

***KLASEA BORNMUELLERI* (AZN.) BİTKİSİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

Zülfinaz Betül ÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞUSTOS 2013
ANKARA**

ZÜLFİNAZ BETÜL ÇELİK tarafından hazırlanan “*KLASEA BORNMUELLERİ* (AZN.) BİTKİSİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Sibel SÜMER

Biyoloji, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi

Prof.Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Gazi Üniversitesi

Doç.Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Tez Savunma Tarih: 05/08/2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Zülfinaz Betül ÇELİK

***KLASEA BORNMUELLERİ* (AZN.) BİTKİSİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Zülfinaz Betül ÇELİK

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2013

ÖZET

Bu çalışmada *Klasea bornmuelleri* (Azn.) bitkisinin metanol, etanol ve su ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik aktiviteleri ve DNA etkileşimlerinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla ekstraların antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ile incelendi. Metanol ve su ekstresinin test edilen bazı bakterilere karşı orta derecede antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Metanol ekstresinin *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı etkili olduğu, su ekstresinin *K. pneumoniae* ATCC 25955 bakterisine karşı etkili olduğu bulundu. Çalışılan diğer on mikroorganizmanın ekstralara karşı dirençli oldukları tespit edildi. Çalışılan ekstralar arasında en fazla sayıda mikroorganizmaya karşı etki gösteren ve en geniş inhibisyon zonu oluşturan metanol ekstresinin en etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip ekstre olduğu tespit edildi.

Ekstrelerin antioksidan etkileri 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivite ve Folin-Ciocalteu reaktifli fenolik içerik tayiniyle incelendi. Antioksidan aktivitede etanol ekstresinin (IC₅₀: 50,5±0,5 µg/ml), metanol (IC₅₀: 83,5±0,5 µg/ml) ve su ekstresine (IC₅₀: 91,7±0,5 µg/ml) göre DPPH radikali süpürücü aktivitesi ve fenolik içeriği daha yüksek bulundu.

Ekstreler ile pBR322 DNA arasındaki etkileşim agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelendi. Metanol ve etanol ekstresinin konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak DNA'yı parçalama ve kesme şeklinde etkiler gösterdikleri bulundu.

Ekstrelerin sitotoksik etkileri HeLa (Serviks Kanseri) ve MCF-7 (Meme Kanseri) hücre dizilerinde 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemiyle belirlendi. Sitotoksisite propidium iyodür (PI), 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve 3',3'-diheksiloksakarbo siyanin iyodür (DiOC6) floresan boyama yöntemleriyle de araştırıldı. Etanol ve su ekstralarının 0,001-100 µg/ml konsantrasyon aralığında ve 24 saat sürede HeLa (Etanol IC₅₀: 9,84±0,05 µg/ml, Su IC₅₀: 0,1±0,005 µg/ml) ve MCF-7 (Etanol IC₅₀: >100 µg/ml, Su IC₅₀: 11,04±0,05 µg/ml)'ye karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Floresan boyama sonuçlarına göre etanol ekstresinin HeLa hücre dizisi üzerinde apoptotik etkisi olduğu belirlendi. Sonuç olarak HeLa hücre dizisinin MCF-7 hücre dizisine göre etanol ekstresine daha duyarlı olduğu tespit edildi.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : Antioksidan, Antimikrobiyal, Sitotoksisite,
DNA Etkileşimi
Sayfa Adedi : 93
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF *KLASEA*
BORNMUELLERI (AZN.)**

(M.Sc. Thesis)

Zülfinaz Betül ÇELİK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2013

ABSTRACT

In this study, it is aimed to investigate the antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and DNA interactions of *Klasea bornmuelleri* (Azn.) methanol, ethanol and water extracts.

To this end, the extracts were analysed for antimicrobial activity by agar well diffusion and minimum inhibition concentration (MIC). It was observed that methanol and water extracts had mild antimicrobial activity against some tested bacteria. The methanol extract was observed to be effective against *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 35218 and *S.aureus* ATCC 25923 bacteria. In addition, it was noted that the water extract was also effective against *K. pneumoniae* ATCC 25955. The methanol extract showed activity against the maximum number of microorganisms and created the largest zone of inhibition among the extracts studied was found to have the most effective antimicrobial activity.

The extracts were analysed for antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and phenolic content detection with Folin-Ciocalteu reactive. According to the results, the ethanol extract (IC₅₀: 50,5±0,5 µg/ml) had DPPH radical scavenging activity and phenolic content

higher than methanol (IC_{50} : $83,5\pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) and water (IC_{50} : $91,7\pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) extracts.

The interaction between the extracts and pBR322 plasmid DNA were analyzed by agarose gel electrophoresis. It was found that the methanol and ethanol extracts, depending on the concentration of compounds and the duration of incubation, showed effects such as DNA destruction and cleavage.

Cytotoxic effects of the extracts on HeLa (Cervix Cancer) and MCF-7 (Breast Cancer) cells were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method and also by propidium iodide (PI), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and 3,3'-diethylthiopyranine iodide (DiOC6) fluorescence dyes. The ethanol and water extracts at 0,001-100 $\mu\text{g/ml}$ concentration range were effective on HeLa (Ethanol IC_{50} : $9,84\pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$, Water IC_{50} : $0,1\pm 0,005$ $\mu\text{g/ml}$) and MCF-7 (Ethanol IC_{50} : >100 $\mu\text{g/ml}$, Water IC_{50} : $11,04\pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$) in 24 hours. In fluorescence dyes results, it was found that ethanol extract had an apoptotic effect on HeLa cell line. As a consequence, it was detected that HeLa was the most sensitive cell line and was more sensitive against ethanol extract than MCF-7.

Science Code : 203.1.104
Keywords : Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic,
DNA Interactions
Page Number : 93
Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, bilgilerini paylaşan, her türlü destek, yardım ve ilgisini esirgemeyen, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a çok teşekkür ederim.

Tez savunma jürimde bulunarak tezin değerlendirilmesinde önemli katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Sibel SÜMER ve Sayın Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e çok teşekkür ederim.

Tezimin konusu olan bitkinin toplanmasında ve teşhis edilmesinde yardımcı olan Sayın Öğr. Gör. Uzman Biyolog Bilal Şahin'e çok teşekkür ederim.

Tez sürecimde ve laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Bil. Uzmanı Biyolog Yağmur ÖNER ve Sayın Dr. Biyolog E.Burcu BALI'ye çok teşekkür ederim.

Tezin gerçekleşmesinde en önemli role sahip olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyip bu günlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Tıbbi Bitkiler	4
2.2. Bitkilerdeki Biyolojik Aktivite Gösteren Bileşikler	4
2.2.1. Alkoller ve uçucu yağlar.....	5
2.2.3. Alkaloidler	5
2.2.4. Terpenler ve terpenoidler.....	6
2.3. <i>Asteraceae (Compositae)</i> Familyasının Genel Özellikleri	6
2.4. <i>Klasea</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri	7
2.4.1. <i>Klasea</i> L. cinsinin sistematikteki yeri.....	8
2.4.2. <i>Klasea</i> L. cinsinin ülkemizdeki yayılışı.....	8
2.5. Bazı <i>Klasea</i> ve <i>Asteraceae</i> Türleriyle Yapılan Biyolojik Etki Çalışmaları	8
2.6. Antioksidanlar	13
2.6.1. Bitkilerdeki antioksidanlar.....	14

Sayfa

2.6.2. Memelilerdeki antioksidanlar	15
2.7. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	16
2.7.1. Toplam fenolik madde içerik tayini.....	16
2.7.2. DPPH radikali süpürücü aktivitesi.....	17
2.8. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	17
2.8.1. Seyreltme (Dilüsyon) yöntemi.....	18
2.8.2. Difüzyon yöntemi	18
2.8.3. Enfeksiyonlara neden olabilecek bazı mikroorganizmalar.....	19
2.9. İlaç-DNA etkileşimi	21
2.10. Kanser.....	22
2.10.1. Yaygın kanser türleri	25
2.10.2. Kanser ve antioksidanlar.....	29
2.10.3. Kanser ve apoptoz.....	29
3. MATERYAL VE METOT	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Bitki	34
3.1.2. Mikroorganizmalar	35
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	35
3.1.4. Kullanılan cihazlar.....	36
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	36
3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre dizileri	37
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Bitkilerin kurutulması ve ekstraların hazırlanması.....	38

Sayfa

3.2.2. Bitki ekstralarının antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.....	38
3.2.3. Bitki ekstralarının antioksidan etkilerinin belirlenmesi.....	40
3.2.4. Bitki ekstralarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	4
3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi	44
3.2.6. Hücre ölümünün propidium iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi.....	44
3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi	44
3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimlerin belirlenmesi.....	45
3.2.9. Ekstre-DNA etkileşiminin belirlenmesi	45
3.2.10. Agaroz jel elektroforezi	45
4. DENEYSEL BULGULAR	46
4.1. Ekstrelerin % Verimleri.....	46
4.2. Bitki Ekstrelerin Antimikrobiyal Etkileri	46
4.2.1. Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitesinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi	46
4.2.2. Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitesinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile belirlenmesi.....	50
4.3. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Etkileri.....	50
4.3.1. Bitki ekstralarının radikal süpürücü aktivitesinin DPPH yöntemi ile belirlenmesi	50
4.3.2. Bitki ekstralarının toplam fenolik içerikleri	52
4.4. Bitki Ekstrelerinin Plazmit DNA Üzerine Etkisi.....	53
4.5. Bitki Ekstrelerin Sitotoksik Etkileri	55
4.6. Ekstreyle Muamele Edilen HeLa ve MCF-7 Hücre Dizilerinin Sağ Kalım Eğrilerinin Belirlenmesi	59

Sayfa

4.7. Ekstreyle Muamele Edilen HeLa Hücre Dizisinde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	61
4.7.1. Hücre ölümünün propidium iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi.....	61
4.7.2. Apoptotik etkinin DiOC ₆ boyama ile belirlenmesi	65
4.7.3. Apoptotik etkinin DAPI boyama ile belirlenmesi	68
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	92

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bitkilerde bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	15
Çizelge 2.2. Memelilerde bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	16
Çizelge 2.3. Apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde rol alan genler	31
Çizelge 4.1. <i>K. bornmuelleri</i> ekstrelerinin % verimleri.....	46
Çizelge 4.2. <i>K. bornmuelleri</i> ekstrelerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	48
Çizelge 4.3. Metanol ve su ekstrelerinin MİK değerleri.....	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Serbestleşen oksijen moleküllerinin oluşturduğu radikaller	14
Şekil 2.2. Hücrenin antioksidan savunma mekanizması	14
Şekil 2.3. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı	17
Şekil 4.1. Ekstrelerin ve pozitif kontrol BHT'nin DPPH süpürücü aktivitesi	51
Şekil 4.2. Ekstrelerin ve BHT'nin DPPH süpürücü aktivitelerinin IC ₅₀ değerleri.....	52
Şekil 4.3. Gallik asit eşdeğer eğrisi.....	52
Şekil 4.4. Ekstrelerin ve BHT'nin fenolik içerik miktarları.....	53
Şekil 4.5. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	56
Şekil 4.6. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	57
Şekil 4.7. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	57
Şekil 4.8. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	58
Şekil 4.9. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan MCF-7 ve HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı	59
Şekil 4.10. Etanol ekstresi varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği.Süre 24-96 saat.....	60
Şekil 4.11. Etanol ekstresi varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği.Süre 24-96 saat.....	61

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Meme kanseri.....	26
Resim 2.2. Prostat kanserinin evreleri.....	27
Resim 2.3. Serviks kanserinin evreleri.....	28
Resim 2.4. İnsan Papilloma Virüsü (HPV)	28
Resim 2.5. Hücrede apoptoz	30
Resim 3.1. <i>K. bornmuelleri</i> 'nin arazide çekilen fotoğrafı (Foto: Bilal Şahin)	34
Resim 4.1. Etkili olan ekstrelerin antimikrobiyal etki sonuçları.....	49
Resim 4.2. (a) Etanol ekstresi-24 saat, (b) Etanol ekstresi-48 saat, (c) Metanol ekstresi-24 saat (d) Metanol ekstresi-48 saat, (K) Kontrol	55
Resim 4.3. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.....	63
Resim 4.4. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	63
Resim 4.5. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	63
Resim 4.6. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	63
Resim 4.7. Etanol ekstresiyle muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	64
Resim 4.8. Etanol ekstresiyle muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	64
Resim 4.9. Etanol ekstresiyle muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	64
Resim 4.10. Etanol ekstresiyle muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	64
Resim 4.11. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	66
Resim 4.12. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	66

Resim	Sayfa
Resim 4.13. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	66
Resim 4.14. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	66
Resim 4.15. Etanol ekstresiyle muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	67
Resim 4.16. Etanol ekstresiyle muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	67
Resim 4.17. Etanol ekstresiyle muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	67
Resim 4.18. Etanol ekstresiyle muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	67
Resim 4.19. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	69
Resim 4.20. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	69
Resim 4.21. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi	69
Resim 4.22. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi	69
Resim 4.23. Etanol ekstresiyle muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	70
Resim 4.24. Etanol ekstresiyle muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	70
Resim 4.25. Etanol ekstresiyle muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi	70
Resim 4.26. Etanol ekstresiyle muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
A	Absorbans
°C	Santigrat derece
g	Gram
H	Hidrojen
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µM	Mikromolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
O	Oksijen
V	Volt
w/v	Ağırlık/Hacim
w/w	Ağırlık/Ağırlık
Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DiOC6	3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Kısaltmalar	Açıklama
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
DU145	Androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizisi
EDTA	Etilen Diamin Tetra asetik asit
HeLa	Serviks kanseri hücre dizisi
IC₅₀	Hücre canlılığını %50 oranında azaltan derişim
MCF-7	Meme kanseri hücre dizisi
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları
MMP	Mitokondri membran potansiteli
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid
PC-3	Androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizisi
PI	Propidyum İyodür
ROT	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
SDA	Sabouroud Dextrose Agar
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris asetat

1. GİRİŞ

Bitkiler, insan yaşamının devam edebilmesi için gerekli olan oksijen ve besinleri sağlayan canlılardır. Bitkilerin tedavide kullanımı insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. İnsanlar, binlerce yıl önce bitkilerin tedavi edici gücünü ve besinsel özelliklerini deneme yanılma yöntemiyle fark etmiş ve onlardan faydalanmıştır.

Yazılı tarih başlamadan önceleri de insanlar bitkileri yiyecek, korunak, haşereleri kovmak ve hastalıkları tedavi etmek amaçlı kullanmışlardır. Bitkisel droglardan bahsedilen ilk yazılı metin ise M.Ö 3700 yıllarında Çin hükümdarı Shin-nong'a aittir. Ayrıca Hitit tabletlerinde de kayıtlı reçetelerde buğday, sarımsak, alıç, kayısı, haşhaş, soğan, zeytin gibi bugün bile tıbbi amaçlı kullanılan birçok bitkiye rastlanmaktadır. İslami bitki uzmanlarının ilk büyük ismi Razi'dir. M.S 865-925 yılları arasında Bağdat'ta doktorluk yapmış ve pek çok öğrenci yetiştirip sayısız tıp eseri vermiştir. Bunlardan en önemlisi 24 ciltlik "Kitab-al Mansuri" adlı eseridir. Tarihteki en büyük İslam alimi İbn-i Sina (M.S 980-1037) "Kanun" adlı eserinde sayısız bitki tedavi reçetelerine yer vermiştir. "Tıbbi bitkilerle tedavi" anlamına gelen "Fitoterapi" terimini ise ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) kullanmıştır [1].

Türkiye'de de tıbbi amaçlı kullanılan bitkiler çok önemli yere sahiptir ve bunların kullanımları uzun tecrübeler sonucunda günümüze kadar gelmiştir. Ülkemiz bitki çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Ülkemizdeki bu bitkisel zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya florası arasında köprü olması, pek çok bitki taksonunun orijin ve farklılaşma merkezi olmasından kaynaklanmaktadır [2]. Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12 000'den fazla tür ve tür altı taksonu ile oldukça zengin bir flora sahiptir. Bu taksonların 234'ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisidir. Geriye kalan türler ise yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir. Tüm Avrupa kıtasının yaklaşık 12 000 kadar bitki taksonuna sahip olduğu düşünüldüğünde yurdumuzun bitki örtüsü bakımından ne kadar zengin olduğu görülmektedir. Endemizm bakımından da yurdumuz oldukça zengindir. Tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson

sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891'dir. Bu sayıya, endemik olan 497 alt türü ve 390 varyeteyi dahil edildiği zaman toplam endemik takson sayısı 3750'den fazladır [2].

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan açıklamaya göre, dünya nüfusunun yaklaşık %80'i sağlık sorunlarını, doktora gitmeden önce bitkisel drogları kullanarak gidermeye çalışmaktadır. Ayrıca, gelişmiş ülkelerde kullanılan reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (aspirin, kinin) oluşturmaktadır [3].

Araştırmacılar bakteriler, funguslar, virüsler ve parazitlerin sebep olduğu enfeksiyon kaynaklı birçok hastalığa karşı geniş spektrumlu antibiyotik ilaçlar üretmek amacıyla yıllardır çalışmaktadır. Son yıllarda sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin çok fazla olması, özellikle antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı organizmaların direnç oluşturmaları, ayrıca kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin de fazla olması, doğal bitkisel kaynakların ve bu maddeleri taşıyan tıbbi bitkilerin önemini daha çok arttırmıştır. [4]. Günümüzde hala kanser başta olmak üzere pek çok hastalığa kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bu nedenle, tedavi amaçlı yeni yöntemler bulabilmek için son zamanlarda bitkilerde bulunan bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında *Klasea bornmuelleri* (Azn.) Greuter & Wagenitz [5] bitkisinin biyolojik aktivitesini araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için bitkinin metanol, etanol ve su ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik etkileri ve pBR322 plazmit DNA üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ekstrelerin 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/ml'lik derişimlerde antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk yöntemi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile, antioksidan etkileri 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivitesi ve Folin-Ciocalteu reaktifli fenolik içerik tayini yöntemleriyle araştırılmıştır. Ekstrelerin pBR322 plazmit DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Ekstrelerin sitotoksik etkileri meme kanseri (MCF-7) ve serviks kanseri (HeLa) hücre dizilerinde MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) yöntemiyle incelenmiştir. Hücre kültüründe yüksek sitotoksik etkili ekstrelerin kanser hücre dizileri üzerine farklı süredeki sağ kalımlarına bakılmıştır. Mevcut sitotoksik etkinin kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyip tetiklemediğini araştırmak amacıyla propidyum iyodür (PI), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 3',3'-diheksiloksakarbosiyenin iyodür (DiOC₆) floresan boyama yöntemleri kullanılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tıbbi Bitkiler

Yaprak, kök, meyve, tohum, yumru, çiçek, kabuk gibi organlarından herhangi birisinde veya tüm organlarında bulunan alkaloid, glikozit, flavonoid, fenolik madde gibi biyolojik sekonder metabolitlerinden dolayı ilaç hammaddesi olarak kullanılan bitkilere tıbbi bitkiler denir [54].

Dünyada bulunan yaklaşık 270 000 tohumlu veya çiçekli bitkiden yaklaşık 20 000'in tıbbi amaçlı kullanım için uygun olduğu, yaklaşık 4000 bitkisel drogun yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir [55].

Türkiye üç büyük fitocoğrafik bölgenin kesişim bölgesinde yer alması nedeniyle, tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından zengin bir çeşitlilik göstermektedir. İklim, yer şekilleri ve toprak özellikleri bakımından birçok bitkinin yetişmesi için uygun şartlara sahiptir [2]. Ülkemizde ticari değeri olan bitkiler *Asteraceae (Compositae)*, *Lamiaceae (Labiatae)*, *Apiaceae (Umbelliferae)*, *Solanaceae*, *Lauraceae*, *Fabaceae (Leguminosae)*, *Rutaceae* ve *Ranunculaceae* familyalarına aittir. Tıbbi ve aromatik bitkiler açısından en zengin olan familyalar ise *Asteraceae (Compositae)*, *Apiaceae (Umbelliferae)* ve *Lamiaceae (Labiatae)*'dir [56].

2.2. Bitkilerdeki Biyolojik Aktivite Gösteren Bileşikler

Bitkilerin kimyasal olarak çok zengin olan içeriği, sudan başlayarak, inorganik tuzlar, karbonhidratlar, yüksek oranda proteinler ve alkaloidlerden oluşur. Bitkilerin tedavi edici özelliklerinin çoğu sahip oldukları uçucu ve aromatik yağlardan kaynaklanır. Bu etkili bileşikler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [6].

2.2.1. Alkoller ve uçucu yağlar

Alkoller bitkilerde uçucu yağların oluşumuna yardımcı olurlar. Nandedeki mentol, güldeki geraniol bunlara örnek verilebilir. Özellikle nane ve kekik gibi bitkilerdeki bu uçucu yağlar, yoğunluklarına göre bitkileri az ya da çok kokulu yaparlar. Bu uçucu yağların damıtılmasıyla hem parfüm hem de tedavi amaçlı yağlar elde edilir. Hepsi antiseptik özellik taşır. Okaliptüs, kekik ve sarımsak yağı vücutta kolaylıkla dolaşırlar. Kullanıldıktan sonra boşaltım sistemi, akciğer, gözyaşı ve diğer vücut sıvılarında kolayca rastlanır. Hatta hamilelerde fetüse bile ulaşabilir. Kan hücrelerinin oluşumunu artırır, vücudun doğal savunmasına yardımcı olurlar. Papatya ve nane gibi sinir sistemine etki edenler ise sakinleştirici etki yapar [6].

2.2.2. Fenolik bileşikler

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, inanamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Fenolik bileşiklerin yapısı bitkilere güneşten gelen ultraviyole radyasyonunu emme özelliği verir ve bu sayede onları genetik hasardan korur. Bazı fenolikler, bitkinin belli kısımlarına acı tat vererek herbivorları uzaklaştırırken, bazıları da antimikrobiyal özelliğe sahip olduğundan enfeksiyonları önler [54, 64]. Fenolik bileşiklerin en basit örneği salisilik asittir. Genel olarak şekerle oluşturduğu glikozit formunda bulunurlar. Örnek olarak söğüt, ateş düşürücü, ağrı giderici ve antiseptik özellikler taşır. Bu yolla üretilen en yaygın kullanımlı ilaç aspirindir. Tane karanfildeki ögenol ve kekikteki timol de aspirine benzer etkilidirler [6].

2.2.3. Alkaloitler

Alkaloitler insan vücudu ve sinir sistemi üzerinde çok etkili kimyasallardır. Başlangıçta afyon bitkisiyle anlaşılan uyuşturucu ve ağrı hissini yok edici kimyasallar, tıptaki yararlı ve kontrollü kullanımları yanında, kontrol dışı

kullanımlarıyla da tehlikeli alışkanlıklar ortaya çıkarırlar [6]. Kan kanserine karşı etkin olan ilaç üretimi için kullanılan *Catharanthus roseus*'un 100'ün üzerinde farklı alkaloid ürettiği tespit edilmiştir [64]. *Compositae*, *Leguminose*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Apocynaceae* ve *Solanaceae* gibi bazı familyalar alkaloid içeriği açısından zengin bitki türlerini barındırır [54]. Avrupa'da geleneksel ilaç olarak *Compositae* familyasına ait *Anthemis tinctoria*, *Solidago virga-aurea*, *Tripleurospermum inodorum* ve *Matricaria chamomilla* bitkilerini kanser ve kanserli ülser tedavisinde kullanmaktadırlar [65].

2.2.4. Terpenler ve terpenoitler

Terpenler ve terpenoitler bitkilerde hastalığa yol açan canlıları veya böcekleri uzaklaştırmak için savunma işlevi görürler. Fotosentezin ışık alma reaksiyonlarında da görev alır ve zararlı ışınlar tarafından meydana gelen zararları engellerler. Ayrıca bitkilerden elde edilen terpen ve terpenoitler parfüm, kozmetik ve aromaterapide de kullanılırlar [54, 64].

2.3. *Asteraceae* (*Compositae*) Familyasının Genel Özellikleri

Asteraceae familyası Angiospermlerin en geniş familyalarından biridir. Son sınıflandırmaya göre 4 alt familyaya ve 17 tribusa ayrılmaktadır. Amerika'nın Güneybatısı, Meksika, Güney Brezilya, Orta ve Güneybatı Asya ve Avustralya'ya kadar uzanan çeşitli bölgelerde geniş çapta bir yayılım göstermektedir. Familyanın coğrafik orijininin filo-genetik olarak Güney Amerika olduğu kabul edilmektedir. Bugüne kadar familya içerisinde 1535 cins ve 26 000 tür rapor edilmiştir [7].

Otsu, iki veya çok yıllık, ağaççık, ağaç, sarılıcı gövdeli, ya da kaktüs ya da yastık şeklinde olabilen bitkilerdir. Yaprakları basit veya birleşik stipulsuz, genellikle alternat, nadiren karşılıklı durumdadır. Temel çiçek durumu az çok çiçekli bir kapitulium, bazen tek çiçekli, çok kısalmış durumdadır. Kapitulium genellikle rasemöz veya simöz şeklinde gruplar halindedir. Kapitulium bazen basık bir başçık

şeklinde olabilir ve buradaki çiçeklerin genç olanları ortada, yaşlı olanları ise bunların çevresinde olacak biçimde sarmal şekilde yerleşim gösterirler. Tipik kapitulum şekilleri koni veya kozalak şeklindedir. Fakat kapitulum hafif konveks, düz, konkav veya vazo şeklinde de olabilir. Kapitulumda iki çeşit brakte bulunur. Birincisi kapitulumu çevreleyen involukruma dönüşen dış braktelelerdir. Bunların her birine fillari adı verilir. İkincisi çiçeklerin brakteleleridir. *Asteraceae*'de üç tip çiçek görülür. Bunlar; tubular çiçek, iki dudaklı (bilabiat) çiçekler, ligulat (dils- ipliksi) çiçekler. Kapitulumdaki tüm çiçekler tüpsü veya tamamı dilsli olabilir (homogam). Ayrıca burada iki dudaklı korollalar da bulunabilir. Heterogam kapitulumda ise tubular çiçekler ve dilsli çiçekler bir arada bulunur. Ayrıca çiçekler ayrı eşeylidir. Kaliks kıl ya da pul şeklinde indirgenmiştir. Kaliks döllenmeden sonra tüysü ve ipeksi bir yapı olan papusa dönüşür. Korolla genellikle gamopetal pentamerdir. Nadiren değişiklik gösterebilir. Androkeum eşit beş stamenden meydana gelir. Stamenler alternipetaldirler ve anterleriyle birleşip tüp ya da boru şeklini alarak stilusu sararlar. Ginekeum birbirine yapışık iki karpelden meydana gelir. Ovaryum alt durumlu ve tek bölmelidir. Ayrıca ovaryum genellikle tek, dik bir tohum taslağı bulundurur. Nadiren 1-2 tohum taslağı bulunur (*Klasea* ve *Cirsium*) [8, 9].

2.4. *Klasea* L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Klasea türleri dallanmayan çok yıllık, otsu bitkiler şeklindedir. Kapitulum diskoit (ender olarak dioik) homogamdır. Fillariler genellikle imbrikat, 4-8 serili, bütün veya uçta sivri, bazen uzun sivri, saman renginde ya da nadiren morumsudur. Çiçek tablası uzun ve sık tüylerle kaplıdır. Çiçekler beyaz, sarı, mavi mor renklerde olabilir. Akenler obovoidtir. Papus çok serili şekildedir.

2.4.1. *Klasea* L. cinsinin sistematikteki yeri

Regnum : Plantae
 Divisio : Spermatophyta
 Subdivisio : Angiospermae
 Phylum : Magnoliophyta
 Classis : Magnoliopsida
 Ordo : Asterales
 Familia : Asteraceae
 Genus : *Klasea*

2.4.2. *Klasea* L. cinsinin ülkemizdeki yayılışı

Klasea cinsi, oldukça kozmopolit bir familya olan *Asteraceae* familyasında yer alır. Bu familya Türkiye Florası'na göre 136 cins ve 1195 tür ile temsil edilmektedir. Buna göre hem tür hem de cins bakımından Türkiye Florasının en zengin familyasıdır. *Asteraceae* aynı zamanda en çok endemik türe sahip familyadır. Bu familya toplam 446 endemik tür içermektedir ve endemizm oranı % 37,3'tür [10, 11, 12].

Cinsler arasında en yaygın olanı *Centaurea*'dır [9]. Ülkemizde *Klasea* cinsi ise 18 takson ile temsil edilmektedir. Bu taksonlardan *Klasea aznavouriana*'nın nesli tükenmiştir. Araştırmacılar tarafından yayılış alanından en son 1905 yılında toplanmıştır [8].

2.5. Bazı *Klasea* ve *Asteraceae* Türleriyle Yapılan Biyolojik Etki Çalışmaları

Cai ve arkadaşları, Çin'de yetişen *Klasea strangulata* bitkisinden izole edilen 20-hydroxyecdysone (E1), 25-deoxy-11,20-dihydroxyecdysone (E2), 24-(2-hydroxyethyl)-20-hydroxyecdysone (E3), ve 20-hydroxyecdysone-20,22-monoacetone (E4) olarak adlandırılan dört ecdysteroidin antioksidan ve serbest

radikal süpürücü etkilerini araştırmışlardır. Bu ecdysteroidlerin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) tarafından indüklenen oksidatif strese karşı insan eritrositlerini koruduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan E1 ve E3'ün ise diğer ikisine göre en iyi antioksidatif ve radikal süpürücü etkiye sahip olduklarını saptamışlardır [13].

Dai ve arkadaşları, Çin'de yetişen *Klasea strangulata* bitkisinden izole edilen yeni bir ecdysteroid olan (24R)-24-(2-hydroxyethyl)-20-hydroxyecdysone (3) üzerine antioksidan aktivite çalışması yapmışlardır. Yapılan çalışmada bu yeni ecdysteroidin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) tarafından indüklenen insan eritrositlerinin hemolizi ve Fe²⁺ sistein tarafından indüklenen karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonu üzerine etkili bir antioksidan aktivitesi olduğunu göstermişlerdir [14].

Bathori ve arkadaşları, *Serratula coronata*, *S. wolffli* ve *S. tinctoria* bitkilerinin sulu metanolik özütlerinin antioksidan etkisini araştırmışlardır. Bu ekstrelerin lipid peroksidasyonuna konsantrasyon bağımlı inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan bileşikler olarak ekstrelerde mevcut flavanoidler ve ecdysteroidler değerlendirmişlerdir. Ayrıca lipid peroksidasyonunda, *S. coronata* bitki ekstresinin flavonoid içeren kısımlarının ecdysteroid içeren kısımlardan daha etkili olduğu tespit edilmiştir [15].

Dai ve arkadaşları, *K. strangulata* bitkisinin rizomlarından üç gliseroglikolipit, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-amine-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-p-hydroxy-phenyl-propionamido-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol ve 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-[alpha -D-glucose(1-6)-beta -D-allose]-glycerol elde etmişlerdir. Bu gliseroglikolipitlerin yapılarını 2D NMR gibi spektroskopik metotlar kullanarak aydınlatmışlardır. Ayrıca bu bileşiklerin önemli antimikrobiyal ve antitümör aktivitelerinin olduğunu tespit etmişlerdir [16].

Aliyu ve arkadaşları, Kuzey Nijerya'da geleneksel ilaç olarak kullanılan *Vernonia ambigua*, *V. blumeoides* ve *V. oocephala* türlerinin etanol ve kloroform ekstrelerini standart prosedürlerle fitokimyasal taramalara tabi tutmuş ve disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Fitokimyasal taramalarda ekstrelerde steroidler, terpenler, saponinler, flavonoidler, alkaloidler, tanenler ve glikozitlerin mevcut olduğu gösterilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal sonuçlara göre bu ekstrelerin potansiyel antimikrobiyal preparatlar olduğunu göstermişlerdir [17].

Bagci ve arkadaşları, *Tanacetum balsamita subsp. balsamita* ve *T.chiliophyllum var. chiliophyllum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların kimyasal bileşimini analiz etmişlerdir. Ayrıca bu yağların yaklaşık %85'ini oluşturduğu tespit edilen trans-chrysanthenol, chrysanthenyl acetate, linalool oxide, camphor, 1,8-cineole, propionate, carveol gibi bileşenlerin *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerini, iki gram-pozitif ve gram-negatif bakteri ile iki maya üzerinde araştırmışlardır. Sonuç olarak bu yağların denenen tüm mikroorganizmalara karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [18].

Hulley ve arkadaşları, *Pteronia incana* bitkisinin Güney Afrika'da grip, ateş, böbrek hastalıkları ve sırt ağrısı gibi rahatsızlıklarda tedavi amaçlı kullanılması üzerine bu bitkinin biyolojik aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmada bir maya (*Cryptococcus neoformans*), iki gram-negatif bakteri (*Moraxella catarrhalis* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve bir gram-pozitif bakteri (*Mycobacterium smegmatis*) kullanmış ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini kullanarak antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Sonuç olarak, metanol diklorometan (MeOH CH₂Cl₂) ekstresinin ve esansiyel yağların *C. neoformans* ve *M. smegmatis* üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir [19].

Jayaraman ve arkadaşları, *Stevia rebaudiana* bitkisinin etil asetat, aseton, kloroform ve su ekstrelerinin antimikrobiyal ve antitümör aktivitesini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite için bakteri olarak *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio cholerae*

kullanılmış, antifungal aktivite için ise *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Epidermophyton species* türlerini ve agar difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Sitotoksik aktivite için Vero ve HEp2 hücreleri ile 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) metodunu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, aseton ve etil asetat ekstralarının daha etkin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ve gram-negatif organizmalardan daha çok gram-pozitif organizmalarda etkili olduğunu, ayrıca tüm ekstraların *Epidermophyton species* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca 1: 8 seyreltilmiş aseton ekstresinin normal hücrelere toksik etkisinin olmadığı, kanserli hücreler üzerine ise hem antikanser hem antiproliferatif aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [20].

Nino ve arkadaşları, Kolombiya’da Ucumari doğa parkından topladıkları sekiz *Asteraceae* ve iki *Rubiaceae* türünün antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmada agar difüzyon yöntemi ile iki gram-pozitif, iki gram-negatif bakteri ve üç mantar türü kullanmışlardır. *Asteraceae* familyasına ait ekstraların *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı daha aktif antimikrobiyal etki gösterdiğini ve *Asteraceae* familyasının çok etkili sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [21].

Pelissari ve arkadaşları, başlıca Latin Amerika ve Brezilya’da bulunan ve Halk arasında anti-inflamatuar ve yara iyileştirmede kullanılan *Melampodium divaricatum* bitkisinin antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağları ve disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktiviteyi gözlemlemek için *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* ve *Serratia marcescens* bakterilerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda sadece *S. aureus* ve *B. subtilis*’de duyarlılık tespit etmişlerdir [22].

Del-Vechio-Vieira ve arkadaşları, *Ageratum fastigiatum* bitkisinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini agar difüzyon metodu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhosa* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ama *Pseudomonas aeruginosa* ve funguslarda aktivitesinin olmadığını tespit etmişlerdir [23].

Lenza ve arkadaşları, *Eclipta alba* bitkisinin etanol ekstresinin antibakteriyel ve antifungal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini ve farklı patojenik bakterileri kullanmışlardır. Çalışma sonunda *Eclipta alba* bitkisinin etanol ekstresinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus spp* üzerine önemli bir antimikrobiyal aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [24].

Cardenas ve arkadaşları, *Monticalia greentmaniana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini ve insanlar için patojen olan önemli gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 25955) üzerinde önemli bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [25].

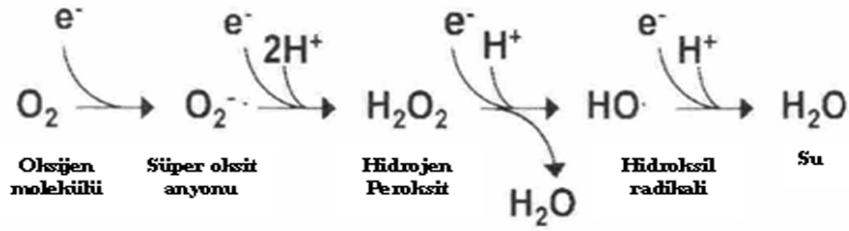
Senatore ve arkadaşları, Lübnan'da yetişen *Achillea falcata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların bileşimini ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda çoğunlukla gram-pozitif bakteriler üzerinde aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [26].

Boussaada ve arkadaşları, *Evax pygmaea* bitkisinin metanol ekstresinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada beş bakteri ve

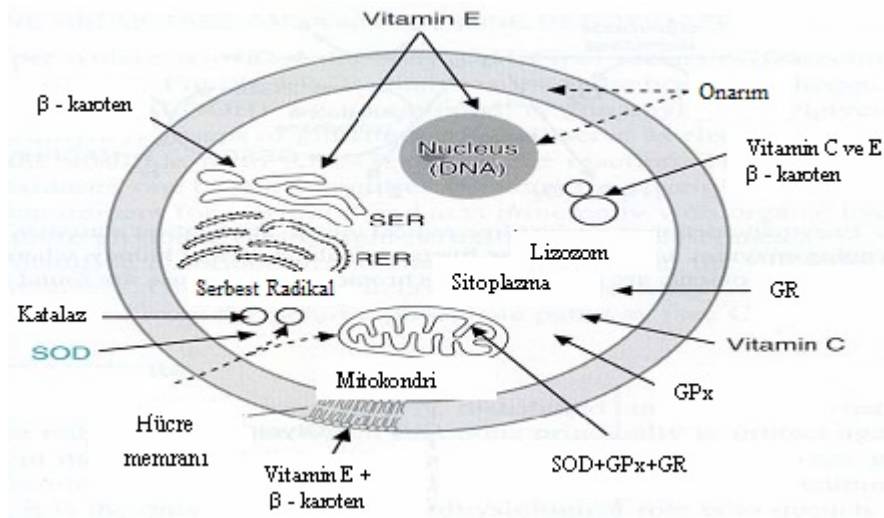
iki maya kullanmışlardır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ve TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metotlarını kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde ise agar difüzyon ve broth mikrodilüsyon metotlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu ama antifungal aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca etil asetat ve metanol ekstrahelerinin önemli serbest radikal süpürücü etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir [27].

2.6. Antioksidanlar

Şekil 2.1'de görüleceği gibi serbestleşen oksijen moleküllerinin oluşturduğu serbest radikaller aerobik metabolizma esnasında hayvan ve bitkilerde üretilerek, memeli ve bitkilerde lipit peroksidasyonu, protein ve DNA hasarı ile hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca insanlarda oksidatif strese bağlı olarak Alzheimer, Parkinson, romatoid artirit, diabetes mellitus gibi rahatsızlıklar meydana getirdikleri de bilinmektedir. Yaşlanmaya da, serbest radikallerin çok fazla birikerek veya hücrenin tamir yeteneğini bozarak neden olduğu da ileri sürülmektedir. Literatür kaynaklarına göre diyetle alınan antioksidanlar, serbest radikallere karşı korunmada yararlıdır ve insanlarda pek çok hastalığın ve kanserin önlenmesinde önemli rol oynarlar. Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini zincirleme şekilde ilerleyen lipit peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek, direkt olarak reaktif oksijen türleri (ROT) konsantrasyonunu azaltarak, serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirerek ya da geçiş metalleri ile şelat oluşturarak gösterirler. Şekil 2.2'de görüleceği gibi, antioksidan enzimler ve antioksidanlar hücrenin farklı kısımlarında görev alır serbest radikallerin temizlenmesinde sinerjistik etkiler sergiler [28].



Şekil 2.1. Serbestleşen oksijen moleküllerinin oluşturduğu radikaller [28]



Şekil 2.2. Hücrenin antioksidan savunma mekanizması [28]

2.6.1. Bitkilerdeki antioksidanlar

Hayvansal organizmalarda olduğu gibi bitkiler de yaşamlarını sürdürebilmek için serbest radikallere ve aktif oksijen türlerine karşı çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Bunlar Çizelge 2.1’de görülebileceği gibi enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar şeklinde iki kısma ayrılırlar. Enzimatik antioksidanlar; superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz, monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, glutatyon redüktaz’dır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; vitamin-E (alfa-tokoferol), vitamin-C (askorbik asit), glutatyon ve fenolik bileşiklerdir [28].

Çizelge 2.1. Bitkilerde bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
Superoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon S-transferaz Fosfolipit-hidroperoksit glutasyon peroksidaz Askorbat peroksidaz Monodehidroaskorbat redüktaz Dehidroaskorbat redüktaz Glutasyon redüktaz	Vitamin-E (Alfa-tokoferol) Vitamin-C (Askorbik asit) Glutasyon Fenolik bileşikler

2.6.2. Memelilerdeki antioksidanlar

Antioksidanlar düşük derişimlerde okside edilebilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele etmede kullanılan maddelerdir. Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini dört farklı şekilde gösterirler. Örneğin α -tokoferol, lipit faz zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipit peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları kırar. Glutasyon gibi antioksidan moleküller ise doğrudan reaktif oksijen türleri derişimini azaltırlar. Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bazı maddeler ise geçiş metalleri ile şelat oluşturarak etkilerini gösterirler. Bu yolla laktoferritin, transferrin ile ferritin demirle; seruloplazmin ve albumin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler. Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek için endojen antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu sistemler, Çizelge 2.2’de görülebileceği gibi antioksidan enzimler ve antioksidan vitaminler olarak iki kısma ayrılırlar. Antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz’dır. Antioksidan vitaminler ise; alfa-tokoferol, beta-karoten ve askorbik asit’tir [28].

Çizelge 2.2. Memelilerde bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Süperoksit dizmutaz (SOD)	$O_2^{\cdot -}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür	Manganez içerir (Mn-SOD) Bakır ve çinko içerir (CuZn-SOD) Mn ve Fe içerir (Fe-SOD) Ni içerir (Ni-SOD) Bakır içerir (Cu-SOD)
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir	Peroksizomlarda yer alan tetramerik bir proteindir
Glutatyon peroksidaz (GPx)	H_2O_2 ve lipit peroksidlerini etkisizleştirir	Selenoprotein (Se^{2+} içerir), daha çok sitozolde, az olarak mitokondride bulunur
Antioksidan Vitaminler	Rolü	Özellikleri
Alfa tokoferol	Lipit peoksidasyonunu kırar, lipit peroksidlerini $O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} 'yi temizler	Yağda çözünür
Beta karoten	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} 'yi temizler, vitamin A'nın oksidasyonunu önler, geçiş metalleri bağlar	Yağda çözünür
Askorbik asit	Direkt olarak $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} ve H_2O_2 'yu temizler, nötrofiller tarafından uyarılan antioksidanları nötralize eder, vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlar	Suda çözünür

2.7. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

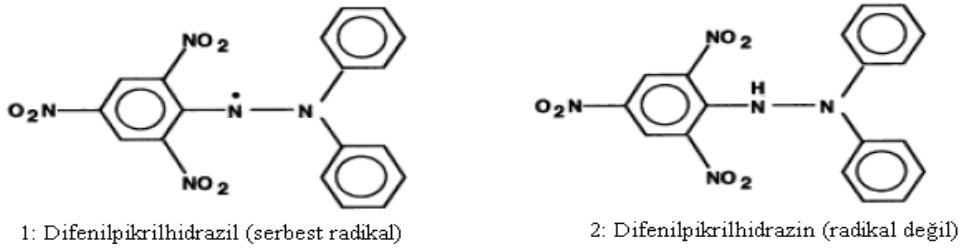
2.7.1. Toplam fenolik madde içerik tayini

Singleton (1965), tarafından ortaya konan yöntemine göre; suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan sarıdan yeşile doğru renkli kompleks 760 nm'de maksimum absorbanı oluşturur [29].

2.7.2. DPPH radikali süpürücü aktivitesi

Blois (1958), tarafından ortaya konan yöntemine göre; DPPH radikali ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup, bu radikal 517 nm’de maksimum absorptans oluşturmaktadır. Şekil 2.3’de DPPH’ın serbest radikal olan ve radikal olmayan yapıları görülmektedir. Antioksidan maddelerle muamele edilmesi, DPPH’tan kaynaklanan mor rengin şiddetinin azalarak absorptansın düşüşüne sebep olmaktadır. Farklı numune derişimleriyle muamele edilen DPPH’ın absorptansındaki değişim ölçülür ve aşığıdaki eşitlik kullanılarak süpürücü aktivite % inhibisyon değeri olarak hesaplanır [29].

Serbest radikalın % inhibisyon değeri = $(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}} \times 100$



Şekil 2.3. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)’in moleküler yapısı [30]

2.8. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın hangi antibiyotiklere duyarlı ya da dirençli olduğu antimikrobiyal aktivite deneyleri ile belirlenerek ve duyarlı olduğu en uygun antimikrobiyal madde kullanılarak tedavi edilir. Mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde iki temel yöntem kullanılır.

2.8.1. Seyreltme (Dilüsyon) yöntemleri

Sıvı ve agar seyreltme yöntemleri antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmaları öldüren ve üremelerini durduran minimal derişimleri genellikle mg/ml cinsinden belirlemeye yarayan testlerdir. Seyreltme yöntemleri, disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testi yapılmayan zor üreyen bakterilerin denenmesine imkan sağlar. Bu yöntem, antimikrobiyal maddenin sıvı veya katı besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı denenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesi esasına dayanır. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37 °C'de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletildikten sonra elde edilen sonuçlar, bakterinin üremesini durduran en az antimikrobiyal madde miktarı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerini verir [29].

2.8.2. Difüzyon yöntemi

Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Yöntemin temelini belirli derişimlerdeki antimikrobiyal maddenin katı besiyerine difüze olup yayılması oluşturur. Denenecek bakteriden uygun katı besiyerine ekim yapılır. Kullanılacak antimikrobiyal maddenin ilave edilmesi için katı agar besiyeri üzerinde belli çaplarda kuyucuklar açılır. Daha sonra belirlenen derişimlerdeki antimikrobiyal madde açılan kuyucuklara ilave edilir. Optimum inkübasyon sıcaklığında yeterince bekletildikten sonra zon oluşup oluşmadığına bakılır [29].

Disk Difüzyon Yöntemi

Yöntemin temeli belirli derişimdeki antimikrobiyal maddenin katı besiyerine difüze olup yayılmasına dayanır. Denenecek bakteriden uygun katı besiyerine ekim yapılır. Antimikrobiyal madde kağıt disklere belli derişimlerde emdirilir. Optimum

inkübasyon sıcaklığında yeterince bekletildikten sonra zon oluşup oluşmadığına bakılır [29].

2.8.3. Enfeksiyonlara neden olabilecek bazı mikroorganizmalar

Bacillus cereus

Gram pozitif, endospor oluşturan bakteriler olup zorunlu veya fakültatif aeropturlar. Genel yaşam ortamı toprak ve sudur. Genelde laboratuarlarda hava kaynaklı kontaminantlar olarak görülürler. *B.cereus* dokuda hasara neden olan bir ekzotoksin üretir ve enterotoksinleriyle de besin zehirlenmesine neden olur [31].

Bacillus subtilis

Gram pozitif, endospor oluşturan bakteriler olup zorunlu veya fakültatif aeropturlar. Genel yaşam ortamı toprak, su, bitkiler, hayvanlar, sütlerdir. Sıklıkla besin zehirlenmesi ve doku veya göz içerisinde enfeksiyon ve hasara sebep olurlar [31].

Staphylococcus aureus

Gram pozitif koklardır. Mikrofauları ve makrofauları degranüle eder. Epidermolizden sorumludur. Serolojik olarak farklı beş enterotoksini vardır ve besin zehirlenmelerine sebep olurlar. Genellikle iltihap oluşumuyla seyreden lokal enfeksiyonlara sebep olurlar. Hastane enfeksiyonlarının en sık görülen sebeplerindendir. Septisemi, endokardit ve grip sonrası pnömoni etkenidirler [32].

Enterococcus faecalis

Gram pozitif koklardır. Yuvarlak, oval, çiftler ve zincir şeklinde dizilim gösterirler. Alfa hemoliz veya hemolizsiz olabilirler. Normal dışkı florasının bir kısmını oluştururlar. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon oluştururlar. Konak

direncinin zayıfladığı durumlarda idrar yolu enfeksiyonu, sepsisemi, bakteriyal endokardit ve safra yolu enfeksiyonu oluştururlar [31].

Pseudomonas aeruginosa

Gram negatif basillerdir. Hareketli, kapsüllü ve zorunlu aerob bir bakteridir. En önemli insan patojenlerinden biri olup toprakta, sularda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygındır. Fırsatçı patojenlerden olup, hastane enfeksiyonlarının önde gelen etkenlerindedir. Pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, cerrahi enfeksiyonlar, yanık enfeksiyonları, kemoterapi uygulanan ve antibiyotik tedavisi uygulanan hastalarda çeşitli enfeksiyonların etkenidir [31].

Proteus vulgaris

Gram negatif basillerdir. Hareketli, üreaz enzimi üreten, laktoz negatif kapsülsüz ve sporsuz bakterilerdir. İdrar yolu enfeksiyonlarının ve diğer barsak dışı enfeksiyonların etkenidir. Yara enfeksiyonları, pnömoni, sepsisemi gibi enfeksiyonlara da sebep olabilir [31].

Escherichia coli

Gram negatif basillerdir. Tümü fakültatif anaeroptur. Oksidaz negatiftir. Doğal yaşam ortamı insan ve hayvanların barsaklarıdır. İnsandaki bakteri enfeksiyonlarının en sık rastlanan etkenidir. İdrar yolu enfeksiyonlarında da etken olabilir. Ayrıca kolesistit, apandisit, peritonit, ameliyat sonrası yara enfeksiyonları ve sepsisemilerde de önemli etkisi vardır. Bazı suşları süt çocuğu diyaresinden sorumludur. Bazı suşları enterotoksinleriyle kolera benzeri bir tablo oluştururken, bazıları da kalın barsakta dizanteri benzeri bir hastalığa sebep olurlar [32].

Klebsiella pneumoniae

Gram negatif basillerdir. Büyük, hareketsiz ve kapsüllü bakterilerdir. Laktozu fermente ederler. Alkolizm, diyabet veya kronik akciğer hastalığı olan bireylerde pnömoni etkenidir. Özellikle hastanede yatan hastalarda olmak üzere, idrar yolları enfeksiyonlarının ve bakteriyeminin etkenidirler [31].

Salmonella typhimurium

Gram negatif basillerdir. İnsan, hayvan ve tavukların gastrointestinal sisteminde bulunur. Kontamine olmuş besinler ile, oral veya fekal yoldan bulaşır. Çiğ süt ve kaplumbağalardan da bulaşan bu bakterinin en önemli bulaşma yolu yumurta ve kümes hayvanlarıdır. Hem ince hem kalın barsakta enfeksiyon oluşturur ve diyareye sebep olur [31].

Candida albicans ve *Candida tropicalis*

İnsandaki *Candida* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğuna *C.albicans*, geri kalanına ise *C.tropicalis* ve başka diğer türler sebep olur. Diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir. Tomurcuklanan, oval mayalardır. İnsan ve hayvanlarda mukozalarda yaygın olarak bulunurlar. Özellikle hücresel bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda mukozalara ve nadiren deri ve iç organlarda yerleşim gösterirler. Yoğun antibiyotik kullanımı da kandidoza zemin hazırlar. Esas olarak vücudun sıcak ve nemli bölgelerinde enfeksiyon yaparlar [32].

2.9. İlaç-DNA Etkileşimi

İlaçlarla DNA'nın etkileşimi, ilaç keşfi ve ilaç geliştirme sürecinde biyolojik çalışmaların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [57, 58]. DNA'yı bağlayan ligandlarla ilişkili etkileşimlerin çeşitli tipleri vardır. Bunlar interkalasyon, kovalent olmayan oluk bağlanma, kovalent bağlama veya çapraz bağlama, DNA'yı kesme ve

nükleozit analog birleşmeyi içerir. Bu bağlanma etkileşimlerinin sonuçları, kompleks oluşumu düzenlemek için hem DNA hem de ilaç moleküllerinde değişikliklere yol açar. Çoğu durumda, DNA sarmal yapısındaki değişiklikler, değişmiş termodinamik kararlılık ile sonuçlanır ve DNA'nın işlevsel özelliklerinde değişikliklere sebep olur [59]. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur [60]. Çoğu antitümör ilacı da hedef hücredeki DNA'ya zarar vererek işlev yapar, yani doğrudan DNA'ya bağlanır ve DNA hasarına neden olur. Bu şekilde DNA kalıbı işlevine engel olabilir, replikasyonu ve DNA sentezini inhibe edebilir [33].

2.10. Kanser

Kanser, hücrenin genetik materyali tarafından kontrol edilen hücre bölünmesinin normal ilerleme sürecinde meydana gelen düzensizlikler sebebiyle hücrelerin anormal şekilde ve kontrolsüz bölünmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Hücre döngüsünde G1, S, G2 ve M (Mitoz) olmak üzere dört ana faz vardır. S fazı DNA'nın sentez fazı, M fazı ise hücre bölünme fazıdır. Bu iki faz, G1 ve G2 adı verilen iki boşluk fazı ile ayrılır. M fazı, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak dört alt safhaya ayrılır. G1, S ve G2 interfazı oluşturur. G0 ise çoğalmanın olmadığı dinlenme fazıdır, bölünmeyecek hücreler veya hasarlı hücreler G0'da bekler. Bu hücre döngüsünün her basamağı çoklu protein kinaz kompleksleri tarafından katalizlenen protein fosforilasyonu aracılığıyla kontrol edilir. Farklı siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünün farklı fazlarını kontrol eder. Bunların aktiviteleri transkripsiyonel kontrol, inhibitör proteinler tarafından aktivitelerinin değişmesi ve proteolitik yıkımlarının düzenlenmesi ile kontrol edilir. Hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini düzenleyen proto-onkogenler ile Rb (Retinoblastoma tümör baskılayıcı proteini) ve p53 gibi tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü ile kanser arasındaki ilişkide çok önemlidir. Kanseri hücreleri normal hücre döngüsü düzenlenmesinden kurtulup anormal şekilde ve hızla bölünerek tümör oluşumuna sebep olurlar [61].

İnsan vücudundaki hücrelerin çoğalması (proliferasyon), farklılaşması (diferansiyasyon), yaşlanma (senesens) ve programlı ölümleri (apoptoz), sayıları 100'den fazla olan değişik proteinler tarafından düzenlenir. Bu proteinleri kodlayan genlerden birinin veya birkaçının mutasyona uğraması kanser için başlangıç sebebi olabilir. Canlı organizmalarda görülen bu tür hücre çoğalma düzenlemeleri, bazen çeşitli faktörlerin etkisiyle bozulmaktadır. Canlının ihtiyacı olmadığı halde herhangi bir dokuda meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi sayısal olarak aşırı hücre artışına ve sonuçta da tümör oluşumuna sebep olur. Tümör bölgesindeki hücreler sayısal olarak aşırı artış gösterir ve buna bağlı olarak artan besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılmaya başlar. Bu tümör hücreleri şekil ve fonksiyon bakımından normal hücrelerden farklı bir yapı gösterirler. Sonuçta hem yapısal hem de işlevsel bakımdan anormal bir doku kitlesi oluşur. Bu kitle, tetikleyici faktörler ortadan kalksa bile büyümesini sürdürür. Bulunduğu yerdeki doku ve organı işgal eder ve giderek vücudun başka organlarına da yayılmaya başlar. Hastalığın sonraki evrelerinde ise vücudu sarabilir ve bu duruma da metastaz adı verilir [34].

Kanserler, hücre tipine bağlı olarak genellikle dört gruba ayrılmaktadır. Kanserlin iki tipi olan lösemiler ve lenfomalar beyaz kan hücreleri olan lökosit ve lenfositlerin gereğinden çok üremesinden dolayı oluşmaktadır. Sarkomalar, kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezodermden gelişen dokuların tümörleridir. Karsinomalar ise kanserlerin %85'ini oluşturmaktadır ve bunlar bezler, meme, deri ve ürogenital dokulardan (prostat, rahim ağzı gibi) köken almaktadır [62].

Kanser hücrelerinin genel özellikleri şunlardır [34] :

- Kanserleşen hücre üreme kontrolünü kaybeder. Normal hücrelerde gereksiz çoğalmayı önleyen inhibisyon mekanizması kanser hücrelerinde bozulmuştur.

- Kanserleşen hücre, dokuya özgü olan yapısal özelliğini ve morfolojik yapısını kaybetmiştir. Kanserleşen hücreler normal hücrelere göre küçük ancak çekirdekleri daha büyük olur.
- Kanserleşen dokuda, bölünen hücrelerde normal farklılaşma gerçekleşmez.
- Kanserleşen hücrelerin arasında dokuya özgü kontakt inhibisyonu oluşmaz.
- Kanserleşen hücrelerin metabolizması değişmiştir. Genellikle şeker alımı artmış ve anaerobik solunum oranı yükselmiştir.
- Kanserleşen hücrelerin enzimlerinde miktar ve fonksiyon bakımından değişiklikler oluşur.
- Kanserleşen hücrenin antijenik özellikleri değişmiştir.
- Kanserleşen hücrelerin sitoplazmik hacimleri normal hücrelere oranla daha küçük olup mikroskop altında kolaylıkla ayırt edilebilirler.

Kanser oluşumunda etkili olan üç tip gen bulunmaktadır:

- Tümör süpressör genler (tümör baskılayıcı genler, anti-onkogenler)
- Proto-onkogenler (hücre büyümesini sağlayan genler)
- Onkogenler (proto-onkogenlerin kanser etkeni genlere dönüşmesi)

Kanser genlerinin aktivasyonunda rol oynayan çevresel faktörler:

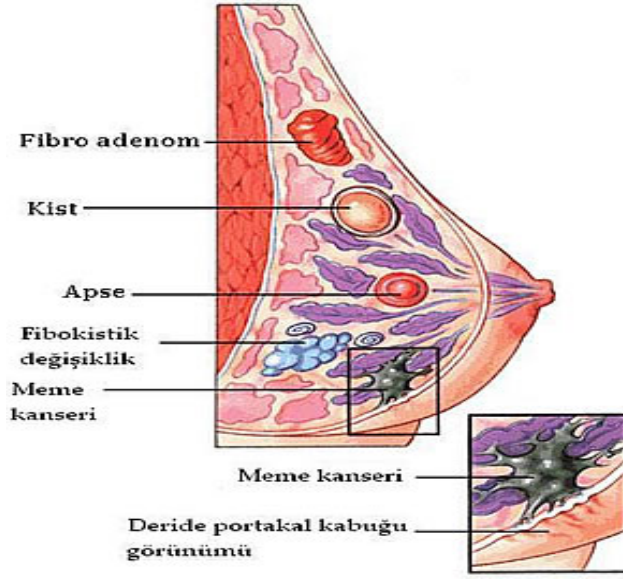
- Kimyasal mutajenler
- Fiziksel etkenler (radyasyon ve ultraviyole ışınları)
- Virüsler (kanserlerin %10'una neden olmakta)
- Alınan gıdalar
- Sigara (kanserlerin %50-60'ına neden olmakta)
- Yaşlanmış hücrelerde biriken toksik maddeler ve çevre kirliliği [34].

2.10.1. Yaygın kanser türleri

Meme Kanseri

Kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Meme kanseri doğum yapmamış kadınlarda ve 40 yaş üzerindeki kadınlarda daha sık görülmektedir. Ayrıca doğum yapıp bebeğini emzirmeyenlerde, alkol, sigara ve aşırı deodorant kullananlarda meme kanseri riskinin fazla olduğu ifade edilmektedir [34].

Östrojen gibi üreme hormonlarının, kanser gelişiminin yanı sıra hücre proliferasyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkilerinin meme kanseri riskinde önemli olduğu düşünülmektedir. Erken yaşta menarş, geç yaşta menapoz, geç yaşta ilk hamilelik ve daha az sayıda hamilelik, meme kanseri riskini üreme hormonları seviyelerini etkileyerek arttırmaktadır [35]. Meme dokusunda sert kitle oluşumunun fark edilmesi (Resim 2.1) veya periyodik mamografi çekilmesi ile meme kanseri tanısı konulmaktadır [34]. Her yıl 180 000'den fazla vakaya teşhis konmakta ve yaklaşık 43 000 kadın meme kanserinden ölmektedir. Meme kanserinden sorumlu olduğu bilinen iki gen vardır. Bunlardan *BRCA1* kromozom 17'nin uzun kolunda haritalanmış otozomal dominant bir gendir, diğer gen ise kromozom 13'ün uzun kolunda haritalanmış otozomal dominant bir gen olan *BRCA2*'dir. Mutant bir *BRCA1* geni taşıyan kadınların %90'ında meme kanseri gelişmektedir ve yumurtalık kanseri içinde büyük bir risk oluşturur. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri hızlı bölünen hücrelerde ifade edilir ve G1/S sınırında ifadesi en yüksek düzeydedir [63].



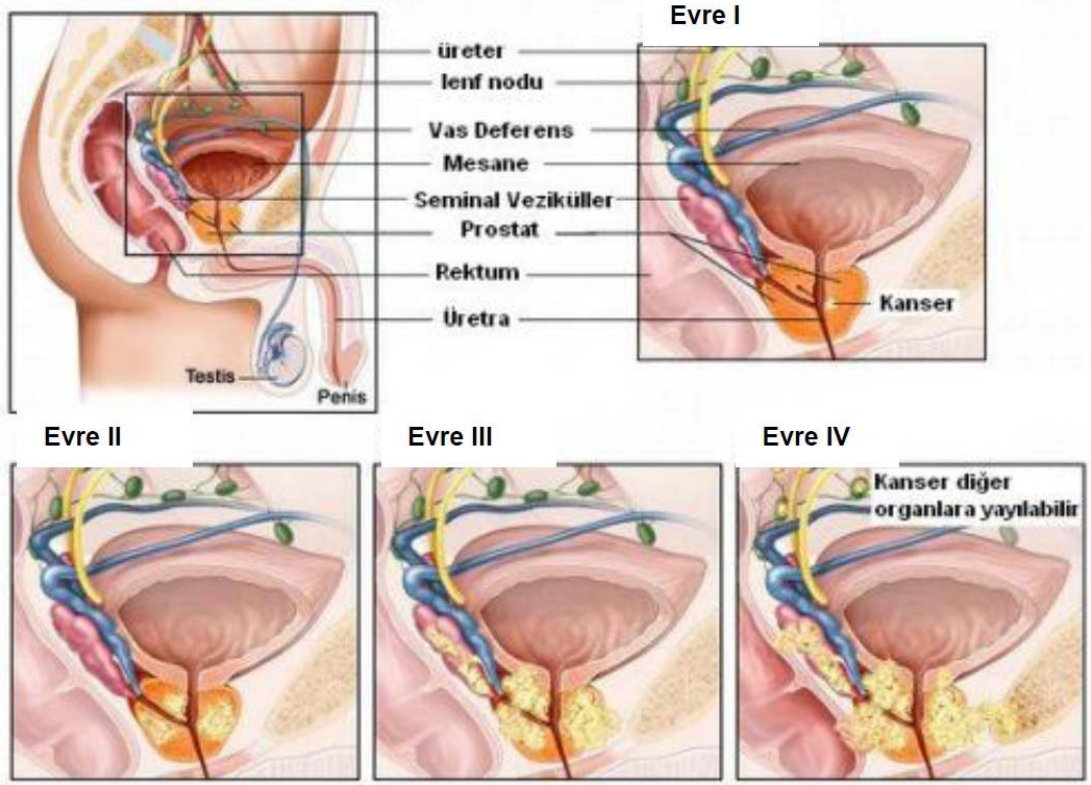
Resim 2.1. Meme kanseri [66]

Prostat Kanseri

Prostat, erkek genital sisteminin en büyük bezi olup erkek üretrasının başlangıç kısmını oluşturur. Kısmen tübüloalveolar bezlerden kısmen de bu bezlerin arasını dolduran ara dokudan yapılmış olan prostat bezi 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında iri bir ceviz büyüklüğünde olup, yaklaşık 18-20 gr ağırlığında androjen bağımlı bir organdır. Prostat kanserlerinin %30-35'i lokal ileri veya metastatik kanserlerdir. Prostat kanseri I-IV arasında evrelendirilmektedir (Resim 2.2). İleri evrede, prostat kanserinin büyüme ve gelişimi androjen bağımsız olmakta ve androjen işlev kaybı tedavisini etkisiz hale getirmektedir. İleri prostat kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç gelişimi hastalığın tedavisinde kemoterapatik ajanları yetersiz kılmaktadır [35].

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanser çeşitidir. 50 yaş üzeri erkeklerde görülme sıklığı artmaktadır. Genellikle idrar yapmakta zorlanma, kanamalı idrar, sırt ve bel ağrıları belirtileri arasındadır. Prostat kanserinde gen tedavisi konusunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle rekombinant tekniklerle üretilen Leuvectin

maddeleri hastaya verilerek bağışıklık sisteminin aktive edilmesi amaçlanmaktadır [34].



Resim 2.2. Prostat kanserinin evreleri [67]

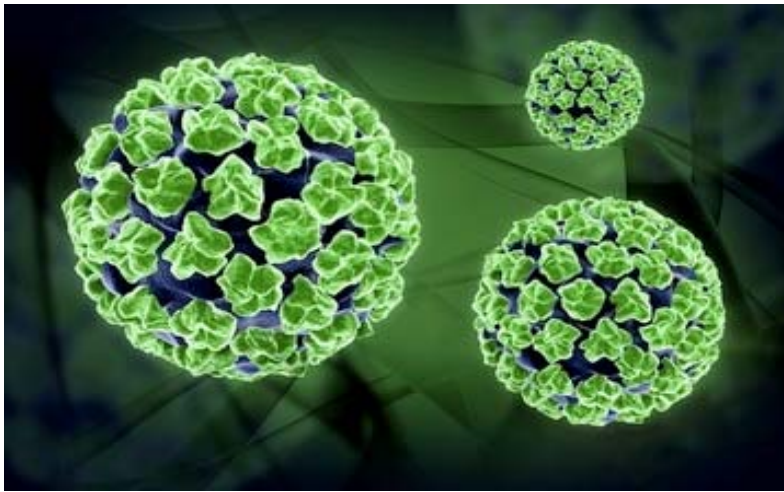
Serviks (Rahim Ağızı) Kanseri

Serviks kanseri, meme kanserinden sonra kadınları etkileyen en önemli kanserdir. Her yıl serviks kanserinden 231 000 kadın ölmektedir. Ayrıca her yıl 466 000 kadın serviks kanserine yakalanmaktadır. Servikal kanser genellikle HPV (İnsan Papilloma Virüsü)'nin onkojenik tiplerinin uzun süren enfeksiyonu sonucu ortaya çıkar (Resim 2.3). Şimdiye dek 100'den fazla HPV tipi saptanmıştır; bunlardan onkojenik türler, servikal kansere ya da vulvarprekanseroz lezyonlara neden olmaktadır. Serviks kanserinin sebepleri arasında, HPV, Herpes Simpleks Tip-2 gibi enfeksiyonlar, çok eşlilik, cinsel yaşamın 20 yaşından önce başlaması, çok sayıda doğum, sigara ve C

vitamini eksikliği gösterilmektedir. Serviks kanseri, tüm kanserler içinde taramayla önlenabilir olan tek kanserdir. Korunmak için rahim ağzındaki olası değişiklikleri görmek amacıyla her yıl rahim ağzından sürüntü alınarak test (Pap-smear testi) yaptırmak yeterlidir. 35-40 yaş arasında bu test mutlaka bir defa yaptırılmalı ve 5 yılda bir tekrarlanmalıdır [36].



Resim 2.3. Serviks kanserinin evreleri [68]



Resim 2.4. İnsan Papilloma Virüsü (HPV) [69]

2.10.2. Kanser ve antioksidanlar

Antioksidanlar, kimyasal maddeye maruziyet ya da radyasyona maruz kalma sonucunda veya iç kaynaklı olarak oluşan kararlı olmayan oksijen türlerine elektron vererek etkilerini gösterirler. Bu özellikleri sayesinde antioksidanlar birçok yol ile kansere karşı koruyucu olabilirler. Antioksidanlar, hücre membranının fiziksel bütünlüğünün artmasına ve normal membranların oluşumuna yardımcı olurlar. Bu gruptaki bileşiklere örnek olarak askorbik asit (C vitamini) ve karotenoidler (beta-karoten) verilebilir. Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyerek DNA ile etkileşimini önlerler. Antioksidanların başlıca avantajı, mutajenlerin geniş bir kısmına karşı etkili olmalarıdır [37].

2.10.3. Kanser ve apoptoz

Apoptoz veya programlı hücre ölümü, organizmanın gelişimi sırasında sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir süreçtir. Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık ihtiyaç duyulmuyorsa, hücre içi ölüm programları aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu süreç, Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptozis ile gerçekleşir. Programlı hücre bölümünün işlevi tüm metazoonlarda tanımlandığı kadarıyla evrimsel süreçte korunmuş yollardan biridir. Canlıların başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi, embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır. Hücre farklılaşması ve değişik hücrelere dönüşmesi hem hücre bölünmesinin hem de hücre ölümünün kontrol edildiğini göstermektedir. Erişkin hücrelerde apoptoz normal hücre homeostazisini sağlamaktadır. Bu durum özellikle uzun yaşam süresi olan, fizyolojik olduğu kadar patolojik birçok ölüm sinyalini de entegre etmesi gereken memeliler için oldukça önemlidir. Örneğin, apoptotik yolda görev alan genlerin işlev kaybı ya da kazanımı hücrel homeostazinin bozulmasına yol açarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Yetersiz apoptoz ise kanser ve otoimmün

hastalıklara, hızlandırılmış hücre ölümü ise akut ve dejeneratif birçok hastalığa yol açabilmektedir [38].

Genel olarak canlı organizmalarda iki ana hücre ölüm biçimi vardır. Bunlardan biri apoptoz, diğeri ise hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar göerek şişip, patlayarak ölmesi yani nekrozdur. Hücreler apoptoz sırasında birçok uyararla ölüme giderler ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Bu süreç nekrotik hücre ölüm sürecinden farklıdır. Nekrotik ölümdede hücre kontrolsüz bir biçimde ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülür. Apoptotik ölümdede ise hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunur. Bu nedenle apoptoz hücre intiharı olarak da bilinir. Nekrozda patlayan hücrenin içerikleri komşu hücrelere de zarar verirken, apoptozda çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmezler [38].



Resim 2.5. Hücrede apoptoz [70]

Apotoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve yoğunlaşmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Apoptozun erken evrelerinde kaspaz

proteinleri salınmaya başlar ve aktifleşen bu proteinler hücresel birçok substratın parçalanmasına hem aracılık eder hem de neden olur. Kaspaz enzimleri ayrıca hücrenin diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirirler. Bunun sonucunda hücre hem biyokimyasal hem de morfolojik olarak değişir [38].

Apoptozun düzenlenmesinde görev alan proteinler şunlardır: Fas, Trail, TNF (almaç ve ligandlar), Bcl-2 ailesi (yaklaşık 12 tane), kinazlar (RIP3, CAP, AKT, PKA, MapK), mitokondri proteinleri (VDAC, ANT, Sitokrom C, AIF, SMAC), proteazlar, kaspazlar (yaklaşık 13 tane), kaspaz düzenleyicileri (IAP/Survivin, Apaf-1), transkripsiyon faktörleri (p53, myc, Nur77), diğerleri (FADD, TRADD, DAD1) [38]. Apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde rol alan genler ise Ced-1, Ced-2, Ced-5, Ced- 6, Ced- 7, Ced- 10 ve Ced- 12'dir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde rol alan genler [38]

Sınıf I Genler	Homologları/İşlevi	Sınıf II Genler	Homologları/İşlevi
Ced-1	Yutma almaçlı kodlar	Ced-2 Ced-5	Crkl1 DOCK-180
Ced-6	Memeli PTB domaini taşıyan adaptör protein	Ced-10	Küçük GTPaz Rac-1
Ced-7	ABC-1 (apoptotik tanıma) taşıyıcı hücreyi	Ced-12	ELMO (hücre iskeleti)

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler ise, genel olarak 5 grupta incelenebilmektedir [35] :

-Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri (Hematoksilen ve Giemsa boyama ile ışık mikroskopunda, DAPI (6,4'-diamidino-2-fenilindol), Propidyum iyodür (PI) ve Hoeschst boyası ile floresans mikroskopunda görüntüleme).

- Biyokimyasal Yöntemler (Western Blotlama, Flow Sitometri).
- Histokimyasal Yöntemler (Anneksin V, Kaspaz-3 yöntemi, TUNEL, M30).
- İmmünolojik Yöntemler (ELISA, Flourimetrik yöntem).

DAPI, PI ve DiOC₆ Boyama

DAPI, floresan boyama ile hücre DNA'sında meydana gelen değişimi gözlemlemekte kullanılan bir boyadır. Aynı anda canlı ve ölü hücreleri boyamak için kullanılabilen mavi renkli floresan özellikli bir proteindir. DNA'ya özgün bir prob olup DNA'nın küçük oluğundaki A-T bazlarınca zengin dizilere bağlanarak floresan bir kompleks oluşturur. DNA'ya bağlandığında, floresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır. Bu reaktif, DNA fragmentleşmesini gözlemlemek için kullanılmaktadır. DNA fragmentleşmesi apoptoz için tanımlayıcı olan bir işlemdir. DAPI akım sitometri, kromozom boyaması, histokimya ve biyokimyadaki DNA görüntülenmesi ve miktarının tespiti için DNA-özgün prob olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Propidyum iyodür (PI) ise geç apoptoz boyunca ve membran bütünlüğü bozulduğu için hücre ölümü sırasında hücrelerden içeri daha hızlı giren, normal hücrelerin membranından geçemeyen bir nükleik asit boyasıdır [35].

Apoptoz aynı zamanda membran yüzeyindeki fosfatidilserinin (PS) açığa çıkması ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) kaybının oluşumu ile bir arada gerçekleşir. Son çalışmalar mitokondrideki değişikliklerin apoptotik kaskadın kritik olaylarını ortaya çıkardığını göstermektedir. MMP'nin azalması apoptozun erken geri dönüşümlü basamakları boyunca karşılaşılan değişiklikler arasındadır ve çeşitli hücre tiplerinde sitokrom-c salınımından önce meydana gelir. MMP'nin çöküşü doğrudan hücre ölümünün işaretidir. MMP'deki değişiklikler 3',3'-diheksiloksakarbosiyanın iyodür (DiOC₆) alımı ile belirlenmektedir. DiOC₆, mitokondriye özgü voltaja bağlı katyonik floresan bir boyadır. Apoptotik hücrelerdeki MMP'nin azalması akım sitometri analizi ile gösterildiği gibi DiOC₆ alımının azalması ile de ilişkilidir ve

MMP analizi apoptoz çalışmaları için güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir [35].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki

Çalışmada *Klasea bornmuelleri* (Azn.) Greuter & Wagenitz türü bitki materyali olarak kullanılmıştır. *K. bornmuelleri* bitkisi, 04.07.2011 tarihinde Darende-Malatya yolu 10.km, Akçatoprak Köyü'nden toplanmıştır ve arazi defteri numarası BŞ5481'dir. Bitkinin toplanması ve bitki türünün teşhisi Çankırı Karatekin Üniversitesi Öğretim Görevlisi Uzman Biyolog Bilal Şahin tarafından gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.1. *K. bornmuelleri*'nin arazide çekilen fotoğrafı (Foto: Bilal Şahin)

3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışmada yer alan antimikrobiyal aktivite deneylerinde 10 bakteri türü ile 2 maya türü kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter fecalis* ATCC 292112 ve *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 10231 mayası Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711 bakterisi Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden *Candida tropicalis* ATCC 13803 mayası Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 bakterileri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler; Mueller Hinton Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), Saboroud Dekstroz Broth (Merck), Sabouroud Dekstroz Agar (Merck), NaCl (Merck), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma). Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler; 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma), Gallik asit (Sigma), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) (Sigma), Folin Reaktifi (Merck), Etanol (Merck), Metanol (Sigma). Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan kimyasal maddeler; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), RPMI-1640 besiyeri (İçeriği L-glutamine, 2.0 g/L NaHCO₃) (Pan Biotech GmbH), Fetal Bovine Serum (GIBCO), Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (Ca⁺⁺ ve Mg⁺ içermeyen) (Hyclone), Penisilin-Streptomisin (Sigma), Tripsin-EDTA Çözeltisi (10X) (Sigma), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), tripan mavisi (Merck), izopropanol (Merck). Çalışmada kullanılan besiyerlerinin tümü 121°C'de 1,5 atm/Hg basınçta 20 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan cihazlar

12 kuyucuklu hücre petripleri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 6 kuyucuklu hücre petripleri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 75cm² hücre büyütme kapları (hücre kültürü için) TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 96 kuyucuklu hücre petripleri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), Etüv Heraeus Thermo Electron Company Model: Hera cell 150, Hemostometr Hausser. (Bright-Line, Neubauer Model, 0.1mm derinlikli), Laminar flow HeraSafe Model: 12469 2000. 2. dereceden güvenlik kabin, pipetler Ratiolab (Accupetta), pipet uçları CAPP, Petri kapları (100x20 mm) TPP (Zellkultur Schalen) (İsviçre), Serolojik pipetler (5ml) TPP, serolojik pipetler (10ml), şırınga filtreleri (0,22 µm) TPP, 5-10-25 cc Şırıngalar, Set Inject, santrifüj Model 5417R Eppendorf, trypsin-edta Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek Israel), Blender (Siemens), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (Beko), terazi (Scaltech), hassas terazi (Sartorius), mikrodalga fırını (Vestel), DNA görüntüleme sistemi (Biometra), rotaevaporotör (Buchi), manyetik karıştırıcı, kar makinesi (Hoshizaki), dikey elektroforez, güç kaynağı (Consort EV 233), sıvı azot kapları, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (ELx808-IU) (Bio-Tek), inverted mikroskop (Olympus), ısıtmalı karıştırıcı, mikrosantrifüj (Beckman Counter), vorteks, çalkalayıcı, membran filtreleri, beher, baget, balon joje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, steril cerrahi eldiven, buzdolabı (+4°C) ve dondurucular (-20°C ve -80°C).

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

BHT: 0,01 gram BHT 10 ml metanol içinde çözülerek hazırlanmıştır.

DPPH: 0,004 gram DPPH tartılmış ve 100 ml metanol içinde çözülmüştür. Karanlıkta muhafaza edilerek +4°C'de en fazla bir hafta saklanmıştır. Bir hafta sonunda çözelti tekrar hazırlanmıştır.

Gallik Asit Çözeltisi: 0,001 gram gallik asit 1 ml metanol içinde çözülerek hazırlanmıştır.

MTT : 100 mg MTT, 20 ml PBS içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0,20 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve deneyde kullanılmak üzere ependorflara bölünmüştür. Bu şekilde -20 °C'de karanlık ortamda saklanmıştır.

Stok Tris çözeltisi: 500 mM Tris (pH: 8,0)

Stok EDTA tamponu: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik disodyum tuzu), 5M NaOH (pH: 8,0) ile hazırlanmıştır.

TE tamponu: 10 mM Tris (pH:8), 1 mM EDTA (pH:8) ile hazırlanmıştır.

Agaroz: % 1 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.

Tris asetat (TAE) tamponu: 242 gram Tris bazı, 57,1 ml Glisyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH:8), saf su ile hazırlanmıştır.

Yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0,025 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol ile hazırlanmıştır.

Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmıştır. Koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Mc Farland No: 0,5 bulanıklık standardı: BaCl₂ (%1,175) 0,5 ml, H₂SO₄ 99,5 ml, BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 15 ml'lik kapaklı tüplere dağıtılmıştır. Karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Mueller-Hinton Agar: 34 gram alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırılıp çözülerek hazırlanmıştır.

Sabouraud Dektroz Agar: 65 gram alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırılıp çözülerek hazırlanmıştır.

Nutrient Broth: 8 gram alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırılıp çözülmüş ve kapaklı tüplere 10'ar ml ilave edilmiştir.

Sabouraud Dekstroz Broth: 30 gram alınıp 1000 ml saf su içinde karıştırılıp çözülmüş ve kapaklı tüplere 10'ar ml ilave edilmiştir.

3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre dizileri

Çalışmada meme kanseri MCF-7 (ATCC HTB-22), serviks kanseri HeLa (ATCC CCL-2) hücre dizileri kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin kurutulması ve ekstrelerin hazırlanması

Toplanan *K. bornmuelleri* bitkisinin toprak üstü kısımları oda sıcaklığında gölgeli bir ortama serilerek 1 hafta süreyle kurutulmuştur. Kurutulan bitki materyali küçük parçalara ayrıldıktan sonra 50'şer gr bitki blendır yardımıyla toz haline getirilmiş ve üzerlerine 500 ml metanol-etanol ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 2 hafta boyunca iki günde bir çözücü yenilenmek suretiyle bekletilmiştir. Elde edilen sıvı metanol ve etanol ekstresi rotary evaporatörde 45°C'de çözücüsünden ayrılmış ve katı ekstre elde edilmiştir. Su ekstresi ise 50 gr kurumuş bitki örneği üzerine 1000 ml distile su konularak gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek hazırlanmıştır. Elde edilen sıvı ekstre -80°C'de dondurulmuş daha sonra liyofilizatörde kurutularak katı su ekstresi elde edilmiştir.

3.2.2. Bitki ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin hazırlanması

Antimikrobiyal etki tayini için metanol ve etanol ekstrelerinin her biri 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/ml derişimlerde olacak şekilde %50 dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Su ekstresi ise yine aynı derişimlerde distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır. Ekstreler antimikrobiyal etki deneylerinde kullanılmadan önce 0,45µm çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmiştir. DMSO ve distile su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerek DMSO gerekse distile su içinde çözümlenerek hazırlanan ekstreler koyu renkli ve kapaklı şişelerin içerisinde antimikrobiyal etki deneyleri yapılmaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Agar kuyucuk yöntemi

Elde edilen bitki ekstralarının antimikrobiyal etkilerine Perez ve arkadaşlarının (1990) çalışmalarında kullanılan agar kuyucuk yöntemi çalışılmıştır. Bu yöntemde kullanılan bakteri kültürlerini aktif hale getirmek için Nutrient Broth (NB), maya kültürlerini aktive etmek için ise Saboroud Dekstroz Broth kullanılmıştır. Stok kültürlerden alınan bakteri kültürleri ayrı ayrı 4–5 ml sıvı vasıta süspansiyon edilerek, 2-5 saat arasında etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda izotonik sodyum klorür (%0,9 NaCl) çözeltisi kullanılarak kültürlerin 0,5 Mc Farland ayarına uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar besiyerine, maya süspansiyonu ise Saboroud Dekstroz Agar besiyerine 100 µl drigarski özesi ile yayılmıştır. Ardından steril delgeç yardımıyla petride uygun aralıklarla 8 mm çapında kuyular açılmıştır. Kuyulara her bir ekstreten 100 µl (50, 100, 150, 200 ve 250 mg/ml'lik derişimlerde) aktarılmıştır. Ekstre eklenen petriyeler bakteriler için 37°C'de 24 saat, mayalar için ise 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oluşan zon çapları (mm) ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca çözücü olarak kullanılan DMSO'da kuyucuklara konulmuş ve DMSO'nun mikroorganizmalar üzerinde etkisinin olup olmadığı denenmiştir. Çalışmalar en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır [39].

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi

Çalışmada kullanılan ekstraların MİK değerlerine Zgoda ve arkadaşlarının (2001) kullandıkları mikrodilüsyon yöntemi çalışılmıştır. Ekstrelerin 250 mg/ml'lik derişimden hazırlanan serileri yarı yarıya seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. 96'lık mikropiplakların her bir kuyucuğuna 95 µl NB konulmuştur ve üzerlerine 100 µl hacimde 250-0,98 mg/ml arası seyreltilmiş ekstralar ilave edilmiştir. Son olarak her kuyucuğa 5 µl mikroorganizma süspansiyonu konulmuştur. Son kuyucuğa negatif kontrol olarak 195 µl besiyeri, 5 µl mikroorganizma konulmuştur. Kuyucuklardaki son hacim 200 µl olarak ayarlanmıştır. Etüve konmadan önce plâtelere üstü kapatılarak mikropiplate okuyucuda 300 rpm'de 20 sn çalkalama yapılmış ve 600

nm'de etüve konmadan önce okuması yapılmıştır. Daha sonra plateler üstü kapatılarak 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar 600 nm'de platelerin okuması yapılmış ve etüv öncesi ve sonrası sonuçlar kıyaslanmıştır. MİK değeri büyümenin olmadığı en düşük numune derişimi olarak tanımlanmıştır [40].

3.2.3. Bitki ekstralarının antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Bitki ekstralarının hazırlanması

Bitki ekstraları 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yönteminde kullanılmak üzere 50-250 µg/ml derişimleri arası çalışılmıştır. Fenolik içerik tayini için ekstralar 1 mg/ml derişimde hazırlanmıştır. Bitki ekstraları antioksidan aktivite deneyleri için kendi çözücülerinde hazırlanmıştır. Ekstreler koyu renkli şişelerde +4°C'de çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

DPPH yöntemi

Ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri Blois (1958)'in kullanmış olduğu yöntemle göre belirlenmiştir. Bu yöntem kararlı serbest radikal DPPH'nin elektron veya hidrojen atomları veren bir antioksidan varlığında bu kimyasal tarafından süpürülmesi ile karakteristik mor rengin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Buna göre antioksidan madde ne kadar güçlü etkiye sahipse, DPPH'nin mor renginin o kadar açılması beklenir. Deneyde farklı derişimlerde hazırlanan ekstralardan 1 ml alınarak, 1 ml %0,004'lük metanolik DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu bekleme süresinin ardından örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçülerek boş kontrole (1 ml metanol+1 ml DPPH) karşı değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) kullanılmıştır. Ekstrelerin boş kontrol testleri ve pozitif kontrollerin absorbans değerleri kullanılarak DPPH'nin % inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [41].

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}} \times 100$$

Toplam fenolik içerik miktar tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak, Singleton ve Rossi (1965) tarafından değiştirilen Folin Ciocaltaeu yöntemine göre belirlenmiştir. Bu çalışmada gallik asit, metanol, etanol ve su ekstralarının çözeltileri 1 mg/ml derişimde hazırlanmıştır. 100 µl ekstre üzerine 200 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten sonra 3 dakika beklenilerek 1 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Sonra numunelerin absorbansları 760 nm'de UV spektrofotometresinde (Shimadzu-1700) ölçülmüştür [42]. Ekstrelerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak µg gallik aside eşdeğer mg ekstre olacak şekilde hesaplanmıştır:

$$A = 0,0085 \text{ gallik asit } (\mu\text{g}) - 0,0209 \quad (R^2: 0,9858)$$

3.2.4. Bitki ekstralarının sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Bitki özütlerinin hazırlanması

Mevcut ekstraların hücre dizileri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile 10 mg/ml'lik stok ekstre çözeltileri hazırlanmıştır. Etanol ekstresini çözmek için gerekli miktarda tartılan ekstre üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) ilave (mevcut en yüksek ekstre derişimindeki oranı %1'i geçmeyecek şekilde) edilmiştir. Çözdürülen ekstre üzerine azar azar besiyeri ilave edilerek çözdürme işlemine devam edilmiş ve stok çözelti gerekli hacme tamamlanmıştır. Su ekstresinde ise stok çözeltiler besiyeri içinde çözülmüştür. Hazırlanan stok çözelti 0,22 µm por çaplı, şırıngalı filtreden geçirilerek steril edilmiş kapaklı tüplere alınmış ve çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanmıştır.

Hücrelerin dondurulması

Hücre kültüründe kullanılan hücre dizilerini en uygun saklama şekli -86°C veya -150°C sıcaklıkta bekletmektir. Bu sıcaklık değerlerinde hücrenin organelinin korunması amacıyla DMSO yada gliserol gibi kryoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Hemen çalışılmayacak hücreler RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri ile santrifüj edilmiş ve süpernant uzaklaştırılarak pelet %10 DMSO ve %90 fetal sığır serumu (FBS) içeren çözelti ile karıştırılarak buz üzerinde dondurulmuştur. Belirli hacimde cryotüplere paylaştırılan hücreler dondurulup sıvı azot tankında saklanmıştır.

Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada belirtilen donmuş hücre dizileri 37°C su banyosunda çözdürülmüş ve ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile 2 kez yıkanmıştır. Hücreler besiyeri içinde süspanse edildikten sonra % 10 FBS, 100 U/ml streptomisin ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penisilin içeren RPMI-1640 vasatlarında gereksinime göre 25 ve 75 cm^2 'lik flasklarda %5 CO_2 varlığında 37°C 'de üretilmiştir. Hücrelerin besiyerleri iki üç gün aralıklarla değiştirilmiştir. Çalışma boyunca, pH çok önemli olduğu için her gün besiyerinin rengi, hücrelerin morfolojik görünümleri ve çoğalma hızları ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir.

Hücre kültürlerinin pasajlanması

Hücre kültürlerini pasajlamak amacıyla, hücrelerin besiyeri steril cam pastör pipetleriyle uzaklaştırılmıştır. Kalan serum ve ortamın da uzaklaştırılıp tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen steril PBS ile hücreler iki kez yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flask içine 3 ml tripsin/EDTA ilave edilmiştir. Farklı hücrelere ve farklı pasajlara göre değişen 2-5 dakika 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde bekletilmiş ve hücrelerin flasktan kaldırılması sağlanmıştır. Tripsin

üzerine yaklaşık 6-7 ml besiyeri ilave edilerek tripsin aktivitesi sonlandırılmıştır. Flask içindeki hücreler 15 ml falkon tüp içine alınıp 20°C’de, 2000 rpm’de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. Pipetaj ile hücreler süspansiyon haline getirilerek hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre sayımı

Hücreler pasajlanırken yeni kültüre istenen miktarda almak için hemositometrede sayılmıştır. Hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamında yapılmıştır. Sayım için hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp tripan mavisıyla 100 µl’ye tamamlanmıştır. Karışım pipetle homojenize edilmiş ve lam üzerine 10 µl bırakılarak yayılmıştır. Hücreler thoma lamında görülen 4 büyük karede sayılmış ve hücrelerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğinde olduğu için, sayım yaparken koyu mavi renkli görülen hücreler ölü, açık renkte görülen parlak hücreler canlı olarak sayılmıştır. Hücre sayımından sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı} = A \times B \times C \times 10^4$$

A = Hücre içeren besiyerinin hacmi (ml)

B = Seyreltme faktörü

C = Canlı hücrelerin ortalama sayısı

Hücre proliferasyon testi

Çalışmada kullanılan 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) testi Ferrari ve arkadaşları (1990) ile Ural ve arkadaşları (2006) yöntemine göre yapılmıştır. Uygun vasat içindeki MCF-7 ve HeLa hücrelerinin her biri 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96’lık mikropatlere dağıtılmıştır. Sonra her kuyucuğa 100 µl vasat ve 20 µl MTT çözeltisi eklenmiştir. Platelere % 5 CO₂ varlığında 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Sonra hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl isopropil-HCl eklendikten sonra plateler 4 saat karanlıkta,

hava almadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Açığa çıkan renk 480 ve 620 nm dalga boyunda okutulmuş ve canlı hücrelerin yüzde oranı ve yüzde sitotoksitesisi hesaplanmıştır [43, 44].

3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi

Hücre dizilerinin zamana bağlı olarak hücre canlılığını %50 oranında azaltan etanol veya su ekstrilerine verdikleri cevabı belirleyebilmek için her bir kuyucuğa 5×10^4 hücre olacak şekilde hücreler 12 kuyucuklu kültür petrilere ekilmiştir. Daha sonra 0 ile 96 saat arasında etanol ve su ekstrileri hücrelere uygulanmıştır. Her 24 saatte bir tripsin ile kaldırılmış hücreler %0,4 tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak hemositometre lamında mikroskopta sayılmıştır.

3.2.6. Hücre ölümünün propidyum iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi

Hücrelerin ölüm oranları, PI boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler kuyucuk başına 1×10^5 olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiş, etanol ekstresi ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS ile yıkanmıştır. Besiyeri çekilmeden PI boyası (1µg/ml) hücreler üzerine eklenmiştir. 15 dakika bekletildikten sonra floresan mikroskopu altında görüntüleme yapılmıştır.

3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre petrilere ekilmiştir. Etanol ekstresiyle 24 saat inkübasyon sonrası PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin çekirdeklerini görebilmek için PBS içerisinde hazırlanan 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) moleküler probu ile 15 dakika boyunca hücreler boyanmıştır. Daha sonra floresan mikroskopunda incelenerek her bir görüş alanında 100 hücre olacak şekilde sayım yapılmıştır.

3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre petrilere ekilmiştir. Etanol ekstresi hücreler üzerine 24 saat uygulanmıştır. Sonrasında PBS ile yıkanmış ve 4 nM 3, 3'-diheksiloksakarbosiyanın iyodür (DiOC_6) floresan probu ile 15 dakika boyunca muamele edilmiştir. $\Delta\psi_m$ değişimi floresan mikroskopta (Olympus, Japan) (Excitation/emission = 488 nm /525 nm) gözlenmiştir.

3.2.9. Ekstre-DNA etkileşiminin belirlenmesi

DMSO'da çözülerek hazırlanan ekstrelerin pBR322 plazmit DNA üzerinde etkisi araştırılmıştır. Yüksek derişimden düşük derişime seyreltilerek hazırlanan ekstreler pBR322 plazmit DNA ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saat sonunda agaroz jel elektroforezi yapılarak oluşan bantlar incelenmiştir. Kontrol olarak ise bileşik ile muamele edilmemiş pBR322 plazmit DNA'sı jeldeki birinci kuyucuğa ilave edilmiştir.

3.2.10. Agaroz jel elektroforezi

% 1 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra tabağa dökülmüştür. Jel polimerleştikten sonra inkübasyon sonrası ekstre-DNA çözeltisi ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşan kuyucuklara yüklenmiş ve TAE tamponu içinde 40-90 V uygulanarak 3-4 saat süre ile doğru akımda yürütülmüştür. Etidium bromür içinde birkaç dakika boyama yapılmıştır. Daha sonra jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) görüntüleme cihazında yapılmış ve bilgisayar ortamında fotoğrafları alınmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Ekstrelerin % Verimleri

Çalışmada kullanılan *Klasea bornmuelleri* bitkisinden elde edilen metanol, etanol ve su ekstralarının yüzde verimleri aşağıdaki gibi hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

$$\text{Yüzde Verim (g/g)} : \frac{\text{Ekstraksiyon sonrası elde edilen kuru ekstre miktarı}}{\text{Başlangıçta tartılan kuru bitki miktarı}} \times 100$$

Çizelge 4.1. *K. bornmuelleri* ekstralarının % verimleri

Ekstreler	% Verim (g/g)
Metanol	19,4
Etanol	17,9
Su	6,6

4.2. Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkileri

4.2.1. Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitesinin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmesi

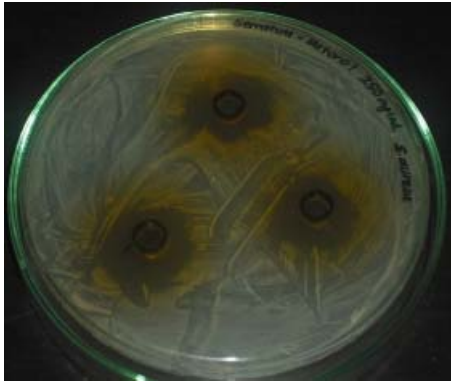
Metanol, etanol ve su ekstralarının antimikrobiyal etkisi agar kuyucuk yöntemiyle çalışılmış ve her bir ekstreten 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/ml olacak şekilde 5 farklı derişim hazırlanmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak %50 DMSO kullanılmıştır. Bakteriler için pozitif kontrol olarak amphisilin (10 µg/ml), mayalar için ise ketokonazol (50 µg/ml) kullanılmıştır. Metanol ve su ekstrelerine karşı

mikroorganizmaların oluşturdukları zon çapları izelge 4.2’de verilmiştir. Etkili olan ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri Resim 4.1’de gösterilmiştir.

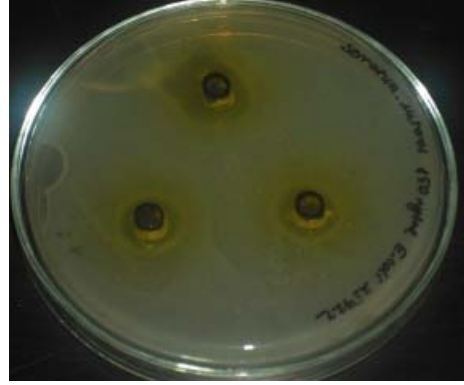
Metanol ekstresinin *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922 bakterilerine karşı, su ekstresi ise *K. pneumoniae* ATCC 700603 bakterisine karşı orta derecede etki göstermiştir. Metanol ekstresinin 250 mg/ml derişiminde *E. coli* ATCC 35218’in zon çapı $21,7 \pm 0,6$ mm ve *S. aureus*’un zon çapı $12,7 \pm 0,6$ mm’dir. Metanol ekstresinin 150 mg/ml derişiminde ise *E.coli* ATCC 25922’nin zon çapı $15,3 \pm 0,6$ mm’dir. Su ekstresinin 250 mg/ml derişiminde *K. pneumoniae*’nın zon çapı $13,7 \pm 0,6$ mm’dir. Ekstreler, çalışılan diğer bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Etanol ekstresinin denenen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir. Ekstreler, denenen mayalara karşı antifungal etki göstermemiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan %50 DMSO’nun mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal bir etkisi görülmemiştir.

Çizelge 4.2. *K. bornmuelleri* ekstrelerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

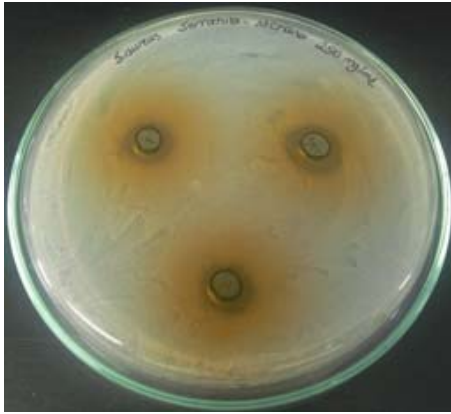
İnhibisyon Zon Çapları (mm)						
Mikroorganizma	Metanol Ekstresi	Etanol Ekstresi	Su Ekstresi	Negatif Kontrol DMSO	Antibiyotik Amfisilin	Antifungal Ketokonazol
<i>B. cereus</i> (NRRL-B-3711)	-	-	-	-	10,0 ± 1,0	-
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	-	-	-	-	30,3 ± 0,5	-
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	15,3 ± 0,6 150 mg/ml	-	-	-	20,3 ± 0,5	-
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	21,7 ± 0,6 250 mg/ml	-	-	-	R	-
<i>E. faecalis</i> (ATCC 292112)	-	-	-	-	30,0 ± 0,0	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	-	R	-
<i>P. vulgaris</i> (ATCC 8427)	-	-	-	-	R	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	12,7 ± 0,6 250 mg/ml	-	-	-	35,0 ± 0,0	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 25955)	-	-	13,7 ± 0,6 250 mg/ml	-	19 ± 0,0	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	9 ± 0,0	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-	-	-	30,0 ± 0,0
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	-	-	-	-	-	29,0 ± 0,5



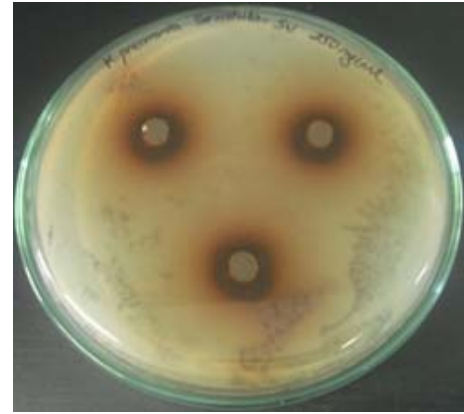
(a)



(b)



(c)



(d)

Resim 4.1. Etkili olan ekstrelerin antimikrobiyal etki sonuçları (a-d).

- (a) 250 mg/ml Metanol ekstresinin *E. coli* ATCC 35218 üzerine etkisi,
- (b) 150 mg/ml metanol ekstresinin *E. coli* ATCC 25922 üzerine etkisi,
- (c) 250 mg/ml metanol ekstresinin *S. aureus* ATCC 25923 üzerine etkisi,
- (d) 250 mg/ml su ekstresinin *K. pneumoniae* ATCC 25955 üzerine etkisi.

4.2.2. Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivitelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile belirlenmesi

Agar kuyucuk yöntemi sonuçlarına göre antimikrobiyal etki gösteren metanol ve su ekstralarının etkili olduğu bakteri türleriyle minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) deneyi yapılmıştır. Bitkinin metanol ve su ekstraları 250 mg/ml derişiminden başlayarak seyreltilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Çizelge 4.3’de görülebileceği gibi ekstraların MİK değerlerinin 31,25 mg/ml ile 50,00 mg/ml arasında değiştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Metanol ve su ekstralarının MİK değerleri

Mikroorganizma \ Ekstre	Metanol 250 mg/ml	Su 250 mg/ml
<i>E.coli</i> ATCC 25922	31,25 mg/ml	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	31,25 mg/ml	-
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 25955	-	31,25 mg/ml
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	50,00 mg/ml	-

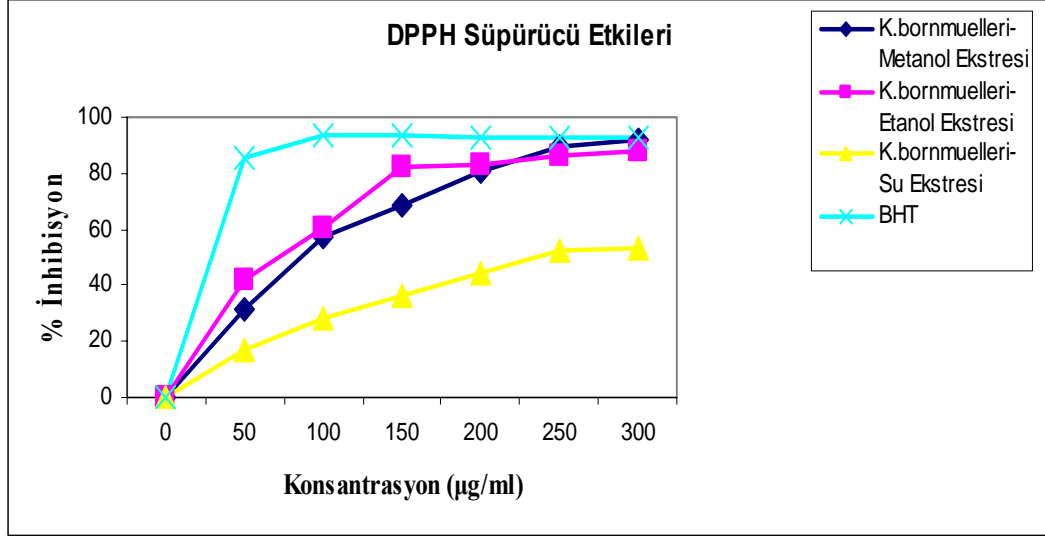
K. bornmuelleri bitkisinin metanol ekstresi için *E.coli* ATCC 25922 ve *E. coli* ATCC 35218’in MİK değeri 31,25 mg/ml, *S. aureus* ATCC 25923’un MİK değeri 50,00 mg/ml olarak belirlenmiştir. *K. bornmuelleri* bitkisinin su ekstresi için *K.pneumoniae* ATCC 25955’in MİK değeri 31,25 mg/ml olarak belirlenmiştir.

4.3. Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Etkileri

4.3.1. Bitki ekstralarının radikal süpürücü aktivitesinin DPPH yöntemi ile belirlenmesi

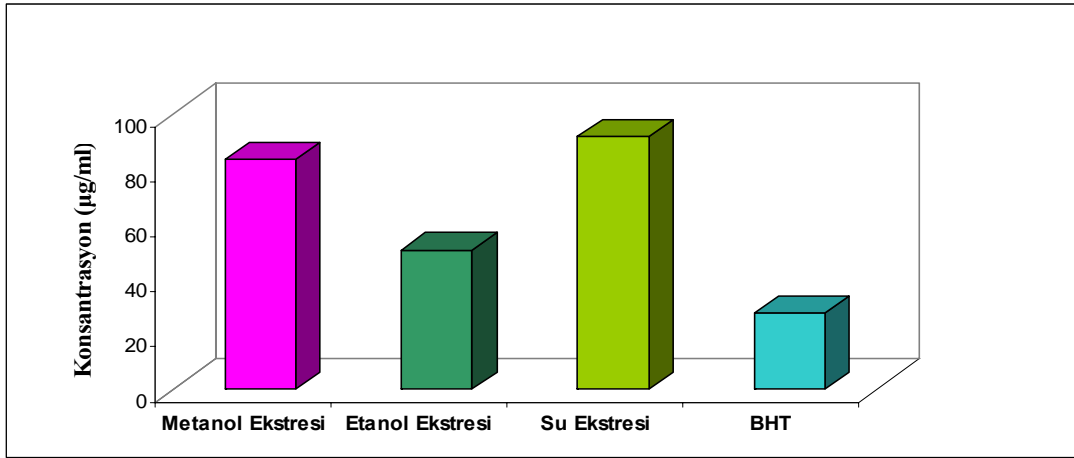
Çalışmada 50-300 µg/ml derişimleri arası hazırlanan metanol, etanol, su ekstraları ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHT’nin serbest radikal süpürücü etkilerine DPPH

yöntemi kullanılarak bakılmıştır. %0,004'lük DPPH çözeltisinin menekşe moru renginin açılım kapasitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Bitkinin metanol, etanol, su ekstraktları ve pozitif kontrol BHT'nin DPPH radikali süpürücü etkileri Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Ekstrelerin ve pozitif kontrol BHT'nin DPPH süpürücü aktivitesi

Şekil 4.1'de görülebileceği gibi 300 µg/ml derişimdeki etanol, metanol, su ekstraktları ve BHT'nin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla %91,89±0,31, %87,89±1,37, %53,01±1,34 ve %93,12±0,25 olarak bulunmuştur. IC₅₀ değeri ekstrenin veya standardın serbest radikali süpürdüğü % inhibisyon değerinin yarısına karşılık gelen derişim değeri olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2'de ekstraktların IC₅₀ değerleri görülmektedir. Şekil 4.2'de görülebileceği gibi ekstraktların standarda göre IC₅₀ değerlerinin daha yüksek olduğu, dolayısıyla DPPH süpürücü aktivitelerinin standartlara göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin ve standardın DPPH süpürücü aktivitesi en yüksekte en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: BHT (IC₅₀: 27,5±0,2 µg/ml) > Etanol ekstresi (IC₅₀: 50,5±0,5 µg/ml) > Metanol ekstresi (IC₅₀: 83,5±0,5 µg/ml) > Su ekstresi (IC₅₀: 91,7±0,5 µg/ml).



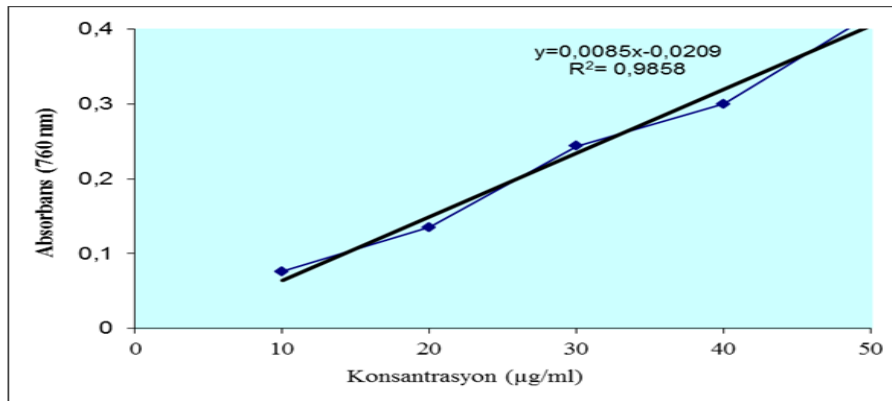
Şekil 4.2. Ekstrelerin ve BHT'nin DPPH süpürücü aktivitelerinin IC₅₀ değerleri

4.3.2. Bitki ekstralarının toplam fenolik içerikleri

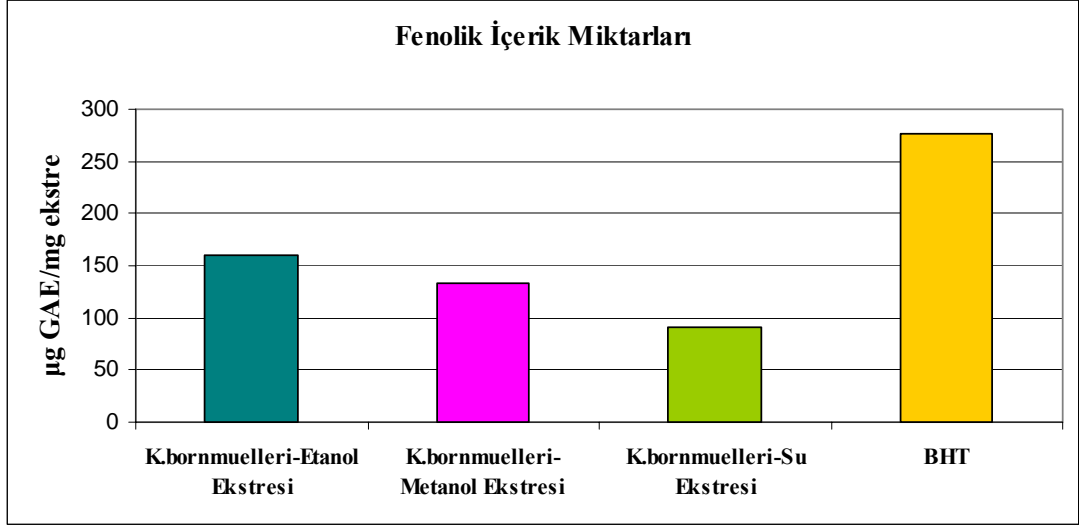
Ekstrelerin toplam fenolik içerik miktarları µg gallik asite eşdeğer mg ekstre olacak biçimde Şekil 4.3'deki grafikte görülmekte olan gallik asit eğrisine göre, aşağıda verilmiş olan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$A = 0,0085 \text{ gallik asit } (\mu\text{g}) - 0,0209 \quad (R^2: 0,9858)$$

Gallik asit eğrisine göre hesaplanan metanol, etanol ve su ekstralarının fenolik içerik miktarları Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.3. Gallik asit eşdeğer eğrisi



Şekil 4.4. Ekstrelerin ve BHT'nin fenolik içerik miktarları

Şekil 4.4'te ekstrelerin fenolik içerik miktarlarına bakıldığında metanol ekstresinin $133,4\pm 6,66$ µg GAE/mg ekstre, etanol ekstresinin $159,59\pm 3,28$ µg GAE/mg ekstre ve su ekstresinin $91,13\pm 0,99$ µg GAE/mg ekstre fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Standart olarak kullanılan BHT'nin ise $277,24\pm 0,99$ µg GAE/mg fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar DPPH radikali süpürücü aktivitesi en yüksek olan ve standart olarak kullanılan BHT'nin (IC_{50} : $27,5\pm 0,2$ µg/ml) toplam fenolik içeriğinin de yüksek olduğunu, DPPH radikali süpürücü aktivitesi en düşük olan su ekstresinin (IC_{50} : $91,7\pm 0,5$ µg/ml) toplam fenolik içeriğinin de düşük olduğunu göstermektedir. Ekstrelerin ve standardın fenolik içerik miktarları en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: BHT > Etanol ekstresi > Metanol ekstresi > Su ekstresi.

4.4. Bitki Ekstrelerinin Plazmit DNA Üzerine Etkisi

DMSO'da çözülerek 1×10^4 µM olarak hazırlanan metanol ve etanol ekstrelerinin pBR322 plazmit DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Bileşiklerin DMSO içerisindeki çözeltileri 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 ve 78 µM olacak şekilde farklı derişimlerde hazırlandıktan sonra

plazmit DNA ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra DNA-ekstre karışımı agaroz jel ile elektroforezde yürütülerek UV görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilmiştir. Etkili ekstre olan metanol ve etanol ekstresinin 24 ve 48 saat süreyle plazmit DNA üzerine etkisini gösteren elektrofotogramlar Resim 4.2'de verilmiştir.

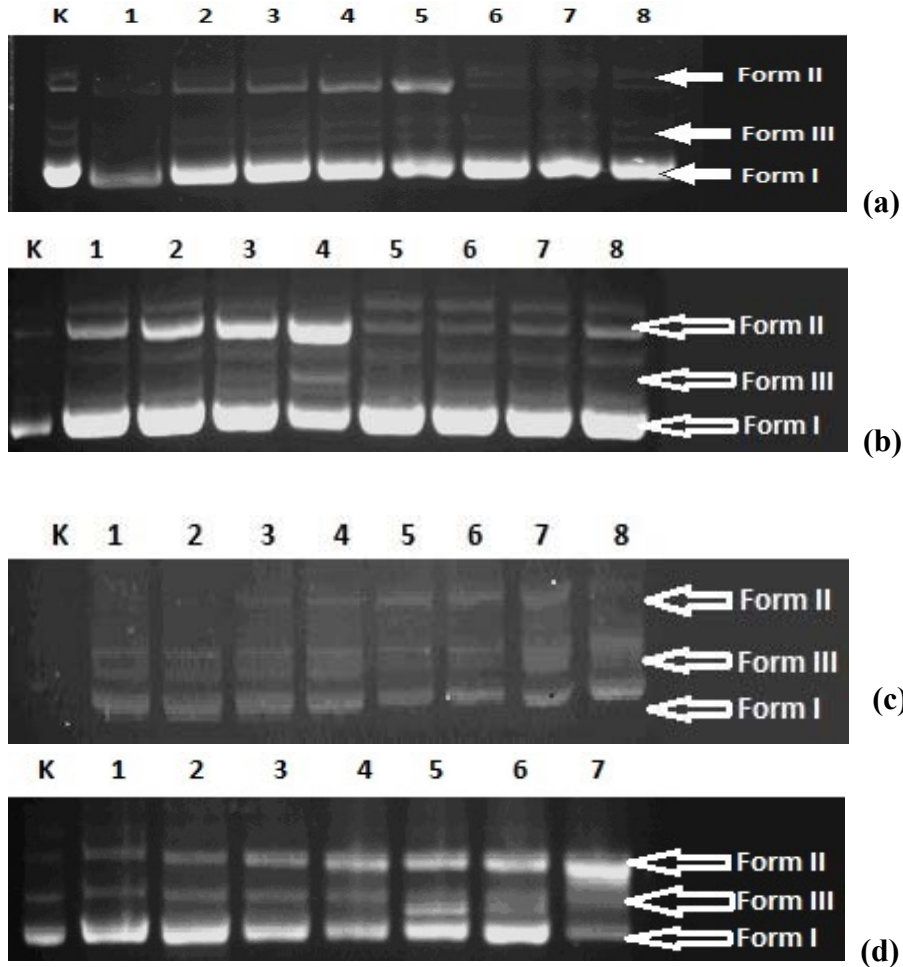
Etanol ekstresiyle plazmit DNA'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, form I (süper sarmal form), form II (açık halkasal form) ve form III (doğrusal form) oluşumu gözlenmiştir. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde azalma olduğu görülmüştür. En düşük üç derişimde ise form II kaybolmuş ve form III gözlenmiştir. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form III ve form I hareketliliğinde azalma olmuştur (Resim 4.2 (a)).

Etanol ekstresiyle plazmit DNA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde ve son dört düşük derişimde form II yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. Derişim azaldıkça form III hareketliliğinde değişiklik olmadığı, ancak dördüncü derişimde hareketliliğinde artış olduğu görülmüştür. İlk dört yüksek derişimde form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda azalma olduğu görülmektedir. Son dört düşük derişimde form I yoğunluğunda ve hareketliliğinde artış olduğu görülmüştür (Resim 4.2 (b)).

Metanol ekstresiyle plazmit DNA'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, en yüksek iki derişimde form II kaybolmuş ve sonra derişim azaldıkça form II hareketliliğinde azalma olmuştur. Derişim azaldıkça form III hareketliliğinde azalma olduğu görülmüştür, ancak yoğunluğunda değişiklik olmamıştır. Derişim azaldıkça form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür (Resim 4.2 (c)).

Metanol ekstresiyle plazmit DNA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde ve yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür. En yüksek derişimde form III hareketliliğinde azalma olmuştur. Beşinci derişimde ise form III sonrasında form II oluştuğu görülmüştür. Yüksek

derişimden düşük derişime gidildikçe form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür (Resim 4.2 (d)).

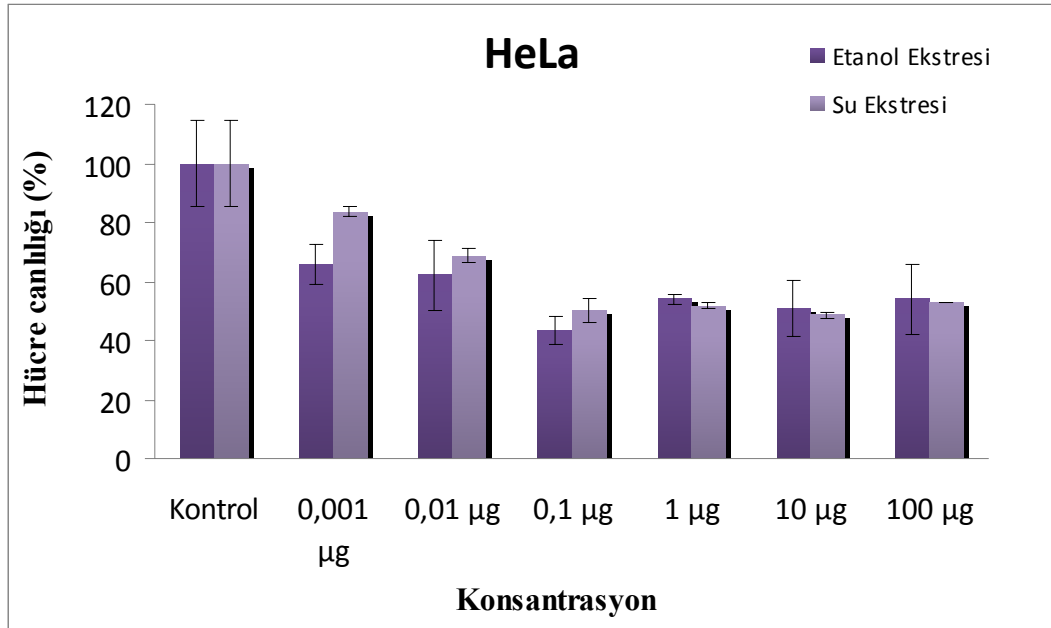


Resim 4.2. (a) Etanol ekstresi-24 saat, (b) Etanol ekstresi-48 saat, (c) Metanol ekstresi-24 saat, (d) Metanol ekstresi-48 saat, Kontrol (K)

4.5. Bitki Ekstrelerin Sitotoksik Etkileri

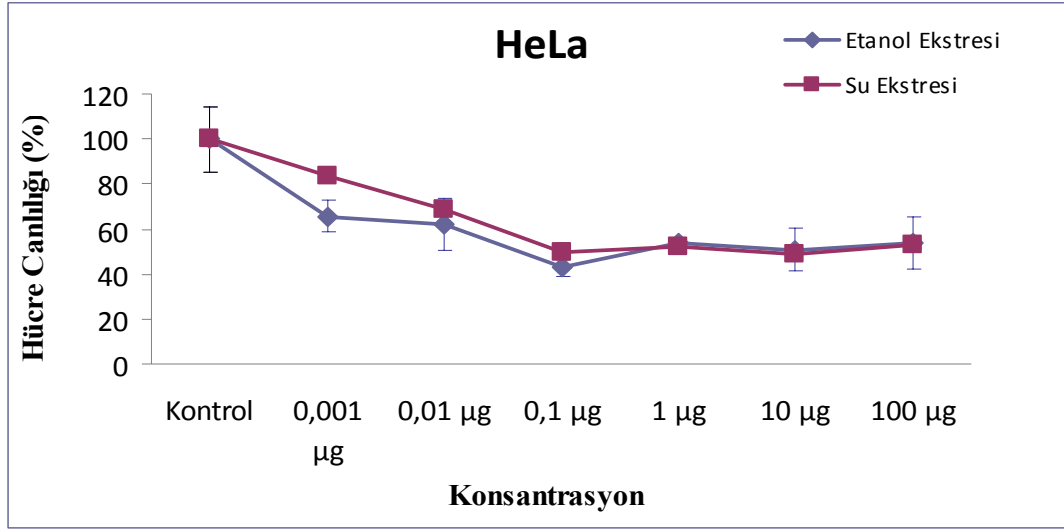
Su ve etanol ekstresinin HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi 0,001-100 $\mu\text{g/ml}$ derişimleri arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak ekstre ile muamele edilmemiş HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizileri kullanılmıştır. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da 0,001-100 $\mu\text{g/ml}$ derişimleri arasında etanol ve su ekstrilerine maruz kalan HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

gösterilmektedir. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de ise 0,001-100 µg/ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrelerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.

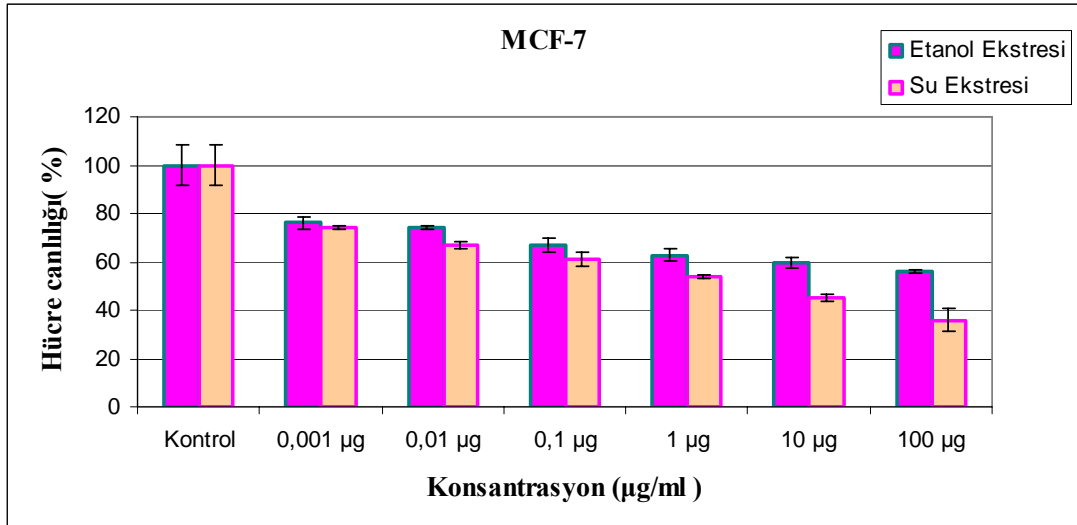


Şekil 4.5. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrelerine maruz kalan HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

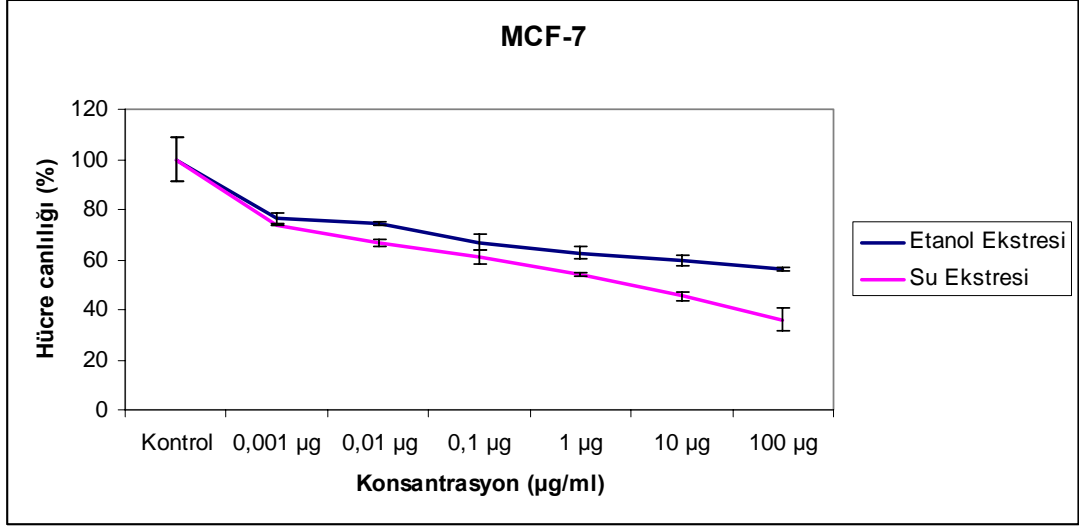
Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da görülebileceği gibi HeLa hücre dizisi etanol ve su ekstresi ile 24 saat muamele edildiğinde etanol ekstresi için 0,001 µg/ml’de %65,6±6,9, 0,01 µg/ml’de %62,1±11,8, 0,1 µg/ml’de %43,4±4,6, 1 µg/ml’de %54,0±1,6, 10 µg/ml’de %50,8±9,2, 100 µg/ml’de %53,9±11,6 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Su ekstresi için ise 0,001 µg/ml’de %83,5±1,7, 0,01 µg/ml’de %68,7±2,4, 0,1 µg/ml’de %50,0±4,1, 1 µg/ml’de %51,7±0,9, 10 µg/ml’de %48,6±1,1 ve 100 µg/ml’de %52,7±0,1 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrilerine maruz kalan HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı



Şekil 4.7. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrilerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

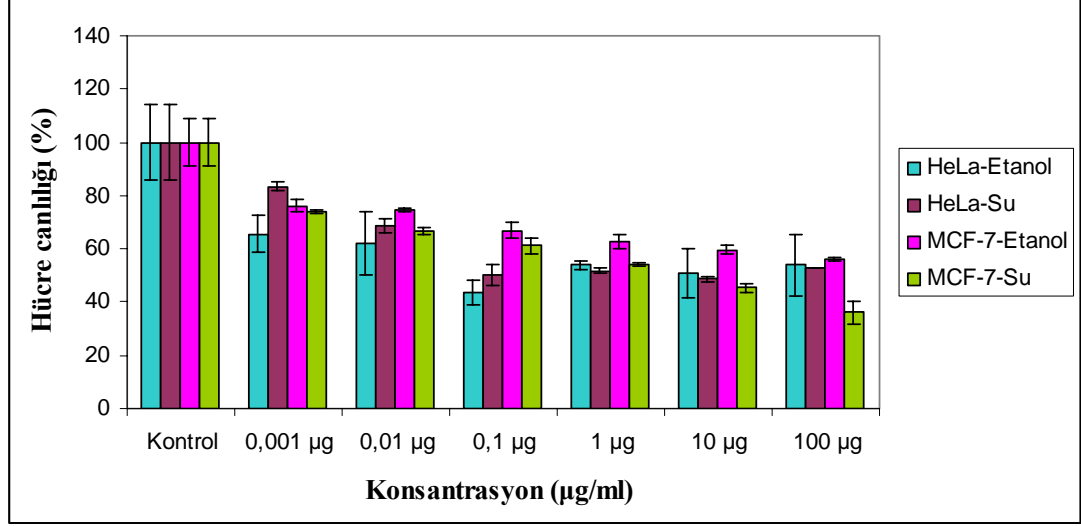


Şekil 4.8. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstrlerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de görülebileceği gibi, MCF-7 hücre dizisi ise etanol ve su ekstresi ile 24 saat muamele edildiğinde etanol ekstresi için 0,001 µg/ml'de %76,2±2,5, 0,01 µg/ml'de %74,4±0,7, 0,1 µg/ml'de %66,9±3,1, 1 µg/ml'de %62,8±2,6, 10 µg/ml'de %59,7±1,9, 100 µg/ml'de %56,1±0,7 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Su ekstresi için ise 0,001 µg/ml'de %74,0±0,6, 0,01 µg/ml'de %66,7±1,4, 0,1 µg/ml'de %61,1±2,9, 1 µg/ml'de %54,0±0,7, 10 µg/ml'de %45,3±1,6 ve 100 µg/ml'de %36,0±4,4 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

Çalışmada etanol ve su ekstresinin derişime bağılı olarak HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrlerin HeLa hücre dizisi üzerinde MCF-7'ye göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Etanol ekstresinin MCF-7 hücre dizisi üzerine IC₅₀ değeri >100 µg/ml, su ekstresinin ise 11,04±0,05 µg/ml olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre dizisi üzerine su ekstresinin etanol ekstresine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. HeLa hücre dizisi üzerine etanol ekstresinin IC₅₀ değerleri 9,84±0,05 µg/ml, su ekstresinin ise 0,1±0,005 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak HeLa hücre dizisi üzerine su ekstresinin etanol ekstresinden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Her iki kanser hücre dizisinde de su ekstresinin etanol ekstresine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. 0,001-100 µg /ml derişimleri arasında etanol ve su ekstreslerine maruz kalan MCF-7 ve HeLa hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

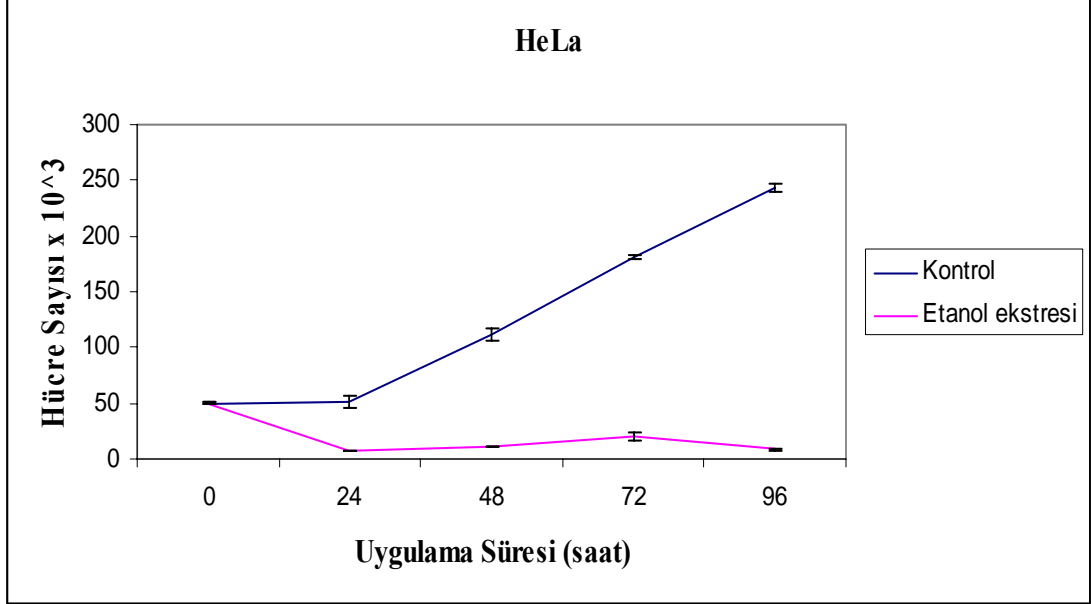
4.6. Ekstreyle Muamele Edilen HeLa ve MCF-7 Hücre Dizilerinin Sağ Kalım

Eğrilerinin Belirlenmesi

Çalışmada HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizilerinin hücre canlılığını %50 oranında azaltan etanol ekstresinin 0, 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle hücrelerle muamele edilmesi sonucunda hücrelerin sağ kalımları belirlenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak, ekstre ile muamele edilmemiş HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizileri kullanılmıştır. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de etanol ekstresi varlığında HeLa ve MCF-7 hücre dizilerinin zamana bağlı sağ kalım grafikleri görülmektedir.

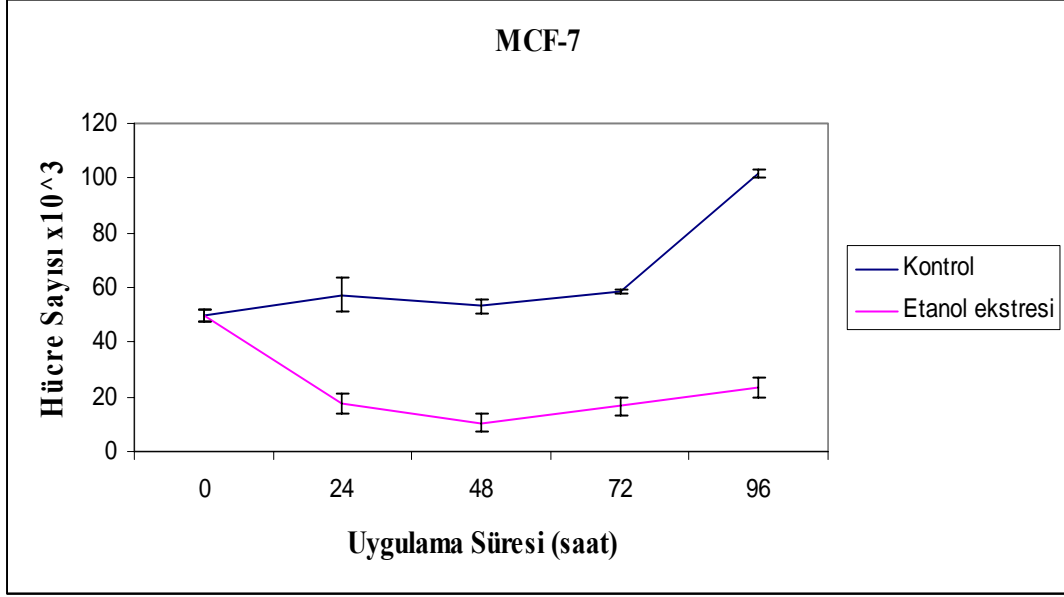
HeLa hücrelerinin sağ kalım eğrisinde görülebileceği gibi, ekstre ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki HeLa hücre sayısı 24 saatten sonra düzenli olarak artış göstermiştir. Etanol ekstresi ile muamele edilen hücrelerde ise 24 saatte hücre sayısında azalma olduğu, daha sonra hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Sonuç

olarak 24 saatte etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerinde kontrole göre hücre canlılığını önemli derecede azalttığı görülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Etanol ekstresi varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği (Süre 24-96 saat)

MCF-7 hücrelerinin sağ kalım eğrisinde görülebileceği gibi, ekstre ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre sayısı 24 saatte artış göstermiştir. Etanol ekstresi ile muamele edilen hücrelerde ise 48 saatte kadar hücre sayılarında azalma olduğu, 48 saatten sonra hücre sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. Etanol ekstresi 48 saate kadar hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiştir, 48 saatten sonra ise hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi azaldığı için MCF-7 hücrelerinin sağ kalımının arttığı görülmüştür. Sonuç olarak 48 saatte etanol ekstresinin kontrole göre MCF-7 hücre canlılığını önemli derecede azalttığı görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Etanol ekstresi varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği (Süre 24-96 saat)

4.7. Ekstreyle Muamele Edilen HeLa Hücre Dizisinde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Çalışmada HeLa hücre dizileri 10 mg/ml derişimdeki etanol ekstresi ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonra ekstrenin HeLa üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla propidium iyodür (PI), 3',3'- 6,4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve diheksiloksakarboşiyanın iyodid (DiOC₆) floresan boyamaları yapılmıştır. Görüntülerin 4x ve 10x büyütmede hem ışık mikroskobunda hem de floresan mikroskobunda fotoğrafları çekilmiştir.

4.7.1. Hücre ölümünün propidium iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi

PI boyası membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyama özelliğindedir. 10 mg/ml derişimde etanol ekstresi ile muamele edilmiş ve edilmemiş HeLa hücre dizisindeki ölü hücreler PI boyama ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olan ekstreyle muamele edilmemiş HeLa hücreleri ile 10 mg/ml derişimdeki ekstreyle muamele edilmiş HeLa hücrelerinin PI boyama sonrasında 4x ve 10x büyütmedeki ışık ve

floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.3-Resim 4.10'da verilmiştir. Ekstre ile muamele edilmeyen HeLa hücrelerinin 4x ve 10x büyütmedeki floresan mikroskop görüntülerinde ölü hücre bulunmadığından fotoğraf karesi siyah olarak görülmüştür (Resim 4.4 ve Resim 4.6). Etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinde ise ölü hücrelerin PI ile kırmızı renk verdiği görülmüştür (Resim 4.8 ve Resim 4.10). Sonuç olarak 10 mg/ml derişimdeki etanol ekstresinin HeLa hücrelerinin hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir.



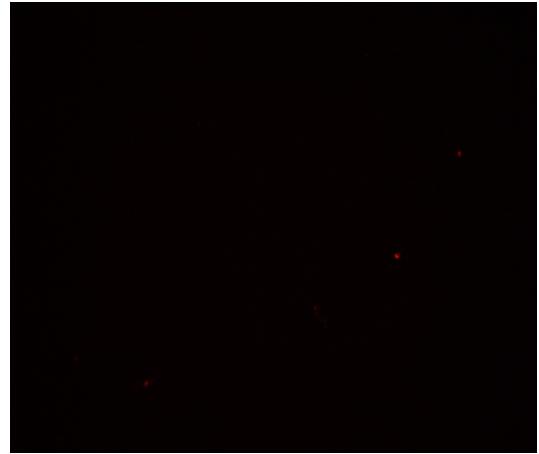
Resim 4.3. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.4. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



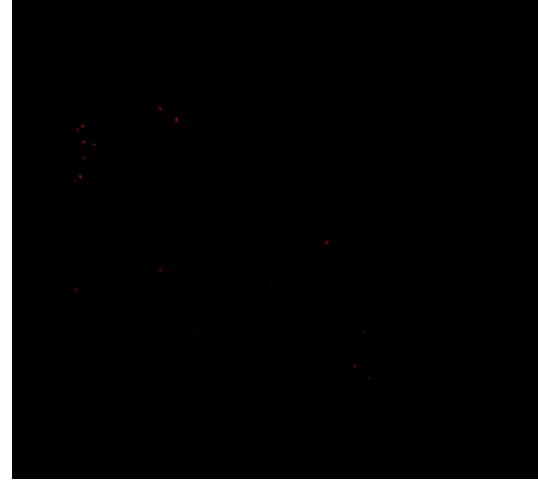
Resim 4.5. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.6. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



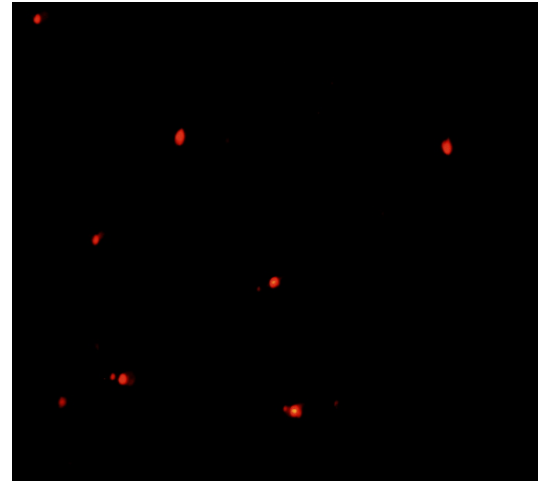
Resim 4.7. Etanol ekstresi ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.8. Etanol ekstresi ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



Resim 4.9. Etanol ekstresi ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.10. Etanol ekstresi ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.

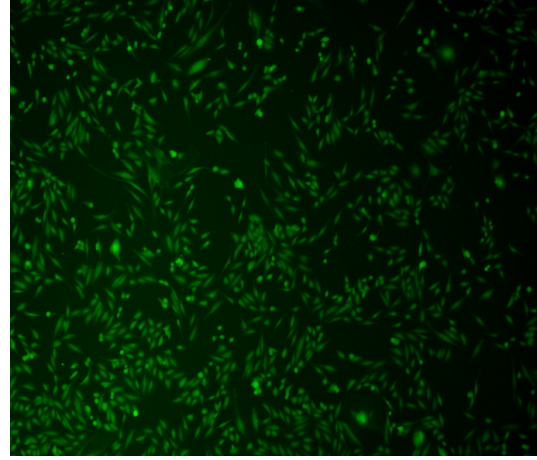
4.7.2. Apoptotik etkinin DiOC₆ boyama ile belirlenmesi

DiOC₆ canlı hücreleri boyayan, yeşil floresan renk veren, mitokondriye özel voltaj bağımlı bir boya olduğundan erken apoptotik hücrelerdeki mitokondriyal değişimleri göstermek için kullanılmaktadır. Erken apoptotik hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) azaldığından dolayı hücrelerin DiOC₆ boya alımı da azalmaktadır. Çalışmada 10 mg/ml derişimdeki etanol ekstresi ile 24 saat muamele edilmiş HeLa hücrelerindeki ve ekstre ile muamele edilmemiş kontrol grubu HeLa hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyelini belirlemek amacıyla DiOC₆ boyama yöntemi kullanılmıştır. Etanol ekstresi ile muamele edilmiş HeLa hücreleri ve kontrol grubu olan HeLa hücrelerinin DiOC₆ boyama sonrasında 4x ve 10x büyütmede ışık ve floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.11- Resim 4.18'da verilmiştir.

Resim 4.12 ve Resim 4.14'de görülebileceği gibi, kontrol grubu olan HeLa hücreleri floresan mikroskopta yeşil renk vermiştir. Alandaki çoğu hücre apoptoza gitmediği için hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olmamış ve alandaki hücreler yeşile boyanmıştır. Ancak, etanol ekstresi ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin kontrol grubuna göre DiOC₆ ile boyanan hücre sayısının daha az olduğu görülmüştür (Resim 4.16 ve Resim 4.18). Ekstre ile muamele edilen hücrelerin DiOC₆ ile daha az boyandığı dolayısıyla mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu için apoptoza gittiği tespit edilmiştir.



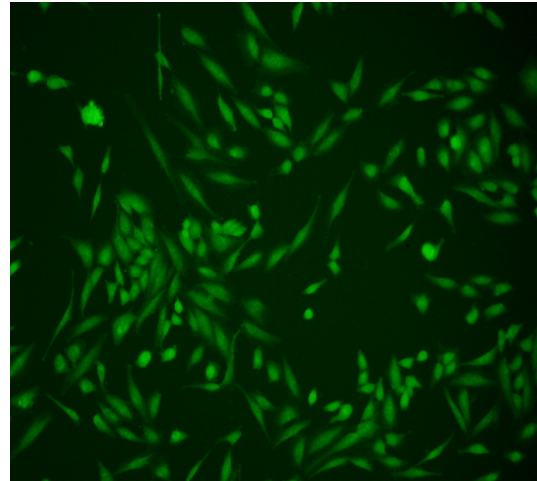
Resim 4.11. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.12. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



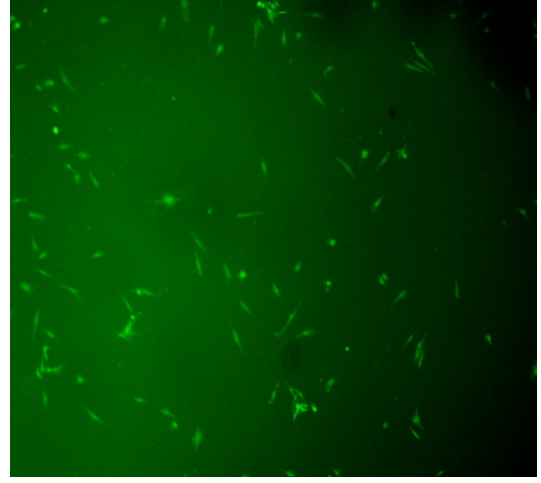
Resim 4.13. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



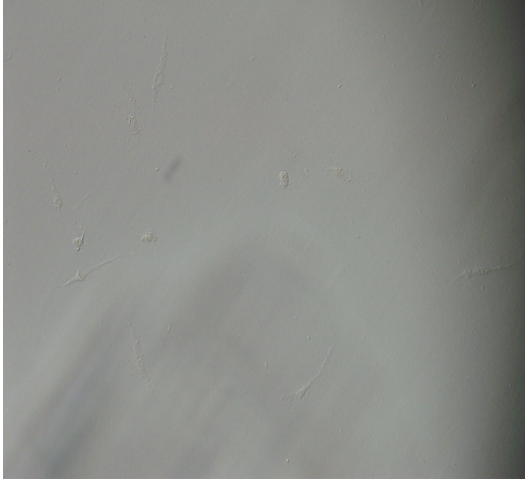
Resim 4.14. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



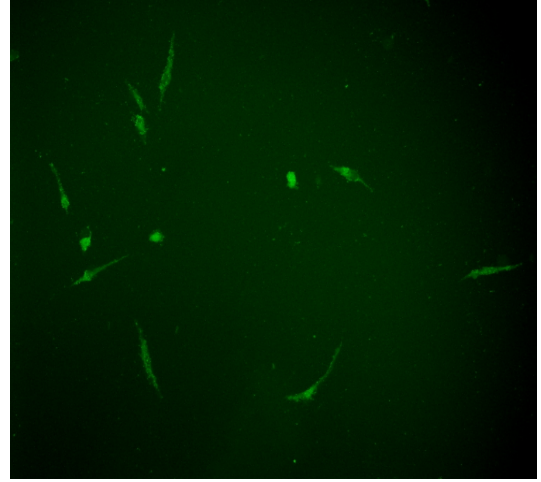
Resim 4.15. Etanol ekstresi ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.16. Etanol ekstresi ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



Resim 4.17. Etanol ekstresi ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.18. Etanol ekstresi ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.

4.7.3. Apoptotik etkinin DAPI boyama ile belirlenmesi

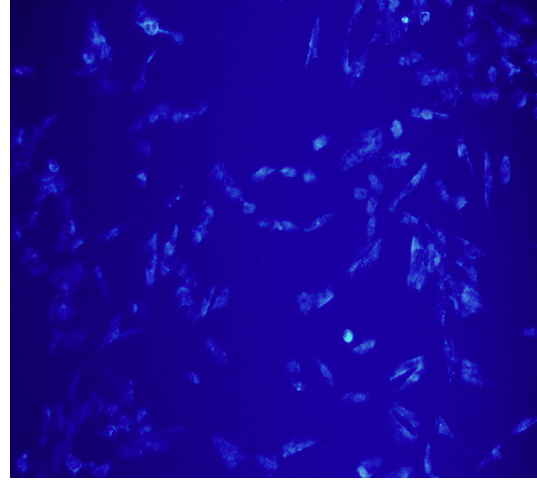
Çalışmada 10 mg/ml derişimdeki etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiş ve apoptotik nükleuslu hücreler floresan mikroskop alanında parlak mavi renkli olarak görülmüştür. DAPI ile boyanmış kontrol grubu HeLa hücrelerinin ve 10 mg/ml etanol ekstresi ile muamele edilmiş olan HeLa hücrelerinin 10x ve 40x büyütmedeki ışık ve floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.19- Resim 4.26'da verilmiştir.

DAPI ile boyanan mavi çekirdekli HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.20 ve Resim 4.26'da verilmiştir. HeLa hücrelerinde parlak mavi lekeli olmayan hücreler normal nükleuslu olup, kontrol grubunda fazla miktarda bulunmuştur (Resim 4.20 ve Resim 4.22). Etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinde parlak boyanmış hücreler apoptotik nükleuslu hücrelerdir (Resim 4.24 ve Resim 4.26). Ekstre ile muamele edilmeyen HeLa hücrelerine göre ekstre uygulanmış olan hücrelerde mikroskop alanında görülen apoptotik nükleusların daha fazla sayıda olduğu görülmüştür.

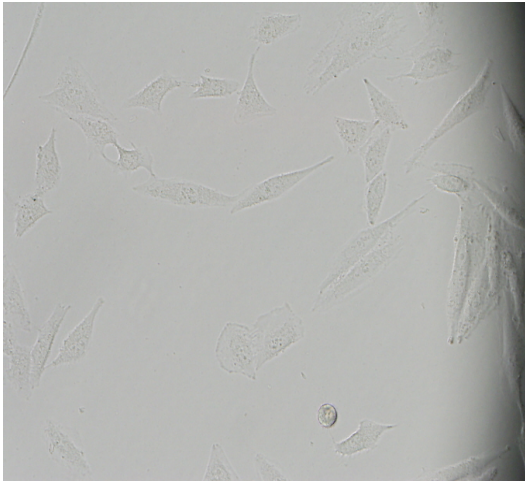
Sonuç olarak DAPI boyamada, kontrol grubu HeLa hücrelerinde apoptotik nükleuslu hücreler çok az sayıdayken, etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinde apoptotik hücreler görülmüştür ve etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğu söylenebilir.



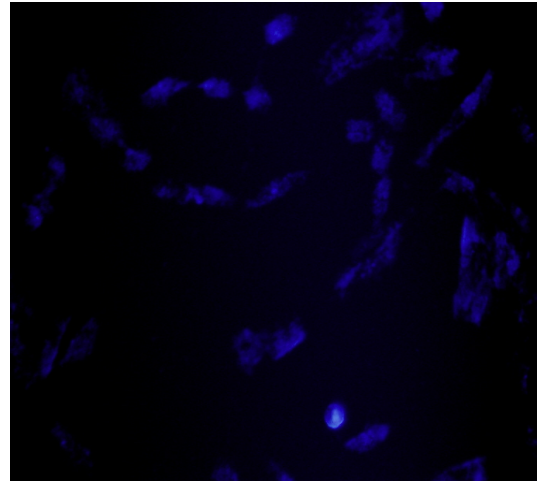
Resim 4.19. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.20. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



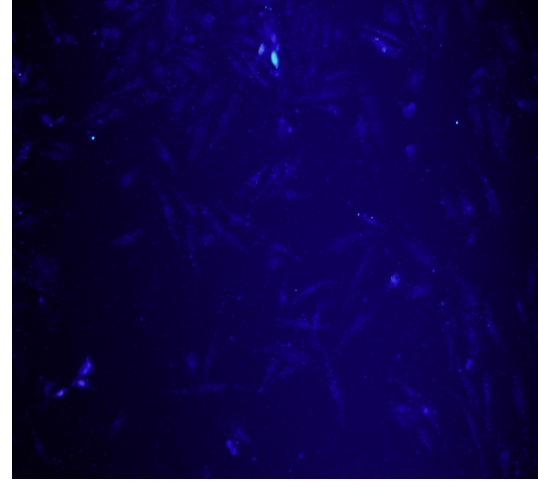
Resim 4.21. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi.



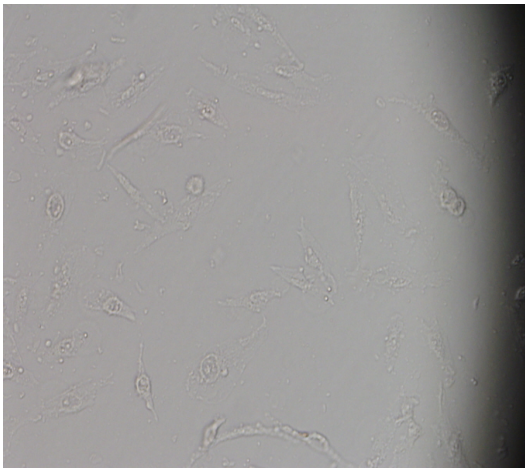
Resim 4.22. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



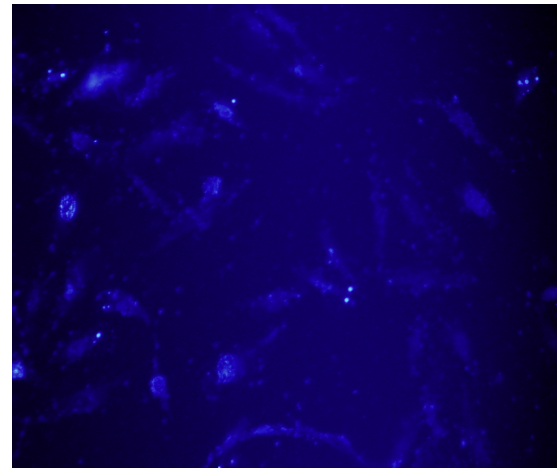
Resim 4.23. Etanol ekstresi ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.24. Etanol ekstresi ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



Resim 4.25. Etanol ekstresi ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.26. Etanol ekstresi ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *Klasea bornmuelleri* Azn. bitkisinin metanol, etanol, su ekstralarının farklı derişimlerdeki antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik etkileri ve pBR322 plazmit DNA ile etkileşimleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, endemik *K. bornmuelleri* Azn. bitkisinin metanol, etanol ve su ekstralarının 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/ml derişimlerdeki antimikrobiyal etkisine agar kuyucuk ve MİK yöntemiyle bakılmıştır. Bitkinin metanol ekstresinin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, 150 mg/ml'de agar kuyucuk yöntemine göre *E. coli* ATCC 25922 bakterisinin zon çapının $15,3 \pm 0,6$ mm, 250 mg/ml'de *E. coli* ATCC 35218 bakterisinin zon çapının $21,7 \pm 0,6$ mm ve *S. aureus* bakterisinin zon çapının $12,7 \pm 0,6$ mm olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin su ekstresinin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, sadece 250 mg/ml'de *K.pneumoniae* ATCC 25955 bakterisinde etki olduğu ve zon çapının $13,7 \pm 0,6$ mm olduğu tespit edilmiştir. Ekstreler, çalışılan diğer bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Etanol ekstresi denenen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Ekstreler, denenen mayalara karşı antifungal etki göstermemiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan %50 DMSO'nun mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal bir etkisi görülmemiştir. Metanol ekstresinin su ekstresiyle kıyaslandığında daha fazla türde bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve daha geniş çapta inhibisyon zonuna sahip olduğu saptanmıştır. Bakterilerin MİK değerlerinin 31,25-50 mg/ml derişimde değiştiği tespit edilmiştir. MİK yönteminde metanol ekstresine en duyarlı bakterilerin *E. coli* ATCC 25922 (31,25 mg/ml) ve *E. coli* ATCC 35218 (31,25 mg/ml) daha sonra *S. aureus* (50,00 mg/ml) olduğu tespit edilmiştir. Su ekstresinin etkili olduğu *K. pneumoniae* ATCC 25955 bakterisinin MİK değerinin ise 31,25 mg/ml olduğu belirlenmiştir. MİK sonuçları agar kuyucuk yöntemiyle kıyaslandığında ise zon çapı küçük olan *S. aureus*'un (50,00 mg/ml) MİK değerinin en yüksek, zon çapları daha büyük olan *E. coli* ATCC 25922 (31,25 mg/ml), *E. coli*

ATCC 35218 (31,25 mg/ml) ve *K. pneumoniae*'nin (31,25 mg/ml) bakterilerinin MİK değerlerinin en düşük olduğu tespit edilmiştir. MİK ve agar kuyucuk yöntemleri arasında negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite ile ilgili olarak Dai ve arkadaşları, *Klasea strangulata* bitkisinin rizomlarından üç gliseroglikolipit, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-amine-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-p-hydroxy-phenyl-propionamido-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol ve 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-[alpha -D-glucose(1-6)-beta -D-allose]-glycerol elde etmişlerdir. Bu gliseroglikolipitlerin yapılarını 2D NMR gibi spektroskopik metotlar kullanarak aydınlatmışlardır. Ayrıca bu bileşiklerin önemli antimikrobiyal ve antitümör aktivitelerinin olduğunu tespit etmişlerdir [16].

Hulley ve arkadaşları, *Asteraceae* familyasına ait olan *Pteronia incana* bitkisinin Güney Afrika'da grip, ateş, böbrek hastalıkları ve sırt ağrısı gibi rahatsızlıklarda tedavi amaçlı kullanılması üzerine bu bitkinin biyolojik aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmada bir maya (*Cryptococcus neoformans*), iki gram-negatif bakteri (*Moraxella catarrhalis* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve bir gram-pozitif bakteri (*Mycobacterium smegmatis*) kullanmışlardır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini kullanarak antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Sonuç olarak, metanol diklorometan (MeOH CH₂Cl₂) ekstresinin ve esansiyel yağların *C. neoformans* (MİK değeri 0,3 mg/ml) ve *M. smegmatis* (MİK değeri 0,5-0,8 mg/ml) üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir [19].

Aliyu ve arkadaşları, Kuzey Nijerya'da geleneksel ilaç olarak kullanılan *Asteraceae* familyasına ait olan *Vernonia ambigua*, *V. blumeoides* ve *V. ocephala* türlerinin etanol ve kloroform ekstralarını standart prosedürlerle fitokimyasal taramalara tabi tutmuş ve disk difüzyon yöntemini kullanarak antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Fitokimyasal taramalarda ekstrelerde steroidler, terpenler,

saponinler, flavanoidler, alkaloidler, tanenler ve glikozitlerin mevcut olduğu, ayrıca bu ekstrelerin potansiyel antimikrobiyal preparatlar olduğunu gösterilmiştir [17].

Pelissari ve arkadaşları, başlıca Latin Amerika ve Brezilya'da bulunan ve halk arasında anti-inflamatuar ve yara iyileştirmede kullanılan, *Asteraceae* familyasına ait olan *Melampodium divaricatum* bitkisinin antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağları ve disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktiviteyi gözlemek için *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* ve *Serratia marcescens* bakterileri üzerinde çalışmışlardır. Çalışma sonucunda sadece *S. aureus* ve *B. subtilis*'de duyarlılık tespit etmişlerdir [22].

Bagci ve arkadaşları, *Asteraceae* familyasına ait olan *Tanacetum balsamita* subsp. *balsamita* ve *T.chiliophyllum* var. *chiliophyllum* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların kimyasal bileşimini analiz etmişlerdir. Ayrıca bu yağların yaklaşık %85'ini oluşturduğu tespit edilen trans-chrysanthenol, chrysanthenyl acetate, linalool oxide, camphor, 1,8-cineole, propionate, carveol gibi bileşenlerin *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerini, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida glabrata*, *S.aureus*, *S. typhimurium*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerinde araştırmışlardır. Sonuç olarak bu yağların test edilen tüm mikroorganizmalara karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [18].

Cardenas ve arkadaşları, *Asteraceae* familyasına ait olan *Monticalia greentmaniana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini ve insanlar için patojen olan önemli gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 25955) üzerinde önemli bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [25].

Del-Vechio-Vieira ve arkadaşları, *Asteraceae* familyasına ait olan *Ageratum fastigiatum* bitkisinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini agar difüzyon metodu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhosa* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ama *Pseudomonas aeruginosa* ve funguslarda aktivitesinin olmadığını tespit etmişlerdir [23].

Lenza ve arkadaşları, *Asteraceae* familyasına ait olan *Eclipta alba* bitkisinin etanol ekstresinin antibakteriyel ve antifungal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemini ve farklı patojenik bakterileri kullanmışlardır. Çalışma sonunda *Eclipta alba* bitkisinin etanol ekstresinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus spp.* üzerine önemli bir antimikrobiyal aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [24].

Senatore ve arkadaşları, Lübnan'da yetişen ve *Asteraceae* familyasına ait olan *Achillea falcata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların bileşimini ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda çoğunlukla gram-pozitif bakteriler üzerinde aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [26].

Amjad ve arkadaşları, *Achillea wilhelmsii* C. Koch bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağın ve metanol ekstresinin bakteriler üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Ekstreler antimikrobiyal aktivite için 20 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml ve 400 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Metanol ekstrelerinin antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle ve MİK testi ile belirlenmiştir. Metanol ekstresinin *B. cereus* ATCC 1274 (400 mg/ml'de zon çapı $21,75 \pm 0,5$ mm) ve *S. aureus* ATCC 25923 (400 mg/ml'de $18 \pm 0,816$ mm) bakterilerine karşı daha yüksek etkili olduğu, *E. coli* ATCC 25922 (400 mg/ml'de $9 \pm 0,816$ mm) bakterisine karşı zayıf etkili olduğu ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 (tüm konsantrasyonlarda 6 mm) bakterisine karşı ise herhangi bir büyüme inhibisyon

etkisi göstermediği tespit edilmiştir. *S. aureus*, *B. cereus* ve *E.coli* bakterilerinin MİK değerlerinin sırasıyla 12,5, 6,25 ve 100 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *A. wilhemsii* bitkisinin yaprak metanol ekstresi ve uçucu yağının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [45].

Literatürde *K. bornmuelleri* bitkisi ile ilgili daha önce yapılmış antimikrobiyal, antioksidan ya da sitotoksikite çalışması bulunmamaktadır. *Klasea* cinsine ait birkaç tür ile ilgili çok az sayıda biyolojik aktivite çalışması yapılmış olup, bu çalışmalar özellikle bitkilerden izole edilen ecdysteroid, flavonoid ve gliserolipitlerin biyolojik aktiviteleri üzerine yoğunlaşmıştır. *Eclipta alba* bitkisinin etanol ekstresinin *S. aureus* ve *E.coli* üzerinde etkili olması [24], *Evax pygmaea* bitkisinin metanol ekstresinin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili olması [27], *Monticalia greentmaniana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların *S.aureus*, *E.coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 üzerinde önemli derecede antibakteriyel etkili olması, *Melampodium divaricatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların *S.aureus* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olması [22], çalışmamızla yakın ve uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda *K. bornmuelleri* Azn. bitkisinin metanol, etanol ve su ekstralarının antioksidan etkisine DPPH radikal süpürücü aktivite ve fenolik içerik tayini yöntemleri ile bakılmıştır. Çalışmada DPPH süpürücü aktivite deneyinde standart antioksidan olarak BHT kullanılmıştır. Radikal süpürücü aktivite sonuçlarında standart olarak kullanılan BHT'nin (IC₅₀: 27,5±0,2 µg/ml) ekstrele göre daha etkili olduğu, ekstraların ise Etanol ekstresi (IC₅₀: 50,5±0,5 µg/ml) > Metanol ekstresi (IC₅₀: 83,5±0,5 µg/ml) > Su ekstresi (IC₅₀: 91,7±0,5 µg/ml) sırasıyla etkili olduğu tespit edilmiştir. Etanol ekstresinin metanol ve suya göre daha iyi antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri derişime bağlı olarak etkili bulunmuştur. 300 µg/ml derişimdeki metanol, etanol, su ekstraları ve BHT'nin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla %91,89±0,31, %87,89±1,37, %53,01±1,34 ve %93,12±0,25 olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre metanol ve etanol ekstralarının su ekstresine göre çok daha fazla radikal süpürücü

etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ekstrelerin fenolik içerik miktarlarına bakıldığında metanol ekstresinin $133,4 \pm 6,66 \mu\text{g GAE/mg}$ ekstre, etanol ekstresinin $159,59 \pm 3,28 \mu\text{g GAE/mg}$ ekstre ve su ekstresinin $91,13 \pm 0,99 \mu\text{g GAE/mg}$ ekstre fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre etanol ekstresi en fazla fenolik içeriğe sahip ekstrelerdir. Etanol ve metanol ekstrelerinin fenolik içerik miktarları su ekstresine göre çok daha fazladır. DPPH radikali süpürücü aktivitesi en yüksek yani IC_{50} değeri en düşük olan etanol ekstresinin (IC_{50} : $50,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) toplam fenolik içeriğinin yüksek olması, DPPH radikali süpürücü aktivitesi en düşük ve IC_{50} değeri en yüksek olan su ekstresinin (IC_{50} : $91,7 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) toplam fenolik içeriğinin de düşük olması, fenolik içerik miktarıyla IC_{50} değeri arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca DPPH aktivitesi ve fenolik içerik miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite ile ilgili olarak Boussaada ve arkadaşları, *Evax pygmaea* bitkisinin metanol ekstresinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmada beş bakteri ve iki maya kullanmışlardır. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ve TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metotlarını kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde ise agar difüzyon ve broth mikrodilüsyon metotlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu ama antifungal aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. Etil asetat ve metanol ekstrelerinin önemli serbest radikal süpürücü etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir [27].

Literatürde *K. bornmuelleri* bitkisi ile ilgili daha önce yapılmış antioksidan etki çalışması bulunmamaktadır. Ancak *Klasea* cinsine ait birkaç tür ile ilgili ve özellikle bitkilerden izole edilen ecdysteroid, flavanoid ve gliserolipitlerin antioksidan aktivite çalışmaları mevcuttur. Dai ve arkadaşları, Çin'de yetişen *Klasea strangulata* bitkisinden izole edilen yeni bir ecdysteroid olan (24R)-24-(2-hydroxyethyl)-20-hydroxyecdysone (3) üzerine antioksidan aktivite çalışması yapmış ve yapılan

çalışmada bu yeni ecdysteroidin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) tarafından indüklenen insan eritrositlerinin hemolizi ve Fe^{2++} sistein tarafından indüklenen karaciğer mikrozoamlarında lipit peroksidasyonu üzerine etkili bir antioksidan aktivitesi olduğunu göstermişlerdir [14]. Bathori ve arkadaşları, *Serratula coronata* (*Klasea coronata*), *S. wolffli* ve *S. tinctoria* bitkilerinin sulu metanolik ekstralarının antioksidan etkisini araştırmışlardır. Bu ekstraların lipit peroksidasyonuna derişim bağımlı inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Antioksidan bileşikler olarak ekstralarda mevcut flavanoidler ve ecdysteroidler değerlendirmişlerdir [15]. Cai ve arkadaşları, Çin'de yetişen *Klasea strangulata* bitkisinden izole edilen 20-hydroxyecdysone (E1), 25-deoxy-11,20-dihydroxyecdysone (E2), 24-(2-hydroxyethyl)-20-hydroxyecdysone (E3), ve 20-hydroxyecdysone-20,22-monoacetone (E4) olarak adlandırılan dört ecdysteroidin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkilerini araştırmışlardır. Bu ecdysteroidlerin, 2,2'-azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) tarafından indüklenen oksidatif strese karşı insan eritrositlerini koruduğunu belirlemişlerdir [13]. Yapılan bu çalışmalar, bu tez çalışmasıyla benzer ve yakın ilişkili bulunmuştur. *Klasea* cinsinin ve *Asteraceae* familyasının iyi bir antioksidan kapasitesine sahip olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında *Klasea bornmuelleri* Azn. bitkisinden elde edilen metanol ve etanol ekstralarının DNA ile etkileşimlerine pBR322 plazmit DNA'sı ile bakılmıştır. DMSO çözücüsünde çözülerek 1×10^4 μ M olarak hazırlanan ve farklı derişimlerde seyreltilen metanol ve etanol ekstralarının pBR322 plazmit DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Elektroforez sonucu genellikle plazmit DNA'nın üç farklı biçimi gözlenir: form I (süper sarmal form), form II (açık dairesel form) ve form III (doğrusal form). Molekül ağırlıkları aynı olmasına karşın bu üç formun jeldeki göç sırası, agaroz derişimine, DNA'nın büyüklüğüne, uygulanan akıma ve tamponun iyonik kuvvetine bağlıdır. Optimize olmuş koşullarda genellikle form I diğerlerine göre daha hızlı hareket eder [51]. Plazmit DNA üzerindeki bir iplikçikte kesim oluşursa, süper sarmal form gevşeyerek daha yavaş

hareket eden açık dairesel olan form II oluşur. Her iki iplikçik de kesilirse, I ve II formları arasında göç eden doğrusal bir form yani form III meydana gelir [52]. *K. bornmuelleri* bitkisinin metanol ve etanol ekstralarının pBR322 plazmit DNA'sı üzerine etkisinin araştırıldığı bu tez çalışması sonucunda, ekstraların her ikisinde derişime ve inkübasyon süresine bağılı olarak plazmit DNA'nın hareketliliğinde, yoğunluğunda ve parçalanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak etanol ekstresinin metanol ekstresine göre, plazmit DNA'nın hareketliliği ve yoğunluğu üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Madde-DNA etkileşimiyle ilgili olarak Asmafiliz ve arkadaşları (2009), sentezledikleri yeni mono- ve bisferrosenilfosfazen türevlerinin antimikrobiyal aktivitelerini ve DNA etkileşimlerini araştırmışlardır. Bileşiklerin DNA etkileşimlerinin incelenmesi sonucunda tüm bileşiklerin pBR322 plazmit DNA'sının hareketliliğinde değışime etken olduğu, bazı bileşiklerin etkisinin diğervalerinden farklı olduğu tespit edilmiştir [46].

İlter ve arkadaşları (2010), sentezledikleri yeni spirosiklik monoferrosenilsiklotrifosfazenlerin, antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırmıştır. Ayrıca, bileşiklerin DNA üzerine etkilerini incelenmişlerdir. Bu maddelerin bazılarının, patojen bakteriler üzerine, tüberküloz referans suşuna ve klinik suşlara da etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimleri sonucu DNA hareketliliği ve yoğunluğunda etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan restriksiyon analizinde tüm bileşiklerce *BamHI* kesiminin engellendiğı, ancak *HindIII* kesiminin gözlendiğı bildirilmiştir [47].

Işıklan ve arkadaşları (2010), sentezledikleri yeni N/O spirosiklik fosfazen türevlerinin biyolojik aktiviteleri ve DNA etkileşimlerini çalışmışlardır. Bileşiklerin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimleri sonucu DNA hareketliliğinde değışikliğe neden olduğunu ve yapılan restriksiyon analizinde tüm bileşiklerce *BamHI* ve *HindIII* kesiminin engellendiğini tespit etmişlerdir [48].

Okumuş ve arkadaşları (2011), sentezledikleri yeni mono ve bis (4florobenzil) spirosiklofosfazen'lerin biyolojik aktiviteleri ve DNA etkileşimlerini çalışmışlardır. Çalışma sonucunda bileşiklerden sadece ikisinin bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bileşiklerin DNA ile etkileşimlerini pBR322 plazmit DNA'sı ile çalışmışlar ve sentezlenen tüm bileşiklerin DNA'nın hareketliliği üzerinde etkili olduğunu tespit etmişlerdir [49].

Asmafiliz ve arkadaşları (2012), sentezledikleri yeni N/O spirosiklotrifosfazenlerin biyolojik aktiviteleri ve DNA etkileşimlerini çalışmışlardır. 5000 μM ve 10000 μM derişimlerde, bileşikleri bazı bakteri ve mantar suşlarına karşı denemişler, ancak herhangi bir güçlü antimikrobiyal aktivite tespit edememişlerdir. Aktivite göstermeme nedenlerinin, maddelerin hücreye girememesi, hücreye girdikten sonra hücreden atılması veya hücre tarafından maddeyi inaktive eden bir enzim üretiminin olabileceğini tartışmışlardır. Bileşiklerin DNA ile etkileşimlerini pBR322 plazmit DNA'sı ile çalışmışlar ve sentezlenen her bileşiğin doza bağlı olarak DNA hareketliliğini değiştirerek etkili olduğunu tespit etmişlerdir [50].

Çalışmamızda etanol ve su ekstresinin 24 saat sürede HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi MTT testiyle çalışılmıştır. Ekstreler 24 saatte MCF-7 hücre dizilerine karşı HeLa hücre dizilerine göre daha düşük sitotoksik aktivite göstermiştir. Etanol ekstresinin MCF-7 hücre dizisine karşı IC_{50} değeri $>100 \mu\text{g/ml}$, su ekstresinin ise $11,04 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. HeLa hücre dizisine karşı etanol ve su ekstrlerinin IC_{50} değerleri sırasıyla $9,84 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ ve $0,1 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak HeLa hücre dizisinde su ekstresinin etanol ekstresine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Her iki kanser hücre dizisinde su ekstresinin etanol ekstresine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizilerinin hücre canlılığını %50 oranında azaltan etanol ekstresinin 0, 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle hücrelerle muamele edilmesi sonucunda hücrelerin sağ kalımları belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak,

ekstre ile muamele edilmemiş HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizileri kullanılmıştır. Ekstre ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki HeLa hücre sayısı 24 saatten sonra düzenli olarak artış göstermiştir. Etanol ekstresi ile muamele edilen hücrelerde ise 24 saatte hücre sayısında azalma olduğu, daha sonra hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 24 saatte etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerinde kontrole göre hücre canlılığını önemli derecede azalttığı görülmüştür. Etanol ekstresinin MCF-7 kanser hücreleri üzerine etkisine bakıldığında ise ekstrenin 48 saate kadar hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, 48 saatten sonra ise hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin azaldığı görülmektedir. 48 saatten sonra MCF-7 hücrelerinin sağ kalımı artmaktadır. Sonuç olarak MCF-7 hücre dizileri üzerinde 48 saatte etanol ekstresinin kontrole göre hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Etanol ekstresinin HeLa kanser hücreleri üzerinde MCF-7 kanser hücrelerine göre daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Son olarak, belirli derişimde etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinin sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin araştırılması amacıyla PI, DAPI ve DiOC₆ boyamaları yapılmıştır. PI boyamada etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinde ölü hücrelerin PI ile kırmızı renk verdiği görülmektedir. Buna göre 10 mg/ml konsantrasyondaki etanol ekstresinin, kontrole göre HeLa hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. DAPI boyamada ekstre uygulanmayan kontrol grubunda apoptotik nükleuslu hücreler çok az mevcutken, etanol ekstresi ile muamele edilen HeLa hücrelerinde apoptotik hücreler görülmüştür. Bu yüzden etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. DiOC₆ boyamada ise etanol ekstresi ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin kontrole göre DiOC₆ ile boyanan hücre sayısının daha az olduğu görülmektedir. Ekstre ile muamele edilen hücrelerin DiOC₆ ile daha az boyandığı dolayısıyla mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu için apoptoza gittiği düşünülmüştür. Sonuç olarak tüm floresan boyamalarda etanol ekstresinin apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sitotoksik aktiviteyle ilgili olarak Dai ve arkadaşları, *K. strangulata* bitkisinin rizomlarından üç gliseroglikolipit, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-amine-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol, 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-(6-p-hydroxy-phenyl-propionamido-6-deoxy-alpha -D-glucosyl)-glycerol ve 1,2-di-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-O-[alpha -D-glucose(1-6)-beta -D-allose]-glycerol elde etmişlerdir. Bu gliseroglikolipitlerin yapılarını 2D NMR gibi spektroskopik metotlar kullanarak aydınlatmışlardır. Ayrıca bu bileşiklerin önemli antimikrobiyal ve antitümör aktivitelerinin olduğunu tespit etmişlerdir [16].

Jayaraman ve arkadaşları, *Stevia rebaudiana* bitkisinin etil asetat, aseton, kloroform ve su ekstralarının antimikrobiyal ve antitümör aktivitesini araştırmışlardır. Sitotoksik aktivite için Vero ve HEp2 hücreleri ile 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) metodunu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, aseton ve etil asetat ekstralarının daha etkin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ve gram-negatif organizmalardan daha çok gram-pozitif organizmalarda etkili olduğunu, ayrıca tüm ekstraların *Epidermophyton species* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca 1: 8 seyreltilmiş aseton ekstresinin normal hücrelere toksik etkisinin olmadığı, kanserli hücreler üzerine ise hem antikanser hem antiproliferatif aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [20].

Nino ve arkadaşları, Kolombiya'da Ucumari doğa parkından topladıkları sekiz *Asteraceae* ve iki *Rubiaceae* türünün antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmada agar difüzyon yöntemi ile iki gram-pozitif, iki gram-negatif bakteri ve üç mantar türü kullanmışlardır. *Asteraceae* familyasına ait ekstraların *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı daha aktif antimikrobiyal etki gösterdiğini ve *Asteraceae* familyasının önemli derecede sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [21].

Csupor-Löffler ve arkadaşları (2009), *Achillea millefolium* agregatının çeşitli kısımlarının n-hekzan, kloroform, su-metanol ve sulu ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri üç adet insan tümör hücre dizisinde MTT testi ile araştırmıştır. Kloroformda çözünen özütünün HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerinde yüksek oranda tümör hücre proliferasyonunu inhibe edici aktivitesi olduğu ve A431 hücreleri üzerinde orta seviyede etkili olduğu görülmüştür. Bu ekstrenin biyolojik olarak aktif fraksiyonlar detaylı incelenmiştir. Çok basamaklı kromatografik purifikasyonların (VLC, CPC, PLC, jel filtrasyonu) sonucunda, beş flavanoid (apigenin, luteolin, centaureidin, casticin ve artemetin) ve beş seskiterpenoid (paulitin, isopaulitin, psilostachyin C, desacetylmaticarin ve sintenin) izole edilip spektrofotometrik yöntemlerle tanımlanmıştır. Antiproliferatif ölçüm centaureidinin bitkinin çeşitli kısımlarının en etkili içeriği olduğunu ve özellikle HeLa (IC_{50} : 0,0819 μ M) ve MCF-7 (IC_{50} :0,1250 μ M) hücreleri üzerinde yüksek oranda büyümeyi inhibe edici aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir. Apigenin, luteolin ve isopaulitin orta seviyede aktif (IC_{50} : 6,95–32,88 μ M) olmalarına karşın, casticin ve paulitin üç tümör hücresine karşı yüksek oranda (IC_{50} :1,286–4,76 μ M) etkilidir. Artemetin, psilostachyin C, desacetylmaticarin ve sintenin bu hücre dizilerine karşı antiproliferatif bir etki göstermediği tespit edilmiştir [53].

Klasea bornmuelleri Azn. bitkisi ekstraları ile yapılan antimikrobiyal, antioksidan, ekstre-DNA etkileşimi ve sitotoksik aktivite çalışmaları sonucunda, metanol ve su ekstresinin bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkili olduğu ve sahip olduğu bu antimikrobiyal etkisinin yüksek fenolik içeriğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Etanol ekstresinin metanol ve su ekstresine göre daha fazla DPPH süpürücü aktivitesinin ve fenolik içeriğinin daha yüksek olması, HeLa ve MCF-7 kanser hücre dizilerine karşı su özütünden daha etkili olması ve HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkili olmasından dolayı biyolojik bir önem taşımaktadır. Etanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin incelenmesinde PI, DAPI ve DiOC₆ floresan boyama sonuçları birbirini desteklemektedir. Metanol ve etanol ekstralarının pBR322 plazmit DNA'sı üzerine

derişime ve inkübasyon süresine bağlı olarak plazmit DNA'nın hareketliliğinde, yoğunluğunda ve paręalanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu ęalıřmada sonuç olarak, *K. bornmuelleri* bitkisi ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkiye sahip olduğu, HeLa hücrelerinde belirli derişimde apoptotik etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, derişime ve inkübasyon süresine bağlı olarak plazmit DNA'nın hareketliliğinde, yoğunluğunda ve paręalanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkiyle yapılacak olan daha sonraki ęalıřmalarda bu ekstrenin içeriğindeki maddeler araştırılarak, etken maddenin tespit edilmesi ve biyolojik etkilerinin araştırılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca *Klasea* türleriyle yapılmış olan biyolojik aktivite ęalıřmaları literatürde ęok sınırlıdır. Bu yüzden bu türün ve başka *Klasea* türlerinin farklı ekstrelerinin ve bu tez de ęalıřılmıř olan etanol ve su ekstrelerinin DU145 ve PC-3 (Androjen bağımsız prostat kanseri) gibi diğer kanser hücre dizileri üzerinde apoptotik etkili olup olmadığı ve etkili ise bu etkinin moleküler mekanizmasının nasıl olduğunun aydınlatılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baydar, S. N., “Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi Cilt:1”, *Palme Yayınları*, Ankara, 7-11 (2006).
2. Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S., “Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi”, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 52 – 67 (2011).
3. Fransworth, N. R., Akerev, O., Bingel, A. S., *The Bulletin of WHO*, 63: 9865-9871 (1985).
4. Karaalp, C., Yurtman, A. N., Yavasoglu, N. U. K., “Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts”, *Pharm. Biol.*, 47 (1): 86-91 (2009).
5. Özhatay, N., Kültür, Ş., Arslan, S., “Check-list of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey IV”, *Turk J. Bot.*, 33: 191-226 (2009).
6. Kırtunç, E., “Doğa Eczanesi Şifalı Bitkiler”, *4Renk Yayınları*, Ankara, 20-23 (2002).
7. Doğan, B., Duran, A., Hakkı, E., “Numerical analyses of Wild *Jurinea* spp. (Asteraceae) in Turkey”, *Bangladesh J. Bot.*, 38 (1): 47-53 (2009).
8. Davis, P. H., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol.5”, *Edinb. Un. Press*, London, 224-252 (1967).
9. Akman, Y., “Angiosperma”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 2007.
10. Davis, P. H., Mill, R., Tan, K., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (supplement 1)”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh (1988).
11. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (supplement 2)”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh, 158-159 (2000).
12. Davis, P. H., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh, 224-252 (1975).
13. Cai, Y. J., Dai, J. Q., Fang, J. G., Ma, L. P., Hou, L. F., Yang, L., Liu, Z. L., “Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulata*”, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80 (12): 1187-1194 (2002).

14. Dai, J. Q., Cai, Y. J., Shi, Y. P., Zhang, Y. H., Liu, Z. L., Yang, L., Li, Y., “Antioxidant activity of ecdysteroids from *Serratula strangulata*”, *Chinese Journal of Chemistry*, 20 (5): 497-501 (2002).
15. Bathori, M., Zupko, I., Hunyadi, A., Gacsne-Baitz, E., Dinya, Z., Forgo, P., “Monitoring the antioxidant activity of extracts originated from various *Serratula* species and isolation of flavonoids from *Serratula coronata*”, *Fitoterapia*, 75 (2): 162-167 (2004).
16. Dai, J. Q., Zhu, Q. X., Zhao, C. Y., Yang, L., Li, Y., “Glyceroglycolipids from *Serratula strangulata*”, *Phytochemistry*, 58 (8): 1305-1309 (2001).
17. Aliyu, A. B., Musa, A. M., Abdullahi, M. S., Ibrahim, H., Oyewale, A. O., “Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (*Asteraceae*)”, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 68 (1): 67- 73 (2011).
18. Bagci, E., Kursat, M., Kocak, A., Gur, S., “Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Tanacetum balsamita* L. subsp *balsamita* and *T. chiliophyllum* (Fisch et Mey.) Schultz Bip. var. *chiliophyllum* (*Asteraceae*) from Turkey”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11 (5): 476-484 (2008).
19. Hulley, I. M., Viljoen, A. M., Tilney, P. M., Van Vuuren, S. F., Kamatou, G. P. P., Van Wyk, B. E., “The ethnobotany, leaf anatomy, essential oil variation and biological activity of *Pteronia incana* (*Asteraceae*)”, *South African Journal of Botany*, 76 (4): 668-675 (2010).
20. Jayaraman, S., Manoharan, M. S., Illanchezian, S., “In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia Rebaudiana* (*Asteraceae*) Leaf Extracts”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (4): 1143-1149 (2008).
21. Nino, J., Narvaez, D. M., Mosquera, O. M., Correa, Y. M., “Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight *Asteraceae* and two *Rubiaceae* plants from Colombian biodiversity”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (4): 566-570 (2006).
22. Pelissari, G. P., Pietro, R. C. L. R., Moreira, R. R. D., “Antibacterial activity of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC, (*Asteraceae*)”, *Revista Brasileira de farmacognosia- Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20 (1): 70-74 (2010).
23. Del-Vechio-Vieira, G., Sousa, O. V., Yamamoto, C. H., Kaplan, M. A. C., “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of

- Ageratum fastigiatum (*Asteraceae*)”, *Records of Natural Products*, 3 (1): 52-57 (2009).
24. Lenza, V. A., Morel, L. J. F., Coppede, J. S., Fernandes, V. C., Martinez-Rossi, N. M., Franca, S. C., Belebony, R. O., Pereira, P. S., Fachin, A. L., “Antimicrobial Activities of Ethanol Extract and Coumestans from *Eclipta alba* (L.) Hassk (*Asteraceae*)”, *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (6): 863-868 (2009).
 25. Cardenas, J., Rojas, J., Rojas-Fermin, L., Lucena, M., Buitrago, A., “Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Monticalia greenmaniana* (*Asteraceae*)”, *Natural Product Communications*, 7 (2): 243-244 (2012).
 26. Senatore, F., Napolitano, F., Arnold, N. A., Bruno, M., Herz, W., “Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. (*Asteraceae*)”, *Flavour and Fragrance Journal*, 20 (3): 291-294 (2005).
 27. Boussaada, O., Chriaa, J., Nabli, R., Ammar, S., Saidana, D., Mahjoub, M. A., Chraeif, I., Helal, A. N., Mighri, Z., “Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *Evax pygmaea* (*Asteraceae*) growing wild in Tunisia”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (8): 1289-1296 (2008).
 28. Çaylak, E., “Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1): 73-83 (2011).
 29. Akyüz, E., “Bazı *Anthemis* türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 16-18 (2010).
 30. Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., “Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (4): 401-409 (2010).
 31. Harvey, R. A., Champe, P. C., Fisher, B. D., “Lippincott's Illustrated Reviews: Mikrobiyoloji”, *Nobel Tıp Kitapevleri*, 161-418 (2006).
 32. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M., “Tıbbi Mikrobiyoloji, 9. Baskı”, *Nobel Tıp Kitapevleri*, 219-369 (2002).
 33. Avcı, O., “Dört dişli ligandların trimer ile etkileştirilmesinden oluşan fosfazen bileşiklerinin biyolojik aktivitesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 16 (2013).

34. Dilsiz, N., “Moleküler Biyoloji”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 155-169 (2004).
35. Bali, E. B., “*Achillea teretifolia* Willd. Özütlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-41 (2012).
36. Akalın, D., Gökteş, E., Horzum, E., Karaodul, G., Çobanoğlu N., “Eğitimciler İçin Eğitim Rehberi, Üreme Sağlığı Modülleri, Meme ve Üreme Organlarında Sık Görülen Kanseler”, *Sağlık Bakanlığı Yayınları*, Ankara, 722: 114-115 (2008).
37. Gürbüz, N., “Antimutajenler ve Antikarsinojenler (Kanser Gelişiminin Kimyasal Bileşiklerle Önlenmesi)”, *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 26: 312-318 (2006).
38. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., “Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı”, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 423-459 (2007).
39. Perez, C., Pauli, M., Bazerque, P., “An antibiotic assay by the agar-well diffusion method”, *Acta Biologiae et Medicine Experimentalis*, 15: 113-115 (1990).
40. Zgoda, J. R., Porter, J. R., “A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi”, *Pharmaceutical Biology*, 39: 221–222 (2001).
41. Blois, M. S., “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 181: 1199–1200 (1958).
42. Singleton, V. L., Rossi, J. A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158 (1965).
43. Ferrari, M., Fornasiero, M. C., Isetta, A. M., “MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro”, *J. Immunol. Methods*, 131: 165-172 (1990).
44. Ural, A. U., Avcu, F., Candir, M., Guden, M., Ozcan, M. A., “In vitro synergistic cyto-reductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells”, *Breast Cancer Res*, 8: 52 (2006).
45. Amjad, L., Mohammadi-Sichani, M., Mohammadi-Kamalabadi, M., “Potential Activity of the *Achillea wilhelmsii* Leaves on Bacteria”, *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1: 216-218 (2011).

46. Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Koç, L. Y., Açık, L., Kısa, Ö., Albay, A., Üstündağ, Z., Solak, A. O., “Phosphorus-Nitrogen Compounds. 18. Syntheses, Stereogenic Properties, Structural and Electrochemical Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New Spirocyclic Mono- and Bisferrocenylphosphazene Derivatives”, *Inorganic Chemistry*, 48 (21): 10102-10116 (2009).
47. İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E. B., Solak, A. O., Büyükkaya, F., Dal, H., Hökelek, T., “Phosphorus–nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes”, *Polyhedron*, 29: 2933–2944 (2010).
48. Işıklan, M., Asmafiliz, N., Özalp, E. E., İlter, E. E., Kılıç, Z., Çoşut, B., Yeşilot, S., Kılıç, A., Öztürk, A., Hökelek, T., Bilir, L. Y. K., L. Acık, Akyüz, E., “Phosphorus–Nitrogen Compounds. 21. Syntheses, Structural Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New N/O Spirocyclic Phosphazene Derivatives. The NMR Behaviors of Chiral Phosphazenes with Stereogenic Centers upon the Addition of C”, *Inorganic Chemistry*, 49 (15): 7057-7071 (2010).
49. Okumuş, A., Kılıç, Z., Hökelek, T., Dal, H., Açık, L., Öner, Y., Koç, L. Y., “Phosphorus–nitrogen compounds part 22. Syntheses, structural investigations, biological activities and DNA interactions of new mono and bis (4-fluorobenzyl) spirocyclophosphazenes”, *Polyhedron*, 30 (17): 2896-2907 (2011).
50. Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Hayvalı, Z., Açık, L., Hökelek, T., Dal, H., Öner, Y., “Phosphorus–nitrogen compounds. Part 23: Syntheses, structural investigations, biological activities, and DNA interactions of new N/O spirocyclophosphazenes”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 86: 214-223 (2012).
51. Akerman, B., Cole, K. D., “Electrophoretic capture of circular DNA in gels”, *Electrophoresis*, 23: 2549-2561 (2002).
52. Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E. J., Fernandez-Mestre, M., Arrieché, D., Marchan, E., “Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97 (4): 364–369 (2003).
53. Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J., “Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids

- from *Achillea millefolium* s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines”, *Phytotherapy Research*, 23: 672–676 (2009).
54. Baydar, H., “Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri (Bilimi ve Teknolojisi)”, *SDÜ Yayınları*, Isparta, 1-21 (2001).
55. Goavaerts, R., “How many species of seed plants are there”, *Taxon*, 50: 1085-1090 (2001).
56. Davis, D. H., “Flora of Turkey and The East Aegean Islands”, Işık, K., *Edinburg University Press*, 4: 130-402 (1984).
57. Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., Khalid, A. M., “Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 205–217 (2005).
58. Erdem, A., Ozsoz, M., “Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions”, *Electroanalysis*, 14 (14): 965-974 (2002).
59. Graves, D. E., Velea, L. M., “Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids”, *Current Organic Chemistry*, 4 (9): 915-929 (2000).
60. Bloomfield, V. A., "DNA condensation by multivalent cations", *Biopolymers*, Ankara, 44 (3): 269–282 (1997).
61. Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H., “ Moleküler Biyoloji, Instant Notes”, Konuk, M., *Nobel Yayın Dağıtım*, 80-83 (2004).
62. Devita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., “Cancer, practice and principles of oncology”, *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia (1977).
63. Klug, W. S., Cummings, M. R., “ Genetik Kavramlar”, Öner, C., *Palme Yayıncılık*, Ankara, 635-649 (2003).
64. Graham, E. L., Graham, M. J., Wilcox, W. L., “Bitki Biyolojisi”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 24-28 (2004).
65. Hartweel, J., “Plant used against cancer”, *J.Nat Prod*, 31: 71-170 (1968).
66. İnternet: Meme kanseri
<http://ozondoktoru.com/Kolon-kanseri.php> (2013).

67. İnternet: Prostat kanserinin evreleri
<http://www.forumgercek.com/showthread.php?t=48563> (2013).
68. İnternet: Serviks kanserinin evreleri
http://www.genitalsigil.net/serviks_kanseri.html (2013).
69. İnternet: İnsan Papilloma Virüsü (HPV)
<http://www.livescience.com/20517-hpv-vaccine-teens-doctors.html> (2013).
70. İnternet: Hücrede apoptoz
<http://www.tkd.org.tr> (2013).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı , adı : ÇELİK, Zülfinaz Betül
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 27.04.1988 Erzurum
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 213 26 32
 e-mail : biologbetul@hotmail.com
zbcelik@firat.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D.)	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013- Halen	Fırat Üniversitesi/Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.	Araştırma Görevlisi
2010-2011	Gazi Üniversitesi/Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	Sözleşmeli Arş.Gör.

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Phosphorus-Nitrogen Compounds: Part 25. Syntheses, Spectroscopic, Structural and Electrochemical Investigations, Antimicrobial Activities, and DNA Interactions of Ferrocenyldiaminocyclotriphosphazenes. 2013. Nuran Asmafiliz, Zeynel Kılıç, Aslı Öztürk, Yasemin Süzen, Tuncer Hökelek, Leyla Açık, **Z. Betül Çelik**, L. Yasemin Koç, Mehmet Lütfi Yola, Zafer Üstündağ. Phosphorous Sulfur Silicon Relat. Elem. DOI:10.1080/10426507.2013.779273.

Kurs ve Kongreler

1. Türk Toksikoloji Derneği Moleküler Epidemiyoloji Kursu “Human population studies with genetic biomarkers: Measure of exposure, assessment of damage, and detection of susceptibility”,Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/ Ankara, Haziran 2012.
2. 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, Aralık 2011.
3. 9.Ankara Biyoteknoloji Günleri (Mikrobiyal Biyoteknoloji), Ankara Üniversitesi /Ankara, Ekim 2011.
4. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu, Atatürk Üniversitesi / Erzurum, Temmuz 2011.
5. 8.Ankara Biyoteknoloji Günleri (Türkiye’de Biyoteknoloji Politikaları ve Biyogüvenlik), Ankara Üniversitesi /Ankara, Kasım 2010.

Kongrelerde Sunulan Posterler

1. “Heptaptera anisoptera ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Ön Çalışmalar”, **Z.Betül Çelik**, Leyla Açık, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 2011.
2. “Antimicrobial and Cytotoxic Activities, and DNA interactions of new fully substituted mono (4-fluorobenzyl) spirocyclotriphosphazenes”, Leyla Açık, Hüseyin

Akbaş, Aytuğ Okumuş, Zeynel Kılıç, L. Yasemin Koç, **Z.Betül Çelik**, 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology, Graz, Avusturya, 2-6 Eylül 2012.

Projeler

1. Retinol'ün (A Vitamini) İnsan Lenfosit Kültüründe Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri, Aralık 2009.
2. Alfa-Tokoferol'un (E Vitamini) İnsan Lenfosit Kültüründe Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri, Mayıs 2010.

Hobiler

Kitap okumak, Sinema