

**BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN
MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN
IN VITRO ARAŞTIRILMASI**

Banu Barutca
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2006

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Banu Barutca'nın "Bazı Bitki Ekstrelerinin Memeli Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Aktivitelerinin *In Vitro* Araştırılması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 17.07.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard.Doç.Dr. MELİH ZEYTİNOĞLU	
Üye	: Yard.Doç.Dr. BERRİN TÜYLÜ	
Üye	: Yard.Doç.Dr. MEDİHA CANBEK	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN *IN VITRO* ARAŞTIRILMASI

Banu BARUTCA

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman:Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU
Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL
2006, 87 sayfa**

Günümüzde çeşitli bitkilerden ekstrakte edilen esansiyel yağlar ve bu yağlardan izole edilen terpenoid bileşikler ilaç, gıda ve kozmetik sanayinde sıkça kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, bazı bitkilere ait esansiyel yağ ve monoterpenlerin A549, V79 379A ve CHO hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT, Neutral Red Up Take ve koloni formasyonu yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 1,8 sineolun uygulanan konsantrasyonlarda düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu, timol, karvakrol ve mentolun doza ve zamana bağlı sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan diğer test maddeleri olan *Laurus nobilis* (defne), *Salvia fruticosa* (adaçayı), *Pimpinella anisum* (anason) ve *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağlarının doza bağımlı sitotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır. Monoterpenler ve esansiyel yağlar ile ilgili bulguların yapılacak antineoplastik tedaviler ve *in vivo* araştırmalar için ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Esansiyel yağlar, monoterpenler, koloni formasyonu, MTT, Neutral Red (NR)

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATING THE CYTOTOXIC ACTIVITIES OF SOME PLANT
EXTRACTS ON MAMALIAN CELL CULTURES *IN VITRO*****Banu BARUTCA****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU
Assist. Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL
2006, 87 pages**

Nowadays essential oils and isolated from its terpenoid compounds of extracted from various plants have different biological activities. In this case, they are used in drug, food and cosmetics industries. In this study, cytotoxic activity of some essential oils and monoterpenes obtained from some plants investigated with MTT, Neutral Red Uptake and colony formation assays on A549, V79 378A and CHO cell lines. It's found that 1,8 cineole has low cytotoxic effect at treated concentrations. Thymol, carvacrol and menthol demonstrated that time and concentration based cytotoxic effect. It was resulted that other test compounds *Laurus nobilis* (bay-leaf), *Salvia fruticosa* (sage), *Pimpinella anisum* (anise) and *Origanum onites* (thyme) essential oils have concentration based cytotoxic effect. It is thought that the results about of monoterpens and essential oils would lead for the future investigations about using antineoplastic therapy and *in vivo*.

Keywords: Essential oils, Monoterpenes, Colony formation, MTT, Neutral Red
(NR)

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman yanında bulunan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocalarım Sayın Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'na ve Sayın Yard. Doç. Dr. A.Tansu KOPARAL'a

Tezim sırasında karşılaştığım sorunlara pratik çözümler üreten ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Seval KORKMAZ'a,

Tezimde kullandığım kimyasal maddeleri sağlayan Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e ve Yard. Doç. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na,

Sevgi, ilgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Banu BARUTCA

Ağustos 2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Doku Kültürü.....	3
1.2. Sitotoksosite.....	5
1.3. Kanser.....	7
1.3.1. Kanserli hücrelerin özellikleri.....	8
1.3.2. Kanserli dokunun büyüme profili.....	10
1.3.3. Kanser tedavisi.....	11
1.3.3.1. Cerrahi.....	11
1.3.3.2. Radyoterapi.....	11
1.3.3.3. Kemoterapi.....	11
1.4. Tezde Kullanılan Hücreler, Test Maddeleri ve Yöntemler.....	13
1.4.1. Çalışmalarda kullanılan hücrelerin özellikleri.....	13
1.4.1.1. A549 hücreleri.....	13
1.4.1.2. V79 379A hücreleri.....	13
1.4.1.3. CHO hücreleri.....	14
1.4.2. Çalışmalarda kullanılan test maddeleri.....	14
1.4.2.1. Esansiyel yağlar ve monoterpenler.....	14
1.4.2.1.1. Timol ve Karvakrol.....	15
1.4.2.1.2. L-Mentol.....	17
1.4.2.1.3. 1,8 Sineol.....	17
1.4.2.1.4. <i>Salvia fruticosa</i> (Adaçayı) yağı.....	18

1.4.2.1.5. <i>Laurus nobilis</i> (Defne) yağı.....	18
1.4.2.1.6. <i>Pimpinella anisum</i> (Anason) yağı.....	19
1.4.2.1.7. <i>Origanum onites</i> (Kekik) yağı.....	19
1.4.3. Çalışmalarda kullanılan yöntemler hakkında bilgiler.....	20
1.4.3.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi.....	20
1.4.3.2. Lizozomal aktiviteye dayanan Neutral Red Up-Take (NR) ölçümü.....	21
1.4.3.3. Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin ölçülmesine dayalı yumuşak agar koloni formasyonu.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Kullanılan Bitki Ekstreleri.....	23
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	23
2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	24
2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler.....	24
2.5.1. A549 hücre kültürü.....	24
2.5.2. V79 379A hücre kültürü.....	24
2.5.3. CHO hücre kültürü.....	24
2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	25
2.6.1. Monoterpenlerin ve esansiyel yağların dozlarının hazırlanması.....	25
2.6.1.1. Timol dozlarının hazırlanması.....	25
2.6.1.2. Karvakrol dozlarının hazırlanması.....	25
2.6.1.3. L-Mentol dozlarının hazırlanması.....	25
2.6.1.4. 1,8 Sineol dozlarının hazırlanması.....	25
2.6.1.5. <i>Salvia fruticosa</i> (Adaçayı) dozlarının hazırlanması.....	26
2.6.1.6. <i>Pimpinella anisum</i> (Anason) dozlarının hazırlanması.....	26
2.6.1.7. <i>Laurus nobilis</i> (Defne) dozlarının hazırlanması.....	26
2.6.1.5. <i>Origanum onites</i> (Kekik) dozlarının hazırlanması.....	27
2.7. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması.....	27
2.8. Yöntem.....	27
2.8.1. Hücre kültürü.....	27

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	27
2.8.3. MTT ölçümü.....	28
2.8.4. Neutral Red Up-Take sitotoksosite ölçümü.....	29
2.8.5. Yumuşak agar koloni formasyonu.....	29
2.9. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	30
3. BULGULAR.....	31
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKLAR.....	49
Ek: Deney Sonuçları.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

1. Timol'un A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	60
2. Timol'un V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	60
3. Timol'un CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	61
4. Timol'un A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	61
5. Timol'un V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	62
6. Timol'un CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği	62
7. Timol'un koloni formasyon sonuçları.....	63
8. Karvakrol'un A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	63
9. Karvakrol'un V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	64
10. Karvakrol'un CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	64
11. Karvakrol'un A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	65
12. Karvakrol'un V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	65
13. Karvakrol'un CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	66
14. Karvakrol'un koloni formasyon sonuçları	66
15. L-Mentol'ün A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	67
16. L-Mentol'ün V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	67
17. L-Mentol'ün CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	68
18. L-Mentol'ün A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	68
19. L-Mentol'ün V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	69
20. L-Mentol'ün CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	69
21. L-Mentol'ün koloni formasyon sonuçları	70
22. 1,8 Sineol'ün A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	70
23. 1,8 Sineol'ün V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	71
24. 1,8 Sineol'ün CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	71
25. 1,8 Sineol'ün A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	72
26. 1,8 Sineol'ün V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	72
27. 1,8 Sineol'ün CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği.....	73
28. 1,8 Sineol'ün koloni formasyon sonuçları	73
29. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği.....	74

30. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	74
31. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	75
32. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	75
33. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	76
34. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği	76
35. <i>Salvia fruticosa</i> 'nın (adaçayı) koloni formasyon sonuçları	77
36. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	77
37. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) V79 379A hücrelerinde MTT grafiği	78
38. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	78
39. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	79
40. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	79
41. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği	80
42. <i>Pimpinella anisum</i> 'un (anason) koloni formasyon sonuçları	80
43. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	81
44. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	81
45. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	82
46. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	82
47. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	83
48. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği	83
49. <i>Laurus nobilis</i> 'in (defne) koloni formasyon sonuçları	84
50. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) A549 hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	84
51. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) V79 379A hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	85
52. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) CHO hücrelerinde MTT sonuçları grafiği	85
53. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) A549 hücrelerinde NR sonuçları grafiği	86
54. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) V79 379A hücrelerinde NR sonuçları grafiği	86
55. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) CHO hücrelerinde NR sonuçları grafiği	87
56. <i>Origanum onites</i> 'in (kekik) koloni formasyon sonuçları grafiği	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
IC ₅₀	: Hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
NR	: Neutral red
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1. GİRİŞ

Besin alınımı, yaşam için gerekli çeşitli biyoaktif molekülleri karşılayarak, metabolizmayı ve sağlığı düzenler. Çağlar boyunca ilaçlar beslenme yetersizliğine karşı mücadelede kullanılmıştır. Yetersiz fito-antioksidantların alımı 1980'lerde vitamin eksikliği gibi hastalıklara neden olurken, günümüzde, batı diyetlerinde aşırı miktarda doymuş yağlarla birlikte yetersiz fito-antioksidantların alımı kanser ve kardiyovasküler hastalıklara yol açmaktadır. Kanser gibi hastalıklar tek bir tümör ajanıyla tedavi edilemezler çünkü kanserler çok aşamalı süreçlerde ilerler ve bireyin genetik ve epigenetik özelliklerine göre çeşitlenirler. Bitkilerde, sebzelerde ve köklerde bulunan doğal bileşiklerin sağlık üzerindeki yararlı etkileri insanlarda çok eski zamanlardan beri geleneksel olarak bilinmektedir. Batılı ülkeler modern gıda ve ilaç üretiminden dolayı geleneksel ilaç kullanımını terk ederken, Çin ve Japon geleneksel ilaçları bu bilgiyle yüzyıllar boyunca gelişmiş ve bu konuda tecrübe kazanılmış ve kanser tedavilerinde bize ön verileri sağlayan epidemiyolojik gözlemler toplanmıştır (Signorelli ve Ghidoni 2005).

Kanser yakın, hatta uzaktaki dokulara nüfus edebilen neoplazma haldeki hücrelerin anormal büyümeleri ile karakterize edilen sonuç olarak ölüme bile sebep olabilen bir seri malignant hastalık olarak ele alınabilir (Mathur ve ark. 2006). Son zamanlarda kanserin etiyolojisi, patogenezi ve tedavisindeki umut verici gelişmelere rağmen kanser, halen tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli mortalite (ölüm) nedenidir. Kanser, ülkemizde de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Birçok kanser türü yaşla birlikte artış göstermektedir. Gittikçe yaşlanan dünya nüfusu gelecekte kanserlerin daha önemli morbidite (hastalık) nedeni olabileceğini düşündürmektedir. Gelişen tanı yöntemleri ve ortalama yaşam süresinin uzaması, yeni tespit edilen kanser olguları sayısında artışla sonuçlanmakta, buna bozulan ekolojik denge de katkıda bulunmaktadır (Yalçın ve ark. 2003). Tedavi edici potansiyel etkileri ve halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitki türevleri ve bileşikleri son zamanlarda kanser tedavisi için yeni ilaç araştırmalarının birçoğuna konu olmuştur (Shi ve ark. 2006). Deneysel çalışmalar da monoterpenlerin antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu

gösterilmiştir. Bu nedenle monoterpenler, kanser tedavisinde ümit vermektedirler (Loza-Tavera 1999).

Hayvan hücre kültürleri, kanser araştırmalarında hücre farklılaşma olaylarının incelenmesi, onkojenik maddelerin ve onkojenlerin etkilerinin analizleri, hücre hareketleri olaylarının incelenmesinde büyük önem taşımaktadır (Kılıç 2002).

Hücre kültürü, hücrelerin organizma dışında, plastik petrilere ya da plakalarda kontrollü şartlarda (CO₂ basıncı, nem, sıcaklık) büyüme faktörleri ve metabolik substratlar içeren besiyerlerinde geliştirilmesidir.

Hücre kültürü yöntemleri ile

- ❖ Bir bileşiğin, hücreler üzerindeki etkisi doğrudan doğruya gözlenebilir.
- ❖ Bir bileşiğin ya da bir kimyasal maddenin etkileri her cins doku veya hücrelerde ayrı ayrı araştırılabilir.
- ❖ Organizmadaki karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmalar *in vitro* da yapılabilir.

Hücre kültürü yönteminde etkiler doğrudan doğruya olduğundan sonuç kısa sürede alınabilir, istatistik olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilir, çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesi önlenir.

Hücre kültürü yöntemleri hayvan modellerinin kullanıldığı testlere göre bu avantajları taşıdığı için dünyada yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu sebepten dolayı hücre kültürü kanser araştırmaları (*in vitro* toksikoloji), sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyoloji çalışmalarında, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku ve deri mühendisliği, kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde, farmasötik proteinlerin üretiminde, kozmetikte sık sık kullanılmaktadır (Gad 2000; Putnam 2002).

Basal sitotoksosite bir kimyasalın tüm ökaryotik hücre tipleri üzerindeki toksik etkisinin genel yapısı ve temel hücresel özelliklerinin tarifinde kullanılmaktadır. Basal sitotoksosite *in vivo* ortamındaki hedef organ toksisitesiyle benzerlik göstermektedir. Düşük konsantrasyonlardaki bir toksik kimyasalın *in vitro* ortamdaki hücreler üzerindeki sitotoksitesi *in vivo* ortamdaki çeşitli hedef organların toksisitesiyle karşılaştırılıp aralarında ilişki kurulabilir. Bu yüzden *in*

vitro sitotoksosite deneyleri hayvan letalitesini belirlemek için yapılan toksisite çalışmalarında da yararlı metotlar olarak kullanılabilir. Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için de çoğunlukla kullanılmaktadır (Anonim).

In vitro sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre poliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad 2000). Sitotoksosite deneyleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Neutral Red (NR) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell 2005; Fent 2001). Kanseri çalışmaları amaçlanan, tümör oluşumunun önüne geçilmesi ve yayılmasını önlemektir. Çeşitli *in vitro* yöntemler tümör gelişimini önlemeyi amaçlamaktadır. Yumuşak agar koloni formasyonu testi birkaç hafta içinde tamamlanarak sonuca ulaşılabilirliği sağlayan pratik bir testtir. Bu nedenle birçok antineoplastik ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Begg ve ark 2002).

Kemoterapinin kanser tedavisinde önemli bir yaklaşım olduğunu düşünerek çalışmamızda anti-tümör ve antioksidan etkiye sahip olduğunu düşündüğümüz ya da deneysel çalışmalarda kanıtlanmış bileşenlerin (timol, 1,8 sineol, karvakrol, L-mentol) ve esansiyel yağların (defne yağı, anason yağı, kekik yağı, adaçayı yağı) normal sağlıklı hücrelerde (V79 379A ve CHO) ve kanserli insan akciğer hücresinde (A549), sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

1.1 Doku Kültürü

Doku kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besi ortamlarında bir süre yaşatılmalarıdır. Doku kültürü yöntemi hücre biyolojisinde sıkça kullanılan yaygın bir yöntem olup özellikle kanser araştırmalarında kanser hücrelerinin biyolojisinin öğrenilmesinde kullanılan yararlı bir model oluşturmaktadır (Ozban 1988).

Hücre kültürü yöntemi kullanılarak, endositozisinde içinde bulunduğu birçok farklı hücresel aktivite, hücre hareketi, hücre bölünmesi, membran transportu, hücrelerin ilaçlara maruz kaldığında verdiği etki, hücrelerin hormonlara, büyüme faktörlerine, ve diğer aktif maddelere verdiği cevap belirlenebilir (Karp 1999).

Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamakta ve kökeni 1885 yılına kadar dayanmaktadır. 1852’de Wilhelm Roux embriyonik tavuk hücrelerinin birkaç gün boyunca vücut dışında bir tuz çözeltisinde canlılıklarını sürdürebildiğini, daha sonra 1898 yılında Ljunggren insan dokusunun kullanıldığı ilk deneyi yaparak, insan derisininin *in vitro* ortamda asidik sıvıda canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1913’te Alexis Carol hücrelerin düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında çoğalabildiklerini belirlemiştir. Wilton Earle ve arkadaşları 1943’te L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını; 1951’de George Gay ilk sürekli (continuous) insan hücre serisini, HeLa serisini geliştirmişlerdir ki bugün bile hala bu hücre serisi yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950’li ve 1960’lı yıllarda Eagle, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White ve Waymounth adlı araştırmacıların da içinde bulunduğu birçok bilim adamı kültürde bulunan hücrelerin gelişmeleri için gerekli olan besin maddelerini belirlemişlerdir (Langdon 2004).

Hücre ve doku kültürü teknikleri, hücre davranışının analizine izin vermektedir. Bunun için hücre ve dokular, büyüme faktörleri, hormonlar ve serum içeriklerinin ilave edildiği, kimyasal olarak belirlenmiş sentetik bir ortamda üretilirler. Bu yapay ortam canlı ortamına benzerdir. Hücreler ya bir süspansiyon içinde veya kültür plağı üzerine yayılarak gelişir ve böylece tek hücre tabakası meydana getirilir (Franks ve Teich 1996).

Hücre kültürü normal ve kanserli hücrelerin metabolizmalarının çalışmasının araştırılmasında kullanılır. Ayrıca bu teknik, sadece hücrede üreyen ve büyüyen parazitlerin; virüsler, mikoplazma ve bazı protozonlar gibi, canlılarla da çalışılmasına olanak sağlamaktadır (Junqueira ve ark. 1992). Hücre kültürü, ilaçların etkilerinin ve hücrelerin birbirleri ile olan ilişkilerinin araştırılmasında da kullanılabilir (Franks ve Teich 1996).

Doku kültürü 3'e ayrılır (Freshney 1994)

- 1.Öncül hücreler (primer kültür): Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan *in vitro* ortama tutunan ilk hücrelerdir.
2. Sekonder kültür: Öncül kültürlerden elde edilen hücrelerin yeni bir ortama aktarılması ile elde edilen hücrelerin oluşturduğu kültürdür.
3. Sürekli kültür hücresi: Normal (malignant olmayan) hücreler ölene kadar hücre tipine bağlı olarak ancak 50 ile 100 defa bölünebilirler. Bu sebepten dolayı doku kültürü çalışmalarında genellikle hücrelerin sürekli bölünebilmesi için genetik olarak değiştirilmiş birçok sürekli kültür hücresi (cell line) kullanılmaktadır (Karp 1999). Bu sürekli kültür hücrelerinin laboratuvarlarda pasajlar halinde kültürleri yapılabilmektedir. Bu hücrelerin kromozomlarında normal hücrelerden farklılıklar oluşmuş ve sayıları değişmiştir. Bu hücrelere HeLa, KB3, KB gibileri örnek verilebilir (Unat 1997).

1.2. Sitotoksisite

Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Böylece birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksisite deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalmasını belirler (Weyermann ve ark. 2005).

Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için de kullanılmaktadır. Ne tüm antineoplastikler sitotoksiktir, ne de tüm sitotoksik bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Anonim).

Sitotoksisite kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksisitenin karsinogenesis ve inflasyonunda içinde bulunduğu patolojik proseslerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sitotoksisite serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir

(Putnam, ve ark. 2002). Ayrıca sitotoksik deneylerle balık hücre hatlarını kullanarak farklı ağır metallerin ve organik bileşiklerin de içinde bulunduğu birçok çevresel kimyasalın sitotoksik etkisi de belirlenebilir (Fent 2001).

Sitotoksitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirmesidir. *In vitro* testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir (Putnam ve ark. 2002). *In vitro* sitotoksikite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesinde belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksikite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler neutral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücre metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testi (hücre lizisini belirlemek için) dir (Gad 2000).

Kimyasalların sitotoksikitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli farklı noktalarla belirlenebilir. Bir bileşiğin sitotoksik etkisi test edilirken hücrelerin genel mekanizması ve hücre tiplerine özgü mekanizmalar göz önünde tutulmalıdır (Putnam ve ark. 2002). Hücre canlılığının belirlenmesi mutagenesiz, malignant transformasyon, apoptosis, hücre patoloji ve farmosötik toksisiteyi değerlendirmede oldukça önemlidir. Çünkü sadece canlı hücrelerin değişimiyle oluşur. Ölen hücrelerdeki sinyaller ve diğer değişimler karsinogenez araştırmalarında önemli değildir (Komissarova ve ark. 2005).

Sitotoksikite deneyleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Neutral Red (NR) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksikite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fotakis ve Timbrell 2005; Fent 2001). Neutral Red deneyi boyanın yaşayan hücrelerin lizozomlarında

birikmesi temeline dayanır (Borenfreund ve Puerner 1985). MTT deneyi ise mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi temeline dayanmaktadır (Fent 2001).

1.3. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastas yapması ile kendini gösteren öldürücü bir hastalıktır. Epidemik boyutta ortaya çıkması ve gerek hastanın, gerekse yakın çevresinin morali ve davranışı üzerinde olumsuz yansımalar yapması nedeniyle çağımızın en önemli ve dramatik mediko sosyal sorunlarından biridir. Çoğalan hücrelerin kaynağına, tipine ve oluştuğu organa göre kanserin çok çeşitli tipleri vardır. Gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sıradaki ölüm nedenidir. Türkiye’de yıllık kanser insidensi Sağlık Bakanlığınca yüz binde yaklaşık 150 olarak tahmin edilmiş ve her yıl yaklaşık 90.000-100.000 civarında yeni kanser olgusu görüleceği bildirilmiştir (Kayaalp 2003).

Kanser, bir seri genetik hasarın birikimi ile çevresel etmenlerin bağımsız ya da işbirliği sonucu meydana gelmektedir. Genetik hasar olarak adlandırılan mutasyonların bazıları, hücre çoğalmasının kontrolünü etkilerken, diğer mutasyonlar tümör hücrelerini bulundukları yerden uzak mesafelere taşınmalarını ve gelişebilmeleri için gerekli işlemleri uyarmaktadırlar (Klug ve Cummings 2000).

Mutasyon olasılığı, bireylerin belirli kimyasal, fiziksel ya da biyolojik faktörlere maruz kaldıkları zaman artabilir. Mutasyona neden olan faktörler 5’e ayrılır.

1. X ışınları, gama ışınları, radyoaktif maddeler ve ultraviyole ışınları gibi iyonize edici radyasyonlar kansere neden olabilirler. Bu radyasyonların etkisi altında doku hücrelerinde oluşan iyonlar yüksek düzeyde reaktiftir; DNA zincirlerini kırarak birçok mutasyona neden olurlar.

2. Bazı kimyasal maddelerin mutasyona neden olma olasılıkları fazladır. Uzun zamandır anilin boya türevlerinin büyük olasılıkla kansere neden oldukları, bu maddeleri elde etmek için kimya fabrikalarında çalışan işçilerin korunmadıkları takdirde kansere özel bir yatkınlık gösterdikleri bilinmektedir.

Mutasyon meydana getirerek kansere neden olan kimyasal maddelere karsinojen adı verilmektedir. Günümüzde en çok ölüme neden olan karsinojenler, sigara dumanında bulunmaktadır. Bu karsinojenler kanser ölümlerinin dörtte birinin nedenini oluşturur.

3. Fiziksel irritantlar da sindirim sisteminin bazı yiyecek çeşitleriyle sürekli hasar oluşturmasıyla kansere yol açabilir. Bu da dokuların hasar görmesine ve tamir edici hücrelerde hızlı mitotik çoğalmaya neden olmaktadır. Mitoz hızlandıkça mutasyon şansı da artar.

4. Birçok kişi kansere kalıtsal yatkınlık duyar. Kansere yatkınlığa kişinin taşıdığı genomlarda bulunan bir ya da daha çok mutant gen neden olur. Bu nedenle böyle kişilerde kanserin gelişmesi için çok daha az sayıda ek mutasyon yeterlidir.

5. Deney hayvanlarında belirli virüs çeşitleri kanserlere neden olmaktadır (Guyton 1986).

Kanserler temel yapılarına göre karsinom (karsinoma) ve sarkom (sarkoma) olarak ikiye ayrılabilir. Karsinomlar vücudu kaplayan deri ile meme, solunum ve sindirim yolları, iç salgı bezleri, üreme organları ve boşaltım sisteminin iç yüzünü döşeyen epitelyum dokudan; sarkomlar bağ doku, yağ dokusu, kan damarları, kemik ve kıkırdak gibi dokulardan türerler (Raven ve Johnson 1992).

1.3.1. Kanser hücrelerinin özellikleri

İnsan kanser hücrelerinin davranışları hakkında elde edilen bilgilerin çoğu, *in vitro* ortamda geliştirilen hücrelerle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Karp 1999).

Kanser hücresiyle normal hücre arasında iki büyük fark bulunur:

- 1) Kanser hücresi hücre büyümesinin normal sınırlarına saygı göstermez, bunun nedeni normal hücrelerin büyümesi için gerekli büyüme faktörlerinin bu hücrelere gerekmemesidir.

- 2) Kanser hücreleri birbirlerine normal hücrelerden çok daha az tutunur. Bu nedenle kolaylıkla dokularda dolaşarak kan dolaşımına girip, bütün vücuda taşınarak çok sayıda yeni kanser odakları yaratırlar (Guyton 1986).

Normal hücreler hücre çoğalmasının desteklendiği doku kültüründe geliştiğinde malignant olanlarınkine benzer şekilde gelişerek bölünürler. Bununla birlikte, normal hücreler bulundukları kültür ortamının tabanını kaplayana kadar çoğalırlar, daha sonra gelişme hızları belirgin biçimde azalır ve bu hücreler tek tabakalı (monolayer) olarak kalmaya yatkındırlar. Büyüme oranları hücrelerin çevreden aldıkları büyümeyi engelleyici etkilere bağlı olarak azalır. Bunun aksine, malignant hücreler aynı şartlarda kültür edildiklerinde büyümeye devam ederek birbiri üzerinde yığınlar oluştururlar. Malignant hücreler, normal hücrelerin büyüme ve bölünmesinin kesilmesini sağlayan düzenleyici sinyal tiplerine cevap vermezler. Bu kontrolsüz büyüme ölümcül tehdit yaratmaktadır (Karp 1999). Normal hücrelerin büyümesi için gerekli büyüme faktörlerine kanser hücrelerinin ihtiyacı olmadığı için kanser hücreleri sonsuz olarak çoğalarak sayıları günden güne kat kat artar. Böylece vücut için gerekli bütün besinleri kullanırlar. Sonuçta normal doku hücreleri yetersiz besinden yavaş yavaş ölmektedirler (Guyton 1986).

Kanser hücreleri normal hücrelerden mikroskop yoluyla ayırt edilebilirler. Bir spesifik dokuda kanser hücreleri hızlı büyümeleriyle karakterize edilebilirler. Çekirdekleri sitoplazmalarına oranla büyüktür (Darnell 1986).

Normal hücrelerle kanserli hücreler arasında biyokimyasal ve yapısal birçok farklılık bulunmaktadır. Bir kanser hücresinin sitoplazmasında meydana gelen en belirgin morfolojik değişiklik hücre iskeletinde meydana gelir. Normal bir hücre, genellikle iyi organize olmuş mikrotübüller, mikroflamentler ve intermediate flamentleri içerir, kanser hücrelerinin hücre iskeleti azalmıştır ve/veya organizasyonu bozulmuştur (Karp 1999).

Kanserleşen hücre, dokuya özgü olan yapısal özelliğini ve morfolojik yapısını kaybetmiştir. Hücrelerinin sitoplazmaları normal hücrelere göre daha küçüktür bu nedenle mikroskopla ayırt edilebilirler (Dilsiz 2004).

Hücre yüzeyinde özel komponentlerin azalmasını ya da artmasını kapsayan çok sayıda değişiklik te gözlenebilir. Bazı kanser hücreleri, tümör-

associated antigenler olarak adlandırılan yeni hücre yüzey proteinlerine sahiptirler. Çünkü kanser hücreleri, hücreye karşı yönelen antibodilerin oluşumunu indükleyebilirler. Hücre yüzeyindeki değişiklikler yüzünden, kanser hücreleri tipik olarak diğer hücrelere ve hücreyel olmayan yüzeylere daha az bağlanma özelliğindedirler. Kanser hücreleri, hücre yüzeyine daha az bağlandıkları için tümör kitlesinden ayrılıp vücudun diğer bölgelerine göç edebilirler. Tümör hücreleri arasındaki bu azalmış bağlanma ilişkileri, birbirleriyle olan gap junction oluşturma eğilimlerinin azalmasına neden olmaktadır (Karp 1999).

En önemli özellik, kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücre bölünmesi için sonlu mitotik bölünmelerden sonra sınırlı bir kapasite gösterirler, bölünme ve büyüme için uygun olmadıkları için yaşlanmaya girerler (Karp 1999). Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda çoğalırlar. Hücre farklılaşırken, çoğu normal hücrede kromozom uçları olan telomerler gittikçe kısalırken, kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomerez enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler farklılaşırken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Oysa birçok kanser tipinde telomerez etkinliğini sürdürmektedir. Sonuçta telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır.

Kanser hücreleri anormal ve sabit olmayan kromozom sayılarına sahiptirler (Darnell 1986). Kanserleşen dokuda, bölünen hücrelerde normal farklılaşma gerçekleşmez. Kanser hücrelerinin metabolizmaları değişmiştir. Genellikle şeker alınımlı ve anaerobik solunum oranı artmıştır. Kanserleşen hücrelerin enzimleri miktar ve fonksiyon bakımında farklılıklar gösterir (Dilsiz 2004).

1.3.2. Kanserli dokunun büyüme profili

Solid tümörlerin birçoğunda (akciğer, mide ve uterus gibi) büyüme hızı tümör büyüdükçe azalır. Bir solid tümörün hücreleri 3 tabaka oluşturur: A tabakası bölünen hücreleri içerir, muhtemelen sürekli olarak hücre siklusundadırlar; B tabakası istirahat haldeki hücreleri (Go), yani bölünmeyen fakat potansiyel bölünme özelliği olan hücreleri içerir. C tabakası ise artık bölünmeyen ama tümör hacmine katkıda bulunan hücreleri içerir. Esas olarak bazı

solid tümörlerin %5'ini oluşturan A tabakasındaki hücreler halen mevcut olan ilaçlara duyarlıdır. C tabakasında bulunan hücreler ise bir sorun yaratmazken B tabakasında bulunan hücreler kanserin ilaçla tedavisini zorlaştırır. Çünkü bu hücreler sitotoksik ilaçlara duyarlı değildir, fakat bir kemoterapi uygulanması sonrasında A tabakasına geçme eğilimi gösterirler (Bökesoy ve ark. 2000).

1.3.3. Kanser tedavisi

1.3.3.1. Cerrahi

Kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan en eski yöntemdir. Amaç, tümörlü doku veya organın ameliyat ile sağlam bölgeden çıkarılmasıdır. Cerrahi operasyonun başarılı olabilmesi, tümörün belli bir bölgede lokal olmasına bağlıdır. Tümör diğer doku ve organlara yayılmış ise bu durumda cerrahi tedavinin yanında radyoterapi, kemoterapi gibi tedavi yöntemlerinin de kullanılması gerekebilir (Dilsiz 2004).

1.3.3.2. Radyoterapi

Bu tedavi yönteminde atomik veya subatomik partiküller ve radyasyon uygulanır. Sağlam dokuyu etkilemeden tümörlü bölgenin tahrip edilmesi amaçlanır. Bu tedavi kanser hastalarında tümörün yayılmasını önlemek ve tümöral kitlenin küçültülmesinde kullanılabilir (Dilsiz 2004).

1.3.3.3. Kemoterapi

Kemoterapi 19'uncu yüzyılın sonunda Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmış bir deyimdir. Vücudu istila eden mikroorganizmaları veya parazitleri konakçıya zarar vermeksizin öldürebilen ilaçlarla yapılan tedavi şeklidir. Vücuda giren ve hastalık etkeni olan organizmalar çok çeşitli oldukları için kemoterapide kullanılan ilaçlar da yapıcı o oranda çeşitlilik gösterirler. Vücut için malinyite göstermesi, çabuk çoğalması ve normal vücut hücresinden kısmen farklı

biyokimyasal özelliklere sahip olması bakımından neoplastik hücreler de bakteri ve diğer patojen mikroorganizmalara benzetilebilirler. Bu nedenle farmakolojide, kanser ve diğer neoplazmaların kemoterapisinden de söz edilir.

Bakteri ve protozoon enfeksiyonlarında kemoterapinin başarılı sonuçlar vermesi, memeli hücrelerinin kontrolsüz, aşırı ve istilacı bir şekilde patolojik çoğalmasına bağlı olan maliny neoplazmaların da kimyasal etkenler tarafından iyi edilebileceği olasılığını düşündürmüştür. Bu noktadan hareketle neoplastik ilaçlar konusunda geniş kapsamlı araştırmalar yapılmış ve birçok sentetik veya doğal kaynaklı ilaç tedavi sürecine sokulmuştur. Gerek antimikrobik, gerekse antineoplastik kemoterapinin ana ilkesi: hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeksizin mikrop veya tümör hücresinin büyümesini veya çoğalmasını durdurmak ve mümkünse onları yok etmektir (Kayaalp 2000).

Kemoterapik ilaçların ideal olarak sadece neoplastik hücreleri spesifik olarak hedef alması ve normal hücrelere en az kollateral hasar vererek tümör hücrelerinde sitotoksik ve/veya sitostatik etkileri indükleyerek tümör yükünü azaltması gerekir (Kosmider ve ark. 2004). Kanser kemoterapisinin bakteriyel hastalıkların kemoterapisiyle karşılaştırıldığında başarılı olması daha güçtür. Mikroorganizmaların normal insan hücrelerinden belirgin nitel ve nicel farklılıklarından dolayı birçok mikroorganizma için selektif ilaç bulmak mümkündür. Buna karşın bugün için normal memeli hücreleri ve kanser hücreleri arasındaki farklılıkları ortaya koymak son derece güçtür (Bökesoy ve ark. 2000).

Kanser tedavisinde üç temel yaklaşım vardır. Bunlar; cerrahi, radyasyon ve kemoterapidir. Bu tedavi yöntemlerinin her birinin indikasyonu tümör tipine ve gelişim evresine göre değişir. Sitotoksik ilaçlarla yapılan kemoterapi az sayıdaki kanser türü için ilk tercih edilen bir yöntemdir (Bökesoy ve ark. 2000). Kanser kemoterapisi, daha çok yaygın tümörlere karşı ameliyat ve radyoterapinin yanında uygulanan üçüncü tedavi metodudur. Kanser kemoterapisi tümör hücrelerinin büyüme oranları ve poliferasyonlarıyla ilişkin dinamik prosesler için kullanılır. Bunun yanında ilacın toksisite ve etki mekanizmasını da belirlenebilmektedir (Arıcan ve ark. 2005).

1.4. Tezde Kullanılan Hücreler, Test Maddeleri ve Uygulanan Yöntemler

1.4.1. Çalışmalarda kullanılan hücrelerin özellikleri

1.4.1.1. A549 hücreleri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın günümüzde görülme sıklığı artan, önemli bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark. 2004). Akciğer kanserinin %80'i ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserleridir (Chang ve ark. 2004). A549 kanser hücreleri tip 2 alveolar epitel özellikteki bir adenokarsinom insan akciğer cell line'ıdır (Kreja ve Seidel 2002). A549 cell line'ı 1972 yılında D.J: Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir Caucasian erkekten alınan akciğer tümöründen üretilmiştir ve 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M:Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stok edilmiştir. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonrada birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır. A549 hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Tokyo, Japonya) dan satın alınmıştır (Koparal, 2002).

1.4.1.2. V79 379A hücreleri

Chinese Hamster Akciğer fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler sitotoksisite, toksisite ve mutajenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melo ve ark. 2001; Corr  a ve ark. 2005). Ayrıca bu hücre hattının *in vivo* ortamda alınan cevaplara benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Okumura 1999). V79 379A hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Tokyo, Japonya)'dan satın alınmıştır.

1.4.1.3. CHO hücreleri

Chinese Hamster Ovaryum epitelyal benzeri hücrelerdir. Bu hücreler East Anglia Üniversitesi (İngiltere), Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır.

1.4.2. Çalışmalarda kullanılan test maddeleri

1.4.2.1. Esansiyel yağlar ve monoterpenler

Oda sıcaklığında sıvı halde olan bazen de donabilen, kokulu, uçucu, yağimsı karışımlara eterik yağlar (esans) adı verilir. Esansiyel yağlar, yüksek bitkilerde bulunan lipofilik sıvı ve genellikle terpenoid bileşiklerin karışımından oluşmuşlardır. Esansiyel yağların içinde günümüze kadar 3000'den fazla bileşik bulunduğu belirlenmiştir (Kohler ve ark. 2000). Esansiyel yağlar bitkilerden mekanik presleme ya da buhar distilasyonu ile elde edilen ve bitkilerin koku ve diğer karakteristik özelliklerini taşıyan uçucu yağ sınıfındandır (Stammati ve ark. 1999; Gomes-Carneiro ve ark. 1998). Alternatif olarak ekstrakte edilip organik çözücü olarak kullanılabilir. Eterik yağlar olarak da adlandırılan esansiyel yağlar bitkinin çeşitli kısımlarından (çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, sürgün, kabuk, meyve ve kök) elde edilebilmektedir (Burt 2004). Şimdiye kadar 3000 kadar yağ bilinmekte ve bunların yaklaşık 300 tanesi ticari amaçla kullanılmaktadır (Van De Braak ve Leijten 1999). Son zamanlarda esansiyel yağlar, bitki ekstraktları ve onların saflaştırılmış ya da sentez edilmiş bileşenleri gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stammati ve ark. 1999; Gomes-Carneiro ve ark. 1998).

Bazı esansiyel yağlar, antimikrobiyal özellikleriyle tanınmaktadır (Burt 2004; Boyle 1955; Guenther 1948). Antibakteriyal özelliklerinin yanı sıra (Mourey ve Canillac 2002; Carson ve ark. 1995; Deans ve Ritchie 1987), esansiyel yağlar ve onların bileşikleri; antiviral (Bishop 1995), antimitotik (Mari ve ark. 2003; Jayashree ve Subramanyam 1999; Akgül ve Kıvanç 1988; Azzoua ve Bullermen 1982), antitoksijenik (Akgül ve ark. 1991; Ultee ve Smid 2001),

antiparazitik (Pessoa ve ark. 2002; Pandey ve ark. 2000), ve ineksidal (Konstantopoulou ve ark. 1992; Karpouhtsis ve ark. 1998) özellikler içermektedirler (Burt 2004; Guenther 1948; Mahmoud ve Croteau 2002).

Monoterpenler bitkilerden elde edilen kokulu karışımlar olan esansiyel yağların başlıca bileşenleridir (Gomes-Carneiro ve ark. 1998). Bitkilerin bileşikleri olan monoterpenlerin birçoğu insanların besinlerinde bulunmakta ya da birçoğu besin olarak kullanılmaktadır (Elegbede ve ark. 2003). Monoterpenler 10-C atomu içeren izoprenoid grubundandır. Esansiyel yağlar ve onların monoterpenoid bileşikleri kozmetikte parfümlerde, yiyecek ve içeceklerde tat verici olarak ve evde sıkça kullanılan deterjanlarda, sabunlarda, oda spreylerinde ve böcek ilaçlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar ve monoterpenler düşük konsantrasyonda kullanıldığında hoş koku ve tat verdiğinden çok eskiden beri bitkilerden elde edilir. Hatta bugün bile gıda katkı maddesi olarak ta kullanılmaktadır.

Esansiyel yağlar ve monoterpenler lipofilik bileşiklerdir ve kolayca hücre membranından geçebilirler bu sayede akciğer ve deride absorbe edilirler. Bu nedenle monoterpenler ve esansiyel yağlar uzun yıllar boyunca tıpta göğüs üşütmelerinin tedavilerinde, kas ağrılarına karşı merhem ve kremlerde kullanılmaktadır (Mühlbauer ve ark. 2001). Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar; bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinogenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle monoterpenler, etkili, toksik olmayan, antikarsinogenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler, bu ajanlar yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler (Loza-Tavera, 1999).

1.4.2.1.1. Timol ve karvakrol

Timol (2-isopropyl-5methylphenol), thyme (kekik) bitkisinden elde edilen doğal bir antiseptiktir. Tıpta, tarımda, kozmetikte ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Szentandrassy ve ark. 2003; Aeschbach ve ark. 1994; Manou ve ark. 1998; Sanchez ve ark. 2004).

Timol, monoterpen grubu içersinde sınıflandırılan bir bileşiktir. Genel olarak bir antimikrobiyal ajan olarak bilinir. Timol'ün ağız bakterilerine karşı bakteriosit aktivitesi bulunması nedeniyle genellikle ağız solüsyonları timol içermektedir. Ayrıca bu terpenin önemli bir fungusit etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bileşiğin bakteriosit ve antioksidan (Alam ve ark. 1999) özellikleri nedeniyle dişçilikte ağız enfeksiyonlarını tedavisinde timol kullanımına sıkça başvurulmaktadır. Timol'ün kimyasal yapısına bakılarak bu bileşiğin amfipatik ve/veya hidrofobik davranışa sahip olduğu söylenebilir (Sanchez ve ark. 2004). ATPaz ve membran reseptör gibi ve membran proteinlerinin aktivitesinde, membran geçirgenliğinde, timol etkili bir maddedir (Montes-Belmant 1998).

Karvakrol [2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol], *Origanum*, *Satureja Thymbra*, *thymus* ve *Cordodothymus* türlerinin de içinde bulunduğu Labiatae familyasının birçok esansiyel yağında bulunan fenolik bir monoterpendir (Kirimer ve ark. 1995; Zeytinoğlu ve ark. 2003; Magyar ve ark. 2004). Yapılan çalışmalarda, karvakrol'ün belirgin bir antioksidan, (Milos ve ark. 2000) antibakteriyal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Juven ve ark. 1994; Kim ve ark. 1995; Sivropoulou ve ark. 1996; Thompson 1996; Ultee ve ark. 1998). Karvakrol hücre membranını K^+ ve H^+ için geçirgen hale getirerek, proton hareket ettirici gücü yok etmekte ve ATP sentezini engellemektedir (Ultee ve ark.1999). Ayrıca insan larinks karsinoması kökenli Hep-2 hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve apoptotik fenotipi indüklediği belirlenmiştir (Stammati ve ark. 1999). 60 μg 'ın üzerindeki dozlarda fare myoblast hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 2003).

Timol ve karvakrol düşük konsantrasyonlarda insan besin maddelerinde de bulunmaktadır (Stammati ve ark. 1999). Karvakrol ve timol antiseptik özelliğe sahip olduklarından tıpta ve dental yöntemlerde, fungusit, bakteriosit ve antioksidan ve anti_inflammatör özelliklerinden dolayı da tarımda kozmetikte ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan monoterponoid fenol türevleridir (Magyar ve ark. 2004; Perry ve ark. 2003). Ayrıca insektisit ve akarisit etkiye de sahiptirler (Hierro ve ark. 2004).

1.4.2.1.2. L-mentol

Hoş bir tadı ve kokusu olan Mentol, spearmint ve peppermint'i de içeren 100 den fazla esansiyel yağda doğal olarak bulunan bir monosiklik terpen alkoldür. Oral dozaj formülasyonlarında ağız tatlandırıcı ajan olarak, tropikal formülasyonlarda da koku verici olarak kullanılır (Shojaei ve ark. 1999; Soottitantawat ve ark. 2005).

Karakteristik nane aroması ve doğal l-mentol izomeri ve sentetik d,l-mentol'ün serinletici kaliteleri; mentolün diş macunu, ağız gargarası, gıdalar, sigaralar ve oral farmasötik preparasyonlar gibi ticari ürünlerde kullanılmasına neden olmuştur. Mentol içeren ilaçlar soğuk algınlığının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gelal ve ark. 1999; Sato ve ark. 2002; Hamasaki ve ark. 1998).

Yapılan çalışmalarda, mentol'ün genotoksik ve sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve mentol'ün DNA çift ipliğinde kırılmalara ve ikinci derecede sitotoksositeye neden olduğu rapor edilmiştir (Hartmann ve Speit 1997). Mentol antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahiptir (Morris ve ark. 1979; Mucciarelli ve ark. 2001).

1.4.2.1.3. 1,8 sineol

Ökaleptol ya da kajepulol olarak ta bilinen 1,8 Sineol birçok bitkinin esansiyel yağında bulunan bir terpen oksittir (Lahlou ve ark. 2005; De Vincenzi ve ark. 2002). Eucalyptus türlerinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağlarında bol miktarda (%25- 90 oranında) bulunur (Giamakis ve ark. 2001). 1,8 Sineol gıda maddelerinde sık sık tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Geleneksel olarak, enfeksiyonların neden olduğu solunum yolu hastalıklarının semptomlarının tedavisinde kullanılır. Son zamanlarda 1,8 Sineol'un birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe edici etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir (Santos ve ark. 2001). Bu bileşik burun spreyi, dezenfektan, analjezik gibi farmasötik preparatlarda ve gıda maddelerinde de tatlandırıcı olarak kullanılır. Ayrıca 1,8 Sineol romatizma, soğuk algınlığı, bronşial astım ve septik-şokla birleşen patolojilerin tedavisinde de kullanılmaktadır (Lahlou ve ark. 2005;

Miyazawa ve ark. 2000; Duisken ve ark. 2005). 1,8 Sineol antibakteriyal (Santos ve ark. 2001, Pattnaick ve ark. 1997) ve antitümoral etkilere sahiptir (Moteki ve ark. 2002; Santos ve ark. 2001).

1.4.2.1.4. *Salvia fruticosa* (Adaçayı) yağı

Labiatae familyasında sınıflandırılmaktadır. *Salvia fruticosa*, *S. triloba* ve *S. cypria* olarak adlandırılır (Gali-Muhtasib ve ark. 2000). 89 türü Türkiye’de bulunan adaçayının 45 türü endemiktir Birçok adaçayı türü bitkisel çay ve gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Tepe ve ark. 2005). Orta doğuda hemen hemen her evde bu bitkinin su eksraktı, mide ağrılarına karşı, öksürük ve soğuk algınlığının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Gali-Muhtasib ve ark. 2000). Ayrıca ağızdaki iltihaplar için anti inflamatör ajan olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu bitkinin uçucu yağının önemli ölçüde anti bakteriyel etkisinin olduğunu (Hefnawy ve ark. 1993) ve fare derisi üzerinde yapılan çalışmalarda da tümör oluşumunu engelleyici etkisinin olduğunu gösterilmiştir (Gali-Muhtasib ve Affara 2000). Bu bitki tıp alanında birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmasına karşın bitkinin esansiyel yağının toksik etkisiyle ilgili çalışmalara az rastlanmaktadır (Farhat ve ark. 2001). Sivropoulou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1997) *Salvia fruticosa*’nın antibakteriyel, sitotoksik ve antiviral etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sivropoulou ve ark. 1997). Farhat ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2001) adaçayının uçucu yağında α -pinene, Camphene, β - pinene, limonene, sineol, α -thujon, β -thujon, camphor, linalool, linalenasetat ve borneol bileşiklerinin bulunduğu ve mevsime göre miktarlarında değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir.

1.4.2.1.5. *Laurus nobilis* (Defne) yağı

Laurus nobilis yaprakları ve yapraklarının esansiyel yağı mutfakta ve gıda endüstrisinde baharat ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu bitkinin tıpta önemli bir kullanımı olmamasına rağmen son zamanlarda bu bitki bilimsel araştırma konusudur (Simic ve ark. 2003). *Laurus nobilis* L. (Lauraceae)

geleneksel olarak gastrointestinal sorunların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin sıvı ekstratı halk arasında anti-hemoroidal, anti-romatik, diüretik olarak, yılan ısırıklarına karşı antidot ve mide ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır (Kıvçak ve Mert 2002).

Akdeniz ve Avrupa defnesinin (*Laurus nobilis*) yapraklarından elde edilen esansiyel yağın kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi için yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Riaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada esansiyel yağının başlıca bileşenlerinin sineol (%44,12), eugenol (%15,16), sabinene (%6,20), 4-terpinol (%2,74), metileugenol (%2,48), α -terpinol (%2,19) ve β -pinen %2,05) olduğu rapor edilmiştir (Sayyah ve ark. 2002).

1.4.2.1.6. *Pimpinella anisum* (Anason) yağı

Pimpinella anisum Umbelliferae familyasına ait Türkiye, İran Hindistan ve dünyanın diğer sıcak bölgelerinde de yaygın olarak yetişen tek yıllık bir bitkidir (Sahraei ve ark. 2002; Pourgholami ve ark. 1999). *Pimpinella anisum* beyaz çiçekli, küçük yeşil-sarı tohumlu Türkiye, Mısır ve Yunanistan'da yetişen otsu bir bitkidir (Boskabady ve Ramazani-Assari, 2001). İran'da şifalı bir bitki olarak kullanılır ve özellikle meyvesinin esansiyel yağı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Sahraei ve ark. 2001). Farmasötik endüstrisinde soğuk algınlığında ve ilaçlarda istenmeyen tatların maskelenmesinde kullanılmaktadır. Türkiye'de popüler bir içki olan rakının yapımında da kullanılmaktadır. Antiseptik, diüretik, ekspektorant ve uyarıcı etkileri bulunmaktadır (Lawless, 2002). Kimyasal çalışmalar *Pimpinella anisum*'un meyve esansiyel yağının başlıca bileşenlerinin eugenol, anethol, metilkhavikol ve anisaldehit ve estragol olduğunu göstermiştir. Eugenol ve estragol anestetik etki, hipotermik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Sahraei ve ark. 2001).

1.4.2.1.7. *Origanum onites* (Kekik) yağı

Labiata familyasının bir üyesi olan İzmir kekiği, akkekik, peynir kekiği ve güvey otu olarak bilinen kekik (*Origanum onites* L.) antik çağlardan beri halk

tarafından baharat ve ilaç olarak kullanıldığı bilinen bir bitkidir. *Origanum onites* kekik yağı açısından da zengindir (Seçmen ve ark. 1992). Yapılan bir çalışmada, *O.onites* L. uçucu yağı detaylı olarak araştırılmış ve uçucu yağ içindeki ana bileşenlerin; karvakrol (%65.91), linalool (%14.84), timol (%3.64), p-simen (%3.24) ve g-terpinen (%2.08) olduğu ortaya konulmuştur (Erdemgil 1992; Aydın ve ark. 2005; Kamel ve ark. 2001; Skoula ve ark. 1999). Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Bunun yanı sıra karvakrol ve karvakrolce zengin kekik yağlarının gıdaların saklanmasıdaki rolleri çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 1998).

1.4.3. Çalışmalarda kullanılan yöntemler hakkında bilgiler

1.4.3.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

Kültürdeki yaşayan hücre sayısını belirlemek için direk ve indirek olmak üzere iki yöntem vardır. Direk yöntemde tüm hücreler sayılırken indirek yöntem ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerindeki değişikliğine dayanır (Genç ve ark. 2002). Tetrazolyum boyasının (MTT) hücre sayısını belirleyen bir indikatör olarak kullanımı ilk olarak 1980’li yılların başında rapor edilmiştir (Langdon 2004). MTT deneyi, sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirek indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür (Wu ve ark. 1999). MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir (Doğan ve ark. 2004). Birçok araştırmacı tarafından sitotoksite araştırmalarında kullanılmaktadır (Mohamed ve ark. 2000; Ali ve ark. 2001).

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Genç ve ark. 2002). Hızlı ve doğrudan dehidrogenaz aktivitesini ölçer. Tetrazolyum tuzlarının formazan ürünlere dönüşümü, NADH veya NADPH’in azalmasıyla

meydana gelir. NADH dehidrogenazları solunumun enerji üreten reaksiyonlarında: glikoliz, kreps döngüsü ve oksidatif fosforilasyonda rol alır. NADPH dehidrogenazları ise biyosentetik üretim reaksiyonlarında görev alır. Bu dehidrogenazlar genelde mitokondrilerde yer alırlar (Wu ve ark. 1999). Bu nedenle MTT tekniği mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine dayanır. Kolorimetrik ölçümlerde tercih edilen renksiz substrat kullanılarak yaşayan hücrelerde renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan, substrat olarak renksiz, yaşayan hücrelerin sağlam mitokondrilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olup sağlam mitokondrilerde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur (Shi ve ark. 2006; Langdon 2004; Korkmaz 2002). Dehidrogenazlar NADH ya da NADPH kullanarak sarı renkteki MTT tuzlarını mor formazan kristallerine dönüştürür. Formazan kristalleri DMSO, izopropanol ya da formazan ürünlerinin çözülebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Barile 1994; Subhashini 2004). Oluşan formazan tuzlarının miktarı direk olarak hücre sayısının oranını gösterir (Holst ve Oredsson 2005) Bu teknik düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilir ve çok sayıda örnekle çalışılma imkanı sağladığından tercih edilmektedir (Collier ve ark. 2003; Yano ve ark. 2005).

1.4.3.2. Lizozomal aktiviteye dayanan Neutral Red Up-Take (NR) ölçümü

Kolorimetrik bir yöntem olan Neutral red uptake sitotoksisite deneyi, lizozomlarda biriken, elektrostatik olarak lizozomal matriskteki anyonik bölgelere bağlanan, katyonik süpravital bir boya olan nötral kırmızısının (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alınımına dayanır (Bulychev ve ark. 1978; Weyermann 2005; Andreoli ve ark. 2003; Genta ve ark. 2001). Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal membrandaki hasar, NR'nin alınımını ve bağlanmasını azaltarak canlı sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri ayırmayı mümkün kılar (Komissarova ve ark. 2004; Barile 1994). Neutral red

boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikir (Fotakis 2006; Yano ve Marcondes 2005). Neutral red uptake sitotoksosite deneyi, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Popiolkiewicz 2005).

1.4.3.3. Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin ölçülmesine dayalı yumuşak agar koloni formasyonu

Koloni formasyon testi bir hücre popülasyonundaki tek hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerini saptamaya yarayan bir testtir (Wilson 1992; Kreja ve Seidel 2002). Hastadan alınan dokudaki hücreler ile yapılan yumuşak agar koloni formasyon testlerinden elde edilen sonuçlar ile ilacın hastaya uygulanması ile birebir örtüşen sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle bu teknikle antineoplastik ilaçların *in vitro* ortamdaki yanıtları ile ilacın hastaya uygulanması ile elde edilecek *in vivo* cevapları tahmin etmek için pratik bir yöntemdir (Korkmaz 2002).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Bitki Ekstreleri

Karvakrol; Flutarom (İsrail) firmasından, L-mentol; Polarom (Polonya) firmasından, kekik, defne, adaçayı, anason yağları ile adaçayı ve defne esansiyel yağının önemli bir bileşeni olan 1,8 sineol ve kekik esansiyel yağının önemli bir bileşeni olan timol; Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiş olup, yağların elde edildiği bitkinin kaynağı ve yağların kompozisyonu tam olarak bilinmektedir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Nutrient Mixture F-12 (HAM, Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), Fetal Bovine Serum (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Trypsin-EDTA Solution (10X) (Sigma), Sodyum Bikarbonat (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Riedel de Haen), Dimethyl Sulfoxide (Sigma), Etanol (Riedel de Haen), MTT (Sigma), Hanks' Balanced Salt Solution (10X) (HBSS)(Sigma), Trypan Blue (Merck), Asetik Asit Glasiyal (Carlo Erba), Neutral Red (Fluka), Formaldehit (Merck), CaCl (Merck), Select Agar (Sigma), KCl (Merck), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), EDTA (Merck), Sıvı Azot

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik flasklar 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacminde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacminde), 100, 250, 500, 1000 ml'lik Durham şişeler, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50' ml hacminde), steril filtreler, Thoma Lamı.

2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, derin dondurucu, buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ karbondioksit inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (ELx808-IU) (Bio-Tek), İnverted mikroskop 1X71 (Olympus), 12 kanallı mikropipet (Eppendorf), dağıtıcı pipet (Eppendorf)

2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler

2.5.1. A549 hücre kültürü

A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM) ve Penicilin-Streptomycin ve %7,5 NAHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.2. V79 379A hücre kültürü

V79 379A hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicilin-Streptomycin ve %9,2 NAHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.3. CHO hücre kültürü

CHO hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM), Penicilin-Streptomycin içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

2.6.1. Timol dozlarının hazırlanması

Timol, dimetil sülfoksit (DMSO; Riedel de Haen) içinde çözülerek 50mM, 100mM 200mM, 400mM ve 800mM'lık dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Timol DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Timol'ün hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.2. Karvakrol dozlarının hazırlanması

Karvakrol, dimetil sülfoksit (DMSO; Riedel de Haen) içinde çözülerek 100mM, 200mM, 400mM, 800mM ve 1000mM 'lık stok dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Karvakrol DMSO içinde çözüldüğü için (Zeytinoğlu 2003), negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Karvakrol'ün hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.3. L-Mentol dozlarının hazırlanması

L-mentol, dimetil sülfoksit (DMSO; Riedel de Haen) içinde çözülerek (Hartmann ve Speit, 1997) 125mM, 250mM 500mM, 750mM ve 1000mM'lık stok dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. L-mentol DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Mentol'ün hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.4. 1,8 Sineol dozlarının hazırlanması

1,8 sineol, dimetil sülfoksit (DMSO; Riedel de Haen) içinde çözülerek 125mM, 250mM 500mM, 750mM ve 1000mM'lık stok dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. 1,8

Sineol DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. 1,8 Cineol'ün hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.5. *Salvia fruticosa* (adaçayı) dozlarının hazırlanması

Salvia fruticosa (adaçayı yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 12,5mg/ml, 25mg/ml 50mg/ml, 100mg/ml ve 200mg/ml'lık stok dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Adaçayı yağı etanol içinde çözüldüğü için (Sivropoulou ve ark. 1997), negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Adaçayı'nın hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.6. *Pimpinella anisum* (anason) dozlarının hazırlanması

Pimpinella anisum (anason yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 12,5mg/ml, 25mg/ml 50mg/ml, 100mg/ml ve 200mg/ml'lık stok dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Anason yağı etanol içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Anasonun hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.7. *Laurus nobilis* (defne) dozlarının hazırlanması

Laurus nobilis (defne yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 50mg/ml 100mg/ml, 200mg/ml, 400mg/ml ve 800mg/ml'lık stok dozları hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Defne yağı etanol içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Defne'nin hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.6.8. *Origanum onites* (kekik) dozlarının hazırlanması

Origanum onites (kekik yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 0,4mg/ml 2mg/ml, 10mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml'lık stok dozları hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Kekik yağı etanol içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Kekik yağı'nın hazırlanan stok dozları +4°C'de saklanmıştır.

2.7. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar, 0,22 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmişlerdir.

2.8. Yöntem

2.8.1. Hücre kültürü

A549, V79 379A ve CHO hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm²'lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Trypsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT ve neutral red-up take testleri için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (V79 379A için 1000, CHO için 3000, A549 için 5000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde

süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C’de 24 saat inkübe edilmişlerdir (Piddubnyak ve ark. 2004). 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24, 48, 72 ve 96 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Timol’ün, Karvakrol’un ve mentol’un belirlenen dozları hazırlanmıştır. Timol, Karvakrol, L-mentol ve 1,8 sineol için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı % 0,1’i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0,1 olacak şekilde 1 ml içinde 1 µl DMSO’da verilmiştir ve final konsantrasyonları: Timol’ün 50-100-200-400 ve 800 µM, karvakrol’un 100-200-400-800-1000µM, mentol’un 125-250-750 ve 1000 µM ve 1,8 sineol’un 125-250-750 ve 1000 µM olması sağlandı. Esansiyel yağların hepsi etanol içinde çözülmüştür. Etanol oranı % 0,05’i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0,05 olacak şekilde 1 ml içinde 0,5 µl etanol’de verilmiştir ve final konsantrasyonları: Adaçayı’nın 12,5-25-50-100 ve 200 µg, anason yağı 12,5-25-50-100 ve 200 µg, defne yağı 50-100- 200-400 ve 800 µg ve kekik yağının 0,4-2-10-50-100 µg olması sağlanmıştır. Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (sadece besiyeri) ve %0,1 DMSO ya da %0,05 etanol içeren çözücü kontrol grubu da teste eklenmiştir.

2.8.3. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24–48–72 ve 96 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5mg/ml⁻¹ MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözülmeyen formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için karbondioksit inkübatöründe 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir.

Plakalardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mosmann 1983).

2.8.4. Neutral Red Up-take sitotoksite ölçümü

Test maddeleri ile 24-48-72 ve 96 saat bekletilen hücrelerden besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler 37°C'ye getirilmiş steril fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS: 137 μ M NaCl, 2,7 μ M KCl, 15 μ M KH_2PO_4 , 8 μ M NaHPO_4 ; pH 7,3) ile 3 kez yıkanmıştır. Hücreler 50 μ g/ml Neutral red up-take solüsyonu ile 37°C'de 2-3 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerden boya solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan 0,1 ml ilave edilerek oda sıcaklığında 1-2 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra fiksatif/yıkama solüsyonu dökülüp plakalar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde 1 gün bekletilerek kurutulmuştur. Bu süre sonunda asetik asit-etanol solüsyonu 0,1 ml ilave edilerek 15 dakika oda ısısında bekletilmiş ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik densiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Borenfreund ve Puerner, 1985; Stamatii ve ark.1999; Yano ve ark. 2005; Correa ve ark. 2005).

2.8.5. Yumuşak agar koloni formasyonu

Yumuşak agar koloni formasyonu deneyinde steril edilmiş %3'lük select agar kullanılmıştır. Alt agar tabakası 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu için 1 ml olarak hesaplanmıştır. 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri olacak şekilde hazırlanarak hemen kuyucuklara ilave edilmiştir. Bu sırada 1 ml'lik üst agar tabakası ve 1 ml üst tabaka için 1000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Üst agar tabakası 1 kısım hücre süspansiyonu (hücre miktarı, tüm üst tabaka hacmi için hesaplanacak) + 2 kısım agarlı besiyeri (alt agar tabakası: 1 kısım agar + 4 kısım besiyeri) olarak hazırlanmış ve soğutulmuş olan plakalara

ilave edilmiştir. İlave edilen agar ve besiyeri karışımı donduktan sonra üzerine bir kuyucuk hacmi 2 ml olacak şekilde hesaplanarak 0,1 ml içinde test maddelerinin konsantrasyonları uygulandı ve hücreler 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Hergün takip edilerek koloniler 35–40 hücreye ulaşınca (her hücre için bu süre farklıdır, yaklaşık 10-16 gün) inverted mikroskopta sayıldı. Sayımlar üç kez tekrar edildi. (Yeates ve ark. 1997; Korkmaz 2002).

2.9. İstatistiksel Değerlendirmeler

MTT ve NR deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmeleri için SPSS (Statistics Program for Social and Science) istatistik programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ve Post-Hoc testlerinden Tukey uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Timol'ün A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.1.1. Timol'ün MTT testi sonuçları

Timol uygulanan hücrelerle yapılan MTT testi sonucunda, A549 hücrelerinde uygulanan tüm dozlarda ilk gün başlayan dördüncü günde devam eden zamana ve doza bağımlı anlamlı sitotoksik etkinin gözlemlendiği saptanmıştır. Timolun A549 hücrelerinde maksimum etkisinin üçüncü gün 800 μ M'lık dozda elde edildiği ve mitokondriyal aktivitenin % 16,82 oranına kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 1.).

Timolun V79 379A hücreleri üzerindeki etkisi A549 hücrelerine benzerlik göstererek yine maksimum etkinin üçüncü gün 800 μ M'lık dozda gözlemlendiği ve bu etkinin doza ve zamana bağımlı olduğu saptanmıştır (Şekil 2.).

CHO hücrelerinde 50 μ M ve 100 μ M timol dozlarının etkilerinin çözücü olan DMSO ile yakın olduğu ve beklenen toksik etkinin bu dozlarda gözlenmediği, ancak 200, 400, 800 μ M dozlarda doza bağımlı bir etkinin elde edildiği ve bu etkinin birinci gün başlayıp dördüncü gün de devam eden uzun süreli bir etki olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen maksimum etkinin üçüncü gün 800 μ M'lık dozda başladığı, dördüncü günde devam ettiği ve mitokondriyal aktiviteyi % 2,7883 seviyesine kadar düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 3.).

3.1.2. Timol'ün NR ölçümü sonuçları

Timol'ün NR testi uygulaması ile elde edilen sonuçlarında, A549 hücrelerinde uygulanan 50, 100 ve 200 μ M dozların birbirine yakın sonuçlar oluşturduğu, maksimum sitotoksik etkinin ise 800 μ M'lık dozda üçüncü gün elde edildiği (%29,535) saptanmıştır (Şekil 4.).

V79 379A hücrelerinde ise, uygulanan 200, 400 ve 800 μ M'lık dozların anlamlı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 400 μ M ve 800 μ M dozlarda ikinci günden itibaren alınan cevapların birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir.

400 μ M ve 800 μ M timol dozlarında dördüncü günde maksimum etkinin elde edildiği (% 29,555) saptanmıştır (Şekil 5.).

CHO hücrelerinde 50 μ M ve 100 μ M timol dozlarında üçüncü ve dördüncü günde lizozomal enzim miktarında artış gözlemlenirken, 200, 400 ve 800 μ M'lık timol dozlarında birinci günden başlayan doza ve zamana bağımlı anlamlı bir sitotoksik etki belirlenmiştir. Maksimum sitotoksik etki timol'ün 800 μ M'lık dozunda ikinci günde gözlenmiş ve bu etki üçüncü ve dördüncü günde devam etmiştir (Şekil 6.).

3.1.3. Timol'ün koloni formasyon sonuçları

Timol'ün A549 hücreleri üzerine etkisi koloni formasyon testi ile ölçülmüş, A549 hücrelerinde koloni sayısında doza bağımlı bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 7.).

3.2. Karvakrol'un A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.2.1. Karvakrol'ün MTT testi sonuçları

Karvakrol uygulanan hücrelerle yapılan MTT testi ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde tüm dozlar ilk günden itibaren dördüncü günde devam eden anlamlı sitotoksik etki göstermiştir. Elde edilen maksimum yanıt, dördüncü günde 800 μ M ve 1000 μ M karvakrol dozlarında görülmüştür. 800 μ M ve 1000 μ M karvakrol dozlarında dördüncü gün mitokondriyal aktivite % 5,4575 seviyesine kadar düşmüştür (Şekil 8.).

Karvakrol'un V79 379A hücrelerine uygulanması ile elde edilen sonuçlarda tüm dozlarda birinci ve ikinci gün mitokondriyal aktivitenin azaldığı, ikinci günden itibaren uygulanan tüm dozların birbirine yakın etki göstererek mitokondriyal aktivitenin sabit kaldığı ve % 2,85 seviyesine kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 9.).

CHO hücrelerinde birinci ve ikinci günde, uygulanan tüm karvakrol dozlarında doza bağımlı olarak antiproliferatif etki gözlenmiştir. 100 ve 200 μ M

karvakrol dozlarında üçüncü ve dördüncü gün antiproliferatif etkinin azaldığı saptanırken, 400, 800 ve 1000 μ M karvakrol dozlarında sitotoksik etkinin arttığı ve üçüncü gün maksimuma ulaşarak hücre popülasyonunu kontrole göre % 5,1175 seviyesine kadar düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 10.).

3.2.2. Karvakrol'ün NR ölçümü sonuçları

Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinde 100 μ M ve 200 μ M dozlarda karvakrol uygulanması ile lizozomal enzim miktarında birinci gün artış gözlenmiştir. Uygulanan diğer dozlarda doza bağımlı olarak lizozomal aktivitenin azaldığı ve en fazla sitotoksik etkinin dördüncü gün 800 ve 1000 μ M dozlarında görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 11.).

V79 379A hücrelerinde doza bağımlı anlamlı sitotoksik etki elde edilmiş ve bu etkinin dört gün boyunca devam ettiği görülmüştür. Maksimum etki dördüncü gün 800 μ M ve 1000 μ M karvakrol dozlarında elde edilmiş ve lizozomal aktiviteyi kontrol grubuna göre % 7,455 seviyesine kadar düşürmüştür (Şekil 12.).

CHO hücrelerinde 100 μ M ve 200 μ M dozlarda karvakrol uygulanması ile lizozomal enzim miktarında tüm günlerde artış saptanmıştır. 800 μ M ve 1000 μ M dozlar birbirine yakın etkiler oluştururken karvakrolun CHO hücreleri üzerindeki en fazla etkisi üçüncü ve dördüncü gün bu dozlarda gözlemlendiği, lizozomal enzim miktarını kontrole göre % 13,14 seviyesine kadar düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 13.).

3.2.3. Karvakrol'ün koloni formasyon sonuçları

Karvakrol'un A549 hücreleri üzerine etkisi koloni formasyon testi ile ölçülmüş, A549 hücrelerinde koloni sayısında doza bağımlı bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 14.).

3.3. L-Mentol'ün A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.3.1. L-Mentol'ün MTT testi sonuçları

L-Mentol uygulanan hücrelerle yapılan MTT testi sonucunda A549 hücrelerinde en düşük doz olan 125 μ M dozun mitokondriyal aktiviteyi artırdığı fakat bu etkinin geçici olduğu ve ikinci günden itibaren mitokondriyal aktiviteyi düşürerek anlamlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Uygulanan diğer dozların ise doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği maksimum sitotoksik etkinin ise üçüncü gün 1000 μ M mentol dozunda elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 15.).

V79 379A hücrelerinde L-mentol'un maksimum sitotoksik etkisi ikinci gün 1000 μ M mentol dozunda elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki mentol dozlarında anlamlı sitotoksik etkinin olduğu fakat etkinin geçici olduğu saptanmıştır (Şekil 16.).

CHO hücrelerinde ise maksimum sitotoksik etkinin 125 μ M'lık mentol dozunda dördüncü gün elde edildiği ve mitokondriyal aktiviteyi % 68,3625 oranına kadar düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 17.).

3.3.2. L-Mentol'ün NR ölçümü sonuçları

L-Mentol'ün NR uygulaması ile elde edilen sonuçlarında, A549 hücrelerinde maksimum sitotoksik etkinin lizozomal aktiviteyi % 72,0775'e düşürdüğü 1000 μ M dozda elde edildiği saptanmıştır (Şekil 18.).

V79 379A hücrelerinde ilk günden başlayarak üçüncü günde devam eden doza bağımlı sitotoksik etki gözlenmiştir. Bu hücrelerde elde edilen maksimum yanıtın lizozomal aktiviteyi % 12,9075'e düşüren 1000 μ M dozda üçüncü günde elde edilmiştir (Şekil 19.).

CHO hücrelerinde ise maksimum anti proliferatif etkinin (lizozomal aktivite % 81,7975) üçüncü gün mentol'un 1000 μ M'lık dozunda tespit edilmiştir. Uygulanan tüm dozların dördüncü gün CHO hücrelerinin lizozomal enzim miktarını artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 20.).

3.3.3. L-Mentol'ün koloni Formasyon Sonuçları

L-Mentol'ün A549 hücreleri üzerine etkisi koloni formasyon testi ile ölçülmüş, A549 hücrelerinde koloni sayısında doza bağımlı bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 21.).

3.4. 1,8 Sineol'ün A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.4.1. 1,8 Sineol'ün MTT testi sonuçları

Sineol'un MTT testi ile elde edilen sonuçlarında A549 hücrelerinde sineol'un çok düşük bir sitotoksik etki oluşturduğu, mitokondriyal aktiviteyi 1000 μ M'lik dozun ancak % 80,77 seviyesine kadar düşürdüğü saptanmıştır (Şekil 22.).

1,8 Sineol uygulanan V79 379A hücrelerinde maksimum sitotoksik etkinin üçüncü gün elde edildiği ve sineol'ün en yüksek dozu olan 1000 μ M'lik dozun mitokondriyal aktiviteyi % 15 inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 23.).

CHO hücrelerinde ise hücrelerinde maksimum sitotoksik etkinin ikinci gün elde edildiği ve sineol'ün en yüksek dozu olan 1000 μ M'lik dozun mitokondriyal aktiviteyi % 66,71 seviyesine kadar düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 24.)

3.4.2. 1,8 Sineol'ün NR ölçümü sonuçları

1,8 Sineol'ün hücreler üzerindeki etkileri NR testi ile değerlendirildiğinde, sineol'ün A549 hücrelerinde 1000 μ M'lik dozun mitokondriyal aktiviteyi ikinci gün ancak % 80,31 seviyesine kadar düşürdüğü ve bu sitotoksik etkinin geçici olduğu gözlenmiştir (Şekil 25.). V79 379A hücrelerinde maksimum etkinin dördüncü gün gözleendiği (Şekil 26.), CHO hücrelerinde ise maksimum sitotoksik etkinin en yüksek konsantrasyonlu dozda elde edildiği, uygulanan tüm dozlarda dördüncü gün CHO hücrelerinin lizozomal enzim miktarında artış saptanmıştır (Şekil 27.).

3.4.3. 1,8 Sineol'ün koloni formasyon sonuçları

Koloni formasyonu testi ile elde edilen sonuçlarda A549 hücrelerinin agar tabakasında oluşturdukları koloni sayılarında kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir. (Şekil 28.).

3.5. *Salvia fruticosa*'nın A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.5.1. *Salvia fruticosa*'nın MTT testi sonuçları

Adaçayı esansiyel yağının MTT testi ile elde edilen sonuçlarında, A549 hücrelerinde uygulanan tüm dozlarının birinci gün etanole yakın cevap oluşturdukları görülmüştür. 50, 100, 200 µg/ml adaçayı dozlarının ilk günden itibaren dördüncü günde devam eden antiproliferatif etki gösterdikleri, dördüncü günde 200 µg/ml dozda A549 hücrelerinde mitokondriyal aktivitenin % 54,14 olduğu ve maksimum sitotoksik etkinin görüldüğü saptanmıştır (Şekil 29.).

V79 379A hücrelerinde ise uygulanan 12,5 µg/ml'lik en düşük dozun birinci gün başlayan ikinci günde devam eden sitotoksik etkisi üçüncü günde azaldığı dördüncü günde ise sitotoksik etkinin ortadan kalkarak çözücü kontrolle aynı seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Uygulanan diğer dozlarda güne ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki artmış dördüncü günde 200 µg/ml adaçayı dozunda mitokondriyal aktivite % 3,4525 olarak ölçülmüştür (Şekil 30.).

CHO hücrelerinde adaçayının maksimum etkisi ikinci gün 200 µg/ml dozda elde edildiği ve hücre canlılığını ancak % 71,065 seviyesine kadar düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 31.).

3.5.2. *Salvia fruticosa*'nın NR ölçümü sonuçları

Adaçayı esansiyel yağı uygulanan hücrelerde NR ölçümleri sonucunda, A549 hücrelerinde lizozomal aktivitenin doza bağımlı olarak azaldığı belirlenmiştir. lizozomal enzimlerdeki azalma, dördüncü gün % 42,4175 seviyesine kadar ulaşarak maksimum etki görülmüştür (Şekil 32.).

V79 379A hücrelerinde de lizozomal enzim miktarında doza bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Maksimum sitotoksik etki ikinci gün 200 µg/ml dozda görülmüştür. Enzim miktarının ancak % 66,7325 seviyesine kadar düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 33.).

CHO hücrelerinde ise uygulanan tüm dozlarda meydana gelen yanıtın V79 379A hücrelerindeki etkiye benzerlik gösterdiği, uygulanan dozların etanole yakın cevaplar oluşturduğu belirlenmiştir. Maksimum sitotoksik etkinin V79 379A hücrelerindeki gibi ikinci gün elde edildiği (% 91,125) saptanmıştır (Şekil 34.).

3.5.3. *Salvia fruticosa*'nın koloni formasyon sonuçları

Adaçayı esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisi koloni formasyon testi ile ölçülmüş, A549 hücrelerinde koloni sayısında doza bağımlı bir azalma olduğu görülmüştür (Şekil 35.).

3.6. *Pimpinella anisum*'un A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.6.1. *Pimpinella anisum*'un MTT testi sonuçları

Anason esansiyel yağı uygulanan hücrelerin MTT testi ile değerlendirilmesinde, A549 hücrelerinde tüm dozlarda doza ve zamana bağımlı anlamlı sitotoksik etki gözlenmiştir. A549 hücrelerinde maksimum yanıtın dördüncü gün 200 µg/ml dozda elde edildiği ve hücre canlılığını % 3,705'e kadar düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 36.).

V79 379A hücrelerinde de anasonun etkisi A549 hücrelerine benzerlik göstererek maksimum etkinin dördüncü gün 200 µg/ml dozda görüldüğü (%2,9825) saptanmıştır (Şekil 37.).

CHO hücrelerinde ise anasonun maksimum etkisinin üçüncü gün 200 µg/ml dozda görüldüğü ve bu dozun mitokondriyal aktiviteyi % 41,01'e düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 38.).

3.6.2. *Pimpinella anisum*'un NR ölçümü sonuçları

A549 hücrelerinde 100 ve 200 µg/ml anason dozlarının birbirine yakın bir grafik verdiği görülmüştür. Maksimum, anlamlı sitotoksik etkinin dördüncü günde 200 µg/ml anason dozunda elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 39.).

V79 379A hücrelerinde tüm anason dozlarının dört gün boyunca anlamlı sitotoksik etki meydana getirdiği lizozomal aktivitedeki maksimum düşüşün dördüncü günde en yüksek anason dozunda elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 40.).

CHO hücreleri anason esansiyel yağı ile muamele edildiğinde anasonun CHO hücre canlılığı üzerinde madde konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Anason uçucu yağının en yüksek konsantrasyonu (200 µg/ml) ile muamele edilen CHO hücrelerinin canlılığı üçüncü gün % 41,01 oranına kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 41.).

3.6.3. *Pimpinella anisum*'un koloni formasyon sonuçları

Kanserli hücrelerin agar tabakasında koloni oluşturabilmesine dayalı bir yöntem olan koloni formasyon testi ölçümlerinde, koloni sayılarında doza bağımlı bir azalma görülmemiştir (Şekil 42).

3.7. *Laurus nobilis*'in A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.7.1. *Laurus nobilis*'in MTT testi sonuçları

Defnenin A549 hücrelerindeki etkileri MTT testi ile değerlendirildiğinde, en düşük defne dozu olan 50 µg/ml'lik dozda anlamlı bir sitotoksik etki gözlenmezken, diğer dozlarda zamana ve doza bağımlı sitotoksik etki artmıştır. 200, 400 ve 800 µg/ml dozlarında dördüncü gün birbirine yakın sonuçlar elde edildiği ve maksimum etkinin (mitokondriyal aktivite % 33,705) görüldüğü saptanmıştır (Şekil 43.).

V79 379A hücrelerinde ise zamana ve doza bağımlı sitotoksik etkinin artışı en fazla sitotoksik etkinin dördüncü gün 400 ve 800 µg/ml dozlarda elde edildiği ve mitokondriyal aktivitenin % 3,0425 olduğu belirlenmiştir (Şekil 44.).

CHO hücrelerinde ise 800 µg/ml dozun dördüncü gün maksimum etkiyi meydana getirdiği ve mitokondriyal aktiviteyi % 5,7775 seviyesine kadar inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 45.).

3.7.2. *Laurus nobilis*'in NR ölçümü sonuçları

Defne esansiyel yağı uygulanan hücrelerde kolorimetrik NR ölçümleri sonucunda, A549 hücrelerinde defnenin en düşük dozu olan 50 µg/ml dozda lizozomal enzim miktarında defnenin etkisi değişkenlik göstermiştir. Üçüncü gün lizozomal enzim miktarında azalma saptanmıştır. İkinci ve dördüncü günlerde lizozomal enzim miktarında artış görülmüştür. Defnenin özellikle 200, 400 ve 800 µg/ml dozlarında lizozomal enzim miktarı doza ve zamana bağımlı olarak azalmıştır. Maksimum yanıtın ise dördüncü gün en yüksek doz olan 800 µg/ml defne dozunda elde edildiği (lizozomal enzim miktarı % 40,3175) belirlenmiştir (Şekil 46.).

V79 379A hücrelerinde ise defne değişken bir etki göstermiştir. Maksimum yanıt 400 ve 800 µg/ml dozlarda ikinci gün elde edilmiştir (%12,2075) (Şekil 47.).

CHO hücrelerinde ise defnenin 400 ve 800 µg/ml dozlarında anlamlı sitotoksik etki elde edilmiştir. Lizozomal enzim aktivitesi üçüncü gün 800 µg/ml dozda % 20,3375 olarak saptanmıştır (Şekil 48.).

3.7.3. *Laurus nobilis*'in koloni formasyon sonuçları

A549 hücreleri *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağı ile muamele edildiğinde inkübasyon boyunca agar tabakasında oluşan koloni sayıları madde konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır (Şekil 49.).

3.8. *Origanum onites*'in A549, V79 379A ve CHO Hücreleri Üzerine Etkileri

3.8.1. *Origanum onites*'in MTT testi sonuçları

Kekik esansiyel yağı uygulanan A549 hücrelerinde düşük konsantrasyonlu dozların (0,4, 2 ve 10 µg/ml) düşük sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu dozlar olan 50 ve 100 µg/ml dozların mitokondriyal aktiviteyi oldukça düşürdüğü gözlenmiştir. Maksimum sitotoksik etki 50 ve 100 µg/ml dozlarda üçüncü ve dördüncü gün elde edildiği, bu dozların toksik etki oluşturdukları saptanmıştır (Şekil 50.).

V79 379A hücrelerinde ise uygulanan düşük dozların (0,4 ve 2 µg/ml) ikinci ve üçüncü gün hücre popülasyonundaki canlılığı artırdığı dördüncü gün bu etkinin geçerek anlamlı sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Maksimum sitotoksik etki dördüncü gün 50 ve 100 µg/ml uygulanan dozlarda olduğu ve lizozomal enzim miktarı % 3,5 seviyesine kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 51.).

CHO hücrelerinde ise maksimum etkinin birinci günden başlayıp dört boyunca devam ettiği görülmüştür (Şekil 52.).

3.8.2. *Origanum onites*'in NR ölçümü sonuçları

Kekik esansiyel yağının A549 hücrelerindeki etkileri NR testi ile değerlendirildiğinde, A549 hücrelerinde 0,4 µg/ml dozun lizozomal enzim miktarında değişken bir grafik oluşturduğu saptanmıştır ilk iki gün enzim aktivitesinde artış görülmüş, üçüncü gün anlamlı sitotoksik etki gözlenmiş, dördüncü gün ise lizozomal enzim miktarında artış meydana gelmiştir. Kekiğin 10, 50 ve 100 µg/ml dozları sitotoksik etkiyi doza ve zamana bağımlı olarak arttırmıştır. Elde edilen maksimum yanıt kekiğin 50 ve 100 µg/ml dozlarında elde edilmiştir (lizozomal aktivite % 15,185) (Şekil 53.).

V79 379A hücreleri kekik esansiyel yağı ile muamele edildiğinde kekiğin V79 379A hücre canlılığı üzerinde madde konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Kekik uçucu yağının en yüksek

konsantrasyonu (100 µg/ml) ile muamele edilen V79 379A hücrelerinin canlılığı üçüncü gün % 16,6025 oranına kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 54.).

CHO hücrelerinde kekik esansiyel yağının maksimum sitotoksik etkisi 500 ve 100 µg/ml dozlarında üçüncü gün meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 55.).

3.8.3. *Origanum onites*'in koloni formasyon sonuçları

Kekik esansiyel yağının etkileri kanser hücrelerinin yumuşak agarda koloni oluşturabilme yeteneklerinin ölçülmesine dayalı koloni formasyon yöntemi ile değerlendirildiğinde, kekiğin doza bağımlı olarak meydana gelen koloni sayılarını azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 56.).

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

İlaç keşif süreci ve yeni bir ilaç keşfetmek oldukça karmaşık testlerden oluşur. Tek bir aktif madde için yapılan bir araştırmada binlerce kimyasal madde test edilir ve en uygun olanı seçilir. Bunlar yüksek riskli ve pahalı projelerdir. Başlangıç testlerinin uygun seçimi ön-klinik çalışmalarla ilgili giderleri azaltabilir. İstenilen ilaç adayının özgün sınıfı için uygun olan sayısız farklı *in vitro* aktivite yöntemi vardır, fakat toksisite yöntemleri nispeten azdır. Herhangi bir klinik deneme planlamadan önce hayvanlar üzerinde yapılması gereken toksisite çalışmaları tüm ilaç keşif sürecinin önemli bir bölümünü oluşturur. Toksisite testleri zaman alıcı, pahalı ve çok sayıda hayvan kullanılmasını gerektirir. Bu nedenle, *in vitro* yöntemler deneyler için gerekli hayvan sayısını azaltabilen ve bunun sonucu olarak giderleri azaltan bir metot olarak tercih edilmektedir.

Yeni anti kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı ençok kullanılan metot sitotoksisite testleridir. Anti kanser ilaçları tümör hücrelerine seçici olması gerekirken, bazen tüm hücreleri öldürebilir. Bu yüzden *in vitro* toksisite testlerinde en az toksik olan bileşikler seçilmelidir. Her bir dokunun toksisitesinin belirlenmesi için birçok *in vitro* metot geliştirilmiştir. Eğer bir bileşiğin toksisitesi belirlenecekse bu metotlardan bir ya da daha fazlası seçilmelidir. *In vitro* toksisite testleri sadece bileşiklerin hayvanlara verilecek akut oral toksisitesinin belirlenmesi için başlangıç dozunu saptamak amacıyla kullanılmasının yanında bileşiklerin LD50 (%50'sini öldürdüğü letal doz) değerlerini de saptarlar (Popiolkiewicz ve ark. 2005). *In vitro* genotoksisite ve sitotoksisite deneyleri yeni bir kimyasalın ya da ilacın mutajenik ve sitotoksik etkisinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Andreoli ve ark. 2003).

Günümüzde kanser tedavisinde bitkisel kaynaklı pek çok ilaç kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, çeşitli bitkilerden ekstrate edilen uçucu yağlar ve bu yağlardan izole edilen terpenoid bileşiklerin küçük hücreli olmayan akciğer kanserli A549 hücreleri ile sağlıklı V79 379A ve CHO hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemleri kullanılarak karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız ve sitotoksik etkisini araştırdığımız timol'ün farklı konsantrasyonunda, farklı hücreler ile yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlarda timol'ün uygulanan tüm dozlarında A549 hücrelerinde, sitotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır. V79 379A ve CHO sağlıklı hücrelerine göre insan akciğer karsinomasından türeyen malignant bir hücre ırkı olan A549 hücrelerinde daha anlamlı sitotoksik etkiler elde edilmiştir. Timolün yüksek konsantrasyonlardaki dozları (400 ve 800 μ M) çalışmada kullanılan üç hücrede de uygulanan MTT ve NR test yöntemleri ile değerlendirildiğinde, popülasyondaki hücre canlılığını %30 ile %3 arasında değişen seviyeye kadar düşürdüğü ve bu dozların toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle hücre kültüründe sitotoksikite çalışmaları için daha düşük konsantrasyonlardaki dozların uygun olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla timol'ün 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M dozlarının çalışmada kullanılan üç hücre üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında, 200 μ M'lık dozu MTT testine göre değerlendirildiğinde hücre canlılığını yaklaşık olarak % 63,65 oranına düşürdüğü görülmüştür. NR testi ile değerlendirildiğinde, 200 μ M timol dozunun A549 hücrelerinde hücre canlılığını % 76,1775 oranına düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.). Sağlıklı bir hücre hattı olan ve fibroblastik bir karakter gösteren V79 379A hücrelerinde timol'ün düşük dozlarının (50, 100 ve 200 μ M) mitokondriyal aktiviteyi % 71,11 oranına kadar düşürdüğü saptanmıştır. Timol'ün sitotoksik etkisinin kanserli bir hücre hattı olan A549 hücrelerinde sağlıklı V79 379A ve CHO hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Timol'ün hücreler üzerindeki etkileri NR testi ile değerlendirildiğinde, A549 hücrelerinde ilk üç gün konsantrasyona ve doza bağımlı sitotoksik etkinin arttığı tespit edilmiştir. Dördüncü gün A549 hücrelerinde lizozomal enzim miktarında DMSO'yu aşmayan bir artış görülmüştür. Lizozomal enzimlerin apoptosiz de rol aldıkları düşünüldüğünde bu etki apoptosiz ile ilişkilendirilebilir. Sağlıklı hücreler olan V79 379A ve CHO hücrelerinde de timolün doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir.

Stammati ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada timol'ün toksik etkisi mikrobiyal ve memeli hücre kültürü yöntemleri ile araştırılmıştır. Hep-2 hücreleri kullanılarak timolün toksik etkisi Neutral Red (NR) , koloni formasyonu ve

toplam protein içeriği yöntemleri ile değerlendirilmiş ve timolun doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. NR deneyi ile Hep-2 hücrelerinde timol'ün IC50 değeri 710 μ M olarak bulunmuştur (Stammati ve ark. 1999). Bu değer bizim verilerimizle uyuşmamaktadır. Bunun nedeni farklı hücre tiplerinde bir maddenin etkisinin farklı olabileceğidir (Zeytinoğlu ve ark. 2003).

Sonuç olarak timol'ün MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemleri ile elde edilen verileri üç hücre tipinde karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde, timol'ün zamana ve doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki timol dozlarının sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik etkisinin A549 hücrelerine göre çok az olduğu saptanmıştır. Bu nedenle timol antikanser ilaç çalışmalarında ümit verici bir madde olabilir.

Kekik ve kekik uçucu yağının önemli bir bileşeni olan karvakrol, A549 hücrelerinde MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemlerine göre değerlendirildiğinde sitotoksik etki göstermiştir. Karvakrolun uygulanan yüksek konsantrasyonlu dozlarında tüm hücrelerde toksik etki tespit edilmiştir. Karvakrol uygulanan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri üç hücre tipi karşılaştırıldığında, kanserli A549 hücrelerine göre sağlıklı V79 379A ve CHO hücrelerine daha etkili olduğu görülmüştür. NR deneyine göre değerlendirildiğinde, CHO hücrelerinde lizozomal aktiviteyi daha az düşürdüğü saptanmıştır. Yapılan literatür araştırmalarına göre karvakrol'un antioksidan, antibakteriyel, antifungal (Zeytinoğlu ve ark. 2003) ve inseksidal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Ultee ve ark. 1998). Zeytinoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada karvakrol'un melanoma hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, *in vivo* çalışmada ise ratlarda DMBA ile indüklenen tümör oluşumu üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 1998). Hücre çoğalmasına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, karvakrol'ün A549 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır (Koparal ve Zeytinoğlu, 2003). Karvakrol ile ilgili bir diğer çalışmada karvakrol'un CO25 hücrelerinde etkisi MTT yöntemi ile araştırılmış, karvakrol'un IC50 değerinin 60 μ g/ml olduğu bulunmuştur (Zeytinoğlu ve ark. 2003). Hep-2 hücrelerinde yapılan bir sitotoksite çalışmasında, hücrelerin canlılığı ve proliferasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve apoptotik fenotipi indüklediği saptanmıştır. Koloni formasyonu yöntemi uygulanarak doza bağımlı

olarak tümör oluşumunu önlediği görülmüştür. NR yöntemine göre Hep-2 hücrelerindeki karvakrolun IC50 değeri 320 μ M bulunmuştur. Bu değer bizim çalışmamızda bulunan sonuçları desteklemektedir.

Halk arasında soğuk algınlığının tedavisinde kullanılan, bununla birlikte pek çok farmasötik preparatların içeriğinde bulunan mentolün sitotoksik etkisini araştırmak için uyguladığımız MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemlerine göre, mentol'ün yüksek konsantrasyonlu dozlarında (750 ve 1000 μ M) A549 ve V79 379A hücrelerinde hücre canlılığını % 60–80 inhibe ettiği, CHO hücrelerinde ise mitokondriyal aktiviteyi %80 seviyesine kadar düşürdüğü saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda mentol'ün düşük konsantrasyonlu dozlarının akciğer kanserli A549 hücrelerine zarar vererek hücre canlılığını inhibe ettiğini, aynı konsantrasyonlardaki dozların sağlıklı CHO ve V79 379A hücrelerinde sitotoksik etki oluşturmadığını belirlenmiştir. Neutral Red sonuçlarına göre mentol'ün hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin geçici olduğu görülmüştür. Hartmann ve Speit'in yaptıkları bir çalışmada, D-mentol'ün 2000 μ M'lık dozunun V79 hücrelerinin canlılığını %63'e düşürdüğü tespit edilmiştir (Hartmann ve Speit, 1997). Mentol'ün MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemlerinde uygulanan düşük dozlarda A549 hücrelerine spesifik ve uzun süreli olmayan etkisi mentol'ün A549 hücreleri için kanser tedavisinde kullanılabilecek etken bir madde olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle sonuçlarımız *in vivo* çalışmalarına bir basamak oluşturabilir.

Antibakteriyal (Santos ve ark 2001) ve antitümoral (Moteki ve ark. 2002) etkiye sahip 1,8 sineol'ün A549, V79 379A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla uygulanan MTT, Neutral Red ve koloni formasyonu yöntemlerinden elde edilen bulgulara göre 1,8 sineolün hücreler üzerinde düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Kanserli bir hücre cell line'ı olan A549, fibroblastik karakter gösteren V79 379A ve epitelyal özellik gösteren CHO hücreleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında 1,8 sineol'ün CHO hücrelerine daha etkili olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre 1,8 sineol'ün daha yüksek konsantrasyonlu dozlarının hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiği önerilebilir.

Salvia fruticosa (adaçayı) uçucu yağıyla yapılan çalışmalar bu bitkinin

antibakteriyal, antifungal, antiviral, ve sitostatik özellik gösterdiğini ortaya koymuştur (Sivropoulou ve ark. 1997). Ayrıca Sivropoulou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Salvia fruticosa* uçucu yağının etanolde içinde çözünmüş çeşitli konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi tripan mavisi yöntemi kullanılarak Vero hücreleri üzerinde araştırılmıştır. *Salvia fruticosa* esansiyel yağının 1/500 oranındaki etanol dilüsyonlarının hücre canlılığını tamamen yok ettiği saptanmıştır (Sivropoulou ve ark. 1997). Bizim çalışmamızda *Salvia fruticosa*'nın etanol içinde çözülüş belirlenen konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri MTT, NR ve koloni formasyonu deneylerinde belirlenmiştir.

MTT deneylerinde adaçayının, tüm konsantrasyonlarının A549 hücrelerinde uzun süreli sitotoksik etkili oldukları, düşük dozlarının (12,5-25-50 µg/ml) ise V79 379A ve CHO hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin geçici olduğu saptanmıştır.

Adaçayının sitotoksik etkisi NR yöntemi ile değerlendirildiğinde, bu uçucu yağın düşük konsantrasyonlu dozlarının A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkili oldukları, V79 379A hücrelerinde ise düşük sitotoksik cevap oluşturdukları belirlenmiştir. CHO hücrelerinde adaçayı dozlarının sitotoksik etkili olmadıkları saptanmıştır. Koloni formasyonu deneylerinde adaçayının düşük dozlarında sitotoksik aktiviteye sahip olmadığı yüksek konsantrasyonlarındaki dozlarında ise sitotoksik etki elde edildiği görülmüştür. NR, MTT ve koloni formasyonu yöntemlerinden elde edilen verilerde, adaçayının A549 hücrelerinde doza bağımlı ve etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu, düşük konsantrasyonlu dozlarının sağlıklı hücrelerde çok düşük toksisite gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu bulgulara göre, adaçayının düşük konsantrasyonlu dozlarının kanser tedavilerinde (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde kullanılabilir olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar adaçayının *in vivo* deneysel çalışmalarda denenebileceğini ve yararlı sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir.

Pimpinella anisum (anason) esansiyel yağının sitotoksik etkisini belirlemek için MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemleri uygulanmış, mitokondriyal aktiviteye dayalı bir yöntem olan MTT testi sonuçları A549, V79 379A ve CHO hücrelerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, anasonun doza ve zamana bağımlı sitotoksik etkisinin arttığı saptanmıştır. A549 ve

V79 379A hücrelerinde birbirine yakın cevaplar elde edilmiştir. CHO hücrelerinde ise anasonun mitokondriyal aktiviteyi daha az inhibe ettiği görülmüştür. Neutral Red yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlara göre, anasonun uygulanan tüm konsantrasyonların hücrelerin lizozomal aktivitesini doza bağımlı olarak azalttığı, anasonun A549 hücrelerinde hücre çoğalımını inhibe edici etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır.

Laurus nobilis (defne) uçucu yağının sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT, NR ve koloni formasyonu testlerine göre, defnenin V79 379A hücrelerine daha sitotoksik etkili olduğu görülmüştür.

Günümüzde halk arasında geniş bir kullanıma sahip olan kekiğin (*Origanum onites*) uçucu yağıyla yapılan bilimsel çalışmalar, bu bitkinin antiviral, antiparazitik ve antibakteriyel (Sivropoulou ve ark, 1996) antioksidan, antifungal, inseksidal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Erdemgil 1992). Çalışmamızda kekik uygulanan V79 379A, CHO ve A549 hücrelerinde kekiğin MTT, NR ve koloni formasyonu yöntemleri ile elde edilen sonuçlarında 50-100 µg/ml konsantrasyonlarındaki dozlarının çalıştığımız üç hücre tipinde de toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Uygulanan tüm dozlarda sitotoksik etkinin elde edildiği ancak bu etkinin, A549 hücrelerine spesifik olmadığı görülmüştür. *Origanum onites* L. uçucu yağının içeriğinin detaylı olarak araştırıldığı çalışmalarda uçucu yağ içindeki ana bileşenlerin; karvakrol (%65.91), linalool (%14.84), timol (%3.64), olduğu belirlenmiştir (Erdemgil 1992; Aydın ve ark. 2005; Kamel ve ark. 2001; Skoula ve ark. 1999). Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarada, karvakrol'un çok düşük dozlarda hücreler üzerinde toksik etkili olduğunu, hücre canlılığını düşürdüğünü saptamıştık. Doğal bir bileşik olan karvakrol ve kekik uçucu yağının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, kekik esansiyel yağının hücrelerin çoğalımı üzerinde inhibe edici etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kekik uçucu yağının, yüksek oranlarda karvakrol ve timol içermesi olabilir.

Doğal bileşikler, yayılımı durdurulması zor kanser tiplerinin gelişiminin önlenmesinde, durdurulmasında ya da geri dönüşümünde kullanılabilir olduğu için

çalışmamızda bazı bitki ekstralarının sitotoksik etkileri saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulguların *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerektiği, bulgularımızın *in vivo* ve antineoplastik etki çalışmaları için ön verileri oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgül, A. ve Kıvanç, M., (1988), *Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi*, International Journal of Food Microbiology, **6**, 263-268.
- Akgül, A., Kıvanç, M. ve Sert, S., (1991), *Effects of carvacrol on growth and toxin production by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus*, Sciences des Aliments, **11**, 361-370.
- Alam, K., Nagi, M.N., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Rikabi, AC. ve Al-Bekari A.M., (1999), *The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice*, Pharma. Research, **40(2)**.
- Ali, A.M., Umar-Tsafe, N., Mohamed, S.M., Inayat-Hussain, S.H., OO, K.T., Yusoff, K., Osman, A.N. ve Din, L.B., (2001), *Apoptosis induction in CEM-SS T-Lymphoblastic leukemic cell line by goniothalamin*, J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys., **5**, 227-235.
- Almeida, A.B.A., Melo, P.S., Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Carli, L., Nunes, D.S., Haun, M. ve Souza Brito, A.R.M., (2003), *European Journal of Pharmacology*, **472**, 205-212.
- Andreoli, C., Gigante, D. ve Nuziata, A., (2003), *A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim reducing the toxicity of smoke*, Toxicology in Vitro, **17**, 587-594.
- Anonim, (2003), *Antineoplastik (sitotoksik) ilaçlarla güvenli çalışma rehberi*, T.C. Sağlık Bakanlığı, Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü.
- Arıcan, G.Ö. ve Soy, N.N., (2005) *Effects of epirubicin and daunorubicin on cell proliferation and cell death in HeLa cells*, J. of Cell and Molecular Biology, **4**, 47-52.
- Aydın, S., Başaran, A.A., ve Başaran, N., (2005), *The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C*, Mutation Research, **581**, 43-53.
- Azzouz, M.A., ve Bullerman, L.B., (1982), *Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents*, Journal of Food Protection, **45**, 1298-1301.

- Barile, F.A., (1994), *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*, CRC Pres, Florida, USA.
- Begg, A.C., Sprang, D., Balm, A. ve Martin, J.M.C., (2002), Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction, *Radioterapy and Oncol.*, **62**, 335-343
- Bishop, C.D., (1995), *Antiviral activity of the essential oil of melaleuca +alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (Tea Tree) against tobacco mosaic virus*, *Journal of Essansial Oil Research*, **7**, 641-644.
- Borenfreund, E. ve Puerner, J.A., (1985), *Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*, *Toxicology Letters*, **24**, 119-124.
- Boskabady, M.H. ve Ramazani-Assari, M., (2001), *Relaxant effect of Pimpinella anisum on isolated guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s)*, *Journal of Ethnopharmacology*, **74**, 83-88.
- Boyle, W., (1955), *Spices and essential oils as preservatives*, *The American perfumer and Essensial Oil review*, **66**, 25-28,
- Bozkurt, B., Selçuk, T., Fırat, P., Kalyoncu, A. F. ve Artvinli, M.,(2004), *1972 2002 döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde akciğer kanseri tanısı konulan hastaların histolojik ve epidemiyolojik değerlendirmesi*, *Toraks Dergisi* cilt **5(3)**, 148-153.
- Bökesoy, A., Çakıcı, İ., Melli, M., (2000), *Farmakoloji Ders Kitabı*, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Bulychev, A., Trouet, A. ve Tulkens, P.,(1978), *Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts*, *Cell Res.* **115**, 343–355.
- Burt, S., (2004), *Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review.*, *Int. J. of Food Microbiol.*, **94**, 223-253.
- Carson, C.F., Cookson, B.D., Farrelly, H.D., ve Riley, T.V., (1995), *Susceptibility of methicilin-resistant Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia*, *J. of Antimicrobial Chemo.*, **35**, 421-424
- Collier, A.C. ve Pritsos, C.A., (2003), *The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT*, **66**, 281-287.

- Corr ea, D.H.A., Melo, P.S., de Carvalho, C.A.A., de Azevedo, M.B.M., Duran, N. ve Haun, M., (2005), *Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes*, European Journal of Pharmacology, **510**, 17-24.
- Darnel, j., Lodish, H. ve Baltimore, D., (1986), *Molecular cell biology*, Scientific American Books, 1035-1039.
- Deans, S.G., ve Ritchie, G., (1987), *Antibacterial properties of plant essential oils*, International Journal of Food Microbiology, **5**, 165-180.
- Dilsiz, N., *Molek ler biyoloji*, (2004), Palme Yayıncılık, Ankara, 155-177.
- De Vincenzi, M., Silano, M., Maialetti, F. ve Scazzocchio, B., (2002), *Constituents of aromatic plants: Eucalyptol*, Fitoterapia, **73**, 269-275.
- Doğan, A., Doğan, A.L., Canpınar, H. ve Demirpençe E., (2004), *Hidroksi renin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkileri*, Türk Biyokimya Dergisi, **29(3)**, 232-236.
- Duisken, M., Sandner, F., Bl meke, B. ve Hollender, J., (2005), *Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: identification of a new hydroxylated metabolite*, Biochimica et Biophysica Acta, **1722**, 304-311.
- Elegbede, J. A., Flores, R. ve Wang, R.C., (2003), *Perilly alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in Broto and A549 Cells Cultured In Vitro*, Life Sciences, **73**, 2831-2840.
- Erdemgil, Z., (1992), *Origanum onites L. u ucu yağının bileşimi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu  niv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Farhat, G.N., Affara, N.I. ve Gali-Muhtasib, H.U., (2001), *Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (Salvia libanotica) and its toxicity in mice*, Toxicon, **39**, 1601-1605.
- Fent, K., (2001), *Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples*, Toxicology in Vitro, **15**, 477-488.
- Franks, L.M. ve Teich, N.M., (1996), *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, Third Edition*, Oxford university Press.
- Freshney, I., (1994), *Culture of animal cells*, 3 rd Ed., John Wiley & Sons Inc., Publication, New York, USA, **486**.

- Fotakis, G. ve Timbrell, J.A.,(2006), *In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*, Toxicology Letters, **160**, 171-177.
- Gad, S.C., *In vitro toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- Gali-Muhtasib, H.U. ve Affara, N.I., (2000), *Chemopreventive effects of sage oil on skin papillomas in mice*, Phytomedicine, **7(2)**, 129-136.
- Gali-Muhtasib, H.U., Hilan, C. ve Khater, C., (2000), *Traditional uses of Salvia libanotica (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils*, Journal of Enhnopharmacology, **71(3)**, 513-520.
- Gelal, A., Jacob, P., Yu, L. ve Benowitz, N.L., (1999), *Disposition kinetics and effects of menthol*, Clinical Pharmacology Therapeutics **66**, 128-135.
- Genç, S., Akhisaroğlu, M., ve Genç, K., (2002), *Eritropoetin'in PC12 hücre Hattında Amiloid-Beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi*, Turkish Journal of Geriatrics, **5(1)**, 1-6.
- Genta, M.T., Villa, C., Mariani, E., Loupy, A., Petit, A., Rizzetto, R., Mascarotti, A., Morini, F. ve Ferro, M., (2002), *Microwave-assisted preparation of cyclic ketals from a cineole ketone as potential cosmetic ingredients: solvent-free synthesis, odour evaluation, in vitro cytotoxicity and antimicrobial assays*, I. J. of Pharmaceutics, **231**, 11-20..
- Giamakis, A., Kretsi, O., Chinou, I. ve Spyropoulos, C.G., (2001), *Eucalyptus camaldulensis: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and β -pinene by in vitro cultures*, Phytochemistry, **58**, 351-355.
- Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb, I. ve Paumgarten, F.J.R., (1998), *Mutagenicity testing of ($\pm$)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay*, Mutation Research, **416**, 129-136.
- Guenther, E., (1948), *The Essential oils*, D. Van Nostrand, New York, USA.
- Guyton, A.C., (1986), *Tıbbi fizyoloji*, Cilt: 1, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

- Hamasaki, K., Kato, K., Watanabe, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Yamamoto, A. ve Matsunaga, A., (1998), *Determination of l-menthol in pharmaceutical products by high performance liquid chromatography wiht polarized photometric detection*, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **16**, 1275-1280.
- Hartmann, A. ve Speit, G., (1997), *The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet Assay)*, Toxicology letters, **90**, 183-188.
- Hefnawy, Y., Moustafa, S. ve Marth, E., (1993), *Sensitivity of listeria monocytogenes to selected spices*, J. Food Protection, **56(10)**, 876-878.
- Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P. and Navarro, M.C., (2004), *Action of different monoterpenic compounds against Anisakis simplex s.l. L3 larvae*, Phytomedicine, **11**, 77-82.
- Holst, C.M. ve Oredsson, S.M., (2005), *Comparison of three cytotoxicity teste in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines*, Toxicology in Vitro, **19**, 379-387.
- Jayashree, T. ve Subramanyam, C., (1999), *Antiaflatoxicenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation*, Lettesin Appl. Microbiology, **28**, 179-183.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. ve Kelley, R.O., (1992), *Temel histoloji*, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. ve Weisslowicz, (1994), H., *Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent*. J. Appl. Bacteriol. **76**, 626-631.
- Kamel, M.S., Assaf, M.H., Hasanean, H.A., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K., (2001), *Monoterpene glucosides from Origanum syriacum*, phytochemistry, **58**, 1149-1152.
- Karp, G., (1999), *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Kayaalp, S.O., (2000), *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*, Hacettepe Taş Cilt 1, Ankara.

- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C.I., (1995), *Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens*, J. Agric. Food Chem., **43**, 2839-2845.
- Kirimer, N., Baser, K.H.C., Tümen, G., (1995), *Carvacrol rich plants in Turkey*, Chem. Nat. Compounds, **31**, 37–42.
- Kılıç, V.,(2002), *Kanserogenesis’de Ras ve P53 proteinlerinin rolü üzerine bir çalışma*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kıvçak, B. ve Mert, T., (2002), Short report, *Preliminary evaluation of cytotoxic properties of Laurus nobilis leaf extracts*, Fitoterapia, **73**, 242-243.
- Komissarova, E., Saha, S.K. ve Rossman, T.G., (2005). *Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example*, Toxicology and Applied Pharmacology, **202**, 99–107.
- Koparal, A.T., (2001), *Hücrelerdeki transformasyon gelişiminin moleküler yöntemlerle belirlenmesi*, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Koparal, A.T. ve Zeytinoğlu, M., (2003), *Effects of carvacrol on a non small cell lung cancer NSCLC cell line, A549*, Cytotechnology, **43**, 149-154.
- Korkmaz, S., (2002), *Paklitaksel, kesretin, ve berberinin A549, HeLa, HT-29, NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi*, doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kreja, L., Seidel H-J., (2002), “*On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549*,” Chemosphere, **49**, 105-110.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhães, P.J.C. ve Leal-Cardoso, J.H., (2002), *Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats*, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, **12(80)**, 1125-1131.
- Langdon, S.P., (2004), *Cancer Cell Culture, Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Lawless, J., (1995), *The Illustrated Encyclopedia of Essential oils, The Complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism*, Element Books.

- Loza-Tavera, H., (1999), *Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties*, Advances in Experimental Medicine and Biology, **464**, 49-62.
- Magyar, J. Szentandrassy, N. Bányász, T. Fülöp, L. Varró, A. ve Nánási, P.P., (2004), *Effects of terpenoid derivatives on calcium current in canine and human ventricular Cardiomyocytes* European J. of Pharma., **487**, 29-36.
- Mahmoud, S.S. ve Croteau, R.B., (2002), *Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants*, Trends in Plant Science, **7**, 366-373.
- Manou, L., Bouillard, L., Devleeschouwer, M.J. ve Barel, A.O., (1998), *Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test*, J. Appl. Microbiol., **84**, 368-376.
- Mathur, R., Gupta, S.K., Singh, N., Sandeep, M., Kochupillai, V. ve Velpandian, T., (2006), *Evaluation of The Effect of Withania somnifera Root Extract On Cell Cycle and Angiogenesis*, J. of Ethnopharmacology, **105(3)**, 336-344.
- Melo, P.S., Duran, N. ve Haun, M., (2001), *cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and Escherichia coli*, Toxicology Letters, **159(3)**, 135-141.
- Miyazawa, M., shindo, M. ve Shimada T., (2001), *Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from Eucalyptus polybractea, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes*, The American Society for Pharmacology and Experimental therapeutics, **29(2)**, 200-205.
- Mohamed, S.M., Ali, A.M., Rahmani, M., Wiart, C., Dhaliwal, J.S. ve Yusoff, K., (2000), *Apoptotic and necrotic cell death manifestations in leukemic cells treated with methylgerambullin a sulphone from Glycosmis calcicola*, J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys, **4**, 253-261.
- Morris, J.A., Khetry, A. ve Seitz, E.W., (1979), *Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils*, J. Am. Oil Chem. Soc., **56**, 595-599.
- Moteki, H., Hibasami, H., Yamada, Y., Katsuzaki, H., Imai, K. ve Komiya, T., (2002), *Specific induction of apoptosis by 1,8 cineole in two human leukemia cell lines, but not a human stomach cancer cell line*, Oncol. Lett., **9**, 757-760.

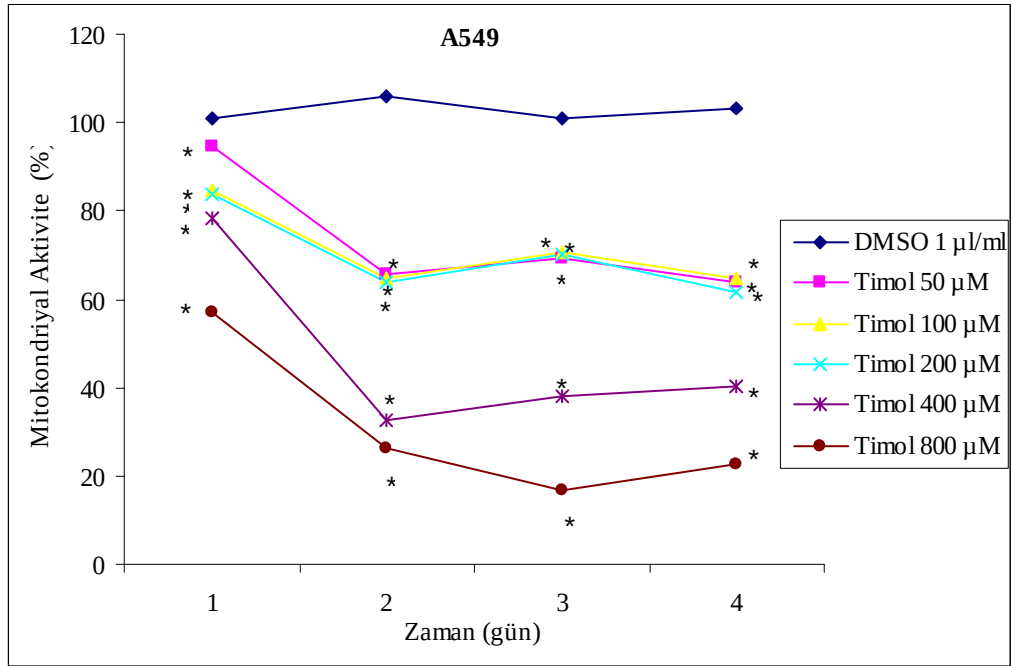
- Mourey, A. ve Canilac, N., (2002), *Anti-Listeria monocytogenesis activity of essential oils components of conifers*, Food Control, **13**, 289-292.
- Mucciarelli, M., Camusso, W., Berteà, C.M., Bossi, S. ve Maffei, M., (2001), *Effect of (+)-pulegone and other oil components of Mentha piperita on cucumber respiration*, Phytochemistry, **57**, 91-98.
- Mühbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A. ve Felix, R., (2003), *Common herbs, essential oils, and monoterpenes potentially modulate bone metabolism.*, Bone **32**, 372-380,
- Ozban, N., (1988), *Hücre*, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 37-38.
- Pandey, R., Karla, A., Tandon, S., Mehrota, N., Singh, H.N. ve Kumar, S., (2000), *Essential oil compounds as potent of nematicidal compounds*, J. of Phytopathology, **148**, 501-502.
- Perry, N., Bollen, C., Perry, E. ve Ballard, C., (2003), *Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial*, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, **75**, 651-659.
- Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilacqua, C.M.L. ve Luciano, J.H.S., (2002), *Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn. And eugenol against Haemonchus*, Veterinary Parasitology, **109**, 59-63.
- Pourgholami, M.H., Majzoob, S., Javadi, M., Kamalinejad, M., Fanaee, G. H. R. ve Sayyah, M., (1999), *The fruit essential oil of Pimpinella anisum exerts anticonvulsant effects in mice*, Journal of Ethnopharmacology, **66**, 211-215.
- Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S. ve Mazurek, A., (2005), *In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides*, Cancer Letters, **229**, 67-75.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W. ve Doolittle, D.J., (2002), *Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate*, Toxicology In Vitro, **16**, 599-607.
- Raven, P.H. ve Johnson, G.B., (1992) *Biology*, Third Edition, Mosby-Year Book, Inc.

- Sahraei, H., Ghoshooni, H., Salimi, S.H., Astani, A. M., Shafaghi, B., Falahi, M. ve Kamalnegad, M., (2002), *The effects of fruit essential oil of the Pimpinella anisum on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice*, Journal of Ethnopharmacology, **80**, 43-47.
- Santos, F.A ve Rao, V.S.N., (2001), *1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats*, Digestive Diseases and Sciences, **46(2)**, 331-337.
- Sayyah, M., Valizadeh, J. ve Kamalinejad, M., (2002), *Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures*, Phytomedicine, **9**, 212-216.
- Sanchez, M.E., Turina, A.V., Danial, A.G., Nolan, M.V. ve Perillo, M.A., (2004) *Surface activity of thymol: implication for an eventual pharmacological activity*, Colloids and Surfaces B., **34**, 77-86,.
- Shi, M., Cai, Q., Y,L., Mao, Y., Ming, Y. ve Ouyang, G., (2006), *Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells*, Cell Biology International, **30**, 221-226.
- Shojaei, A.H., Khan, M., Lim, G. ve Khosravan, R., (1999), *Transbuccal permeation of a nucleoside analog dideoxycytidine: effects of menthol as a permeation enhancer* International Journal of Pharmaceutics **192**, 139-146,
- Signorelli, P. ve Ghidoni, R., (2005) *Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises*, Journal of Nutritional Biochemistry, **16**, 449-466.
- Simic, M., Kundakovic, T. ve Kovacevic, N., (2003), *Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts*, short report, Fitoterapia, **74**, 613-616.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. ve Arsenakis, M., (2006), *Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils*. J. Agric. Food Chem. **44(5)**, 1202-1205.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. ve Arsenakis, M., (1997), *Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of Salvia fruticosa Essential oil*, J. Agric. Food Chem., **45**, 3197-3201.

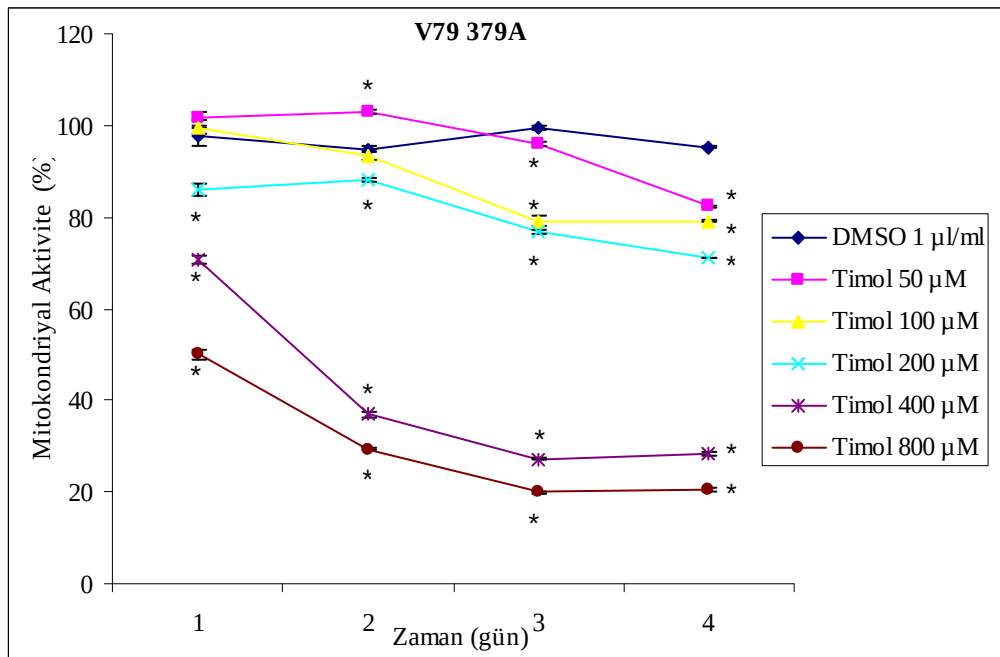
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G. ve Johnson, C.B., (1999), *A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus Origanum (Labiatae)*, *Phytochemistry*, **52**, 649-657.
- Soottitantawat, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. ve Linko, P., (2005), *Microencapsulation of L-menthol by spray drying and its release characteristics*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6(2)**, 163-170.
- Stammati, A., Bonsı P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alokomi, H.-L. ve Wright, A., (1999), *Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assay .*, *Food and Chemical Toxicology* , **37**, 813-8231.
- Subhashini, J., Mahipal, S.V.K. ve Reddanna, P., (2005), *Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro*, *Cancer Letters*, **224(1)**, 31-43.
- Szentandrassy, N., Szentesi, P., Magyar, J., Nanasi, P.P ve Csernoch, L., (2003), *Effect of thymol on kinetic properties of ca and K currents in rat skeletal muscle*, *BMC Pharmacol.*, **3**, 9.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A. ve Sokmen, (2005), *Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey*, *Food Chemistry*, **95(2)**, 200-204.
- Thompson, D.P., (1996), *Inhibition of growth of mycotoxigenic Fusarium species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol*. *J. Food Prot*, **59**, 412-415.
- Ultee, A., Gorris, L.G.M. ve Smid, E.J.,(1998), *Bactericidal activity of carvacrol towards the food-pathogen Bacillus cereus*, *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 211-218,0
- Ultee, A., Kets, E.P.W. ve Smid, E.J., (1999), *Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65(10)**, 4606-4610.
- Ultee, A. ve Smid, E.J., (2001), *Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus*, *Inter. J. of Food Microbiol.* **64**, 373-378.
- Unat, E.K., (1978), *Temel mikrobiyoloji*, İ. Ü. Basımevi ve Film Merkezi, III. Baskı, İstanbul.

- Van De Braak, S.A.A.J. ve Leijten, G.C.J.j., (1999), *Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union*, CBI, Center for The Promotion of Imports From Developing Countries, Rotterdam, 116.
- Weyermann, J., Lochmann, D., ve Zimmer, A., *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, International Journal of Pharmaceutics, **288**, 369-376.
- Wu, F., Lukinius, A., Bergström, M., Eriksson, B., Watanabe, Y. ve Lågström, B., (2005), *A Mechanism behind the antitumour effect of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON): disruption of mitochondria*, European Journal of Cancer, **35(7)**, 1155-1161.
- Yalçın, A., Nevruz, O., Arpacı, F., Gülhan, Ö., Hasde, M. ve Beyan, C., (2003), *Gülhane Tıp Dergisi*, **45(2)**, 96-200.
- Yano, C.L. ve Marcondes, M.C.C.G., (2005), *Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro*, Free Radical Biology & medicine, **39(10)**, 1378-1384.
- Zeytinoğlu, H., Incesu, Z., ve Baser, K.H.C., (2003), *Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene*, Phytomedicine, **10**, 292-299
- Zeytinoğlu, M., Aydın, S., Oztürk, Y. ve Baser, K.H.C., (1998), *Inhibitors effects of carvacrol on DMBA induced pulmononary tumorigenesis in rats*, Acta Pharmaceutica Turcica, **2**, 93-98.

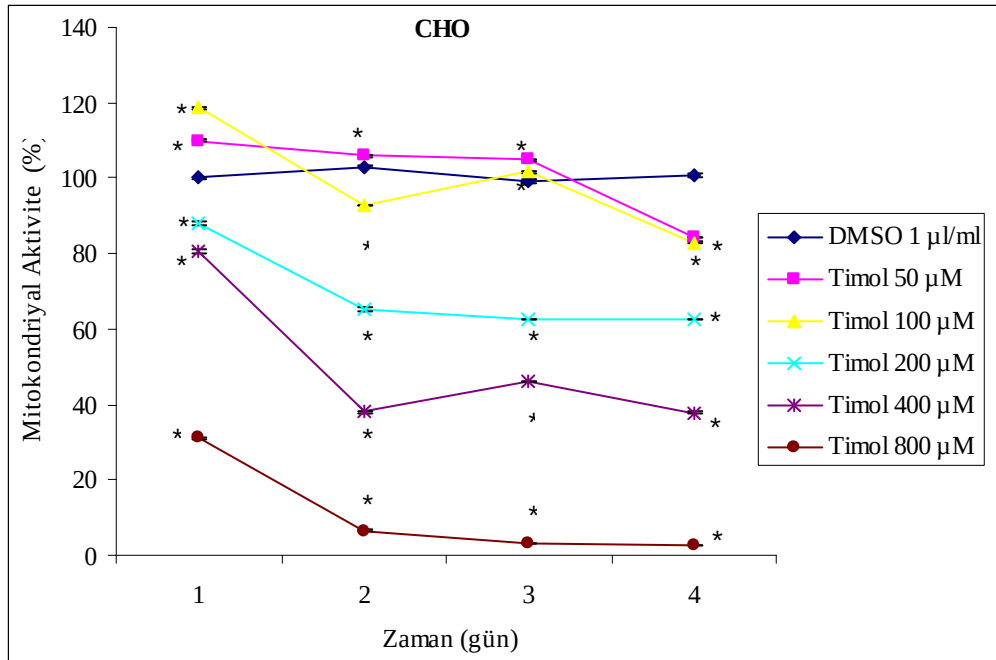
EK: DENEY SONUÇLARI



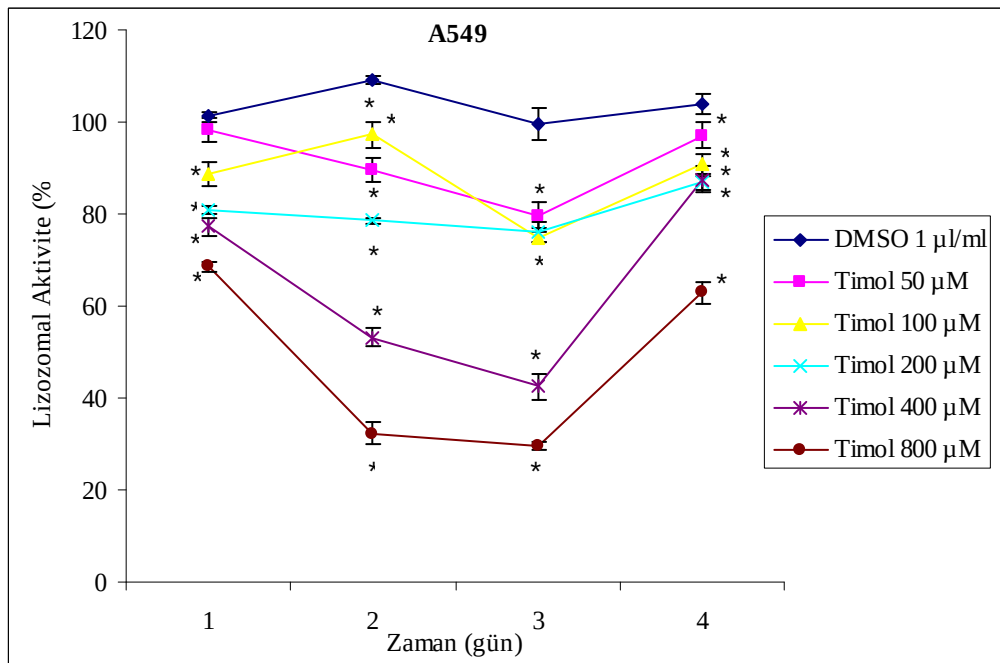
Şekil 1.Timol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



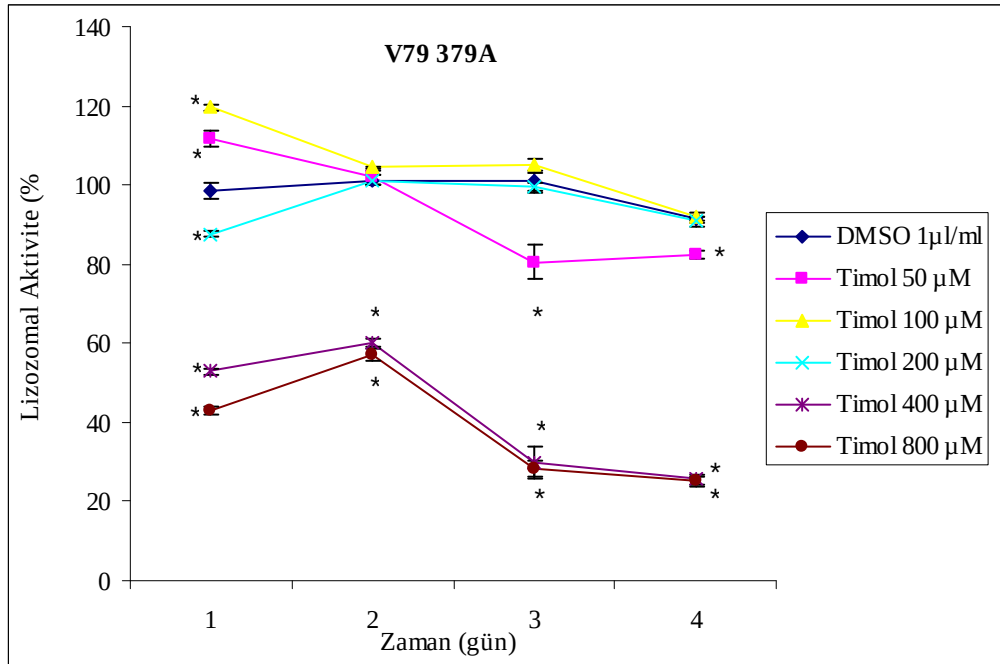
Şekil 2.Timol'ün V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



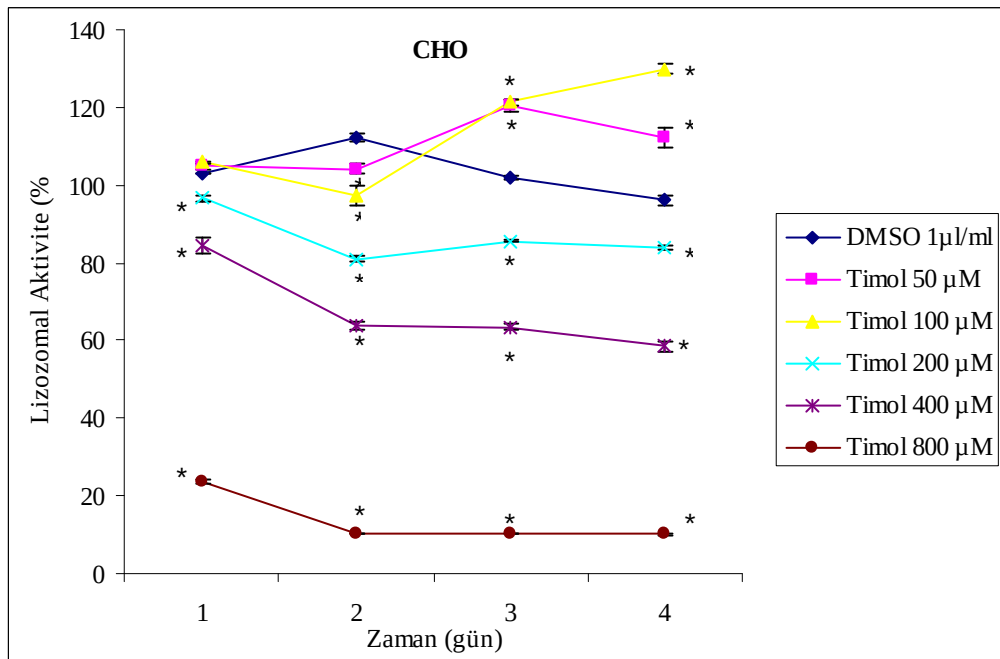
Şekil 3. Timol'ün CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



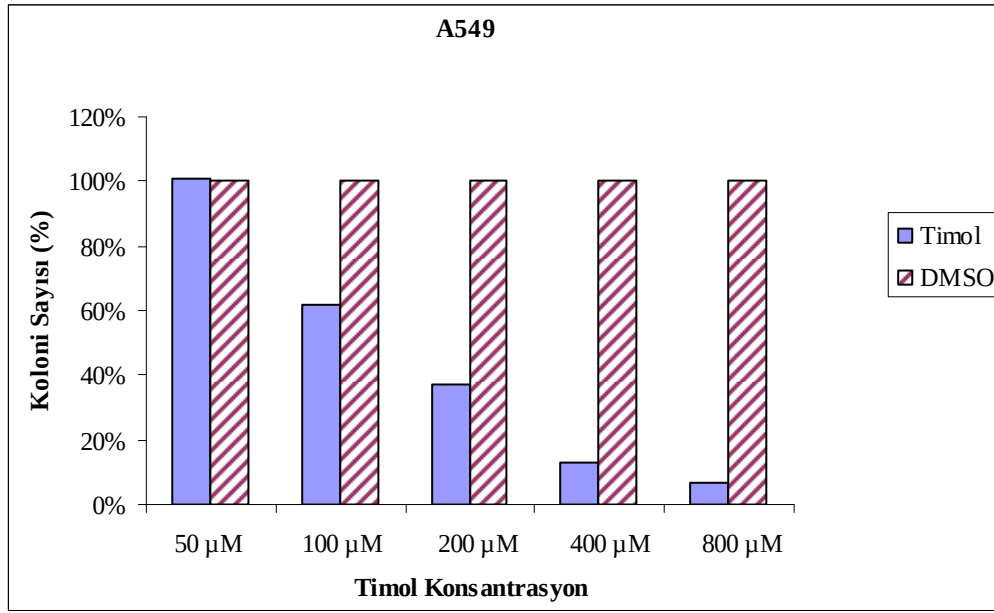
Şekil 4. Timol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



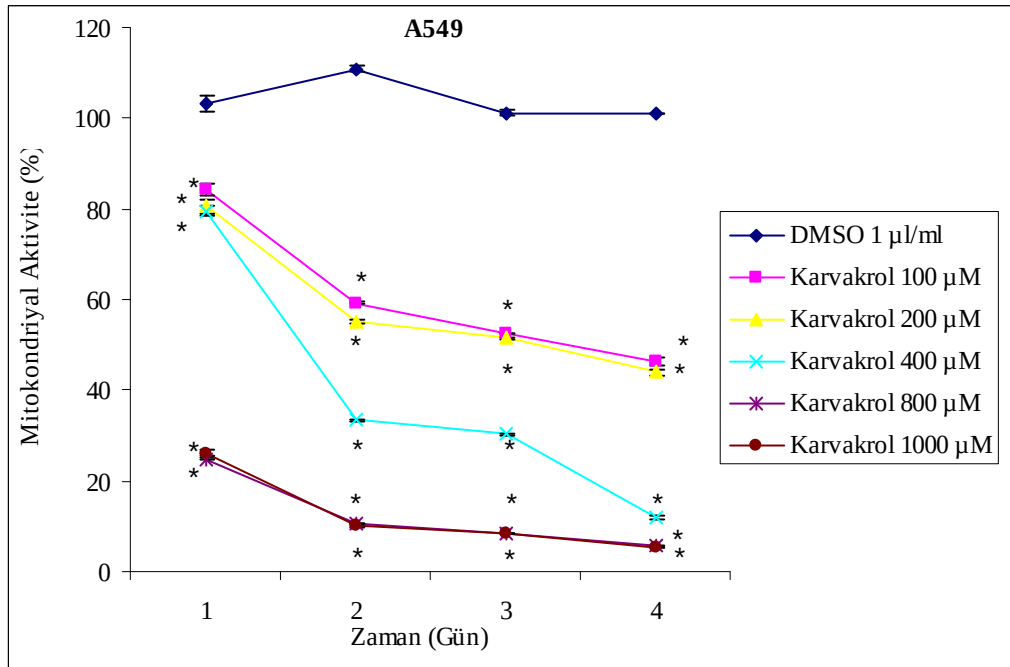
Şekil 5. Timol'ün V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



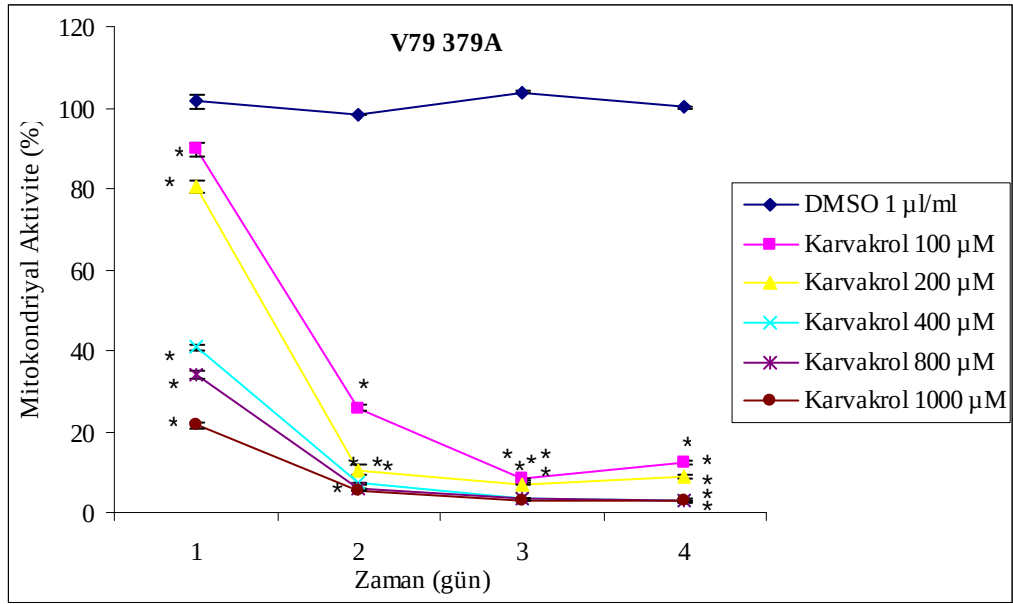
Şekil 6. Timol'ün CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



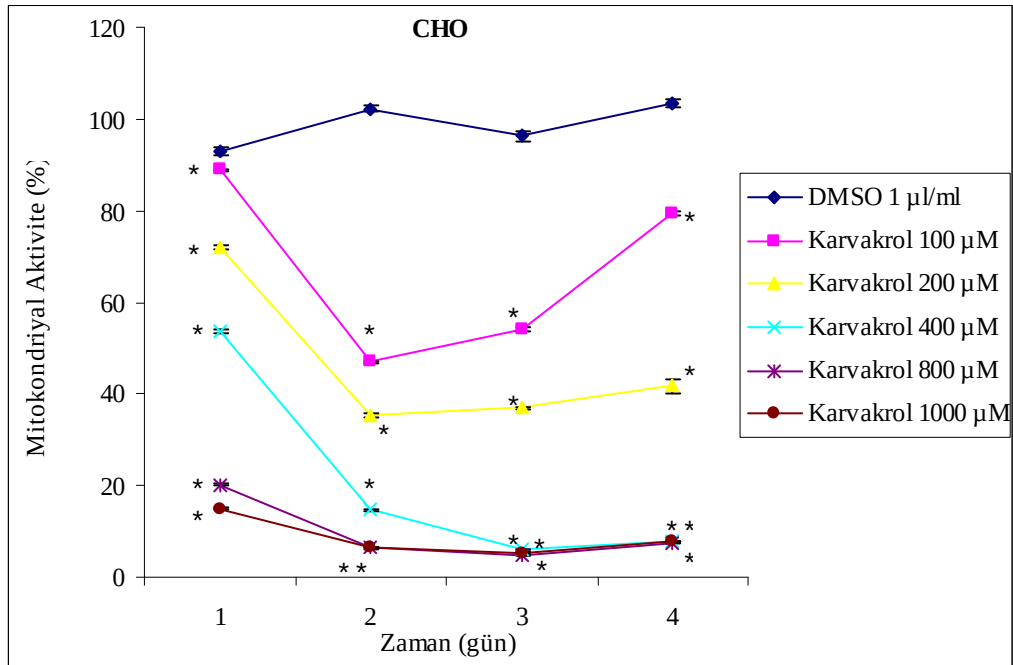
Şekil 7. Timol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



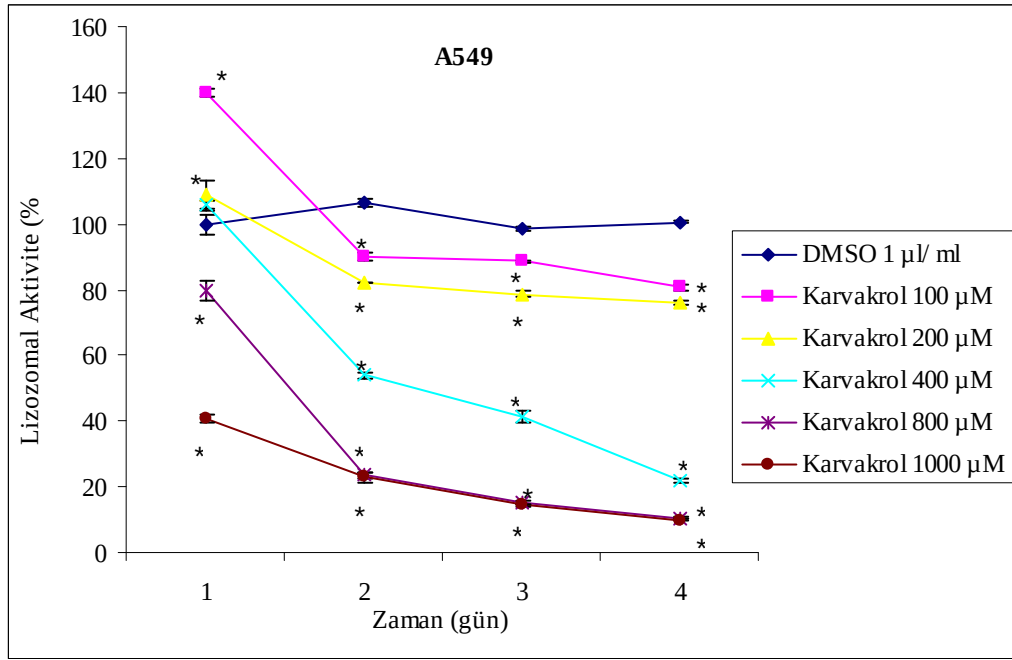
Şekil 8. Karvakrol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



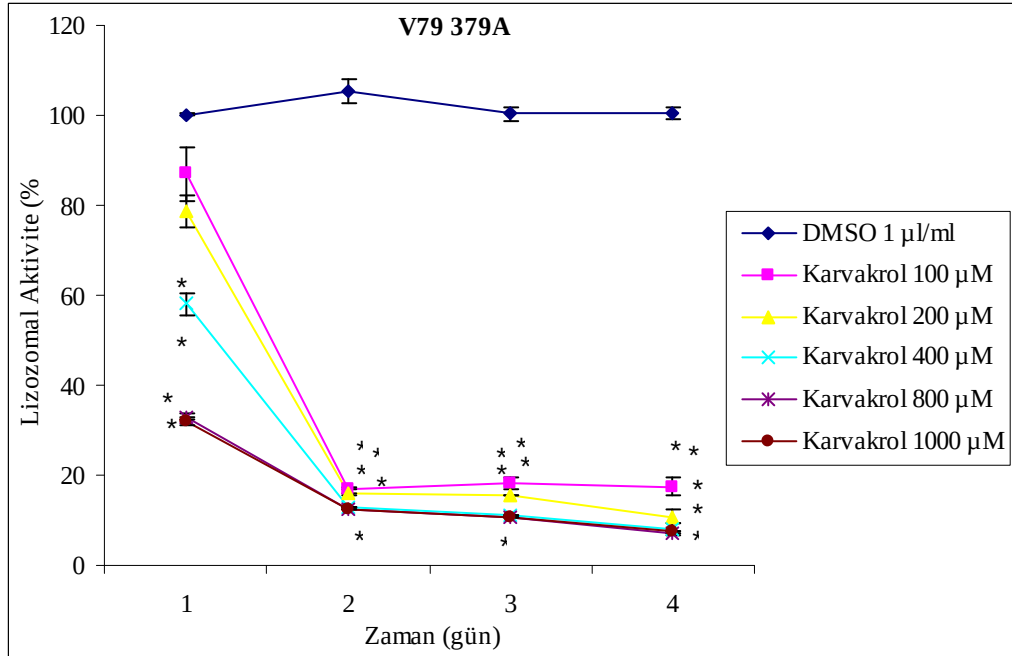
Şekil 9. Karvakrol'un V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



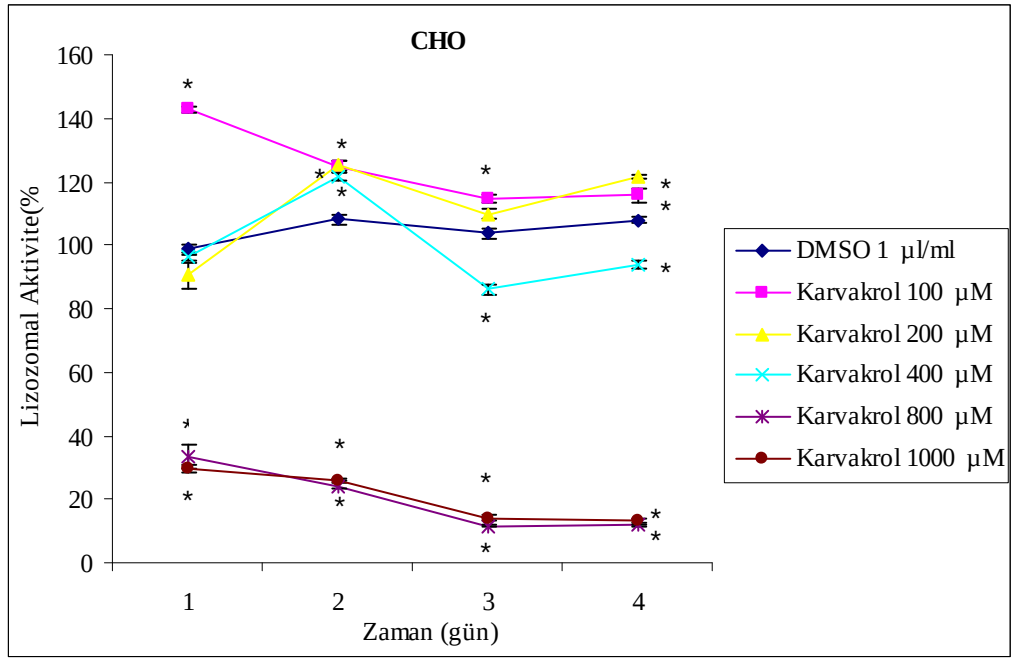
Şekil 10. Karvakrol'un CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



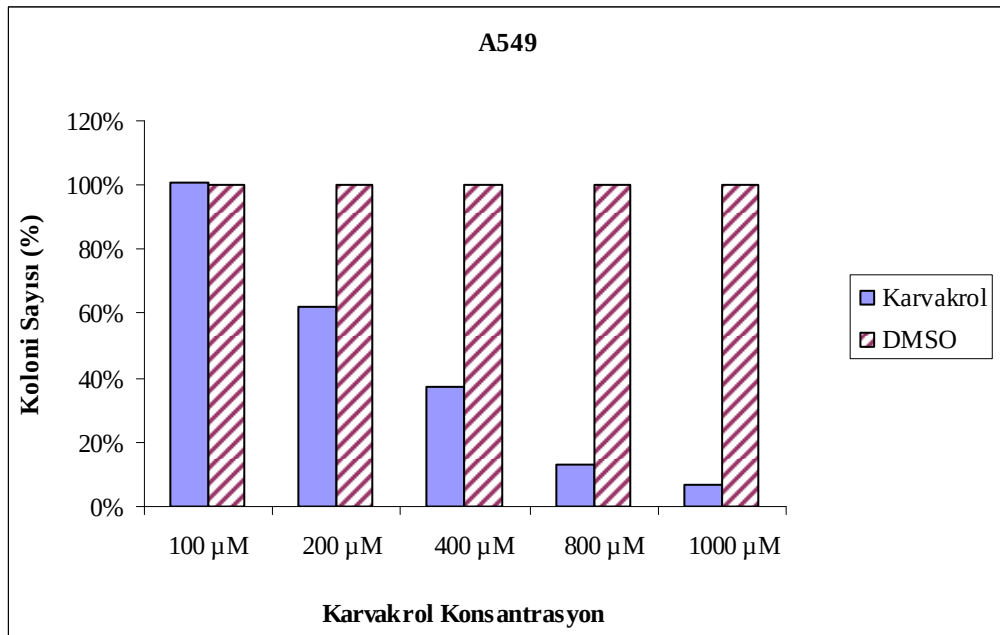
Şekil 11. Karvakrol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



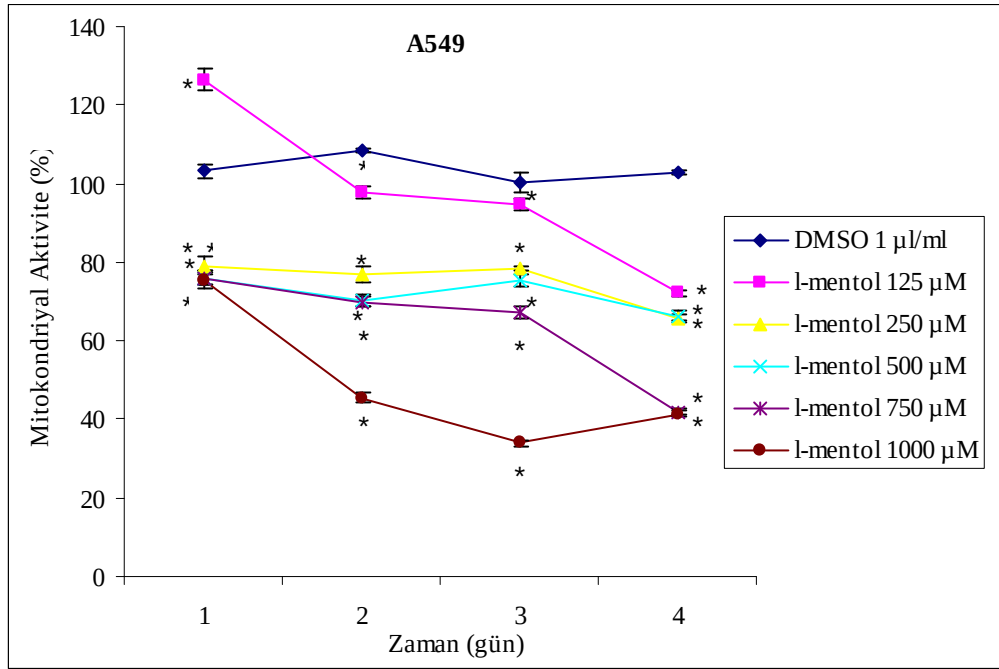
Şekil 12. Karvakrol'un V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



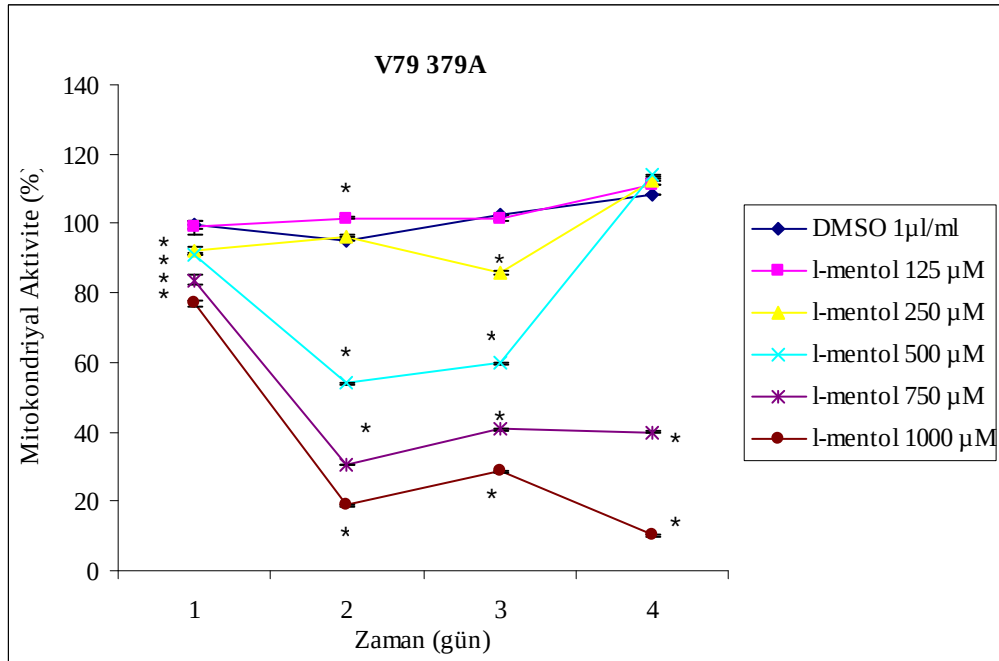
Şekil 13. Karvakrol'un CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



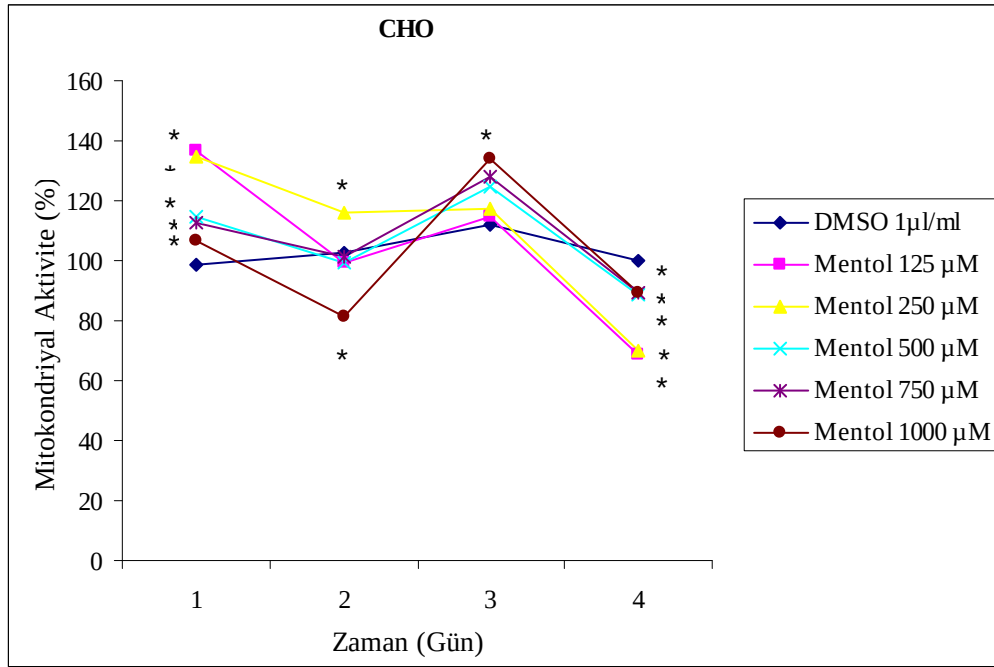
Şekil 14. Karvakrol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



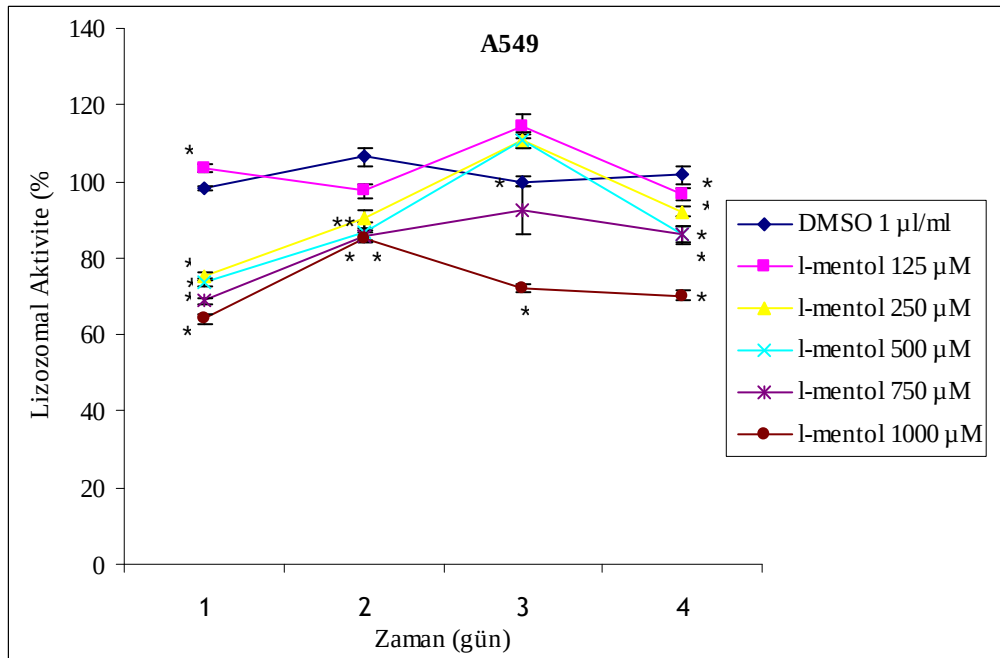
Şekil 15. L-Mentol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



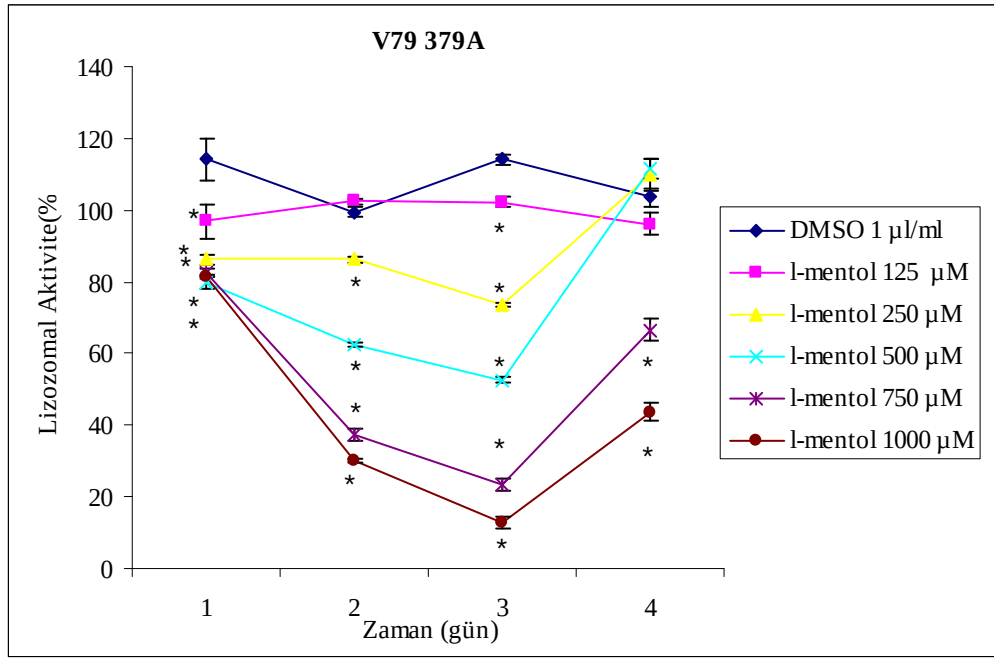
Şekil 16. L-Mentol'un V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



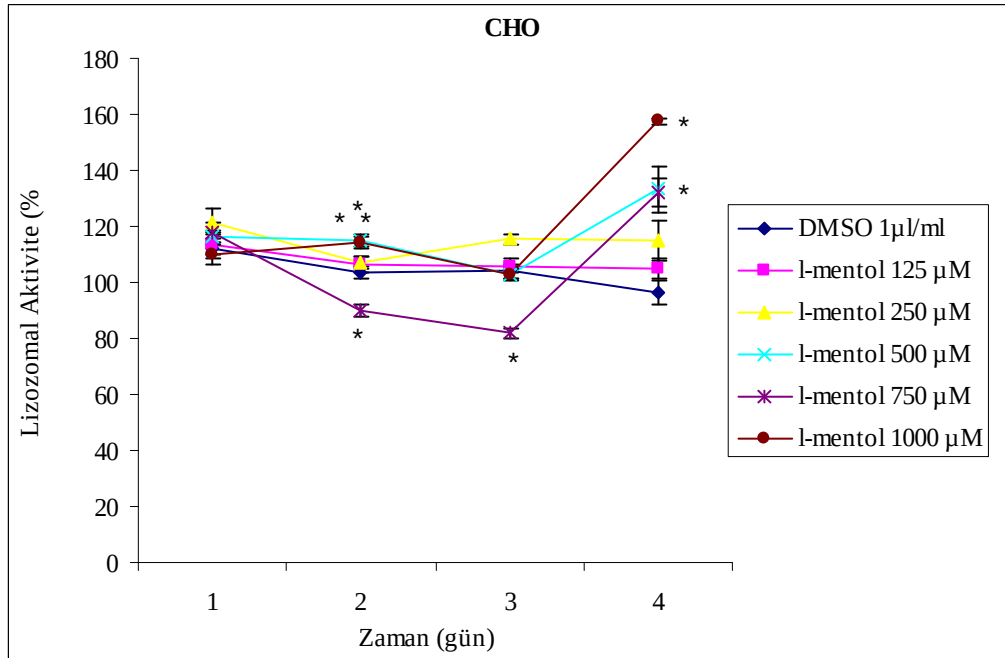
Şekil 17. L-Mentol'un CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



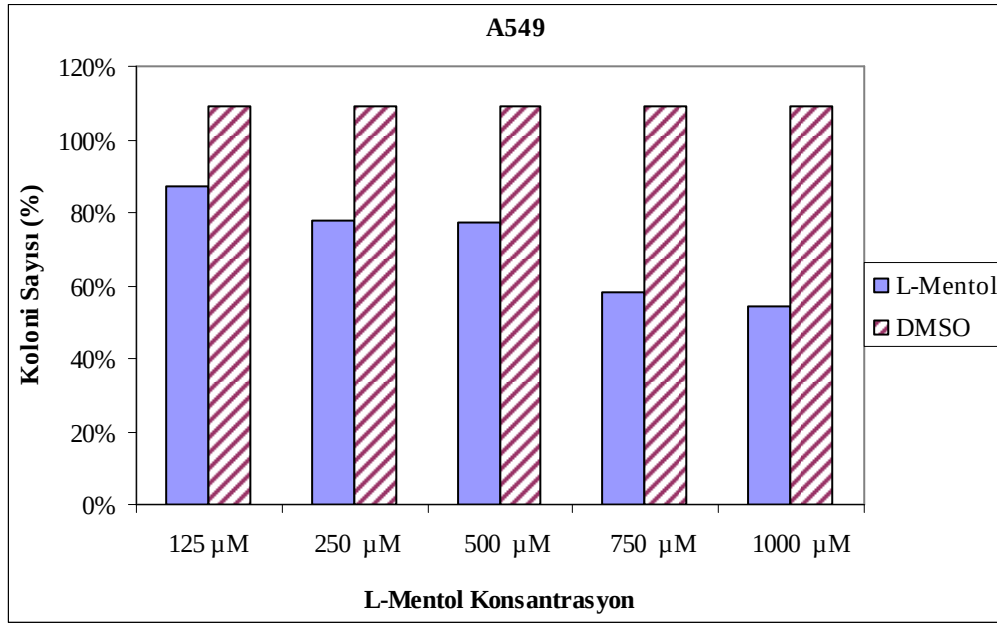
Şekil 18. L-Mentol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



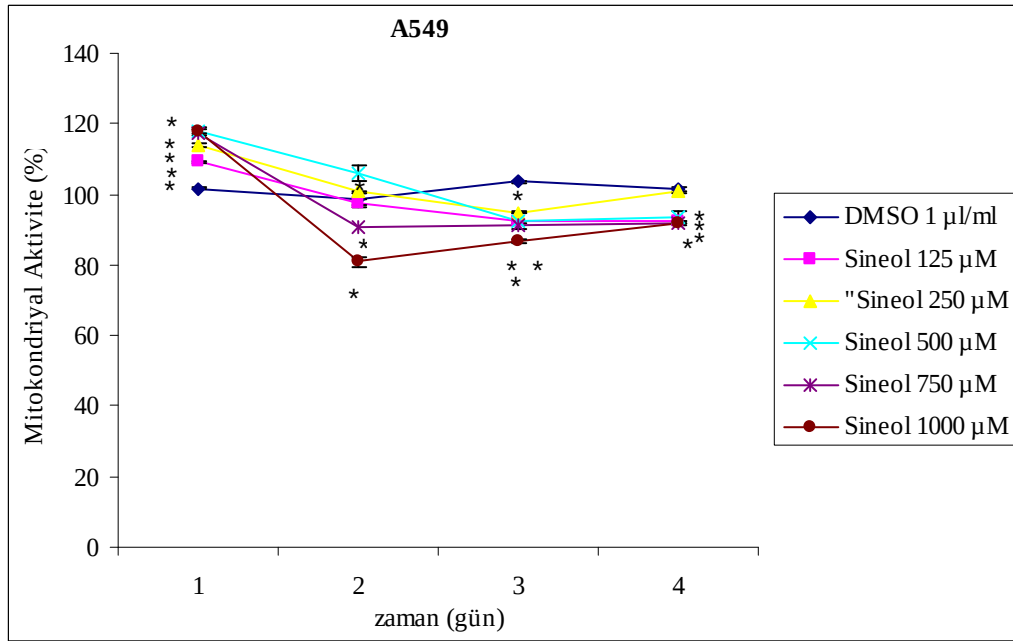
Şekil 19. L-Mentol'un V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



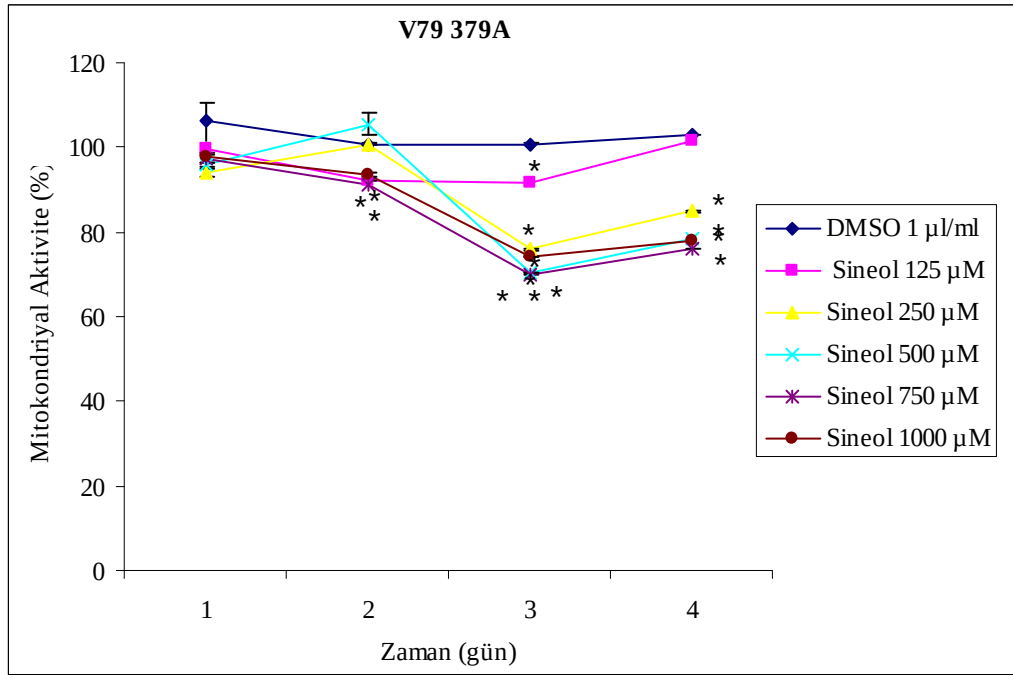
Şekil 20. L-Mentol'un CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



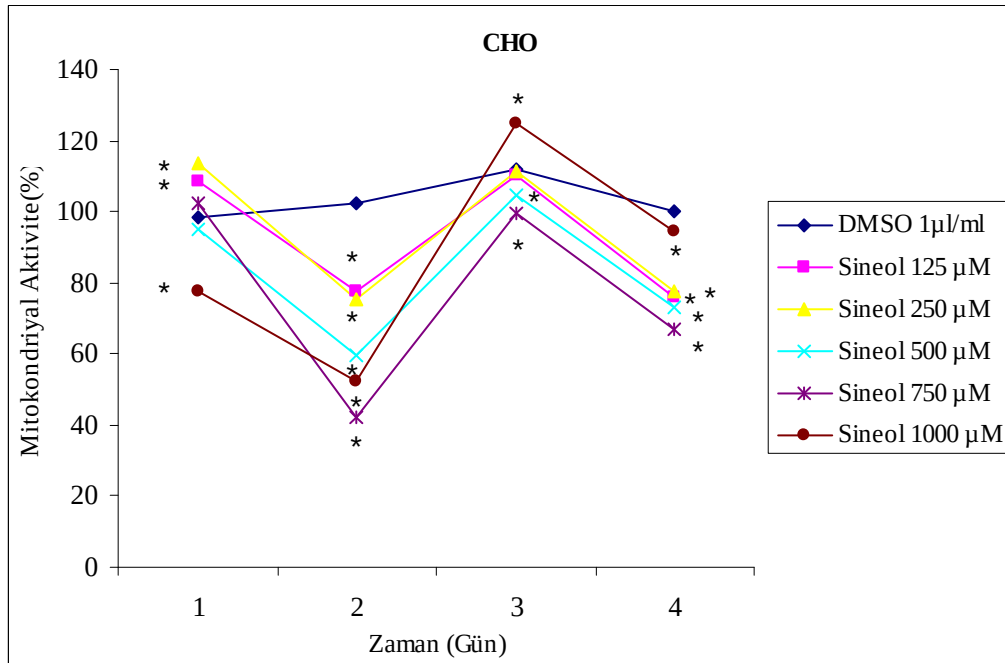
Şekil 21. Mentol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



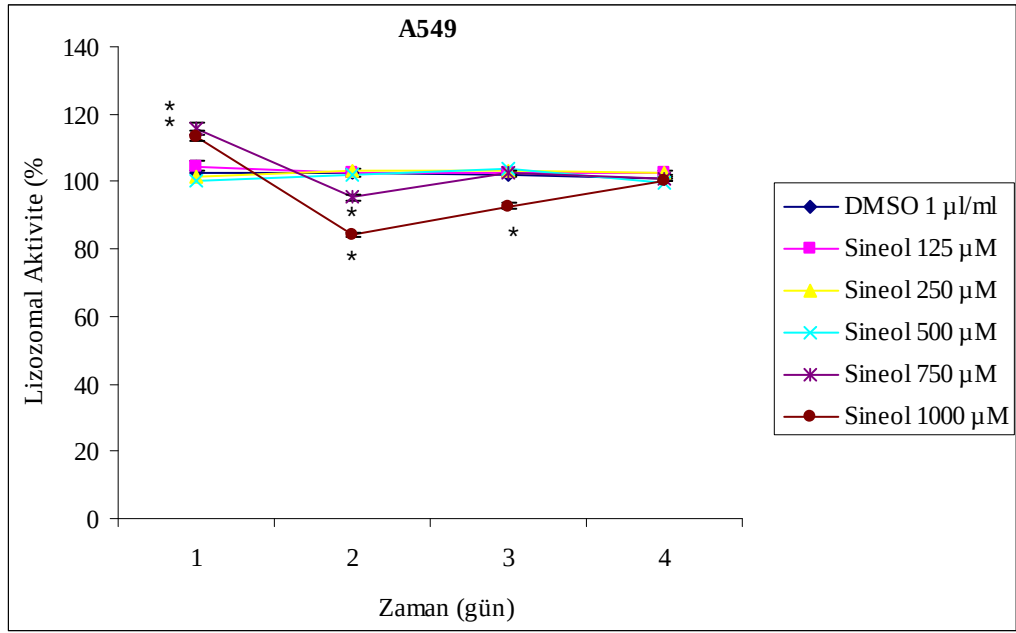
Şekil 22. 1,8 Sineol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



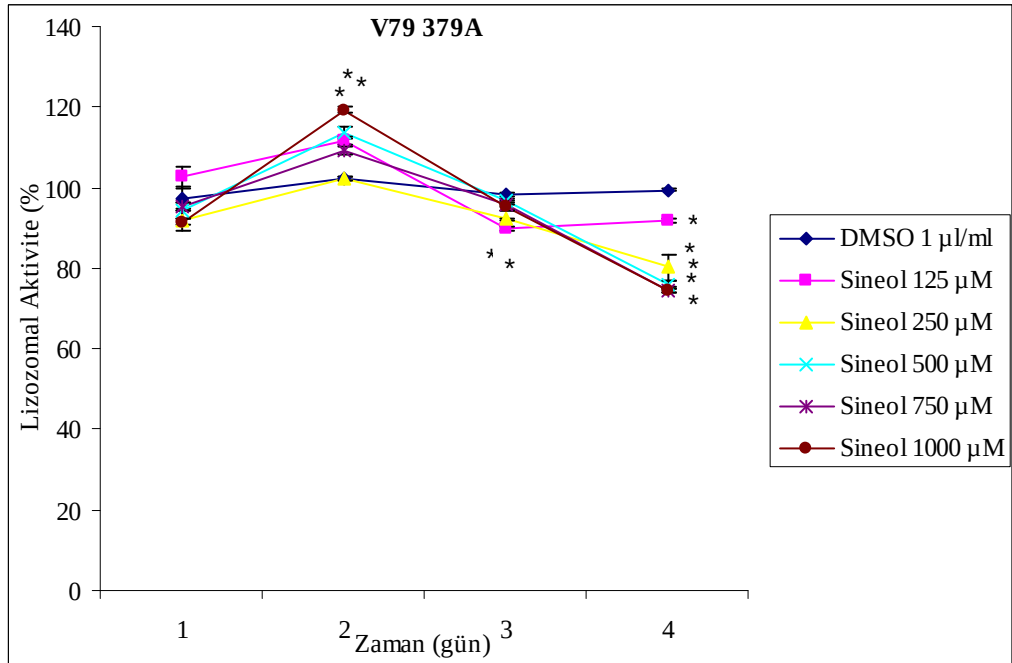
Şekil 23. 1,8 Sineol'ün V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



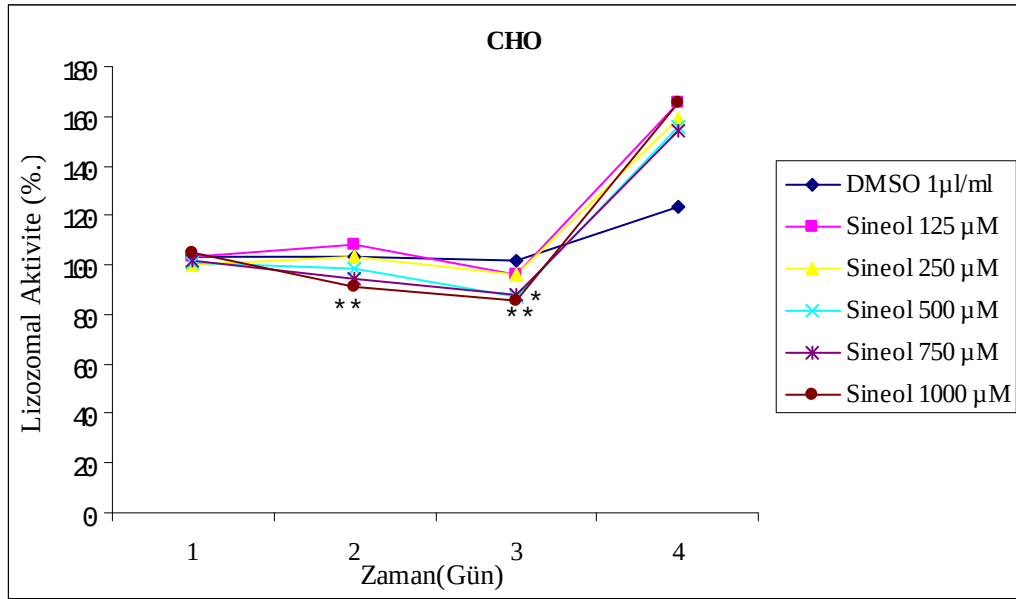
Şekil 24. 1,8 Sineol'ün CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



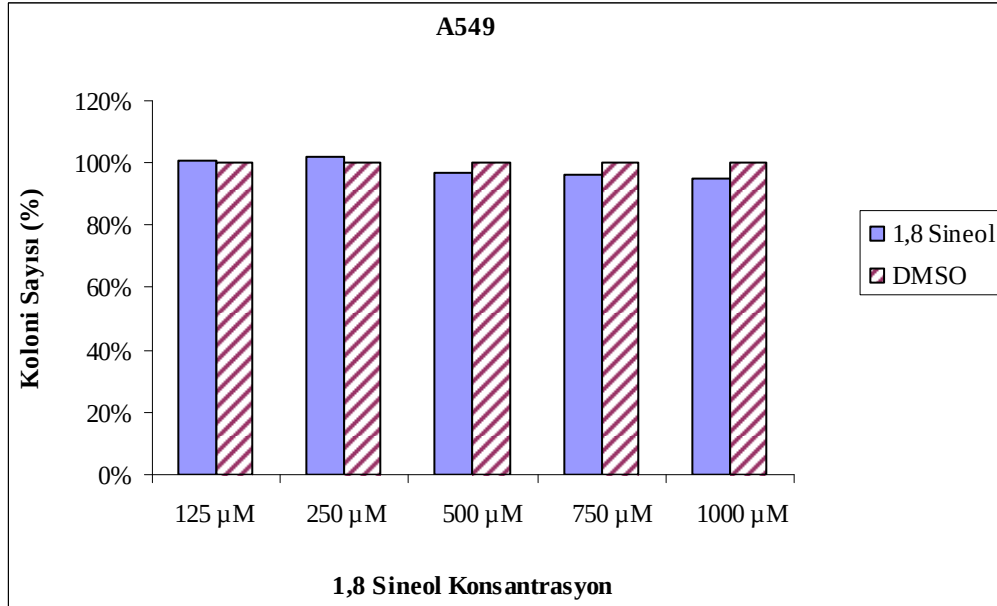
Şekil 25. 1,8 Sineol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



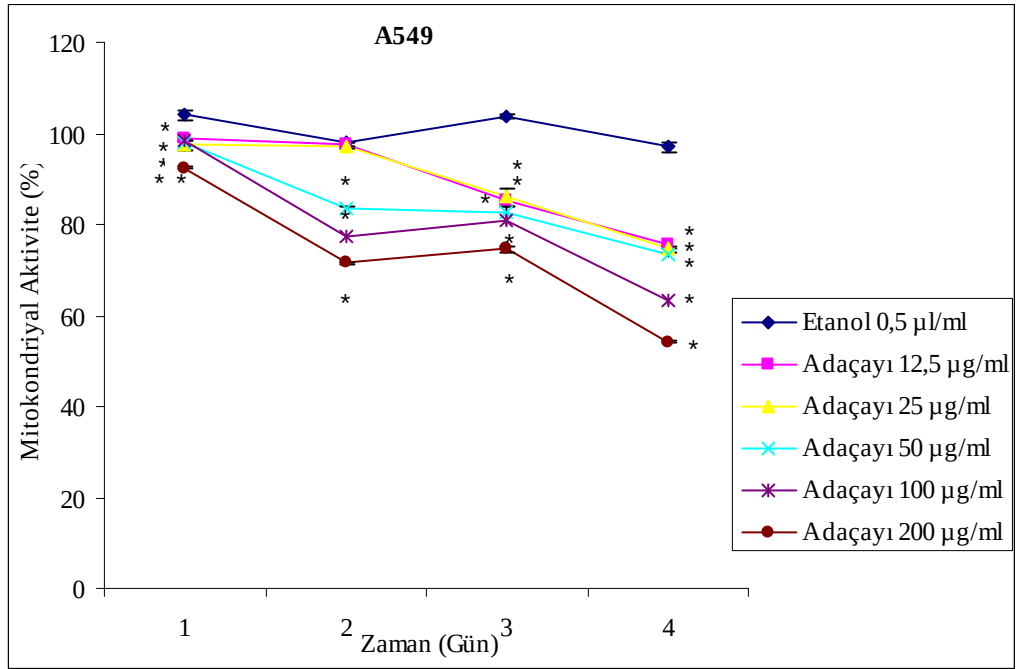
Şekil 26. 1,8 Sineol'ün V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



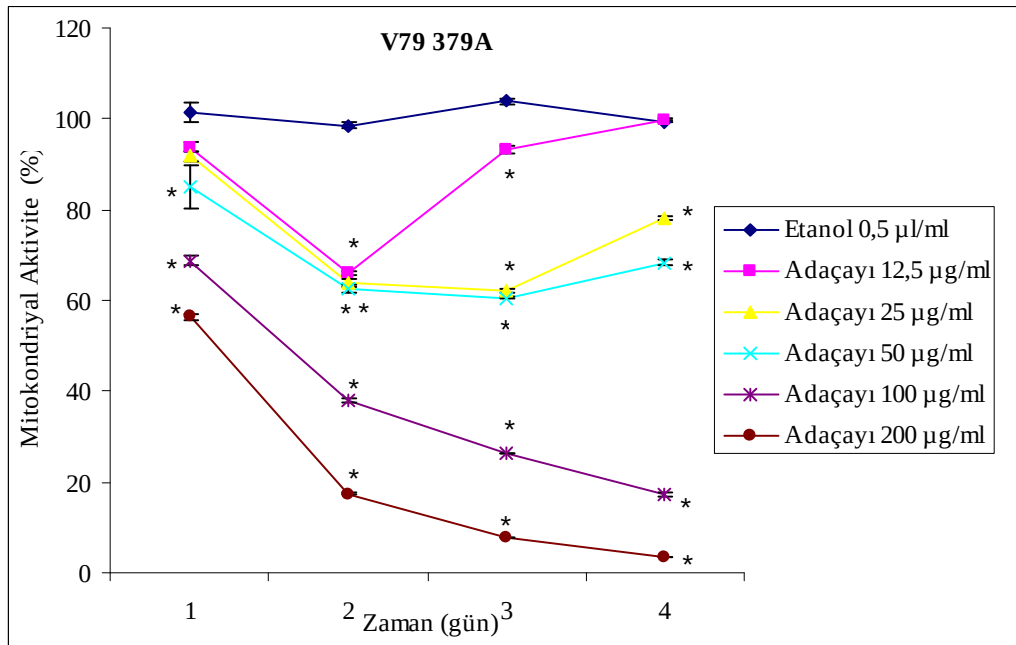
Şekil 27. 1,8 Sineol'ün CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



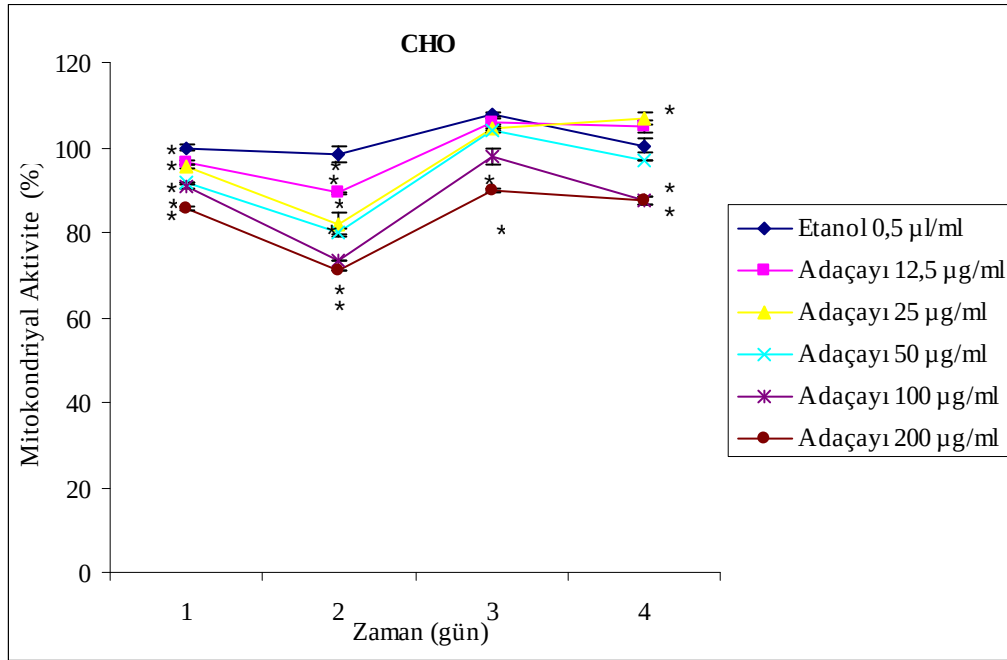
Şekil 28. 1,8 Sineol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



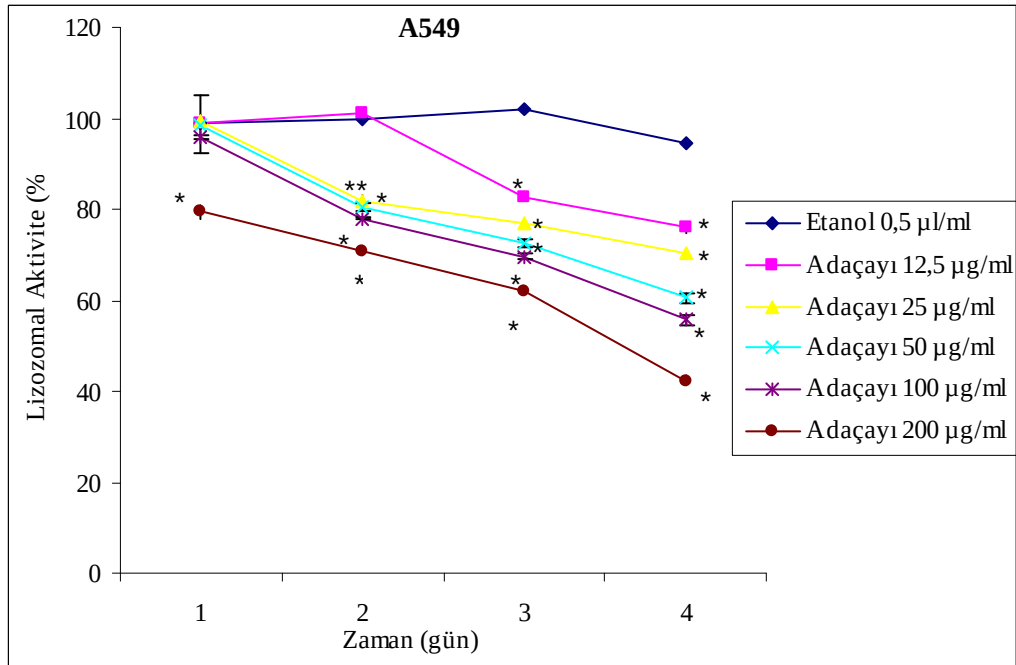
Şekil 29. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



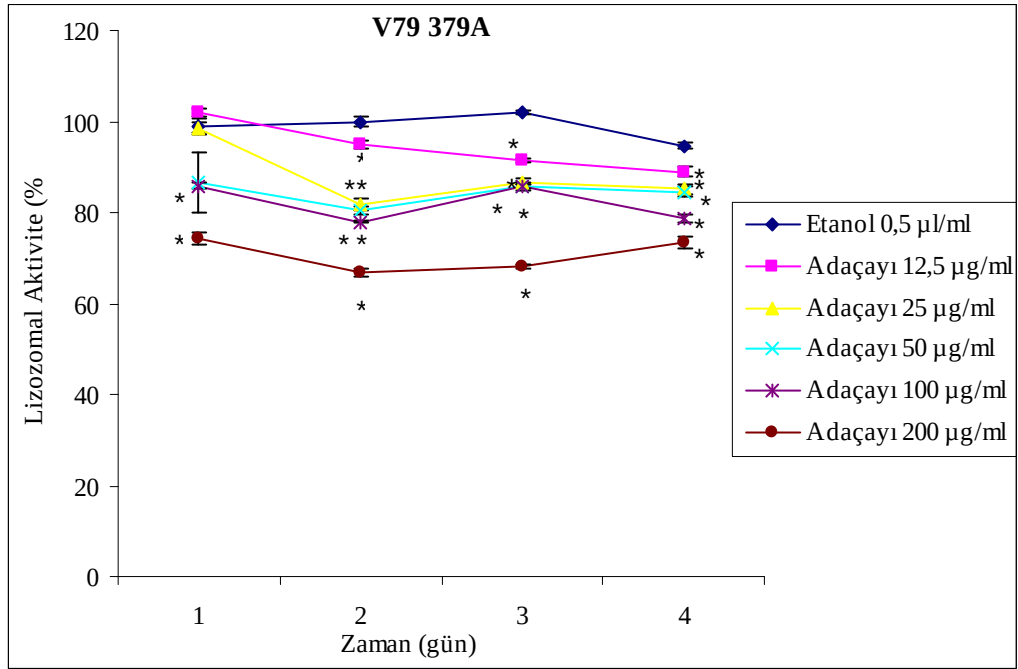
Şekil 30. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



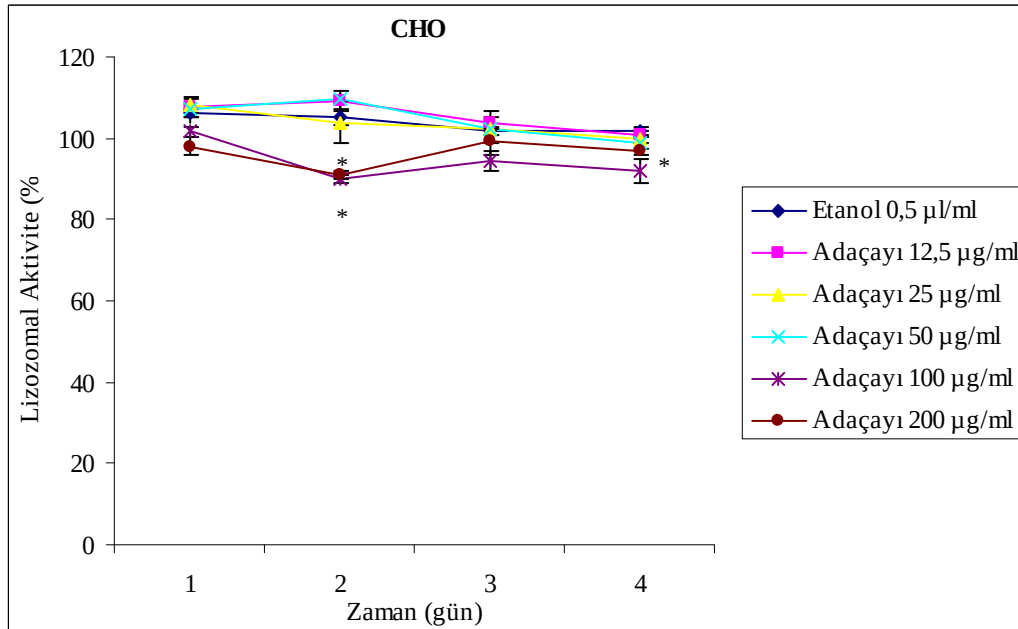
Şekil 31. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



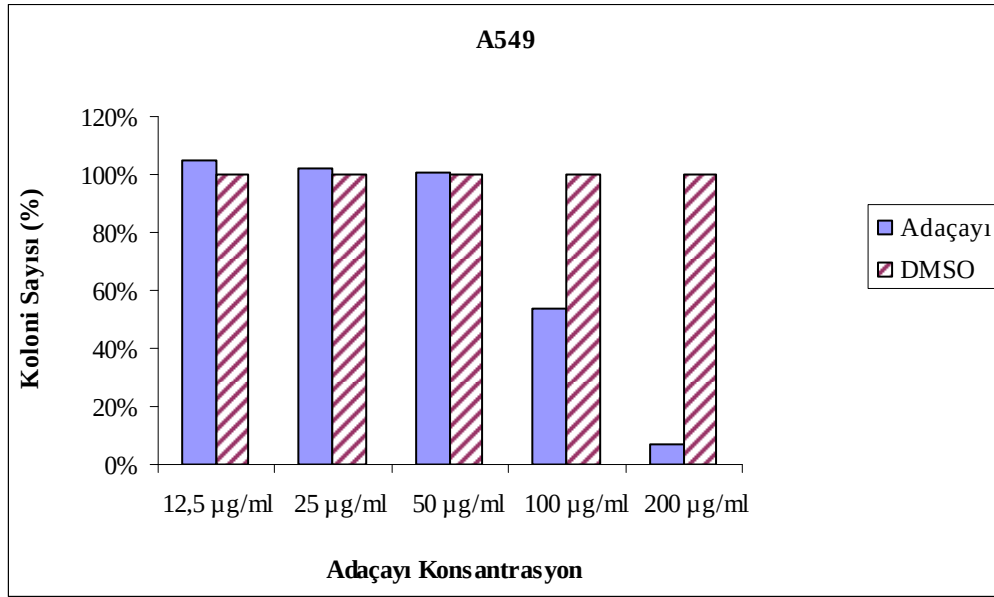
Şekil 32. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



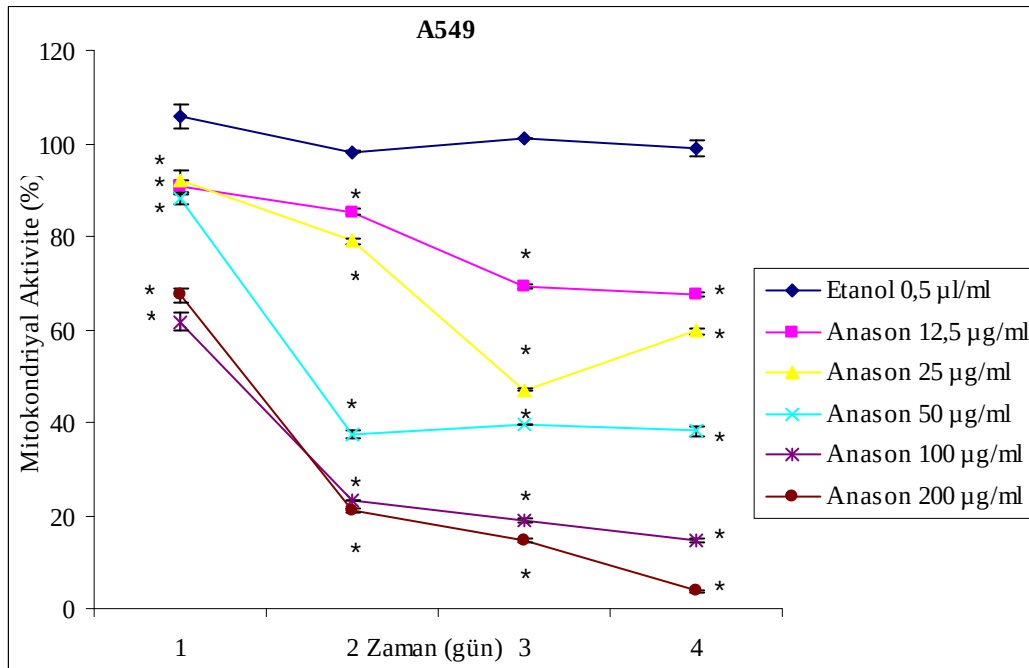
Şekil 33. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



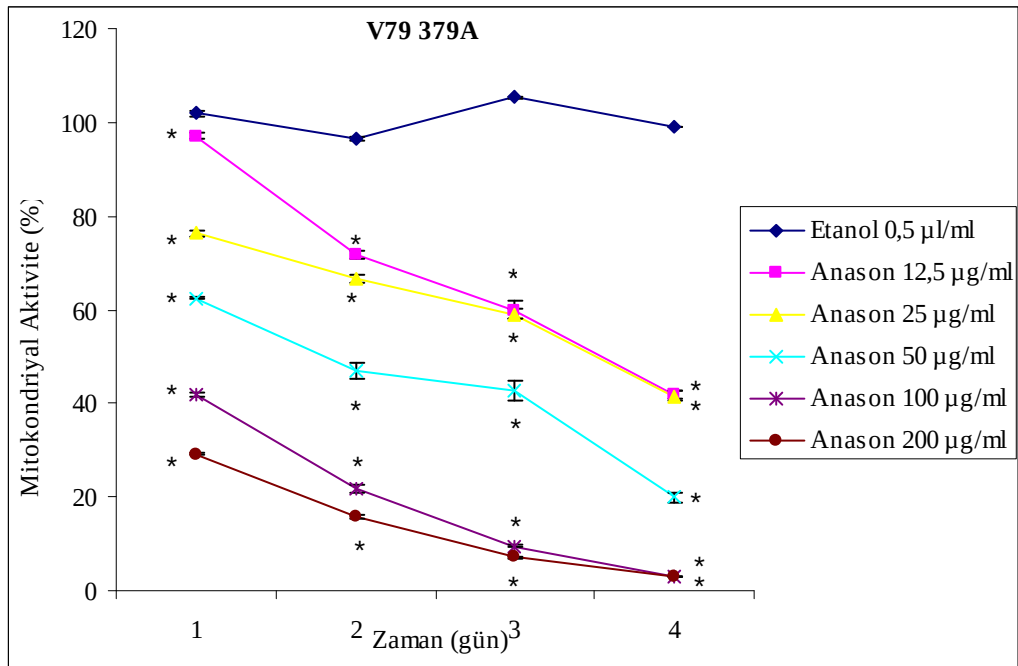
Şekil 34. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



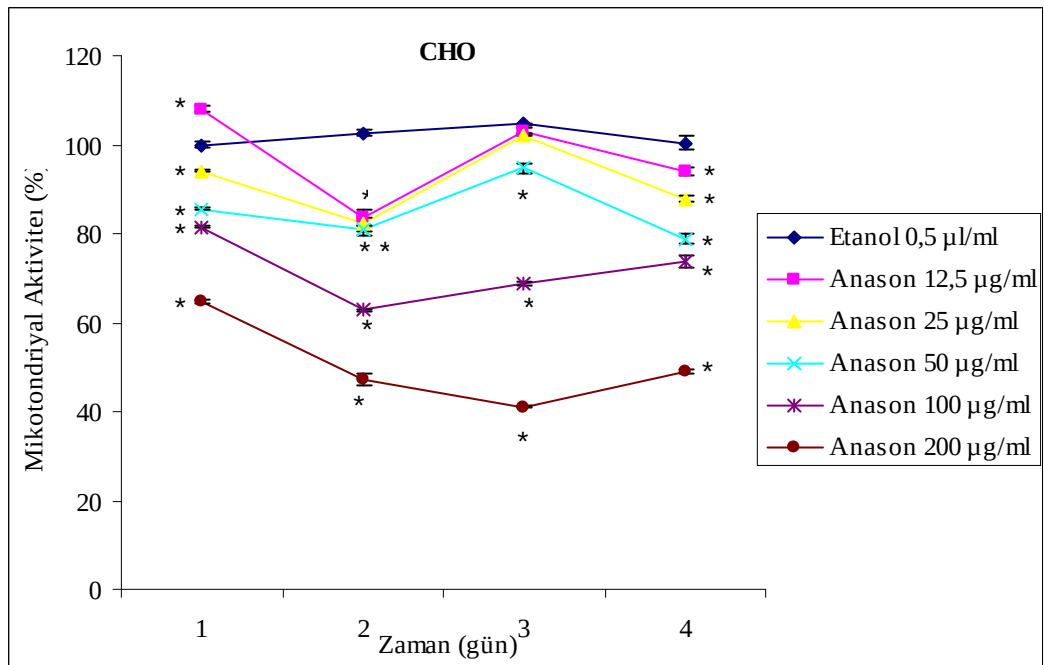
Şekil 35. *Salvia fruticosa* (adaçayı) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



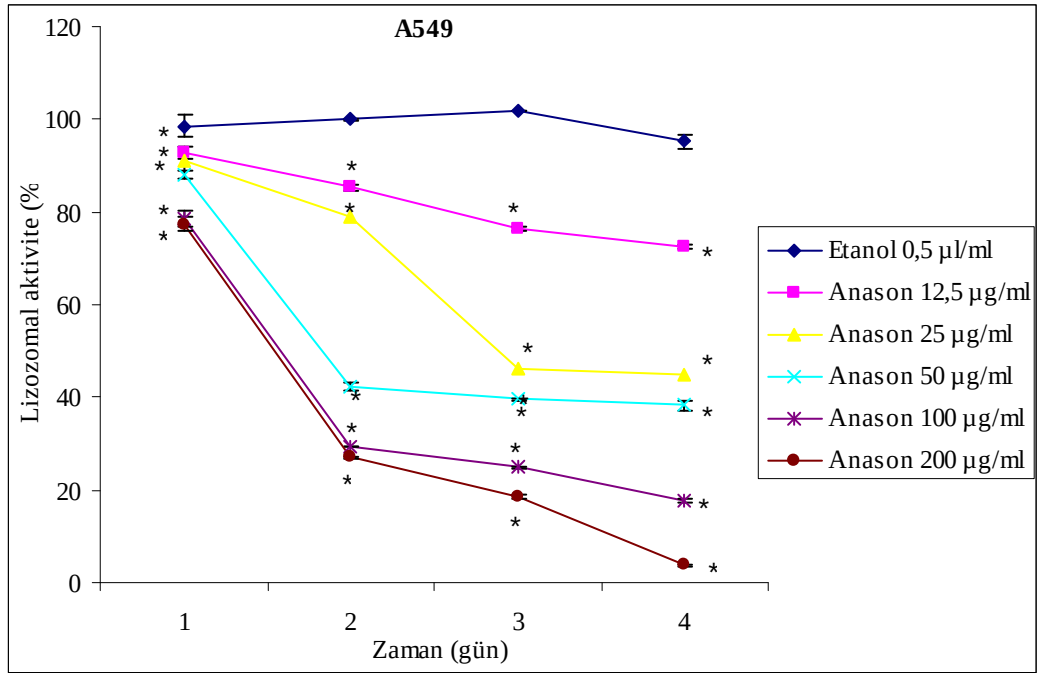
Şekil 36. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$



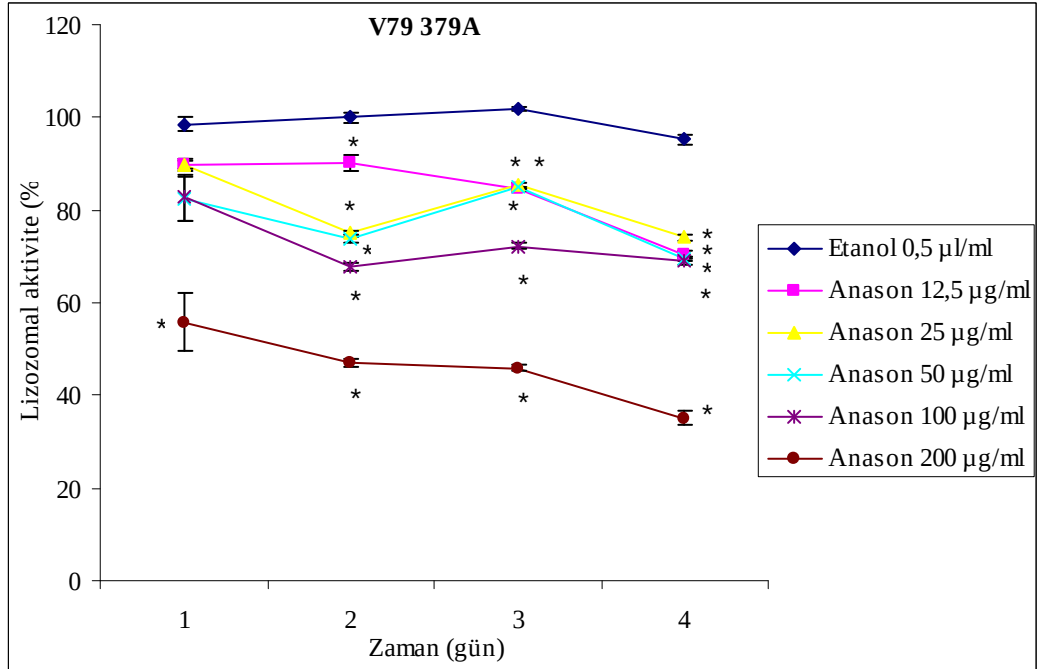
Şekil 37. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$



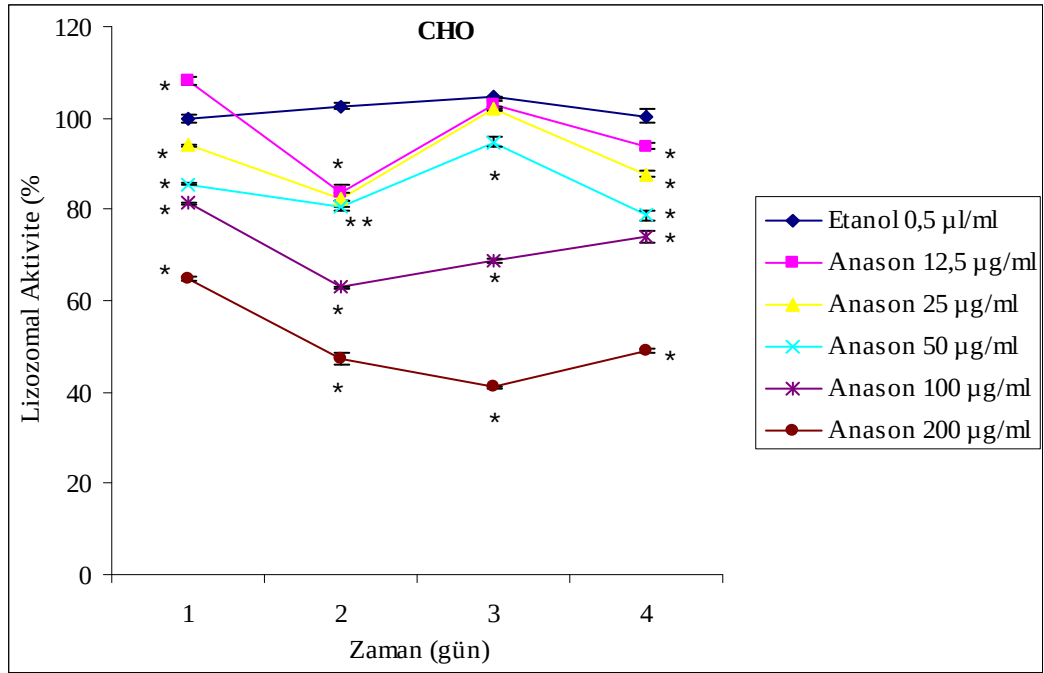
Şekil 38. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$



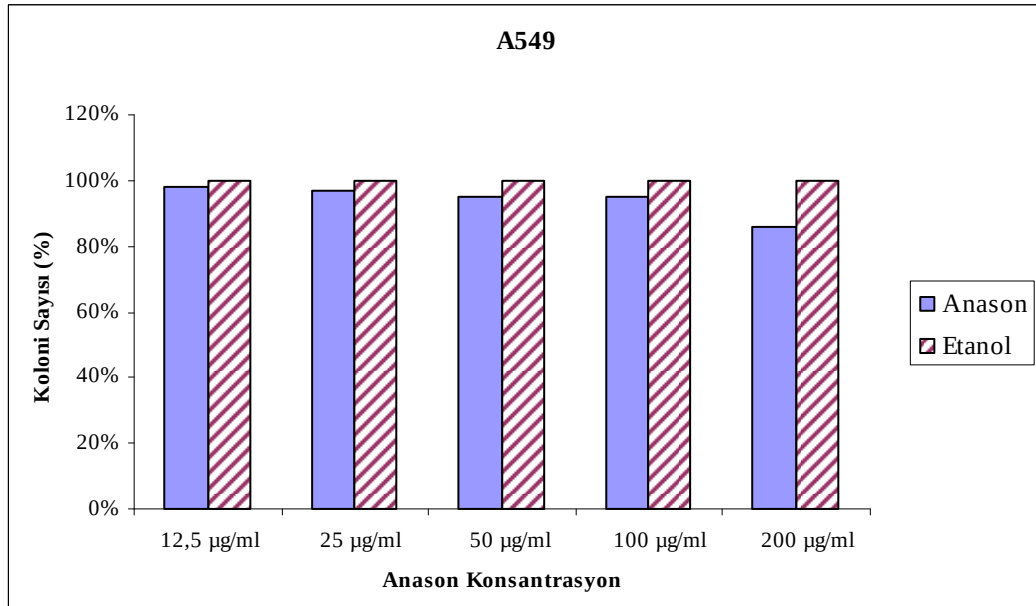
Şekil 39. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$



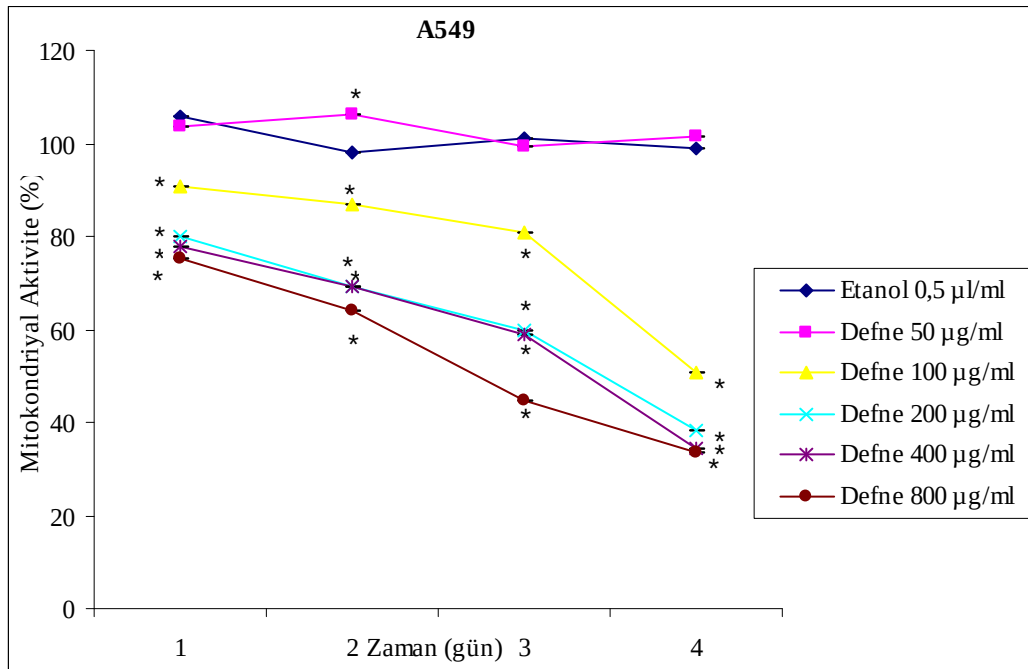
Şekil 40. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anamlılık değeri $p < 0,05$



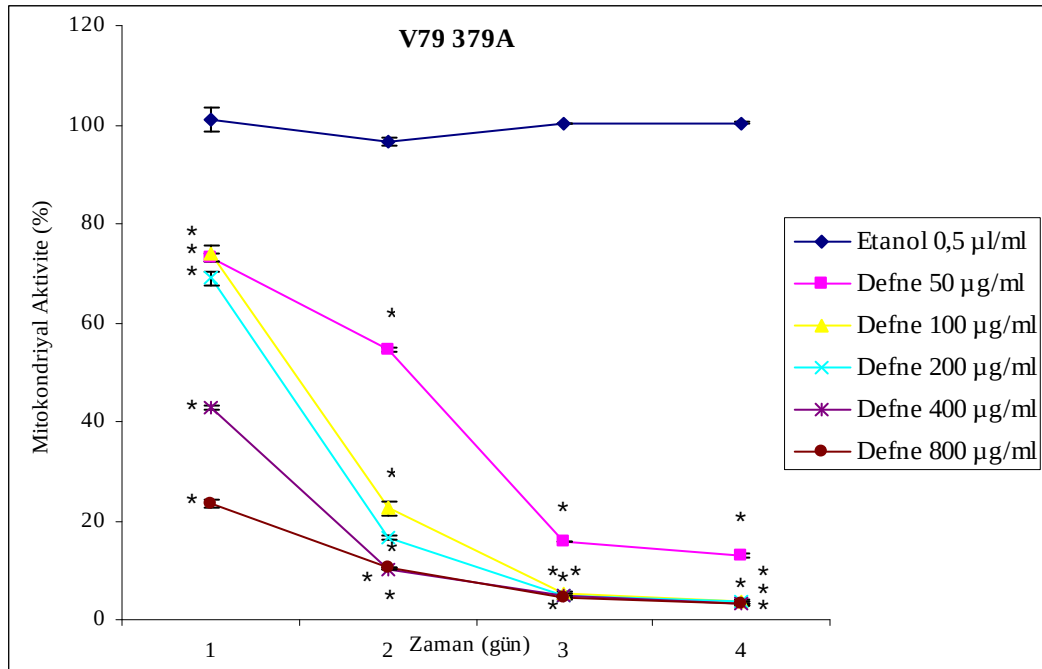
Şekil 41. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



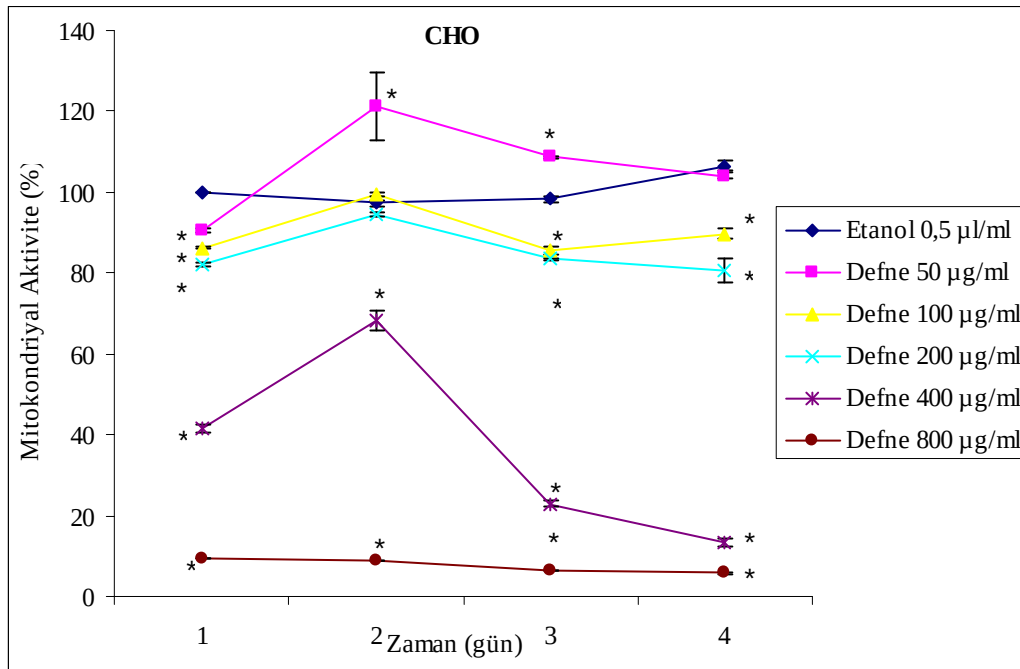
Şekil 42. *Pimpinella anisum* (anason) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



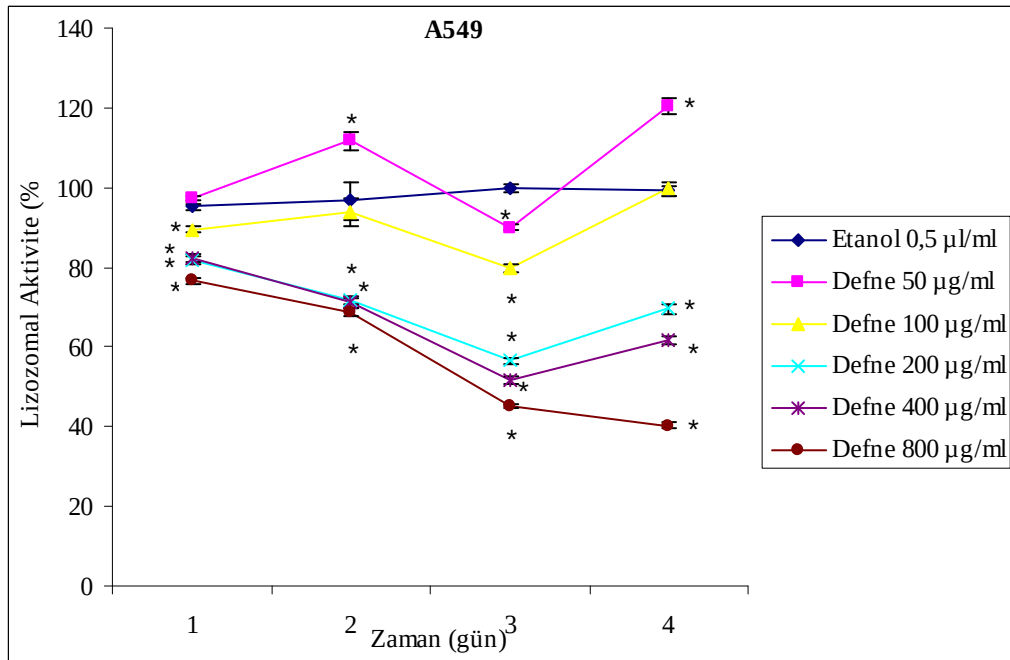
Şekil 43. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



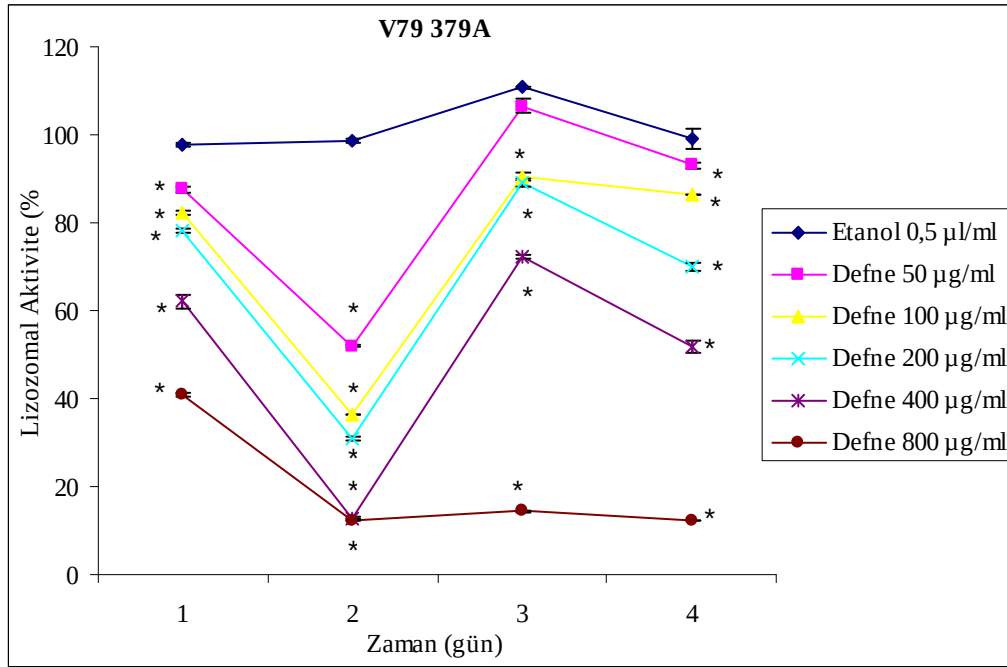
Şekil 44. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



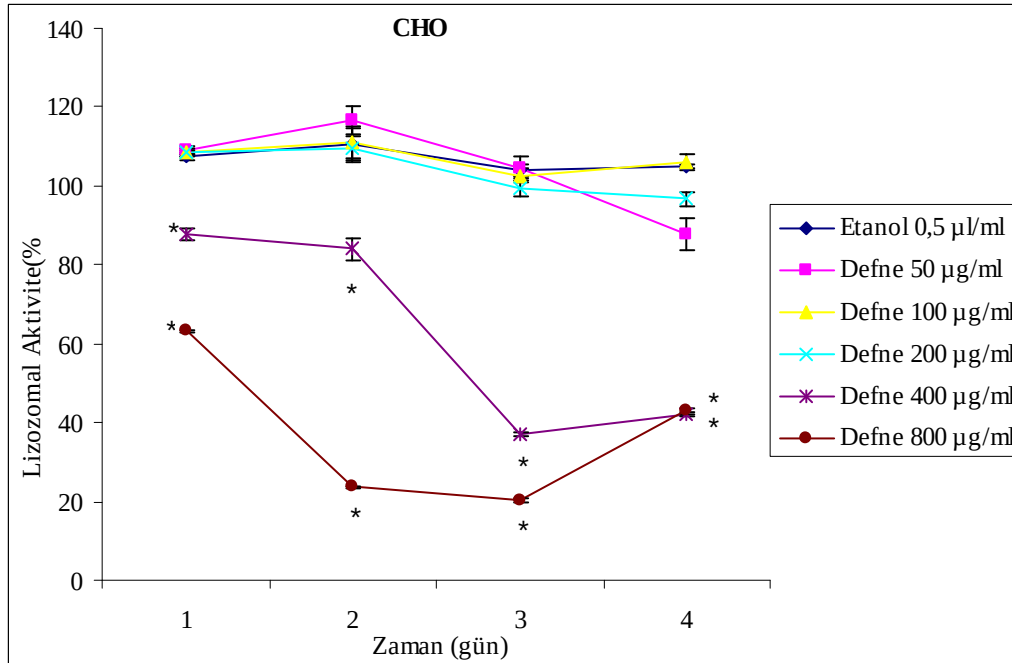
Şekil 45. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



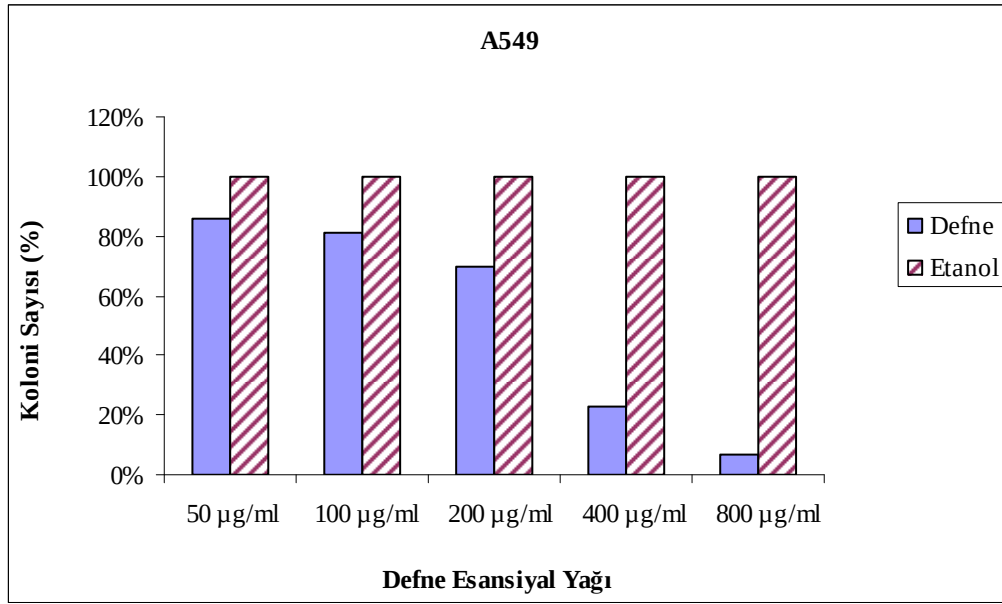
Şekil 46. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



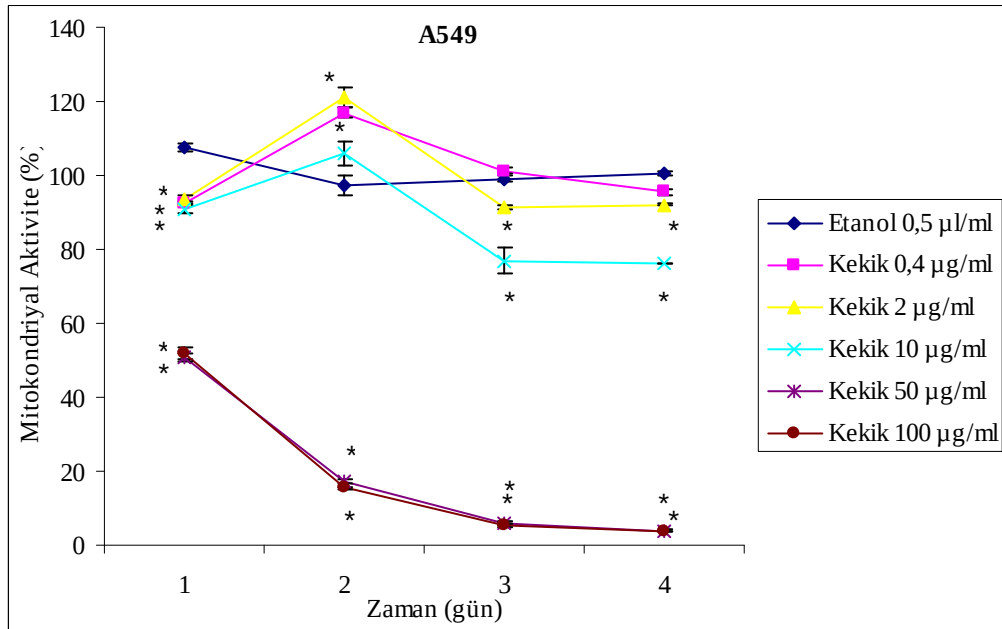
Şekil 47. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



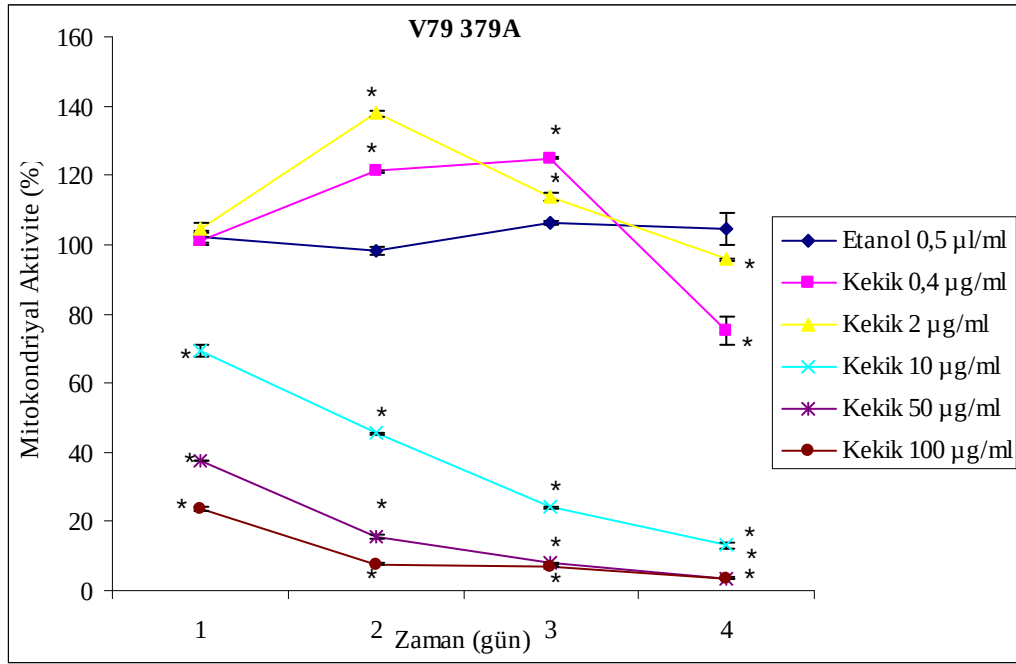
Şekil 48. *Laurus nobilis* esansiyel (defne) yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



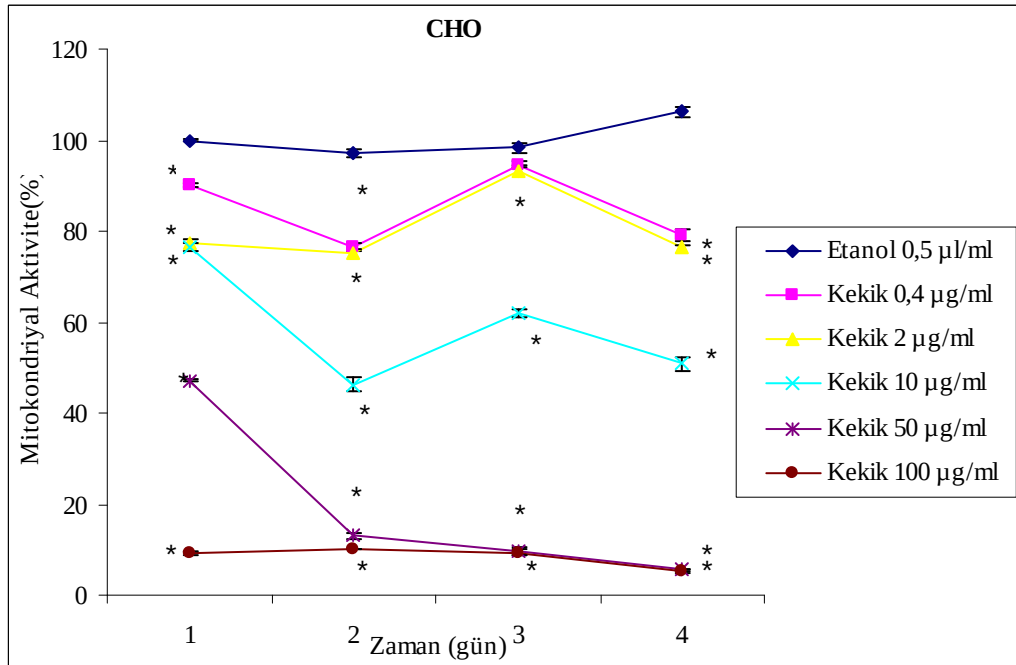
Şekil 49. *Laurus nobilis* (defne) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi



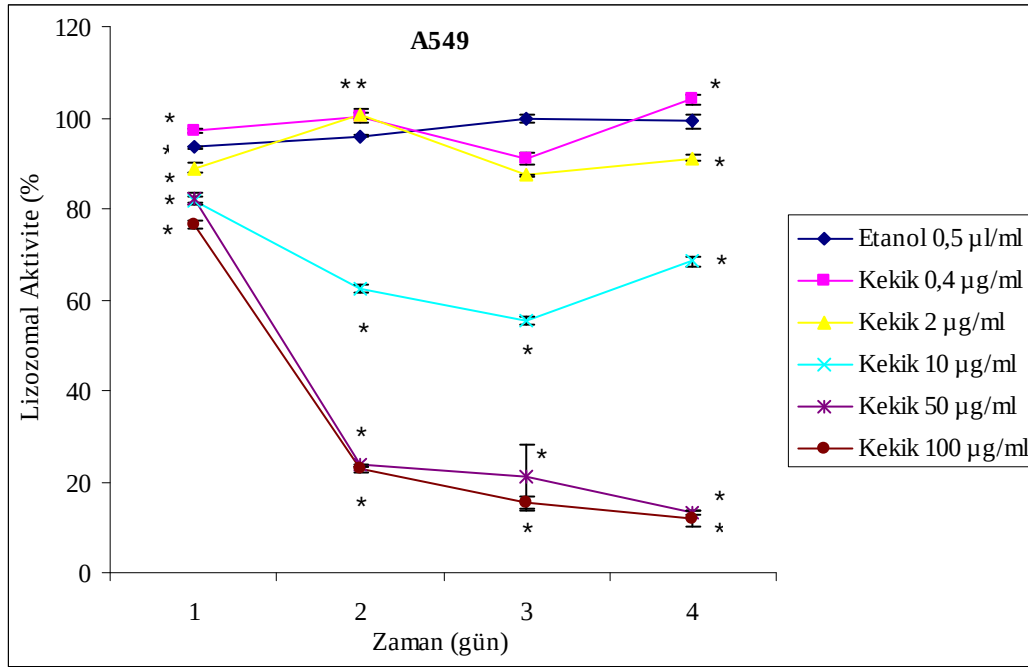
Şekil 50. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



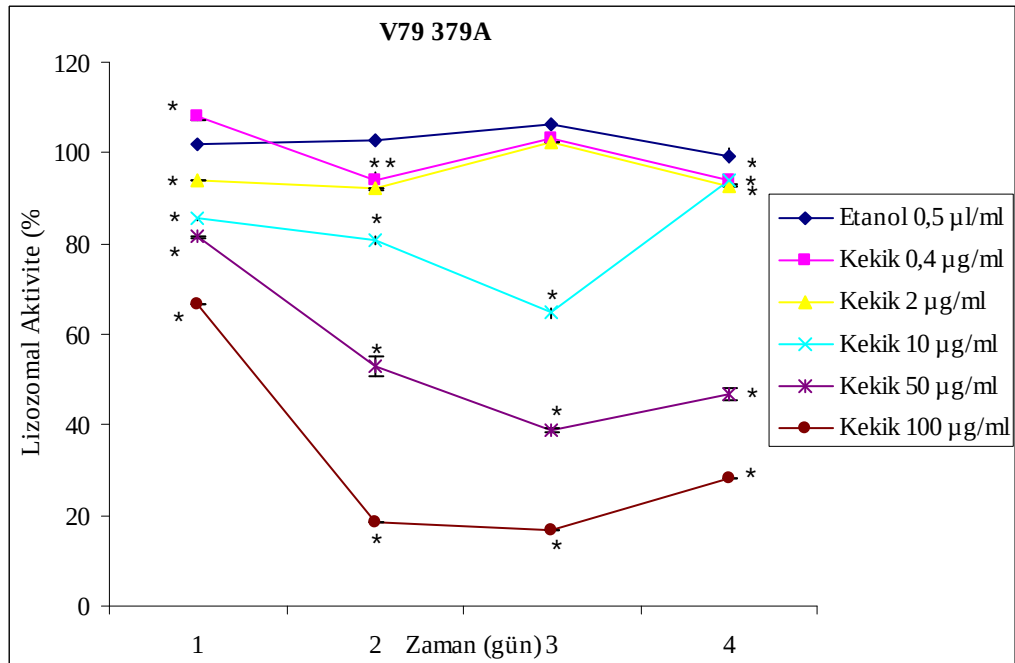
Şekil 51. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



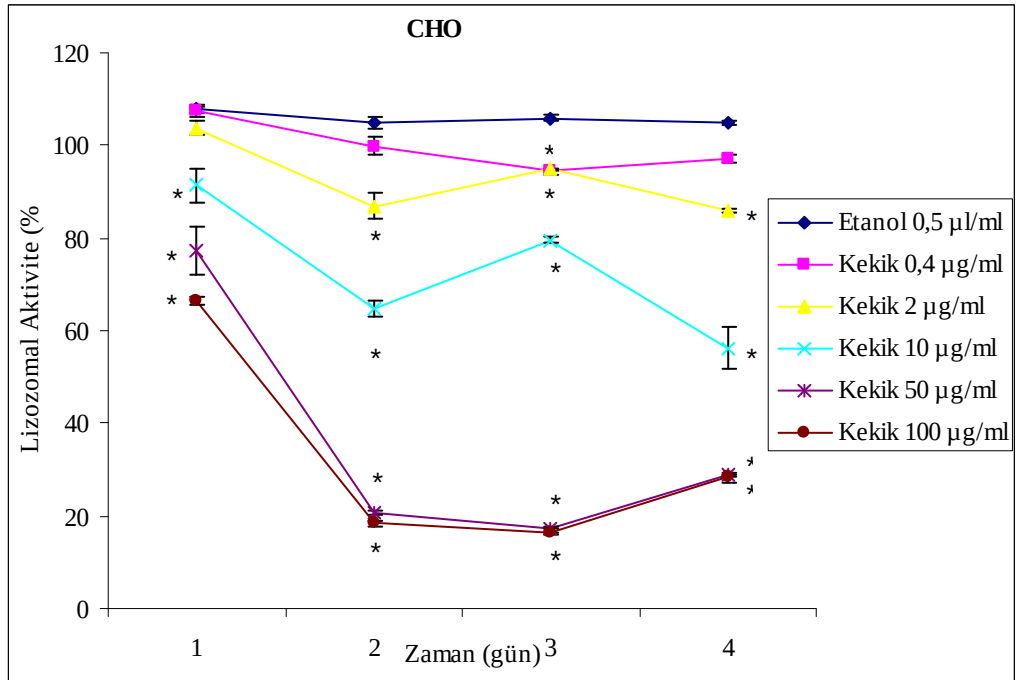
Şekil 52. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



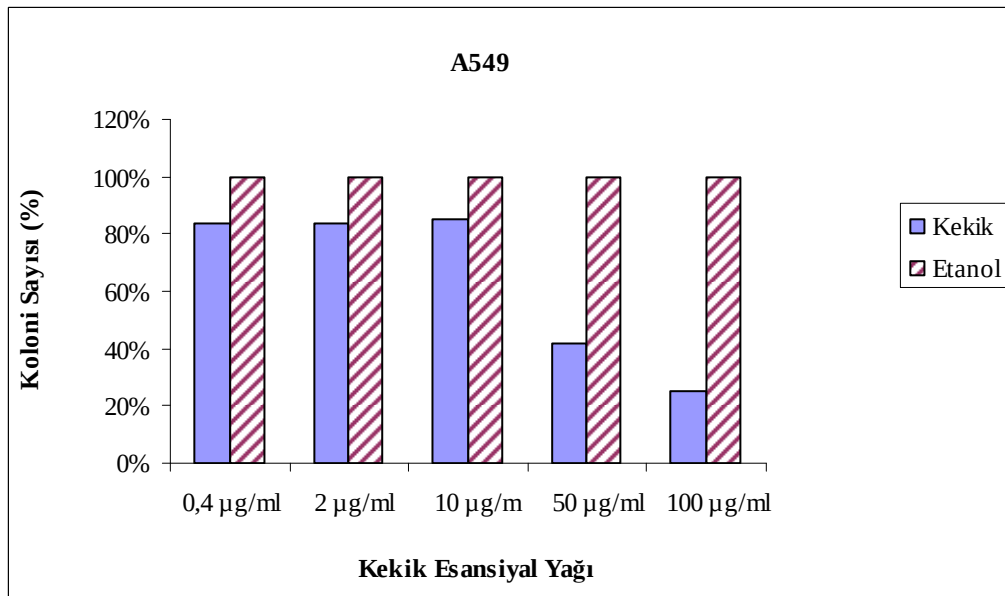
Şekil 53. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 54. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 55. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının CHO hücreleri üzerine etkisinin Neutral Red (NR) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 56. *Origanum onites* (kekik) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin koloni formasyon testi ile değerlendirilmesi