



***ECHINOPHORA TENUIFOLIA VE CHENOPODIUM BOTRYS'UN***

***ESANSİYEL YAĞLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN***

**İNCELENMESİ**

**BEYZA HİLAL KESKİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

**PROF.DR. İSA KARAMAN**

**2019**

**Her hakkı saklıdır**

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***ECHINOPHORA TENUIFOLIA VE CHENOPODIUM BOTRYS'UN***  
**ESANSİYEL YAĞLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**BEYZA HİLAL KESKİN**

**TOKAT**  
**Ocak - 2019**

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2016/82 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Beyza Hilal KESKİN tarafından hazırlanan “*Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys*’un Esansiyel Yağlarının Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18 OCAK 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI ‘nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

PROF.DR. İSA KARAMAN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

Üye

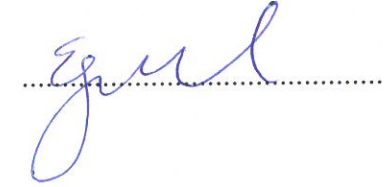
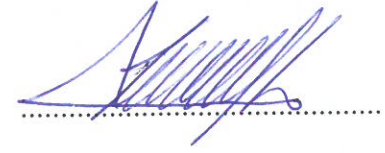
PROF.DR. İBRAHİM TÜRKEKUL

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

Üye

DOÇ.DR. EMEL ERGENE

ESKİŞEHİR TEKNİK ÜNİVERSİTESİ



Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

30.01/2019

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Beyza Hilal KESKİN**

**18 Ocak 2019**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

### *ECHINOPHORA TENUIFOLIA* VE *CHENOPODIUM BOTRYS*'UN ESANSİYEL YAĞLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

BEYZA HİLAL KESKİN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. İSA KARAMAN)

Esansiyel yağlar, aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak oluşan güçlü bir koku ile karakterize edilen uçucu kompleks bileşiklerdir. Bakterisid, böcek öldürücü, mantar öldürücü, antioksidan, antikanser, kardiyovasküler, kozmetik ve gıda uygulamaları için yaygın olarak kullanılırlar. Tıbbi bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar çeşitli kanser hücre dizilerinde apoptozun indüksiyonu ve yeni antikanser ajanlarının gelişimine umut veren bileşiklerdir. Bu tez çalışmasında *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys*'un Esansiyel Yağlarının Biyolojik Aktiviteleri incelenmiştir. Esansiyel yağlar disk difüzyon ve MİC testi ile 16 mikroorganizma üzerinde denenmiştir. Denenen mikroorganizmaların hepsinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Biyofilm inhibisyonu 6 mikroorganizma üzerinde denenmiş ve esansiyel yağlar biyofilm oluşumunu engellemiştir. DPPH Testinde *Echinophora Tenuifolia* için IC50 değeri 30,43384 µl/ml , *Chenopodium Botrys* IC50 değeri ise 487,591 µl/ml bulunmuştur. Sitotoksitite ve apoptotik etki deneyleri incelendiğinde *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının MDA-MB-231 hücrelerine bütün dozlar ve zamanlarda anlamlı bir etkisinin olduğu görülmüştür. *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının IC50 dozu 24 ve 48 saatte yaklaşık olarak 7 µl/ml ve 72 saatte yaklaşık 5 µl/ml yağ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağında ise IC50 dozu 48 saatte yaklaşık olarak 7 µl/ml ve 72 saatte 5 µl/ml yağ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının CCD-19Lu hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine göre etkisi daha düşüktür ancak buradada dozlardaki etki anlamlıdır. AO/EB floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde apoptotik etkinin olduğu görülmüştür ve iki yağ için sonuçların benzer olduğu görülmüştür. Sonuçlar bu esansiyel yağların daha ileri araştırmalara değer olduklarını göstermektedir.

2018, 56 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Echinophora Tenuifolia*, *Chenopodium Botrys*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan, sitotoksitite, apoptoz

## **ABSTRACT**

### **MASTER THESIS**

#### **INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ECHINOPHORA TENUIFOLIA AND CHENOPODIUM BOTRYS ESSENTIAL OIL**

**BEYZA HİLAL KESKİN**

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOENGINEERING**

**SUPERVISOR: PROF.DR. ISA KARAMAN**

Essential oils are volatile complex compounds characterized by a strong odor, which are formed as secondary metabolites by aromatic plants. They are widely used for bactericidal, insecticides, fungicides, antioxidants, anticancers, cardiovascular, cosmetic and food applications. Essential oils derived from medicinal plants are promising compounds for induction of apoptosis and development of new anticancer agents in various cancer cell lines. In this thesis, Biological Activities of Echinophora Tenuifolia and Chenopodium Botrys Essential Oils were investigated. Essential oils were tested on 16 microorganisms by disk diffusion and MIC test. Antimicrobial effect was observed in all of the microorganisms studied. Biofilm inhibition was tested on 6 microorganisms and essential oils prevented biofilm formation. In the DPPH test, the IC<sub>50</sub> value for Echinophora Tenuifolia was found to be 30,43384 µg / ml and for the Chenopodium Botrys IC<sub>50</sub> was found to be 487,591 µg / ml. Once cytotoxicity and apoptotic effect tests were examined, it was observed that Echinophora Tenuifolia and Chenopodium Botrys essential oils had a significant effect on MDA-MB-231 cells at all doses and times. The IC<sub>50</sub> dose of Chenopodium Botrys essential oil was determined to be approximately 7 µl / ml and approximately 5 µl / ml oil concentration to 72 hours at 24 and 48 hours. Echinophora Tenuifolia and Chenopodium Botrys essential oils have a lower effect on CCD-19Lu cells compared to MDA-MB-231 cells, but the effect in doses is significant. When the AO / EB fluorescence microscope images were examined, it was seen the apoptotic effect and was found that the results were similar for the two oils. The results show that these essential oils are worth further research.

2018, 56 Page

**KEYWORDS:** Echinophora Tenuifolia, Chenopodium Botrys, antimicrobial activity, antioxidant, cytotoxicity, apoptosis

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince desteği, tecrübesi ve emeğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. İsa KARAMAN'a, hücre kültürü çalışmalarımnda yardımını, desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Emel ERGENE'ye, ve çalışmalarım boyunca destek olan değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili babam Erhan ALAGÖZ'e, sevgili annem Zeynep ALAGÖZ'e ve sevgili kardeşim İclal Rumeysa ALAGÖZ'e ve sevgili eşim Bünyamin KESKİN'e teşekkür ederim.



**Beyza Hilal KESKİN**

**18 Ocak 2019**



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. <i>Chenopodium Botrys</i> ve Biyolojik Özellikleri.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. <i>Echinophora Tenuifolia</i> ve Biyolojik Özellikleri.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Biyofilmler.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Kanserin Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5. Meme Kanseri.....</b>	<b>9</b>
2.5.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması.....	9
2.5.2. Meme Kanseri Tedavisi.....	10
<b>2.6. Apoptozis.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Materyal.....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyaller.....	15
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	15
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları.....	15
3.1.4. Solvent ve Besiyerleri.....	15
3.1.5. Antibiyotik Diskleri , Antibiyotikler ve Kimyasallar.....	16
3.1.6. Hücre Kültürü Materyalleri.....	16
3.1.7. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	16
<b>3.2. Metod.....</b>	<b>16</b>
3.2.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması ve Kurutulması.....	16
3.2.2. Esansiyel Yağların Elde Edilmesi.....	17
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılacak Besiyerlerinin Hazırlanması.....	17

3.2.4. Mikroorganizma Kùltürlerinin Hazırlanması .....	18
3.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi .....	18
3.2.6. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) Testi.....	18
3.2.7. Biyofilm İnhibisyonu .....	19
3.2.8. DPPH Testi.....	19
3.2.9. Hücre Kùltürü Deneyleri .....	20
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Disk Difüzyon Zon Ölçümleri .....</b>	<b>24</b>
4.1.1. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağının Disk Difüzyon Zon Ölçümü Değerleri .....	24
4.1.2. <i>Echinophora tenuifolia</i> Esansiyel Yağının Disk Difüzyon Zon Ölçümü Değerleri .....	25
<b>4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC Testi).....</b>	<b>26</b>
4.2.1. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu27	
4.2.2. <i>Echinophora tenuifolia</i> Esansiyel Yağı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu.....	28
<b>4.3. Biyofilm İnhibisyonu.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4. DPPH Testi .....</b>	<b>29</b>
4.4.1. $\alpha$ -tokoferol'un IC50 Değerinin Hesaplanması .....	30
4.4.2. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağının IC50 Değerinin Hesaplanması ..	30
4.4.3. <i>Echinophora Tenuifolia</i> Esansiyel Yağının IC50 Değerinin Hesaplanması	31
<b>4.5. MTT Canlılık Testi İle Mitokondriyal Aktivite Belirlenmesi.....</b>	<b>32</b>
4.5.1. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağının MDA-MB-231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi .....	32
4.5.2. <i>Echinophora Tenuifolia</i> Esansiyel Yağının MDA-MB-231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi .....	33
4.5.3. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağının CCD-19Lu Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi .....	34
4.5.4. <i>Echinophora Tenuifolia</i> Esansiyel Yağının CCD-19Lu Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi .....	35
<b>4.6. Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) çift boyama .....</b>	<b>36</b>
4.6.1. <i>Chenopodium Botrys</i> Esansiyel Yağının Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) Çift Boyama ile MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi .....	36

4.6.2. <i>Echinophora Tenuifolia</i> Esansiyel Yağının Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) Çift Boyama ile MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi .....	39
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>42</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
°C	Santigrade Derece
l	Litre
g	Gram
mm	Milimetre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
rpm	revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
nm	Nanometre
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
AO	Akridin orange
B	Biyofilm oluşumu
CFP	Cepheperazone sulbaktam
CV	Kristal viyole
DMEM	Dulbecco's modified eafle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH	Difenil-1-pikrihidrazil
E	Eritromycin
EB	Etidyum bromide
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EO	Esansiyel yağ

EPS	Ekzoselüler polimerik madde
ER	Östrojen reseptörleri
FBS	Fetal bovine serum
FCA	Fluconozole
G	Pozitif kontrol
GM	Gentamycin
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü 2
IPM	İmipenem
MIC	Minium inhibisyon konsantrasyonu
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient broth
NC	Negatif kontrol
NS	Nystatin
NK	Negatif kontrol
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate buffered saline
PDA	Potato dextrose agar
PR	Progesteron reseptörleri
RNA	Ribo nükleik asit
S	Streptomycin
TE	Tetracycline
TSB	Tryptic soy broth

VOR

Voriconazole



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2. 1. <i>Chenopodium botrys</i> genel görünüşü .....	3
Şekil 2. 2. <i>Echinophora tenuifolia</i> genel görünüşü .....	6
Şekil 2. 3. Apoptozda iç ve dış yolağın uyarılması .....	12
Şekil 2. 4. Apoptoziz morfolojik değişimi.....	14
Şekil 4. 1. $\alpha$ - tokoferol Konsantrasyon- % PI grafiği .....	30
Şekil 4. 2. <i>Chenopodium Botrys</i> esansiyel yağı Konsantrasyon- % PI grafiği .....	31
Şekil 4. 3. <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağı Konsantrasyon- % PI grafiği.....	32
Şekil 4. 4. <i>Chenopodium Botrys</i> esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi *** $p<0.001$ .....	33
Şekil 4. 5. <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi *** $p<0.001$ .....	34
Şekil 4. 6. <i>Chenopodium Botrys</i> esansiyel yağının CCD-19-Lu hücre canlılığı üzerine etkisi ** $p<0.01$ , * $p<0.05$ (E.T: <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağı dozu, C.B: <i>Chenopodium botrys</i> esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol) .....	35
Şekil 4. 7. <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi ** $p<0.01$ , $p<0,05$ (E.T: <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağı dozu, C.B: <i>Chenopodium botrys</i> esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol) .....	36
Şekil 4.8.1.1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	37
Şekil 4.8.2. <i>Chenopodium Botrys</i> esansiyel yağı 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	37
Şekil 4.8.3. 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	37
Şekil 4.8.4. <i>Chenopodium Botrys</i> esansiyel yağı 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	38
Şekil 4.9.1. 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	39
Şekil 4.9.2. <i>Echinophora Tenuifolia</i> esansiyel yağı 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop) .....	39
Şekil 4.9.3. 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO 48saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop).....	40

- Şekil 4.9.4. Echinophora Tenuifolia esansiyel yağı 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop) ..... 40
- Şekil 4.10. Echinophora Tenuifolia ve Chenopodium Botrys esansiyel yağı apoptotik indeks \*\*\*  $p<0.001$  (E.T: Echinophora Tenuifolia esansiyel yağı dozu, C.B: Chenopodium botrys esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol)..... 41





## ÇİZELGELER LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2. 1. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar (Yıldırım ve ark., 2010).....	14
Çizelge 4. 1. Chenopodium Botrys esansiyel yağının disk difüzyon deneyi ile elde edilen inbisyon zon çapları (mm) .....	25
Çizelge 4. 2. Echinophora tenuifolia esansiyel yağının disk difüzyon deneyi ile elde edilen inbisyon zon çapları (mm) .....	26
Çizelge 4. 3.. Chenopodium botrys esansiyel yağının MİC değerleri ( $\mu\text{l} / \mu\text{l}$ ).....	27
Çizelge 4. 4. Echinophora tenuifolia esansiyel yağının MİC değerleri ( $\mu\text{l} / \mu\text{l}$ ) .....	28
Çizelge 4. 5. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar .....	29

## 1. GİRİŞ

Esansiyel yağlar tıbbi ve aromatik bitkilerin farklı organlarında değişik oranlarda bulunmaktadır. Oda sıcaklığında sıvı olan esansiyel yağlar, renksiz veya açık sarı renkte, yoğun kokuya sahip ve kristalleşebilen uçucu bileşiklerdir (Uçar ve ark., 2015).

Bitkilerden izole edilen esansiyel yağlar ve ikincil metabolitler, gıda ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmalarının yanı sıra tıpta birçok uygulamada kullanılırlar. Uçucu yağların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi olduğu ve insan sağlığına yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu özellikleri esansiyel yağların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmalarını sağlamaktadır (Ozer ve ark., 2017).

Dünya sağlık örgütünün bildirisine göre dünya nüfusunun %80'i yöresel ilaçlara, bitki ekstraktları yada onların aktif bileşenlerinin kullanıldığı geleneksel tedavilerin büyük bir kısmına güvenmektedir. Antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel kullanımından dolayı mikroorganizmaların birçok antibiyotiğe karşı dayanıklılığının artışı ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde oldukça büyük problem yaratmaktadır. Ayrıca antibiyotik hassasiyeti yüksek kişilerde yan etkili olduğu, bağırsak ve mukozal mikroorganizmaların yararlarını azalttığı, bağışıklık sisteminin baskılanmasını ve alerjik reaksiyonlara yol açtığı gözlemlenmiştir. Bundan dolayı hastalıkların tedavisinde alternatif antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Yerel tıbbi bitkiler, yeni antibakteriyel ve antifungal kemoterapötiklerin zengin bir kaynağı olarak gösterilmektedir (Korukluoğlu ve ark., 2006).

Tıbbi bitkilerden elde edilen uçucu yağlar halk tıbbında farklı hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkisel ilaçların çoğunun antioksidan özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal potansiyeli için de kullanıldığı bilinmektedir. Sentetik veya doğal antioksidanlar serbest radikallerin inhibisyonunda, membranların ve dokuların oksidatif hasarlardan korunmasında önemli rol oynamaktadır. Potansiyel olarak zararlı sentetik antioksidanlar hakkında artan endişe nedeniyle, şu anda doğal antioksidanlara ilgi artmaktadır. Meyveler, sebzeler ve tıbbi bitkilerde bulunan doğal antioksidanlar, hücrelerin hidrojen peroksitin zararlı etkilerinden koruyabilir ve koroner kalp hastalığı riskini azaltabilir. Bu nedenle, yeni ve etkili kaynakları bulmak için, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerine dayanarak fonksiyonel bileşikler içeren tıbbi bitkilerin taranması ile ilgili çalışmalar çok önemlidir (Gökbulut ve ark., 2013).

Biyofilm, bakterilerin polisakaritler, hücre dışı DNA ve proteinlerden oluşan bir hücre dışı matriste (EPS) birlikte yaşadığı ve farklı ortamlarda bakterilerin hayatta kalması için anahtar faktör kabul edilen bir mikrobik toplum olarak tanımlanır. Doğada, biyofilm hem abiyotik hem de biyotik yüzeylerde gelişebilir ve karmaşıklığı mikrobiyal hücrelere yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç kazandırır. Biyofilm oluşumunun önlenmesi, hücrelerin temas yüzeylerine sıkı sıkıya tutunmasını engellemek için yüzeylerin düzenli olarak temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi gerekir (Campana ve ark., 2017).

Biyofilm dezenfeksiyonunda yeni maddelerin araştırılması önemli bir odak noktasıdır. Sentetik kimyasallara karşı yakın zamanda artan olumsuz tüketici algılaması, bu araştırma gayretini doğal alternatiflere kaydırmıştır. Bu bağlamda, uçucu yağlar (EO), biyofilmi kontrol etmek için ikincil metabolitlerini veya bileşenlerini kullanabilme imkânı olan uygun alternatif doğal dezenfektanlar olarak ortaya çıkmaktadır (Campana ve ark., 2017).

Kanser, genel bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilen, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine değişkenlik gösteren karmaşık bir hastalıktır. Kanserler iki kalıtsal özellik ile tanımlanırlar. Bu özelliklerden biri kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki kontrol mekanizmalarına karşı koyarak çoğalmaları, diğeri ise başka hücreler için ayrılmış alanlara yayılıp ve yerleşebilmeleridir. Hücre çoğalmasındaki denetim kayboluyorsa bir tümör ya da neoplazmaya, yani anormal hücreler kitlesinin oluşumuna neden olur. Neoplastik hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durdukları sürece bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. İyi huylu tümörler genellikle etrafındaki normal dokuyu işgal etmez, eğer ederse de bu işgal sınırlıdır. Ancak bir tümör kötü huylu ise, yani hücreleri etrafındaki dokulara doğru yayılım özelliği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir. Bu yayılma veya istila genellikle bütünlüğü bozma, kan dolaşımına ya da lenf damarlarına girme ve vücudun diğer bölgelerinde, metastaz olarak adlandırılan ikincil tümörler oluşturma yeteneğini ifade etmektedir (Sağlam, 2014).

Bu tez çalışmasının amacı *Echinophora tenuifolia* ve *Chenopodium botrys* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal, biyofilm oluşumu, antioksidan, sitotoksik ve antikanserojen özelliklerinin incelenmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Chenopodium Botrys* ve Biyolojik Özellikleri

*Chenopodiaceae*, yaklaşık 102 cins ve 1400 türden oluşan geniş bir ailedir. *Chenopodiaceae*, çoğunlukla ılıman ve subtropikal tuzlu yaşam ortamlarında yaygın olarak bulunan çok yıllık çok sayıda ottan oluşan geniş bir ailedir (Mahboubi ve ark., 2011; Andov ve ark., 2014).

*Chenopodiaceae* familyasının bir üyesi olan *Chenopodium* cinsi, 100'den fazla tür içermektedir. *Chenopodium* türleri, otsu bitki ya da çalılar ve küçük ağaçlar halinde büyüyebilir ve esasen aromatik değillerdir. Yalnızca karakteristik kimyasal bileşimi olan uçucu yağ üreten az sayıdaki tür bulunur. *Chenopodium botrys* genel görünüşü Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Mahboubi ve ark., 2011; Andov ve ark., 2014; Tzakou ve ark., 2017).



**Şekil 2. 1.** *Chenopodium botrys* genel görünüşü

*Chenopodium botrys*, *Pinus halepensis* olarak bilinen *Chenopodiaceae* ailesinin bir üyesidir. *Chenopodium botrys*, Avrupa'ya ve Asya'ya özgü olup, Kuzey Amerika'nın büyük bölümünde adventiftir. Bitki, geleneksel olarak tıbbi amaçlar için kullanılmıştır; Genellikle, *C.botrylerin* bu terapötik kullanımları ve sağlığa olan faydaları, bilimsel destek olmaktan ziyade folkloraya dayanmaktadır; bu da, fitokimyasal içerik, in vitro deneyler, hayvan modelleri ve araştırmalarda bulunan insan çalışmaları da dahil olmak üzere belgeler toplamak için iyi bir adaydır. *C. botrys*, tütsü kokusunu andıran yoğun karakteristik kokusu olan uçucu yağ üreten glandüler trikomlara sahiptir. Bu bitkinin

uçucu yağı incelenmiş ve bazı oksijen içeren seskiterpenlerin varlığı belirgin antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği görülmüştür (Mahboubi ve ark., 2011; Andov ve ark., 2014; Morteza-Semnani, 2017).

Bitki, pektoral şikayet, öksürük, karın ağrısı, akciğer tıkanıklığı ve sinirsel etkiler gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde uygulamaları ile ünlüdür. Birçok ülkenin geleneksel tıbbında, *C. botry*'lerden hazırlanan ekstraktlar (sıvı halde), diüretik, antispazmodik, karminatif, antidiyareik özelliklere sahip ilaçlar olarak ve antikonvülsan ve tonik etkili balgam söktürücü olarak kullanılır. *C. botrys*'in yaprakları şiddetli baş ağrılarının tedavisinde etkili bulunmuştur ve tohumlarının kaynatılması, özellikle çocuklarda tenya sıçraması vakalarında kullanılmıştır. Avrupa'da, *C. botrys*, katar ve humoral astım tedavisinde kullanılmıştır. Bazı raporlar, bitkinin yeni ilaç kaynakları geliştirme tıbbi potansiyelini desteklemektedir (Bojilov ve ark., 2017; ).

İran geleneksel ilaçlarında, *C. botrys*'in çiçekli hava kısımları, uzun süre balgam söktürücü, antiasmatik, antikatarr, antikonvülsan ajan ve tonik olarak kullanılmıştır. Birçok durumda, güvelerden uzak durmak içinde lavanta yerine *C. botrys* kullanılmıştır. Buna ek olarak, *Chenopodium botrylerin* hava kısımlarının flavon krizeriol içerdiği bildirilmiştir. Ahmad ve ark.'nın yaptığı araştırmalara göre; Pakistan'da, *C. botrys*, aynı zamanda halk tarafından antihipertansif ajan olarak kullanılmaktadır (Mahboubi ve ark., 2011; Rauf ve ark., 2017; Ozer ve ark., 2017)

*C.botrys* flavonoidler, çeşitli alkaloidler ve terpenoidler içerir. Farklı kökenli *C. Botrys* % 0.08-2 öz yağ vermektedir. Farmakolojik raporlar, *C. botrylerin* yeni ilaç geliştirme tıbbi potansiyelini desteklemektedir. Farklı kökenlerden *C. botrys* yağı içerisinde ascaridole ait farklı izomerler tespit edilmiştir. Bazı raporlarda, bu bileşikler yağın temel bileşenleridir. Ascaridole, anthelmintik, antifungal, sedatif ve ağrı gidericiler gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Ascaridole ayrıca in vitro olarak farklı tümör hücre çizgilerine karşı aktivite göstermiştir. Bu veriler, *C. botrylerin* kanser tedavisi için ilginç yeni bir ada bitkisi olabileceğini düşündürmektedir, ancak bu olasılığı doğrulamak için birçok çalışma gerekmektedir (Morteza-Semnani, 2017).

Belli bir bitki türünden uçucu yağın kimyasal bileşimi hasat mevsimi, çeşidi, büyüme evresi, toplanma tarihi, ekstraksiyon yöntemi ve coğrafi kaynaklar arasında farklılık gösterebilir. Aynı bitkinin farklı bölümleri uçucu yağının kimyasal bileşimi büyük

oranda etkileyebilir. Yağın kimyasal bileşimi, diğer ülkelerden ve İran'dan gelen diğer raporlarda farklılık göstermektedir. *C. botrys* uçucu yağın kimyasal bileşimleri araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir; Yunanistan'da bulunan *C.botrys* esansiyel yağında elementol asetat (% 16.3), elemol (% 14.1), botrydiol (% 11.1),  $\alpha$ -chenopodiol (% 9.5),  $\beta$ -eudesmol (% 7.0) ve selina-3-11-dien -6  $\alpha$ -ol (% 6.1) 3; iranda iki farklı yerden elde edilen yağda; ardiç kafuru (% 16.5 ve% 25.7), elemol (% 14.3 ve% 13.4) ve  $\alpha$ -cadinol (% 8.2 ve% 11.6) 4, Suudi Arabistan;  $\alpha$ - ve  $\beta$ -eudesmol 6, Kuzey Amerika'dan;  $\alpha$ -chenopodiol,  $\beta$ -chenopodiol, eudesma 3,11-dien-6-ol 7 yağın ana bileşenleridir. İran'da yapılan diğer araştırmalar, yağın ana bileşenleri olarak  $\gamma$ -terpineol (% 52.8), p-simen (% 19.0) ve izoasiridol (% 7.0) varlığını ortaya koymuştur (Mahboubi ve ark., 2011).

Araştırmalarda bitki flavonoidlerinin tıbbi yararları, serbest radikallere karşı aktiviteleri, antibakteriyel ve anti-kanserojenik özelliklerinden dolayı doğal tıbbın ilaç formülasyonunda kullanımının önemi artmaktadır. *C. botrys*'den (Morteza-Semnani, 2015) birkaç flavonoid, alkaloid ve terpenoid izole edilmiş olmasına rağmen, *C. botrylerin* kimyası ve farmakolojik etkisi ayrıntılı olarak bilinmemektedir ( Mahboubi ve ark., 2011; Bojilov ve ark., 2017).

## **2.2. *Echinophora Tenuifolia* ve Biyolojik Özellikleri**

*Echinophora* (Apiaceae), Akdeniz bölgesinden Afganistan'a dağılan yaklaşık 10 türden oluşmaktadır. Türkiye florasında üç endemik tür de dahil olmak üzere altı tür tarafından temsil edilmektedir. *Echinophora* türleri, Anadolu'nun düşük yağış alan yerlerde doğal olarak yetişir, yaraları iyileştirmek, antimikrobiyal aktivite, yağ asidi ve sindirim özelliklerinden dolayı gastrik ülseri tedavi etmek için halk hekimliğinde kullanılır (Çetin ve ark., 2015; Şanlı ve ark., 2016).

*Echinophora tenuifolia* , yerel olarak 'çörtük', 'çördük', 'tarhana otu' ve 'turşu otu' olarak adlandırılmaktadır. *E. tenuifolia*, 20-50 cm uzunluğunda, sarı yaprakları olan ve kuru yerlerde yetişen greyish-tüylü, çok yıllık bir bitkidir. *E. tenuifolia*'nın taze ve kurutulmuş yaprakları ve çiçek açan dalları, etli yemekler, turşu ve çikolata aromaları için lezzetlendirici olarak kullanılmaktadır. Türkiye de ise yaraların, mide ülseri ve sindirim bozukluğunun tedavisinde taze veya kurutulmuş olarak kullanılmaktadır .

*Echinophora tenuifolia* genel görünüşü Şekil 1.2’de gösterilmiştir.(Baser ve ark., 2011; Gokbulut ve ark., 2013; Çetin ve ark., 2015; Marelli ve ark., 2017).



**Şekil 2. 2.** *Echinophora tenuifolia* genel görünüşü

### **2.3. Biyofilmler**

Biyofilmler, yüzeylere güçlü bir şekilde yapışmış hücre yığınları ve yapışkan polisakkaritler ile çevrelenmiş mikroorganizma topluluğudur. Biyofilm ile ilişkili hücreler, ekso polisakkaritler, proteinler ve DNA’dan oluşan bir hücre dışı matris tarafından korunmaktadır (Szczepanski ve Lipski, 2014).

Hücreler arası iletişim, biyofilm gelişimi ve devamlılığında önemlidir. Bir yüzeye bir hücrenin tutunması biyofilm-spesifik genlerin ifadesi için bir sinyaldir. Bu genler hücreler arası sinyal molekülleri sentezleyen ve polisakkarit oluşumunu başlatan proteinleri kodlar. Bilinen bir biyofilm oluşturucu olan pseudomonas aeruginosa’da, ana sinyal molekül homoserin laktonlar denen bileşiklerdir. Bu moleküller biriktiğinde, bu moleküller *P. Aeruginosa* hücrelerinin yakınında toplanan kemotaktik ajanlar olarak quorum sensing denen mekanizma ile iş görürler ve bunun sonunca biyofilm gelişir (Madıgan ve Martinko, 2010).

Biyofilm oluşumunda rol alan rol alan proteinleri kodlayan lux operonlar LuxR adında aktivatör proteinin kontrolü altındadır ve AHL (N-3-oksoheksanoil homoserin lakton)’nin konsantrasyonu yeterince yüksek olduğu zaman uyarılır. Bu AHL luxI geni



tarafından kodlanan protein tarafından sentezlenir. Bu genler P. Aeruginosa hücrelerinin sıvıda serbestçe süspansiyon halinde büyümeleri yerine biyofilm adında yarı katı bir matris oluşturarak büyümelerini sağlar. Özel polisakkaritlerden oluşan biyofilm organizmanın patojenitesini artırır ve antibiyotiklerin penetrasyonunu önler (Madıgan ve Martıno, 2010).

Biyofilmler, antibiyotiklere planktonik hücrelere göre 1000 kat daha fazla direnç gösterirler. Bu, biyofilmleri klinik ortamlarda özellikle önemli kılar; çünkü biyofilm varlığı genellikle hasta sağlığı açısından ciddi komplikasyonlar oluştururken, bunların uzaklaştırılması birçok zorluk getirir. Biyofilm ile ilişkili hücrelerin bu özellikleri nedeniyle, biyofilm oluşumunun ilk aşamasında belirli işlemleri engelleyen ve dolayısıyla biyositler ve dezenfektanlara karşı artan direnci ile olgun biyofilmlerin oluşumunu önleyen maddelere karşı büyük ve artan bir ilgi vardır. . Mevcut bilimsel kanıtlar, olgun biyofilmlerin sodyum hipoklorit, kuaterner amonyum tuzları, fenolik dezenfektanlar, hidrojen peroksit ve gümüş iyonları gibi sıvı kimyasal dezenfektanlara duyarlılığının azaldığını ortaya koymuştur. Bu ajanlardan birçoğu, özellikle de yüksek organik madde yükleri varlığında, doğru bir dezenfeksiyon için çok uzun bir temas süresi gerektirir (Sieniawska ve ark., 2013; Szczepanski ve Lipski, 2014; Myszkowski ve ark., 2016).

Biyofilm kontrolü büyük bir iştir ve bu işi başaracak sınırlı düzeyde araç vardır. Boruları ve diğer yüzeyleri biyofilmlerden arındırmak için bir çok endüstri kuruluşu her yıl milyarlarca dolar harcamaktadır. Biyofilmlere nüfuz eden yeni antibiyotikler ve hücrelerarası iletişimi bozarak biyofilm oluşumunu önleyen bir takım ilaçlar geliştirilmektedir (Madıgan ve Martıno, 2010).

#### **2.4. Kanserin Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları**

Kanser, genellikle hücrelerin büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden mekanizmaların hatalarından kaynaklanır. Normal büyüme oranlarını kontrol altında tutan mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar, aşırı hücre bölünmesine neden olur ve kanser oluşur (Lodish ve ark., 2011).

Birçok veya tüm kanser olgularına neden olan hücresel düzenlemenin kaybı genellikle tümör oluşturucu kimyasallar, hormonlar ve bazen virüslerin etkisiyle birlikte yürüyen genetik bozulmaların sonucudur. Kansere iki geniş gen grubundaki mutasyonlarla



ilişkilidir: **proto-onkogenler** ve **tümör baskılayıcı (süpresör) genler**. Proto-onkogenler normalde hücre büyümesini teşvik eder; bu genler mutasyonlarla **onkogenlere** dönüşerek büyümenin teşvik edilmesinde genin aşırı aktif olmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise normalde büyümeyi sınırlarlar. Eğer bunlar mutasyon ile inaktive olurlarsa, bunu olağan dışı hücre büyümesi takip eder (Lodish ve ark., 2011).

Onkogen aktivasyonları nokta mutasyonları, kromozom translokasyonu ve gen amplifikasyonu sonucunda gerçekleşebilmektedir. Aktive olan onkogenler hücre çoğalmasını tetikleyen proteinleri kodlamaya başlar. Söz konusu proteinler; büyüme faktörlerinin hücre membranı üzerindeki reseptörlere bağlanmasından, genetik materyalin transkripsiyonuna kadar her aşamayı etkilemektedir (Paşalak ve Seven, 2017).

Tümör baskılayıcı genler ise hücre çoğalmasının kontrolünde onkogenlerin tam tersi yönünde hareket ederek normal şartlarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskırlar. Çoğu tümörde bu genlerin hasar görmesi ya da aktivitelerinin bozulmasıyla tümör hücreleri anormal çoğalabilirler(Cooper ve ark., 2006).

Koruyucu genler olarak adlandırılan daha özelleşmiş üçüncü bir gen sınıfı da genellikle kanserle ilişkilendirilir. Koruyucu genler normal olarak genomun bütünlüğünü korurlar; bu genler inaktif olduğunda hücreler büyümenin kontrolünü hasara uğratan ve kansere neden olan mutasyonlarda dahil olmak üzere ek mutasyonlara uğrarlar. DNA tamir enzimlerini kodlayan genler gibi koruyucu genlerde meydana gelen işlev kaybı mutasyonları, hücrelerin tümör baskılayıcı genleri inaktive eden veya onkogenleri aktive eden mutasyonları düzeltmesini engeller (Lodish ve ark., 2011).

Kanserler iki kalıtsal özellik ile tanımlanırlar. Bu özelliklerden biri kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki kontrol mekanizmalarına karşı koyarak çoğalmaları, diğeri ise başka hücreler için ayrılmış alanlara yayılıp ve yerleşebilmeleridir. Hücre çoğalmasındaki denetim kayboluyorsa bir tümör ya da neoplazmaya, yani anormal hücreler kitlesinin oluşumuna neden olur. Neoplastik hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durdukları sürece bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. İyi huylu tümörler genellikle etrafındaki normal dokuyu işgal etmez, eğer ederse de bu işgal sınırlıdır. Ancak bir tümör kötü huylu ise, yani hücreleri etrafındaki dokulara doğru yayılım

özelliği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir. Bu yayılma veya istila genellikle bütünlüğü bozma, kan dolaşımına ya da lenf damarlarına girme ve vücudun diğer bölgelerinde, metastaz olarak adlandırılan ikincil tümörler oluşturma yeteneğini ifade etmektedir (Cooper ve ark., 2006).

Özetle, kansere sebep olan etmen her ne olursa olsun, sonuçta hücrenin genetik malzemesinde bozulma meydana gelir. Tek bir gendeki mutasyondan çok, birkaç gende birden oluşan hasar (hücre sayısının artması yönünde çalışan genler oncogenler, tümör önleyici genler ve DNA onarım genleri) kanser oluşumunda rol oynamaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

## **2.5. Meme Kanseri**

Meme kanseri dünya genelindeki kadınlar arasında en sık görülen neoplazi olup 2012’de yaklaşık 1.67 milyon yeni vaka ve bu vakaların yaklaşık 500.000’den fazlası ölümlle sonuçlanmıştır. Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanser tiplerinin % 25’ini oluşurmaktadır (Melo ve ark., 2016; Chan ve ark., 2017).

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan heterojen özellik göstermektedir. Bu yüzden kanser gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların ve her hastanın tümörünün özelliklerinin belirlenmesi ve buna en uygun tedavi yönteminin uygulanması büyük önem taşımaktadır (Sağlam, 2014).

Olguların yarısında bilinen risk faktörleri arasında menarş yaşı, ilk canlı doğum yaşı, menapoz yaşı, proliferatif meme hastalığı gibi faktörler bulunabilir. Olguların %65-75’i sporadik meme kanseridir. Yüzde 20-30 olguda pozitif aile öyküsü bulunmaktadır ve sadece %5-10 olguda genetik meme kanseri saptanmaktadır. Meme kanseri risk faktörlerinin anlaşılması, riskli olguların saptanmasında ve izlenmesinde yararlı olacaktır. Bunlar dışında yaş, aile öyküsü, oral kontraseptiflerin kullanımı, radyasyona maruz kalma, alkol kullanımı ve iyi huylu meme hastalığı gibi nedenler de meme kanseri risk faktörleri arasındadır (Çamyar, 2011; İşlen, 2017).

### **2.5.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması**

Meme kanserleri içerisinde gen ekspresyon farklılıklarını belirleyen, ilk kapsamlı ve çığır açan girişim 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi ve meme tümörleri 4 ana gruba ayrılmıştır:

- 1) Luminal hücre benzeri,
- 2) Bazal hücre benzeri,
- 3) Normal epitel benzeri
- 4) HER2 pozitif grup

Tümör oluşumu ve ilerlemesi genellikle meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptörleri (ER), progesteron reseptörleri (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü-2 reseptörleri (HER-2) ile ilgilidir. Bu nedenle meme kanseri reseptör durumuna göre sınıflandırılabilir. İmmüno histokimya östrojen reseptörünün varlığına göre tümörlerin östrojen reseptörü pozitif (ER+) ve östrojen reseptörü negatif (ER-) olarak sınıflandırılmasında kullanılır. FISH, insan epidermal büyüme faktörü-2 reseptörünün varlığına göre meme tümörlerinin HER-2 amplifikasyonu olan veya olmayan olarak sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. Reseptör tipine bağlı olarak yapılan meme kanseri sınıflandırması kanser hücrelerinin klinik sonuçlarının ve prognozunun iyileştirilmesine ve hastaların tedavisinde reseptörün etkisini inhibe eden anti-reseptör ajanların kullanılmasına imkan sağlar (Nıtwa, 2015).

### **2.5.2. Meme Kanseri Tedavisi**

Kanser; hastalığı saptamada, cerrahi işlemlerde, kemoterapi ve radyoterapide gelişmiş teknikler olmasına rağmen hala tedavisi zor bir hastalıktır. Erken evre meme kanserinde genellikle uygulanan tedavi cerrahi müdahaledir. Son zamanlarda birçok araştırmacı reseptörlerin ve büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, tümör süpresör geni inaktivasyonu ve onkogen aktivasyonlarının invaziv ve dirençli bir kanser fenotipinin gelişmesinin temel nedeni olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hücre içi sinyal yollarındaki işlev bozukluklarının da aynı zamanda kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir (İşlen, 2017).

Meme kanseri cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi gibi farklı tedavi şekillerinin birleşimi ile tedavi edilir. İlk basamak tümörlerin cerrahi müdahale ile alınıp en kötü prognostik faktör olan metastatik tümör özeleklerinin aranması için incelenmesidir. Primer tümörler kolaylıkla tedavi edilebilirken metastatik tümörler hastanın ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, tümör metastazlarının oluşumunu ve gelişimini incelemek zorunludur (Lodish ve ark., 2011; Cong ve ark., 2017).

Moleküler hücre biyolojisi tekniklerinin hem iyileştirici hem de hafifletici tedavileri nasıl etkilediğini göstermek için meme kanseri iyi bir örnektir. Kanser hücrelerinde hormon-reseptör varlığını gösteren moleküler veriler kullanılarak gerçekleştirilen tamoksifen gibi hormon bloke edici tedaviler sayesinde kansere yakalanma riski %10-15 oranında azaltılabilmektedir. HER2/NEU onkoproteinine karşı antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen tedavide ölüm oranı %5-10 oranında azaltılmıştır. Bu nedenle moleküler biyoloji meme kanseri hastalarının iyileşmesi üzerinde çok büyük bir öneme sahiptir ve yeni yöntemler geliştirebilmek için aydınlatılması gereken pek çok mekanizma vardır (Lodish ve ark., 2011).

## 2.6. Apoptozis

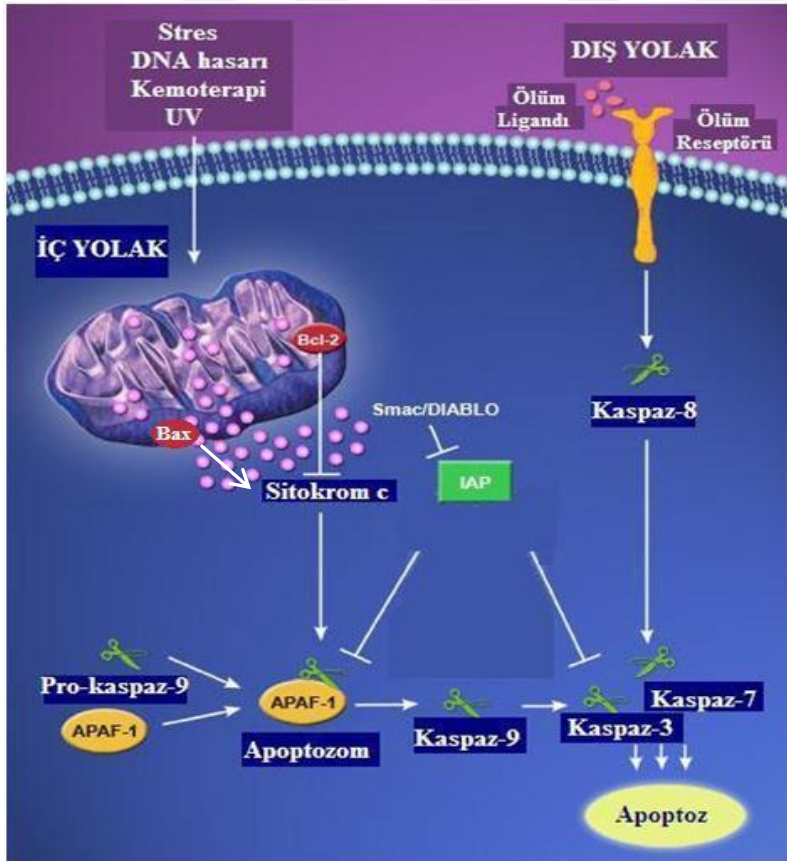
**Apoptozis**, ya da **programlı hücre ölümü**, organizmanın gelişimi sırasında, sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir süreçtir. Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Programlanmış hücre ölümü, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağımlı atrofi ve embriyonik beyin gelişimi gibi birçok biyolojik işlemde sorumlu olan dikkatle düzenlenmiş bir mekanizmadır (Yıldırım ve ark., 2010; Martinez ve ark., 2010).

Yaşamsal işlevini bitiren hücreler programlanmış hücre ölümü ile yok edilmektedirler. Hücrede apoptozun düzenlenmesinde sistein proteazlar (kaspazlar; kaspaz-8, 9 ve 3) ve Bcl-2 (kaspaz aktivasyonunu düzenler) gen ailesi olmak üzere iki protein ailesi önemli rol oynar. Apoptozu düzenleyen genlerin mutasyonu da kanser oluşumuna yol açmaktadır. Hücrenin yaşaması apoptozu uyaran ve inhibe eden genlere bağlıdır. Bu genler; Bcl-2 (antiapoptotik), Bax ve p53 (apoptotik) genleridir. Başta p53 proteinindeki mutasyonlar yoluyla apoptotik direnç, birçok kanser ilacını etkisiz hale getirir. Apoptoz hem sağlıklı organizma işlevinde hem de hastalıklarda böylesine büyük bir rol oynadığından, moleküler düzeyde mekanizmaları anlamak hastalıklar hakkında daha derin bir bilgi sağlayarak tedavi ve teşhis konusundaki ilerlemeleri etkileyebilir (Martinez ve ark.,2010; Yokuş ve Çakır, 2012).

Doğadaki birçok canlının embriyo döneminden yaşlanıp ölüncüye kadarki yaşam süreçlerinde görülen sayısız biyolojik olayların ve hastalıkların ortaya çıkma mekanizmalarında, herhangi bir nedenle stabilitesi bozularak, artık organizma için

zararlı hale gelen hücrelerin yok oluş evrelerinde apoptoz ve sağkalım mekanizmaları çok büyük önem taşır. Apoptoz ve hücre sağkalımının hüresel mekanizmalarının ortaya konması, kalp hastalıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, AIDS ve birçok hastalığın tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin ortaya atılmasına olanak sağlamıştır (Gültekin ve ark., 2008).

Apoptoz ve hastalıkların düzenlenmesindeki değişiklikler arasında güçlü bir korelasyon vardır. Hücre büyümesi ile hücre ölümü arasındaki denge düzgün bir şekilde düzenlenmediğinde doku ve daha sonra ilgili organda işlev bozukluğu meydana gelir. Apoptoz, yalnızca hücre sayısını ve doku boyutunu kontrol etmek için bir mekanizma değil, aynı zamanda enfekte olmuş, hasar görmüş veya stres altındaki hücreleri organizmadan çıkarmak için bir mekanizmadır. Bununla birlikte, bazı virüsler ve bakteriler, apoptoz mekanizmalarını önleme yeteneğini geliştirmiştir. Apoptozda iç ve dış yolağın uyarılması Şekil 2.3' gösterilmiştir (Martinez ve ark., 2010).



Şekil 2.3. Apoptozda iç ve dış yolağın uyarılması

**P53 aracılı apoptosis:** p53 ve Bcl-2 programlı hücre ölümünde anahtar rol oynayan genlerdir. Normalde p53 hücre akıbetini belirleyen moleküler ağı düzenler. cMyc

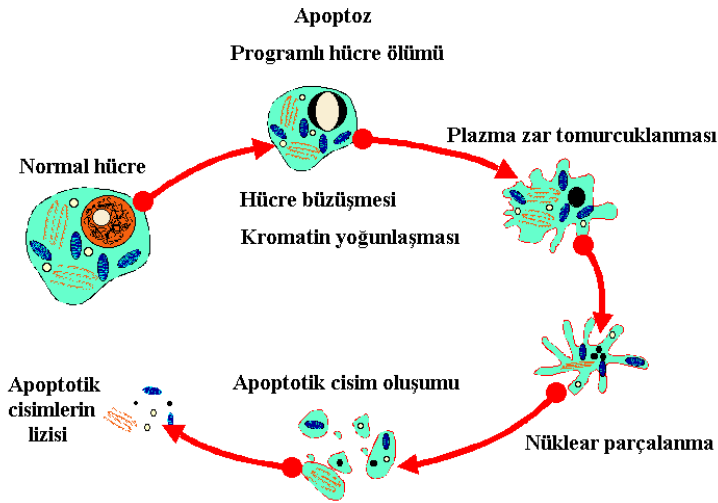
(nükleer fosfoprotein) p53 'ü seçici olarak aktive eder ve p53 apoptozisi başlatır. Nükleer fosfo protein cMyc ,Fas ligand ve Fas reseptörle birleşir. Bu proteinin p53 bağımlı ve bağımsız yollar ile sitokrom c salınımını indükleyen bax'ın transkripsiyonunu düzenlediği de düşünülmektedir. Hasarlı hücrelerde fonksiyonel p53 yoksa, hücre siklusu kontrol noktaları tarafından kontrol edilmeden siklus ilerler. p53 'ün düzenleyici aktivitesini geçtiğini gösteren alternatif yol ise p53'un negatif düzenleyicisi Mdm2 (murine double minute 2) dir. Mdm2 proteini, p53'ü kontrol altında tutar ve p53'ün G1 /S geçişinde siklusu durdurmasını ve apoptozisi engeller. Radyasyon ve benzeri etkenlerle hücre etkilendiğinde Mdm2 proteininin p53 bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu nedenle Mdm2 p53'ü bağlayamaz ve serbest p53 transkripsiyonel aktivitesi ile G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusu durdurur ve bax genini aktive ederek apoptozise neden olur. Mdm2 , p53'ün transkripsiyonunu azaltır ya da p53'e bağlanarak aktivitesini inhibe edebilir. Lösemi, lenfoma, sarkoma glioma ve meme kanserinde Mdm2 gen amplifikasyonu gösterilmiştir. Çok organize bir işlem olan apoptozis zararlı ve anormal hücrelerin yıkımını sağlamaktadır . Apoptozis yolunda iki düzeyde mekanizma bozuklukları görülür:

1. Apoptozisi düzenleyen genlerde mutasyon ve bu nedenle apoptozise gitmeyen hücrelerin yaşamasıdır,
2. Apoptozise direnç geliştiren hücrelerin Darwinizm (doğal seçim) ile seçilip yaşamaya devam etmesidir (Cabadak,2008).

Apoptozun aksine, doku hasarı nedeniyle ölen hücreler, nekroz olarak adlandırılan, çok farklı morfolojik değişiklikler gösterirler. Bu süreçten geçen hücrelertipik olarak şişip patlar, bu süreçte çevre hücrelere zarar verebilecek ve sıklıkla da inflamasyona yol açabilecek hücre içi içeriklerini dışarı salarlar. Nekroz ve apoptoziste görülen değişimler Tablo 2..1 ve Şekil 2.4'de gösterilmektedir (Lodish ve ark., 2011).

**Çizelge 2. 1. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar (Yıldırım ve ark., 2010).**

<b>Apoptozis</b>	<b>Nekroz</b>
Kromatin kondensasyonu	Çekirdeğin şişmesi
Hücre küçülmesi	Hücrenin büyümesi ve şişmesi
Eliminasyon-fagositoz	Hücre parçalanması ve dağılması
DNA fragmentasyonu	Enflamasyon



**Şekil 2. 4. Apoptozis morfolojik değişimi**

### **3. MATERYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyaller**

Çalışmamızda kullanılan, ülkemiz florasında bulunan *Chenopodium botrys* ve *Echinophora tenuifolia* Tokat yöresinden toplanmıştır.

##### **3.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar**

Bu çalışmada Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınan ; *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* hastane suşları kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları**

Çalışmada Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Hücre Kültürü Laboratuvarı koleksiyonu olan ATCC hücre bankasından satın alınan yüksek derecede invazif olan ve metastatik özelliğe sahip MDA-MB-231 (İnsan, epitel, meme bezi) ve CCD-19Lu (insan, fibroblast, akciğer) hücre hatları kullanılmıştır.

##### **3.1.4. Solvent ve Besiyerleri**

Çalışmada; bakterilerin büyütülmesi için Nutrient Agar (NA) ve mayaların büyütülmesi için Potota Dextrose Agar katı genel besiyeri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testlerinde ise Tryptic Soy Broth (TSB) ve Dimetil sülfoksit (DMSO) solventi kullanılmıştır. Biyofilm testinde ise nutrient broth (NB) sıvı genel besiyeri kullanılmıştır. DPPH testinde solvent olarak etanol kullanılmıştır.



### **3.1.5. Antibiyotik Diskleri, Antibiyotikler ve Kimyasallar**

Çalışmada disk difüzyon yönteminde pozitif kontrol olarak; imipenem (Oxoid), tetracycline (Oxoid), gentamycin (Oxoid), eritromycin (Oxoid), streptomycin (Oxoid), cephoperazone (Oxoid), fluconozole (Oxoid), nystatin (Oxoid) ve variconozole (Oxoid) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

MİC Testi için pozitif kontrol olarak metronidazol, ciproflacacin ve tetracycline antibiyotikleri kullanılmıştır.

DPPH Testi için toz DPPH (Sigma) ve  $\alpha$ -tokoferol (Sigma) kullanılmıştır.

### **3.1.6. Hücre Kültürü Materyalleri**

Hücre kültürü çalışmalarında; RPMI-1640(Sigma), DMEM(Sigma), Fetal Bovin Serum (Sigma), Penisilin/Streptomisin(10000 unit penisilin), 10 mg streptomisin)(PAA) , Trypsin-EDTA, Dimetil sülfoksit (Sigma), Trypan blue, PBS tablet (Amresco), MTT (Applichem) , akridine orange (Sigma) ve etidyum bromit (Sigma) kullanılmıştır.

### **3.1.7. Kullanılan Sarf Malzemeleri**

Deneylerde sarf malzemesi olarak; petri kabı (İsolab), cam tüp, polisitren tüp (Orlab), beher, balon joje, erlen, cam pipet, cam pastör pipet, santrifij tüpü (İsolab), cam şişe, duran şişe, metalik pipet kutuları, 10, 100 ve 1000  $\mu$ l'lik otomatik pipet uçları, 12.5, 25 ve 75 cm<sup>2</sup> 'lik hücre kültürü flaskları (Cell star), hücre sayım cihazında kullanılan tek kullanımlık sayım lamalar (Cedex), Thoma lamı (Marienfeld), hücre dondurma kabı (Mr. Frosty), eldiven ve otoklav bandı kullanılmıştır.

## **3.2. Metod**

### **3.2.1. Bitkisel Materyallerin Toplanması ve Kurutulması**

Çalışmamızda kullanılan, *Chenopodium botrys* ve *Echinophora tenuifolia* çapa ve makas yardımı ile Tokat yöresinden toplanıp köklerinden ayrılarak Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında oda sıcaklığında güneş ışığına maruz kalmadan kurutulmuştur.

### **3.2.2. Esansiyel Yağların Elde Edilmesi**

Kurutulan bitkiler, Blender cihazı ile öğütülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Toz halindeki bitkiden 100 g tartılıp Clevenger cihazında 1.5 l musluk suyu ilave edilerek 100 °C’de 4 saat kaynatılarak esansiyel yağ elde edilmiştir. Ekstraksiyon süresi sonunda cihaz oda sıcaklığına kadar soğutulmuş esansiyel yağ cam tüplere eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında saklanmıştır. İki bitki için de bu işlem sırasıyla uygulanmıştır.

### **3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılacak Besiyerlerinin Hazırlanması**

#### **3.2.3.1. Nutrient Agar (NA) Besiyerinin Hazırlanması**

Nutrient Agar(NA) bakteriler için yaygın olarak kullanılan genel besiyeridir. Toz halinde ki besiyeri 20 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerlerinin sıcaklığı 45 – 50 °C geldiğinde petri kaplarına 15 ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir ve 25 °C’da pH’sı 7,0-7,2 arasındadır. NA mikroorganizmaların büyütülmesinde ve disk difüzyon metodunda kullanılmıştır.

#### **3.2.3.2. Potato Dextros Agar (PDA) Besiyerinin Hazırlanması**

Funguslar ve mayalarda yaygın olarak kullanılan Potato Dextros Agar (PDA) genel bir besiyeridir. Potato Dextros Agar (PDA) 39 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyerinin sıcaklığı 45 – 50 °C geldiğinde petri kaplarına 15 mL olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı-kahve renktedir ve 25 °C’da pH’ı 5,6-5,8 arasındadır. PDA besiyeri fungus ve mayaların yetiştirilmesinde ve disk difüzyon metodunda kullanılmıştır.

#### **3.2.3.3. Nutrient Broth (NB) Besiyerinin Hazırlanması**

Nutrient Broth (NB) bakteriler ve mayalar için kullanılan genel sıvı besiyeridir. Toz halindeki Nutrient Broth (NB) 8 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir ve 25 °C’da pH’sı 7,0-7,2 arasındadır. NB, disk difüzyon ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) deneyinde kullanılmıştır.

#### 3.2.3.4. Tryptic Soy Broth (TSB) Besiyerinin Hazırlanması

Tryptic Soy Broth (TSB) bakteriler ve mayalar için kullanılan genel sıvı besiyeridir. Toz halindeki Tryptic Soy Broth 30 g/l olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir ve 25 °C'da pH'sı 7,3-7,5 arasındadır. TSB biyofilm inhibisyonu deneyinde kullanılmıştır.

#### 3.2.4. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

Patojen bakteri ve maya suşlarını aktifleştirmek ve çoğaltmak için liyofilize edilmiş stoklar önce sıvı besiyerinde çözülmüş ve hazırlanmış petri kaplarına yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Patojen bakteriler Nutrient Agar içeren plaklara, mayalar ise PDA içeren plaklara ekilerek 37.5 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

#### 3.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk Difüzyon Metodu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan Kirby Bauer Metodu olarak bilinen bir testtir (Kıvıçak ve ark., 2002).

Disk Difüzyon Testinde ilk olarak  $OD_{600nm} = 0.4$  standardına göre hazırlanan mikroorganizma suşları PDA (Potato Dextrose Agar) ve NA (Nutrient Agar) genel besiyerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Ekimden hemen sonra bölmelere ayrılmış plakalar pozitif kontrol olarak imipenem, tetracycline, gentamycin, eritromycin, streptomycin, cephoperazone, fluconazole, nystatin ve variconazole antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Esansiyel yağlar standart 6 mm boş antibiyotik disklerine DMSO ile 1:1 oranında hazırlanarak 20 µl emdirilmiştir. Esansiyel yağlar DMSO'da çözüldüğü için negatif kontrol olarak boş antibiyotik diskinde 1:1 oranında hazırlanan DMSO-Su çözeltisi emdirilmiştir. 36,5 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin ardından inhibisyon zonları ölçülerek not edilmiştir.

#### 3.2.6. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) Testi

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu yönteminde, bitki ekstraksiyonu sonucunda elde edilen esansiyel yağ, %100 DMSO'da (50 µl EO, 950 µl %100 DMSO ve 1000 µl nutrient broth) belli oranlarda çözümlenerek stok çözelti oluşturulmuştur. Stok çözelti hazırlandıktan sonra 2 ml nutrient broth bulunan cam tüplere stoktan başlayarak 2'şer

ml seyreltme 9 tüp için yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak metronidazol, ciproflacacin ve tetracycline antibiyotikleri 1 mg/ml su ile çözülerek stok çözelti hazırlanmış ve seyreltme yapılmıştır. Negatif kontrol esansiyel yağ DMSO'da çözündüğü için 1 ml DMSO 1 ml nutrient brotha eklenerek stok çözelti hazırlanmış ve seyreltme yapılmıştır. Seyreltmeler yapıldıktan sonra tüplerin içine OD<sub>600nm</sub>'de 0.4'e ayarlanan mikroorganizma kültürleri hep bir tüpe 100 µl bakteri inoküle edilerek tüplerin ağzı kapatılmıştır. Bakteri eklenen tüpler 36,5 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda çıplak gözle belirlenebilen en yüksek MİC değerleri okunmuştur.

### **3.2.7. Biyofilm İnhibisyonu**

Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşlarının biyofilm oluşturup oluşturmadıkları analiz edilmiştir. OD<sub>600nm</sub>'de 0.4'e ayarlanan mikroorganizmalar 14 mm polistren tüp içinde bulunan TSB (Tryptic Soy Broth) içine 40 µl inoküle edilerek 37 °C'de inkübatörlü shakerda 120 rpm'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda biyofilm oluşturan mikroorganizmalar belirlenmiştir.

Belirlenen mikroorganizmalar üzerinde esansiyel yağların biyofilm inhibisyonu üzerine etkisi C.Niu ve E.S. Gilbert (2004)'ın kullandığı metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların her biri için 9 adet 14 mm çapında 11 cm uzunluğunda polistren tüp kullanılmıştır. Bu tüplerden 3 tanesi pozitif kontrol (G), 3 tanesi negatif kontrol (NC) ve diğer 3 tüp ise biyofilm oluşumu ölçümü (B) için kullanılmıştır. Her tüpe 2 ml Tryptic Soy Broth ve OD<sub>600</sub> = 0.4'e ayarlanan bakteri kültüründen 20 µl eklenmiştir. Sadece biyofilm oluşumu ölçümü için kullanılan tüplere esansiyel yağ eklenmiştir ve hazırlanan tüpler 37 °C'de inkübatörlü shakerda 120 rpm'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda pozitif kontrol tüplerine 570 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Negatif kontrol ve biyofilm oluşum tüplerine % 0,3'lük kristal viyole eklenerek etanol-aseton çözeltisi ile tüpler yıkanmıştır. Son olarak saf su ile 6 kez yıkanan tüpler spektrofotometrede 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

### **3.2.8. DPPH Testi**

Bitki esansiyel yağlarının 2,2 difenil- 1 pikrilhidrazil (DPPH) radikaline karşı radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Metod ilk olarak Blois

tarafından tanımlanmıştır ve Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Testin prensibi antioksidan ile giderilen bir radikal olarak DPPH çözeltisinin mordan sarıya değişen renklerine dayanmaktadır. Kısaca, etanolde çözülmüş 0.1 mM DPPH'nin 1 ml'si, 3 ml ekstrakt çözeltisi ile farklı oranlarda (10-80 µl/ml) karıştırılmıştır. Örnekler 30 dk karanlıkta tutulmuş ve sonra 517 nm' de absorbanstaki azalma ölçülmüştür. Bitki ekstraktları olmadan DPPH çözeltisinin absorbanansı kontrol olarak ölçülür. Trolox pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 30 dk oda sıcaklığında bir inkübasyon süresinden sonra 517 nm'de absorbanans yine sıfır okunmuştur. DPPH serbest radikalının inhibisyon yüzdesi (PI %) şu yolla hesaplanmıştır:  $PI (\%) = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank} )$ ,  $A_{blank}$  kontrol reaksiyonunun (tesir bileşikleri hariç tüm reagentleri içeren) absorbanansıdır.  $A_{sample}$  test bileşenlerinin absorbanansıdır. Sentetik aktioksidan reagent olan  $\alpha$ -tokoferol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve tüm testler üç kopya olarak gerçekleştirilmiştir (Marzouk ve ark, 2009).

### 3.2.9. Hücre Kültürü Deneyleri

Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı %10 FBS (fötal sığır serumu), % 0,1 penisilin-streptomisin, L- glutaminli NaHCO<sub>3</sub> içeren RPMI-1640 besiyeri içinde içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültür edilmiştir. Hücreler 25 cm<sup>2</sup> veya 75 cm<sup>2</sup> 'lik flasklarda büyütülerek, % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra PBS ve PBS EDTA ile yıkanarak % 1'lik tripsin/EDTA ile muamele edilerek pasajlanmıştır. Hücreler medium içinde süspansedilerek, tripan mavisi ile 8 kuyulu tabakalar kullanılarak Cedex XS hücre sayım cihazında sayılmış ve ml'deki hücre sayısı tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan CCD-19Lu hücre hattı %20 FBS (fötal sığır serumu), % 0,1 penisilin-streptomisin, L- glutaminli NaHCO<sub>3</sub> içeren DMEM besiyeri içinde içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda ve kültür edilmiştir. Hücreler 12,5 cm<sup>2</sup> veya 25 cm<sup>2</sup> 'lik flasklarda büyütülerek, % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra PBS ve PBS EDTA ile yıkanarak % 1'lik tripsin/EDTA ile muamele edilerek pasajlanmıştır. Hücreler medium içinde süspansedilerek, tripan mavisi ile 8 kuyulu tabakalar kullanılarak Cedex XS hücre sayım cihazında sayılmış ve ml'deki hücre sayısı tespit edilmiştir.

### 3.2.9.1. Çalışmalarda Kullanılacak Çözeltilerin ve Besiyerlerinin Hazırlanması

**RPMI-1640:** L- glutaminli NaHCO<sub>3</sub> içeren 500 ml RPMI-1640 sıvı steril medium içine FBS'den 50 ml, 10000 ünite/ml Penisilin/Streptomisin'den 5 ml ilave edildi ve buzdolabında 4 °C'de saklandı.

**DMEM:** L- glutaminli NaHCO<sub>3</sub> içeren 500 ml DMEM sıvı steril medium içine FBS'den 100 ml, 10000 ünite/ml Penisilin/Streptomisin'den 5 ml ilave edildi ve buzdolabında 4 °C'de saklandı.

**PBS:** Hazır PBS tablet 200 ml distile su ile çözülerek pH'ı 7,4'e ayarlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**PBS/EDTA:** Hazır PBS tablet 200 ml distile su ile çözüldü ve 0,075 g EDTA eklenerek pH'ı 7,4'e ayarlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**Tripsin/EDTA (1x):** % 0,5'lik ana tripsin çözeltisi (10x), PBS/EDTA ile 1:9 hacimde karıştırıldı ve buzdolabında 4 °C'de saklandı.

**MTT Çalışma Çözeltisi (5 g/l):** 0,25 g toz MTT, 50 ml PBS ile çözüldü daha sonra filtre ile steril edildi. Ardından mikrofüj tüplerine bölünerek çalışma zamanına kadar ışık almaması için alüminyum folyo kaplı şişede buzdolabında -20 °C'de saklandı.

**Akridin oranj (100 g/l):** 0,1 g akridin oranj 1 ml distile su ile çözüldü ve filtre ile steril edilerek buzdolabında 4 °C'de saklandı.

**Etidyum bromit (100 g/l):** 0,1 g etidyum bromit 1 ml distile su ile çözüldü filtre ile steril edilerek buzdolabında 4 °C'de saklandı.

### 3.2.9.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

Yapı formülleri ve moleküler ağırlıkları bilinmeyen *Chenopodium botrys* ve *Echinophora tenuifolia* esansiyel yağı 1:1 oranında DMSO ile çözülerek ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ana stok medium ile seyreltilerek iki ara dilüsyon ve finalde 1000 µl medium içinde 7,6,5 ve 4 µl yağ olacak şekilde dozlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bütün dozlarda DMSO konsantrasyonu % 0,01'in altındadır.

### 3.2.9.3. MTT canlılık testi ile mitokondriyal aktivite belirlenmesi

MTT testi [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] hücrelerin canlılık oranı hızlı ve nicel bir şekilde ölçülebilen kalorimetrik bir yöntemdir. Yöntemin esası canlı hücrelerdeki mitokondrilerin dehidrogenaz enziminin MTT boyasındaki tetrazolium halkasının parçalayabilmesine dayanmaktadır (Kısmalı ve Sel, 2012; Mosmann 1983).

Çalışmamızda MDA-MB-231 hücreleri için  $10 \times 10^3$  ve CCD-19Lu hücreleri  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilerek ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra 1 µl/ml DMSO ve test maddesinin belirli dozları ile muamele edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. MTT testi için; inkübasyon süreleri sonunda her bir kuyuya 5 mg/ml MTT final dilüsyonu olacak şekilde 125 µl MTT solüsyonundan eklenmiştir. MTT eklenen hücreler 2 saat inkübasyon süresinin ardından solüsyon uzaklaştırılarak, her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için 100 µl DMSO eklenmiştir ve 15 dakika boyunca çalkalayıcı tablada bekletilmiştir. Formazan kristallerinin oluşturduğu renk şiddeti ELISA (ELx808-IU) cihazında 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. MTT deneyleri her bir dilüsyon için 4-8 kuyucuk olmak üzere en az 2 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Yapılan MTT sitotoksite test sonuçları SPSS programıyla değerlendirilmiş ve hücreler için IC50 dozu belirlenmiştir.

### 3.2.9.4. Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) çift boyama

Akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boya ları floresan boya lar dır. AO, nükleik asit boyayan floresan katyonik bir boyadır. Apoptozda gözlenen kromatin de ğişimlerini ve hücre döngüsünün evrelerini belirlemek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA ile etkileştiğinde yeşil, RNA ile etkileştiğinde kırmızı renk görünür. EB'de yine DNA çift zinciri arasına interkalasyonla bağlanabilen ve UV ışığı altında turuncu renk veren bir boyadır. AO canlı hücrelerin yapısına girebilir ve nükleik asitleri yeşil boyar. Sitoplazmik yapılar da sarı-yeşil renkte gözlenir. Ancak EB sadece ölü hücrelerin zarlarından geçebilir ve hücrenin kırmızı turuncu görünmesine yol açar. Bu prensiple, bu iki boyanın, apoptotik hücre belirleme çalışmalarında birlikte kullanılmasıyla ölü canlı hücre ayırımı yapılabilmektedir (Wells, 1988).

Çalışmamızda, test maddesi uygulamasının ardından apoptotik (canlı) ya da nekrotik (ölü) MDA-MB-231 hücrelerinin belirlenmesi ve görüntülenmesi için AO-EB boyaması yapıldı. 6 kuyulu plakaya  $3 \times 10^5$ /kuyu olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat inkübasyonun ardından test maddeleri ile muamele edilecek, 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her bir kuyu 1 ml. besiyeri içerisinde toplanarak 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet üzerine 25 µl besiyeri ilave edildi. Boyama için 100 mg/ml akridin oranj ve 100 mg/ml ethidyum bromid 1:1 oranında karıştırılarak ana stok hazırlandı. Ana stok boya 1:9 oranında medium ile seyreltilerek bir ara stok hazırlandı. Hazırlanan ara stok boyadan süspanse hücreler üzerine 1 µl ilave edilerek preparat haline getirildi. Daha sonra floresan mikroskopta (Olympus, BX50) incelenerek fotoğrafları çekildi (Nairs ve ark, 2011).



## 4. BULGULAR

### 4.1. Disk Difüzyon Zon Ölçümleri

Deneyde esansiyel yağ emdirilen boş diskler, pozitif kontrol olarak standart antibiyotik diskleri ve negatif kontrol olarak % 50 DMSO çözeltisi emdirilen boş antibiyotik diski kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak standart antibiyotik disklerinin kullanılmasının amacı antibiyotiklerin oluşturduğu inhibisyon zonlarının esansiyel yağ emdirilen disklerin inhibisyon zonları ile karşılaştırılmasıdır. Negatif kontrolün ise kullanım amacı esansiyel yağların çözünmesi için kullanılan DMSO solventinin oluşan inhibisyon zonuna herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

#### 4.1.1. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının Disk Difüzyon Zon Ölçümü Değerleri

*Chenopodium Botrys* esansiyel yağının *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* patojen suşlarının birçoğuna karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu görüldü. Elde edilen zon ölçümleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 1.** *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının disk difüzyon deneyi ile elde edilen inhibisyon zon çapları (mm)

Mikroorganizma türleri	IPM	TE	GM	E	S	CFP	FCA	NS	VOR	EO	NK
<i>Bacillus Subtilis</i>	32	22	30	22	30	20	-	-	-	8	-
<i>Bacillus Cereus</i>	34	24	29	16	18	21	-	-	-	8	-
<i>Proteus Vulgaris</i>	27	12	24	16	26	17	-	-	-	-	-
<i>Candida Tropicalis</i>	32	28	22	15	18	22	-	-	-	7	-
<i>Candida Albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-
<i>Corynebacterium Diphtheria</i>	50	24	30	16	24	26	-	-	-	9	-
<i>Shigella Baydi</i>	38	-	9	14	10	11	-	-	-	8	-
<i>Escheria Coli</i> ATCC 25922	42	11	32	26	29	36	-	-	-	13	-
<i>Klebsiella Pneumonia</i> ATCC 700603	30	24	24	14	22	17	-	-	-	9	-
<i>Staphylococcus Auerus</i> ATCC 29213	34	22	30	18	24	21	-	-	-	8	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212	32	25	29	25	24	21	-	-	-	8	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 51299	28	25	25	20	27	22	-	-	-	9	-
<i>Pseudomonas Aureginosa</i> ATCC 27853	34	30	32	20	28	21	-	-	-	10	-
<i>Neisseria Sicca</i>	52	24	34	30	34	32	-	-	-	9	-
<i>Acinetobacter Baumanni</i>	30	26	21	12	20	18	-	-	-	9	-
<i>Staphylococcus Aureus</i>	38	-	9	14	10	11	-	-	-	8	-

(EO: *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı, IPM: İmipenem, TE: Tetracyline, GM: Gentamycin, E: Eritromycin, S: Streptomycin, CFP: Cepheperazone sulbaktam, FCA: Fluconozole, NS: Nystatin, VOR: Voriconazole, NK: Negatif kontrol)

#### 4.1.2. *Echinophora tenuifolia* Esansiyel Yağının Disk Difüzyon Zon Ölçümü Değerleri

*Echinophora tenuifolia* esansiyel yağının *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603,

*Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* patojen suşlarının birçoğuna karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu görüldü. Elde edilen zon ölçümleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 2.** *Echinophora tenuifolia* esansiyel yağının disk difüzyon deneyi ile elde edilen inhibisyon zon çapları (mm)

Mikroorganizma türleri	IPM	TE	GM	E	S	CFP	FCA	NS	VOR	EO	NK
<i>Bacillus Subtilis</i>	32	22	30	22	30	20	-	-	-	9	-
<i>Bacillus Cereus</i>	34	24	29	16	18	21	-	-	-	8	-
<i>Proteus Vulgaris</i>	27	12	24	16	26	17	-	-	-	-	-
<i>Candida Tropicalis</i>	32	28	22	15	18	22	-	-	-	10	-
<i>Candida Albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	16	-	14	-
<i>Corynebacterium Diphtheria</i>	50	24	30	16	24	26	-	-	-	9	-
<i>Shigella Baydi</i>	38	-	9	14	10	11	-	-	-	14	-
<i>Escheria Coli</i> ATCC 25922	42	11	32	26	29	36	-	-	-	15	-
<i>Klebsiella Pneumonia</i> ATCC 700603	30	24	24	14	22	17	-	-	-	9	-
<i>Staphylococcus Auerus</i> ATCC 29213	34	22	30	18	24	21	-	-	-	10	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212	32	25	29	25	24	21	-	-	-	8	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 51299	28	25	25	20	27	22	-	-	-	10	-
<i>Pseudomonas Aureginosa</i> ATCC 27853	34	30	32	20	28	21	-	-	-	9	-
<i>Neisseria Sicca</i>	52	24	34	30	34	32	-	-	-	20	-
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	30	26	21	12	20	18	-	-	-	9	-
<i>Staphylococcus Aureus</i>	38	-	9	14	10	11	-	-	-	8	-

(EO: *Echinophora tenuifolia* esansiyel yağı, IPM: İmipenem, TE: Tetracycline, GM: Gentamycin, E: Eritromycin, S: Streptomycin, CFP: Cepheperazone sulbaktam, FCA: Fluconozole, NS: Nystatin, VOR: Voriconazole, NK: Negatif kontrol)

#### 4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİC Testi)

Minimum imbisyon konsantrasyonu bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyondur. MİC Testi antibiyotiğin etkinliğini öngörü çalışmalarında kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin ve esansiyel yağların hızla büyüyen bakteriye etkisini gözlemlemek için yapılmıştır. Deneyde pozitif kontrol olarak Metronidazol, Ciproflacacin ve Tetracycline antibiyotikleri kullanıldı. Negatif kontrol

olarak DMSO solventi kullanıldı. Elde edilen Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları tablo haline getirildi.

#### 4.2.1. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

*Chenopodium Botrys* esansiyel yağının *Bacillus Subtulis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* patojen suşlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 3.. *Chenopodium botrys* esansiyel yağının MİC değerleri ( µl /µl)

Mikroorganizma türleri	Metronidazol	Ciproflacacin	Tetracycline	EO	NK
<i>Bacillus Subtulis</i>	-	0,095	B	0,39	-
<i>Bacillus Cereus</i>	25	0,095	0,19	0,096	-
<i>Proteus Vulgaris</i>	25	B	0,19	0,39	-
<i>Candida Tropicalis</i>	-	0,095	0,78	0,78	-
<i>Candida Albicans</i>	-	-	-	12,5	-
<i>Corynebacterium Diphtheria</i>	5	B	0,39	B	-
<i>Shigella Baydi</i>	1,56	B	B	0,19	-
<i>Escheria Coli</i> ATCC 25922	0,78	B	0,78	B	-
<i>Klebsiella Pneumonia</i> ATCC 700603	-	B	3,125	0,19	-
<i>Staphylococcus Auerus</i> ATCC 29213	50	B	0,095	0,39	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212	25	B	0,19	0,096	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 51299	50	0,095	B	0,39	-
<i>Pseudomonas Aureginosa</i> ATCC 27853	25	B	0,19	B	-
<i>Neisseria Sicca</i>	50	B	0,19	B	-
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	50	B	1,56	0,78	-
<i>Staphylococcus Aureus</i>	-	1,56	0,095	0,39	-

(EO: *Chenopodium botrys* esansiyel yağı, B: Kuyuların hepsi berrak, (-): kuyuların hepsinde üreme var, NK: Negatif kontrol)

#### 4.2.2. *Echinophora tenuifolia* Esansiyel Yağı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

*Echinophora tenuifolia* esansiyel yağının *Bacillus Subtulis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* patojen suşlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4. *Echinophora tenuifolia* esansiyel yağının MİC değerleri ( µl /µl)

Mikroorganizma türleri	Metronidazol	Ciproflacacin	Tetracycline	EO	NK
<i>Bacillus Subtulis</i>	-	0,095	B	1,56	-
<i>Bacillus Cereus</i>	25	0,095	0,19	1,56	-
<i>Proteus Vulgaris</i>	25	B	0,19	B	-
<i>Candida Tropicalis</i>	-	0,095	0,78	12,5	-
<i>Candida Albicans</i>	-	-	-	6,25	-
<i>Corynebacterium Diphtheria</i>	5	B	0,39	1,56	-
<i>Shigella Baydi</i>	1,56	B	B	B	-
<i>Escheria Coli</i> ATCC 25922	0,78	B	0,78	3,12 5	-
<i>Klebsiella Pneumonia</i> ATCC 700603	-	B	3,125	1,56	-
<i>Staphylococcus Auerus</i> ATCC 29213	50	B	0,095	B	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 29212	25	B	0,19	3,12 5	-
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 51299	50	0,095	B	6,25	-
<i>Pseudomonas Aureginosa</i> ATCC 27853	25	B	0,19	B	-
<i>Neisseria Sicca</i>	50	B	0,19	1,56	-
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	50	B	1,56	6,25	-
<i>Staphylococcus Aureus</i>	-	1,56	0,095	3,12 5	-

(EO: *Echinophora tenuifolia* esansiyel yağı, B: Kuyuların hepsi berrak, (-): kuyuların hepsinde üreme var, NK: Negatif kontrol)

### 4.3. Biyofilm İnhibisyonu

Kullanılan mikroorganizmaların biyofilm oluşturup oluşturmadıklarının analiz edilmesi için mikroorganizmalar 14 mm polistren tüp içinde bulunan TSB'ye inoküle edilerek inkübatörlü shakerda 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda biyofilm oluşturan mikroorganizmalar belirlendi. Bu mikroorganizmalar Çizelge 4.5'te gösterildi.

**Çizelge 4. 5.** Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar

<b>Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar</b>
<i>Shigella Baydi</i>
<i>Acinetobacter Baumannii</i>
<i>Escheria Coli</i> ATCC 25922
<i>Candida Albicans</i>
<i>Candida Tropicalis</i>
<i>Enterococcus Faecalis</i> ATCC 51299

Esansiyel yağların biyofilm oluşumuna etkilerinin test edilmesi için 14 mm çapında polistren tüp içinde bulunan TSB'ye farklı konsantrasyonlarda DMSO'da çözünen esansiyel yağlar ve 0,5 Mcfa ayarlanmış bakteri süspansiyonundan eklendi.

Her bir konsantrasyon için 9 adet 14 mm çapında polistren tüp kullanıldı. Bu tüplerin üçü süspansiyon kültür (G), üçü negatif kontrol (NK) ve son üçü de biyofilm ölçümü (B) için kullanıldı. Sadece biyofilm oluşumu için kullanılacak tüplere yani B tüplerine esansiyel yağ eklendi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan tüpler inkübatörlü shakerda 18 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda her iki yağında *Candida Albicans* hariç biyofilm oluşumunu engellediği görüldü. *Candida Albicans* 'ta oluşan biyofilmin ise dibe çöktüğü gözlemlendi.

Deney 2 kere tekrar edildi ancak iki seferde de aynı sonuçlar elde edildi. Bu yüzden SBF değeri her iki yağ içinde yorumlanamadı.

### 4.4. DPPH Testi

DPPH Testi bitki ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Testin prensibi antioksidan ile giderilen bir radikal olarak DPPH çözeltisinin mordan sarıya değişen renklerine dayanmaktadır.

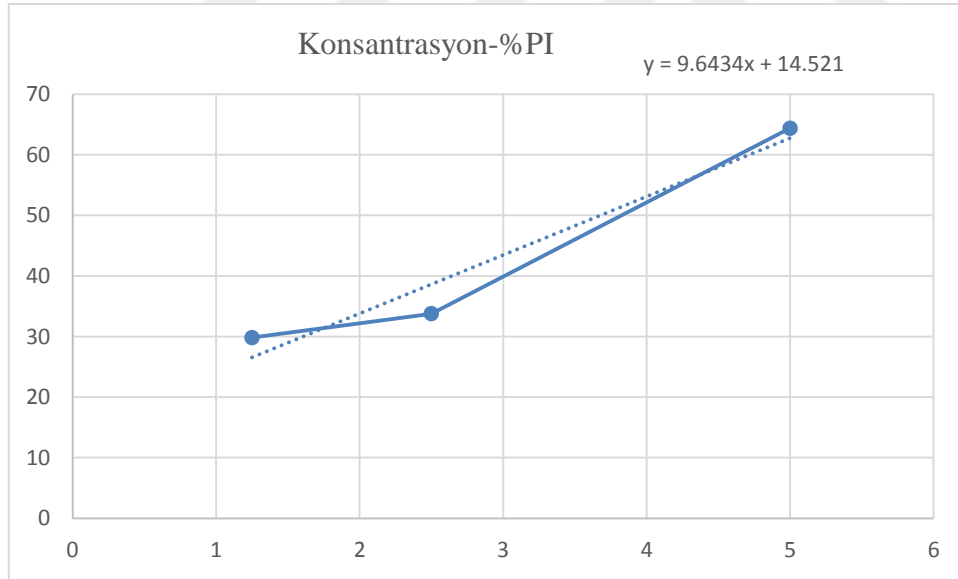
Deneyde 0,1 mM DPPH çözeltisinin 1 ml'si 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan 3 ml etanolde çözünmüş esansiyel yağ çözeltisine eklendi. Pozitif kontrol olarak 1:1 oranında hazırlanan  $\alpha$ -tokoferol kullanıldı.

DPPH eklenen çözeltiler yarım saat karanlıkta bekletildi ve bekleme süresinin ardından 517 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Ölçülen bu absorbans değerlerinden inhibisyon yüzdesi hesaplandı. Farklı konsantrasyonlardaki inhibisyon yüzdelerinden elde edilen grafikten IC50 değeri hesaplandı.

#### 4.4.1. $\alpha$ -tokoferol'un IC50 Değerinin Hesaplanması

Deneyde pozitif kontrol olarak  $\alpha$ -tokoferol kullanıldı. Ölçülen absorbans değerleri ile hesaplanan inhibisyon yüzdesinin konsantrasyonlarla çizilen grafiğinden elde edilen denklem ile IC50 hesaplandı. Bu grafikten elde edilen denklem ile hesaplanan IC50 değeri: 3,679097  $\mu$ l/ml'dir. Elde edilen grafik Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

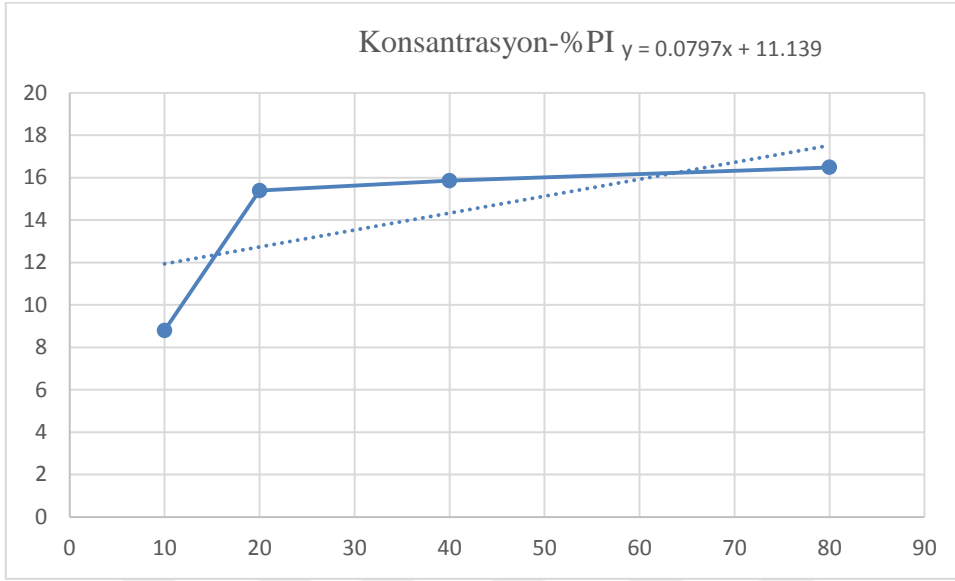


Şekil 4. 1..  $\alpha$ -tokoferol Konsantrasyon- % PI grafiği

#### 4.4.2. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının IC50 Değerinin Hesaplanması

*Chenopodium Botrys* esansiyel yağından hazırlanan çözeltinin 517 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri ile hesaplanan inhibisyon yüzdesinin konsantrasyonlarla çizilen grafiğinden elde edilen denklem ile IC50 hesaplandı. Bu

grafikten elde edilen denklem ile hesaplanan IC50 değeri: 487,591  $\mu$ l/ml 'dir. Elde edilen grafik Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

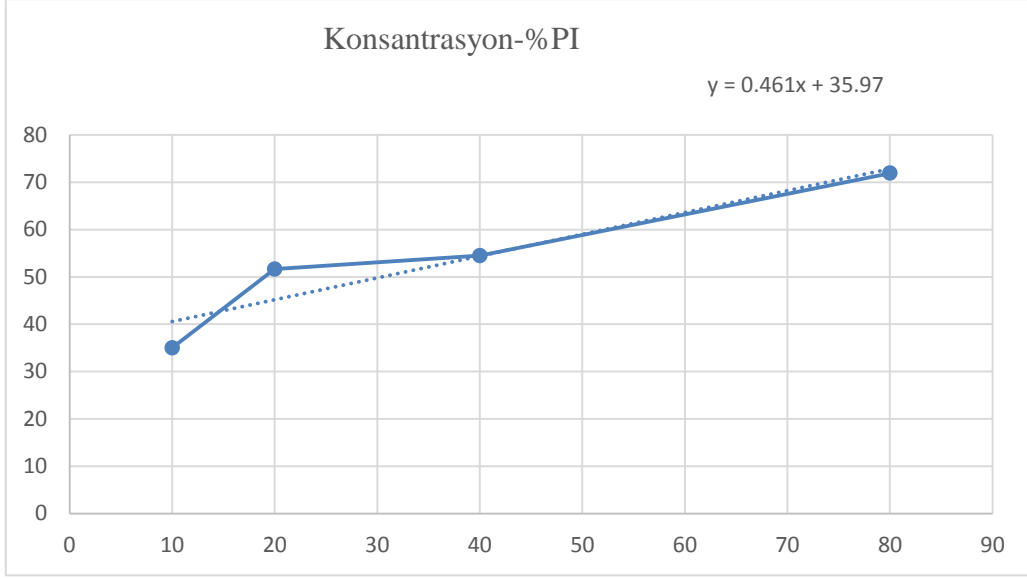


**Şekil 4. 2.** *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı Konsantrasyon- % PI grafiği

#### **4.4.3. *Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının IC50 Değerinin Hesaplanması**

*Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağından hazırlanan çözeltilerin 517 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri ile hesaplanan inhibisyon yüzdesinin konsantrasyonlarla çizilen grafiğinden elde edilen denklem ile IC50 hesaplandı. Bu grafikten elde edilen denklem ile hesaplanan IC50 değeri: 30,43384  $\mu$ l/ml'dir. Elde edilen grafik Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



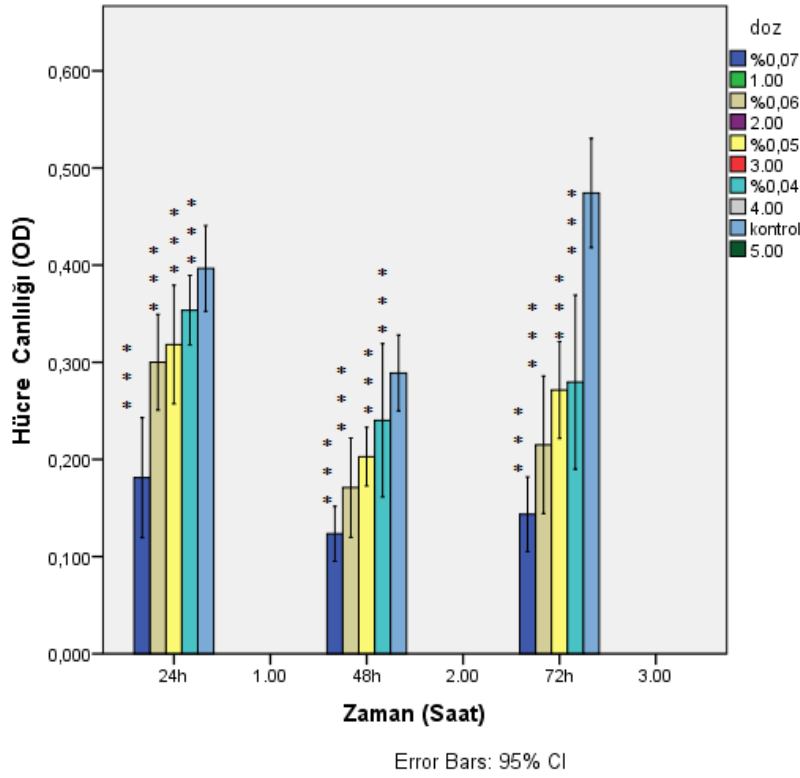


**Şekil 4. 3.** *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı Konsantrasyon- % PI grafiği

#### 4.5. MTT Canlılık Testi İle Mitokondriyal Aktivite Belirlenmesi

##### 4.5.1. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının MDA-MB-231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

Metotta belirtildiği gibi 96'lık plakalara hazırlanan hücreler *Chenopodium botrys* esansiyel yağı 7,6,5 ve 4 µl/ml yağ olacak şekilde hazırlanan dozlar ile 24,48 ve 72 saat muamele edildi. Konsantrasyon ve inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlendi. Sonuçlar incelendiğinde IC50 dozu 24 ve 48 saatte yaklaşık olarak 7 µl/ml ve 72 saate yaklaşık 5 µl/ml yağ konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda hücre canlılığının kontrole göre yaklaşık olarak %50 azaldığı görüldü. İnkübasyon süresi sonunda *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksik etkisi Şekil 4.4'te gösterildi.

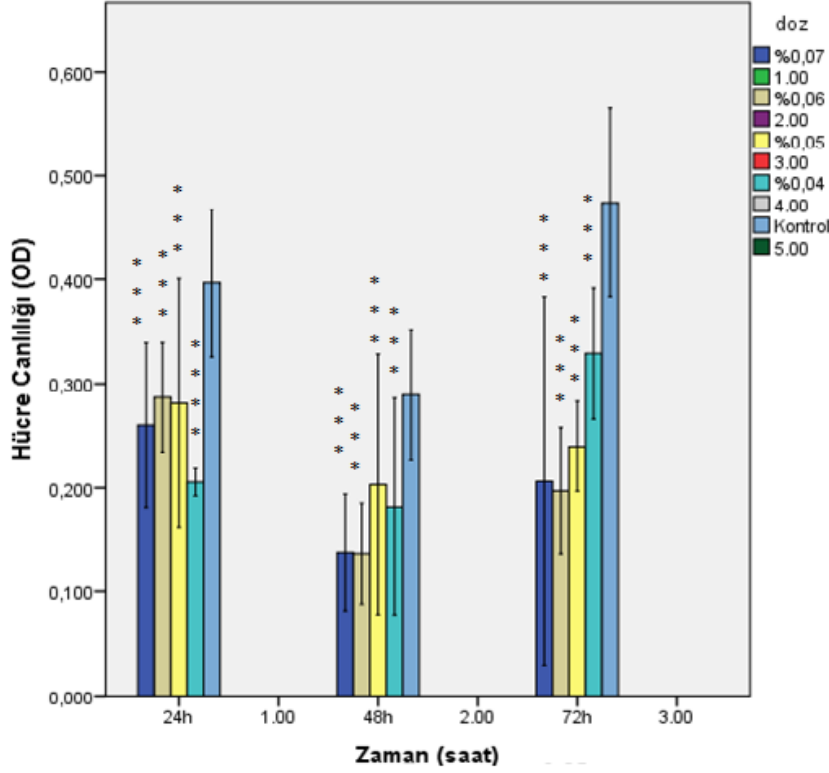


Şekil 4. 4. *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi \*\*\*  $p < 0.001$

#### 4.5.2. *Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının MDA-MB-231 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

Metotta belirtildiği gibi 96'lık plakalara hazırlanan hücreler *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı 7,6 ve 5  $\mu\text{l/ml}$  yağ olacak şekilde hazırlanan dozlar ile 24,48 ve 72 saat muamele edildi. Konsantrasyon ve inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlendi. Sonuçlar incelendiğinde IC50 dozu 48 saatte yaklaşık olarak 7  $\mu\text{l/ml}$  ve 72 saatte 5  $\mu\text{l/ml}$  yağ konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda hücre canlılığının kontrole göre yaklaşık olarak %50 azaldığı görüldü.

İnkübasyon süresi sonunda *Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksik etkisi Şekil 4.5'te gösterildi.

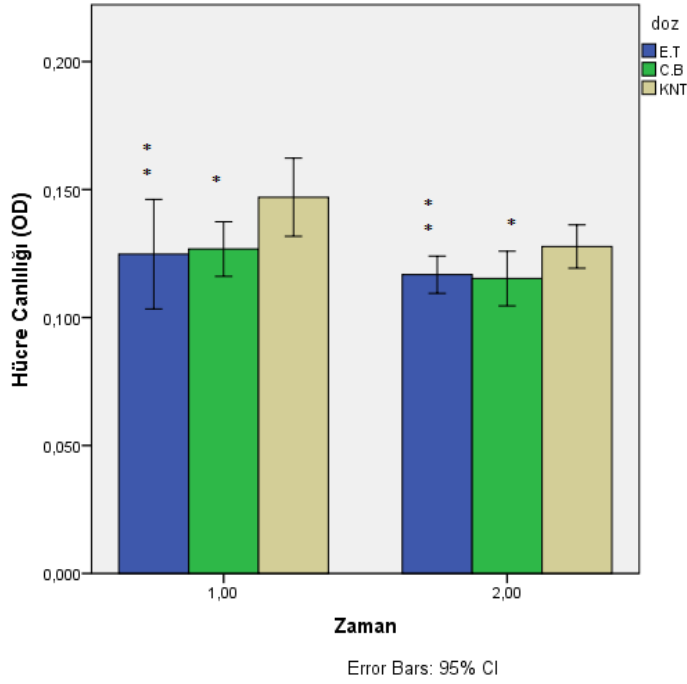


**Şekil 4. 5.** *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi \*\*\* p<0.001

#### 4.5.3. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının CCD-19Lu Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

*Chenopodium botrys* esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre hattında denenen konsantrasyonlardan belirlenen IC50 değeri konsantrasyonu CCD-19Lu hücre hattında 96'lik plakalara hazırlanan hücrelere 24 ve 48 saat muamele edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kontrole göre hücre canlılığı % 86,2 iken 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücre canlılığının %90,2 olduğu görüldü.

*Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının CCD-19Lu hücreleri üzerindeki toksik etkisi Şekil 4.6'da gösterildi.

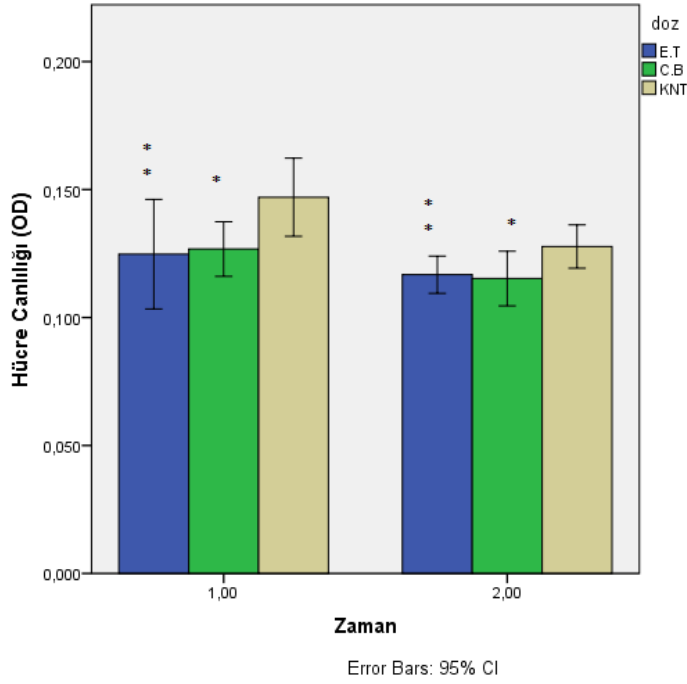


**Şekil 4. 6.** *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının CCD-19-Lu hücre canlılığı üzerine etkisi \*\* $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  (E.T: *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı dozu, C.B: *Chenopodium botrys* esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol)

#### 4.5.4. *Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının CCD-19Lu Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

*Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre hattında denenen konsantrasyonlardan belirlenen IC50 değeri konsantrasyonu CCD-19Lu hücre hattında 96'lik plakalara hazırlanan hücrelere 24 ve 48 saat muamele edildi. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kontrole göre hücre canlılığı % 84,8 iken 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücre canlılığının %91,3 olduğu görüldü.

*Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının CCD-19Lu hücreleri üzerindeki toksik etkisi Şekil 4.7'da gösterildi.

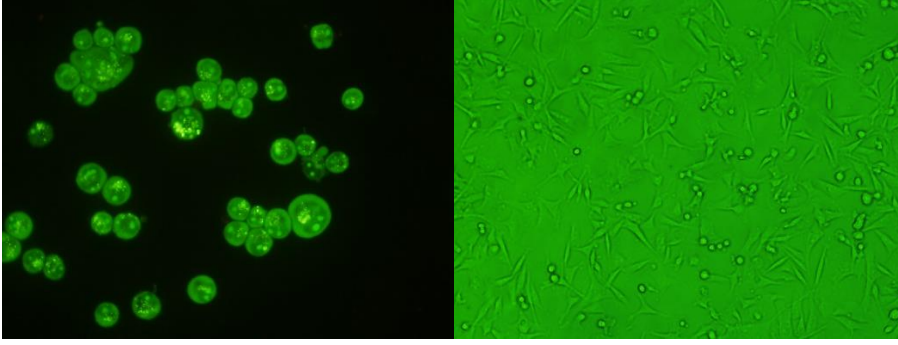


**Şekil 4. 7.** *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkisi \*\*  $p < 0.01$ ,  $p < 0,05$  (E.T: *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı dozu, C.B: *Chenopodium botrys* esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol)

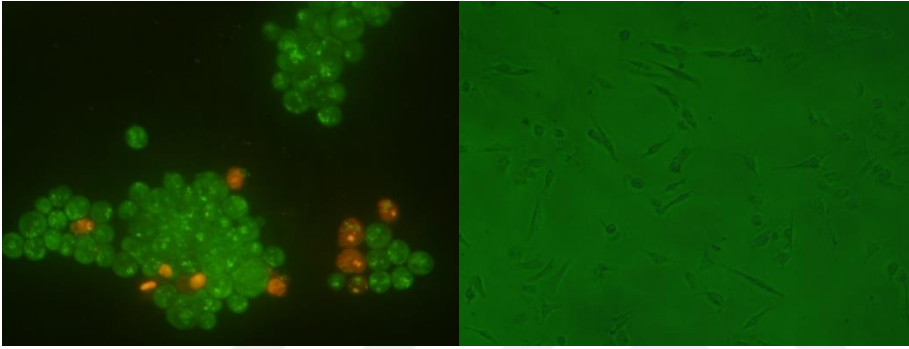
#### 4.6. Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) çift boyama

##### 4.6.1. *Chenopodium Botrys* Esansiyel Yağının Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) Çift Boyama ile MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

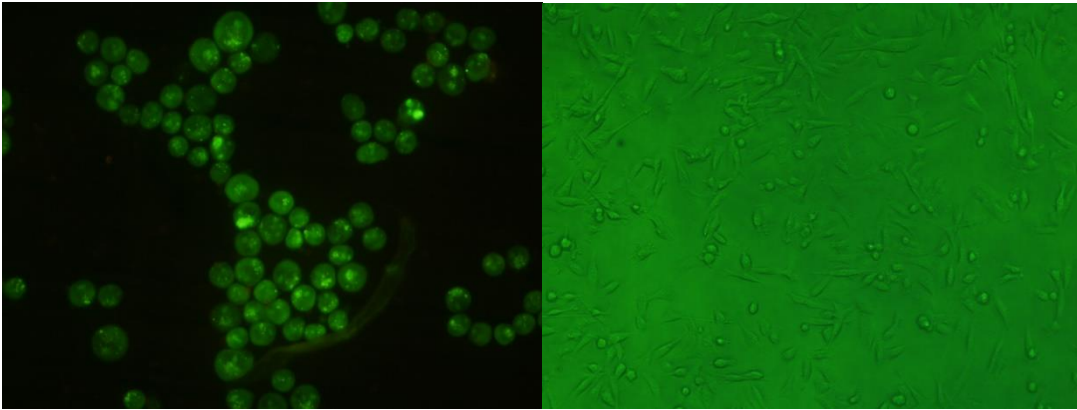
6 kuyulu plakalara hazırlanan MDA-MB-231 hücreleri *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Konsantrasyon olarak MTT deneyinde belirlenen IC50 konsantrasyonu uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücreler önce ters-faz mikroskopta, AO/EB çift boyamadan sonra ise floresan mikroskopta fotoğraflanmıştır. Kontrol olarak 1 µl/ml DMSO kullanılmıştır. Fotoğraflar Şekil 4.8.1, 4.8.2, 4.8.3 ve 4.8.4’de gösterilmiştir.



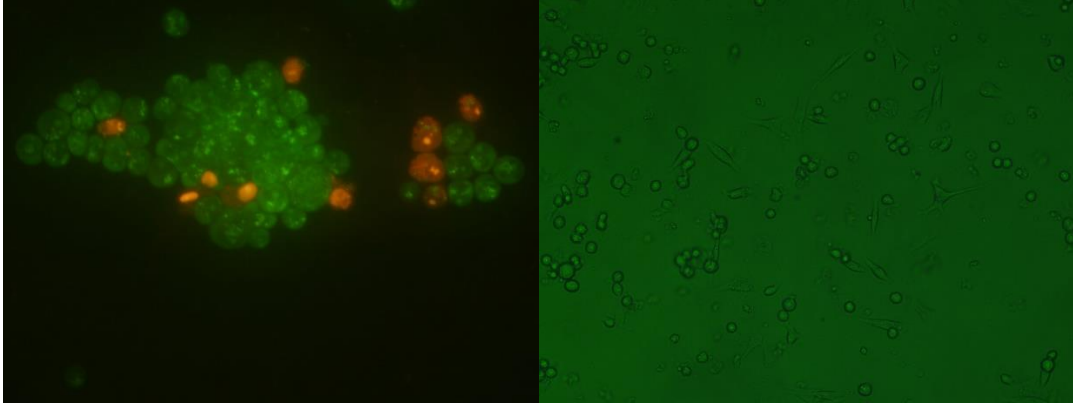
**Şekil 4.8. 1.** 1 µl/ml DMSO 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)



**Şekil 4.8.2.** *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)



**Şekil 4.8. 3.** 1 µl/ml DMSO 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)



**Şekil 4.8.4.** *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)

AO/EB boyama sonucu elde edilen fotoğraflar, hücreler morfolojilerine göre incelenerek canlı, apoptotik ve nekrotik hücre sayısı belirlenmiştir.

AO/EB çift boyama ile homojen kromotin dağılımı gösteren, normal çekirdeğe sahip ve yeşil renkte görünen hücreler canlı (LN; live cells), yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip apoptotik çekirdekli parlak yeşil renkli hücreler ise erken apoptotik (LA; live cells) olarak ifade edilmektedir. Ölü (nekrotik) hücreler (DN; dead cells); normal çekirdeğe sahip, parlak turuncu ya da kırmızı renkte; geç apoptotik hücreler (DA; dead cells); oldukça yoğunlaşmış ve fragmente bir kromatine sahip, çekirdekleri parçalanmış ya da çekirdek zarı düzensizleşmiş olup parlak kırmızı veya turuncu boyanmaktadır (Duke 2004).

Her bir deney en az 2 kez tekrarlanmıştır ve toplamda 500-1500 arasında sayılan hücrelerin apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formülle belirlenmiştir.

**Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi:**  $LA+DA/LN+LA+DN+DA \times 100$

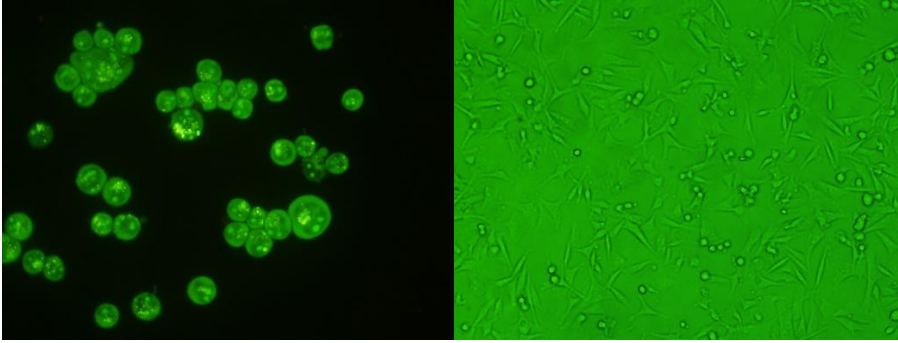
Buna göre *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının kontrol grubuna göre hem 24 hem 48 saat sonuçlarında anlamlı düzeyde farklı oranda apoptotik hücre bulundurduğu belirlenmiştir.

AO/EB floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol hücrelerine 1 µl/ml DMSO uygulanmış ve apoptotik hücre yüzdesinin oranının oldukça düşük olduğu görülmüştür. 24 saat sonucunda apoptotik hücre oranı %7,8 iken 48 saatte apoptotik hücre oranının %13 olduğu apoptotik hücre yüzdesi formülü kullanılarak hesaplanmıştır. *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı uygulanmış hücrelerde ise

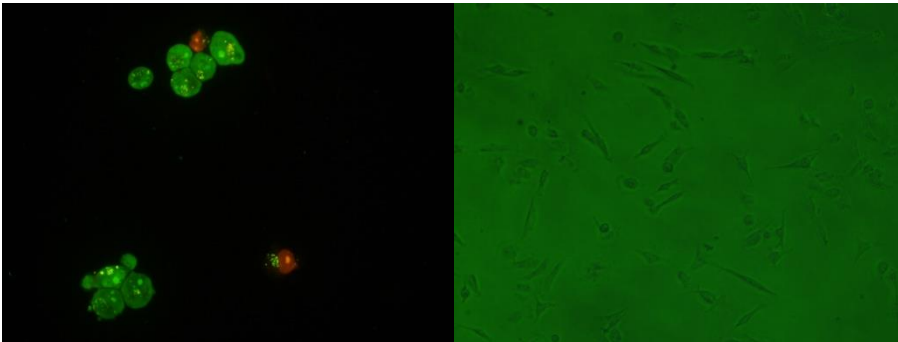
apoptotik hücre yüzdesi 24 saatte %58 iken 48 saatte apoptotik hücre yüzdesinin %67 olduğu görülmüştür. 48 saat sonunda 24 saate göre erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayında artış olduğu gözlemlenmiştir. Apoptotik indeks şekil 4.10’da gösterilmiştir.

#### **4.6.2. *Echinophora Tenuifolia* Esansiyel Yağının Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) Çift Boyama ile MDA-MB-231 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi**

6 kuyulu plakalara hazırlanan MDA-MB-231 hücreleri *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Konsantrasyon olarak MTT deneyinde belirlenen IC50 konsantrasyonu uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücreler önce ters-faz mikroskopta, AO/EB çift boyamadan sonra ise floresan mikroskopta fotoğraflanmıştır. Kontrol olarak 1 µl/ml DMSO kullanılmıştır. Fotoğraflar Şekil 4.9.1, 4.9.2, 4.9.3 ve 4.9.4’de gösterilmiştir.

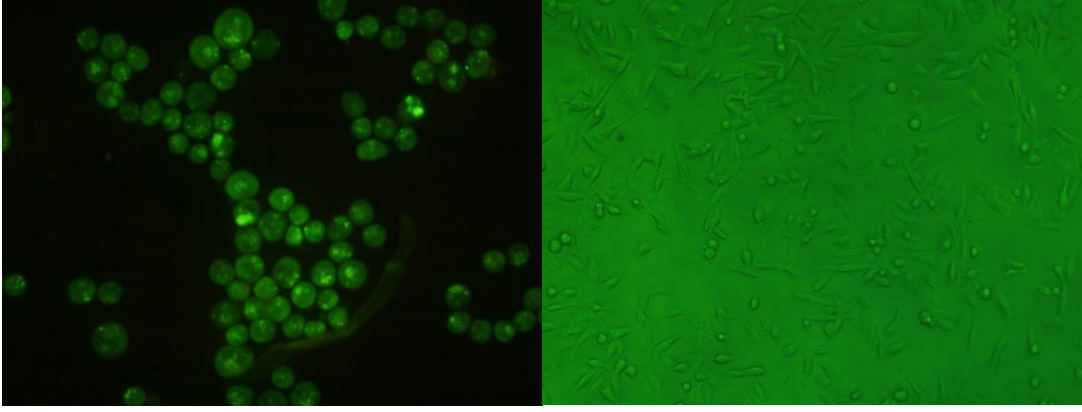


**Şekil 4.9. 1.** 1 µl/ml DMSO 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)

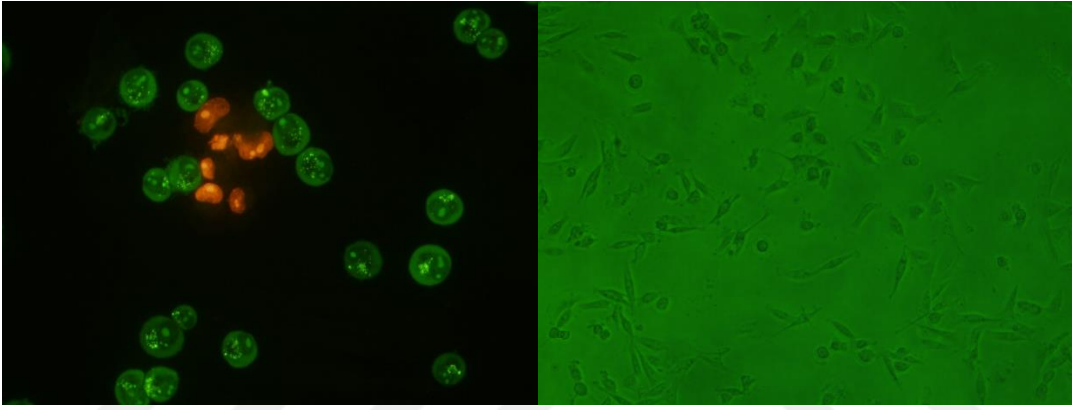


**Şekil 4.9. 2.** *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı 24 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)





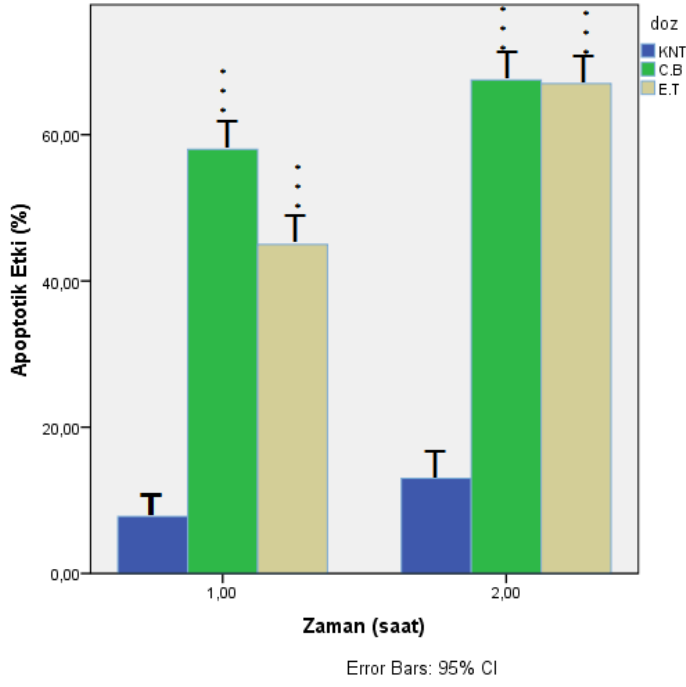
**Şekil 4.9. 3.** 1 µl/ml DMSO 48saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)



**Şekil 4.9. 4.** *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı 48 saat morfolojik değişim fotoğrafları (AO/EB boyama floresan mikroskop/ ters faz mikroskop)

*Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının kontrol grubuna göre hem 24 hem 48 saat sonuçlarında anlamlı düzeyde farklı oranda apoptotik hücre bulunduğu belirlenmiştir.

AO/EB floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol hücrelerine 1 µl/ml DMSO uygulanmış ve apoptotik hücre yüzdesinin oranının oldukça düşük olduğu görülmüştür. 24 saat sonucunda apoptotik hücre oranı %7,8 iken 48 saatte apoptotik hücre oranının %13 olduğu apoptotik hücre yüzdesi formülü kullanılarak hesaplanmıştır. *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı uygulanmış hücrelerde ise apoptotik hücre yüzdesi 24 saatte %45 iken 48 saatte apoptotik hücre yüzdesinin %67,5 olduğu görülmüştür. 48 saat sonunda 24 saate göre erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. Apoptotik indeks şekil 4.10'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.1.** *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı apoptotik indeks \*\*\*  $p < 0.001$  (E.T: *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı dozu, C.B: *Chenopodium botrys* esansiyel yağı dozu, KNT: kontrol)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uçucu yağlar, farklı bileşikleri içeren kompleks karışımlar olduklarından, biyolojik etkileri yönünden farklılık göstermektedirler. Etken maddelerine göre etkileri değişmekle birlikte pek çok uçucu yağ; antimikrobiyal, karminatif, koloretik, sedatif, diüretik, antispazmodik gibi etkilere sahiptir (Esen ve Dığrak, 2008). Esans yağlarının antimikrobiyal, antifungal etkileri ve bitkilerin spesifik aktivitesi bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada araştırılmıştır (Cristina ve ark., 2015). Çok çeşitli bitkilerden elde edilen aromatik ve tıbbi ekstraktlardan elde edilen uçucu yağlar (EO) son zamanlarda popülerleşmiştir ve biyolojik aktiviteleri dolayısıyla gıda koruması için potansiyel doğal maddeler olarak bilimsel ilgi uyandırmıştır (Alvarez ve ar., 2017).

Bu tez çalışmasında *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal etkileri *Bacillus Subtulis*, *Bacillus Cereus*, *Proteus Vulgaris*, *Candida Tropicalis*, *Candida Albicans*, *Corynebacterium Diphtheria*, *Shigella Baydi*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853, *Neisseria Sicca*, *Acinetobacter Baumannii* ve *Staphylococcus Aureus* patojen suşlarda disk difüzyon ve MİC Testi ile araştırılmıştır.

*Chenopodium botrys* esansiyel yağı disk difüzyon testinde denenen 16 mikroorganizma suşunun 14'ünde inhibisyon zonu oluşturmuştur. 13 mikroorganizmada inhibisyon zonu çapları birbirine çok yakınken *Escheria Coli* ATCC 25922 patojen suşunda diğer mikroorganizmalara göre daha çok etki görülmüştür. Her ne kadar pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotikler kadar etki görülmesede bazı suşlarda antibiyotiklerden daha fazla etki görülmüştür. *Shigella Boydii* patojen suşunda esansiyel yağın tetracycline antibiyotiğine göre daha etkili olduğu görülmüştür, gentamycin antibiyotiği ile de eş değer etkide oldukları görülmüştür. *Staphylococcus Aureus* patojen suşunda esansiyel yağın tetracycline antibiyotiğine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Negatif kontrol de ise inhibisyon zonu oluşmamıştır. MIC Testinde esansiyel yağın bütün mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Burda en dikkat çeken sonuç hiçbir antibiyotiğin etki etmediği *Candida Albicans* üzerinde esansiyel yağın 12,5 µl/ml etki göstermesidir. *Bacillus subtulis*'te metronidazol etki göstermezken esansiyel yağ 0,39 µl/ml etki göstermiştir. *Bacillus Cereus*'ta pozitif kontrol olan ciproflacacin ile eş

değer etki görülmüştür. *Candida tropicalis*'te metronidazol etki göstermezken, tetracycline ve esansiyel yağ eş değer etki (0,78 µl/ml) göstermiştir. *Corynebacterium Diphtheria*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853 ve *Neisseria Sicca* patojen suşlarında esansiyel yağ çok etkili olmuştur ve hiçbir tüpte üreme görülmemiştir. Esansiyel yağın bütün mikroorganizmalarda metronidazol pozitif kontrolünden daha etkili olduğu, 9 mikroorganizmada tetracycline antibiyotiğinden daha etkili olduğu ve 2 mikroorganizmada ise ciproflacacinden daha etkili olduğu görülmüştür. Negatif kontrolün hiçbir konsatrasyonunda inhibitör etki görülmemiştir ve bütün tüplerde üreme olduğu görülmüştür.

Literatürde yapılan çalışmalarda Suudi Arabistan'da büyüyen *C. botrys* esansiyel yağının *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Aspergillus Niger*, *Candida Albicans*, *Sarcina Lutea*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Salmonella Enteridis* ve *Shigella Flexneri* patojen suşlarında antimikrobiyal aktivite gösterdiği, Yunanistan'da yetişen *C. Botrys* esansiyel yağının *Salmonella Aureus* ve *Basillus Cereus*'a karşı önemli antibakteriyel aktivite sergilediği, İran'dan toplanan *C. botrylerin* esansiyel yağının ise *Staphylococcus saprophyticus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Morteza-Semnani, 2015). Başka bir çalışmada ise disk difüzyon deneyinde, farklı mikroorganizma gruplarına karşı uçucu yağın inhibisyon zonlarının çapı *S.mutans* hariç diğer antibiyotiklerin inhibisyon çapından daha küçük olduğu görülmüştür (Tzakou ve ark., 2017). Yunanistan'da yapılan başka bir çalışma da *C. botrys* yağının, test edilen *Trichophyton Mentagrophytes*, *Epidermophyton Floccosum* ve *Microsporum Canis* dermatofitlerine karşı güçlü bir aktivite gösterdiği, MIC ve MBC değerlerinin çok düşük ve eşit olduğu rapor edilmiştir (Mahboubi ve ark., 2011).

*Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı disk difüzyon testinde 16 mikroorganizma suşunun 15'inde inhibisyon zonu oluşturmuştur. 15 mikroorganizma içinde en belirgin etki *Candida Albicans* ve *Shigella Boydii* patojen suşlarında görülmüştür. *Candida Albicans*'ta sadece nystatin pozitif kontrolü(16 mm) ve esansiyel yağda(14 mm) inhibisyon zonu ölçülmüştür. Diğer pozitif kontrol ve negatif kontrolde inhibisyon zonu ölçülmemiştir. *Shigella Boydii*'de esansiyel yağ tetracycline, gentamycin, streptomycin ve cepheperazone sulbaktam pozitif kontrollerinden daha etkili, eritromycin pozitif kontrolüylüde eş değer etki göstermiştir. *Escheria Coli* ATCC 25922 üzerinde esansiyel

yağ tetramycin pozitif kontrolünden daha etkilidir. *Neisseria Sicca* suşunda en büyük inhibisyon zonunu (20 mm) oluşturmuş ancak bu pozitif kontrollerden daha etkili olamamıştır. *Staphylococcus Aureus*'ta ise esansiyel yağın tetracycline pozitif kontrolünden daha etkili olduğu görülmüştür. Negatif kontrol hiçbir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon zonu oluşturmamıştır. MIC Testinde esansiyel yağın bütün mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu görülmüştür. En çok etki *Proteus Vulgaris*, *Candida Albicans*, *Klebsiella Pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas Aureginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus Auerus* ATCC 29213 patojen suşlarında görülmüştür ve hiçbir tüpte üreme olmamıştır. *Candida Albicans*'ta ise hiçbir pozitif kontrolde etki görülmezken esansiyel yağda 6,25 µl/ml etki görülmüştür. Esansiyel yağın bütün mikroorganizmalarda metronidazol pozitif kontrolünden daha etkili olduğu görülmüştür. Negatif kontrolün hiçbir konsantrasyonunda inhibitör etki görülmemiştir ve bütün tüplerde üreme olduğu görülmüştür.

Literatürde yapılan çalışmalarda, *E. tenuifolia*'nın uçucu yağının, *Enterobacter Cloacea* hariç tüm test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği olduğu görülmüştür. Suşlar karşılaştırıldığında *Enterobacter Cloacae*'nin en dirençli suş olduğu ve en hassas bakterinin ise *Staphylococcus Aureus* olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen diğer bir dikkat çekici sonuç gram-pozitif bakterilerin esansiyel yağa daha duyarlı olmasıdır (Çetin ve ark., 2015). Başka bir çalışmada uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi, 13 bakteri ve 2 fungal mikroorganizmaya karşı broth seyreltme yöntemi kullanılarak test edilmiştir. *Candida Albicans* ve *Saccharomyces Cereviciae* için antifungal etkinlik 1000 µg / ml'den yüksek iken, uçucu yağın *Bacillus Cereus*'a karşı en düşük minimum inhibisyon konsantrasyonu 62.5 µg / ml olarak rapor edilmiştir (Gökbulut ve ark.,2013). Çörtük uçucu yağının 1µl/petri dozunda *B. Cinerea* ve *S. Sclerotiorum* hariç diğer fungusların hiç birisinde inkübasyonun başından sonuna kadar herhangi bir antifungal etki gözlenmemiştir (Koçak ve Boyraz, 2006). Arıdoğan ve ark. (2002) yaptığı çalışmada ise *E. tenuifolia*'nın uçucu yağının *E.coli*, *S. Aureus* ve *P.aeruginosa* üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür.

Bakteriler biyofilm olarak adlandırılan biyotik veya abiyotik yüzeylerde kompleks topluluklar oluştururlar. Bazı çalışmalar esansiyel yağ bileşenlerinin, *E. coli* ve *S. aureus* biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesi / tedavisi için geleneksel antibiyotik tedavilerine alternatif ve / veya tamamlayıcı stratejiler olarak kullanılabilecek umut

verici moleküller olduğunu düşündürmektedir. Esansiyel yağ bileşenlerinin bazıları için düşük toksisitesi ve ilaç benzeri moleküler özellikleri göz önüne alındığında, bu bileşiklerin klinik uygulamaları değerlendirilmelidir. Üstelik, bu bileşikler, biyofilm ile ilgili problemleri yaşayan gıda işleme sistemleri gibi endüstriyel dezenfeksiyon için umut verici antibiofilm ajanları olarak da kullanılabilir (Borges ve ark., 2017; Walmiki, 2017). Bazı esansiyel yağlar biyofilmlerde hücrelerin ayrılmasına katkıda bulunur, biyofilm yapısını bozar, kalınlığını azaltır ve implant ve tıbbi cihazlarda biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilir (Manoharan ve ark., 2017; Rossi ve ark., 2018). Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan hücre bağlanmasının önlenmesi önemlidir, bu nedenle bu tutunmayı önler ve yüzeyin çevresel koşullarının değiştirilirse, yüzeyden kolaylıkla ayrılabilen bir biyofilm oluşur. Biyofilm ekstra polimerik matriksli bakterilerin bulunduğu kümelerden oluştuğu için engellenmesi zordur (Walmiki, 2017).

Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların belirlenmesiyle yapılan biyofilm inhibisyonu deneyinde *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının *Shigella Baydi*, *Acinetobacter Baumannii*, *Escheria Coli* ATCC 25922, *Candida Tropicalis* ve *Enterococcus Faecalis* ATCC 51299 patojen suşlarında biyofilm oluşumunu engellediği görülmüştür. *Candida Albican*'ta ise biyofilm oluşumu engellenmemiştir ancak biyofilmin yüzeye yapışmasını engellenmiştir. Biyofilm polisitren tüpün dibine çökmüştür.

Literatürde *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının biyofilmlere etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak başka esansiyel yağların biyofilm üzerine etkisi ile çalışmalar bulunmaktadır. Cascarilla kabuğu ve *Helichrysum* yağında bol miktarda bulunan  $\alpha$ -longipinenin, *Candida* biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığını rapor edilmiştir (Manoharan ve ark., 2017). Mevcut bulgular, kekik esansiyel yağın *P. fluorescens* suşlarının biyofilm oluşumunu engellediğini ve motilitelerini değiştirdiğini göstermektedir (Rossi ve ark., 2018). Başka bir çalışma PAEO ve karvakrolün oksasilin ve vankomisine dirençli *S. Aureus* suşuna karşı antibakteriyel ve antibiofilm potansiyelini göstermektedir (Vasconcelos ve ark., 2017).

Son yıllarda, sentetik katkı maddelerinin toksikliği ve karsinojenisitesi nedeniyle esansiyel yağlar gibi doğal katkıları üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Doğal ekstraktlar karmaşık karışımlardır ve bileşimleri etkisiz hale gelebilir ve beklenenden

farklı bir sonuç olabilir (Tsimogiannis ve ark., 2017). DPPH antioksidan testinin temelini oluşturur. . DPPH radikal süpürme, popüler DPPH antioksidan tahlilinin temelini oluşturur. DPPH tahlili, bitki yağlarının oksidatif stabilitesini öngörmek için kullanılmıştır. Esansiyelin yağın kimyasal bileşimi DPPH deneyinin sonucunu etkilemektedir (Chen ve ark., 2014; Turhan ve ark., 2017). Esansiyel yağlar gıda farmakolojisi ve farmasötik gibi çeşitli alanlarda büyük öneme sahiptir ve tıbbi amaçlı kullanımı istenmeyen oksidasyon ürünlerin önlemek için kullanılmıştır. Bu nedenle günümüzde bitki metabolitleri ve esansiyel yağların biyolojik potansiyelleri ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır ( Arabacı ve ark., 2017).

*Chenopodium Botrys* esansiyel yağının DPPH Testi ile hesaplanan IC50 değeri; 487,591 µl/ml'dir. α-tokoferol,, uçucu yağın DPPH süpürme kapasitesini karşılaştırmak için standart olarak kullanılmıştır. α-tokoferol'ün IC50 değeri: 3,679097 µl/ml'dir. Değerler karşılaştırıldığında *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının radikal süpürme kapasitesinin olmadığı görülmüştür. Literatürde de *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

*Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının DPPH Testi ile hesaplanan IC50 değeri; 30,43384 µl/ml'dir. α-tokoferol,, uçucu yağın DPPH süpürme kapasitesini karşılaştırmak için standart olarak kullanılmıştır. α-tokoferol'ün IC50 değeri: 3,679097 µl/ml'dir. Değerler karşılaştırıldığında *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Literatürde bulunan benzer çalışmalarda Adıyaman'da yetişen *Echinophora tenuifolia*'nın uçucu yağın IC50 ile ifade edilen DPPH radikal temizleme aktivitesi 2.84 g/l'dir (Gökbulut ve ark., 2013). Başka bir çalışmada *E. tenuifolia* ham ekstraktının ve fraksiyonlarının radikal temizleme etkinliği, kararlı DPPH radikalinin mor renkli bir metanol solüsyonunun ağartılmasının ölçülmesine dayanılarak DPPH testi ile değerlendirildi. Ham ekstrakt, 84.46 ± 2.59 ug / ml IC50 değeri ile direnç aktivitesi göstermiştir. En iyi DPPH temizleme kapasitesi AcOEt fraksiyonu için gözlenmiştir ve IC50 değeri 40.39±0.41 µg/ml'ye eşittir(Marelli ve ark., 2017).

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak bilinir ve hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, sitokrom c translokasyonu, kaspazların aktivasyonu ve nihayetinde hücrenin apoptotik cisimlere bölünmesi gibi bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile karakterizedir. Güçlü apoptozu indükleyici aktivite ile

minimal toksisite olan doğal bileşiklerin taranması ve değerlendirilmesi ilgi çekici bir alandır (Unlu ve ark., 2010) Yüzyıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler, biyoaktif bileşiklerden dolayı ilaç keşfinde belirgin bir rol oynamaktadır. Kontrolsüz hücre büyümesi ve yaygınlığı olarak tanımlanan kanser, dünyanın dört bir yanında önde gelen ölüm nedenidir. Kemoterapötik duyarlılık ve epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörlerinin ekspresyonu dahil tümörler birçok açıdan heterojendir. Edinilen çoklu ilaç direnci, kanseri tedavisinin başlıca engelidir. Kemoterapi sırasında tümörlerde bir grup ilaç direnci hücresi ortaya çıkabilir .Kanser insidansının artan eğilimi nedeniyle, tümör hücresi çoğalmasını kontrol altına almak için etkin tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, yeni kemoterapötik moleküller bu felaketli sorunu ele almak açısından önemlidir. . Doğal ürünlerin kanseri önlemek veya invaziv kanserlerde ilerlemeyi durdurmak için etkili bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Özkan, 2017; Karan ve ark., 2018). Bitkiler, ilaç keşfi ve kansere sebep olan kimyasalların kullanımının önlenmesi için geliştirilmesi potansiyel bir kaynaktır. Aslında, paklitaksel veya vinka alkaloidleri, vinkristin ve vinblastin gibi şu anda kullanılan anti-kanser ajanlarının en az % 60'ı doğal kaynaklardan türetilmektedir. Birçok rapor tıbbi bitkilerin antikanser aktivitesinin farklı metabolitlerin varlığına bağlı olduğunu göstermektedir. Tıbbi bitkiler, modern (allopatik) ilaçlara kıyasla hiçbir toksisiteye sahip değildir. Antikanser aktivitesi olan yeni doğal ürünler üzerinde yapılan çalışmalar biyoaktiviteye ve etki mekanizmasına dayalı yeni kimyasal türevleri sentezlemek için önemlidir. Ek olarak, doğal kaynaklardan elde edilen uçucu yağlar, doğal olarak oluşan biyoaktif maddelerdir (Aloui ve ark., 2016; Gomez ve ark., 2016). Son zamanlarda, pek çok kanser için alternatif tedavi olarak şifalı bitkilerin kullanımı dünya genelinde ve özellikle Lübnan ve çevredeki ülkelerde artmaktadır. Kanser tedavisinde, tamamlayıcı tedavilerin kullanımı gittikçe daha popüler hale gelmektedir. Yakın geçmişteki bilimsel kanıtlar, bazı tamamlayıcı terapilerin kanseri ve buna bağlı ağrı ve bulantı semptomlarını hafifletmede yardımcı olabileceğini göstermektedir (Salihah ve ark., 2016; Russo ve ark., 2018). Birçok çalışma, esansiyel yağların kimyasal önleyici potansiyele ve anti-tümöral etkinliğe sahip olduğunu farklı kanser hücre dizilerinde apoptozu indüklemek üzere işlev gördüğünü göstermektedir (Gomez ve ark., 2016)

Sitotoksitite ve apoptotik etki deneyleri incelendiğinde *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının MDA-MB-231 hücrelerine bütün dozlar ve



zamanlarda anlamlı bir etkisinin olduğu görülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde *Chenopodium Botrys* esansiyel yağının IC50 dozu 24 ve 48 saatte yaklaşık olarak 7 µl/ml ve 72 saate yaklaşık 5 µl/ml yağ konsantrasyonu olarak belirlendi. *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağında ise IC50 dozu 48 saatte yaklaşık olarak 7 µl/ml ve 72 saatte 5 µl/ml yağ konsantrasyonu olarak belirlendi. *Echinophora Tenuifolia* ve *Chenopodium Botrys* esansiyel yağlarının CCD-19Lu hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine göre etkisi daha düşüktür ancak buradada dozlardaki etki anlamlıdır. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün bitki tarama programında ham yağ, 48 ve 72 saat arasındaki inkübasyondan sonra IC50 değeri 20 mg /ml'nin altında ise, genellikle in vitro sitotoksik aktiviteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Saptanan önemli büyüme inhibisyon değerleri, esansiyel yağların umut verici bir anti-kanser ajanı olarak daha ileri araştırmaya değer olduğunu düşündürmektedir (Zorzetto, 2015).

Apoptotik etkiye bakıldığında AO/EB floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol hücrelerine 1 µl/ml DMSO uygulanmış ve apoptotik hücre yüzdesinin oranının oldukça düşük olduğu görülmüştür. 24 saat sonucunda apoptotik hücre oranı %7,8 iken 48 saatte apoptotik hücre oranının %13 olduğu apoptotik hücre yüzdesi formülü kullanılarak hesaplanmıştır. *Chenopodium Botrys* esansiyel yağı uygulanmış hücrelerde apoptotik hücre yüzdesi 24 saatte %58 iken 48 saatte apoptotik hücre yüzdesinin %67 olduğu görülmüştür. 48 saat sonunda 24 saate göre erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı uygulanmış hücrelerde ise apoptotik hücre yüzdesi 24 saatte %45 iken 48 saatte apoptotik hücre yüzdesinin %67,5 olduğu görülmüştür. 48 saat sonunda 24 saate göre erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlenmiştir. Yağlar karşılaştırıldığında iki yağın apoptotik etkisinin birbirine yakın olduğu görülmüştür.

Literatür çalışmaları incelendiğinde *Chenopodium Botrys* ve *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağı ile ilgili kanserle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak başka esansiyel yağların meme kanseri ile ilgili çalışmaları incelendiğinde benzer sonuçlara rastlanmıştır. Rosemary esansiyel yağı insan meme kanseri MCF-7 ve Hela hücrelerine karşı anti-kanser aktivitesi gösterdiği rapor edildi. (Jardak ve ark., 2017) *Dietes bicolor* esansiyel yağının meme kanseri hücresi hattı MDA-MB-231'e karşı sitotoksik ve apoptotik aktivitesini ortaya koymuştur (Gomez ve ark., 2016) , *Inula Graveolens* uçucu

yağının da anti-kanser ajanı olma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Karan ve ark., 2018). *Decatropis bicolor* uçucu yağının potansiyel biyoaktif bileşiklerle birlikte MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine karşı potansiyel bir sitotoksik ve antitümöral etkisi olduğu rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasının sonucu *Chenopodium Botrys* ve *Echinophora Tenuifolia* esansiyel yağının umut verici antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojen etkilerinin olduğunu göstermektedir. Sonuçlar bu esansiyel yağların daha ileri araştırmalara değer olduklarını göstermektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Aloui Z., Messaoud C., Haoues M., Neffati N., Jamoussi I.B., Essafi-Benkhadir K., Boussaid M., Guizani I., Karoui H., 2016. Asteraceae *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes, 1-15.
- Alvarez C.T., Gonzales A.T., Rodriguez J., Castillo S., Rivas C.L., Gonzales J.G.B., 2017. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *Journal Of Food Science And Technology*, 15 (1), 129-135.
- Andov A.L., Karapandzova M., Cvetkovikj I., Stefkov G., Kulevanova S., 2014. Chemical composition of *Chenopodium botrys* L. (Chenopodiaceae) essential oil. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60 (1) , 45-51.
- Arabacı T., Uzay G., Keleştemur U., Karaaslan M.G., Balcıoğlu S, Ateş B., 2017. Cytotoxicity, Radical Scavenging, Antioxidant Properties and Chemical Composition of the Essential Oil of *Satureja cilicica* P.H. Davis from Turkey. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21 (3), 500-505.
- Arıdoğan A., Atasever L., Bal Ç., 2004. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 34 , 20-23.
- Baser K. H.C., Kürkcüoğlu M., Malyer H., Bicakci A., 1998 . Essential Oils of Six *Echinophora* Species from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 345-351.
- Bojilov D., Dagnon S., Ivanov I., 2017. New insight into the flavonoid composition of *Chenopodium botrys*. *Phytochemistry Letters*, 20, 316-321.
- Borges A., Lopez-Romero J.C., Oliveira D., Giaouris E., Simoes M., 2017. Prevention, Removal And Inactivation Of *Escherichia Coli* And *Staphylococcus Aureus* Biofilms Using Selected Monoterpenes Of Essential Oils. *Journal Of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
- Cabadak H., 2008. Hücre Siklusu Ve Kanser. *Adü Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3) , 51 – 61
- Campana R., Casettari L., Fagioli L., Cespi M., Bonacucina G., Baffone W., 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 132-140.

- Carmen C.W.H., Bernard M.H.L., Winnie K.W.S., Ka Ming C., Mary M.Y.W., 2017. Novel Strategies On Personalized Medicine For Breast Cancer Treatment: An Update. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18, 1-18
- Chen C., Tong Z., Liao D., Li Y., Yang G., Li M., 2014. Chemical Composition And Antimicrobial And Dpph Scavenging Activity Of Essential Oil Of *Toona Sinensis* (A. Juss.) Roem From China. *Antimicrobial Oil, Bioresources*, 9(3), 5262-5278.
- CONG F., YU H., GAO X., 2017. Expression of CD24 and B7-H3 in breast cancer and the clinical significance. *ONCOLOGY LETTERS*, 14, 7185-7190.
- Cooper, M. G., Hausman, E.R., 2006. *Hücre Moleküler Yaklaşım İzmir Tıp Kitabevi., Atlas Kitapçılık, Üçüncü Baskı.*
- Cristina R.T., Obiștioiu D., Dumitrescu E., Nichita I., Muselin F., Brezovan D., Cernea M.S., 2015. Eugenol Biologic Activity In Immunosuppressed Rat Females With *Candida Albicans* Genital Infection: Histocytological Changes. *Turkish Journal Of Biology*, 39, 455-460.
- Çamyar, H., 2011. *Mcf-7 Ve Mda-Mb -231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Docetaxel-Octreotid Kombinasyon Tedavisinin Olası Sinerjistik Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması.(Uzmanlık Tezi), Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir*
- Çetin B., Kaya Y., Çakır A., Özer H., Aksakal Ö., Mete E., 2016. Antimicrobial Activities Of Essential Oils And Hexane Extracts Of Two Turkish Spice Plants, *Cymbocarpum Erythraeum* (Dc.) Boiss. And *Echinophora Tenuifolia* L. Against Foodborne Microorganisms. *Records Of Natural Products*, 10(4), 426-436.
- Duke, R.C., 2004. Methods Of Analysing Chromatin Changes Accompanying Apoptosis Of Target Cells In Killer Cell Assays, *Methods In Molecular Biology*, 282, 43-66.
- Esen, M., Dığrak, M., 2009. Kahramanmaraş Yöresindeki Bazı Orman Ağaçlarından Elde Edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitesi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 21(1), 33-43.
- Gomez C.C.E., Carreno A., Pérez Ishiwara D.G., Martín Martínez E.S., Morales López J., Pérez Hernández N., Gómez García M.C., 2016. Decatropis Bicolor (Zucc.) Radlk Essential Oil Induces Apoptosis of the MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(266), 12906-12916.

- Gökbulut, I., Bilenler, T., Karabulut, I., 2013. Determination Of Chemical Composition, Total Phenolic, Antimicrobial, And Antioxidant Activities Of Echinophora Tenuifolia Essential Oil. International Journal Of Food Properties, 16, 1442–1451.
- Gültekin N., Karaoğlu K., Küçükateş E., 2008. Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi Ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri. Türk Kardiyol Dern Ars, 36(2), 120-130.
- İşlen N., 2017. EGFR İnhibitörünün (AG 1478) Triple Negatif Ve Luminal A Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antiproliferatif Ve Antimetastatik Etkileri, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Radyobioloji Programı(Yüksek Lisans Tezi), İstanbul
- Jardak M., Elloumi-Mseddi J., Aifa S., Mnif S., 2017. Chemical Composition, Anti-Biofilm Activity and Potential Cytotoxic Effect on Cancer Cells Of Rosmarinus Officinalis L. Essential Oil From Tunisia, Lipids in Health and Disease, 16, 190-200.
- Karan T., Yıldız I., Aydın A., Erenler R., 2018. Inhibition of Various Cancer Cells Proliferation of Bornyl Acetate and Essential Oil from Inula graveolens (Linnaeus) Desf., Rec. Nat. Prod. 12(3), 273-283.
- Kısmalı G., Sel T., 2012. Paraquat ile Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması, F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg., 26(2), 79-85.
- Kıvçak, B. 2002. Ceratonia siliqua L. Ekstrelerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29–31 Mayıs, Eskişehir.
- Koçak R., Boyraz N., 2006. Bazı Bitki Uçucu Yağlarının Fungisidal ve Fungistatik Etkileri, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (38), 76-81
- Korukoğlu M., İrkin R., Sertel S., 2006. Salmonella Ve Shigella Türlerinin Gelişmesini Engelleyen Tıbbi Bitkiler ve Esansiyel Yağlar. Gıda, 31(6), 319-324.
- Lodish H., Berk A., Kaiser A., C., Krieger M., Scott P., M., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaire P., 2011. Moleküler Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2010., Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara
- Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F., Farzin N., 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Chenopodium botrys L. Essential Oil, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 14(4), 498-503.
- Manoharan R.K., Lee J., Kim Y. , Kim S., Lee J., 2017. Inhibitory Effects Of The Essential Oils Alongipinene And Linalool on Biofilm Formation And Hyphal

- Growth Of *Candida Albicans*, *The Journal Of Bioadhesion And Biofilm Research*, 33(2), 143-155.
- Marrelli M., Statti G.A., Menichini F., Conforti F., 2017. *Echinophora Tenuifolia L.* Inflorescences: Phytochemistry And In Vitro Antioxidant And Antiinflammatory Properties In LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages, *Plant Biosystems - an International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology*, 151(6), 1073-1081.
- Martinez M.M., Reif R.D., Pappas D., 2010. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques, *Critical Review Analytical Methods*, 2, 996-1004.
- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haloui E., Fenina N., Aouni M., 2009. Antibacterial And Anticandidal Screening Of Tunisian *Citrullus Colocynthis* Schrad. From Medenine, *J Ethnopharmacol*, 125(2), 344-349.
- Melo F.B.B, Marques C.A.V., Rosa I A.S., Figueiredo I E.N., Rivero de Gutiérrez M.G., 2017. Actions of nurses in early detection of breast cancer, *Rev Bras Enferm*, 70(6), 1119-1128.
- Morteza-Semnani K., 2015. A Review On *Chenopodium Botrys L.*: Traditional Uses, Chemical Composition And Biological Activities, *Pharmaceutical And Biomedical Research*, 1(2), 1-9.
- Mosmann T., 1983. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays, *Journal Of Immunological Methods.*, 65(1-2), 55-63.
- Myszka K., , Schmidt M.T., Majcher M., Juzwa W., Olkowicz M., Czaczyk K., 2016. Inhibition Of Quorum Sensing-Related Biofilm Of *Pseudomonas Fluorescens* KM121 By *Thymus Vulgare* Essential Oil And Its Major Bioactive Compounds, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 252-259.
- Nairs S., Varalakshmi K.N., 2011. Anticancer, Cytotoxic Potential Of *Moringa Oleifera* Extracts on HeLa Cell Line, *J. Nat Pharm.*, 2, 138-42.
- Nitwa A.D.A., 2015, *Meme Kanseri Tedavi Parametrelerinin Biyolojik Dozimetri İle İncelenmesi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyojoloji Programı (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul
- Niu C., Gilbert E.S., 2004. Colorimetric Method For Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation And Structure, *Applied And Environmental Microbiology*, 70(12), 6951-6956.
- Ozer M.S., Sarikurkcu C., Ceylan O., Akdeniz I., Tepe B., 2017. A Comprehensive Study On Chemical Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibition

- Activities Of The Essential Oils Of *Chenopodium Botrys* Collected From Three Different Parts Of Turkey, *Industrial Crops & Products*, 107, 326-331.
- Özkan A., Erdoğan A., 2017. Evaluation Of Cytotoxic, Membrane, And Dna Damaging Effects Of *Thymus Revolutus* Célak Essential Oil On Different Cancer Cells, *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 47, 702-714.
- Paşalak Ş.İ., Seven M., 2017. Onkolojide Genetik Gelişmeler Ve Hemşirenin Rollerine Etkisi, *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 14(3), 212-217.
- Rauf A., Uysal S., Hadda T.B., Siddiqui B.S., Khan H., Khan M.A., Ijaz M.I., Mubarak M.S., Bawazeer S., Abu-Izneid T., Khan A., Farooq U., 2017. Antibacterial, Cytotoxicity, and Phytotoxicity Profiles Of Three Medicinal Plants Collected From Pakistan, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2).
- Rossi C., Chaves-López C., Serio A., Anniballi F., Valbonetti L., Paparella A., 2018. Effect of *Origanum vulgare* Essential Oil on Biofilm Formation and Motility Capacity of *Pseudomonas fluorescens* Strains Isolated from Discolored Mozzarella Cheese, 124(5), 1220-1231.
- Russo A., Cardile V., Graziano A.C.E., Avola R., Bruno M., Rigano D., 2018. Involvement of Bax and Bcl-2 in Induction of Apoptosis by Essential Oils of Three Lebanese *Salvia* Species in Human Prostate Cancer Cells, *International Journal Of Molecular Sciences*, 19, 292-305.
- Sağlam Ö., 2014. MDA-MB-231 Kanser Hücrelerinin Çoğalması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi Ve Mirna İlişkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı(Doktora Tezi), Eskişehir.
- Salihah N., Mazlan N., Lua P.L., 2016. The Effectiveness Of Inhaled Ginger Essential Oil In Improving Dietary Intake In Breast-Cancer Patients Experiencing Chemotherapy-Induced Nausea And Vomiting, *Focus On Alternative And Complementary Therapies*, 21(1), 8-16.
- Sieniawskaa E., Los R., Baj T., Malm A., Glowniak K., 2013. Antimicrobial Efficacy of *Mutellina Purpurea* Essential Oil And -Pinene Against *Staphylococcus Epidermidis* Grown In Planktonic And Biofilm Cultures, *Industrial Crops And Products*, 51, 152-157.
- Szczepanski S., Lipski A., 2014. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation, *Food Control*, 36, 224-229.
- Şanlı A., Karadoğan T., Tosun B., Tonguç M., Erbaş S., Growth Stage And Drying Methods Affect Essential Oil Content and Composition Of Pickling Herb

- (*Echinophora Tenuifolia* Subsp. *Sibthorpiana* Tutin), Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1, 43-49.
- Tsimogiannis D., Bimpilas A., Oreopoulou V., 2017. Dpph Radical Scavenging And Mixture Effects Of Plant O-Diphenols And Essential Oil Constituents, European Journal Of Lipid Science and Tecnology, 119, 16003473 (1-9).
- Tural S., Turhan S., 2017. Antimicrobial And Antioxiğant Properties Of Thyme (*Thymus Vulgaris* L.), Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) and Laurel (*Lauris Nobilis* L.) Essential Oils And Their Mixtures, The Journal Of Food, 42(5), 588-596.
- Tzakou O., Pizzimenti A., Pizzimenti F.C., Sdrafkakis V., Galati E.M., 2007. Composition and Antimicrobial Activity of *Chenopodium botrys* L. Essential Oil from Greece, Journal of Essential Oil Research, 19, 292-294.
- Uçar E., Odabaş Köse E., Özyiğit Y., Turgut K., 2015. Bazı Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerde Esansiyel Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 10 (2), 118-124.
- Unlu M., Ergene E., Vardar Unlu G., Sivas H., Vural N., 2010. Composition, Antimicrobial Activity And İn Vitro Cytotoxicity Of Essential Oil From *Cinnamomum Zeylanicum* Blume (Lauraceae), Food And Chemical Toxicology, 48, 3274-3280.
- Walmiki M.R., Ravishankar Rai V., 2017, Cell Attachment Inhibition and Anti-biofilm Activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* Essential Oils Against Pathogenic Bacteria, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 20(1), 59-68.
- Wells J.A., 1988. Technique for Staining the Superficial Cells of Plucked Hair Follicles and Other Solid Tissues, Stain Technology, 63, 3.
- Yokuş B.,Çakır D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(2), 7-18.
- Zorzetto C., Sánchez-Mateo C.C., Rabanal R.M., Lupidi G., Bramucci M., Quassinti L., Iannarelli R., Papa F., Maggi F., 2015. Antioxidant Activity and Cytotoxicity On Tumour Cells Of The Essential Oil from *Cedronella Canariensis* Var. *Canariensis* (L.) Webb & Berthel. (Lamiaceae), Natural Product Research, 29(17), 1641-1649.



## **7. ÖZGEÇMİŞ**

Adı-Soyadı: Beyza Hilal KESKİN

Doğum yeri ve tarihi: Kastamonu- 31.01.1993

E-posta: beyzahilalalagoz@gmail.com

Adres: İstiklal Mh. İki Eylül Cd. No:50/14 Odunpazarı/ESKİŞEHİR

### **Eğitim:**

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi  
Biyomühendislik Bölümü

