

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDEMİK *LATHYRUS* L. TÜRLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FULYA ÇELEBİ

EYLÜL 2012
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDEMİK *LATHYRUS L.* TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL
VE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FULYA ÇELEBİ

EYLÜL 2012
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

FULYA ÇELEBİ tarafından hazırlanan ENDEMİK LATHYRUS L. TÜRLERİ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI başlıklı tezinin, 24/05/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Jüri Başkanı)
Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Yusuf BARAN (Üye)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Vatan TAŞKIN (Üye)
Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

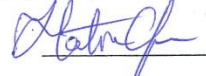
Prof. Dr. Mustafa İŞİLOĞLU
Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ
Danışman, Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 24/05/2012

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Fulya ÇELEBİ

24/05/2012

ÖZET

ENDEMİK *LATHYRUS L.* TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fulya ÇELEBİ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

Mayıs 2012, 66 sayfa

Bu tez çalışmasında, 9 farklı endemik *Lathyrus L.* türleri ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüsünden toplanan 8 farklı türün özütlerinin mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal ve kanser hücreleri üzerinde antitümör etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde 6 farklı mikroorganizma (*Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces albus*, *Micrococcus luteus*) üzerindeki etki disk difüzyon metoduyla belirlenmiştir. Endemik *Lathyrus L.* etanol özütlerinden en yüksek etkiler; *M. luteus* üzerinde *L. brachypterus* (13 mm), *S. albus* ve *P. aeruginosa* üzerinde *L. cilicicus* (13 mm) olarak belirlenmiştir. Kampüs florasından toplanan bitkilerin etanol özütleri soxhlet cihazıyla ve maserasyon tekniği ile elde edilmiş olup 2 farklı teknik arasında soxhlet ile daha iyi sonuç veren *Quercus coccifera* meyve özütünün (15 mm) *S. albus* üzerindeki etkisi dışında belirgin fark olmadığı gözlenmiştir. Toplam 17 bitki özütünün kanser hücreleri üzerindeki antitümör etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. Endemik 9 *Lathyrus L.* türlerinden 6 tanesinin, normal hücre hattı BEAS 2B'ye sitotoksik etki göstermeyip farklı kanser hücrelerinin bölünmeleri üzerinde negatif etkisi olduğu belirlenmiştir. En yüksek antiproliferatif etki *L. tukhtensis* özütünden (kontrolle kıyasla 1,88 kat) DU145 hücre hattı üzerinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bitki özütlerinin hiçbirisi antimikrobiyal ve antitümör aktivitelerde kullanılan pozitif kontroller kadar etkili olamamıştır. Üç aydan daha az sürede saklanan taze *Lathyrus L.* türlerinden elde edilecek özütler söz konusu bu aktiviteler üzerinde daha etkili olabilir.

AnahtarKelimeler: Bitki Özütü, Antimikrobiyal Aktivite, Antitümör Etki

ABSTRACT

INVESTIGATIONS ON ANTIMICROBIAL AND ANTITUMOR ACTIVITIES OF ENDEMIC *LATHYRUS* L. SPECIES

Fulya ÇELEBİ

Master of Science (M.Sc),

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

May 2012, 66 pages

In this thesis, antimicrobial and antitumor activities of 9 different endemic *Lathyrus* L. species and 8 different plant species from Muğla Sıtkı Koçman University Campus were investigated. Antimicrobial activity was examined 6 different microorganism (*Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces albus*, *Micrococcus luteus*) by using disc diffusion method. The highest effects of endemic *Lathyrus* L. extracts were observed on *M.luteus* (13 mm) with *L. brachypterus*; *S. albus* and *P. aeruginosa* (13 mm) with *L. cilicicus*. Ethanol extracts of plants from Muğla Sıtkı Koçman University campus were obtained by using soxhlet equipment was the highest (15 mm zone diameter) on *S. albus* bacteria compared to the other extracts obtained with both techniques. Antitumor activities of total 17 plants extracts on cancer cell lines were analyzed by MTT assay. Six of the 9 *Lathyrus* L. species did not show cytotoxic effect on BEAS 2B normal cell line; however they caused inhibition on cell proliferation of different cancer cell lines. The highest antiproliferative effect which is 1,88-fold compared to control was observed on DU145 cell line with *L. tukhtensis*. In conclusion none of the plant extracts were as compatible as positive controls used on antimicrobial and antitumor activities. Extracts obtained from fresh *Lathyrus* L. species stored not more than 3 months might be more effective on such activities.

Keywords: Plant Extracts, Antimicrobial Activity, Antitumor Activity

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük emeği bulunan, tez konusunun seçimi, hazırlanması ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi ve deneyimleri ile bana yön veren, bundan sonraki hayatımda, birlikte çalışabilme şansını yakaladığım için hep gurur duyacağım değerli hocam Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ' e saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim sırasında destek ve katkıları için saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e ve karşılaştığım zorluklarda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Emin DURU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışma materyallerimi temin eden Yrd. Doç. Dr. Fatma GÜNEŞ'e saygı ve şükranlarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımında her zaman yanımda olan, birlikte çalıştığım laboratuvar arkadaşım Bahar TÜL'e tez çalışmalarımında gösterdiği özveri ve emeği için teşekkür ederim.

Geleceğime yön verirken aldığım her kararın arkasında saygıyla duran her türlü manevi ve maddi destekleriyle her zaman yanımda olan annem Aysel, babam Hüseyin ve kardeşim Açelya ÇELEBİ' ye ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	4
1.2. Kaynak Özetleri	4
1.2.1. Bitki özütlerinin antimikrobiyal etkileri	9
1.2.2. Bitki özütlerinin antitümör etkileri	14
1.2.3. <i>Lathyrus</i> cinsi genel bilgi.....	16
2. MALZEME VE YÖNTEM	17
2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Malzemeler.....	17
2.1.1. Kullanılan kimyasallar	18
2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler.....	18
2.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	18
2.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneğinde Kullanılan Test Mikroorganizmaları .	18
2.4. Bitki Ekstraksiyonu.....	19
2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	19
2.6. Hücre Kültürü.....	20
2.7. MTT Testi	22
2.7.1. Hücre çoğalmasının MTT ile belirlenmesi	23
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	25
3.1. Endemik <i>Lathyrus</i> L. Özütünün Antimikrobiyal Aktivitesi	25
3.2. Kampüs Flora Bitkileri Antimikrobiyal Aktiviteleri	34
3.3. Antitümör Aktivite	36
3.3.1. Endemik <i>Lathyrus</i> L. türleri antitümör aktivite.....	36
3.3.2. Hücre çoğalmasını azaltan özütlerin doz denemesi.....	43
3.3.3. Diğer bitkilerin antitümör etkileri.....	46

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan endemik bitkiler	17
Çizelge 3.1. Disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	25
Çizelge 3.2. Aktif bileşen ekstraksiyonunda kullanılan solventler	30
Çizelge 3.3. Maserasyon yöntemi disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	36
Çizelge 3.4. Soxhlet yöntemi disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	36
Çizelge 3.5. Endemik <i>Lathyrus</i> L. etanol özütlerinin hücre bölünmesi üzerinde etkileri	43
Çizelge 3.6. Bazı bitki özütlerinin hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. K562 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri	38
Şekil 3.2. PC-3 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri	38
Şekil 3.3. DU145 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri.....	40
Şekil 3.4. A549 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri	40
Şekil 3.5. MCF-7 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri.....	41
Şekil 3.6. CCC Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri	41
Şekil 3.7. BEAS 2B Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri	42
Şekil 3.8. <i>L. elongatus</i> 'un PC-3 hücre hattı üzerine konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi	44
Şekil 3.9. <i>L. karsianus</i> 'un K562 hücre hattı üzerine konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi	45
Şekil 3.10. <i>L. nivalis</i> 'in K562 hücre hattı üzerine konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi	45
Şekil 3.11. <i>L. nivalis</i> 'in CCC hücre hattı üzerine konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi	46
Şekil 3.12. Bazı bitki özütlerinin K562 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	47
Şekil 3.13. Bazı bitki özütlerinin PC-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	47
Şekil 3.14. Bazı bitki özütlerinin DU145 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	48
Şekil 3.15. Bazı bitki özütlerinin A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	49
Şekil 3.16. Bazı bitki özütlerinin MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	50
Şekil 3.17. Bazı bitki özütlerinin CCC hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	50
Şekil 3.18. Bazı bitki özütlerinin BEAS2B hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	51

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
UV	Ultraviyole Işın
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
%	Yüzde
cm^2	Santimetrekaire
mm	Milimetre
nm	Nanometre
sa	Saat
dk	Dakika
pH	Asitlik-Bazlık Derecesi
CFU	Colony Forming Unit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer saline)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth

1. GİRİŞ

Türkiye biyoçeşitlilik açısından Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan olmak üzere 3 fitocoğrafik bölgenin kesişim noktasında bulunmasından dolayı zenginlik göstermektedir (Avcı, 2005). İklim özellikleri, toprak yapısındaki çeşitlilik, jeolojik olarak farklı birçok alana sahip olması gibi özellikleri Türkiye'yi bitki zenginliği açısından öne çıkarmaktadır. Türkiye'de yayılış gösteren bitki türlerinin sayısı, Avrupa kıtasının tümünde yayılış gösteren bitki türlerinin sayısına yakındır. 2004 yılındaki verilere göre Türkiye'nin tür, alttür ve varyete düzeyinde 12000 taksona sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Erik ve Tarıkahya, 2004; Avcı, 2005). Endemik, sınırlı yayılışa sahip bitki gruplarını ifade etmektedir. Bu gruplar tür, tür altı ya da tür üstü düzeyde olabilir. Endemizm ise bir bitki türünün dar bir bölgede bulunması durumudur. Bir bitki sınırları belli, dar bir alanda yayılış gösterirse o bitkiye endemik bitki denir. Endemik bitkilerin yayılış alanları birkaç metrekareden bir kıtaya genişletilebilir fakat pratikte sadece bölgesel veya daha dar alanlarda yayılış gösteren bitkiler endemik olarak kabul edilir (Kaya ve Aksakal, 2005). Türkiye'de doğal olarak bulunan 8756 türün yaklaşık % 31'i endemiktir. Alttürler, varyeteler ve hibritler buna dahil edildiğinde bu oran % 33'e kadar çıkmaktadır (Davis, 1988). Tüm Avrupa kıtasında 12500 açık ve kapalı tohumlu bitki türü varken sadece Anadolu'da yaklaşık 11000 tür olduğu ve bunların yaklaşık üçte biri Türkiye'ye özgü yani endemik türleridir. Bu veriler Türkiye'nin sahip olduğu flora zenginliğini açıkça ortaya koymaktadır (Atik vd., 2010).

Türkiye'nin komşu ülkelerinden İran 8000 kadar bitkiye sahiptir ve endemik bitkilerin sayısı, Türkiye'nin yarısı kadardır. Yunanistan 5000 kadar bitki türüne sahiptir ve bunların % 14,9'u endemiktir. Avrupa ülkelerinden Fransa'da endemizm oranı % 2,9 iken İspanya'da % 18,6'dır. Polonya ise sadece 2450 bitki türüne sahipken endemizm oranı % 0,1'dir. Görüldüğü gibi Türkiye endemizm oranı ve

bitki çeşitliliği açısından neredeyse tüm Avrupa ile kıyaslanabilecek durumdadır (Avcı, 2005). Yeryüzünde 250.000 ile 500.000 arasında bitki türünün bulunduğu ancak bunun % 1-10 kadarının besin olarak insanlar ve hayvanlar tarafından kullanıldığı tahmin edilmektedir. Tıbbi amaçla kullanılanların ise bu orandan daha fazla olduğu bilinmektedir (Cowan, 1999).

Bitkiler çok eski zamanlardan günümüze kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Halk arasında şifalı bitkiler olarak bilinen ve doğal olarak yetişen pek çok bitkisel drog mikroorganizmaların sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı denenmiş günümüzde de bu araştırmalar devam etmektedir

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvar şartlarında araştırılmaya başlanılmıştır (Vonderbank, 1949; Dığrak vd., 1999). Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de tıbbi açıdan önemli bulunan bitkiler hastalıkların tedavisinde yüzyıllardan beri halk arasında kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmokopelerinde (kodeks) ve tıbbi bitkileri yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bunların 500 kadarının tarımsal üretiminin yapıldığı, ayrıca değişik amaçla kullanılan bitkilerin çok azının farmokopelerde kayıtlı olduğu bildirilmektedir. Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Oysa, Türkiye'de tıbbi amaçla tüketilen bitki sayısı çok fazladır, hatta bazı yayınlarda bunun en az 500 civarında olduğu kaydedilmektedir (Baytop, 1994).

Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar, sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkilerden dolayı doğal bitkisel ürünlere karşı olan ilginin artmasını sağlamıştır. Bu amaçla birçok bitki kimyasalı, mikrobiyolojik ve farmakolojik yönlerden etraflıca araştırılmaktadır. Tıbbi bileşiklerin kaynağı olan bitkiler, antik çağ uygarlıklarından, günümüzün gelişmiş modern toplumlarına kadar pek çok insan tarafından sağlığın korunmasında önemli bir araç olarak kullanılmıştır. Modern ilaçların % 50'den fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun günümüzde de etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Örneğin, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık

gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun % 64'ünün bitkileri tedavi amaçlı olarak kullandığı anlaşılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Babaoğlu, 2002).

Son yıllarda bütün dünyada, antibiyotiklerin gelişi güzel kullanımı nedeniyle, insan patojeni bakterilerin ilaçlara karşı direnç kazandığı tespit edilmiştir. Yine ilaçlara dirençli patojen fungus ve bakteriler nedeniyle AIDS, kanser gibi hastalıkların tedavisinin zorlaştırdığı görülmüştür (Facey vd., 1999; Ahmad ve Beg, 2001). Bu durum bilim adamlarını değişik kaynaklardan yeni antimikrobiyal bileşiklerin araştırılması için teşvik etmiştir. Bitkilerin yeni antimikrobiyal ve kemoterapötik maddelerin elde edilebileceği, zengin bir kaynak olmasından dolayı araştırmalar özellikle tıbbi bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır (Karaman vd., 2003).

Kanser, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır (Klug ve Cummings, 2002). Günümüzde kanser birçok toplumda kalp ve damar hastalıklarından sonra en fazla ölüme yol açan hastalık grubudur. Kalp ve damar hastalıklarında giderek azalma eğilimi gösteren ölüm oranlarına karşılık kanser ölümleri hemen tüm toplumlarda artmaya devam etmektedir Kadınlarda meme, akciğer, gastrointestinal ve ürogenital kanserlere daha çok rastlanırken, erkeklerde akciğer, gastrointestinal ve ürogenital kanserler en sık rastlanılan kanserlerdir (Ruacan, 2003). Ölümcül bir hastalık olarak bilinen kanser, hastaları ve çevresini moral olarak da etkilemektedir. Bu nedenle günümüzün en önemli mediko-sosyal sorunlarından biridir (Kayaalp, 2000).

Kemoterapide uygulanan antikanser etkili bir ilaç, kanser hücresi üzerine toksik etki gösterirken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki göstermekte ve etkilenen sağlıklı hücrelerin bulunduğu organların tahrip olmasına neden olmaktadır. Antikanser ilaçların istenmeyen bu yan etkileri ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda kanser kemoterapisi uygulanan hastalarda tedavide kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç oluştuğu belirlenmiştir. Kemoterapi kanserli hastaların % 80'ini iyileştirebilmekte, ancak % 20'lik

bölümdeki hastaların kanser hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmekte ya da ölümcül toksisite oluşturmaktadırlar (Korkmaz vd., 2002). Bundan dolayı günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Araştırmaların asıl amacı en az toksisite ile daha etkili bir tedavi sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerine karşı sentetik ve bitkisel ilaçların antikanser etkileri araştırılmaktadır. Özellikle bitkilerden elde edilen özütler ile yapılan çalışmalar daha ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bu konu ile ilgili çalışmalar yoğun şekilde yürütülmektedir (Lee, 1999; El-Shazyl vd., 2000; Turan, 2003; Zhao vd., 2005).

1.1. Amaç ve Kapsam

Tez çalışmasında Türkiye'nin çeşitli lokasyonlarından toplanmış *Lathyrus* genusuna ait 9 endemik türün etanol özütlerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve ayrıca söz konusu bitki ekstraktları çeşitli kanser hücre hatları ile muamele edilerek hücre büyümesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Böylece elde edilen verilerle *Lathyrus* türlerinin antimikrobiyal ve antitümör potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ilave olarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüsünden toplanan bazı bitkilerin etanol özütlerinin de antimikrobiyal ve antitümör etkileri incelenmiştir.

1.2. Kaynak Özetleri

İlk antibiyotik Alexander Fleming tarafından 1929'da *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında sitafilokokların üremesinin inhibe olduğunu görmesi ile keşfedilmiştir. Penisilin direnci ilk olarak 1940'ların ortalarında saptanmıştır (Cohen ve Tartasky, 1997). Antimikrobiyal ilaçlara özellikle de antibiyotiklere karşı enfeksiyöz

hastalıklara neden olan mikroorganizmaların direnç kazanması klinik bir problem haline gelmiş, insanlar yeniden doğal antimikrobiyalere yönelmişler ve bu konudaki çalışmalar hız kazanmıştır (Oksay vd., 2005). Bilim insanları direnç geliştiren bakterilere karşı koyabilmek için alternatif antibiyotik ajan üretme çalışmalarını hızlı bir şekilde sürdürmektedirler. İn vitro koşullarda yapılmış pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin ve bu özütlerden saflaştırılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Sibanda ve Okoh, 2007).

Bitkilerin mikroorganizmalar üzerinde olduğu kadar kanser hücreleri üzerinde de sitotoksik etkisi yıllardır araştırmacıların ilgi odağı durumundadır. Kanser hastalığı, toplumda kardiyovasküler hastalıklarının ardından gelen en önemli ölüm sebeplerindedir. 1850' lerde dünyada görülen kanser oranı % 0,5 iken, 1946'da % 11, 1970' te % 16 ve 1994 yılında yaklaşık % 20 olduğu kayıtlıdır. İstatistiksel sonuçlar, şaşırtıcı olarak toplumun üçte birinin hayatlarında bir defa kanser hastalığı ile karşılaşacağını göstermektedir (Pırıldar, 2006). Bitkilerden elde edilen doğal ürünler farmasötik endüstrinin ilaç geliştirme programlarında ciddi bir öneme sahiptir (Nair vd., 2005). 1983 ve 1994 yılları arasında onaylanmış yeni ilaçların %41'inin kaynağı, doğal ürünlerdir. Sadece antimikrobiyal ve antikanser özellik açısından incelendiğinde, bu oran daha da yükselmektedir. Her ikisi için de kullanılan doğal ürün kaynağı oranı % 60'ları geçmektedir (Özmen, 2008).

Günümüzde bitkilerden özütlenerek tüm dünyada tıbbi tedavide kullanılan 119 adet ilaç bulunmaktadır. Bu nedenle ilaç geliştirme çalışmalarının birinci basamağı olarak bitkilerin araştırılması mantıklı bir gerekçe olarak görülmektedir (Farnsworth, 1990). Ülkemiz zengin bitki florasına sahip olduğundan bütün dünya ülkelerinde olduğu gibi tıbbi bitkilerin araştırılması ve incelenmesi konusu ülkemizde de dikkatleri üzerine çekmiştir (Baydar, 2005).

Polisakkaritler, proteinler, yağlar ve nükleik asitler tüm canlıların olduğu gibi bitkilerin de temel yapı taşlarıdır ve bunlar primer metabolitler olarak isimlendirilirler. Bunun yanında bitkiler hemen hemen sınırsız aromatik madde sentezleme yeteneğine sahiptirler. Bu maddelerin çoğu fenoller ve bunların oksijen

türevleridir. Bu türevlerin çoğu sekonder metabolitler olup 12.000 kadarı izole edilmiştir. Yüksek yapısal çeşitlilikte olan sekonder metabolitler yüksek bitkilerin tümünde mevcuttur. Bu metabolitler bitkinin varlığı açısından çok önemli olmamalarına rağmen genellikle türlerin yaşamlarını sürdürmelerinde anahtar rol üstlenmektedir. Bitkilerde bulunan bu metabolitler mikroorganizmalara, böceklere ve otçullara karşı savunma mekanizması olarak görev yapar (Wink, 2003).

Yüksek bitkiler farklı biyolojik aktivitelere sahip, çok sayıda farklı kimyasal bileşenler üretirler (Hamburger ve Hostettmann, 1991). Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasalların ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır. Boyadan gıda endüstrisine kadar çeşitli alanlarda kullanılan bu aktif doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle *in vitro* antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, yeni antimikrobiyal ajan ve doğal antioksidan madde geliştirme çalışmaları için bitkilerin yeni ve zengin birer araştırma kaynağı olarak görülmelerine neden olmaktadır (Esen, 2008).

Bazı bakteri veya mantar türü mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve terapötik dozlarda, başka mikroplar için üreme durdurucu ve öldürücü etki gösteren antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötiklerdir. Antimikrobiyal ilaçlar, hastanın normal hücrelerine zarar vermeden, enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları öldürebilme yeteneği nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde oldukça etkilidir (Bilgehan, 1989).

Günümüzde antibiyotikler mikroorganizmaların sebep oldukları hastalıklarla savaşmakta yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak yan etkilerinin fazla olmasının yanı sıra bakterilerin bu antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmalarından dolayı ve ayrıca maddi yönden külfetli olmaları bilim adamlarını toksik etkisi olmayan ya da önemsiz denecek kadar az olan, maddi yönden ucuz olan kaynaklardan antibiyotik eldesine yöneltmiştir. İşte bu antibiyotik eldesinde günümüzde alternatif olarak kullanılan kaynaklar tıbbi kökeni olan bitkiler başta olmak üzere, makrofungus ve algler gelmektedir (Dülger, 1999).

İlk zamanlarda birçok antibiyotik grubu, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde oldukça etkin bir şekilde kullanılmıştır. Fakat ileriki yıllarda direnç gelişimi görülmeye başlanmıştır. Direnç gelişimi ve yayılımı genellikle gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte, 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalardaki toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakterilerin bulunduğu, antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin negatif çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da belirtilmektedir. Ancak antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoğul dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların sağaltımında büyük sorunlar yaşanmaya başlanmıştır. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bu ilaçlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek büyümektedir (Cohen, 1992; Gold ve Moellering, 1996; Tenover ve Hugles, 1996; Yüce, 2001). 20.yüzyılın ikinci yarısından itibaren, sentetik ilaçların zamanla, hastalıkların yeni ırklarına karşı etkisiz kaldığı, birçok yan ve toksik etkilerinin olduğu anlaşılmış ve yeniden bitkisel kökenli doğal ilaçlara olan ilgi artmaya başlamıştır (Baydar, 2005).

Bilinen tüm antibiyotiklere direnç geliştirmekte olan bakterilerde, ilaç dirençliliği artmakta ve yayılmaktadır. Bu nedenle ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmektedir ve bazı geleneksel bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır (Toroğlu ve Çenet, 2006). Bitki kaynaklı aktif doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle günümüzde yeni antimikrobiyal ajan ve doğal antioksidan madde geliştirme çalışmalarında bitkiler ön plana çıkmasına rağmen antibiyotiğin 1940'larda ortaya çıkısından sonra bitkisel özütlerin antibiyotik olarak kullanımında belirli bir süre düşüş gözlenmiştir (Cowan, 1999).

Mikroorganizmalara karşı modern kemoterapinin ilk kullanımı, 1930'lu yıllarda sülfonamidlerin, 1940 larda penisilinlerin ve 1940'ların ortalarında streptomisinin keşfi ile başlamıştır. Penisilin direnci ilk olarak 1940'ların ortalarında saptanmıştır

(Cohen ve Tartasky, 1997). 1950 yılında penisilin, tetrasiklin, streptomisin ve eritromisine dirençli, hastane kaynaklı *Staphylococcus aureus* salgını olmuştur. Aynı yıllarda *Klebsiella*, *Proteus* ve *Pseudomonas* türleri gibi bazı antibiyotiklere dirençli Gram- negatif organizmaların etken olduğu infeksiyonlara rastlanmıştır. 1960'larda penisilinaza dayanıklı penisilinlerin kullanıma girmesiyle *Staphylococcus aureus* infeksiyonları sorunu büyük oranda çözümlenmiştir. Sonraki yıllarda hastane infeksiyonları etkenleri arasında Gram negatif bakteriler de önem kazanmıştır. 1970 yılların sonlarında gonokokların çoğu penisiline dirençli hale gelmişlerdir. Bu dönemde dikkati çeken olgu çoğu antibiyotiğe ve diğer ajanlara dayanıklı *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının salgın olmasıdır (Vandenbroucke, 1993).

Yeni antibiyotikler ilk keşfedildikleri anda her ne kadar etkileri güçlü olsa da bir süre sonra bakteriler bu antibiyotiğin bakterisidal etkisine karşı direnç geliştirirler. İlaç varlığında yaşayabilen bu bakteriler gen mutasyonları veya direnç genleri geliştirebilecek özelliktedir. Dirençli bakteriler konjugasyon yoluyla yeni kazandıkları direnç genlerini diğer bakterilere de aktarabilirler. Bulaştırıcı ve öldürücü özelliklerinden dolayı bu antibiyotik dirençli organizmalar süper bakteriler olarak adlandırılırlar (Rybak, 2004). Bununla birlikte bilim insanları direnç geliştiren bakterilere karşı koyabilmek için alternatif antibiyotik ajan üretme çalışmalarını hızlı bir şekilde sürdürmektedir. Bu aşamada tıbbi bitkiler içerdikleri tanen, terpenoid, alkaloid, flavonoid gibi sekonder metabolitlerden dolayı ilgi odağı haline gelmişlerdir. *In vitro* koşullarda yapılmış pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin ve bu özütlerden saflaştırılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Sibanda ve Okoh, 2007).

Genel olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı patojen bir bakterinin direnç geliştirmesi nedeniyle enfeksiyonlara karşı savaşta, direnç problemini yenmede ve bugün mevcut antimikrobiyal ajanların meydana getirdiği yan etkilerden dolayı, yeni antimikrobiyal ajanların bulunması için çalışmaların yapılması zorunludur (Shtayeh vd., 1998).

Fitoterapide saflaştırılmış aktif bileşenler yerine bitkinin tamamının kullanılması, geleneksel tıpta farklı etken maddeleri içeren ilaçların aynı anda uygulanması, ilaç

etkileşmeleri ve yan etkileri nedeniyle farklılık göstermektedir. Fitoterapide bitkinin tamamının kullanılmasıyla içerdiği farklı bileşenlerin sinerjik etki göstermesine veya toksisitesinin tamponlanarak azalmasına neden olur (Poppenga, 2002).

Sentetik olarak üretilen ilaçlar bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesiyle yapılır ve bu nedenle hastalık etmeni mikroorganizmalar bu sade yapıya karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebilirler. Fakat bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle kompleks bir yapı oluşturduklarından hastalık etmenlerinin bu yapılara karşı dayanıklı hale gelmeleri daha zor olmaktadır. Çoğu zaman bitkisel kökenli ilaçların patojenlere karşı etkinliği az fakat kullanılma süresi daha uzun olmaktadır (Özer vd., 2001). Bu nedenle 1981-2002 yılları arasında yeni tanımlanmış tedavide kullanılma potansiyelleri olan kimyasal yapıların % 28'i doğal ürün veya türevidir. Kalanın % 20'lik kısmı da sentetik ürünlerdir. 2001-2002 yılları arasında dünyada satılan ilaçların % 25'i doğal ürün veya sentetiğidir (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Son yıllarda bitkisel ilaçların kullanımının artmasıyla fitoterapiye ilgi de artmıştır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaktadır. Dünya marketlerinde bu tip ilaç pazarının 60 milyon dolara, yıllık büyüme hızının % 5-15 düzeyine ulaştığı bildirilmektedir. ABD'de son 50 yılda halkın bitkisel ilaçlara ilgisi % 34-42 oranında artmıştır (Roy-Byrne vd., 2005). Bitkilerdeki antimikrobiyal bileşenler, kullanılan mevcut antimikrobiallardan farklı mekanizmalarla bakteriyel gelişimi inhibe edebilmekte ve bu sayede dirençli mikrobiyal suşların tedavisinde önemli oranda klinik sonuçlar elde edilebilmektedir (Eloff, 1988).

1.2.1. Bitki özütlerinin antimikrobiyal etkileri

Scrophulariaceae familyasına ait Hatay endemiği *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze.den elde edilen 5 farklı özütünün antimikrobiyal aktivitesinin belirlendiği çalışmada disk difüzyon yöntemi kullanılarak sekiz adet gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Listeria*

monocytogenes ATCC 7644, *Enterococcus gallinarium* CDCNJ-4, *Enterococcus faecium* NJ-1 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), altı adet gram negatif bakteri (*Escherichia coli* O157 H:7, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* NCTC 8394 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247) ve bir adet fungus (*Candida albicans* ATCC 10231) üzerinde test edilmiştir. Non-polar özütlerden hekzan, diklorometan ve metanol/kloroform özütlerinin, polar metanol/su özütünün ve direkt metanol özütünün toplam olarak üç adet gram pozitif, iki adet gram negatif ve maya suşları üzerinde çeşitli düzeylerde antimikrobiyal etkileri gözlenmiştir. Buna göre *V. pinetorum* bitkisinden elde edilen özütlerin genel olarak bazı patojen mikroorganizmaların üremesini engellediği belirlenmiştir (Esen, 2008).

Yenilebilir bir bitki olan *Zingiber officinalis* ' in etil alkol ve kloroform özütlerinin 8 mikroorganizma üzerinde disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmada zencefil özütünün mikroorganizmaların 5'inde üremeyi inhibe ettiğini ancak *Escherichia coli* ATCC11230, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Nalbantsoy vd., 2008).

Tıbbi ve ticari amaçlı kullanılan *Pimpinella anisum* (L.) (tohum), *Coriandrum sativum* (L.) (tohum), *Glycyrrhiza glabra* (L.) (kök), *Cinnamomum cassia* Blume (kabuk) ve *Juniperus oxycedrus* (L.) (tohum)'un alkol, etil asetat, aseton ve kloroform özütlerinin antimikrobiyal etkileri in vitro olarak *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus cereus* EU, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC10, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Listeria monocytogenes* SCOTT A, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Mycobacterium smegmatus* RUT, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Yersinia enterocolitica* O:3 P 41797 'ya karşı agar difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre *Coriandrum sativum* tohumu adı geçen bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturmazken diğer bitkilerin farklı solventlere göre hazırlanan özütlerinin mikroorganizmalara karşı inhibisyon etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Ateş ve Erdoğan, 2003).

Kahramanmaraş ve Hatay yöresinden toplanan *Parmelia furfuracea* (L.) Zopf., *Crocus chrysanthus* (Herbert) Herbert, *Rumex scutatus*, *Myrtus communis* L. subsp. *communis* Ic: Sibth. & Sm., *Asphodelus aestivus* L., *Eugenia caryophyllata* Thunb. Kloroformla hazırlanan bitki özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkisi disk difüzyon metoduna göre *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus brevis* FMC 3, *Escherichia coli* DM, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Listeria monocytogenes* SCOTT A, bakterileri ve *Candida albicans* CCM 314, *Saccharomyces cerevisiae* WET 136 mayaları üzerinde denenmiştir. *Parmelia furfuracea* (L.) Zopf. , *Myrtus communis* L. subsp. *communis* Ic: Sibth. Ve Sm., *Eugenia caryophyllata* Thunb. Test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellediği araştırmacılarca tespit edilmiştir (İlçim vd., 1998).

Türkiye florasında bulunan 35 tıbbi bitkinin farklı kısımlarından farklı solventlerle hazırlanan 76 ham özüt ve bu test bitkilerin fraksiyonları *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans* üzerinde in vitro olarak antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Yapılan bu deneyde 8 bitki türünden elde edilen 16 özütün test edilen mikroorganizmaların en az birinde olmak üzere çeşitli derecelerde inhibisyon etki gösterdikleri, diğer özütlerin test mikroorganizmalarına karşı etkili olmadıkları belirtilmiştir (Sökmen vd., 1999).

İki farklı *Lathyrus* türünün (*Lathyrus ratan*; ticari varyete ve *L. aphaca*; yabani varyete) tohumlarının butanolik özütlerinin in vitro antibakteriyal aktivitelerinin test edildiği çalışmada patojen mikroorganizmalara karşı antibakteriyal aktivite disk difüzyon yöntemi ile zon çapları ölçülerek yapılmıştır. Maksimum inhibisyon çapı *L. ratan* türünde gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* da gözlenmiştir. *L. aphaca* *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde aktiflik göstermemiştir. *L. ratan* ekstresinin *L. aphaca*'dan daha aktif olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık *Bacillus subtilis* her 2 tohum ekstresinden de en az etkilenen bakteri olduğu tespit edilmiştir (Khan vd., 2009).

Valsaraj vd. (1997), Hindistan'da geleneksel olarak kullanılan 78 bitki türünün etanol özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerini agar dilüsyon metodunu kullanarak incelemişler ve ekstrelerin *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Rajbhandari ve Schöpke (1999) yaptıkları çalışmada, 13 Nepal tıbbi bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini incelemişler, büyük çoğunluğunun Gram pozitif bakteriler (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*) üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, çok az bir kısmının Gram negatif (*P. mirabilis*, *S. marcescens* ve *E. coli*) bakteriler ve bir maya türü (*C. maltosa*) üzerinde zayıf bir aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Kabouche vd. (2005) yaptıkları çalışmada, *Salvia jaminiana* bitkisinin aseton ekstrelerinden elde ettikleri bileşikleri antimikrobiyal yönden incelemişler ve test mikroorganizmalar (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. α-hemolitic*) üzerinde dikkate değer ölçüde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır.

Sudhakar vd. (2006), *Euphorbia hirta*, *Caesalpinia pulcherrima* ve *Asystasia gangeticum* bitkilerinin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirdiği bir çalışmada, bu bitkilerin etanol özütlerinin tümünün test mikroorganizmaları (*E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *S. aureus*, *S. fecalis*, *C. albicans*, *A. niger*, *R. oligosporus*) üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Vitex agnus-castus L. (Hayıt)'un antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, bitkiden hazırlanan etil asetat, aseton, kloroform ve etanol özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon metoduna göre bazı Gram pozitif bakteriler (*Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus luteus*, *M. flavus*, *M. roseus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, ve *Corynebacterium glutamicum*, *C. xerosis*), bazı Gram negatif bakteriler (*Aeromonas hydrophila*, *P. vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes feacalis*, *A. eutrophus*, *S. parathyphi*, *S. thyphi*, *S. thyphimurium*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Citrobacter freundii*, *Bordatella bronchiseptica*, *Erwinia amylovora*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. extorquens*, *P. putida* ve *Xanthomonas campestris*), asit-faz özellik gösteren *Mycobacterium smegmatis* ve bazı maya kültürleri (*Kluyveromyces fragilis*, *C. albicans*, *C. utilis*, *Hansenula sp.*, *Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.* ve *Torula sp.*) üzerinde denenmiştir. Bulgulara göre *Vitex agnus-castus* L. özütlerinin, araştırmada kullanılan Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermesine rağmen, Gram negatif bakteriler ve maya kültürleri üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır (Dülger vd., 2002).

Finlandiya'dan toplanan *Thymus vulgaris*'in antimikrobiyal etkisi, *E. coli*, *S. aureus*, *Aspergillus niger* ve *C. albicans* üzerinde çalışılmıştır. *T. vulgaris* özütünün *S. aureus* üzerinde zayıf, *E. coli* üzerinde belirgin bir etkisi görülmüştür. Aynı özütün *A. niger* ve *C. albicans* üzerinde herhangi bir etkisi belirlenmemiştir (Rauha vd., 2000).

Yapılan bir çalışmada, Umbelliferae familyasına ait *Angelica archangelica*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Heracleum persicum*, *Petroselinum sativum*, *Pimpinella anisum*'a ait uçucu yağların antimikrobiyal etkileri agar difüzyon tekniği kullanılarak, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ve *S. aureus* bakterilerine karşı denenmiş, bunlardan *C. sativum* uçucu yağı bu bakterilere karşı sırasıyla 10.0, 9.0, 7.3 ve 11.3 mm'lik inhibisyon zonları oluşturarak etki göstermiştir. *F. vulgare* bitkisine ait uçucu yağın ise 10.3 mm inhibisyon zonuyla *S. aureus* karşı etki gösterdiği, *B. cereus*'a karşı ise göstermediği bildirilmiştir (İşcan vd., 2004).

1.2.2. Bitki özütlerinin antitümör etkileri

Çeşitli Tunus zeytin varyetelerinden elde edilen zeytin yapraklarının %70'lik etanolik özütlerinin antikanser aktivitesi HL-60 hücre hattında araştırılmıştır. Elde edilen özütün 48 saat inkübasyon süresi sonunda kanser hücrelerinin çoğalmasını doza bağlı olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (Abaza vd., 2007).

Güney Afrika'ya endemik olan ve çeşitli hastalıklarda tıbbi bitki olarak kullanılan *Sutherlandia frutescens* bitkisinin %70'lik etanolle hazırlanan özütlerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri zaman (24sa, 36sa, 48sa ve 72sa) ve doz bağımlı (0.5 mg/ml-2.5 mg/ml) araştırılmıştır. Bu çalışmada bitki özütlerinin kültür ortamındaki kanser hücrelerinde sitotoksik etkisinin olduğu belirtilmiştir (Stander vd., 2007).

Çin'de geleneksel tedavide kullanılan *Buplerum scrozonrifolium*'un akciğer kanserinde hücre çoğalmasına karşı aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda bu bitkiden elde edilen aseton özütünün insan akciğer kanseri hücrelerinde, hücre çoğalmasını inhibe ederek apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir (Cheng vd., 2005).

Bangladeş'de halk arasında ilaç olarak kullanılan bitkilerin antikanser potansiyellerinin araştırıldığı çalışmada, 11 bitki incelenmiştir. Bu 11 bitkiden 3'ünün (*Oroxylum indicum*, *Moringa oleifera* ve *Aegles marmelos*) antikanser bileşiklerinin kaynağı olabileceği rapor edilmiştir (Costo-Lotufu vd., 2005).

Scrophularia ningpoensis Hemsl. türünün köklerinden elde edilen oleanonik asit ve ursolonik asitin, MCF7 (meme kanseri), K562 (lösemi) ve A549 (akciğer kanseri) gibi insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik olduğu bulunmuştur (Nguyen vd., 2005).

Stevia rebaudiana yapraklarının aseton özütü HEp2 (insan hepatoma) hücre hattına sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi) hücre hattına toksik olmadığı bununla birlikte HEp2 hücrelerine antikanser özellik gösterdiği ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Jayaraman vd., 2008).

Bir diğer çalışmada *Pfaffia paniculata*'nın bütanolik özütü ile 48 saat farklı dozlarda muamele edilen MCF-7 (meme kanseri) hücreleri üzerinde büyüme baskılayıcı etki gösterdiği ve inhibitör özelliğın en etkili olduğu doz belirtilmiştir (Nagamine vd., 2009)

Halk arasında tedavi amaçlı da kullanılan *Argemone mexicana*'nın etanolik özütü insan akciğer (A-549), larinks karsinoma (Hep-2) kolon (502713 HT-29) ve nöroblastoma (IMR-32) hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmış ve maksimum aktiviteyi kolon kanseri hücrelerinde gösterdiği belirtilmiştir (Verma vd., 2010).

Tanzanya geleneksel tıbbında kullanılan 9'u kanser; 38 'i diğer başka hastalıklara karşı olmak üzere 47 bitkinin HeLa, HT29 (servikal kanser), A431 cilt kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada kansere karşı kullanılan 9 bitkiden 2'sinin; diğer 38 bitkiden ise 14'ünün sitotoksik etki gösterdiği A431 hücre hattının diğer hücre hatlarına göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Kamuhabwa vd., 2000).

Tayland geleneksel tedavide kullanılan 14 bitkinin %50'lik etanol özütü insan malignant hepatoma hücre hattı (HepG2) üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada özütlerden *Polyalthia evecta* ve *Erythroxylum cuneatum*' un potansiyel antikanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Prayong vd., 2008).

Yenilebilir bir bitki olan *Zingiber officinalis*' in etil alkol ve kloroform özütlerinin HeLa (servikal kanser) ve (L929) fare fibroblast hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. MTT sonuçları her iki özütün de kanser hücrelerine karşı doza bağımlı olarak etkili olduğunu göstermiştir (Nalbantsoy vd., 2008).

Brezilya savanlarında yetişen 50 bitki türünün çeşitli solventlerle hazırlanmış 412 özütü HCT-8 (insan kolon karsinom), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (beyin) tümör hücre hatlarına sitotoksik etkileri araştırılmış ve 28 özütün bir ya da daha fazla hücre hattında en az % 85 oranında olmak üzere hücre çoğalmasını inhibe edici özelliklerinin olduğu rapor edilmiştir (De Mesquita vd., 2009).

Arjantin geleneksel tıbbında kanser ve ilişkili hastalıklarda kullanılan 8 bitkinin (*Achyrocline satureioides*, *Aristolochia macroura*, *Celtis spinosa*, *Chenopodium ambrosioides*, *Lithraea molleoides*, *Petieria alliacea*, *Plantago major* ve *Schinus molle*) metanolik özütlerinin HepG-2 (insan malignant hepatoma) hücre hattı

üzerinde sitoksik etkileri araştırılmış ve *A. saturoioides*, *A. macroura*, *L. molleoides* ve *S. molle* bitkilerinden hazırlanan metanolik özütlerin artan doza bağlı olarak en iyi aktiviteyi gösterdikleri bulunmuştur (Ruffa, 2005).

Scutellaria lindbergii' nin total metanolik özütünün farklı konsantrasyonlarının ve fraksiyonlarının AGS (insan gastrik adenokarsinom), HeLa (insan serviks karsinom), MCF-7 (insan göğüs kanser hücre hattı), ve PC12 (sıçan pheochromocytoma hücre hattı) üzerinde sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve en etkili fraksiyonu belirtilmiştir (Tayarani-Najaran vd., 2010).

1.2.3. *Lathyrus* cinsi genel bilgi

Lathyrus L. cinsi *Leguminosae* (*Fabaceae*) familyasının *Papilionoidae* alt familyası ve *Vicieae* tribusundan olup yeryüzünde yaklaşık 200 tür ile temsil edilmektedir. *Lathyrus* cinsi yeryüzünde 13 seksiyon yaklaşık 300 tür (Kupica, 1983) Türkiye Florası'nda 10 seksiyonda toplanmış tür, alttür, varyete seviyesinde 20'si endemik yaklaşık 75 takson içermektedir. *Lathyrus* cinsinin Türkiye'deki endemizm oranı yaklaşık % 30'dur. Tez çalışması kapsamında kullanılan bitkiler *Lathyrus* cinsinin *Platystylis* (Sweet) Bassler. seksiyonunda yer alan taksonlarıdır. *Platystylis* 16 takson ile temsil edilir, 10 takson endemiktir ve endemizm oranı % 62.5'tir ve genellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da yayılış gösterir (Davis, 1970, 1988; Güner vd., 2000).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan endemik bitkiler Yrd. Doç. Dr. Fatma GÜNEŞ (Kafkas Üniversitesi) tarafından sağlanmıştır. Diğer bitkiler ise Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüsü'nden toplanmıştır. Tez kapsamında kullanılan endemik bitkiler Çizelge 2.1.' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan endemik bitkiler

Bitki Adı	Toplanma Lokasyonu	Toplanma Tarihi
<i>L. brachypterus</i> Cel.	Aksaray-Hasan Dağı	09.07.2008
<i>L. haussknechtii</i> Cel.	Van-Piriesit Dağı	12.06.2008
<i>L. karsianus</i> P.H.Davis	Kars-Sarıkamış İsnos Çayırı	07.08.2007
<i>L. satdaghensis</i> P.H.Davis	Hakkari-Yüksekova Dağlıca Yolu	07.06.2008
<i>L. nivalis</i> Hand.-Mazz	Tunceli-Ovacık-Munzur Dağı	11.07.2009
<i>L. armenus</i> (Boiss. & Huet Sirj.)	Sivas-Cumhuriyet Üniversitesi Kampüsü	18.07.2009
<i>L. tukhtensis</i> Czecz	Gümüşhane-Karaca Mağarası Girişi	15.07.2009
<i>L. elongatus</i> (Bornm) Sirj.	Mersin-Gülek Köyü	30.04.2008
<i>L. cilicicus</i> Hayek & Siehe	Karaman-Karaman-Ermenek Yolu Kenarı	10.06.2009

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medyum (L-Glutaminli) (Biochrom, Germany), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom, Germany), Penisilin / Streptomisin (Biochrom, Germany), Tripsin (Biochrom, Germany), Tripkan Mavisi (Sigma, Germany), Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Applichem, USA), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Applichem, USA), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, Germany), Etil Alkol (Merck, Germany), Nutrient Broth (Merck, Germany), Mueller Hinton Agar (Merck, Germany).

2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

Ekim kapları (25-75-175cm² Flask), 96-kuyucuklu mikrolaka, 5-10 ml'lik tek kullanımlık pipetler ve pipet aid, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50' ml hacminde), Eppendorf, steril filtreler, Hemositometre (Thoma Lamı) (Sigma, Germany), Antibiyotik diskleri (Vankomisin, Gentamisin) (Bioanalyse), Whatman No. 4 filtre kağıdı, Test diski (6mm), Mikropipet.

2.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Sitotoksik aktivite tayini için kullanılan; K-562 (KML), DU-145 (prostat kanseri), PC-3 (prostat kanseri), A-549 (akciğer kanseri), CCC-221 (kolon kanseri), MCF-7 (göğüs kanseri) ve BEAS 2B (sağlıklı epitel hücresi) hücre hatları Doç. Dr. Yusuf BARAN' dan (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) temin edilmiştir.

2.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktivite tayini için kullanılan; *Escherichia coli* ATCC 11230, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538/P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NRRLB-4375 ve *Streptomyces*

albus CIP104432 suşları, Doç.Dr. Nurettin ŞAHİN' den (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Fakültesi) temin edilmiştir.

2.4. Bitki Ekstraksiyonu

Araştırmada kullanılan bitki örneklerinin yaprakları küçük parçalar haline getirildikten sonra 10'ar gram tartılarak Soxhlet cihazına yerleştirilmiş ve 150 ml % 96'lık etanolle 10 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Whatman no.1 ile filtrasyondan sonra Rotary evaporatörde çözücü uzaklaştırılmıştır. Ekstreler, hassas terazide ağırlıkları belirlenen ve numaralandırılan ependorf tüplere alınarak çeker ocakta çözücünün tamamen uçması sağlanmış ve ekstrelerin kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılmak üzere alüminyum folyolara sarılarak +4°C'ye kaldırılmışlardır.

2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde çoğunlukla kullanılan metodlar disk difüzyon, agar difüzyon ve broth dilüsyon testleridir. Difüzyon metodlarında disk çevresinde bakteri veya küf üremesininin olmadığı bölge inhibisyon zonu olarak adlandırılır. İnkübasyon sonrasında disk çapıda dahil olmak üzere zon çapı ölçülerek mm cinsinden sonuçlar verilir. Bu çalışmada antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Bunun için stok kültürlerin Mueller Hinton Agara (MHA) ekimleri yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tek düşmüş koloniler seçilerek Nutrient Broth'a inoküle edilip 37°C'de 2-6 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Spektrofotometrik olarak 600 nm'de 0,08-0,1 absorbans değerlerine denk gelen 0.5 Mc Farland standart bulanıklığına ulaşmış bakterilerin bu standarda göre hazırlanmasında %0,9 NaCl çözeltisi kullanılmıştır. 0.5 Mc Farland standart bulanıklığına ulaşan (yaklaşık 1×10^8 cfu/ml) taze bakteri kültürlerinden 100 µl alınarak dökme plak yöntemi için önceden erlenmayerde sterilize edilen ve 45°-50°C'ye kadar soğutulan 15 ml MHA besiyeri ile karıştırılmış ve steril petri kaplara dökülerek 10 dk katılaşması için bekletilmiştir.

Disk difüzyon metoduyla antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde dökme plak yöntemi kullanılmıştır. 1×10^8 CFU/ml yoğunluğuna denk gelen bakteri solüsyonundan 100 µl alınarak önceden erlenmayerde sterilize edilen ve 45-50°C' ye kadar soğutulan 15 ml MHA besiyeri ile karıştırılarak steril petri plakalarda oda sıcaklığında 10 dakika katılaşması için bekletilmiştir (Çoban vd., 1987; Wayne, 1997; Kiska, 1998; Hammer vd., 1999).

Bitki ekstraları etanol içinde 200 mg/ml olacak şekilde çözündürülüp 6 mm çapındaki steril diskler 20 µl emdirilmiştir. Ayrıca çözücünün tek başına etkisinin gözlenebilmesi için 20 µl etanol emdirilmiş diskler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak da vankomisin (30 µg) ve gentamisin (10 µg) diskleri ilave edilmiştir. Katılaştıran besiyeri üzerine kontrol diskleri ve ekstre emdirilmiş diskler yerleştirilerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında oluşan zon çapları milimetrik olarak ölçüldü. Tüm test mikroorganizmalarına karşı denenen bitki ekstraları ile yapılan antimikrobiyal aktivite deneyleri 3'er tekrarlı olarak yapıldı.

2.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü yöntemi, hayvan ya da bitkilerin ergin veya embriyonik dokularından izole edilen hücre, doku veya organların gerçek ortamlarına benzer biçimde hazırlanmış steril besiyerlerinde bir süre yaşatılmalarıdır. Bunun için hücre ve dokular, büyüme faktörleri, hormonlar ve serum içeriklerinin ilave edildiği, kimyasal olarak belirlenmiş sentetik bir ortamda üretilirler. Hücre kültürü yöntemi hücre biyolojisinde sıkça kullanılan yaygın bir yöntem olup özellikle kanser araştırmalarında kanser hücrelerinin biyolojisinin öğrenilmesinde kullanılan yararlı bir model oluşturmaktadır. Hücre kültürü yönteminde etkiler doğrudan hücreye olduğundan sonuç kısa sürede alınabilir, hayvan deneyleriyle çalışılan hücrelerin kat kat fazlası hücre kullanıldığından çok sayıda hayvanın deney amacıyla öldürülmesi önlenir. Hücre kültürü yöntemleri hayvan modellerinin kullanıldığı testlere göre bu avantajları taşıdığı için dünyada yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu sebepten dolayı

hücre kültürü kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyoloji çalışmalarında, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku ve deri mühendisliği, kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde, farmasötik proteinlerin üretiminde, kozmetikte sıklıkla kullanılmaktadır (Gad, 2000; Putnam, 2002).

Bu çalışmada, 6 farklı kanser hücre hattı ve bir normal hücre hattı kullanılmıştır: MCF-7 (meme kanseri), PC-3 (prostat kanseri), DU145 (prostat kanseri), K562 (KML), A549 (akciğer kanseri), CCC-221 (kolon kanseri) ve BEAS 2B (akciğer epitelyum hücreleri).

Hücreler için besi ortamı olarak *Roswell Park Memorial Institue* (RPMI)-1640 kullanıldı. RPMI-1640 besi ortamına % 10 Fetal Calf Serum (FCS) ve penisilin-streptomisin (100 u/ml-100 µg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. Çalışmada belirtilen hücre kültürleri gereksinimlerine göre 25, 75 ve 150 cm²'lik flasklarda üretildi. Hücre kültürleri çalışma boyunca her gün besiyerinin rengi (pH için özellikle önemli olduğundan), konfluent dereceleri, kontaminasyon olup olmadığı ve hücrelerin morfolojik görünümleri ışık mikroskobu ile kontrol edildi. Hücre ekimi için laminar kabinin ultraviyole ışığı her çalışmadan önce ve sonra 30 dk açık bırakıldı, her kullanım öncesi ve sonrası çalışma ortamı % 70'lik etanol ile steril edildi. Kabine alınan sarf malzemelerin üzeri de % 70'lik etanol ile temizlenmiştir.

Hücre hatları % 10 FBS ve penisilin-streptomisin (100 u/ml-100 µg/ml) içeren RPMI-1640 besi yerinde 37°C'de CO₂ inkübatöründe (%5 CO₂, % 95 hava ve nem) kültüre edilmişlerdir. Hücre besiyerleri fosfat tampon solusyonu (PBS) ve MTT ayıracı 2-8°C'de; FCS, L-glutamin, antibiyotik solusyonları -20°C'de; hemen kullanılacak hücre stokları -80°C'de saklanmıştır.

K562 hücre hattı dışındaki hücrelerin hepsi yüzeye tutunarak çoğalan hücreler (adherent) olduğundan tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. Bu işlem için, çoğaldıkları flasklardaki besi ortamı dökülerek uzaklaştırıldı, besi ortamındaki serumun tripsini inaktive etmemesi için PBS ile flasklar yıkandı, tripsin eklenerek CO₂ inkübatöründe 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin yüzeyden

kalktığı mikroskobik olarak gözlemlendikten sonra 37°C’de yarım saat bekletilen RPMI-1640 medyumundan flaslara eklendi ve pipetle homojen dağılım sağlanarak 15 ml’lik falkon tüplere alınan kültür 800 rpm’de 6 dk oda sıcaklığında santrifüjlenip süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet PBS ile yıkandı ve 800 rpm’de 6 dk o da sıcaklığında tekrar santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet RPMI-1640 medyumunda çözündürüldü. Bu kültürden hücre sayımı için ependorf tüplere 100 µl alındı.

Hücre sayımı hemositometre adı veri verilen özel bir sayım lamında yapılmıştır. Canlı ve ölü hücre sayımı için kullanılmıştır. Ölü hücreler boyayı içlerine alacaklarında mavi renkte, canlı hücreler ise şeffaf renkte olmaktadır. Hücre sayımı için ependorf tüpüne alınan 100 µl hücre kültürü 100 µl Tripan mavisini ile karıştırılarak hemositometrede canlı hücre sayımları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

Toplam Hücre Sayısı/ml= 25 karede sayılan hücre sayısı×10⁴×dilüsyon faktörü

Buna göre MTT deneyi için mikrolakalara her bir kuyucuk için inoküle edilen 2×10⁴ hücre/ml ve 25 cm²’lik flaslara ekilen 1×10⁵ hücre/ml konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.7. MTT Testi

Kolorimetrik metot olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst- Hansen ve Brünner, 1998). Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bu testte tetrazolium tuzu canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaza bağlı bir reaksiyonla mavi-mor renkli, suda çözünmeyen ürün olan formazana indirgenir. Formazan hücre zarını geçemediğinden hücre içinde toplanır. Süksinat dehidrogenaz krebs döngüsü enzimlerinden olup mitokondriyal matrikste bulunur. Bir tetrazolyum

tuzu olan sarı renkli MTT süksinat dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşur. DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerin ilavesiyle kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbands verir. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazanın miktarının verdiği absorbandsa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve metabolik aktivitesinin tanımlanmasını sağlar. Bu da hücre canlılığının ölçüsü olarak alınır. Spektrofotometrik olarak ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. (Vijayan vd., 2003; Butler, 2004). Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir test olup günümüzde bir çok literatürde referans gösterilmektedir. (Fotakis ve Timbrell, 2006).

2.7.1. Hücre çoğalmasının MTT ile belirlenmesi

Bitki özütlerinin hücre çoğalması üzerine etkisi MTT deneyi ile belirlendi. Hücre hatları % 85-90 flask yüzeyini kaplayıncaya kadar büyütüldü. Tripsinizasyondan sonra, hücreler 96-kuyucuklu mikro plakalara 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde duplike olacak şekilde 200 µl ekildi. Hücreler 37°C 1 gün %5 CO₂, % 95 hava ve nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

Bitki ekstraları son konsantrasyonu 0.125, 0.25, 0.5, 2, 4 ve 8 mg/ml olacak şekilde her bir hücre hattı için belirlenen kuyucuklara 5'er µl eklenmiştir. Ekstre ile muamele edilmeyen her bir hücre hattına da kontrol grupları olan kolşisin (5µg/ml) lektin (0,2µg/ml) ve %1 DMSO 5'er µl eklendi. 72 saat CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl taze medyum ve 10 µl MTT (5 mg/ml) eklenerek 4 saat CO₂ inkübatörde mikropalakalar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara 100'er µl DMSO eklendi ve orbital çalkalayıcıda 100 rpm'de 10 dakika çalkalanması sağlanarak mikropalakalardaki hücrelerin optik değerleri mikropalaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutuldu. Bu deneyin her aşaması gerek bitki özütlerinin gerekse MTT

boyasının ışıktan etkilenmemesi için direkt ışıktan kaçınıldı (Mosmann, 1983; Zhang vd., 2004).

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. Endemik *Lathyrus* L. Özütünün Antimikrobiyal Aktivitesi

Bu çalışmada *Lathyrus* cinsine ait 9 endemik bitkinin yaprakları % 96'lık etanolle soxhlet cihazında özütlendi. Elde edilen bu özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle 6 farklı bakteri türü üzerinde araştırıldı. Bu yöntemde 6 mm çapa sahip diskler kullanıldı ve inkübasyon süresi sonunda zon çaplarına bu disk çapları dahil olarak ölçüldü. Antimikrobiyal analizde test mikroorganizmaları için pozitif kontrol olarak ticari antibiyotiklerden vankomisin kullanılırken sadece *Pseudomonas aeruginosa* için gentamisin kullanıldı. Negatif kontrol olarak da bitkilerin ekstraksiyonunda kullanılan % 96'lık etil alkol emdirilmiş diskler kullanıldı. Disklere 200 mg/ml konsantrasyonunda çözdürülen ekstrelerden 20'şer µl emdirilerek son konsantrasyon 4mg/ml olacak şekilde deney 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Çizelge 3.1. Disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları

	<i>E. coli</i>	<i>S. albus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. brachypterus</i>	-	9	13	-	-	9
<i>L. haussknechtii</i>	-	8	10	-	8	9
<i>L. karsianus</i>	-	12	9	-	-	10
<i>L. satdaghensis</i>	9	8	9	-	10	9
<i>L. nivalis</i>	8	8	9	8	10	11
<i>L. armenus</i>	8	9	10	9	8	9
<i>L. tukhtensis</i>	8	8	-	8	10	9
<i>L. elongatus</i>	9	-	10	9	9	8

Çizelge 3.1. (devamı)

	<i>E. coli</i>	<i>S. albus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. cilicicus</i>	11	13	10	13	10	8
ANTİBİYOTİK	13	21	31	25	31	19
ETANOL	-	8	9	8	-	9

*(-) İnhibisyon zonu yok.

Rakamlar inhibisyon zon çaplarını göstermekte olup her bir disk 6 mm çapındadır. Veriler bir deneydeki 3 tekrarın ortalamasıdır. Tekrarlar arasındaki fark % 3' ten az olarak bulunmuştur. *P. aeruginosa* için gentamisin (10 µg), diğer mikroorganizmalar için vankomisin (30 µg) kullanılmıştır.

Elde edilen verilere göre, etil alkolün test mikroorganizmalarına karşı etkisinin disk çapı hariç 2-3 mm olduğu gözlenirken *E. coli* ve *B. subtilis*'e karşı ise etkili olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.). Etil alkol gibi organik solventlerin mikroorganizmalar üzerine etkisinin düşük olması uçuculuklarına bağlanmaktadır (Ahmed ve Beg 2001).

L. brachypterus özütünün *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *B. subtilis* mikroorganizmalarına karşı etkili olmadığı gözlenmiştir. *S. albus* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı ise 9 mm çapında çok az etki gösterdiği fakat bu etkinin de etanolden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Buna karşın, bu bitki özütü en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 13 mm zon çapıyla *M. luteus* üzerinde göstermiştir. *L. haussknechtii* en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *M. luteus* mikroorganizmasına karşı 10 mm'lik zon çapıyla gösterirken, negatif kontrol olarak kullanılan etanolün 9 mm' lik zon çapı göz önüne alındığında tek başına özütün etkisinin yok denebilecek kadar az olduğu sonucuna varılmıştır. *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin ise özüte karşı direnç gösterdiği ve bu özütün sözü edilen mikroorganizmalar üzerinde etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. *L. karsianus* özütü antimikrobiyal etkisinin büyükten küçüğe doğru *S. albus*, *S. aureus* ve *M. luteus* mikroorganizmalarına karşı olduğu gözlemlenirken, *M. luteus* ve *S. aureus* bakterilerine karşı olan etkinin etanolden kaynaklandığı, etanolün tek başına verdiği zon çapıyla kıyaslanarak bulunmuştur. *S. albus* üzerindeki

antimikrobiyal etkisi ise etanolün etkisi çıkarıldığında 4 mm olduğu tespit edilmiştir. *L. satdaghensis* özütünün *M. luteus*, *S. albus* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı etanolün zon çapıyla eşit derecede antimikrobiyal etki gösterdiği ve dolayısıyla bu etkinin de çözücünün etkisinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. *E. coli* ve *B. subtilis* üzerinde etanolün hiçbir etkisi olmazken *L. satdaghensis* özütü tek başına sırasıyla 9 mm ve 10 mm'lik zon çaplarıyla en yüksek antimikrobiyal etkiyi söz konusu mikroorganizmalar üzerinde göstermiştir. *L. nivalis* özütü *S. albus*, *M. luteus* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaları üzerine etanolün etki derecesiyle eşit inhibisyon göstermiştir. *B. subtilis* üzerinde ise tek başına 10 mm'lik inhibisyon zon çapı göstermiş olup bu mikroorganizma üzerinde etanolün etkisinin gözlenmediği göze alınırsa etkinin sadece özütten kaynaklandığı görülmektedir. *L. nivalis* özütü *S. aureus* üzerinde 11 mm ile en yüksek inhibisyon zon çapı oluşturmuştur fakat bu etkinin büyük çoğunluğu etanolden (9 mm) kaynaklanmaktadır. *L. armenus* tek başına test edilen mikroorganizmaların üzerinde dikkate değer inhibisyon etki göstermemiştir. Söz konusu özütün mikroorganizmalar üzerinde ölçülen ortalama inhibisyon zon çaplarının en yüksek değerlerinden olan 9-10 mm'lik etki ya etanolle eşit ya da antimikrobiyal etkinin büyük çoğunluğu etanole ait olarak bulunmuştur. Benzer şekilde *L. tukhtensis* özütünün *M. luteus* üzerinde hiçbir inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu özütün *S. albus*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* mikroorganizmaları üzerinde etanolün oluşturduğu inhibisyon zonu kadar zon oluşturduğundan tek başına etkili olmadığı tespit edilmiştir. Etanolün inhibisyon etki göstermediği *E. coli* ve *B. subtilis* mikroorganizmaları üzerinde *L. tukhtensis* özütünün sırasıyla 8 ve 10 mm'lik düşük derecede inhibisyon zon çapı oluşturduğu gözlenmiştir.

Test mikroorganizmalarının hiç birinin *L. elongatus* özütüne duyarlı olmadığı tespit edilmiş olmakla birlikte ölçülen en yüksek değer olan *M. luteus* bakterisi üzerindeki 10 mm'lik zon çapının da etkisinin etanolden (9 mm) kaynaklandığı gözlenmiştir.

L. cilicicus bitkisinden elde edilen özüt ise etanol etkisi ve disk çapı çıkartıldığında tek başına 5'er mm'lik zon çaplarını *S. albus* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaları üzerinde göstermiştir. Etanolün üzerlerinde inhibisyon etki göstermediği *E. coli* ve

B. subtilis mikroorganizmaları üzerinde ise sırasıyla 11 ve 10 mm'lik düşük zon çapı değeri verdiği tespit edilmiştir.

Özet olarak disk difüzyon deneyinde kontrol olarak kullanılan vankomisin ve gentamisin oluşturduğu zon çapları tez kapsamında çalışılan bitkilerin ham özütlerinden çok daha fazladır. Vankomisin ve gentamisin hali hazırda ticari olarak kullanılan antibiyotiklerdir ve ham özütlerden daha fazla zon çapı oluşturmaları doğal bir sonuçtur. Araştırma bulgularında ortaya çıkan sonuca göre Gr (-) bakteriler olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* çalışılan özütlere karşı diğer bakterilere göre daha az duyarlılık göstermişlerdir. Bu sonuç Gr (-) ve Gr (+) bakteriler arasındaki morfolojik farklılıktan ileri gelmektedir. Bu özellik Gram (-) bakterilerin hidrofobik veya amfipatik moleküllere çok az geçirgen olan bir dış membrana sahip olmalarına bağlanabilir (Lawrey, 1989). Bu durum Dülger vd. (2002) yaptığı çalışmada da gözlenmiştir. *E. coli* araştırmada kullanılan 9 özütün 3'üne (*L. brachypterus*, *L. haussknechtii*, *L. karsianus*) karşı direnç göstermiş, bu özütler söz konusu bakteriye karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır. *P. aeruginosa* bakterisi, *E. coli* bakterisine karşı inhibisyon etkisi olmayan aynı bitkilere ek olarak *L. satdaghensis* bitkisinden elde edilen özüte karşı da direnç göstermiştir. *L. cilicicus* bitkisinden elde edilen özüt söz konusu her 2 mikroorganizmaya karşı en yüksek inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerindeki farklılığın içerdikleri etken maddelerin değişkenliği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. (Rabe, 1997; Ali-Shtayeh, 1998). Bu sonuç elde edilen özütte bulunan etken bileşiğin farklı oluşundan ya da miktarının fazla oluşundan kaynaklanabilir. Aynı şekilde bileşimleri ve içerdiği bileşiklerin oranları da, genetik ve çevresel faktörlere, ayrıca analizlerde kullanılan metoda göre değişmektedir (Maffei M, 1989). Tez kapsamında çalışılan bitkilerin hepsi aynı cinse dahil olmalarına rağmen test mikroorganizmalarına karşı düşük düzeyde de olsa antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Bu sonuç farklı türlerin farklı fitokimyasallar içermelerinden dolayı doğal bir sonuç olarak düşünülmektedir (Ateş, 2003). Örneğin Keleş vd. (2001) 'nin yaptığı antimikrobiyal aktivitenin disk difüzyon yöntemiyle araştırıldığı çalışmada farklı lokasyonlardan toplanan *Urtica dioica* bitkisinin etanol özütlerinden biri *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterirken diğer lokasyondan toplanan aynı bitkiden elde

edilen özüt bu bakterilerin hiç birinde antimikrobiyal etki göstermemiştir. Toplanılan yöre ve mevsimsel farklılığın dışında tüm koşullar aynı tutularak yapılan bu çalışmada etki spektrumlarının farklı olması bitkilerin kimyasal içeriklerinin bireysel değişime bağlı olduğu dolayısıyla toprağın yapısı, bitki materyalinin toplanması sırasında günlük ve mevsimsel değişimler, bitkinin fizyolojik gelişim dönemi gibi faktörlerle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir.

Literatürde bu tez çalışmasında kullanılan bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerini kıyaslamak için aynı bitkilerle yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır ancak benzer mikroorganizmalar üzerinde farklı bitki özütlerinin antimikrobiyal etkisini araştıran birçok çalışma vardır. Antimikrobiyal aktivite deneyi disk difüzyon metoduna göre yapılmıştır. Literatürde bu metodla ilgili standart bir yöntem olmadığı, araştırmacıların ekstraksiyon metodundan, bakteri inokulasyonuna; özüt konsantrasyonundan, disklere emdirilen miktara kadar çok çeşitli deneylerin yapıldığı bilinmektedir. Rios ve Recio (2005) bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesinde son 10 yılda gittikçe artan araştırmalara ve yayınlara rağmen henüz standart bir metodun geliştirilemediğini belirtmektedirler. Dolayısıyla, standart metodların geliştirilmesi benzer mikroorganizmalar üzerinde farklı antimikrobiyal bileşenlerin etkisinin daha doğru bir şekilde kıyaslanıp değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Asphodelus aestivus bitkisinin % 96'lık etanol ve n-bütanol ile soxhlet cihazıyla elde edilen özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmada etil alkol özütlerinin etkisinin n-bütanolden çok daha fazla çıktığı bildirilmiştir (Oskay, 2007). Ayrıca aynı bitki ile yapılan bir diğer çalışmada özütün kullanılan test mikroorganizmalarına karşı hiçbir etkisinin olmadığı belirtilirken (Ilçım, 1998) Oskay vd. (2007), yaptığı çalışmada çeşitli mikroorganizmalar üzerinde değişen derecelerde farklılar bulunmuştur. Bu farklılığın ekstraksiyonda kullanılan solventlerin, mikroorganizma suşlarının, ortam şartlarının ve besiyerlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Bitki özütlerinin elde edilmesinde çeşitli araştırmacılar tarafından farklı miktarlar ve çözücüler kullanılmıştır. Literatürde bununla ilgili standart bir prosedür

bulunmamaktadır. Esen (2008), çalışılan bitkinin 20 gramını soxhlet cihazında 250 ml metanol ile 24 saat boyunca özütlerken, Oskay vd. (2007), çalışılan bitkinin 30 gramını 150 ml etanol ile 12 saat soxhlet cihazında ekstrakte etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise çalışılan bitki yapraklarının 10 gramı soxhlet cihazında 10 saat süreyle ekstrakte edildi.

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasalların ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır (Esen, 2008). Al-Dabbas vd. (2006), belirttiği gibi son yıllarda bitkilerin aktif bileşenlerinin tıbbi özellikleri ve biyolojik aktiviteleri araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Antimikrobiyal aktiviteden bu sorumlu fitokimyasallar birkaç gruba ayrılır. Bunlar; fenoller, terpenoidler, esansiyel yağlar, alkaloidler, lektinler, polipeptidler ve poliasetilenlerdir (Cowan, 1999). Bu aktif bileşenlerin eldesinde kullanılan solventler önemlidir çünkü her bileşen her solventle elde edilememektedir. Çizelge 3.2. bu aktif bileşenlerin hangi solventlerle elde edildiğini göstermektedir.

Çizelge 3.2. Aktif bileşen ekstraksiyonunda kullanılan solventler (Cowan, 1999)

Su	Etanol	Metanol	Kloroform	Diklormetanol	Eter	Aseton
Antosiyaninler	Taninler	Antosiyaninler	Terpenoidler	Terpenoidler	Alkaloidler	Flavonlar
Niştasta	Polifenoller	Terpenoidler	Flavonoidler	-	Terpenoidler	-
Taninler	Poliasetilenler	Saponinler	-	-	Kumarinler	-
Saponinler	Flavanol	Taninler	-	-	Yağ asitleri	-
Terpenoidler	Terpenoidler	Zantoksiller	-	-	-	-
Polipeptidler	Steroller	Totarol	-	-	-	-
Lektinler	Alkaloidler	Kuassinoidler	-	-	-	-
-	Propolis	Laktonlar	-	-	-	-
-	-	Flavonlar	-	-	-	-
-	-	Fenonlar	-	-	-	-
-	-	Polinefoller	-	-	-	-

Rios ve Recio (2005), bitkisel özütlerin biyolojik etkilerinin laboratuvar araştırmalarında etanol ve metanolün daha yaygın olarak kullanıldığını belirtmektedirler. Etanol ve metanolün her ikisinden elde edilen ortak bileşenler olmasına rağmen etanol daha büyük sınıfları (alkoloidler gibi) içerdiğinden bizim çalışmamızda tercih edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi uygulamalarında etanolden hazırlanan ekstrelerin diğer çözücülere nazaran daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedir (Benedict, 1972). Etanolün tercih edilmesinin diğer sebepleri de etanolün hücrel membrandan geçişinin daha kolay olduğunun ve bitkisel materyalin hücre içeriğinin daha kolay ekstrakte edilebildiğinin bulunmasındandır (Wang, 2010). Metanol etanolden daha polardır fakat metanolün sitotoksik doğasından dolayı doğru olmayan sonuçlara yol açabildiğinden ekstraksiyon için uygun olmadığı belirtilmektedir (Tiwari vd., 2011).

Tez kapsamında yapılan çalışmada tek bir bileşen yerine bitkinin etanolla elde edilen ham ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Metanol ve etanol ekstreleri saf birçok bileşiği içerdiğinden bu bileşenlerin sinerjik etkisi bileşenlerin tek başına olan etkilerinden farklı olabilmektedir (Wagnor, 1989). Bazı araştırmalarda aynı bitkinin ham ekstresi ile saf bileşenlerinin antimikrobiyal aktivite farklılıklarının değerlendirdiği çalışmalarda ham ekstrenin saf bileşenlerden aynı mikroorganizma üzerinde daha fazla inhibisyon etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bitki yapısında bulunan polar ve non-polar bileşenlerin ham ekstre içerisinde bir arada sinerjistik etki göstererek daha yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Bitki kimyasallarının sinerjistik ve birden fazla farmakolojik etki göstermelerinin gerekçesi olarak da bu kimyasalların bitki savunma sistemindeki yeri işaret edilmektedir. (Briskin, 2000). Ekstraksiyon tipi (soxhlet, maserasyon, dekoksasyon, artan polariteye göre özütleme vb.), ekstrasyon süresi, sıcaklık, solvent tipi ve özelliği, polarite, solvent konsantrasyonundaki farklılıklar özütün sekonder metabolit konsantrasyon ve miktarını etkilemektedir. (Ncube, 2008). Dolayısıyla bu araştırmada kullanılan bitkilerin farklı solventlerle de özüte edilmelidir. Test mikroorganizmalarına karşı kullanılan özütlerin konsantrasyon denemelerinin karşılaştırılmalı olarak yapılması bundan sonraki çalışmalar için aydınlatıcı veriler oluşturacaktır.

Bu çalışmada bitkilerin sadece yaprakları kullanılmıştır. Aynı bitkinin farklı kısımlarından (kök, gövde, çiçek, meyve vb.) elde edilen özütlerden farklı derecelerde antimikrobiyal aktiviteler elde edilebilmektedir. *Asphodelus aestivus* ile yapılan bir çalışmada bitkinin çiçek, meyve ve tüm bitki etanol ekstresi değişen derecelerde test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon göstermiştir. Bitkinin meyve ham özütünün, diğer bitki kısımlarından elde edilen ham özütlerden daha yüksek çıkması antimikrobiyal aktif maddenin meyvede daha yoğun olduğunu düşündürmektedir. Çiçek, meyve, yaprak ve gövdeden elde edilen özütlerde ise antimikrobiyal aktivite düşmektedir (Oskay, 2007). Bitkinin farklı kısımlarından farklı bileşenler elde edildiğinden antimikrobiyal etkisi araştırılan çalışmamızda kullanılan bitkilerin gövde, çiçek gibi organlarının da özütlerinin çıkarılması ile daha ayrıntılı bir araştırma yapılabilir. *Scorzonare mollis* Bieb'in farklı solventlerle hazırlanan özütlerinin antimikrobiyal etkisinin disk difüzyon metoduna göre araştırıldığı çalışmada bitkinin kök ve yapraklarının ayrı ekstreleri hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerden yaprak özütlerinin kök ekstrelerine göre daha etkin olduğu belirtilmektedir. Kullanılan çözümler içerisinde yapraktan elde edilen özütlerde etanol ekstresinin daha etkili olduğu buna karşın kökten elde edilen özütlerde ise aseton ekstresinin etkili olduğu belirtilmektedir (Ertürk vd., 2003). Bu sonuç bitkinin farklı kısımlarında farklı etken maddelerin bulunduğunu ve bu fitokimyasalların en iyi şekilde elde edilmesi için uygun solventin seçilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bakteriyel suşların üreme hızının sabit, bölünmenin hızlı olduğu faz olan logaritmik fazını doğru bir şekilde hedeflemek ve bakteriyel inokulumun başlangıç miktarını belirlemek analizler için önemlidir. Her bakteriyel suş farklı büyüme hızına sahiptir ve bu yüzden logaritmik faza ulaşma zamanları birbirinden farklıdır. Agar bazlı antimikrobiyal test metodlarında inokulumun başlangıç miktarı 1×10^8 bakteri/ml olması gerekmektedir (Kelmanson vd., 2000; Mathabe vd., 2006, Samy vd., 2006). Araştırmamızda bakterilerin istenilen yoğunluğa ulaşma zamanları spektrofotometrik olarak birkaç deneme ile belirlendi. Her mikroorganizmanın büyüme hızı sabit olmadığından bu ön verilerin bilinmesinin deneyin doğruluğu açısından önemlidir. Mc Farland 0.5 standardına göre bakteriyel süspansiyon spektrofotometrik olarak 600 nm'de 0,08-0,1 absorbans değerleri okunarak bakteri yoğunluğunun yaklaşık

olarak 1×10^8 bakteri/ml olduğu sonucuna varılmıştır. Bu araştırmacıların yaptıkları deneylerde bir standart oluşturmaktadır. Agar petri üzerinde bakteriyel dağılım ve bakteri yoğunluğu testlerin hassasiyeti açısından önemlidir çünkü düşük inokulum yoğunluğu yanlış duyarlılık; fazla inokulum yoğunluğu yanlış direnç sonuçları verebilir (Kiska, 1998). Birçok değişkene bağlı olarak yapılan deneylerde araştırmacıların yorum yapması açısından bakteriyel yoğunluğuğun sabit olması doğru bir başlangıç noktası oluşturmaktadır.

Endemik bitkiler genetik olarak izole olmuşlardır ve yeni fitokimyasal bileşikler için de önemli hedefler oluşturmaktadırlar. Ülkemizde doğal olarak yetişen endemik *Lathyrus L.* türleriyle yaptığımız deneyde kullandığımız metodlara göre kayda değer antimikrobiyal aktiviter gözlenememiştir ama daha ayrıntılı araştırmalar içinde potansiyel kaynak oluşturdukları aşıkardır.

Özer vd. (2001), sentetik olarak üretilen ilaçların, bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesi suretiyle yapıldığını ve bu nedenle hastalık etmenlerinin sade bir yapısı bulunan sentetik ilaçlara karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebildiğini belirtmektedirler. Bununla beraber; bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte kompleks bir yapı oluşturduklarından hastalık etmenlerinin bu yapıyı zerek dayanıklı ırklar oluşturması daha zor olmaktadır. Böylece; bitkisel kökenli ilaçlara karşı hastalık etmenlerinin ırk oluşturma olanağı çok zor olmaktadır Her geçen gün antibiyotik dirençliliği kazanan patojen mikroorganizmalara karşı etkili maddelerin bulunması birçok araştırmacı tarafından yıllardır üzerinde durulan araştırılan, deneyler yapılan araştırma alanı olarak popülerliğini devam ettirmektedir. Bunun için dünyanın çok çeşitli yerlerinde araştırmalar yapılmakta ve etken bileşiklerin en doğru şekilde elde edilmesi ve bu etken maddelere karşı duyarlı olan patojen mikroorganizmaların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bitkilerdeki etken maddenin miktarı, bitki materyalinin toplama zamanı ve saklama koşullarına bağlıdır. Bu etken maddelerin etkili olduğu dönem her bitki için farklıdır. Bu da her bitki için özel bir toplama, saklama zamanı olduğunu gösterir (Baytop, 1994). Kurutulmuş bitkilerin tedavi özellikleri bir yıl kadardır. Bir yıldan sonra bitkideki etken madde bozulmaya ve

sonuçta etkisini yitirmeye başlar. Toplanan bitkideki etken maddenin etkisinin bir yıldan daha fazla devamını sağlamak için bitki, özel şartlarda saklanmalıdır. Deneylede kullanılan bitkilerin toplanma zamanından özüte edilmelerine kadar geçen süre en az 2 (*L. nivalis*, *L. armenus*, *L. tukhtensis*, *L. cilicicus*) en fazla 4 yıldır (*L. karsianus*). Bu materyallerin herbaryumda bekletilme sürelerince içerdikleri etken maddelerin nasıl etkilendiği bilinmemektedir. Bazı araştırmacıların *Melissa oleum* L. bitkisinin uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerindeki farklılıkların sebebi olarak uçucu yağlardaki değişimi toprak, iklim koşulları, bitki gelişme dönemleri, bitkinin yaşı, hasat ve bitki depolama koşullarını da içeren iç ve dış faktörlere bağlamaktadırlar (Koller, 1999; Toth, 2003). Kurutulmuş olan droglar tedavi özelliklerini genellikle bir yıl muhafaza edebilmektedirler. Kurutma işleminde enzimlerin en tesirli olduğu ısının 35-50°C arasında bulunduğu düşünülürse, kurutma esnasında bitkisel materyalin bu ısıda çok az bir süre kalmasına bilhassa dikkat edilmelidir. Kurutulmuş bitki materyalinin özelliklerini kaybetmeden muhafaza edilebilmesi için bazı koşullara uyması gerekmektedir. Saklanmasında kurutulan materyalin bozulmasına sebep olan üç etken vardır. Rutubet, sıcaklık, ışık gibi etkenlerin tesirini önlemek için genel olarak drogların serin, kuru ve karanlık yerde muhafaza edilmesi gerekir. Droglar kese kağıdı, cam kavanoz içinde saklanmalıdır. Plastik torba içine konulan droglar kısa zamanda küflenmektedir (Baytop, 1999).

3.2. Kampüs Flora Bitkileri Antimikrobiyal Aktiviteleri

Endemik *Lathyrus* L. ile yapılan antimikrobiyal aktivite deneyine ek olarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kampüsünden 2011 yılında toplanan örneklerle de antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu deneyde maserasyon yöntemi ve soxhlet cihazıyla yapılan özütlemeler karşılaştırmıştır. Bu deneyden alınan sonuçlar referans alınarak endemik *Lathyrus* L. türlerinin özütleme işleminin soxhlet cihazıyla yapılmasına karar verilmiştir. Soxhlet cihazında yapılan özütleme işlemi endemik *Lathyrus* L. ile aynı koşullarda yapılmıştır. Maserasyon ile özütlemeye Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kampüsünden toplanan bitkilerden araştırmada kullanılan yaprak (*Glaucium flavum*, *Euphorbia falcata*, *Conyza canadensis*, *Chenopodium*

botrys, *Catalpha sp.*) meyve (*Quercus coccifera*, *Crataegus monogyna*) ve meyve kabuğu (*Quercus coccifera*) kısımları ise 2 gün boyunca % 96'lık etanolle çalkalamalı inkübatörde maserasyon tekniğine göre özütlenmiş, Whatman no: 1 ile süzildükten sonra rotary evaporatörde 25°C'de çözücü uzaklaştırılmış ve deneylerde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırılmıştır.

Elde edilen verilere göre, oda sıcaklığında (25°C) yapılan ekstraksiyonla soxhlet cihazıyla (65-70°C) yapılan ekstraksiyon arasında önemli derecede bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sadece *Quercus coccifera* meyve özütü *E.coli* dışındaki diğer bakteriler üzerinde maserasyon yöntemiyle elde edilen özüte kıyasla biraz daha yüksek antimikrobiyal etkiye yol açtığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4). Diğer bir deyişle, oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıkta (65-70°C) elde edilen bitki özütlerinin antimikrobiyal etki bakımından birbirine benzer etki yarattığı ve bu çalışma kapsamında çalışılan bitkilerin bileşiklerinin yapısının sıcaklıkla etkisiz hale dönüşmediğini işaret etmektedir. Bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitelerindeki farklılığın içerdikleri etken maddelerin değişkenliği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ali-Shtayeh, 1998; Rabe, 1997). Oskay (2007) *Asphodelus aestivus* ile yaptığı bir çalışmada bitkinin çiçek, meyve ve tüm bitki etanol özütlerinin değişen derecelerde test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon gösterdiğini belirtmiştir. Tez kapsamında yapılan araştırmada *Quercus coccifera* meyve ve meyve kabuğundan ayrı olarak elde edilen ekstraktların farklı mikroorganizmalara farklı derecelerde etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Test edilen mikroorganizmalara karşı meyveden elde edilen özütten daha yüksek aktiviteler elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Maserasyon yöntemi disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları

MASERASYON	Antibiyotik	Etanol	Q.M.*	Q.K.*	F*	Cr M.*	Eu*	Co*	Ch*	K*
E.coli	11	8	10	7	-	7	8	-	7	7
B. subtilis	30	-	10	7	9	-	-	9	7	8
P.aeruginosa	25	7	7	7	7	-	-	7	-	7
S.albus	20	8	8	7	7	7	7	9	9	7
M.luteus	32	7	9	7	-	8	-	9	9	10
S.aureus	18	7	10	9	7	8	8	7	8	9

*(-) İnhibisyon zonu yok.*Q.M. : *Quercus coccifera* meyve Q.K. : *Quercus coccifera* kabuk , F : *Glaucium flavum*, Cr M.: *Crataegus monogyna* meyve, Eu: *Euphorbia falcata*, Co: *Conyza canadensis*, Ch: *Chenopodium botrys* , K: *Catalpha* spp.

Çizelge 3.4. Soxhlet yöntemi disk difüzyon metodu antimikrobiyal aktivite sonuçları

SOXHLET	Antibiyotik	Etanol	Q.M.*	Q.K.*	F*	Cr M.*	Eu*	Co*	Ch*	K*
E.coli	13	8	7	8	7	8	10	10	9	9
B. subtilis	29	-	12	7	-	-	-	14	8	8
P.aeruginosa	24	7	10	8	8	-	-	8	7	7
S.albus	20	8	15	7	7	7	7	7	7	8
M.luteus	35	8	13	7	7	-	11	9	-	10
S.aureus	19	7	13	8	7	7	9	7	7	8

*(-) İnhibisyon zonu yok.Q.M. : *Quercus coccifera* meyve Q.K. : *Quercus coccifera* kabuk , F : *Glaucium flavum*, Cr M.: *Crataegus monogyna* meyve, Eu : *Euphorbia falcata*, Co: *Conyza canadensis*, Ch: *Chenopodium botrys* , K: *Catalpha* sp.

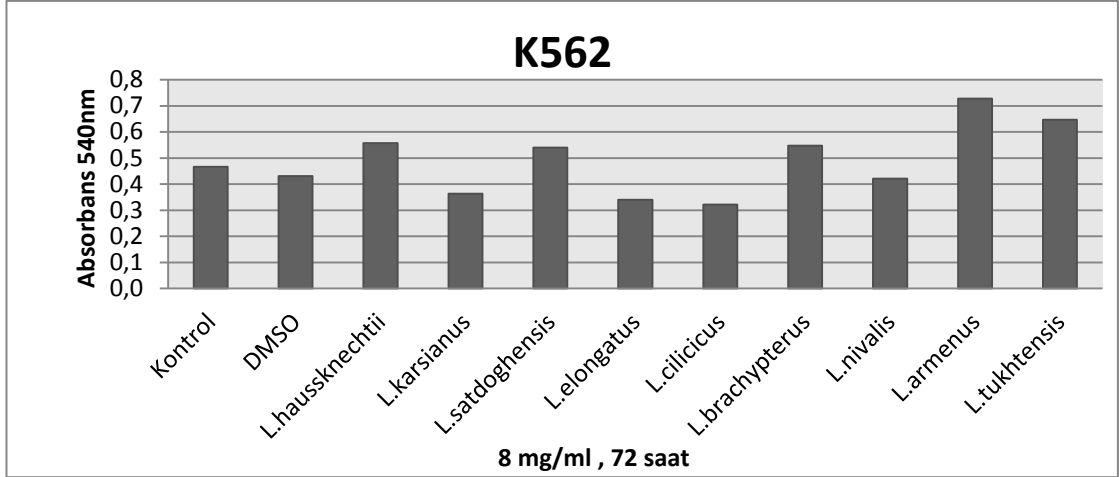
Rakamlar inhibisyon zon çaplarını göstermekte olup her bir disk 6 mm çapındadır. Veriler bir deneydeki 3 tekrarın ortalamasıdır. Tekrarlar arasındaki fark % 3' ten az olarak bulunmuştur. *P. aeruginosa* için gentamisin (10 µg), diğer mikroorganizmalar için vankomisin (30 µg) kullanılmıştır.

3.3. Antitümör Aktivite

3.3.1. Endemik *Lathyrus L.* türleri antitümör aktivite

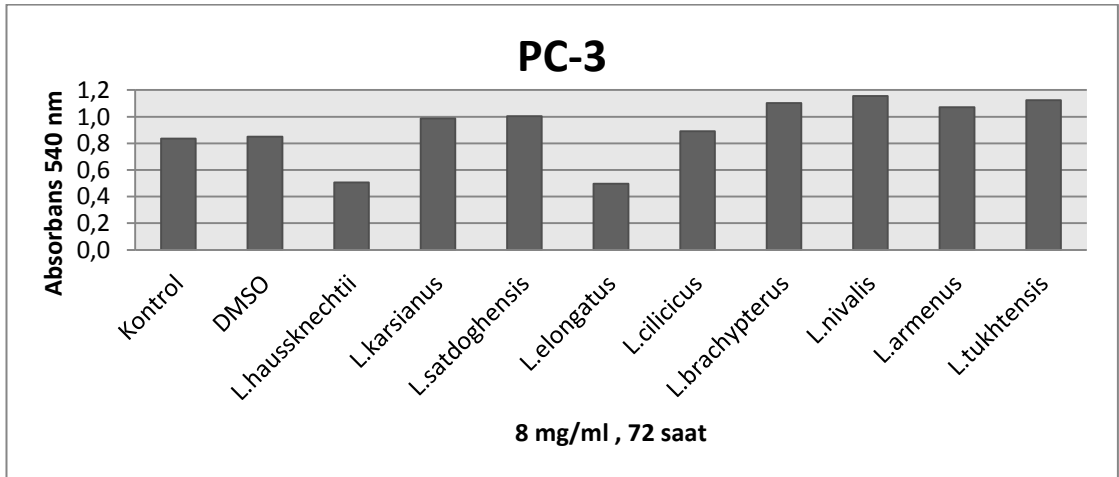
Toplam 9 adet bitki özütünün kanser hücreleri üzerindeki antitümör etkileri MTT testi ile araştırılmıştır. Bitki özütüyle muamele edilmeyen ve sadece DMSO ile muamele edilen hücreler kontrol grubunu oluşturmuşlardır. Bitki özütünün etkisi DMSO ile elde edilen verilerle normalize edilerek bulunmuştur. Bu tez çalışmasında soxhlet cihazı ile elde edilen bitki özütleri yüksek konsantrasyonda (8 mg/ml) 6 farklı kanser hücre hattı ve bir normal hücre hattına uygulanarak hücre bölünmesi üzerindeki etkileri tespit edilmiştir.

K562 hücre hattına denenen 8 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin değişen derecelerde çoğalmayı inhibe edici veya artırıcı etkileri olduğu gözlenmiştir. DMSO'nun etkisi hücreler üzerinde yok denebilecek kadar az olarak bulunmuştur (Şekil 3.1). Bitki özütlerinden *L. karsianus*, *L. elongatus* ve *L. cilicicus*'a ait olan özütler denenen bitki özütleri içerisinde K562 hücrelerinin çoğalmasında azalmaya neden olmuştur. Örneğin, *L. karsianus* özütü 1,3-kat oranında; *L. elongatus* ve *L. cilicicus* özütleri 1,4-kat çoğalmayı inhibe edici özellik göstermişlerdir. *L. nivalis*'in hücrelere olan sitotoksik etkisi ise DMSO ile aynı seviyede bulunduğundan bu etkinin DMSO'dan kaynaklandığı açıktır. Buna karşın, diğer bitki özütlerinin hücre çoğalmasını artırıcı etki gösterdikleri tespit edilmiş olup en yüksek etki 1,6-kat ile *L. armenus* özütünde gözlenmiştir.



Şekil 3.1. K562 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

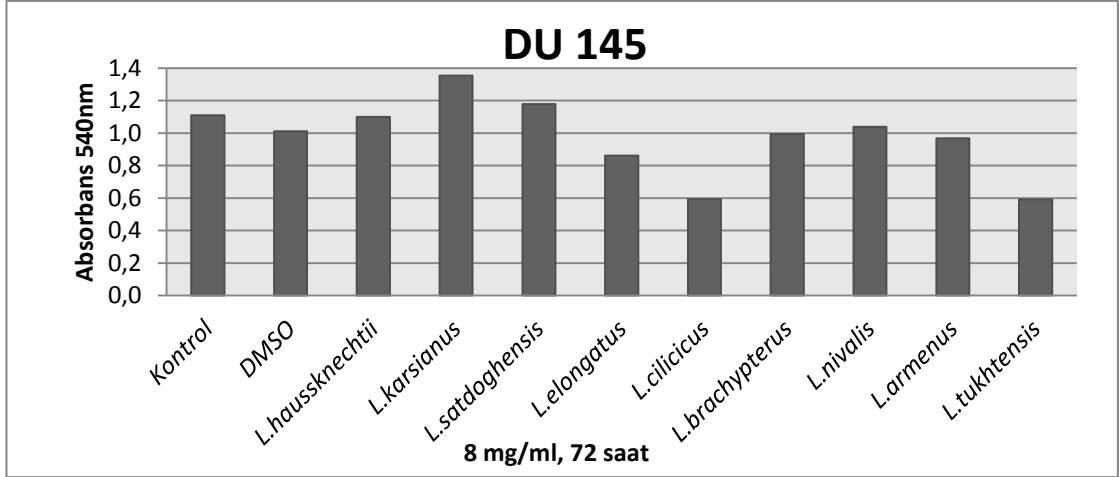
PC-3 hücre hattı üzerine kontrole göre *L. haussknechtii* özütünün 1,65-kat, *L. elongatus* özütünün 1,68-kat oranında hücre çoğalmasını engellediği kaydedilmiştir (Şekil 3.2). DMSO'nun hücre hattı üzerine hiçbir sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Diğer tüm özütler ise çoğalmayı artırıcı etki göstermişlerdir. *L. nivalis* özütünün 1.38-katlık değeriyle en fazla proliferatif etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. PC-3 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

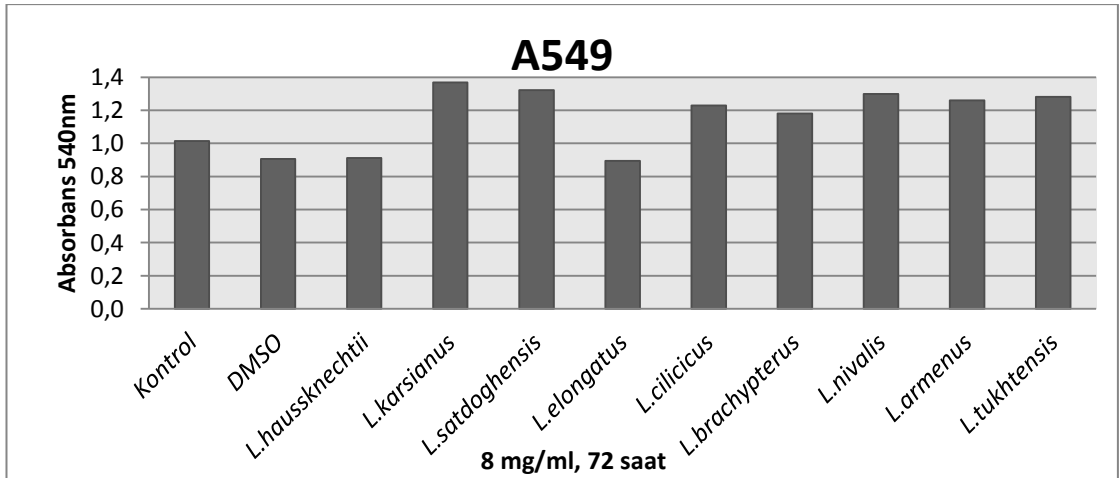
DU 145 hücre hattına *L. karsianus* ve *L. satdaghensis* dışındaki tüm ekstralar değişen oranlarda antitümör etki göstermişlerdir (Şekil 3.3). *L. haussknechtii* kontrolle hemen hemen aynı absorbans değerini vermiştir. DU 45 hücre hattı üzerinde antiproliferatif

etki gösteren özütler *L. elongatus*, *L. cilicicus*, *L. brachypterus*, *L. nivalis*, *L. armenus*, *L. tukhtensis* olarak bulunmuştur. Bu özütler içerisinde *L. cilicicus* ve *L. tukhtensis* sırasıyla 1,87 ile 1,88 oranında kontrole göre yaklaşık 2 kat antiproliferatif etki göstermişlerdir. DMSO söz konusu kanser hücreleri üzerinde kayda değer sitotoksik etki göstermemiştir.



Şekil 3.3. DU145 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

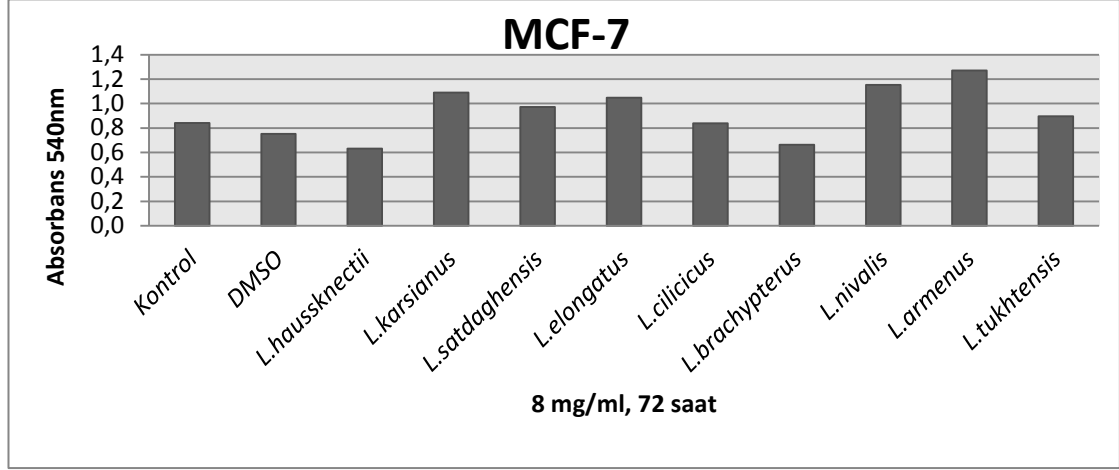
A549 hücre hattına karşı denenen özütlerden sadece *L. haussknechtii* ve *L. elongatus* özütleri hücre çoğalmasını engellediği görülmekle birlikte DMSO ile elde edilen değerlerle aynı olduklarından söz konusu özütlerin hücre çoğalmasını engellemedikleri anlaşılmaktadır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. A549 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

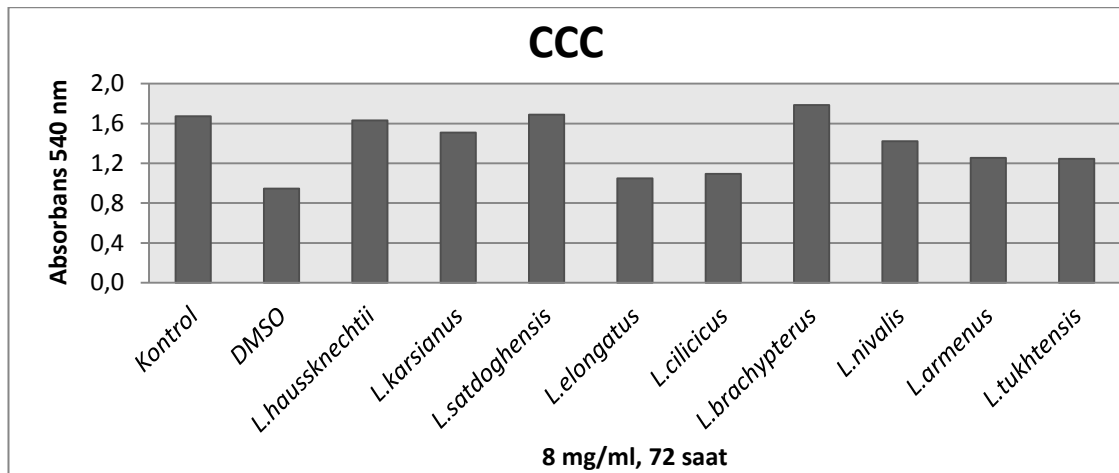
MCF-7 hücreleri üzerinde bitki özütlerinin etkileri araştırıldığında, *L. karsianus*, *L. satdaghensis*, *L. elongatus*, *L. nivalis*, *L. armenus* ve *L. tukhtensis* özütlerinin proliferatif etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Antitümör özellik gösteren özütler *L. haussknechtii* ve *L. brachypterus* birbirlerine çok yakın değerlerde etki

göstermişlerdir fakat her iki özütün etkisinin büyük çoğunlukla DMSO'dan kaynaklandığı görülmektedir.



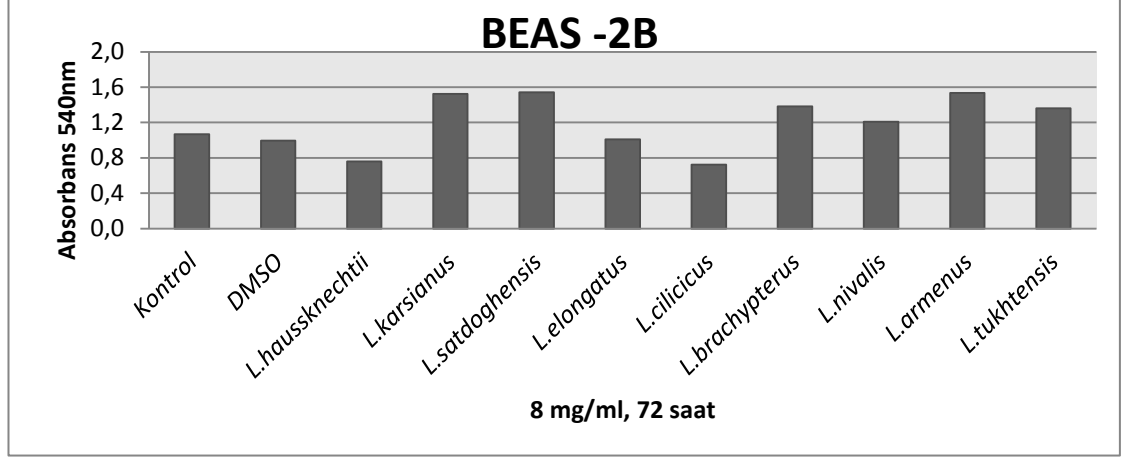
Şekil 3.5. MCF-7 Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

Özütlerin CCC hücre hattı üzerindeki etkileri ele alındığında ise, DMSO kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını 1,77 kat azaltarak belirgin inhibisyon etki göstermiştir Mitokondriyal aktiviteyi en fazla oranda düşürdüğü gözlenen *L. elongatus* ve *L. cilicicus* özütlerinin bu etkileri çok büyük oranda DMSO'nun hücreler üzerinde meydana getirdiği toksik özellikten kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.6). CCC hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösteren diğer ekstraktların anlamlı sitotoksik etki meydana getirmediği ve bu zayıf etkilerin de DMSO'dan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.6. CCC Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

Kanser olmayan BEAS 2B hücre hattı üzerinde *L. haussknechtii*, *L. elongatus* ve *L. cilicicus* özütleri dışındaki diğer özütler sitotoksik etki göstermemişlerdir (Şekil 3.7). Bunların dışındaki bitki özütlerinin ise kontrole göre hücre çoğalmasını artırıcı etki gösterdikleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. BEAS 2B Hücre hattı üzerine bitki özütlerinin antitümör etkileri

Bu çalışmada, *Lathyrus* L. cinsine ait 9 bitki türünden elde edilen özütlerin 6 farklı kanser hücre hattında ve 1 normal hücre hattı üzerindeki etkileri Çizelge 3.5'te özetlenmiştir. *L. haussknechtii* özütü K562 hücre hattı dışındaki diğer hücre hatlarında hücre çoğalmasını azaltıcı etki sergilemektedir. *L. karsianus* özütü K562 ve CCC hücre hatlarında sırasıyla kontrole göre 1,28 ve 1,1-kat hücre çoğalmasını azaltmıştır. Buna karşın *L. satdaghensis* incelenen bütün hücre hatlarında hücre çoğalmasını artırıcı etki göstermiş olup en yüksek etki 1,45-kat olarak BEAS 2B hücrelerinde kaydedilmiştir. Çizelge 3.5'e bakıldığında bazı bitki özütlerinin hücre çoğalmasını engellemenin yerine hücre çoğalmasını artırıcı etki gösterdikleri bulunmuştur. Bütün özütler arasında en yüksek antiproliferatif etkinin *L. tukhtensis* özütü ile DU145 hücre hattında 1,88-kat; *L. cilicicus* özütünün DU145 hücre hattında 1,87-kat; *L. elongatus* özütü ile PC-3 hücre hattında 1,68-kat olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.5. Endemik *Lathyrus L.* etanol özütlerinin hücre bölünmesi üzerinde etkileri

HÜCRE HATLARI							
EKSTRELER							
(8mg/ml)	BEAS 2B	K562	PC-3	DU145	A549	MCF-7	CCC
<i>L. haussknechtii</i>	1,41 -	1,21+	1,65 -	1,01 -	1,11 -	1,33 -	1,03 -
<i>L. karsianus</i>	1,43 +	1,28 -	1,18 +	1,22 +	1,35 +	1,30 +	1,11 -
<i>L. satdaghensis</i>	1,45 +	1,16 +	1,20 +	1,06 +	1,30 +	1,16 +	1,01 +
<i>L. elongatus</i>	1,06 -	1,37 -	1,68 -	1,29 -	1,13 -	1,25 +	1,60 -
<i>L. cilicicus</i>	1,48 -	1,45 -	1,07 +	1,87 -	1,21 +	1,00 -	1,53 -
<i>L. brachypterus</i>	1,30 +	1,18 +	1,32 +	1,12 -	1,16 +	1,27 -	1,07 +
<i>L. nivalis</i>	1,13 +	1,11 -	1,38 +	1,07 -	1,28 +	1,37 +	1,18 -
<i>L. armenus</i>	1,44 +	1,56 +	1,28 +	1,15 -	1,24 +	1,51 +	1,33 -
<i>L. tukhtensis</i>	1,27 +	1,39 +	1,34 +	1,88 -	1,26 +	1,07 +	1,34 -

*(+) hücre çoğalmasını arttırıcı etki, (-) hücre çoğalmasını azaltıcı etki

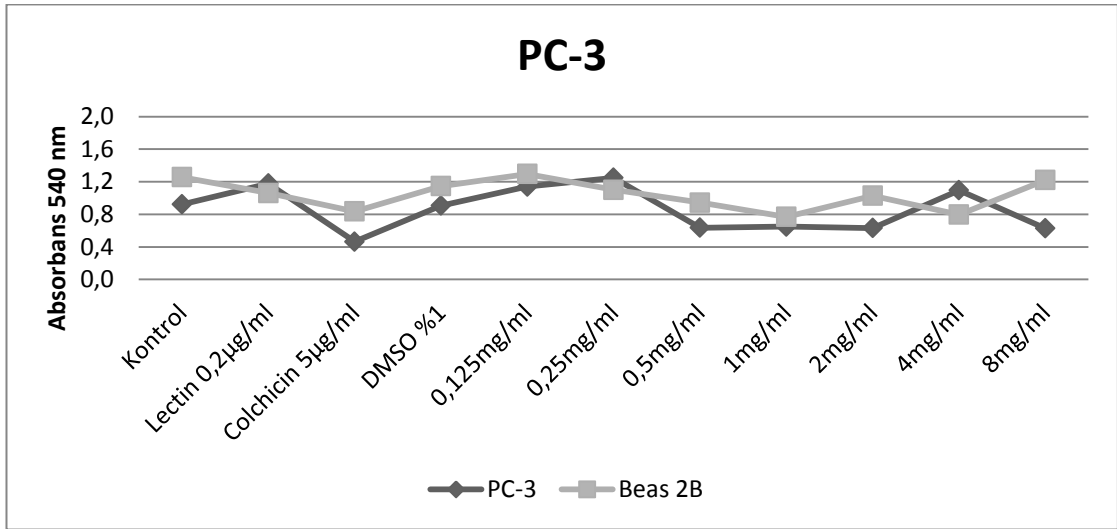
Rakamlar bitki özütüyle muamele edilen hücre proliferasyon değerlerinin DMSO değerleriyle normalize edilerek kontrol değerlerine oranını göstermektedir.

3.3.2. Hücre çoğalmasını azaltan özütlerin doz denemesi

Hücre bölünmesi üzerinde azaltıcı etki gösteren bitki özütlerinden bazılarının farklı dozlarının etkili oldukları hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

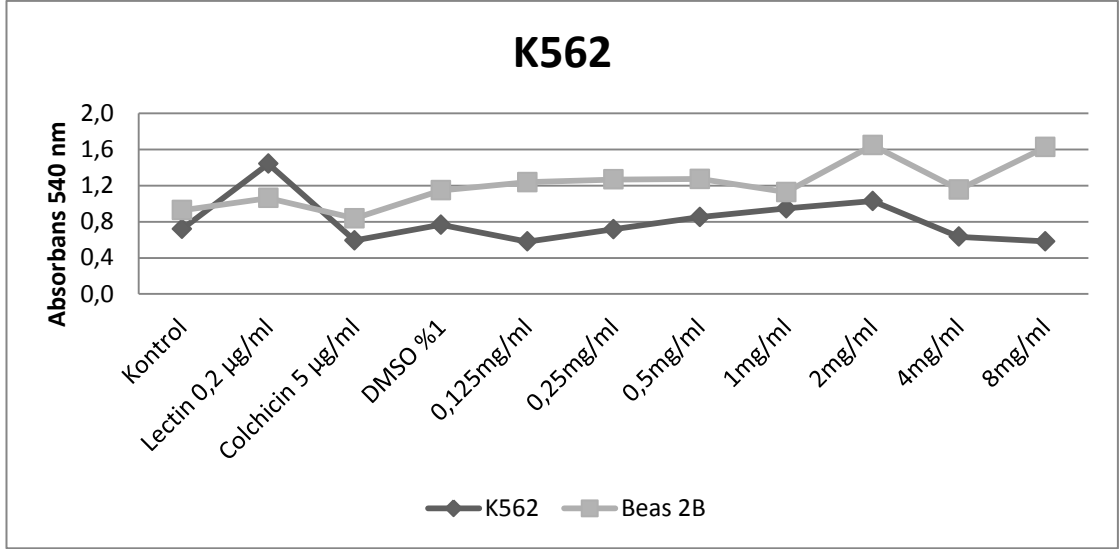
L. elongatus özütünün PC-3 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisinin araştırıldığı deneyde düşük konsantrasyonda hazırlanan özütlerin 0,125 ve 0,25 mg/ml konsantrasyonlarının sitotoksik etki göstermediği, sitotoksitenin 0,5 mg/ml'den itibaren başladığı fakat 4 mg/ml konsantrasyonda hücre canlılığında bir artışın olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8.). Diğer bir deyişle, konsantrasyon artışıyla sitotoksitate arasında doğru orantı gözlenmemiştir. 0,5-1-2 ve 8 mg/ml

konsantrasyonların hücre çoğalmasını sırasıyla 1,45-1,42-1,46 ve 1,47-kat azalttığı belirlenmiştir. *L. elongatus* özütünün çalışılan konsantrasyonları kolşisin ile karşılaştırıldığında bu konsantrasyonlardan hiçbirinin kolşisinden daha yüksek aktivite göstermediği saptanmıştır. En anlamlı sitotoksik aktivite 2 mg/ml'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. Söz konusu özüt, PC-3 hücrelerinin çoğalmasını kontrole göre 1,46 kat azaltırken BEAS 2B hücrelerininkini kontrole göre 1,25-kat artırdığı gözlenmiştir.



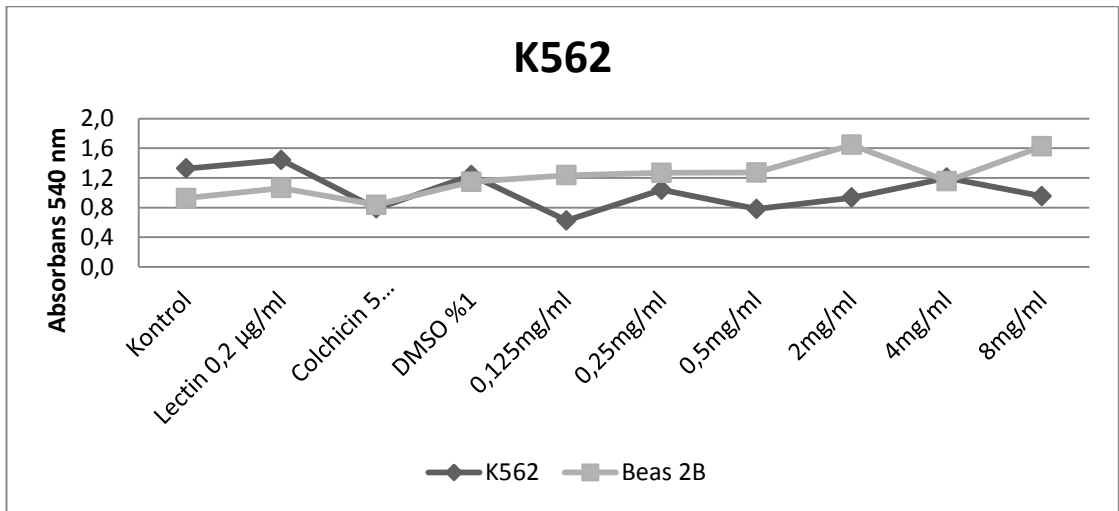
Şekil 3.8. *L. elongatus*'un PC-3 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi

K562 hücre hattı üzerine antitümör etkisi denenen *L. karsianus* özütünün canlılığı azaltıcı etkisi en düşük doz olarak denenen 0,125 mg/ml konsantrasyonda kontrole göre hücre çoğalmasını 1,7-kat azalttığı gözlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre çoğalmasında doğru orantılı bir azalma görülmesi de kontrole kıyasla denenen dozlarda hücre çoğalmasında azalma kaydedilmiştir. Hücre çoğalmasını azaltan (1,7-kat) en etkili dozun ise 0,125 mg/ml konsantrasyon olduğu ve bu özütün kolşisinden daha etkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda özütün hiçbir konsantrasyonu BEAS 2B hücrelerine toksik etki göstermediğinden antitümör etkileri anlamlı olarak bulunmuştur (Şekil 3.9.).



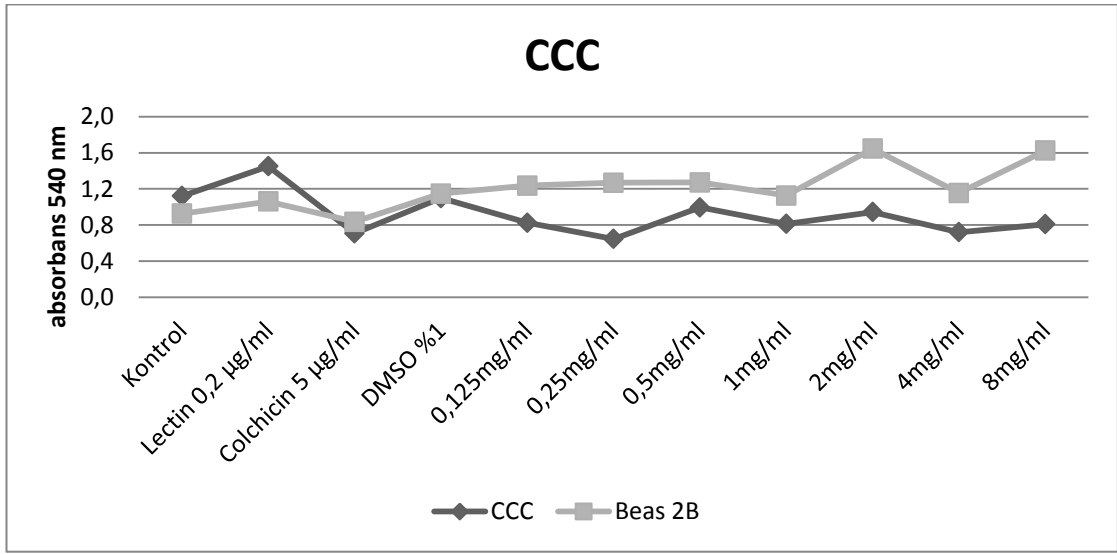
Şekil 3.9. *L. karsianus*'un K562 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi

Benzer şekilde *L. nivalis* özütünün K562 hücre hattı üzerinde doz artışına paralel olarak hücre çoğalmasındaki azalmada doğru orantı saptanamamıştır. Ancak, K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki 0,125, 4 ve 8 mg/ml konsantrasyonlarında gözlenmiştir ve bu dozlardaki etki kolşisinin etkisine çok yakın olarak bulunmuştur (Şekil 3.10.). BEAS 2B hücrelerine özütün hiçbir konsantrasyonu sitotoksik etki göstermemiştir. Deneyde kontrol olarak kullanılan lektin her iki hücre hattında hücre çoğalmasında artışa neden olurken, diğer bir kontrol grubu olan kolşisin her iki hücre hattında da beklenildiği gibi çoğalmayı inhibe edici özellik göstermiştir.



Şekil 3.10. *L. nivalis*'in K562 hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi

CCC hücre hattına karşı antitümör etkisi denenen *L. nivalis* özütünün tüm konsantrasyonları BEAS 2B hücrelerine toksik etki göstermemekle birlikte CCC hücreleri üzerinde değişen derecelerde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Kontrol gruplarından lektin her iki hücre hattında da çoğalmayı artırıcı etki gösterirken, kolşisin inhibisyon etkisi göstermiştir. CCC hücreleri üzerinde en yüksek sitotoksik etki hücre çoğalmasını 1,73-kat azaltan 0,25 mg/ml konsantrasyonda gözlenmiştir (Şekil 3.11.)

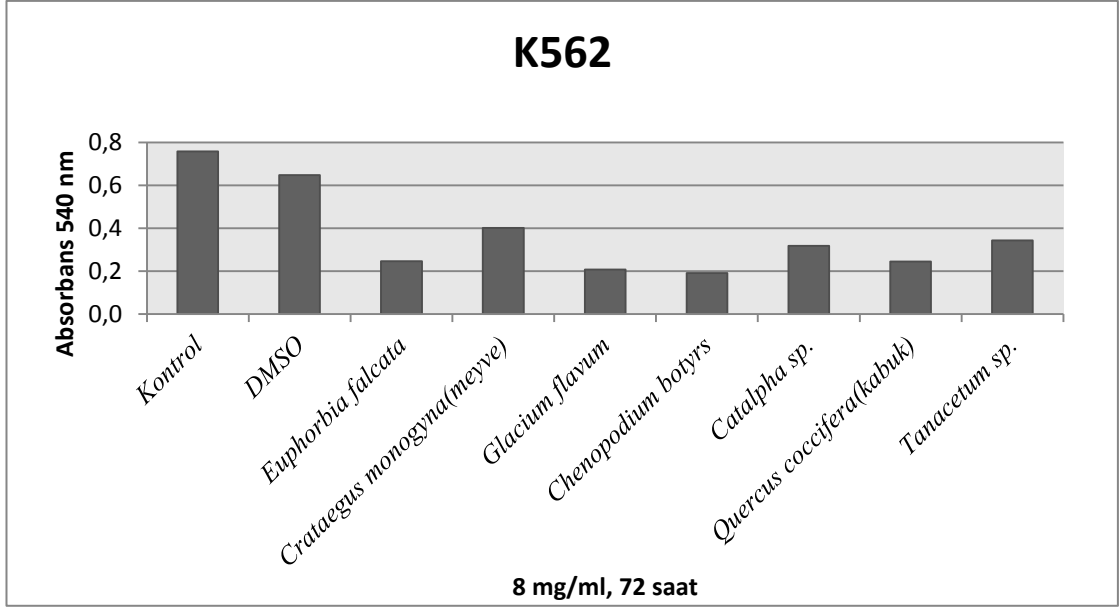


Şekil 3.11. *L. nivalis*'in CCC hücre hattı üzerinde konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi

3.3.3. Diğer bitkilerin antitümör etkileri

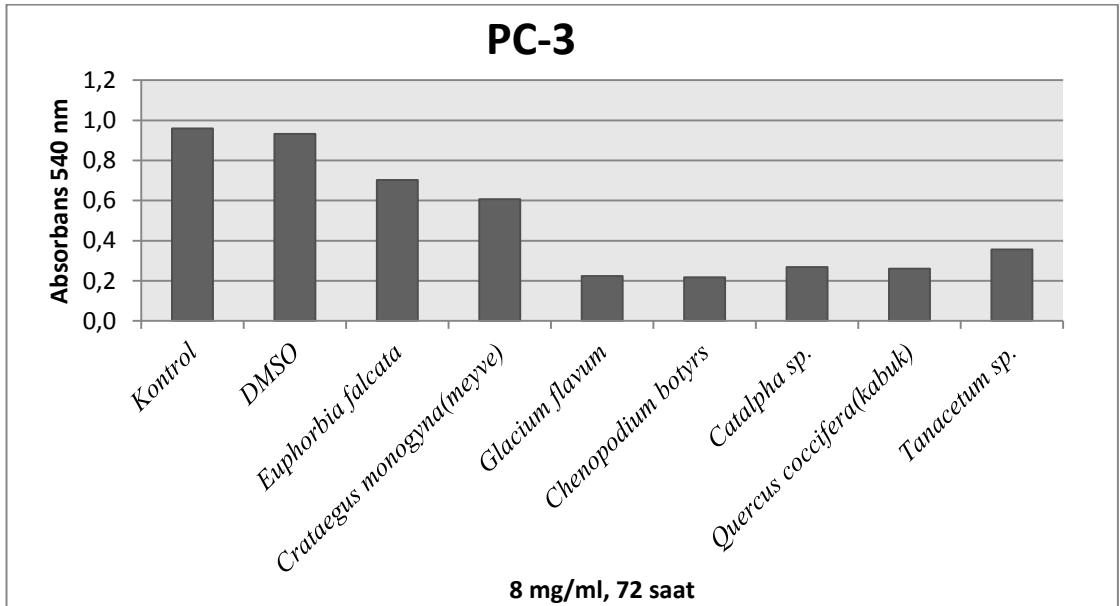
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi kampüsünden toplanan 6 adet bitkinin ve Kars'tan toplanan *Tanacetum sp.* bitkisinin etil alkolle soxhlet cihazında elde edilen ham özütlerinin kanser ve BEAS 2B hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analiziyle incelenmiştir

K562 hücre hattı üzerinde tüm özütlerin değişen derecelerde hücre çoğalmasını azaltıcı etkileri olduğu görülmüştür. En yüksek sitotoksik etki *Chenopodium botrys* özütünden elde edilmiş olup, kontrole oranla hücre çoğalmasını 3,96-kat azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.12.).



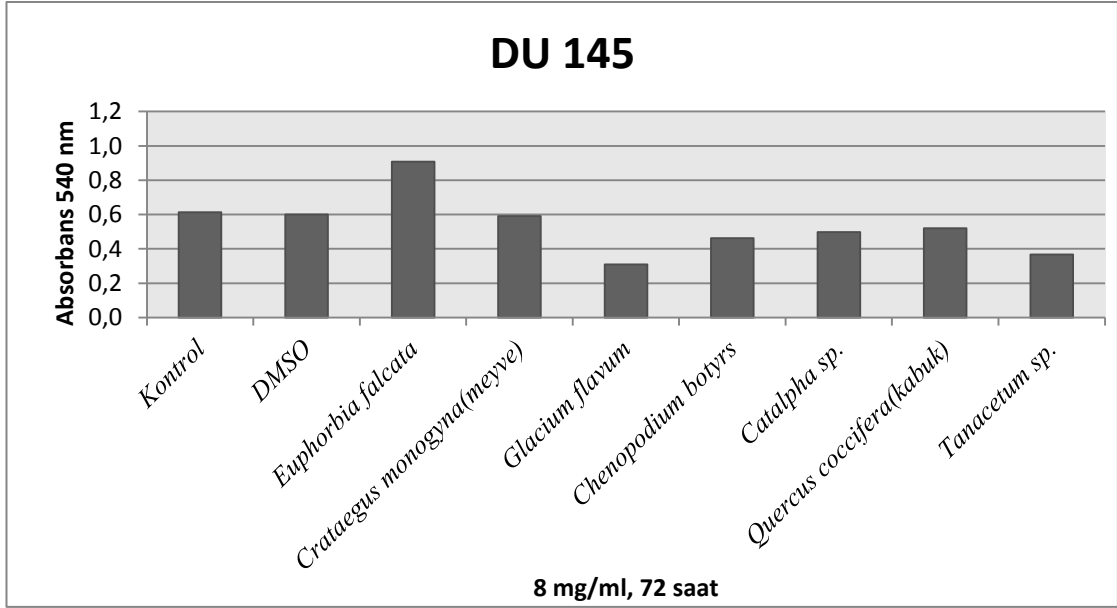
Şekil 3.12. Bazı bitki özütlerinin K562 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

Bitki özütlerinin PC-3 hücreleri üzerinde proliferatif etkileri incelendiğinde, K562 hücre hattında olduğu gibi bütün özütlerin hücre çoğalmasını değişik oranlarda azalttığı tespit edilmiştir. En yüksek antiproliferatif etki *Glacium flavum*, *Chenopodium botyrs*, *Quercus coccifera* (kabuk), *Catalpha sp.* özütleriyle elde edilmiş olup, hücre çoğalmasını kontrole kıyasla sırasıyla 4,30-kat, 4,42-kat, 3,69-kat ve 3,58-kat azalttıkları bulunmuştur (Şekil 3.13.)



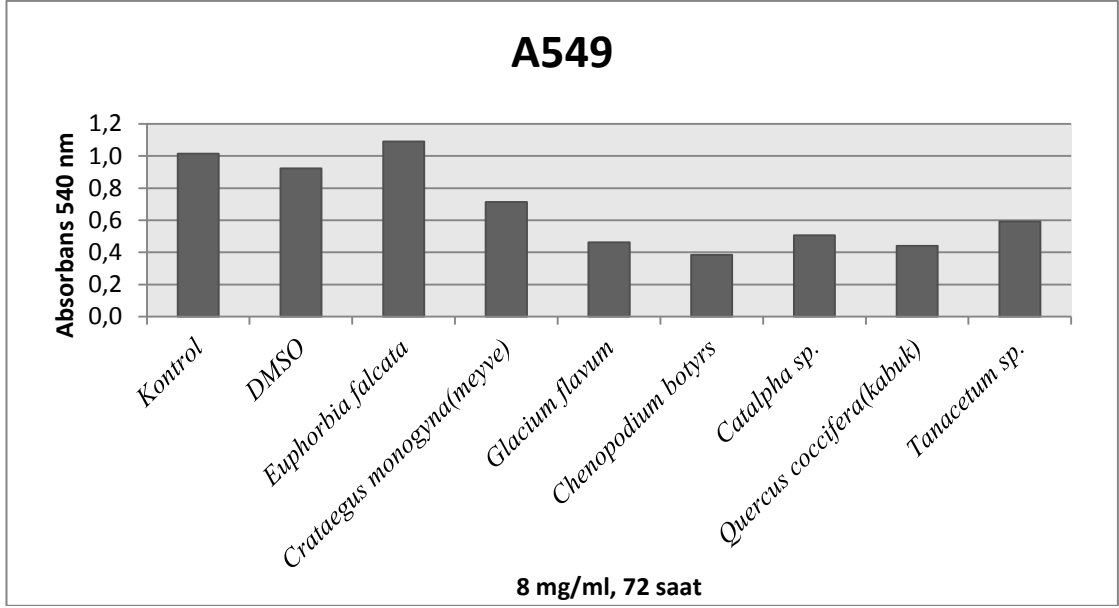
Şekil 3.13. Bazı bitki özütlerinin PC-3 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

DU145 hücre hattına karşı etkileri denenen bitki özütlerinden *Euphorbia falcata* hücre proliferasyonunu artırıcı artırıcı etki göstermiş olup, *Crataegus monogyna* hariç diğer tüm özütlerin farklı oranlarda hücre çoğalmasını azalttıkları belirlenmiştir (Şekil 3.14) En yüksek sitotoksik etki *Glacium flavum* özütünden elde edilmiştir. DMSO'nun DU145 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.



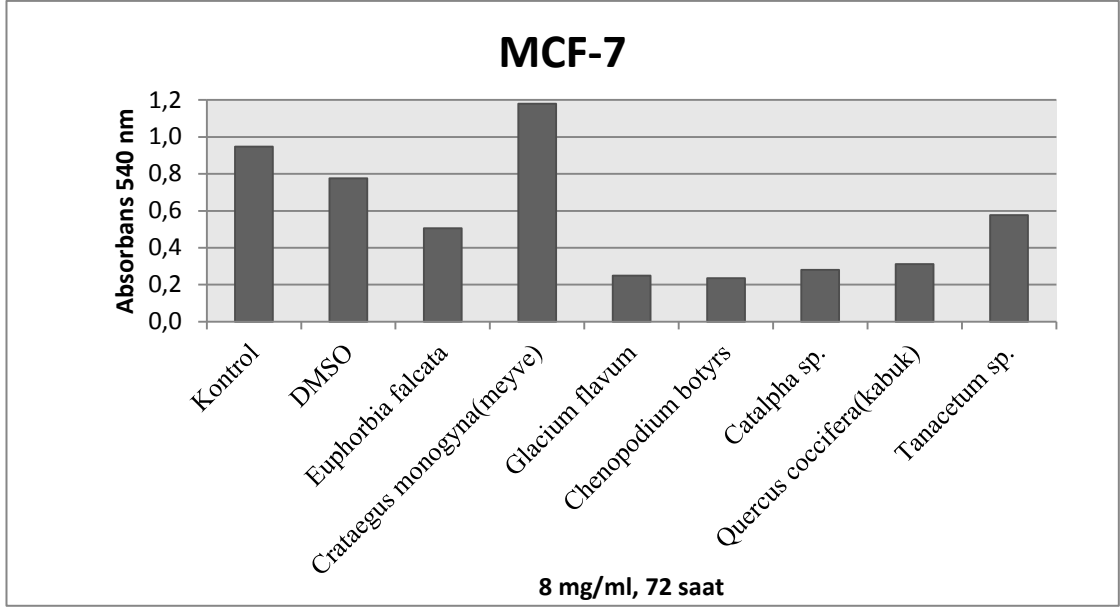
Şekil 3.14. Bazı bitki özütlerinin DU145 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

A549 hücre hattına karşı antitümör etkileri denenen ekstrelerden en yüksek sitotoksik etki kontrol grubuna göre canlılığı 2,63-kat azalttığı belirlenen *Chenopodium botyrs*' ten elde edilmiştir (Şekil 3.15.). *Euphorbia falcata* kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını artırıcı etki gösterirken kalan diğer ekstrelerin A549 hücreleri üzerinde değişen derecelerde antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir.



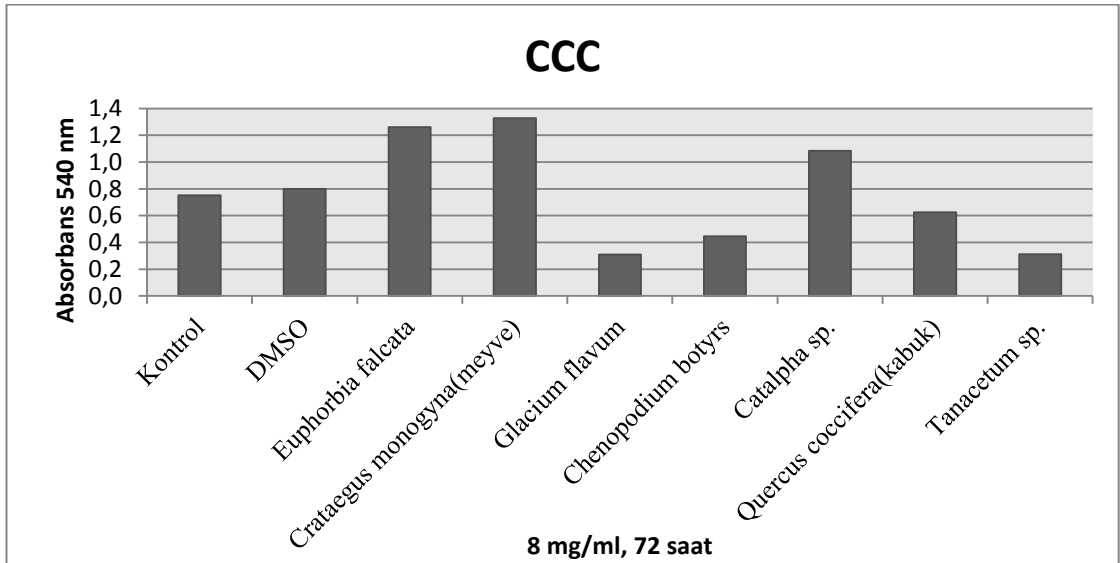
Şekil 3.15. Bazı bitki özütlerinin A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

MCF-7 hücre hattına karşı antiproliferatif etkileri denenen bitki özütlerinden *Crataegus monogyna* (meyve) dışındaki tüm özütlerin hücre çoğalmasını inhibe edici özellik gösterdikleri belirlenmiştir. En yüksek sitotoksik etki kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını 4,01-kat azaltan *Chenopodium botyrs* özütünden, en düşük sitotoksik etki ise kontrol grubuna göre canlılığı 1,64-kat azaltan *Tanacetum sp.* özütünden elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 3.16.). DMSO, MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiş olmasına rağmen antitümör etkileri tespit edilen özütlerin hepsi DMSO'nun etkisinden daha fazla sitotoksik etki göstermişlerdir.



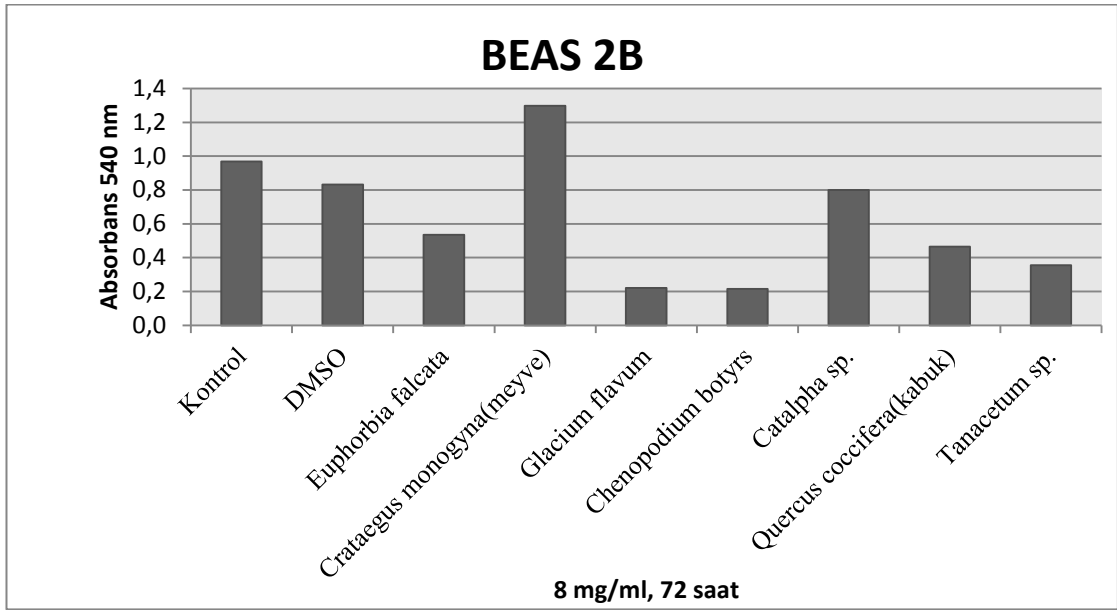
Şekil 3.16. Bazı bitki özütlerinin MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

CCC hücre hattına karşı antitümör etkileri denenen bitki özütlerinden *Euphorbia falcata*, *Crataegus monogyna* (meyve) ve *Catalpha sp.* kontrol hücrelerine göre canlılığı sırasıyla 1,68-2,17-1,44 kat artırarak antiproliferatif etki göstermemişlerdir (Şekil 3.17.). Kontrol grubuna göre hücre çoğalmasını *Glacium flavum* 2,42-kat, *Tanacetum sp.* 2,41-kat, *Chenopodium botyrs* 1,68-kat azalttıkları saptanmıştır. DMSO'nun söz konusu hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir



Şekil 3.17. Bazı bitki özütlerinin CCC hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

Normal bronş epitel hücreleri olan BEAS 2B hücre hattına etkileri incelenen ekstrelerden sitotoksik özellik göstermeyen tek bitki ekstresi *Crataegus monogyna* (meyve) olarak tespit edilmiştir. Diğer ekstreler değişen oranlarda hücre çoğalmasını azaltıcı etki göstermişlerdir (Şekil 3.18.). *Crataegus monogyna*(meyve) dışında, hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkileri belirlenen ekstrelerin BEAS 2B üzerinde de sitotoksik etki göstermeleri bu ekstrelerde hangi bileşen veya bileşenlerin etken madde olarak özellik gösterdiklerinin belirlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Söz konusu bitki ekstrelerinden BEAS 2B hücre hattına olan sitotoksiteleri diğer hücre hatlarında antiproliferatif etki gösterdikleri hücre hatlarına olan sitotoksitelerinden düşük olanlar *Euphorbia falcata* K562 ve MCF-7; *Catalpha sp.* K562, PC-3, MCF-7, DU145 ve A549; *Quercus coccifera* (kabuk) K562, PC-3, A549 ve MCF-7 üzerinde olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.18. Bazı bitki özütlerinin BEAS 2B hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi

Özet olarak, *Lathyrus* türleri dışındaki diğer bitki özütlerinin kanser hücrelerinin bölünmesi üzerinde etkilerinin araştırılması sonucunda elde edilen veriler Çizelge 3.6'da verilmiştir. Buna göre, bütün bitki özütlerinden en az antiproliferatif etki gösterdiği hücre hattı prostat hücre hattı olan DU145 olup hücre çoğalmasının azalmasında görülen en yüksek etki 1,9-kat olup *G. flavum* bitki özütüyle elde edilmiştir. Buna karşın diğer prostat hücre hattı olan PC-3 üzerinde 4 hücre hattının sitotoksik etkisi kontrole göre 3,58-kat ile 4,42-kat arasında değişmektedir. Bunların dışında 4 ve daha üstü bitki özütüyle en çok sitotoksik etki görünen K562 ve MCF-7 hücreleri olduğu tespit edilmiştir. Özellikle *Catalpha* sp. bitki özütü PC-3 ve MCF-7 kanser hücrelerini normal hücre hattı BEAS 2B'ye kıyasla sırasıyla 2,9-kat ve 2,8-kat azalttığı görülmektedir. Diğer bir deyişle, antiproliferatif etki bakımından *Catalpha* sp. bitkisi söz konusu hücre hatlarına karşı en yüksek potansiyele sahiptir. Bitkilerin içerdikleri farklı fitokimyasallardan ve sekonder metabolitlerden dolayı hücre hatları üzerinde farklı veriler elde edilmiştir. Ayrıca her bir kanser hücre hattının kendine özgü karakteristik özelliklerinden dolayı aynı bitki özütü farklı hücreleri üzerinde değişen sonuçlar vermiştir. Hücre hatları üzerinde uygulanan ilaçlara verilen yanıt bu ilaçların etki mekanizmasına, uygulama dozlarına olduğu kadar kullanılan hücrelerin köken aldığı dokuya, kanser hücresinin özelliklerine ve onların genetik değişikliklerine bağlı olduğu belirtilmektedir.

Çizelge 3.6. Bazı bitki özütlerinin hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri

EKSTRELER (8mg/ml)	HÜCRE HATLARI						
	BEAS 2B	K562	PC-3	DU145	A549	MCF-7	CCC
<i>Euphorbia falcata</i>	1,81 -	3,08 -	1,37 -	1,48 +	1,07 +	1,87 -	1,68 +
<i>Crataegus monogyna</i>	1,44 +	1,89 -	1,58 -	1,04 -	1,42 -	1,30 +	2,17 +
<i>Glacium flavum</i>	4,40 -	3,67 -	4,30 -	1,98 -	2,19 -	3,80 -	2,42 -
<i>Chenopodium botyrs</i>	4,49 -	3,96 -	4,42 -	1,32 -	2,63 -	4,01 -	1,68 -
<i>Catalpha</i> sp.	1,21 -	2,39-	3,58-	1,23 -	2,00 -	3,39 -	1,44 +
<i>Quercus coccifera</i>	2,08 -	3,10 -	3,69 -	1,18 -	2,30 -	3,04 -	1,20 -
<i>Tanacetum</i> sp.	2,72 -	2,21 -	2,70 -	1,67 -	1,71 -	1,64 -	2,41 -

*(+) hücre çoğalmasını artırıcı etki, (-) hücre çoğalmasını azaltıcı etki

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tez kapsamında çalışılan 9 endemik *Lathyrus* L. türlerinin 6 farklı mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Uyguladığımız metodlara göre bu bitkilerin yaprak ham özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ticari antibiyotiklerle kıyaslanamayacak kadar düşük olduğu bulunmuştur. Ancak kullanılan antibiyotiklerin saf madde olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmada kullanılan bu bitkinin bakteriler üzerinde etken olan maddeleri tek tek saflaştırılarak kullanılırsa çok daha etkili olabilirler. Ayrıca farklı 7 adet bitkinin de aynı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bitki özütleri maserasyon ve soxhlet cihazıyla ekstraksiyon olmak üzere iki farklı teknikle elde edilmiş olup, antimikrobiyal etkileri birbirleriyle kıyaslanmıştır. Soxhlet cihazıyla elde edilen özütlerin antimikrobiyal etkileri diğer teknikle elde edilen özütlerinkinden biraz daha yüksek çıktığı tespit edilmiştir.

Bitkilerin fitokimyasal özellikleri, kimyasal bileşenleri türden türe farklılık arz ettiği için bazı bitkiler antibakteriyal aktivite göstermemişlerdir. Bu çalışmada endemik *Lathyrus* L. türlerinden kayda değer antimikrobiyal etki alınmamıştır. Bitkinin yaşam süresinin değişik evrelerinde gövde, yaprak ve meyvelerinde ürettiği etken maddeleri keşfedebilmek amacıyla bahar, yaz ve sonbahar gibi farklı zamanlarda toplanan örneklerin farklı solventlerle elde edilen özütlerinin karşılaştırmalı olarak araştırmalar yapılmasının oldukça büyük önem teşkil edeceği düşünülmektedir. Dolayısıyla toplanan materyallerin uygun saklama ve kurutma koşullarına uyularak fazla bekletilmeden deneylerin yapılmasının bitki etken maddelerinin bozulmadan ya da konsantrasyonlarında bir azalma olmadan elde edileceğinden antimikrobiyal etkilerde daha olumlu sonuçlar elde edilebilir.

Antitümör etkileri MTT metoduyla araştırılan 9 endemik *Lathyrus* L. türlerinden 6 tanesi BEAS 2B normal epitelyum hücre hattına sitotoksik özellik göstermeyip

çalışılan farklı kanser hücre hatları üzerinde değişen derecelerde hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Fakat bu etkilerin anlamlı derecede canlılığı azaltıcı yönde olmaması bitkilerin içerdiği fitokimyasallardan kaynaklanabileceği gibi bitkilerin saklama koşullarından ve materyallerin laboratuvar ortamında uzun yıllar bekletilmiş olmasının beraberinde etken maddelerin konsantrasyonlarında azalma ya da kimyasal değişime uğramış olabilme ihtimallerinden kaynaklanabileceği dūřünölmektedir. Aynı bitkilerin bu bahsedilen koşullara uyularak farklı çözügen ve farklı ekstraksiyon metodlarıyla antitümör denemelerinin yapılması gerekliliği açıktır. Ayrıca antitümör etkileri araştırılan diğer bitkilerden kanser hücrelerinin çoğalmasını yüksek oranda azaltan özütler belirlenmiştir. Bu materyallerin içerdiği fitokimyasallardaki çeşitliliğin yanı sıra toplanma, kurutma ve deneylere başlanma süresi kısa tutulmuş olup içerdikleri etken maddelerin bu nedenlerle belirgin sonuçlar verdiği dūřünülebilir.

Tez kapsamındaki araştırmalarda endemik ve diğer bitkilerin ham özütleri kullanılmıştır. Endemik bitkilerden elde edilen özütleri kimyasal içerik analizlerinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkilerin içerdiği hangi etken madde veya maddelerin sitotoksik etkiden sorumlu olduğuna dair değerlendirme yapılmamıştır. Daha ileri çalışmalarla bitkilerden elde edilen özütler içerisindeki etken madde grupları belirlenerek hücre içerisinde hangi mekanizmalarla ve hangi düzeylerde etkinlik gösterdikleri ortaya konmalıdır. İlaç geliştirilmesinde ve toksisite araştırmalarında in vivo testlerden önce deney hayvanı sayısını önemli oranda azaltan, hızlı, organ-dokuya özel, ekonomik, güvenilir hücre kültürü gibi in vitro testlerin yapılması gittikçe yaygınlaşmıştır. İn vitro çalışmalarda canlılık veya diğer etkinlik değerlendirmelerinde test çeşitlerinin artırılması alınan sonuçların ve buna bağlı yapılan yorumların doğruluğunu da artıracaktır. Belirtilen değerlendirmeler doğrultusunda, araştırmadaki bitki özütlerinin etkinliği ve etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için, in vivo araştırmalardan önce, bitki özütlerinin kendisi ve/veya içerdiği etkin maddelerin saflaştırılmış şekillerinin çeşitli doz ve inkübasyon sürelerinde, farklı sitotoksik yollar üzerindeki etkinliklerini belirleyici testlerin yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abaza L., Talorete T.P.N., Yamada P., Kurita Y., (2007) Induction of growth inhibition of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian Gerboi olive leaf extract, *Biosci Biotechnol Biochem*, 71 (5); 1306-1312.
- Ahmad, I., Beg, A.Z., (2001) Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens, *J Ethnopharmacol*, 74: 113-123.
- Al-dabbas, M.M., Saganuma, T., Kitahara, K., Hou, D. X., Fujii, M., (2006) Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts, *J Ethnopharmacol* 108: 287–293.
- Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M. R., Faidi, Y. R., Khalid, S. and Al-Nuri, M. A. (1998) Antimicrobial Activity of 20 Plants Used in Folkloric Medicine in the Palestinian, *J Ethnopharmacol*, 60: 265-271.
- Ateş, D., Erdoğan, Ö., (2003) Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts, *Turk J Biol*, 27: 157-162.
- Atik, A.D., Öztekin, M., Erkoç, F., (2010) Biodiversity and examples of endemic plants in Türkiye, *GÜJGEF*, 30 (1): 219-240.
- Avcı, M. (2005) Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi* 13: 27-55.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., (2002) *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt I. Sel-Ün yayınları, Konya, 374s.
- Balunas M.J., Kinghorn A.D., (2005) Drug discovery from medicinal plants, *Life Sciences*, 78: 431-441.

- Baydar H. (2005) *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 216s.
- Baytop, A.,(1999) *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fak., 252-369.
- Baytop, T., (1994) *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi Geçmişte ve Bugün* ,2, Nobel Tıp, İstanbul, 480s.
- Benedict, RG, Brady LR (1972) Antimicrobial Activity of Mushroom Metabolites, *J Pharm Sci*, 61 (11): 1820-1821.
- Bilgehan, H., (1989) *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*, 4, Barış Yayınları, Ankara, 551s.
- Briskin, D.P., (2000) Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health, *Plant Physiology*, 124, 507-514.
- Butler, M., (2004) *Animal Cell Culture and Technology*. 2 New York: Taylor & Francis, 256s.
- Cheng Y.L., Lee S.C., Lin S.Z., Chang W.L., Chen Y.L., Tsai N.M., Liu Y.C., Tzao C., Yu D. S. ve Harn H. J., (2005) Anti-proliferative activity of *Bupleurum scrozoniferolium* in A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 222 (2): 183-193.
- Cohen, M., (1992) Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era, *Science*, 257:1050-1055.
- Cohen, F.L., ve Tartasky, D., (1997) Microbial Resistance to Drug Therapy, *Am J Infect Control*, (25): 51-64.
- Costa-Lotufu, L., Khan, M., Ather, A., Wilke,D., Jimenez, P., Pessoa C., (2005) Studies on the anticancer potential of plants used in Bangladeshi Folk Medicine, *J Ethnopharmacol*, 99: 21-30.

- Cowan, MM., (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clin Microbiol Rev*, (12): 564-582.
- Davis P.H., (1970) *Lathyrus L.*, *Flora of Turkey and East Aegean Islands* Edinburgh, 3: 328-369. Edinburgh University Press, Edinburg.
- Davis P.H., (1988) *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburgh, 10: 125-126. Edinburgh University Press, Edinburg.
- Dığrak, M., İlçim, A., Alma, M.H. (1999) Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*, *Phytotherapy Research*, 13: 584-587.
- Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Uğurlu, E., (1999) *Artemisia absinthium L.* (Pelin)' un Antimikrobiyal Aktivitesi, *Tr J Biology*, 23: 377-384.
- Dülger, B., Uğurlu, E., Gücin, F., (2002) *Vitex agnus-castus L.* (Hayıt) 'un Antimikrobiyal Aktivitesi, *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 11: 1-5.
- Eloff, J. N., (1988) Which Extractand Should be Used for the Screening and Isolation of Antimicrobial Components From Plants, *J Ethnopharmacol*, 60: 1-8.
- EL-Shazly, M., EL-Zayat, E., Hermersdörfer, H., (2000) Insecticidal activity, mammalian cytotoxicity and mutagenicity of an ethanolic extract from *Nerium oleander* (Apocynaceae), *Appl Biol* 136: 153-157.
- Erik S. ve Tarıkahya B., (2004) Türkiye florası üzerine. *Kebikeç*, 17: 139-163.
- Ertük, Ö., Demirbağ, Z., (2003) *Scorzonare mollis Bieb* (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, *Ekoloji-Çevre Dergisi* 12 (47): 27-31.
- Esen M., (2008) *Verbascum pinetorum (Boiss.) O. Kuntze* Bitki Özüünün Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Hatay.

- Facey, P.C., Pascoe, K.O., Porter, R.B., Jones, A.D., (1999) Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for antibacterial activity. *J Pharm Pharmacol* 51 (12): 1455-1460.
- Farnsworth, N. R., (1990) The role of ethnopharmacology in drug development, *Ciba Found Symp* 2: 11-21.
- Fotakis, G., Timbrell, J., (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160: 171–177.
- Gad, S.C., (2000) *In vitro toxicology*, 2, New York Taylor & Francis, 410s.
- Gold, H., Moellering, R., (1996) Antimicrobial-drug resistance. *New Engl. J Med* 335: 1445-1453.
- Güner, F., N. Özhatay., (2000) *Lathyrus L.*, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* vol. 11. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Hamburger, M., Hostettmann, K., (2000) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, 30: 3864-3874.
- Holst-Hansen, C., Brünner, N., (1998) *MTT Cell Proliferation Assay*, *Cell Biology: a Laboratory Handbook* San Diego: Academic Press. 16-18.
- İlçim, A., Dığrak, M., Bağcı, E., (1998) Bazı Bitki Özütlelerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, *Tr J Biology*, 22: 119-125.
- İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., Kıvanç, M., (2004) Bazı Umbelliferae Türlerinden Elde edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri. *14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 29-31 Mayıs 2002 Eskişehir, 355-366.
- Jayaraman, S., Manoharan, M., Seethalakshmi, Ianchezian , S., (2008) İn vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts, *Trop J Pharm Res*, 7 (4): 1143-1149.

- Kabouche, A., Boutaghane, N., Kabouche, Z., Seguin, E., Tillequin, F., Benlabeled, K., (2005) Components and antibacterial activity of the roots of *Salvia jaminiana*, *Fitoterapia*, 76: 450-452.
- Kamuhabwa, A., Nshimo, C., Witte, P., (2000) Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine, *J Ethnopharmacol*, 70: 143-149.
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., Adıgüzel, A., (2003) Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus L*, *J Ethnopharmacol*, 85(2): 231-235.
- Kaya Y., Aksakal Ö., (2005) Endemik bitkilerin Dünya ve Türkiye'deki Dağılımı, *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi*, 7(1): 85-99.
- Kayaalp, S. O., (2000) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe-Tas Kitapçılık, Ankara, 372-373.
- Kelmanson, J., Jäger, A., Van Staden, J., (2000) Zulu medicinal plants with antibacterial activity, *J Ethnopharmacol*, 69: 241–246.
- Khan, N., Quereshi, S., Pandey, A., Srivastava, A., (2009) Antibacterial Activity of Seed Extracts of Commercial and Wild Lathyrus Species, *Turk J Biol*, 33: 165-169.
- Kiska, D.L., (1998) In vitro testing of antimicrobial agents, *Ped Inf Dis*, 9 (4): 281-291.
- Klug, W., Cummings, M., (2002) *Genetik*, 6, Ankara Palme Yayıncılık, 635–651.
- Koller, W., Özgüven, M., Range P., (1999) Composition of essential oil of wild melisa, *Z Arzn Gew Pfl*, 4: 39-43.
- Korkmaz, S., (2002) *Paklitaksel, Kersetin ve Berberinin A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi*, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 157s.

- Kupica F., (1983) The infrageneric structure of *Lathyrus*, *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, 41: 209-244.
- Lawrey, JD., (1989) Lichen Secondary Compounds; Evidence for a Correspondence Between Antiherbivore and Antimicrobial Function, *The Bryologist*, 92 (3): 326-328.
- Lee, K., (1999) Anticancer drug design based on plant-derived natural products, *J Biomed Sci*, 6: 236-250.
- Lotufo L.V.C., Khan M.T.H., Ather A., Wilke D.V., Jimenez P.C., Pessoa C., Amaral de Moraes M.E., Odorico de Moraes M., (2005) Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine, *J Ethnopharmacol*, 99; 21-30.
- Maffei, M., Chialva, F. and Codignola, A., (1989) Essential oils and chromosome numbers from Italian *Achillea* species, *Ess Oil Res*, 2: 57-64.
- Mathabe, M.C., Nikolova, R., Laly, N., Nyazema, N.Z., (2006) Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa, *J Ethnopharmacol*, 107: 286-293.
- Mesquita, M., Paula, J., Pessoa, C., Moraes, M., Costa-Lotufo, L., Grougnet, R., Michel, S., (2009) Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, *J Ethnopharmacol*, 123: 439-445.
- Morse, D., Gray, H., Payne, C., Gillies, R., (2005) Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 4: 1495-1504.
- Mosmann, T., (1983) Rapid colorometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immunol Method*, 65: 55- 63.

- Mukhrizah, O., Hwei, S., Christophe, W., Teng Jin, K., Kuan Hon, L., Kang Nee, T., (2011) Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts, *J Microbiol Methods*, 84: 161–166.
- Nagamine, M., Silva, T., Matsuzaki, P., Pinello, K., Cogliati., Pizzo, C., Akisue, G., Haraguchi, M., Gorniak, S., Sinhoria, I., Raoa, K., Barbuto, J., Daglia, M., (2009) Cytotoxic effects of butanolic extract from *Paffia paniculata* (Brazilian Ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7, *Exp Mol Pathol*, 61:75–82.
- Nair, R., Kalariya, T., Chanda, S., (2005) Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora, *Turk J Biol*, 29: 41-47.
- Nalbantsoy, A., Tamiş, D., Akgün, I., Yalçın, T., Gürhan, İ., Karaboz, İ., (2008) Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Zingiber officinalis* Extracts, *J Pharm Sci*, 33: 77–86.
- Ncube, N., Afolayan, A., Okoh, A., (2008) Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends, *Afr J Biotechnol*, 7 (12): 1797-1806.
- Nguyen A.T., Fontaine J., Malonne H., Claeys M., Luhmer M. ve Duez P., (2005) A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*, *Phytochemistry*, 66: 1186-1191.
- Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D., Azeri, C., (2007) *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karşılaştırmalı Olarak Belirlenmesi, *Eko ve Çev Der*, 16,(62): 62-65.
- Oskay, M., Tamer, A.U., Ay, G., Sarı, D., Aktaş K., (2005) Antimicrobial Activity of The Leaves of *Lippia triphylla* (L'Her) O. Kuntze (Verbenaceae) Against on Bacteria and Yeasts, *Int J Biol Sci*, 5: 620–622.
- Özer, Z., Tursun, N., Önen, H., (2001) *Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam (Gıda ve Tedavi)*, 4Renk Yayınları, Ankara, 133s.

- Özmen, A., (2008) *Aydın Yöresinde Yetişen Bazı Endemik Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, 82s.
- Pırıldar, S., (2006) *Colchicum baytopiorum C.D. Brickell Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*, İstanbul Üniversitesi; Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD, Doktora Tezi, 184s.
- Poppenga, R. H., (2002) Herbal medicine: Potential for intoxication and interactions with conventional drugs, *Clin Tech Small Anim Pract*, 17: 6-18.
- Prayong, P., Barusrux, S., Weerapreeyakul, N., (2008) Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants, *Fitoterapia*, 79: 598-601.
- Putnam, K., Bombick, D., Doolittle, D., (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, *Toxicol In Vitro*, 16: 599-607.
- Rabe, T., Staden, J., (1997) Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes, *J Ethnopharmacol*, 56:81-87.
- Rajbhandari, M., Schöpke T., (1999) Antimicrobial activity of some Nepalese medicinal plants, *Pharmazie*, 54: 232-233.
- Rauha, J., Remes, S., Heinonen M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, *J Food Microbiol*, 56: 3-12.
- Recio, M.C., Rios, J.L., Villar, A., (1989) Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area, *Phytother Res*, 3: 77-80.
- Rios, J. L., Recio, M. C., (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 100: 80-84.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol*, 23: 127-149.

- Roy-Byrne, P.P., Bystritsky, A., Russo, J., Craske, M.G., Sherbourne, C.D., Stem, M.B., (2005) Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders, *Psychosomatics*, 46: 117–122.
- Ruacan, S., (2003) Karsinogenez, Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri, XV. Ulusal Kanser Kongresi, Nisan, 23, Antalya, 5–11.
- Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wagner, M.L., Calcagno, M.L., Campos, R.H., Cavallaro, L., (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line, *J Ethnopharmacol*, 79: 335–339.
- Rybak, M., (2004) Resistance to antimicrobial agents an update, *Pharmacotherapy*, 24: 203–215.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Houghton, P., Ignacimuthu, S., (2006) Purification of antibacterial agents from *Tragia Involucrata* a popular tribal medicine for wound healing, *J Ethnopharmacol*, 107: 99–106.
- Sibanda, T., Okoh, I., (2007) The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents, *Afr J Biotechnol*, 6 (25): 2886–2896.
- Sökmen, A., Jones, M.B., Ertürk M., (1999) The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants, *J Ethnopharmacol*, 67: 79–86.
- Stander, B.A., Marais, S., Steynberg, T.J., Theron D., Joubert, F., Albrecht, C., Joubert, A.M., (2007) Influence of *Sutherlandia frutescens* extracts on cell numbers, morphology and gene expression in MCF-7 cells, *J Ethnopharmacol*, 112: 312–318.
- Sudhakar, M., Rao, C., Rao, P., (2006) Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*, *Fitoterapia*, 77, 378–380.
- Tayarani-Najaran, Z., Mousavi, S., Asili, J., Emami, S., (2010) Growth-inhibitory effect of *Scutellaria lindbergii* in human cancer cell lines, *Food Chem Toxicol*, 48: 599–604.

- Tenover, F., Hughes J., (1996) The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of methicillin resistant bacterial pathogens, *J Am Med Assoc*, 275: 300-304.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., (2011) Phytochemical screening and extraction A Review, *Int Pharm Sci*, 1: 98-106.
- Toth, J., Mrlianova, M., Tekelova, D., Korenova, M., (2003) Rosmarinic acid - an important phenolic active compound of lemon balm (*Melisa officinalis* L.), *Acta Facult Pharm Univ Comenianae*, 50: 139-146.
- Turan, N., (2003) *Nerium oleander* Bitkisinin, Kök, Yaprak ve Gövde Özütlерinin Lösemi Hücrelerine Sitotoksik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 69s.
- Valsara,j R., Pushpangadan, P., Smitt U., Adsersen, A., Nyman, U., (1997) Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India, *J Ethnopharmacol*, 58: 75-83.
- Vandenbroucke-Grauls, C. M., (1993) The Threat of Multiresistant Microorganisms, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 12(1): 27-30.
- Verma S., Singh, S.K., Mathur, A., Singh, S., (2010) *In vitro* cytotoxicity of *Argemone mexicana* Against Different Human Cancer Cell Lines, *Int J Chem and Pharm Res*, 1 (1): 37-39.
- Vijayan, P., Kumar, S. V., Dhanaraj, S. A., Mukherjee, Suresh, B., (2003) *In vitro* cytotoxicity and antitumour properties of *Hypericum mysorens* and *Hypericum patulum*, *Phytother Res*, 17: 952–956.
- Vonderbank, H., (1949) Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose, *Pharmazie*, 4: 198-207.
- Wagnor, H.H., Farnsworth, N.R., (1989) Principle Pp. The Economic Significance of Plants and Their Constituents as Drugs, *London Academic Press*. 1-17.

- Wang, G.X., (2010) In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*, *Veterinary Parasitology*, 171: 305–313.
- Wink, M., (2003) Evolution of Secondary Metabolites From an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective, *Phytochem*, 64: 3-19.
- Yüce, A., Karaman, M., Gülay, Z. and Yulug, N., (2001) Vancomycin-resistant enterococci in neonates Scandinavian, *J Inf Dis*, 33: 803-805.
- Zhang, X., Pennec, G. L., Steffen, R., Müller, W. E. G., Zhang, W., (2004) Application of a MTT assay for screening nutritional factors in growth media of primary sponge cell culture, *Biotechnol Prog*, 20: 151–155.
- Zhao, Q., LI, B., Weber, N., Lou, Y., Proksch, P., (2005) Estrogen-like effects of ethanol extracts from several Chinese legumens on MCF-7 cell, *Eur Food Res Technol* 221: 828-833.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Fulya Çelebi
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 21/02/1986
Medeni Hali :Bekar
Telefon : 0 505 240 5658
E-posta : fulyaclbio@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2012

Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama			X
Okuma			X