelişen, kadın üreme sistemine ait en yaygın malignitelerden biri olup, morbidite ve mortalite bakımından küresel sağlık açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Burmeister, 2022). Servikal kanserin küresel hastalık yükü halen yüksek olmakla birlikte kontrol altına alınmasında önemli zorluklar bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki tarama ve aşılama programlarının etkili biçimde uygulanması, hastalık insidansını ve mortaliteyi belirgin ölçüde azaltmıştır. Buna karşın, düşük ve orta gelirli ülkelerde bu hizmetlere erişimde yaşanan eşitsizlikler nedeniyle, yeni vakaların %83'ü ve ölümlerin %88'i bu bölgelerde görülmektedir (Burmeister, 2022). Erken tanı ve HPV aşısı uygulama oranlarının artırılması, hastalık insidansını önemli ölçüde azaltmaktadır (Kobayashi, 2024).

Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımlarında önemli gelişmeler kaydedilmiş olsa da ilaçlar aracılığıyla bağışıklık sisteminin baskılanması ve buna bağlı sekonder komplikasyonlar, yüksek tedavi maliyetleri ve ilaç direnci gibi önemli problemler hala devam etmektedir. Bu tedavi yöntemlerinin yüksek mortalite oranları ile ilişkilendirilmesi, yenilikçi ve daha güvenli tedavi alternatiflerine olan ihtiyacı artırmaktadır. Literatürde, tıbbi aromatik bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkiler sergilediğine ilişkin çok sayıda çalışma yer almaktadır. Bitkilerden elde edilen fitokimyasallar veya bunların ekstraktlarıyla yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu bileşiklerin hem kemopreventif hem de kemoterapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Quintero-Rincon, Caballero-Gallardo, & Olivero-Verbel, 2025). Çalışmamız ile, *N.sativa*'dan elde edilen timokinonun ve kekik türlerinden elde edilen karvakrolün, servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki bireysel ve kombine etkileri değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmamız da, HeLa ve 293T hücrelerinde timokinon, karvakrol ve bu iki bileşiğin kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi kullanılarak ayrıntılı biçimde incelenmiştir. İlk olarak, HeLa hücrelerinde timokinon, karvakrol ve kombinasyon dozlarının (timokinon: 0.01–500 μ M; karvakrol: 3.125–25 μ M) tek bir 96 kuyucuklu plate üzerinde doğrudan uygulanması sonucunda, herhangi bir madde eklenmeyen kontrol gruplarının canlılık oranlarının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

Bu durumun buharlaşan karvakrolün, doz bağımsız olarak bütün kuyucuklardaki hücreler üzerinde sitotoksik etkisinden kaynaklandığını düşünerek, her bir etken madde için ayrı 96 kuyucuklu plateler kullanılarak deneyler yeniden gerçekleştirilmiştir. Timokinon uygulamalarında düşük ve orta dozlarda (1–50 μ M) hücre canlılığında anlamlı farklılıklar gözlenmezken, özellikle 25 μ M timokinon uygulanan grupta hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Kontrol grubuna kıyasla 25 μ M timokinon uygulanan hücrelerde hücre canlılığının yüksek çıkması literatürle çelişen bir bulgu olarak karşımıza çıkmakta olup, bu durumun sebebi, kontrol grubunda deney süresince pipetaja bağlı hücre kaybı olabilir. Ancak aynı dozda 293T hücrelerinde de benzer durumun belirlenmesi altta yatan araştırılmaya muhtaç başka bir biyolojik mekanizmanın olabileceğini de işaret etmektedir. Düşük timokinon dozlarında HeLa hücrelerinde sitotoksik etkinin gözlenmemesi neticesi yüksek dozlarda —125 μ M, 150 μ M, 175 μ M ve 200 μ M— timokinon ile hücreler muamele edilmiştir. Böylelikle bütün dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma meydana gelmiş ve bu fark kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Karvakrolün 3.125 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M ve 25 μ M dozları test edilmiş; istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksosite saptanmamış olmakla birlikte, kontrol grubu dahil bütün gruplarda hücrelerin tamamına yakınının öldüğünü gösteren genel canlılık düzeylerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Timokinon ve karvakrol kombine uygulamasında da sonuç, yalnızca karvakrolün uygulandığı plate ile benzer bulunmuştur. Ayrıca karvakrolün buhar (evaporasyon) formu kullanılarak yapılan deneylerde, yüksek dozlara yakın kuyularda hücre canlılığının anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. Özellikle 12.5 μ M ve 25 μ M karvakrol dozlarında bu etki belirgindir ($p<0,05$). Karvakrol buharının, doz arttıkça hücre canlılığını düşürdüğü gösterilmiştir. Timokinon ve karvakrolün etkilerinin servikal kanser hücrelerine spesifik olduğunu belirlemek için aynı deneyler insan emrionik böbrek hücre hattı olan 293T hücrelerinde de gerçekleştirilmiştir. Benzer bulgular elde edilmiştir. Çalışmamız kapsamında sitotoksosite verilerine ek olarak, karvakrolün buhar fazının HeLa hücreleri üzerindeki etkisinin hangi biyolojik mekanizma ile gerçekleştiği araştırılmıştır. Bunun için hücresel Bax ve Bcl-2 protein düzeyleri farklı dozlarda karvakrol buharına maruz kalan hücrelerde immünositokimya methodu ile belirlenmiştir. Apoptotik stimülasyonu gösteren artan miktarlardaki Bax/Bcl-2 oranları karvakrol buharına maruz kalan bütün hücrelerde gösterilmiştir. Literatürden araştırdığımız kadarıyla verilerimiz, karvakrol buharının apoptozu indükleyerek insan servikal kanser hücrelerini öldürdüğünü gösteren ilk çalışma

olma niteliğindedir. Bu bulgu, yan etkileri az alternatif bir kanser tedavi yönteminin geliştirilmesi açısından umut vaadedicidir.

Çalışmamızın bulgularına göre, HeLa hücrelerine uygulanan yüksek dozlarda timokinonun hücre migrasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, literatür verileri ile uyumlu olup, söz konusu bileşiklerin anti-migrasyonel etkilerini desteklemektedir. Diğer taraftan düşük doz sıvı karvakrol uygulaması yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre migrasyon açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hücreler morfolojik olarak incelendiğinde, sağlıklı görünmedikleri, fikse olmuş bir görüntü verdikleri belirlenmiştir. Yüksek doz karvakrol uygulamasında ise hücreler ölmüş, migrasyon değerlendirilememiştir.

Sakalar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, timokinonun HeLa servikal kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bulgular, timokinonun doz bağımlı olarak hücre çoğalmasını ve göçünü baskıladığını, ayrıca yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 100 μM) apoptozu belirgin şekilde indüklediğini ortaya koymuştur. Belirledikleri bu dozlar bizim bulgularımızla uyumludur. Düşük dozlarda ise migrasyonun anlamlı şekilde inhibe edilmesine karşın apoptozun sınırlı düzeyde uyarıldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, timokinonun özellikle metastazın erken evrelerini hedeflemeye etkili olabileceğini ve servikal kanser tedavisinde potansiyel bir doğal ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Sakalar ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda timokinonun HeLa hücrelerinde apoptotik etkileri araştırılmamıştır. İlave çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Çelebioğlu ve arkadaşlarının çalışmasında ise timokinonun, antineoplastik bir ajan olan etoposid ile kombinasyon halinde HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Timokinonun, 24 saatlik sürede 15,63 μM ve üzeri; 48 saatlik sürede ise 31,5 μM ve üzeri konsantrasyonlarda, etoposidin sitotoksik etkisini anlamlı düzeyde ve doz bağımlı biçimde artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca, düşük dozlarda (0,1–5 μM) timokinon ve 1 μM etoposid uygulamaları tek başına DNA hasarına neden olmazken, daha yüksek dozlarda her iki ajan da DNA hasarını anlamlı şekilde artırmıştır. Bununla birlikte, timokinonun 0,1–10 μM aralığında uygulanması, 10 μM etoposid ile indüklenen DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır. Bu bulgular, timokinonun yüksek dozlarda etoposidin antikanser etkilerini potansiyel olarak artırabileceğini, düşük dozlarda ise genotoksik yan etkileri hafifletici bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Elde edilen veriler, tedavi etkinliğini artırma ve

kemoterapiye bağı toksisiteyi azaltma yönünde timokinonun umut vaat eden bir aday olduğunu göstermektedir (Celebioğlu ve ark., 2022).

Uçucu yağlarda bulunan biyolojik olarak aktif bileşiklerin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkileri literatürde geniş biçimde tanımlanmıştır. Bu bileşiklerden biri olan karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol), antimikrobiyal ve antifungal özellikleriyle dikkat çeken temel bir monoterpen olarak tanımlanmaktadır. Hücresel proliferasyon süreci hücre bölünmesi ve ölümü dengesine dayandığından, birçok antikanser ajan bu dengeyi bozarak tümör büyümesini engellemeyi hedeflemektedir. *In vitro* sitotoksik testleri, potansiyel antikanser bileşiklerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmakta olup, bu testlerin sonuçları kullanılan ajan ve yöntemle bağı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, karvakrolün HeLa ve SiHa servikal kanser hücre hatları üzerinde doza bağı olarak sitotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu etkiler hem MTT hem de LDH sızıntı testleriyle doğrulanmış olup, karvakrolün bu hücre hatlarına karşı duyarlılığı desteklenmiştir. Ayrıca, karvakrol uygulaması sonucunda gözlenen apoptoz artışı, bu bileşiğin programlı hücre ölümünü tetikleyebildiğini göstermekte ve antikanser potansiyelini güçlendirmektedir. Elde edilen veriler, karvakrolün sitotoksik ve proapoptotik etkilerinin servikal kanser tedavisinde değerlendirilebilecek doğal ajanlar arasında yer alabileceğine işaret etmektedir. Mehdi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, karvakrolün insan servikal kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri kapsamlı olarak incelenmiştir. Çalışmada uygulanan MTT ve LDH sitotoksik analizleri sonucunda, karvakrolün hem HeLa hem de SiHa hücrelerinde yaklaşık 50 mg/L IC₅₀ değerinde, doza bağımlı bir sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, DNA fragmentasyonu yoluyla değerlendirilen apoptoz analizlerinde, karvakrol uygulamasına bağı olarak hücre ölümünün apoptoz mekanizmasıyla gerçekleştiği saptanmıştır. Bu bulgular, karvakrolün servikal kanser hücrelerinde anlamlı düzeyde antiproliferatif ve proapoptotik aktiviteye sahip olduğunu ve dolayısıyla potansiyel bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Mehdi ve ark., 2011). Karvakrolün HPV18 pozitif HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki antikarsinojenik etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, karvakrolün anlamlı düzeyde antiproliferatif ve pro-apoptotik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. MTT analiziyle değerlendirilen hücre canlılığı verileri, karvakrolün hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde baskıladığını ortaya koymuştur. Karvakrolün kaspaz-bağımlı apoptoz mekanizmasını aktive ettiğini ve aynı zamanda hücre döngüsünü durdurarak tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan ön

analizler karvakrolün kemoterapötik ajanlar olan 5-florourasil (5-FU) ve karboplatin ile birlikte uygulandığında sinerjistik bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu, karvakrolün kemoterapiye olan duyarlılığı artırabileceği ve bu sayede kemoterapötik ilaçlara bağlı toksisiteyi azaltma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, doğal bileşiklerin kemoterapi rejimlerine eklenmesinin tedavi etkinliğini artırabileceğine ve yan etkileri azaltabileceğine dair, artan sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda, karvakrolün gerek tek başına gerekse kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımı, servikal kanser tedavisinde değerlendirilebilecek alternatif yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Ahmad & Ansari, 2021). Mevcut çalışmamızda da benzer şekilde karvakrolün HeLa hücrelerinde apoptozu indükleyici etkileri gözlemlenmiş olup, bulgularımız literatür ile uyumlu bir biçimde karvakrolün terapötik potansiyelini desteklemektedir.

Çalışmamız kapsamında, karvakrolün sıvı formunun fiziksel olarak uygulandığı HeLa hücrelerine komşu kuyularda bulunan ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerinin de öldüğü belirlenmiştir. Karaciğer kanseri hücreleri ile daha önce yaptığımız çalışmada da belirlediğimiz bu durum mevcut çalışma ile daha detaylı incelenmiştir. Böylelikle karvakrolün buharlaşma yoluyla (evaporatif) etkisinin servikal kanser hücreleri üzerindeki olası apoptotik etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla, 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarındaki karvakrol çözeltileri hücre kültür ortamına eklenmiş, ancak doğrudan temas edilmeksizin buhar etkisiyle çevre kuyulardaki kontrol grubu hücreler gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler, karvakrolün buhar formunun bile apoptoz indükleyici etki gösterdiğini ve bu etkinin uygulanan konsantrasyona bağlı olarak arttığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, karvakrolün yalnızca doğrudan temasla değil, aynı zamanda buhar formu aracılığıyla da kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermesi açısından özgündür. Karvakrolün buhar fazdaki etkinliği insan kanserlerinde henüz araştırılmamış ancak, Cid-Perez ve arkadaşlarının 2024 yılında yayımladıkları çalışma, karvakrolün buhar fazının canlı hücreler üzerindeki toksik etkisini kanıtlar niteliktedir. Bu çalışmada timol ve karvakrolün buhar fazı aracılığıyla taze yeşil salata üzerinde inoküle edilen *Escherichia coli* ve *Salmonella* serovar *Typhimurium*'un inhibisyonuna yönelik antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, nişasta, sorbitol ve farklı konsantrasyonlarda karvakrol, timol ya da her ikisinin karışımını içeren film oluşturuç çözeltiler hazırlanmış ve bu çözeltiler, antimikrobiyal ajan içeren ambalaj kapaklarının iç yüzeyine uygulanmıştır. Hazırlanan aktif ambalaj sistemleri sırasıyla 105 mg/L hava karvakrol, 105

mg/L hava timol ve 52 mg/L karvakrol + 52 mg/L timol karışımı içerecek şekilde tasarlanmış ve içerisine patojenlerle inoküle edilmiş yeşil salata yerleştirilmiştir. Ambalajlar hermetik olarak kapatılarak 6 °C'de 48 saat süreyle soğutmalı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriyel büyüme/inhibisyon eğrileri Weibull modeli kullanılarak analiz edilmiş ve tüketici beğeni düzeyi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, uçucu bileşenlerin buhar fazında düşük konsantrasyonlarda dahi antimikrobiyal etkiler gösterebildiğini ve gıda koruma uygulamalarında potansiyel kullanım alanları olabileceği gösterilmiştir (Cid-Perez ve ark., 2024). Karvakrolün buhar fazının antimikrobiyal etkileri çalışmalarca sabittir ancak başta insan kanserleri olmak üzere başka hastalıklar üzerine etkileri de araştırılmalıdır.

Daha önce timokinon ve karvakrolün çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki farklı çalışmalarda ortaya konmuş olsa da bu bileşiklerin servikal kanser üzerindeki *in vivo* etkilerini inceleyen araştırmaların literatürde bulunmadığı görülmektedir. Literatür verileri, timokinon ve karvakrolün hayvan modellerinde, meme kanseri, glioblastoma gibi farklı kanser türleri üzerinde antiproliferatif, proapoptotik ve antimetastatik özellikler sergileyen biyoaktif bileşikler olduğunu göstermektedir. Kaleem ve arkadaşları, timokinonun insan meme kanseri hücre hatları olan MCF7 ve T47D üzerindeki inhibitör etkileri ile tek doz oral 7,12-dimetilbenzantrasen (DMBA;65mg/kg) uygulamasıyla meme kanseri indüklenen dişi sıçanlardaki antitümöral aktivitesini değerlendirmişlerdir. Terapötik etki, DMBA ile tedavi edilen ve haftada üç kez oral olarak timokinon (50 mg/kg) verilen Wistar albino sıçanlarda incelenmiştir. Timokinon ile muamele edilen MCF7 ve T47D hücrelerinde, hücre proliferasyonun konsantrasyona bağlı olarak inhibe edildiği ve apoptozun indüklendiği gözlenmiştir. Ayrıca timokinon, her iki kanser hücre tipinde de DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) ekspresyonunu azaltmıştır. DMBA ile indüklenen deneysel meme kanseri modelinde, timokinon uygulamasının karaciğer ve böbrek metastazlarını azalttığı ve bu etkinin DNMT1 mRNA ekspresyonunun baskılanmasıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bulgular, timokinonun DNMT1 inhibisyonuna dayalı epigenetik mekanizmalar aracılığıyla meme kanserine karşı koruyucu bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Kaleem ve ark., 2024). Başka bir çalışmada, *in vivo* model olarak dişi nude fareler kullanılarak, prostaglandin E2 ile ön muamele edilen insan kolon adenokarsinom hücre hattı olan LoVo hücreleri kullanılarak kolon kanseri oluşturulmuş, ardından farklı dozlarda timokinon uygulanarak tümör büyümesi üzerindeki terapötik etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, timokinonun PI3K/Akt/ β -katenin/COX-2 sinyal yolunu inhibe ederek kolon kanseri

hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu baskıladığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, timokinonun kolorektal kanser tedavisinde potansiyel bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Hsu ve ark., 2017). Alanazi ve arkadaşları karvakrolün, insan glioblastoma hücre hatları U87 ve U251 üzerindeki *in vivo* etkilerini araştırmışlardır. Subkutan ksenograft glioblastoma dişi fare modeli kullanarak yapılan deneylerde, karvakrol uygulanmasının her iki hücre hattında da tümör hacmini anlamlı şekilde azalttığı, p-Akt protein düzeylerini düşürürken p-GSK3 β düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Alanazi ve ark., 2022). Timokinon ve karvakrolün etkileri serviks kanserli hayvan modellerinde henüz araştırılmamıştır. Mevcut veriler gerek timokinon ve karvakrolün tek başına gerekse kombine uygulamalarının deneysel hayvan modellerinde de gerçekleştirilmesi gerektiğinin altyapısını oluşturmaktadır. Diğer taraftan çalışmamız sonucunda belirlenen karvakrolün buhar fazının da antikarsinojenik etkisi, hayvan çalışmaları ile de test edilmeli, daha az toksik ama etkili sonuçlar elde edilme olasılığı değerlendirilmelidir. Ek olarak, timokinon ve karvakrolün kombine formlarının HeLa hücreleri üzerine etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu bağlamda, elde ettiğimiz bulgular literatüre özgün katkılar sunmakta ve bu doğal bileşiklerin birlikte kullanımının potansiyel terapötik etkilerini ortaya koyması açısından yenilikçi nitelik taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, A., & Ansari, I. A. (2021). Carvacrol Exhibits Chemopreventive Potential against Cervical Cancer Cells via Caspase-Dependent Apoptosis and Abrogation of Cell Cycle Progression. *Anticancer Agents Med Chem*, 21(16), 2224-2235. doi:10.2174/1871520621999201230201258
- Ahmad, A., Tiwari, R. K., Saeed, M., Al-Amrah, H., Han, I., Choi, E. H., . . . Ansari, I. A. (2022). Carvacrol instigates intrinsic and extrinsic apoptosis with abrogation of cell cycle progression in cervical cancer cells: Inhibition of Hedgehog/GLI signaling cascade. *Front Chem*, 10, 1064191. doi:10.3389/fchem.2022.1064191
- Alanazi, R., Nakatogawa, H., Wang, H., Ji, D., Luo, Z., Golbourn, B., . . . Sun, H. S. (2022). Inhibition of TRPM7 with carvacrol suppresses glioblastoma functions in vivo. *Eur J Neurosci*, 55(6), 1483-1491. doi:10.1111/ejn.15647
- Almajali, B., Al-Jamal, H. A. N., Taib, W. R. W., Ismail, I., Johan, M. F., Doolaanea, A. A., & Ibrahim, W. N. (2021). Thymoquinone, as a Novel Therapeutic Candidate of Cancers. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(4). doi:10.3390/ph14040369
- Alsaffar, N., Fang, Y., & Walters, E. (2023). Thymoquinone effect on the Dictyostelium discoideum model correlates with functional roles for glutathione S-transferases in eukaryotic proliferation, chemotaxis, and development. *PLoS One*, 18(3), e0282399. doi:10.1371/journal.pone.0282399
- Alvarenga, E. M., Souza, L. K., Araujo, T. S., Nogueira, K. M., Sousa, F. B., Araujo, A. R., . . . Medeiros, J. V. (2016). Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. *Chem Biol Interact*, 260, 129-140. doi:10.1016/j.cbi.2016.11.009
- Arigesavan, K., & Sudhandiran, G. (2015). Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 461(2), 314-320. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.030
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17(8-9), 581-588. doi:10.1016/j.phymed.2009.12.008

- Asaduzzaman Khan, M., Tania, M., Fu, S., & Fu, J. (2017). Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*, 8(31), 51907-51919. doi:10.18632/oncotarget.17206
- Ashour, A. E., Ahmed, A. F., Kumar, A., Zoheir, K. M., Aboul-Soud, M. A., Ahmad, S. F., . . . Rishi, A. K. (2016). Thymoquinone inhibits growth of human medulloblastoma cells by inducing oxidative stress and caspase-dependent apoptosis while suppressing NF-kappaB signaling and IL-8 expression. *Mol Cell Biochem*, 416(1-2), 141-155. doi:10.1007/s11010-016-2703-4
- Aziz, N., Son, Y. J., & Cho, J. Y. (2018). Thymoquinone Suppresses IRF-3-Mediated Expression of Type I Interferons via Suppression of TBK1. *Int J Mol Sci*, 19(5). doi:10.3390/ijms19051355
- Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal el-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*, 26(2), 87-98. doi:10.1081/dct-120020404
- Bakir, M., Geyikoglu, F., Colak, S., Turkez, H., Bakir, T. O., & Hosseinigouzdagani, M. (2016). The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. *Cytotechnology*, 68(4), 1131-1146. doi:10.1007/s10616-015-9871-z
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*, 55(7). doi:10.3390/medicina55070384
- Banik, S., Akter, M., Corpus Bondad, S. E., Saito, T., Hosokawa, T., & Kurasaki, M. (2019). Carvacrol inhibits cadmium toxicity through combating against caspase dependent/independent apoptosis in PC12 cells. *Food Chem Toxicol*, 134, 110835. doi:10.1016/j.fct.2019.110835
- Bedell, S. L., Goldstein, L. S., Goldstein, A. R., & Goldstein, A. T. (2020). Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sex Med Rev*, 8(1), 28-37. doi:10.1016/j.sxmr.2019.09.005
- Burmeister, C. A., Khan, S. F., Schafer, G., Mbatani, N., Adams, T., Moodley, J., & Prince, S. (2022). Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Res*, 13, 200238. doi:10.1016/j.tvr.2022.200238

- Celebioglu, H.G.N., Becit Kizilkaya, M., Caglayan, A., & Aydin Dilsiz, S. (2022). Effects of thymoquinone and etoposide combination on cell viability and genotoxicity in human cervical cancer HeLa cells. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 52(3), 258-264. doi: 10.26650/IstanbulPharm.2022.1105443
- Che, Y., Song, B., Song, Y., Sun, J., Zhao, X., Zheng, J., . . . Yang, L. (2025). Thymoquinone enhances efficacy of cervical Cancer therapeutic vaccines via modulating CD8(+) T cells. *Int Immunopharmacol*, 157, 114605. doi:10.1016/j.intimp.2025.114605
- Chehl, N., Chipitsyna, G., Gong, Q., Yeo, C. J., & Arafat, H. A. (2009). Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)*, 11(5), 373-381. doi:10.1111/j.1477-2574.2009.00059.x
- Cid-Perez, T. S., Munguia-Perez, R., Nevarez-Moorillon, G. V., Ochoa-Velasco, C. E., Navarro-Cruz, A. R., & Avila-Sosa, R. (2024). Carvacrol and thymol effect in vapor phase on *Escherichia coli* and *Salmonella* serovar Typhimurium growth inoculated in a fresh salad. *Heliyon*, 10(9), e29638. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29638
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- Ellenson, L. H., & Wu, T. C. (2004). Focus on endometrial and cervical cancer. *Cancer Cell*, 5(6), 533-538. doi:10.1016/j.ccr.2004.05.029
- Ezz-Eldin, Y. M., Aboseif, A. A., & Khalaf, M. M. (2020). Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. *Life Sci*, 242, 117222. doi:10.1016/j.lfs.2019.117222
- Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., & Sun, H. (2015). Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs*, 26(8), 813-823. doi:10.1097/CAD.0000000000000263
- Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed Res Int*, 2014, 154106. doi:10.1155/2014/154106

- Heidarian, E., & Keloushadi, M. (2019). Antiproliferative and Anti-invasion Effects of Carvacrol on PC3 Human Prostate Cancer Cells through Reducing pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 Signaling Proteins. *Int J Prev Med*, 10, 156. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_292_17
- Hsu, H. H., Chen, M. C., Day, C. H., Lin, Y. M., Li, S. Y., Tu, C. C., . . . Huang, C. Y. (2017). Thymoquinone suppresses migration of LoVo human colon cancer cells by reducing prostaglandin E2 induced COX-2 activation. *World J Gastroenterol*, 23(7), 1171-1179. doi:10.3748/wjg.v23.i7.1171
- Ichwan, S. J., Al-Ani, I. M., Bilal, H. G., Suriyah, W. H., Taher, M., & Ikeda, M. A. (2014). Apoptotic activities of thymoquinone, an active ingredient of black seed (*Nigella sativa*), in cervical cancer cell lines. *Chin J Physiol*, 57(5), 249-255. doi:10.4077/CJP.2014.BAB190
- Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., . . . Islam, S. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Sci Nutr*, 10(11), 3544-3561. doi:10.1002/fsn3.2994
- Jain, M., Yadav, D., Jarouliya, U., Chavda, V., Yadav, A. K., Chaurasia, B., & Song, M. (2023). Epidemiology, Molecular Pathogenesis, Immuno-Pathogenesis, Immune Escape Mechanisms and Vaccine Evaluation for HPV-Associated Carcinogenesis. *Pathogens*, 12(12). doi:10.3390/pathogens12121380
- Kaleem, M., Kayali, A., Sheikh, R. A., Kuerban, A., Hassan, M. A., Almalki, N. A. R., . . . Alhosin, M. (2024). In Vitro and In Vivo Preventive Effects of Thymoquinone against Breast Cancer: Role of DNMT1. *Molecules*, 29(2). doi:10.3390/molecules29020434
- Khan, M. A., Tania, M., & Fu, J. (2019). Epigenetic role of thymoquinone: impact on cellular mechanism and cancer therapeutics. *Drug Discov Today*, 24(12), 2315-2322. doi:10.1016/j.drudis.2019.09.007
- Kobayashi, O., Kamata, S., Okuma, Y., Nakajima, T., Ikeda, Y., Saito, K., & Kawana, K. (2024). Carcinogenesis and epidemiology of cervical cancer: The hallmark of human papillomavirus-associated cancer. *J Obstet Gynaecol Res*, 50 Suppl 1, 25-30. doi:10.1111/jog.15997

- Koka, P. S., Mondal, D., Schultz, M., Abdel-Mageed, A. B., & Agrawal, K. C. (2010). Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235(6), 751-760. doi:10.1258/ebm.2010.009369
- Li, F., Rajendran, P., & Sethi, G. (2010). Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *Br J Pharmacol*, 161(3), 541-554. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00874.x
- Li, J., Khan, M. A., Wei, C., Cheng, J., Chen, H., Yang, L., . . . Fu, J. (2017). Thymoquinone Inhibits the Migration and Invasive Characteristics of Cervical Cancer Cells SiHa and CaSki In Vitro by Targeting Epithelial to Mesenchymal Transition Associated Transcription Factors Twist1 and Zeb1. *Molecules*, 22(12). doi:10.3390/molecules22122105
- Lim, W., Ham, J., Bazer, F. W., & Song, G. (2019). Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. *J Cell Physiol*, 234(2), 1803-1815. doi:10.1002/jcp.27054
- Mahmoud, Y. K., & Abdelrazek, H. M. A. (2019). Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomed Pharmacother*, 115, 108783. doi:10.1016/j.biopha.2019.108783
- Majdalawieh, A. F., Fayyad, M. W., & Nasrallah, G. K. (2017). Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(18), 3911-3928. doi:10.1080/10408398.2016.1277971
- Marth, C., Landoni, F., Mahner, S., McCormack, M., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., & Committee, E. G. (2017). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 28(suppl_4), iv72-iv83. doi:10.1093/annonc/mdx220
- Mediouni, S., Jablonski, J. A., Tsuda, S., Barsamian, A., Kessing, C., Richard, A., . . . Valente, S. T. (2020). Oregano Oil and Its Principal Component, Carvacrol, Inhibit HIV-1 Fusion into Target Cells. *J Virol*, 94(15). doi:10.1128/JVI.00147-20

- Mehdi, J. - Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N., (2011). Cytotoxic effect of Carvacrol on human cervical cancer cells. *Biology and Medicine*, 2011(3):308-312. doi:10.4172/0974-8369.10000119
- Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., . . . Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol*, 35 Suppl(0), S78-S103. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.001
- Nagi, M. N., & Almakki, H. A. (2009). Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytother Res*, 23(9), 1295-1298. doi:10.1002/ptr.2766
- Okunade, K. S. (2020). Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol*, 40(5), 602-608. doi:10.1080/01443615.2019.1634030
- Pal, R. R., Rajpal, V., Singh, P., & Saraf, S. A. (2021). Recent Findings on Thymoquinone and Its Applications as a Nanocarrier for the Treatment of Cancer and Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceutics*, 13(6). doi:10.3390/pharmaceutics13060775
- Quintero-Rincon, P., Caballero-Gallardo, K., & Olivero-Verbel, J. (2025). Natural anticancer agents: prospection of medicinal and aromatic plants in modern chemoprevention and chemotherapy. *Nat Prod Bioprospect*, 15(1), 25. doi:10.1007/s13659-025-00511-0
- Sakalar, C., Yuruk, M., Kaya, T., Aytekin, M., Kuk, S., & Canatan, H. (2013). Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF-NF-kappa-B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Mol Cell Biochem*, 383(1-2), 243-251. doi:10.1007/s11010-013-1772-x
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., . . . Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*, 32(9), 1675-1687. doi:10.1002/ptr.6103
- Shoieb, A. M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L., & Tithof, P. K. (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*, 22(1), 107-113.

- Small, W., Jr., Bacon, M. A., Bajaj, A., Chuang, L. T., Fisher, B. J., Harkenrider, M. M., . . . Gaffney, D. K. (2017). Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*, 123(13), 2404-2412. doi:10.1002/cncr.30667
- Sun, S. Y., Hail, N., Jr., & Lotan, R. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst*, 96(9), 662-672. doi:10.1093/jnci/djh123
- Unsal, V., & Belge-Kurutas, E. (2017). Experimental Hepatic Carcinogenesis: Oxidative Stress and Natural Antioxidants. *Open Access Maced J Med Sci*, 5(5), 686-691. doi:10.3889/oamjms.2017.101
- Volkova, L. V., Pashov, A. I., & Omelchuk, N. N. (2021). Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers. *Int J Mol Sci*, 22(22). doi:10.3390/ijms222212571
- Woo, C. C., Hsu, A., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. (2013). Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS. *PLoS One*, 8(10), e75356. doi:10.1371/journal.pone.0075356
- Zubair, H., Khan, H. Y., Sohail, A., Azim, S., Ullah, M. F., Ahmad, A., . . . Hadi, S. M. (2013). Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death Dis*, 4(6), e660. doi:10.1038/cddis.2013.172

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Melis BULUT TUNÇAY

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

2010, İnebey Anadolu Lisesi. Alanya.

2014, İstanbul Okan Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü. Lisans, İstanbul.

2016, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik ABD. Stajyer araştırmacı. Antalya.

2018, ABDİİBRAHİM İlaç, Esenyurt Üretim Kompleksi. Stajyer mühendis. İstanbul.

2021, Antalya Medicalpark Hastanesi Hematoloji Bölümü, Kök Hücre ve Kemik İliği Nakil Koordinatörlüğü. Koordinatör yardımcılığı. Antalya.

2021, Akdeniz Üniversitesi, Gen ve Hücre Tedavisi ABD. Stajyer araştırmacı. Antalya.

2021, Alaaddin Keykubat Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Yüksek Lisans. Alanya.