

T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI



**ENDEMİK *Hypericum salsolifolium* BİTKİSİNİN ANTİKANSER
VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

GAMZE AKILLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU

HAZİRAN - 2024

KASTAMONU

TEZ ONAYI

GAMZE AKILLI tarafından hazırlanan “ENDEMİK *Hypericum salsolifolium* BİTKİSİNİN ANTİKANSER VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **05.06.2024** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU Kastamonu Üniversitesi
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Kevser Betül CEYLAN Bartın Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Doç. Dr. Selçuk MEMİŞ

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Gamze AKILLI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDEMİK *Hypericum salsolifolium* BİTKİSİNİN ANTİKANSER VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

GAMZE AKILLI

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF.DR MEHMET CENGİZ BALOĞLU

Bu tez çalışmasında, *Hypericum salsolifolium* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktiviteleri belirlenmiştir. Ekstraktların antikanser etkisi MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde MTT testi uygulanarak değerlendirilmiştir. En etkili sonuçlar MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde etil asetat ekstraktında gözlemlenmiş olup, 48 saatlik süre sonunda IC₅₀ değeri 270 µg/mL olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre hattında ise en düşük IC₅₀ değeri 24 saat sonunda etil asetat ekstraktında gözlemlenmiş ve 192,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Antimikrobiyal aktivite 3 Gram (+), 6 Gram (-) bakteri ve bir maya üzerinde agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Aktiviteye sahip ekstraktların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Agar kuyucuk difüzyon sonuçlarına göre en yüksek zon çapı *Bacillus subtilis* (11 mm) ve *Staphylococcus aureus* (8 mm) suşlarına karşı ölçülmüştür. Ekstraktların anti-quorum sensing aktivitelerini belirlemek için, viyolasin pigmenti üretimi ve biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinlikleri sırasıyla *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşları üzerinde araştırılmıştır. Ekstraktlar viyolasin pigment üretimini inhibe edici etki göstermemiştir. Biyofilm oluşumunu en fazla inhibe eden ekstrakt %81,5 oranı ile etil asetat ekstraktı olmuştur. Etil asetat ve metanol ekstraktlarının yeni antikanser ajanları geliştirilmesi adına bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, farklı kanser hücre hatları üzerinde ekstraktların etkinliğinin test edilmesi ileriki, çalışmalar için önemlidir. *S. aureus* suşunda biyofilm oluşumunu en çok inhibe eden etil asetat ekstraktı, ileriki çalışmalarda anti-biyofilm ajanı olarak kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELER: *Hypericum salsolifolium*, antikanser, antimikrobiyal, anti-QS aktivite

Haziran 2024, 76 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF THE ENDEMIC *Hypericum salsolifolium* PLANT

GAMZE AKILLI

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU

In this thesis study, the anticancer, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of ethyl acetate, methanol and water extracts obtained from the aerial parts of the *Hypericum salsolifolium* plant were examined. The extracts were evaluated for their anticancer activity using the MTT assay on MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. The most effective results were observed in the MDA-MB-231 cell line in ethyl acetate extract, and the IC₅₀ value was calculated as 270 µg/mL at the end of the 48-hour period. In the MCF-7 cell line, the lowest IC₅₀ value was observed in ethyl acetate extract after 24 hours and was calculated as 192.1 µg/mL. Antimicrobial activity was investigated on 3 Gram (+), 6 Gram (-) bacteria and a yeast by agar well diffusion method. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values of extracts with activity were determined. According to the agar well diffusion results, the highest zone diameter was measured in *Bacillus subtilis* (11mm) and *Staphylococcus aureus* (8mm) strains. To assess the anti-quorum sensing properties of the extracts, their ability to inhibit violacein pigment production in *Chromobacterium violaceum* CV026 and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains was examined. The extracts did not have an inhibitory effect on violacein pigment production. The extract that most inhibited biofilm formation was ethyl acetate extract with a rate of 81.5%. Ethyl acetate and methanol extracts are thought to have a potential for the development of new anticancer agents. Additionally, testing the effectiveness of the extracts on different cancer cell lines is important for future studies. Ethyl acetate extract, which most inhibits biofilm formation in *S. aureus* strain, can be used as an anti-biofilm agent in future studies.

KEYWORDS: *Hypericum salsolifolium*, anticancer, antimicrobial, anti-QS activity.

June 2024, 76 Page

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca ufkumu genişleten, bilgisini, ilgisini ve desteklerini benden esirgemeyen öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum sayın danışmanım Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU' na; Çalışmamın her aşamasında görüş ve önerilerinden yararlandığım, güler yüzünü, değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca engin bilgilerinden yararlandığım sayın Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ' ye deneyler sırasında sağladığı yönlendirme ve destek için teşekkür ederim. Çalışmama başladığım ilk günden beri desteğini esirgemeyen, deneylerde karşılaştığım zorluklarda anlayışlı ve olumlu yaklaşımıyla yol gösteren, kıymetli tecrübelerinden yararlandığım Arş. Gör. Mustafa ÖÇAL' a teşekkür ederim.

Çalışmalarda kullandığım ekstraktların temin edilmesini sağlayan Prof. Dr. Gökhan ZENGİN' e teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı bana daima kendimi iyi hissettiren başta Öğr. Gör. Necdet Mehmet ÜNEL ve Dr. Anfal Izaldeen ALKATEEB olmak üzere beraber çalıştığımız Plant Omiclabs Reseach Lab aileme teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda beni cesaretlendiren, her türlü imkanı sağlayıp fedakarlıkta bulunan, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim. Zorlandığımda beni motive eden, yaşadığım tüm zorlukta yanımda olan ve hayatımı renklendiren sevgili İsmail Can YEŞİLÇÖP' e teşekkürlerimi sunarım.

GAMZE AKILLI

Kastamonu, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Hypericaceae Familyası	2
1.2 <i>Hypericum L.</i> Cinsi	3
1.2.1 <i>Hypericum salsolifolium</i> Türü Hakkında Genel Bilgiler	4
1.3 Kanser	5
1.3.1 Meme kanseri.....	8
1.4 Antimikrobiyal Aktivite.....	12
1.5 Qurum-Sensing (Çoğunluk algılama)	13
1.5.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	15
1.5.2 Biyofilm oluşumu	15
1.6 Çalışmanın Amacı.....	17
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
2.1 <i>Hypericum L.</i> Cinsine ait Kanser Çalışmaları.....	19
2.2 <i>Hypericum L.</i> Cinsine ait Antimikrobiyal Çalışmaları	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1 Materyal	23
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri	23
3.1.2 Çalışmada İncelenen Hücre Hatları	23
3.1.3 Çalışmada İncelenen Mikroorganizma suşları.....	23
3.1.4 Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler.....	24
3.1.5 Kullanılan Cihazlar, Materyaller ve Sarf Malzemeler.....	24
3.2 Metot	27
3.2.1 Bitki ekstraktlarının Elde Edilişi.....	27
3.2.2 Bitki Ekstraktlarından Çalışma Konsantrasyonları Hazırlama	28
3.2.3 Hücre Kültürü	28
3.2.4 Antimikrobiyal Aktivite.....	31
3.2.5 QS İnhibisyon Testleri	33
3.2.6 İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1 Antikanser Aktivite Bulguları.....	36
4.1.1 Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları	36
4.1.2 Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları	44

4.2	Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	50
4.2.1	Agar Kuyucuk Difüzyon Testi.....	50
4.3	QS İnhibisyon Test Bulguları	53
4.3.1	Viyolasin İnhibisyon Testi.....	53
4.3.2	Biyofilm İnhibisyon Testi.....	54
5.	TARTIŞMA	55
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	65
	KAYNAKÇA	66
	ÖZGEÇMİŞ.....	76



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 <i>Hypericum salsolifolium</i> bitkisi.....	4
Şekil 1.2 Tümör oluşum aşamaları	6
Şekil 1.3 Kanser hücrelerinin özellikleri	7
Şekil 1.4 Meme anatomisi	8
Şekil 1.5 Meme kanserinin moleküler alt tipleri.....	10
Şekil 1.6 MDA-MB-231 hücre hattının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	11
Şekil 1.7 MCF-7 hücre hattının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	12
Şekil 1.8 Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde QS mekanizma	14
Şekil 1.9 <i>C. violaceum</i> 'da QS sistemi	15
Şekil 1.10 Biyofilm oluşum basamakları.....	16
Şekil 3.1 Thoma lamı.....	30
Şekil 4.1 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.....	37
Şekil 4.2 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri	38
Şekil 4.3 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.....	39
Şekil 4.4 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.....	40
Şekil 4.5 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.....	41
Şekil 4.6 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.....	42
Şekil 4.7 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 24 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.	45
Şekil 4.8 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.	46
Şekil 4.9 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 24 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.	47
Şekil 4.10 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC ₅₀ değeri.	48
Şekil 4.11 Antimikrobiyal aktivite sonucu oluşan zon çapları. (1:Pozitif kontrol, 2:Negatif kontrol, 3: Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).	51
Şekil 4.12 <i>E. aerogenes</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ve <i>S. Typhimurium</i> 'a karşı ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri (1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3:Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).....	52
Şekil 4.13 Ekstraktların <i>C.violaceum</i> CV026'da viyolasin üretimini engelleme potansiyeli (1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).	53

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 Çalışmada incelenen mikroorganizma suşları.....	24
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar.	25
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler	26
Tablo 4.1 Ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.	43
Tablo 4.2 Ekstraktların MCF-7 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.	49

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

- Grafik 4.1** *Hypericum salsolifolium* ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılık oranları. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. * $p < 0,0$ 43
- Grafik 4.2** *Hypericum salsolifolium* ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılık oranları. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$ 49
- Grafik 4.3** *Hypericum salsolifolium* ekstraktlarının *S. aureus* suşu üzerine biyofilm inhibitör etkinliği. Veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Negatif kontrol: Hiçbir madde uygulanmamış kuyucuklarda ölçülen absorbans değeri. EA ekstraktı, %5 DMSO uygulanmış kuyucuklarla; MeOH ve su ekstraktları ise %3 DMSO uygulanmış kuyucuklarla karşılaştırılmıştır. 54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	: Santimetre
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
°C	: Santigrad Derece
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
&	: Ve

Kısaltmalar

AHL	: N- açıl homoserin lakton
CO₂	: Karbondioksit
dH₂O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ER	: Östrojen Reseptörü
FAO	: Gıda ve tarım örgütü
FBS	: Fetal bovin serum
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IC₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
Kob	: Koloni oluşturan birim
MeOH	: Metanol
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MTT	: Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NEAA	: Esansiyal Olmayan Amino Asit
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PR	: Progesteron Reseptörü
QS	: Quorum Sensing
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri

1. GİRİŞ

İnsan uygarlığının başlangıcından itibaren bitkiler, çeşitli hastalıkların tedavisi, iyileştirilmesi ve hafifletilmesinde temel kaynaklar olarak önem kazanmıştır. Tıbbi bitkiler, farmasötik, kozmetik ve besin değerleri bakımından büyük ilgi gören geniş bir bitki grubunu içermektedir. Bu bitkilere olan talep, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çeşitli nedenlerden dolayı artmaktadır (Ghorbanpour vd., 2017). Bitkilerin tıbbi kullanımına dair ilk yazılı belgeler, Mezopotamya'da M.Ö. 2600 yıllarına kadar uzanmaktadır. Bu belgeler, gelişmiş bir tıbbi sistemin varlığını ortaya koyan yaklaşık 1000 bitki kaynaklı ilacı içermektedir. Mısır tıbbının tarihi ise M.Ö. 2900'e kadar uzanmaktadır; ancak en önemli kaynaklarından biri M.Ö. 1550'den kalma "Ebers Papirüsü"dür. Bu papirüs, 700'den fazla bitki kökenli ilaç içermekte olup, Mısır'ın tıbbi uygulamaları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Atanasov vd., 2015).

Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre günümüzdeki farmasötik ilaçların %25'i bitkilerden sağlanmaktadır. Dünya genelinde satılan ilaçların ise %30'unun bitki materyallerinden üretildiği Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından belirtilmiştir. Bitkilerde bulunan bazı bileşenler sentezle üretilebilmektedir. Günümüzde sentetik bileşiklerden üretilen ilaçlar önemli bir yer tutsa da zamanla sentetik ilaçların yan etkilere neden olması ya da tedaviye yanıt vermemesi gibi durumlarla karşılaşılabilir. Ayrıca bazı bakteriler antibiyotik tarzı ilaçlara direnç gösterebilir. Bu durumda doğal ürünlere olan talep artmaktadır (Karaca vd., 2023).

Bitkilerin büyüme ve gelişmesinde etkili olan çok sayıda organik bileşikler bulunmaktadır. Nükleotitler, amino asitler ve organik asitler gibi primer metabolitler bitkinin yaşamsal işlevlerinde doğrudan etki göstermektedir (Tiring vd., 2021). Sekonder metabolitler ise büyüme ve gelişmede doğrudan etki göstermemektedir. Fenolik bileşenler, terpenler, azot içeren bileşikler ve kükürt içeren bileşenler olarak sınıflandırılmaktadır (Twaij ve Hasan, 2022). Bitkiler doğal antioksidan bileşiklerinin başlıca kaynağını oluşturmakta ve bu nedenden dolayı süper antioksidanlar olarak bilinmektedir. Antioksidanların en önemli gruplarını ise fenolik maddeler oluşturmaktadır. Fenolik maddeler bitkilerin tüm kısımlarında görünen polifenolik

bileşiklerdir (Deveci vd., 2016). Polifenoller bitkilerin ikincil metabolitleridir ve genel olarak üç ana gruba ayrılır: flavonoidler, flavonoid olmayanlar ve tanenler. Bitkilerdeki polifenoller büyüme, üreme ve patojenlere karşı koruma gibi önemli rol üstlenirler. Ayrıca kanser, diyet, yaşlanma, astım vb. gibi birçok hastalığın gelişimine karşı önemli bir koruma sağlamaktadır (Pandey ve Rizvi, 2009).

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler antimikrobiyal aktivitelerden sorumludur. Antimikrobiyal özelliklere sahip olan başlıca fitokimyasal gruplar: fenolikler ve polifenoller, terpenoidler, alkaloidler, lektinler ve polipeptitlerdir. Bitkilerde bulunan bu bileşiklerin antimikrobiyal etkisinin altında yatan çeşitli mekanizmalar vardır. Fitokimyasallar mikrobiyal membranları parçalayarak veya hücrel metabolizmayı bozarak etki gösterebilir. Bunun yanında biyofilm oluşumunu da kontrol edebilirler. Bitki antimikrobialleri bakteriyel kapsül üretimini engelleyebilir ve bazı bitki bileşikleri çoğunluk algılamayı kontrol ederek bakteriyel virülansı azaltabilir (Ginovyan vd., 2017).

Türkiye, geniş bir bitki çeşitliliğine sahip olup 12.000'den fazla türü barındırmaktadır. Bu nedenle çok fazla endemik tıbbi ve aromatik bitkiler yetişmektedir (Altındal, 2019).

1.1 Hypericaceae Familyası

Birçok taksonomist tarafından Hypericaceae'nin ayrı bir familya mı yoksa Guttiferae (Clusiaceae) içinde Hypericoideae'nin bir alt familyası mı olduğu uzun bir süre tartışma yaratmıştır. Çok sayıda moleküler filogenetik çalışma, Hypericaceae'nin Guttiferae familyasının diğer üyelerinden bağımsız olduğunu açıklamıştır. Hypericaceae olarak sınıflandırılan dokuz taksonomik cins vardır: *Cratoxylum Blume*, *Eliea Cambess.*, *Harungana Lam.*, *Hypericum L.*, *Lianthus N. Robson*, *Santomasia N. Robson*, *Thornea Breedlove & E.M. McClintock*, *Triadenum Raf.* Ve *Vismia Vand* (YuV vd., 2021). Genellikle *Cratoxyleae*, *Hypericeae* ve *Vismieae* olarak üç kategoriye ayrılır. Tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yetişen 540-560 bitki türü içermektedir. *Hypericum L.* cinsi bu ailenin %80'inden fazlasını oluşturur (Hussein Hasan vd., 2023).

Hypericaceae glandüler noktalar veya çizgiler içeren 4-5 parçalı periantlı çiçeklere sahip olmaları bakımından ayırt edici bir familyadır. Bu familya yaprak dökmeyen veya nadiren yaprak dökken ot, çalı ve ağaçlardan oluşmaktadır. Ayrıca çoğu türünün salgı kanalı taşıdığı ksantonların yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. Endospermas tohumlara sahiptir. Meyve yapıları ise üzümü veya kapsül şeklindedir (Simpson, 2010).

1.2 *Hypericum L. Cinsi*

Hypericum kelimesinin kökeni, eski Yunanlılar tarafından kötü ruhları uzaklaştırmak amacıyla türbelerde ve dini resimlerde kullanılmasına dayanmaktadır (YuV vd., 2021). *Hypericum* cinsi dünyanın farklı coğrafyalarında dağılım gösteren çok yıllık otsu ve çalimsı bitkilerdir. Bu tür bitkiler subtropik olmakla birlikte Afrika, Asya ve Avrupa gibi pek çok yerde doğal olarak yetişmektedir (Akgöz, 2013). Antarktika hariç tüm dünyada görülen yaklaşık 500 tür içerir. Akdeniz Havzası, bu türün önemli bir çeşitlilik merkezi olup, 22 bölümde 150'den fazla türü barındırmaktadır (Kakouri vd., 2023). En tanınmış ve yaygın kullanılan türü *Hypericum perforatum*' dur. *Hypericum L.* türleri Türk geleneksel tıbbında “kantaron, peygamber çiçeği, kılıçotu, kanotu, kuzukıran ve binbirdelik otu” isimleriyle de bilinmektedir (Asan, 2020).

Haziran ile Eylül arasında çiçek açan ve boyu 1 metreye kadar uzanan *Hypericum* türlerinin yaprakları ya da çiçeklerinin siyah/kırmızı glandlar içeren hiperisin veya uçucu yağ içeren şeffaf renkli glandlar barındırdığı bilinmektedir. Diğer birçok Hypericaceae üyelerinin aksine, *Hypericum* türlerinin meyveleri kapsül formundadır. *Hypericum* tohumları küçüktür ve silindirikten elips şekline doğru değişen sarımsı-kahverengi ile koyu mor-kahverengi renge sahiptir (Okyay, 2020)

Hypericum cinsi naftodiantronlar, floroglüsinol türevleri, flavonoidler, organik asitler, uçucu yağlar, amino asitler, ksantonlar, tanenler, prosiyanidinler ve diğer suda çözünür bileşikler dahil olmak üzere birçok metabolit içermektedir (Yilmazoğlu vd., 2022). Gıdalarda tat ve kozmetikte koku üretimi yapan işletmeler, yapısında bol miktarda uçucu yağ içeren bitki türleri hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Yapısında

hiperisin, flavonoid ve fenolik bileşikler içermesi araştırmacıların bu cinse ait bitkilere olan merakını artırmıştır (Taşar vd., 2022).

Bu cinse ait türler ve bileşikleri sitotoksik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan, antifungal, antihiperglisemik ve asetilkolinesteraz aktivite sergilemektedir. Ayrıca, hafif depresyon, yaralar, yanıklar, ishal, ağrı ve ateş gibi birçok hastalıklarının tedavisi için de kullanılmaktadır (Caldeira vd., 2022).

1.2.1 *Hypericum salsolifolium* Türü Hakkında Genel Bilgiler

Hypericum salsolifolium, Türkiye'nin Güney Anadolu Bölgesindeki bozkırlarda yetişen otsu ve çalimsı olan bir endemik bitkidir. Bu tür Urfa kantaronu olarak da bilinir (Şekil 1.1).

H.salsolifolium çiçekleri yüksek miktarda hiperisin, psödohiperisin, hiperosid, rutin, kuarsetin, izokuersetin, kersetin, amentoflavon, kateşin ve epikateşin içermektedir. Ayrıca yaprak kısımları Neoklorojenik asit, avicularin ve 2,4-dihidroksibenzoik asit içermektedir fakat kafeik asitten yoksundur (Surmuş Asan, 2019).



Şekil 1.1 *Hypericum salsolifolium* bitkisi

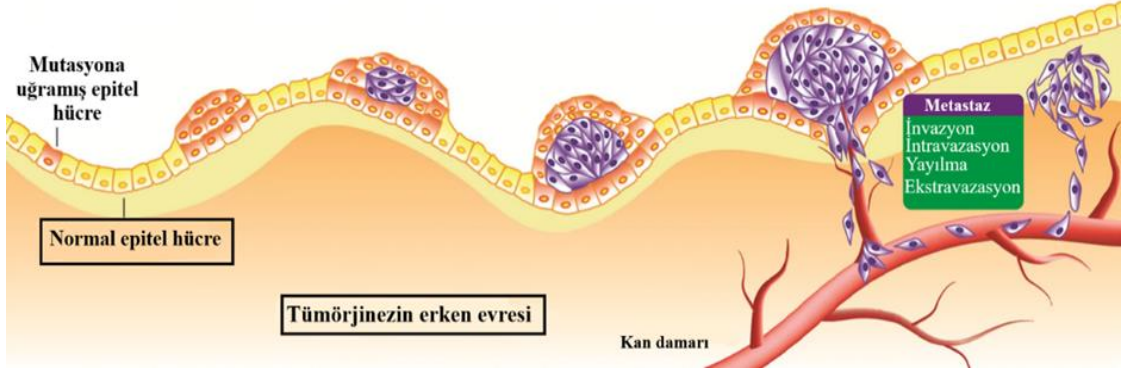
Yapılan bir çalışmaya göre, *H. salsolifolium* 'un ekstraktlarının fenolik bileşen analizi ve amino asit profilinin belirlenmesinde LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bunun sonucunda ekstraktların vanilik asit, siringik asit, fumarik asit, kafeik, hidoksisinamik,

hidroksiben, salisilikasit, oleuropein, mirisetin, ellagikasit, kuersetin, naringenin, luteolin ve kurkumin fenolik bileşikler içerdği saptanmıştır. Ayrıca, metanol ekstraktının içerisinde valin, treonin, izolösin, fenilalanin, lösin, lizin, histidin, triptofan ve metionin esansiyel amino asitleri belirlenmiştir. *H. salsolifolium* bitkisinin yüksek düzeylerde kalsiyum, magnezyum ve potasyum içerdği bunun yanında toksik etki gösteren ağır metaller içermediği tespit edilmiştir (Agan vd., 2023).

1.3 Kanser

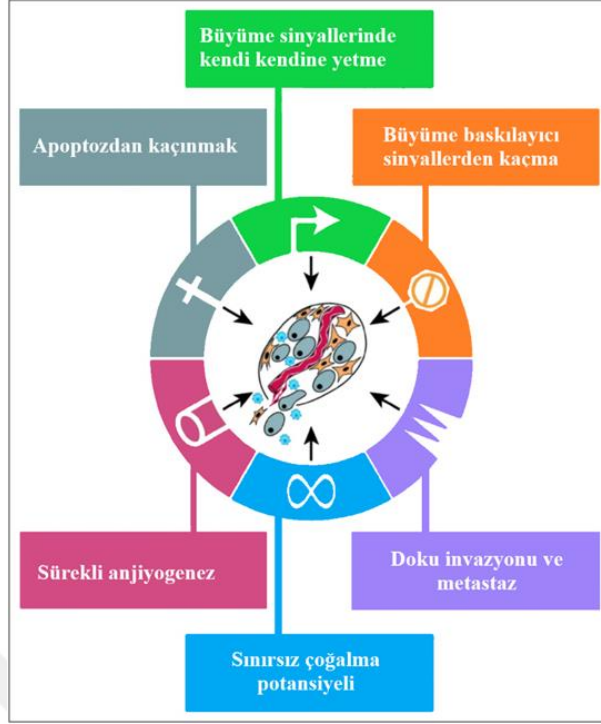
Kanser kontrolsüz büyüme, tümör oluşumu ve çevredeki vücut kısımlarının istilası ile karakterize edilir. Normal somatik hücrelerin aşırı büyümesi tümör gelişimine yol açabilir fakat bu tümörlerin tamamı kanser olmayabilir. Bazı tümör türleri tek bir bölgede kalır, komşu dokuları istila etmez ve böylece vücuda yayılmazlar. Bu tümörler iyi huylu tümör olarak adlandırılır ve kanserli değildir. Kötü huylu tümörler ise Şekil 1.2'de görüldüğü gibi tek bir bölgede kalmayıp vücudun diğer bölgelerine yayılırlar (Kanwal vd., 2013). Tümör oluşumu, epitelyal hücrede hücre bölünme olasılığını artıran bir mutasyon ile başlar. Hiperplazi aşamasında, hücrelerin aşırı çoğalmasıyla birlikte bölgesel hücre yoğunluğu artar, bu da tümör oluşum sürecinde önemli bir adımdır. Displazi aşamasında aşırı büyüyen hücreler, orijinal formlarını ve davranışlarını değiştirir, böylece büyüme potansiyeli artar. Hücrelerin olgunlaşma sürecine girmediği, doku özelliklerini kaybettiği ve kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı neoplastik lezyon, *in situ* karsinom aşamasını temsil eder. Kanser hücreleri lenf sistemi ve kan dolaşımı yoluyla diğer bölgelere ulaşarak metastaz yaparlar. Bu kanserin vücudun farklı bölgelerine sıçramasına ve yeni tümörlerin oluşmasına yol açabilir (X. Li vd., 2020).

Başlangıç Hiperplazi Displazi In situ karsinom Invaziv kanser Metastaz



Şekil 1.2 Tümör oluşum aşamaları (X. Li vd., 2020)

DNA dizisinde meydana gelen anormallikler kanser oluşumunu tetiklemektedir. Kanserler ebeveynlerden gelen genlerle aktarılabilirken hücrelerdeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması ve replikasyonda meydana gelen hatalar sonucunda da oluşabilmektedir. Kalıtsal mutasyonlar ve bağışıklık koşulları gibi içsel faktörlerin yanı sıra çevresel faktörler de kanser oluşumuna yol açmaktadır (Anand vd., 2008). Sağlıklı hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde bu hasarın tamir edilmesi gerekmektedir. Hasar tamir edilmezse apoptoz (programlı hücre ölümü) ile hasar gören hücrenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Aynı zamanda apoptoz hücrelerin uygun bir şekilde yok edilmesinde ve dokuların dengesinin korunmasında (homeostaz) etkili bir mekanizmadır. Kanser hücreleri apoptoza direnç gösteren bir mekanizmaya sahip olduğundan programlı hücre ölümü gerçekleşmemekte ve kanser hücreleri çoğalma göstermektedir (Dağdeviren, 2021). Hanahan ve arkadaşları kanser oluşumuna sebep olan hücreleri normal hücrelerden ayıran özellikleri Şekil 1.3'deki gibi alt kategoriye ayırmıştır. Bu özellikler kanser oluşum mekanizmasının temelini oluşturmaktadır (Hanahan vd., 2000).



Şekil 1.3 Kanser hücrelerinin özellikleri (Gambhir, 2008)

Kanser, dünya genelinde görülen sık yaşam kayıpları nedenlerinden biridir ve bugün itibariyle 185 ülkede bilinen 36 kanser çeşidi bulunmaktadır. Dünya genelinde sıklıkla gözlenen kanser türleri meme, akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanseridir. Kadınlarda meme kanseri en sık teşhis edilen kanser olup akciğer kanserini geride bırakmaktadır. Görülme sıklığı açısından meme ve kolorektal kanserden sonra üçüncü, ölüm oranı açısından ise ikinci sırada yer alan akciğer kanseri erkeklerde kanser morbidite ve mortalitesinin başlıca sebeplerindedir (Sung vd., 2021).

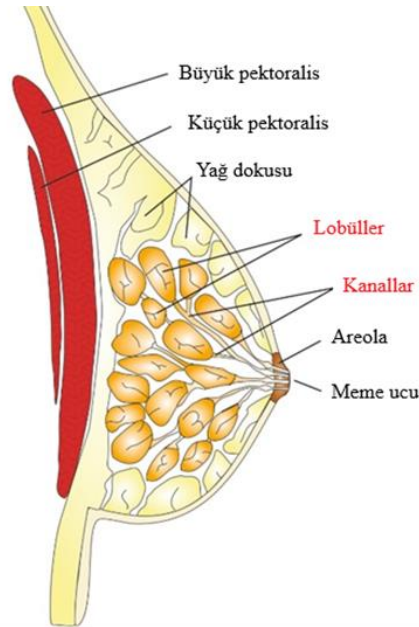
Kanser hastalığı tedavisinde en çok kullanılan yöntemler kemoterapi, cerrahi, radyasyon ve immünoterapi olarak sıralanabilir. Kemoterapi ajanlarının temel amacı, hücre bölünmesini ve çoğalmasını engelleyerek kanser hücrelerini hedef almaktır. Bu ajanlar genellikle DNA, RNA veya protein sentezi gibi biyolojik süreçlere müdahale ederler ve müdahale yeterli olduğunda apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerinin ölümüne neden olurlar (Nakamura ve Maeda, 2023). Radyasyon, kanser hücrelerini etkisiz hale getirmek için kullanılan fiziksel bir ajandır ve bu ajana iyonlaştırıcı radyasyon denir. İyonlaştırıcı radyasyon, elektrik yüklü parçacıklar oluşturur ve dokuların hücrelerinde birikerek enerji depolar. Biriken bu enerji, kanser hücrelerinin yok edilmesine ya da genetik değişikliklere neden olarak kanser hücrelerinin ölümüne

yol açabilir (Baskar vd., 2012). Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerinden farklı olarak immünoterapi bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine çok yönlü ve çeşitli hedeflere saldırmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, bağışıklık sistemi hücrelerini ve moleküllerini düzenleyerek sistemi güçlendirmekte böylece çeşitli noktalardaki tümör hücrelerine etkili bir şekilde saldırabilir hale getirmektedir (Tan vd., 2020).

1.3.1 Meme kanseri

Kadınlarda önemli sağlık sorunu haline gelen meme kanseri ülkelerde sıklıkça rastlanan kanserlerden biridir. Erkeklerde nadir olarak görünen meme kanseri ise dünya genelindeki tüm meme kanserlerinin yalnızca %1'ini ifade etmektedir. Birçok faktörün meme kanserine neden olduğu belirtilse de spesifik risk faktörünü belirlemek mümkün değildir (Gucalp vd., 2019).

Meme, Şekil 1.4'de görüldüğü üzere lob olarak bilinen ve lobüllere ayrılan bölümlerden oluşmaktadır. Lob ve lobülleri birbirine bağlanmasını sağlayan küçük kanallar bulunmaktadır (Shareef vd., 2016).

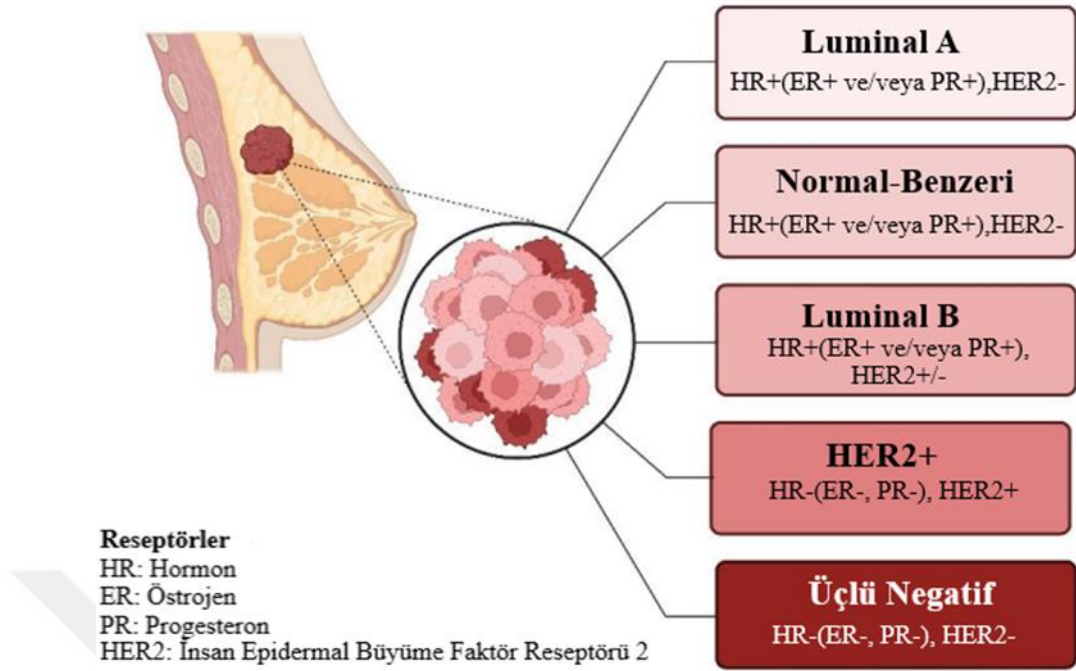


Şekil 1.4 Meme anatomisi (Feng vd., 2018)

Meme kanseri, memenin süt üreten bezlerinde ya da sütün meme uçlarına iletilmesini sağlayan kanallarda anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve metastaz yapması sonucunda oluşmaktadır. Meme de meydana gelen primer tümör, invaziv hale geldiği durumda bölgedeki lenf düğümlerine ilerlemekte ve metastaz yapabilmektedir. Meme kanseri akciğer, kemik, beyin ve karaciğer gibi organlara metastaz yaparak da bireylerin ölüme yol açmaktadır (Baqutayan, 2012; Lu & Kang, 2007).

Yaş, cinsiyet, alkol, obezite, hormonal durum, radyasyon ve genetik faktörler meme kanseri oluşumunu tetiklemektedir. Meme kanserinde en önemli risk faktörü yaş olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri tüm yaş gruplarında gözlenmekle birlikte en yüksek düzeyde 50 yaş altı kadınlarda görülmektedir. Östrojenler meme kanseri gelişiminin patogenezinde önem arz etmektedir. Yüksek östrojen seviyesinin ve bu hormona uzun süre maruz kalmanın meme kanseri riskini ortaya koyduğu belirtilmiştir. Erken menarş ve geç menopoz östrojene maruz kalma süresiyle doğru orantılı olarak kansere yakalanma riskini artırmaktadır. Yapılan çalışmalar fazla yağ dokusuna sahip olmanın da östrojen düzeylerini yükselterek meme kanserine yakalanma riskini artırdığını göstermektedir. Meme kanseri vakalarının %5-10'luk kısmı genetikdir ve en iyi bilinen genetik mutasyonlar *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. *BRCA1* geni baskılayıcı bir gen olan *BRCA2* gen ürünü ile birlikte çift DNA iplikçik kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri hastalarının sadece %3-5'inde görülmektedir (Momenimovahed & Salehiniya, 2019; Smolarz vd., 2022).

Meme kanseri, genellikle Luminal A, Luminal B, HER2, normal benzeri ve bazal benzeri olmak üzere beş moleküler alt gruba ayrılmakta ve genellikle bu alt gruplar mRNA profil modellerine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Mir & Din, 2023)

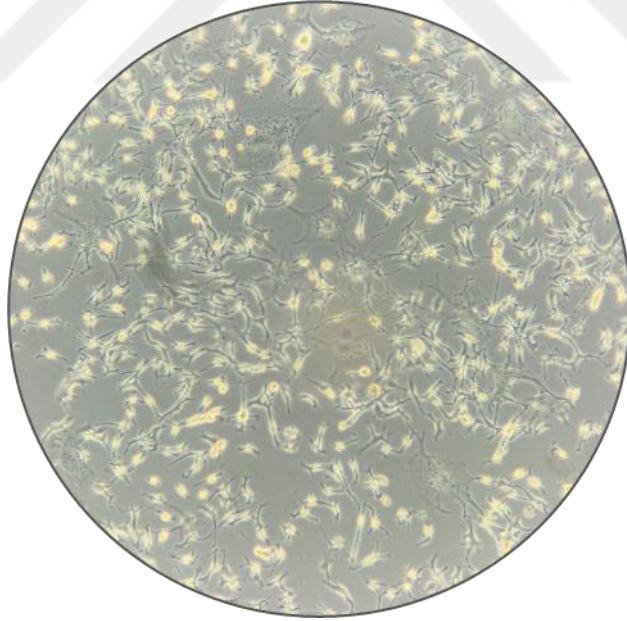
Luminal benzeri kanserler tüm kanserlerin %60-70'ini, HER2 tipi kanserler %12-20'sini ve bazal benzeri kanserler ise tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Meme kanserinin en yaygın tipi olan luminal benzeri kanserler, A ve B olmak üzere iki farklı alt gruba ayrılır. Hormon reseptörlerinin (HR) genetik ekspresyonu luminal A ve B tipi için ortak bir özelliktir. Fakat B tipi, hücre döngüsü genlerinin daha yüksek ekspresyonuna ve daha düşük PR ekspresyonuna sahip olması nedeniyle A tipinden farklıdır. B tipi, A tipine göre yüksek sıklıkta p53 gen mutasyonları ile ilişkilidir (Johnson vd., 2021).

Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC), ER(-), PR(-) ve HER(-) olarak karakterize edilen heterojen bir tipdir. Bu tip 40 yaş altında ve *BRCA1* geninde mutasyon olan kadınlarda daha yaygındır. Çoğunlukla daha kötü prognozla ilişkilendirilir. Bazal benzeri ve TNBC terimleri birbiri yerine kullanılsa da TNBC'lerin tamamı bazal tip olarak sınıflandırılmaz (Łukasiewicz vd., 2021).

1.3.1.1 MDA-MB-231 Hücre Hattı

Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinden biri olan MDA-MB-231, metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki bir kadının plevral (göğüs boşluğu) bölgesinden elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri östrojen (ER), progesteron (PR) ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü) ekspresyonundan yoksun olduğundan son derece agresiftir (Gogacz vd., 2023). ER ifadesinin yokluğu, MDA-MB-231 hücrelerinin anti- hormon tabanlı tedavilerde duyarsızlığa neden olur. Üçlü negatif meme kanseri klinik açıdan tedavi seçeneklerinde sınırlıdır. Bu sebeple, MDA-MB-231 hücre hattı, bu tür meme kanserinin hücresel temelini araştırmak ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Mohammed vd., 2020)

Epitel benzeri morfolojiye sahip olan bu hücreler Şekil 1.6 belirtildiği gibi fenotipik olarak iç şekilli hücreleri içerir.



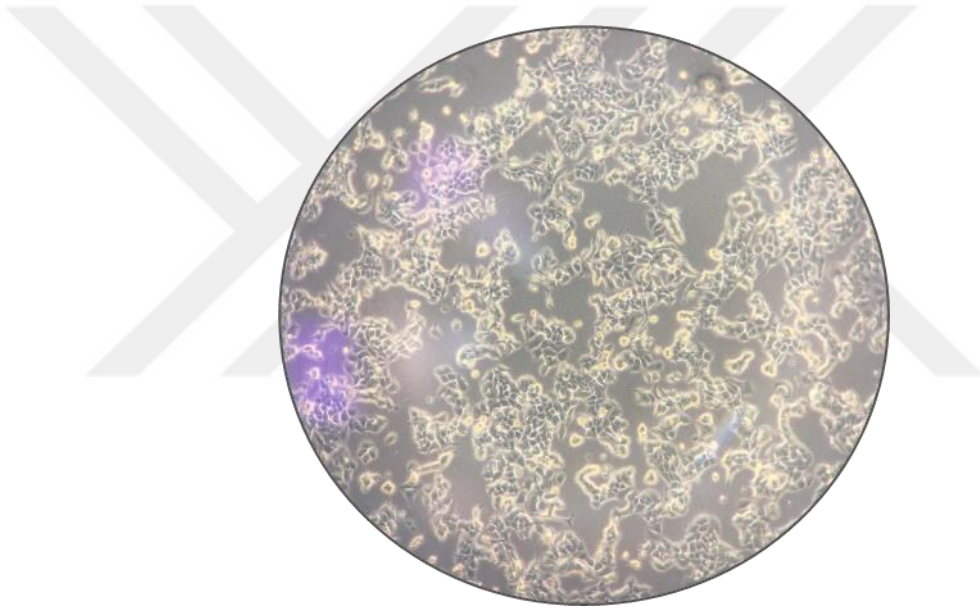
Şekil 1.6 MDA-MB-231 hücre hattının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

1.3.1.2 MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 hücreleri, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri için pozitif, glukokortikoid (HER2) reseptörü için ise negatif aktiviteye sahip olan Luminal A tipi

meme hücre hattıdır. Bu hücre hattı, Dr. Soule ve ekibi tarafından metastatik meme kanseri olan 69 yaşındaki bir kadının plevral enfüzyonundan izole edilmiş ve ismini Michigan Kanser Vakfı'ndan (Michigan Cancer Foundation-MCF) almıştır (Jain vd., 2020). MCF-7, genellikle düşük metastatik potansiyeli olan, az agresif ve yayılma eğilimi olmayan bir hücre hattıdır. Kolayca kültürlenene bu hücre hattı hedefe yönelik tedaviyle tedavi edildiklerinden ve ER ekspresyonunu koruduklarından dolayı anti-hormon tedavisi çalışmaları için çok uygundur (Comşa vd., 2015).

Işık mikroskobu altında genellikle Şekil 1.7' de belirtildiği gibi yuvarlak veya oval şekilli görünebilirler.



Şekil 1.7 MCF-7 hücre hattının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

1.4 Antimikrobiyal Aktivite

Antibiyotikler, mikroorganizmaların büyümesini durdurma veya öldürme yeteneğine sahip olan antimikrobiyal maddelerdir. İnsanlarda ve hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla antibiyotiklere başvurulmaktadır. Antibiyotiklerin aşırı kullanımı, antibiyotik atılımı ve çevresel salınım oranlarında önemli bir artışa ve dolayısıyla bakteri suşlarında direncin yaygınlaşmasına neden olmaktadır (Serwecińska, 2020). Antibiyotikler, duyarlı bakterileri öldürüyorsa “bakterisidal”

veya mikroorganizmaların büyümesini tersine çevrilebilir şekilde engelleyerek “bakteriyostatik” etki gösterirler (Sharma vd., 2014).

Antimikrobiyal direnç, mikroorganizmaların daha önce tedavi edilebilen enfeksiyonlara karşı direnç geliştirmesi ve antibiyotiklere karşı etkisiz hale gelme durumunu ifade etmektedir (Mancuso vd., 2021). Antibiyotik direnci veya antimikrobiyal direnç, doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır. Bakteriler, antibiyotiğin etkilerinden korunmak için mikroorganizmanın doğal direncini oluşturan fizyolojik değişiklikler ve genetik özelliklerden kaynaklanabilen içsel mekanizmalar geliştirirler (Sharma vd., 2014). Kazanılmış direnç, bakterilerin genetik özelliklerindeki değişiklikler sonucunda daha önce duyarlı olduğu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesini ifade etmektedir. Bu tür direnç genellikle bakteri genomundaki kromozomal veya ektrakromozomal elementler (plazmit, transpozon vb.) aracılığıyla kazanılır (Cesur & Demiröz, 2013).

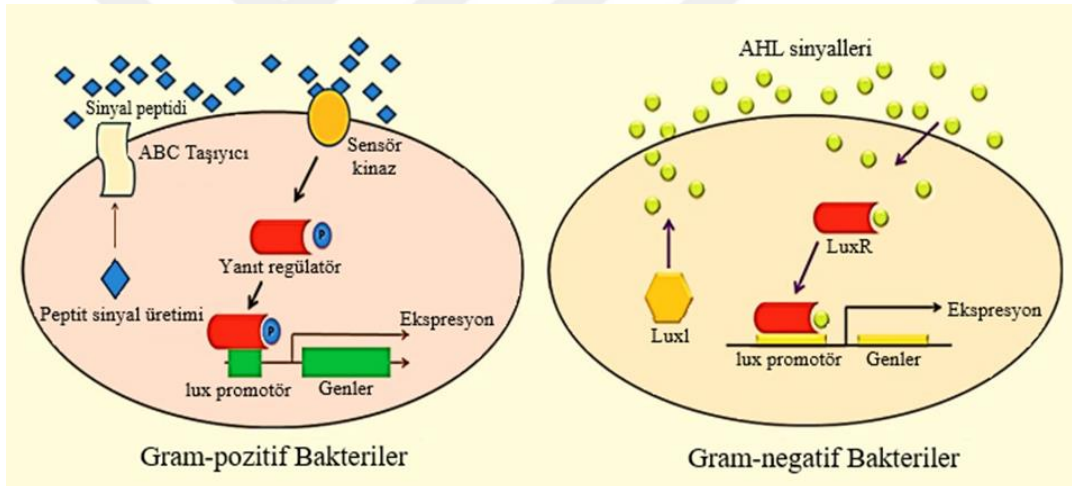
Antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonlar son zamanlarda halk sağlığı için ciddi bir tehdit unsuru olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü dirençli bakteriler, mevcut antibiyotiklerin yetersiz kalmasına ve tedavi seçeneklerinin azalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, yeni antibakteriyel ajanlara olan ihtiyacın artması antibiyotik direnciyle başa çıkabilmek için önemlidir (Chinemerem vd., 2022).

1.5 Qurum-Sensing (Çoğunluk algılama)

Quorum Sensing (QS), bakterilerin hücre yoğunluğuna bağlı olarak belirli sinyal moleküllerini algılamaları ve bu moleküller aracılığıyla çeşitli fenotipik ve fizyolojik davranışlarını düzenlemeleri olgusudur. QS, bakteriler tarafından üretilen bir sinyalin uygun reseptörüne bağlanmasıyla başlayan bir süreçtir. Uygun reseptörüne bağlanan sinyal molekülleri çeşitli genlerin ekspresyonunu modüle etmektedir. Bu durum bakterilerde çeşitli fenotipik ve fizyolojik davranışların ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır (Yi vd., 2021).

QS, aynı tür bakteri hücreleri arasında gerçekleştiği gibi farklı türden bakteri hücreleri arasında da gerçekleşebilmektedir. QS sistemi, ilk olarak biyoluminesans üreten Gram negatif hücre duvarına sahip bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır

Bu bakteri ve diğer Gram negatifler QS sinyali olarak çeşitli açıl homoserin lakton (AHL) moleküllerini kullanır. *V. fischeri* LuxI proteinler ile AHL sentezini gerçekleştirirken, LuxR proteinler ile sinyal moleküllerini algılar. Başlangıçta sentezlenen AHL molekülleri difüzyonla ortama yayılmakta ve belirli bir konsantrasyona ulaştığında LuxR promotörüne bağlanarak LuxR-AHL kompleksi oluşturmaktadır. Bu kompleks *V. fischeri*'de biyoluminesans sentezinden sorumlu genlerin dolaylı olarak ekspresyonunu sağlamaktadır (DeLisa & Bentley, 2002). Diğer Gram-negatif bakterilerde de LuxI/LuxR benzeri sistemler kullanılmaktadır. Gram-pozitif bakteriler ise sinyal molekülü olarak oligopeptitleri kullanılmaktadır. İlk aşamada, oligopeptit yapıdaki sinyal molekülü öncü peptit olarak sentezlenmekte ve ABC taşıyıcılar ile ortama salınmaktadır. Sinyal moleküllerinin konsantrasyonu arttığında histidin kinazlar tarafından algılanmaktadır (Kumar & Nath Tripathi, 2021).

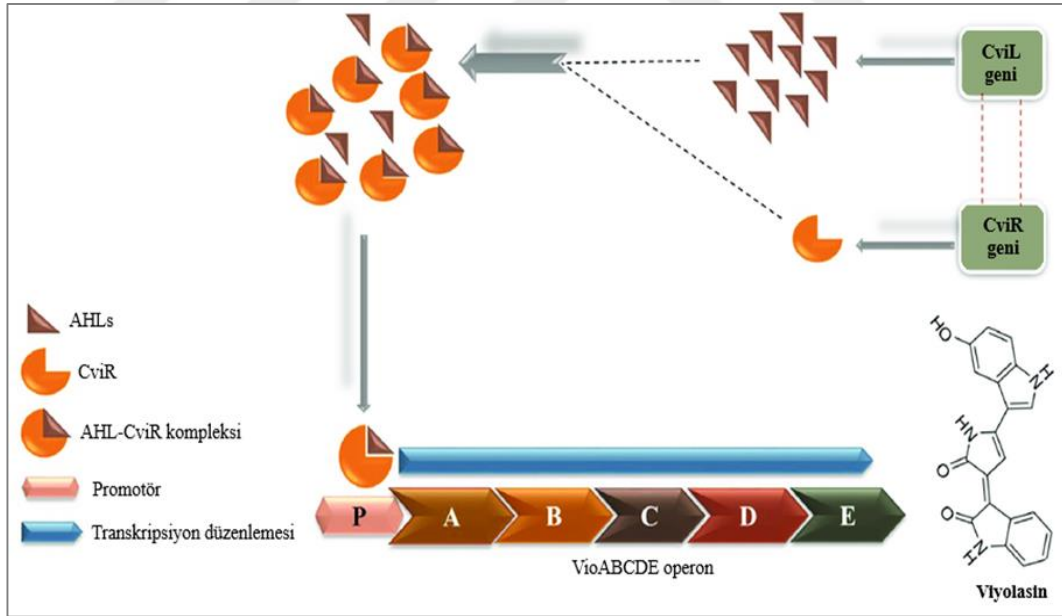


Şekil 1.8 Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde QS mekanizması (Nabeeh Jaafar vd., n.d.)

Bakterilerde QS sistemi, sinyal moleküllerinin üretiminin durdurulması, sinyal moleküllerinin etkisizleştirilmesi veya enzimatik olarak yok edilmesi, sinyal moleküllerinin reseptöre bağlanmasının engellenmesi ve QS sinyal tarafından etkilenmesi gereken genlerin bloke edilmesi yoluyla inhibe edilebilir (Prazdnova vd., 2022).

1.5.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum, Gram-negatif bir bakteri türüdür ve mavi-mor renkli koloniler oluştururlar. Bu renk, viyolasin pigmentini kodlayan *vio* operonu tarafından QS mekanizması ile düzenlenir. Viyolasein üretimi *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* ve *vioE* enzimlerini kodlayan genden oluşan *vio* operonunun ekspresyonunu içerir. *C. violaceum*'un QS sistemi, *CviI* (otoindükleyici sentaz) ve *CviR* (reseptör) genlerini içeren bir transkripsiyonel düzenleyici ile ilişkilidir. Bu genler sırasıyla LuxI ve LuxR'ye homologdur. *CviI* genleri, yağ asitlerinin ve S-adenozilmetiyoninin AHL'lere dönüşümünü sağlar. Hücre yoğunluğu arttığında AHL sinyal molekülleri de artar ve *CviR* ile bağlanma sırasında kompleks oluşumuna yol açar. AHL/*CviR* kompleksi *vio* operonunun promotor bölgesine bağlanarak onun transkripsiyonunu aktive eder. Hücre yoğunluğu düşük olduğunda ise AHL konsantrasyonu eşik değerinin altında kalır ve sinyal- reseptör kompleksi *vio* operonunun transkripsiyon faktörünü aktive edemez (Kothari vd., 2017). *C. violaceum*'da QS sistemi Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



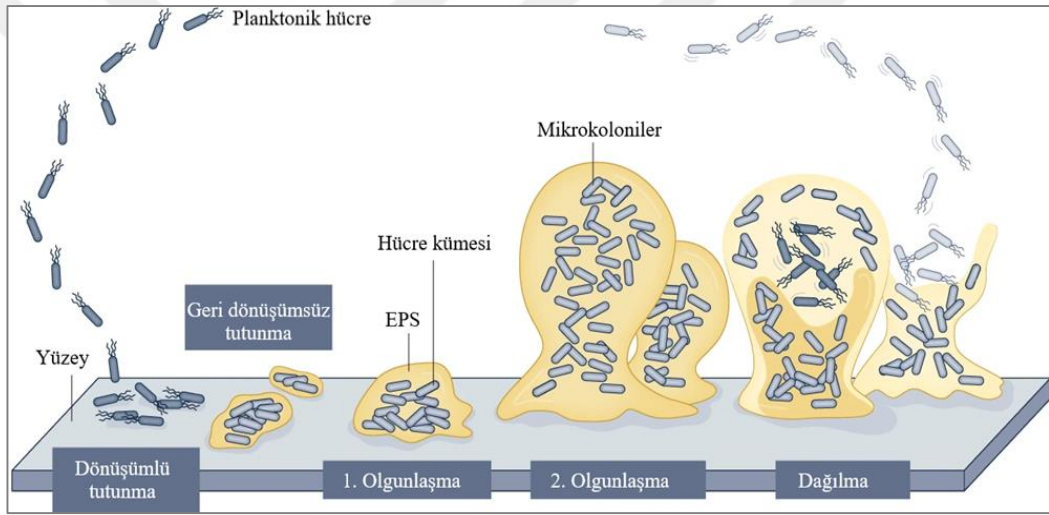
Şekil 1.9 *C. violaceum*'da QS sistemi (Ahmed vd., 2021)

1.5.2 Biyofilm oluşumu

Biyofilmler, canlı veya cansız bir yüzeye tutunan bakteri topluluklarıdır ve bu topluluklar bakteriler tarafından üretilen bir polimerik matris içinde yer alır. Bu matris,

hücre dışı polisakkarit matrisi (EPS) olarak adlandırılır. Biyofilmler, %10-25 mikrobiyal hücrelerden ve %75-90 EPS matrisinden oluşan heterojen bir yapıdadır. EPS, biyofilmi bir arada tutan bir iskele görevi görerek hücre-hücre iletişimine yardımcı olur. Ayrıca biyofilm oluşumu için gerekli adezyon ve koadezyonu sağlar. EPS polisakkaritler, hücre dışı proteinler, yüzey aktif maddeler ve lipitler, hücre dışı DNA (eDNA) ve su bileşenlerinden oluşmaktadır (Rather vd., 2021).

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması, geri dönüşümsüz bağlanma, mikrokoloni oluşumu ve dağılma (disperisyon) olmak üzere dört basamakta meydana gelmektedir. Bu basamaklar Şekil 1.10'da gösterilmiştir.



Şekil 1. 10 Biyofilm oluşum basamakları (Sauer vd., 2022)

Elverişli besin ortamına sahip herhangi bir yüzey biyofilm oluşumu için uygundur. Bu yüzeyler metal, cam, plastik, medikal implantlar, paslanmaz çelik gibi abiyotik ya da yüzey doku hücreleri, insan cildi ve hayvan dokuları gibi biyotik olabilir (Öztürk vd., 2023). Mikroorganizmaların ilk etkileşimleri geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz tutunma olarak iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Dönüşümlü tutunmada, hücre ve yüzey arasında van der waals etkileşim kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler meydana gelmektedir. Bu aşamada mikroorganizmalar uzaklaştırılabilir. Geri dönüşümsüz tutunmada ise flagella ve fibria gibi yapılar üreterek yüzeye daha kuvvetli bir şekilde tutunmaktadır (Yin vd., 2019). Geri dönüşümsüz tutunmadan sonra, tutunan hücreler çoğalmaya devam eder ve EPS üreterek mikrokoloniler oluşturur. EPS yüzeylere tutunmaya, biyofilmin 3 boyutlu yapısını stabilize etmeye,

hücreleri bir arada gruplandırmaya ve oksidatif hasar gibi çeşitli streslerden korumaya yardımcı olduğundan biyofilmin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizma yoğunluğu bir eşik seviyeye ulaştığında ise çekirdek algılama (QS) sistemi etkin hale gelmektedir (Li vd., 2023). Son aşamada olgun biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar planktonik formlarına geri dönmekte ve başka bölgelerde yeniden biyofilm oluşturmaktadır. Bu durum biyofilm oluşumunun tümünde ortaya çıkabileceği gibi yalnızca bir alanda da gerçekleşebilir. Ortam sıcaklığının farklı olması, besin maddelerinin eksikliği ve oksijen yetersizliği gibi nedenler biyofilmin dağılmasını etkilemektedir (Öztürk vd., 2023).

Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler biyofilm oluşturabilirler. Ancak en yaygın biyofilm oluşturan türler şunlardır: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* (Khatoon vd., 2018).

1.5.2.1 *Staphylococcus aureus* Biyofilm Oluşumu

Staphylococcus aureus biyofilm formasyonu oluşturan patojenlerden biridir. *S.aureus* biyofilminde EPS'nin ana bileşenini polisakkarit yapıda hücrelerarası adezin (PIA) oluşturmaktadır. *S. aureus* 'ta biyofilm oluşum mekanizması, *ica* lokusunda *icaADBC* operonu tarafından kodlanan proteinler yoluyla kontrol edilmektedir. Bu operon PIA'nın üretiminden sorumludur ve PIA bakterilerin yüzeye yapışmasını sağlamaktadır. *İcaADBC* proteinleri, PIA' nın sentezini düzenleyerek biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Agr ve LuxS/AI-2 sistemleri biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Biyofilm oluşturan hücreler arasında iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinin üretimi Agr sistemi tarafından kontrol edilmektedir. LuxS/AI-2 sistemi ise bakteriler arasındaki ilişkiyi düzenlemektedir. Agr sistemi biyofilm oluşumunu teşvik etmekte ve RNAIII transkripsiyonunu artırarak bu süreci düzenlemektedir (Peng vd., 2023; Wu vd., 2024).

1.6 Çalışmanın Amacı

Bu alışmada Hypericaceae familyasına ait endemik *Hypericum salsolifolium* (Urfa kantaronu) bitkisinin toprak üstü bölümlerinden hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı hücre canlılık aktivitesi, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktiviteleri incelenerek bu bitkinin ilaç etken maddesi olma potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hypericum L. cinsine ait bitkiler, tanımlanmış birçok türle birlikte tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Bu türe ait bitkiler besinsel özelliklerinin yanı sıra farmakolojik özellikleriyle de dikkat çekmiş ve geleneksel tıbbın bir parçası olmuştur. *Hypericum* türleri antikanser, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan, özellikleri gibi birçok biyolojik aktivite sergilemektedir (El-Chaghaby vd., 2024). Bu cinse ait bitkilerle yapılan birçok çalışma literatürde mevcuttur.

2.1 *Hypericum L.* Cinsine ait Kanser Çalışmaları

Caldeira ve arkadaşları (2023), *H. foliosum*'dan elde edilen hidroetanolik, diklorometan ve su ekstraktlarının A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), HCT8 (kolon kanseri) ve MDA-MB-23 (meme kanseri) hücre hattına karşı *in vitro* seçici antikanser aktivitesini araştırmışlardır. Belirtilen üç kanser hücre hattına karşı diklorometan ekstraktının daha yüksek aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 71.49, 27.31 ve 9.51 µg/mL olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, *Hypericum mysorensense* türüne ait yapraklardan elde edilen metanol ekstraktlarının HT29 (kolon kanseri) ve A549 hücre hatları üzerinde antikanser özellikleri araştırılmıştır. HT29 hücreleri için maksimum hücre ölümü, 100 µg/mL konsantrasyonda %59,67 olarak, A549 hücreleri için maksimum hücre ölümü 100 µg/mL konsantrasyonda %63,27 olarak belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri ise sırasıyla 10,56 µg/mL ve 10,30 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Author, 2020).

Aztopal ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *Hypericum olympicum* ve *Hypericum adenotrichum*' dan elde edilen metanol ekstraktlarının A549 ve PC3 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik/apoptotik aktivitesi araştırılmıştır. PC3 hücre hattı A549 ile karşılaştırıldığında *H. olympicum* ve *H. adenotrichum*'a daha duyarlı olduğu fakat *H. olympicum*'un A549 ve PC3 kanser hücre hatları üzerinde *H. adenotrichum*'a göre çok daha iyi sitotoksik etki sergilediği gözlenmiştir. Yine *Hypericum perforatum* türünün gövde ve çiçeklerinden elde edilen ekstraktların HeLa, K562, A549 ve MRC-5 hücre hattına karşı antikanser etkileri araştırılmıştır. Metanol, etil asetat ve hekzan bitkinin hem gövde hem de çiçek kısmı için çözücü olarak

kullanılmıştır. En zayıf sitotoksik etkiyi metanol gövde ekstraktı gösterirken en yüksek etkiyi ise hekzan çiçek ekstraktı göstermiştir. Ekstraktların K562 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi HeLa hücrelerine kıyasla daha düşük yoğunluğa sahip olduğu açıklanmıştır. Antikanser aktivitesinin daha iyi anlaşılması için özütler hem 2D hem de 3D hücre kültürlerinde HeLa hücreleri üzerinde test edilmiştir. 2D hücre kültüründe HeLa hücreleri 3D ile karşılaştırıldığında daha zayıf sitotoksik etki gösterdiği ifade edilmiştir (Matić vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada, *H. lanuginosum* bitkisinin n-hekzan, aseton, metanol ve su ekstraktlarının meme kanseri (MCF-7), hepatoselüler karsinom (Hep 3B ve Hep G2) ve servikal adenokarsinom (HeLa) hücre hatları üzerinde antikanser özelliğinin araştırılmıştır. Ekstraktların tümü hücre hatlarına karşı antikanser etki göstermiştir. Hep 3B hücre hattına karşı en yüksek antikanser etki su ekstraktında gözlenmiş, IC₅₀ değeri $46,9 \pm 1,01$ µg/mL olarak hesaplanmıştır. Metanol ekstraktı HeLa ve MCF7 hücrelerine karşı en yüksek antikanser etki göstermiş olup IC₅₀ değerleri sırasıyla $16,07 \pm 0,25$ ve $33,92 \pm 0,91$ µg/mL olarak belirlenmiştir (Jaradat, 2022). *H. sampsonii*'den elde edilen etanol ekstraktlarının antikanser etkisi insan melanom hücresi (A375), insan mide kanseri (SGC-7901), insan rahim ağzı kanseri (SiHa), insan meme kanseri (MDA-MB-231) ve insan kemik iliği nöroblastoma hücre hatlarına karşı değerlendirilmiştir. Etanol ekstraktı A375, MDA-MB-231, SiHa ve SHSY-5Y'ye karşı orta düzeyde etki gösterirken SGC-7901'e karşı aktivite göstermemiştir (Chen vd., 2020).

H. amblysepalum'un çiçek, meyve ve tohum kısımlarından elde edilen metanol ekstraktlarının HeLa ve NRK-52 hücre hatlarına karşı antikanser özelliklerinin araştırıldığı bir deneyde en yüksek sitotoksik etki tohum metanol ekstraktında gözlenmiştir. Çiçek ekstraktında ise kayda değer bir sonuç elde edilmemiştir. Başka bir çalışmada, *Hypericum mysorense*'nin toprak üstü, çiçek, yaprak, kök ve gövde kısımlarından elde edilen metanol ekstraktlarının Ehrlich Assit Karsinomu (EAC) üzerinde antikanser aktivitesi araştırılmıştır. En iyi etki çiçek ve gövde kısımlarında elde edilmiştir (Keskin, 2015; Raghu vd., 2009).

2.2 *Hypericum L.* Cinsine ait Antimikrobiyal Çalışmaları

Gül ve arkadaşları (2021), *H. perforatum*, *H. aviculariifolium*, *H. origanifolium* ve *H. linarioides* türlerinin çiçek ve yapraklarından elde edilen etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini 7 Gram pozitif ve 2 Gram negatif bakteri suşuna karşı araştırmıştır. Genellikle çiçek ekstraktları yaprak ekstraktlarına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. En belirgin antibakteriyel aktivite, *H. perforatum*'un çiçek ekstresi tarafından gösterilmiştir. Ayrıca *Escherichia coli*'nin bu dört *Hypericum* türlerine karşı en dirençli organizma olduğu belirlenmiştir.

H. hookerianum' un yapraklarından elde edilen hekzan, etil asetat ve etanol ekstraktlarının *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* ve *B. subtilis* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi analiz edilmiştir. Yapılan testler sonucunda, en aktif etki gösteren ekstraktın etanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir. Bitki ekstraktına karşı en duyarlı suş *P. vulgaris* olup bunu *M. luteus*, *B. subtilis* ve *E. coli* takip etmiştir (Mahendrakumar vd., 2017).

H. spectabile, *H. pseudolaeve*, *H. thymbrifolium*, *H. neurocalycinum*, *H. malatyanum* ve *H. perforatum*'un ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, mikrodilüsyon testi kullanılarak çeşitli mikroorganizmalara karşı araştırılmıştır. Test edilen gram pozitif bakterilere karşı tüm ekstraktların (petrol eteri, dietil eter, kloroform, aseton ve metanol) aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca *H. spectabile* ve *H. pseudolaeve*'nin bazı ekstraktlarının *C. albicans*'a karşı antifungal etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (Eroğlu vd., 2019). Bir başka çalışmada *Hypericum havvae* ekstraktlarının antifungal aktivitesi sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kültürlere karşı güçlü etkiye sahip olan ekstraktların MİK değerleri 3,12 ile 25,00 mg/ml arasında değişkenlik göstermiştir. Bitki ekstraktlarının yaprak + kök kombinasyonunun 1,56 mg/ml'lik MİK değeriyle *Candida albicans* ve *Cryptococcus laurentii*'ye karşı daha güçlü anti fungal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Dulger vd., 2014).

Sengera ve arkadaşları (2023), *Hypericum revolutum* yapraklarından ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın antibakteriyel aktivitesini araştırmıştır. Test edilen tüm

mikroorganizmalardaki MİK değerinin 250 ila 15,6250 µg/ml aralığında olduğu belirlenmiştir. Yağlar, test edilen bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Haemophilus influenzae*) karşı %100 yağ konsantrasyonunda 20,67 ± 0,33 ila 32,00 ± 1,00 mm aralığında ortalama inhibisyon gstermiştir. Bitkide bulunan karyofilen, a- pinen ve kamfen bileşikleri sayesinde antibakteriyel etkinin gürldüğü rapor edilmiştir

Meral ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada, *H. triquetrifolium turra.*, *H. perforatum L.* ve *H. empetrifolium Willd.* metanol ekstraktlarının 4 Gram pozitif ve 4 Gram negatif bakteri suşu üzerindeki antibakteriyel etkinliğini disk difüzyon metoduyla incelemiştir. Üç *Hypericum* türü bakterilerin tümüne karşı aktif olsa da *S. aureus* türünde en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi gstermiştir. En yüksek zon çapı (20-26 mm) *Hypericum perforatum L.* türünde elde edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Tez çalışmasında kullanılan *Hypericum salsolifolium* bitkisi Şanlıurfa ilinin, Birecik ilçesi Yılmaz köyü civarında yüksekliği 463 m olan kalkerli toprak alanlarından M. Balos 5247 toplayıcı numarası ile 18.06.2021 tarihinde toplanmıştır. (37°03'54" K, 38°01'15" D). Bitki örneklerinin taksonomik olarak tanımlanması, Munzur Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Uğur ÇAKILCIOĞLU tarafından yapılmıştır. Bitki ekstraktları analize kadar +4°C'de bekletilmiştir.

3.1.2 Çalışmada İncelenen Hücre Hatları

H. salsolifolium'un toprak üstü kısmından elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antikanser aktivitesini belirlemek için MDA-MB-231 ve MCF-7 olmak üzere iki farklı meme kanseri hücre hattı çalışılmıştır. Deneyde kullanılan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları, Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden elde edilmiştir.

3.1.3 Çalışmada İncelenen Mikroorganizma Suşları

H. salsolifolium'un toprak üstü kısmından elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, 6 Gram-negatif, 3 Gram-pozitif ve bir maya olmak üzere toplam 10 tür mikroorganizmaya karşı araştırılmıştır. *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları ise Anti-QS inhibisyonunu test etmek için kullanılmıştır. Deneyde kullanılan mikroorganizma suşları, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) referans suşlarıdır. Mikroorganizmalar Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yer alan Kanser Genetiği ve

Biyoinformatik Laboratuvarından tedarik edilmiştir. Çalışmada incelenen mikroorganizmalar Tablo 3.1 de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada incelenen mikroorganizma suşları

Numara	Mikroorganizmalar	
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Gram-pozitif basil
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram-pozitif kok
3	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 2921	Gram-pozitif kok
4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19002	Gram-negatif kokobasil
5	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Gram-negatif basil
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-negatif basil
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram-negatif basil
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-negatif basil
9	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Gram-negatif basil
10	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Maya
11	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Gram-negatif basil

3.1.4 Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler

Agar kuyucuk difüzyon deneyi için MHA, Sıvı mikrodilüsyon testi için MHB ve biyofilm testi için LB Broth besiyerleri kullanılmıştır. Viyolasin inhibisyon testi için ise LB Broth ve LByumuşak agar (%0,5 agar) besiyerleri kullanılmıştır. Agar kuyucuk difüzyon deneyi ve sıvı mikrodilüsyon analizi yapılırken pozitif kontrol olarak levofloksasin antibiyotiği kullanılmıştır. Agar kuyucuk difüzyon deneyinde maya türü için pozitif kontrol olarak flukonazol antibiyotiği kullanılmıştır.

3.1.5 Kullanılan Cihazlar, Materyaller ve Sarf Malzemeler

Bu araştırma, Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde yer alan Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı ile Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yer alan Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı'nın alt yapısından faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.2 de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Numara	Kimyasal Adı	Üretici Firma
1	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT)	BioFroxx
2	Penisilin/Streptomisin karışımı (%0,1)	Lonza
3	İnsülin (0,01 mg/ml)	PAN Biotech
4	Dimetilsülfoksit (DMSO)	İsolab
5	Fosfat Tampolu Tuz Çözeltisi (PBS)	Gibco
6	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco
7	Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
8	Non-Esansiyel Amino Asit (NEAA)	PAN Biotech
9	Levofloksasin	Oxoid
10	Frukanozal	Oxoid
11	Etanol (EtOH)	-
12	Kristal viyole	Merck-Germany
13	Serum Fizyolojik (Sodyum klorür)	Merck-Germany
14	Mueller Hinton agar (MHA)	Biolife
15	Mueller Hinton broth (MHB)	Biolife
16	Luria Bertani broth (LB)	Nzytech
17	Nutrient agar (NA)	Biolife
18	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Millipore- Germany
19	Bakteriyolojik Agar (%0,5)	AppliChem

Deneyleerde kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler Tablo 3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler

Numara	Cihaz adı	Marka/Model
1	20 / +4 Buzdolabı	Arçelik / 4552
2	-80 Derin dondurucu	Nuaire / Glacier-Nu 9668E
3	Buz Makinası	Hoshizaki / Scotsman
4	Hassas terazi	Precise / XP220A
5	Saf su cihazı	Human Corporation Zeneer Power
6	Ultra saf su cihazı	Mpminipure / Dest-up
7	Vortex	Wise-Mix/VM-10
8	Çalkalamalı Kuru Blok Isıtıcı	Biosan / TSH-100
9	Çekercok	Tezsan
10	Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Tezsan / ClassII
11	Test Kabini	Nüve / TK-252
12	CO ₂ İnkübatörü	Nüve / EC160
13	Isı Kontrollü İnkübatör	Thermo
14	Otoklav	Nüve / Steam Art
15	Masaüstü Santrifüj	Nüve / NF 800
16	Mikrosantrifüj	Starlab
17	Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich / MICRO 220R
18	Faz Konstrast Görüntüleme Sistemli Kameralı Ters Mikroskop	Leica / DMi1
19	Spektrofotometre Nano Drop	Thermo Scientific / MultiskanGO UV/Vis
20	Mcfarland Densitometer Cihazı	Biosan / DEN-1B
21	Kimyasal Saklama Dolabı	Tez-san
22	96 Kuyucuklu Mikropleytlar	Techno Plastic Products

Tablo 3.3'ün devamı

23	Steril Besiyeri Kapları (90mm çaplı)	Isolab
24	Falkon Tüpler (50 mL ve 15 mL)	Isolab, Kirgen, CAPP
25	Hücre Sıyırıcı	Techno Plastic Products
26	Thoma lamı	Marienfeld-Neubauer-improved
27	Hücre petri kapları	Techno Plastic Products
28	Eppendorf Tüpler (Cryotüp)	Isolab
29	Serolojik Pipetler	Greiner bio-one
30	Mikropipetler (tek ve çok kanallı)	Eppendorf, Thermo, CAPP, Topscien
31	Tek kullanımlık plastik özeler	Medster
32	pH gösterge stribi	Isolab
33	Pamuklu eküvyon	Cultiplast/LP Italiana spa

3.2 Metot

3.2.1 Bitki ekstraktlarının Elde Edilişi

Ekstraktların elde edilmesi Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gökhan Zengin tarafından gerçekleştirilmiştir. *Hypericum salsolifolium*'dan etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) çözücüleri aracılığıyla yapılan ekstraksiyon işlemi maserasyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak bitki örnekleri toprak üstü kısımlarından ayrılarak gölgede kurutulup değirmende toz haline getirilmiştir. Bu amaçla, 5 gr bitki materyalleri 100 mL bu çözücüler ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ardından çözücüler döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Su ekstraktı ise infüzyon yöntemi ile elde edilmiş ve 5 gr bitkisel materyal 100 mL kaynar suda bekletilmiştir. Ardından karışım süzülüş ve infüzyon tekniği kullanılarak sağlanan sulu karışımlar liyofilize edilmiştir. Ekstraktların tamamı deney geçekleşene kadar +4 °C'de muhafaza

edilmiştir. Ekstraktların yüzde verimi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Abbas vd., 2021).

$$Verim = \frac{Elde\ edilen\ ekstrakt}{Ekstre\ edilmek\ için\ kullanılan\ bitki} \times 100$$

3.2.2 Bitki Ekstraktlarından Çalışma Konsantrasyonları Hazırlama

Hücre kültürü deneyleri için bitki ekstraktları stok konsantrasyon 10 mg/mL olacak şekilde DMSO, 1x PBS ve saf su gibi çözücülerde çözülmüştür. Etil asetat ekstraktı ve metanol ekstraktı DMSO'da, su ekstraktı ise 1x PBS'de çözülmüştür. Stok konsantrasyonlardan seri sulandırma yapılarak 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL hacminde çalışma stokları hazırlanmıştır. Çalışma stokları kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Hücre Kültürü

Çalışmada, *H. salsolifolium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen EA, MeOH ve su ekstraktlarının *in vitro* antikanser aktivitesi sırasıyla MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde test edilmiş ve değerlendirilmiştir. Antikanser etkinliğinin belirlenmesi için Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.1 Hücre Kültürünün Devamlılığı

- Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması için %10 FBS (Fetal bovine serum), %1 NEAA (Non-essential aminoasit), %0,1 penisilin/streptomisin ve 0,01 mg/ml insülin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri kullanılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

- Hücrelerin açılması

Dondurulmuş halde -80 °C'de muhafaza edilen cryotüp içerisinde hücreler alındıktan sonra, hücrelerin çözülmesi için oda sıcaklığında bir süre beklenmiştir. Daha sonra, 90 mm çaplı hücre kültür plakalarına 7 mL DMEM besiyeri ve 1 mL çözülmüş hücreler eklenerek homojen bir hücre dağılımı sağlanmıştır. Homojen dağılım hücrelerin besiyeri içinde eşit şekilde dağılması ve sağlıklı bir şekilde çoğalmalarını sağlamak amacıyla önemlidir.

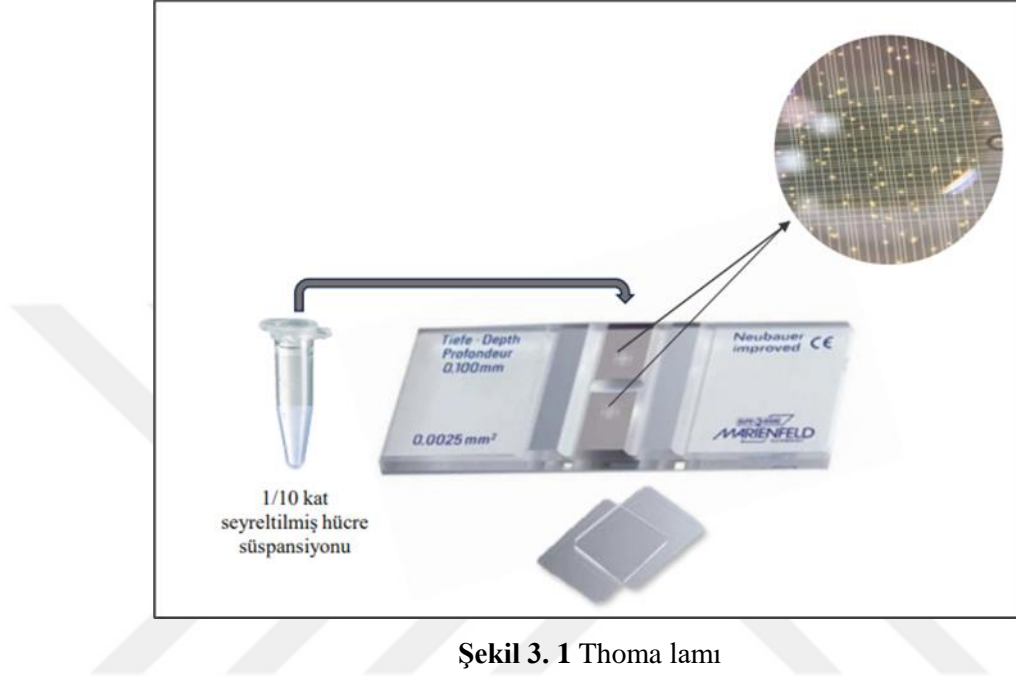
➤ Hücrelerin pasajlanması

Petrinin yüzeyini kaplayacak yoğunluğa ulaşan hücreler (%70-80) için pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak petri içerisindeki besiyeri aspire edilmiş, 2 mL fosfat tampon solüsyonu (1x PBS) eklenerek yıkama işlemi yapılmış ve petri yüzeyine yapışmayan hücrelerin uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından petri yüzeyine tutunan hücrelerin uzaklaştırılması için 1X Tripsin-EDTA kimyasalından 1 mL petrilere eklenmiş, petrilere hafifçe çalkalanmış ve 2-3 dk inkübatörde bekletilmiştir. Bu işlem hücrelerin daha hızlı ayrılması için yapılmıştır. Süre sonunda tripsin aktivitesini durdurmak için eklenen tripsin hacminin iki katı kadar besiyeri (DMEM) transfer edilmiştir. Ardından bir kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyindeki hücreler kazınmış ve santrifüj yapılması için 15'lik falkona toplanmıştır. Santrifüj işlemi 2000 rpm'de 5 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant kısım ayrılmış ve falkona 3 mL taze besiyerinden (DMEM) ilave edilmiştir. Ardından mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak peletin çözülmesi sağlanmıştır. 90 mm çaplı üç petri kabının her birine 7 mL DMEM ve 1'er mL çözülmüş hücreler ilave edilmiştir. Petri üzerine çalışılan hücrenin adı, pasaj numarası ve deneyin yapıldığı tarih yazılarak 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Tüm hücrelerin morfolojileri, büyümeleri ve canlılıkları invert mikroskop ile 10X objektif altında takip edilmiştir.

➤ Hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için, santrifüjden sonra pelet 1 mL besiyeri (1x DMEM) ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 1/10 kat PBS ile seyreltilmiş, Thoma lamının alt ve üst tarafında bulunan hücreler mikroskopta sayılmıştır (Şekil 3.1). Ardından sayılan hücrelerin miktarı, lamın her iki tarafında bulunan bölgelerin ortalaması alınarak

belirlenmiştir. Toplam hücre sayısı = Hücre sayılarının ortalaması x seyreltme oranı x 10^4 (Thoma laminin hacminden gelen katsayı) formülle hesaplanmıştır. Sayım sonunda 96 kuyucuklu pleytlere hücreler inoküle edilmiş ve inkübasyona (37°C 'de %5 CO_2) bırakılmıştır.



Şekil 3. 1 Thoma lamı

➤ Hücrelerin dondurulması

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler, falkon tüpe toplanıp 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra, süpernatant atılıp pelet çözülmüştür. Çözülen pelet crytüpde 1/10 oranında DMSO (1 mL hücre + 100 μL DMSO) ile seyreltilmiştir. Tüplerin üzerine hücre adı, pasaj numarası, tarih ve pasajı yapan kişinin ismi yazılarak hücreler -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2 Hücre Canlılık Testi (MTT)

Hücre canlılık aktivitesi, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] testi ile belirlenmiştir (Tonder, 2015). İlk olarak %70-80 yoğunlukta hücre içeren petriden besiyeri uzaklaştırılmış ve 2 mL 1x PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından petri üzerine yapışan hücrelerin kalkması için 1 mL 1x Tripsin-EDTA kimyasalından eklenmiş ve 2-3 dk inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin aktivitesini engellemek için eklenen tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri

eklenmiştir. Ardından bir kazıyıcı yardımıyla hücreler kazınmış ve santrifüj yapılması için falkona toplanmıştır. Santrifüjden sonra pelet 1 mL besiyeri (1x DMEM) ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 1/10 kat seyreltilmiş ve Thoma alanı üzerinde hücreler mikroskopta sayılmıştır. Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekimi yapılarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 96 kuyucuklu pleytte büyüyen hücreler üzerine kontrol kuyucukları hariç 10’ar µL etil asetat, metanol ve su ekstraktlarından eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise ekstraktların çözücülerinden aynı hacimde eklenmiştir. Bu işlem 96 kuyucuklu pleyt üzerinde 3 teknik tekrarlı olarak yapılmıştır. Ekstraktların 24 ve 48. saatlerdeki etkisi incelenmek üzere pleyt 37°C’de inkübatöre kaldırılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri (1xDMEM) aspire edilmiş ve ekstraktların her bir konsantrasyondaki etkilerini gözlemlemek için fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflama işlemi tamamlandıktan sonra her bir kuyucuğa MTT çözeltilisinden (0,025 g MTT + 250 µL FBS + 49,75 mL saf 1X DMEM) 100’µL transfer edilmiş ve pleyt 4 saat inkübasyona (37°C’de %5 CO₂) bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda bulunan MTT çözeltilisi uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100’er µL saf DMSO konulmuştur. Blank olarak son bir kuyucuğa 100 µL saf DMSO eklenmiş ve pleyt 400 rpm’ de 25dk tutularak formazan kristallerinin homojen bir şekilde çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki absorbans değeri blank kuyucuğuna karşı spektrofotometrede 570 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen değerler kontrol kuyucuğuna göre kıyaslanıp yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Bu hesaplama ekstrakt absorbans değerinin kontrol absorbans değerine bölünüp ardından 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Deneyler birbirinden bağımsız olarak en 3 teknik tekrarla gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı % cinsinden hesaplandıktan sonra, IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 8 programına konsantrasyon değerleri ve bunların karşılık geldiği hücre canlılığı değerlerinin girilmesiyle belirlenmiştir.

3.2.4 Antimikrobiyal Aktivite

3.2.4.1 Bitki Ekstraktlarından Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite deneyleri için ekstraktlar aseptik koşullarda tartılarak, nihai konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Stokların hazırlanmasında EA ekstraktlarını çözmek için %100 DMSO; MeOH ve su ekstraktlarını çözmek için

%60 DMSO kullanılmıştır. Hazırlanan çalışma stokları kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

Ticari olarak toz halinde temin edilen Muller Hinton Agar (MHA), Muller Hinton Broth (MHB) ve LB broth besiyerleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda distile suda hazırlanmış ve pH değerleri ölçülmüştür. LB soft agar hazırlamak için ise LB broth besiyerine son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde bakteriyolojik agar eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyerleri 121°C'de 15 dk otoklav işlemine tabi tutulmuştur. Otoklav sonrası besiyerleri ~50°C'ye kadar soğutulmuş ve 90 mm çaplı petripler içerisinde 25 mL hacminde dökülmüştür. Dökülen besiyerleri donduktan sonra kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların -80°C'de saklanan stoklarından genel bir agar besiyerinde canlandırmaları yapılmış ve saflıkları kontrol edilmiştir. Ardından izole kolonilerden genel bir agar besiyerinde alt kültür hazırlanmış ve hazırlanan bu taze alt kültürlerden deneyler gerçekleştirilmiştir

3.2.4.3 Agar Kuyucuk Difüzyon Testi

Test edilen mikroorganizmaların taze kültürlerinden steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) solüsyonu içerisinde bir hücre densitometresi kullanılarak McFarland 0.5 (bakteriler için $1-2 \times 10^8$ kob/mL; maya için $1-2 \times 10^6$ kob/mL) yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. Hazırlanan bu inokulumdan bakteriler için MHA, maya için SDA besiyerine pamuklu eküvyon ile üç yönlü ekimleri gerçekleşmiştir. Ardından besiyeri üzerine 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve kuyucukların içine ekstraktların 10 mg/mL çalışma stoklarından 50 µL damlatılmıştır (500 µg/kuyucuk). Deneylerde referans antimikrobiyal ajan olarak bakteriler için levofloksasin (5 µg/kuyucuk); maya için flukonazol (25 µg/kuyucuk) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise ekstraktların çözücülerini kullanılmıştır. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, kuyucukların etrafındaki inhibisyon zon çapları bir cetvel yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür.

3.2.4.4 MİK Tespiti

Antimikrobiyal aktiviteye sahip ekstraktların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Wiegend ve arkadaşlarının (2008) tarif ettiği şekilde 96 kuyucuklu mikropleypte sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Özetle ekstraktların MHB besiyerinde 2000-62,5 µg/mL aralığında seri sulandırmaları hazırlanmıştır. Son olarak kuyucuklara final konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde inokulum eklenmiştir. Her bir ekstrakt için birer kuyucuk üreme kontrolü (ekstrakt içermeyen) ve sterilite kontrolü (bakteri içermeyen) olarak kullanılmıştır. Deneyle referans antimikrobiyal ajan ve negatif kontrol olarak sırasıyla yukarıda bahsedilen antimikrobiyaller ve ekstraktların çözücülerini kullanılmıştır. Son olarak mikropleyten steril kapağı kapatılmış ve 37°C de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda gözle görünür bakteri üremesinin olmadığı son ekstrakt konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

MİK değerlerinin tespit edilmesinden sonra ekstraktların minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri araştırılmıştır. Bu amaçla MİK ve üzeri konsantrasyonlardan genel bir besiyerinde alt kültürler hazırlanmış ve sonucunda <50 koloni veren ilk ekstrakt konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.2.5 QS İnhibisyon Testleri

3.2.5.1 Viyolasin İnhibisyon Testi

Ekstraktların viyolasin pigment üretimini inhibe etme yetenekleri McClean vd., (1997) tarif ettiği şekilde *C. violaceum* CV026 biyoindikatör suşu kullanılarak yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır. İlk olarak *C. violaceum* CV026 suşunun LB agar üzerindeki taze kültüründen bir koloni alınarak 5 mL LB broth içerisine inoküle edilmiş ve ardından 37° C' de 150 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürden 50 µL alınarak 5 mL hacmindeki erimiş LB agar (%0,5 agar) içerisine inoküle edilmiştir. Agar-kültür karışımına son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde eksojen C6-AHL sinyal molekülü eklenmiş ve karışım maksimum hızda vortekslendikten sonra önceden hazırlanmış olan LB agar plaklarının üzerine dökülmüştür. Yaklaşık 30 dk agar-kültür karışımının donması beklenmiş ve ardından

her bir ekstrakt için yüzeyde 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucukların içine ekstraktların 10 mg/mL çalışma stoklarından 50 µL damlatılmıştır (500 µg/kuyucuk). Pozitif kontrol olarak *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun bir gecelik kültürünün süpernatantından 50 µL damlatılmıştır. Negatif kontrol olarak ise ekstraktların çözücüsü kullanılmıştır. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklar etrafında pigment üretiminin inhibe edildiği fakat bakteri büyümesinin inhibe edilmediği renksiz, opak, buzlu cam görüntüsünde bir zon çapının varlığı araştırılmıştır.

3.2.5.2 Biyofilm İnhibisyon Testi

Ekstraktların biyofilm inhibitör etkinliği *S.aureus* ATCC 25923 suşu üzerine kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır (Coffey & Anderson, 2014). Başlangıçta *S. aureus*'un taze kültüründen bir koloni alınarak 5 mL LB broth içerisine inoküle edilmiş ve 37°C de 150 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür temiz LB broth ile 100 kat seyreltilmiştir. Deney düz tabanlı 96 kuyucuklu polistren mikroyeşil olarak gerçekleştirilmiş olup, kuyucuklara bu inokülümünden 190'ar µL transfer edilmiştir. Blank kuyucuğuna ise bakteri içermeyen 200 µL steril LB broth konulmuştur. Ardından ekstraktların kuyucuklardaki son konsantrasyonun 500 µL olması için (sub-MİK değeri) 10 mg/mL çalışma stoklarından 10'ar µL alınmış ve 190 µL'nin üzerine transfer edilmiştir. Kontrol olarak kuyucuklara son konsantrasyonu %3 ve %5 olmak üzere DMSO' dan 20'şer µL eklenmiş ve mikroyeşil 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki içerik dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Planktonik hücrelerin uzaklaştırılması için kuyucuklar distile su ile üç kez yıkanmış ve kurutulmuştur. Ardından kuyucuklara 200 µL hacminde %0,1'lik kristal viyole transfer edilmiş ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından kuyucuklarda ki boya dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve fazla boyanın uzaklaştırılması için yukarıda açıklanan yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Son olarak kuyucuklara biyofilm tabakası tarafından tutulan boyanın çözülmesi için 200 µL hacminde %96 etanol eklenmiştir. Kuyucuklardaki absorbans değeri etanol içeren blank kuyucuğuna karşı spektrofotometre de 550 nm dalga boyunda okutulmuştur. Ekstrakt ile muamele edilmiş kuyucukların absorbans değeri, kontrol kuyucuğun absorbans değerine bölünmüş ve sonrasında 100 ile çarpılmıştır. Bu yöntemle,

ekstraktlar ile muamele edilmiş kuyucuklardaki biyofilm oranı % olarak hesaplanmıştır.

3.2.6 İstatistiksel Analizler

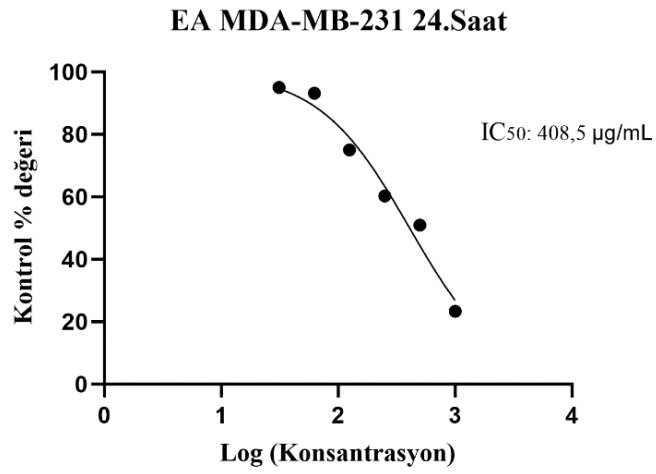
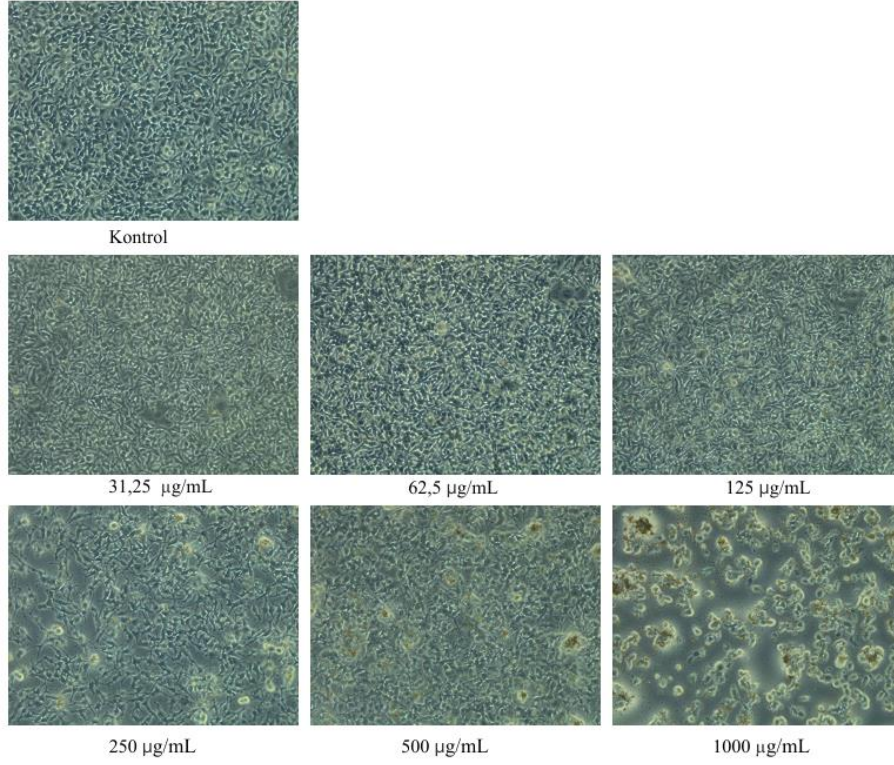
Deneyleer birbirinden bağımsız olacak şekilde en az üç kez tekrarlanmıştır. Hücre canlılığı yüzdesi Microsoft Office Excel 2016 programı ile hesaplanmış ve sonuçlar grafiklerle gösterilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 23. paket programında bağımsız grup t-testi ile yapılmıştır. Antikanser ve anti-biyofilm aktivite deneylerine ait veriler ortalama \pm standart hata şeklinde sunulmuş ve $p < 0,05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Antikanser Aktivite Bulguları

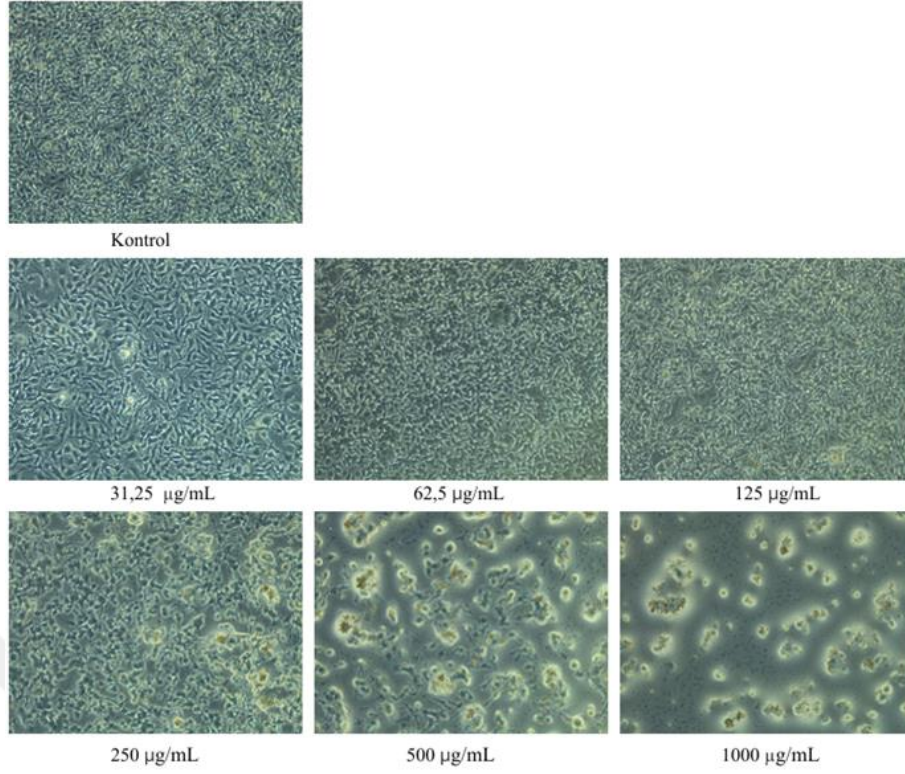
4.1.1 Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları

Hypericum salsolifolium bitki ekstraktlarının hücre canlılığına olan etkisini incelemek amacıyla MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları etil asetat, metanol ve su ekstraktları ile farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL) işlem görmüştür. Ekstraktların 24 ve 48. saatteki etkinliğinin değerlendirilmesi için hücre canlılığı deneyi yapılmıştır. Muamele sonrasında, hücrelerin canlılık durumu 24 ve 48. saatlerde ters mikroskop altında gözlemlenmiş ve hücre görselleri elde edilmiştir. *Hypericum salsolifolium* bitkisinin etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatteki etkisi göz önünde bulundurulduğunda, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %23,36 'sının canlı kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, IC₅₀ değeri 24. saat için 408,5 olarak bulunmuştur. Hücrelerinin morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

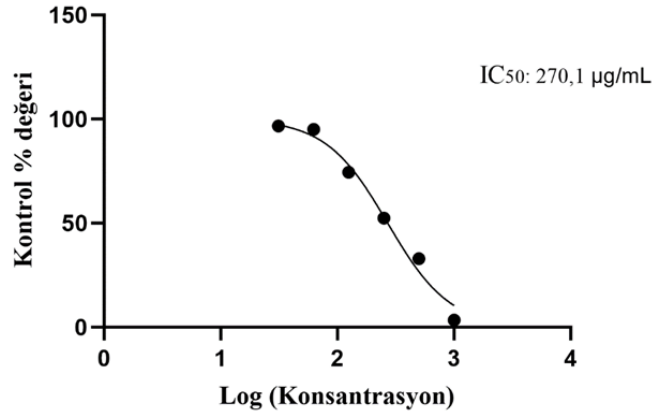


Şekil 4.1 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri

Hypericum salsolifolium bitkisinin etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hattı üzerindeki etkisinin 48. saatte incelenmesi sonucunda, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonunda %3,38'inin, 500 µg/mL konsantrasyonunda ise %32,91'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC₅₀ değeri ise Şekil 4.2'de gösterildiği gibi 48. saat için 270,1 µg/mL olarak bulunmuştur.

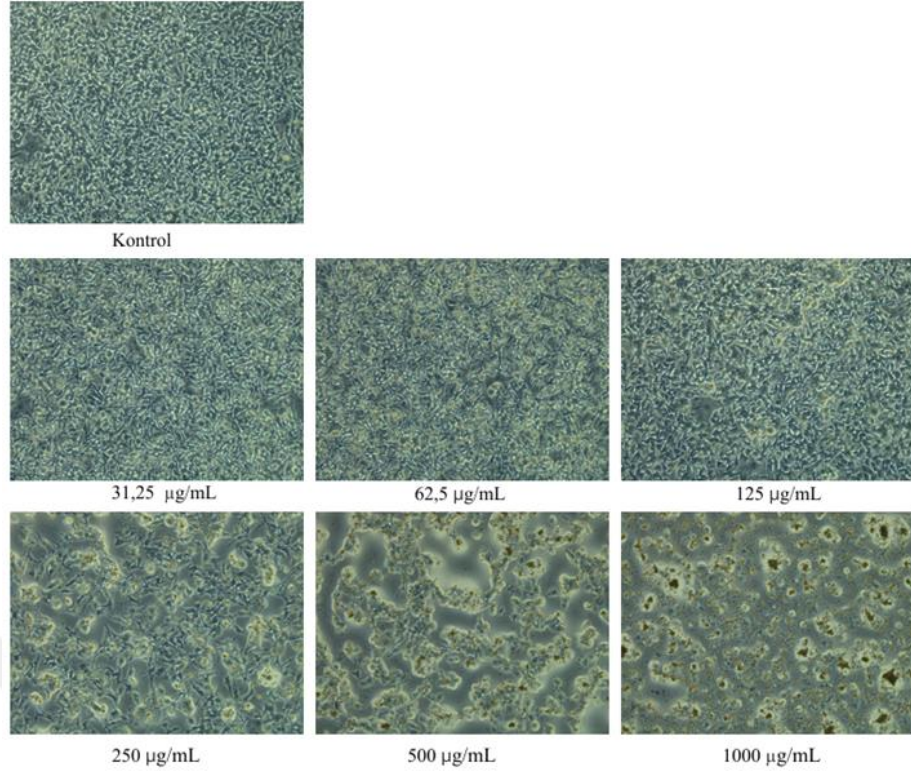


EA MDA-MB-231 48.Saat

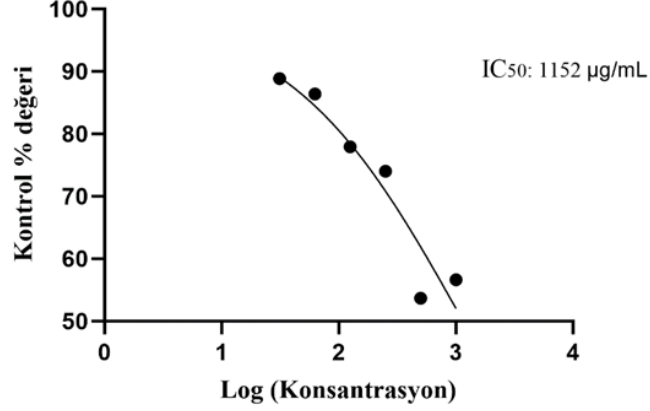


Şekil 4.2 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri

Hypericum salsifolium bitkisinin metanol ekstraktının MDA-MB-231 hattı üzerinde 24. saatteki etkisine bakıldığında, canlılık oranında en belirgin azalma 1000 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda gözlemlenmiştir. Hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %56,64 ,500 µg/mL konsantrasyonda ise %53,66 oranında canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri ise 24. saat için 1152 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3).

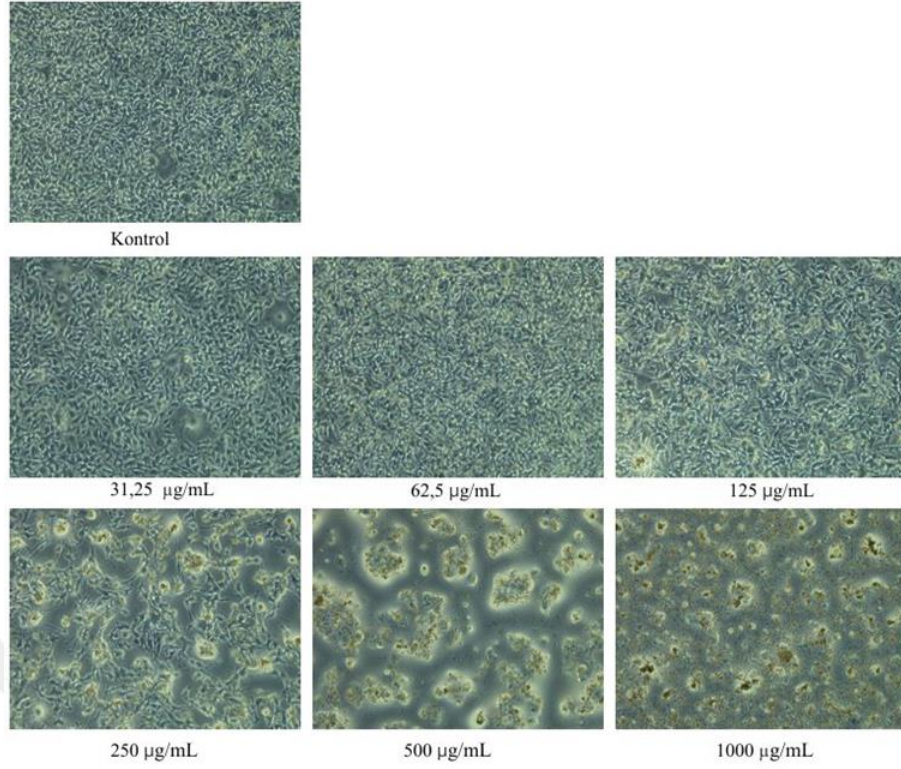


MeOH MDA-MB-231 24.Saat

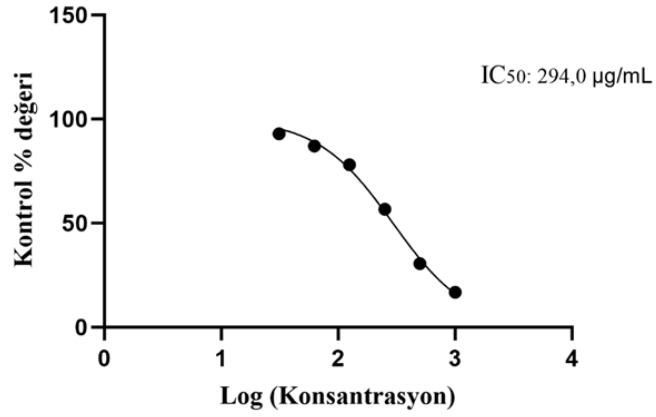


Şekil 4.3 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin metanol ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisine bakıldığında, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonunda %16,83'inin, 500 µg/mL konsantrasyonunda ise %30,56'sının canlı kaldığı. Ayrıca, 48. saat için IC₅₀ değeri 294 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).

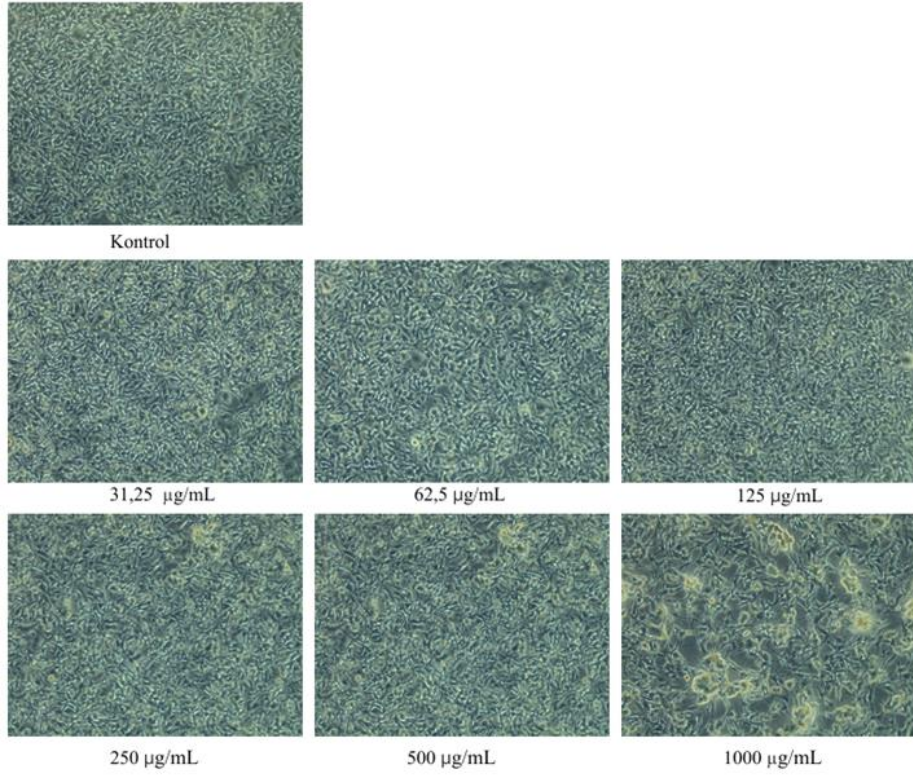


MeOH MDA-MB-231 48.Saat

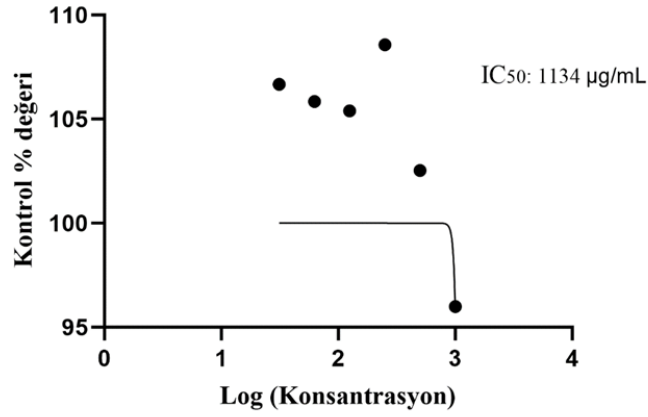


Şekil 4.4 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin su ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatte ki etkisi göz önünde bulundurulduğunda canlılık oranında önemli bir azalma meydana gelmemiştir. Hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %95,99'unun canlı kaldığı belirlenmiş ve IC₅₀ değeri 24. saat için 1134 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

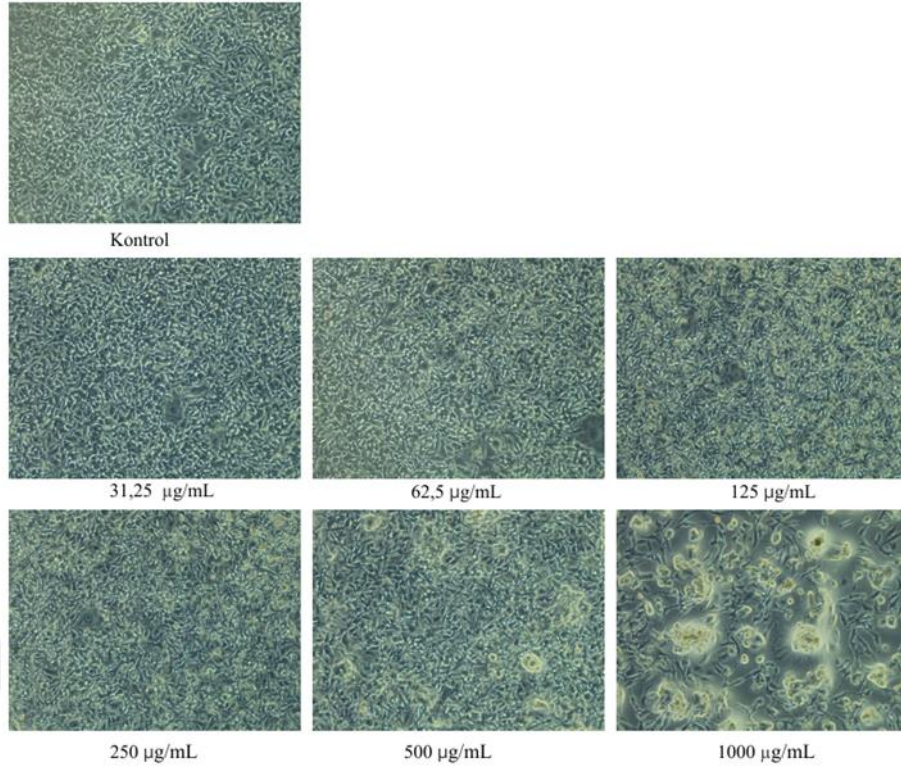


Su MDA-MB-231 24.Saat

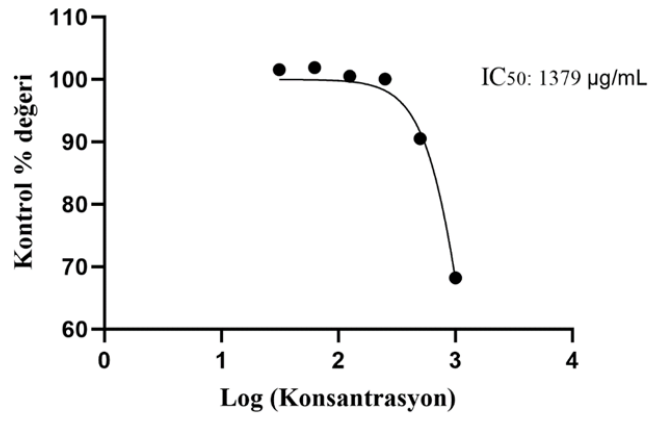


Şekil 4.5 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri

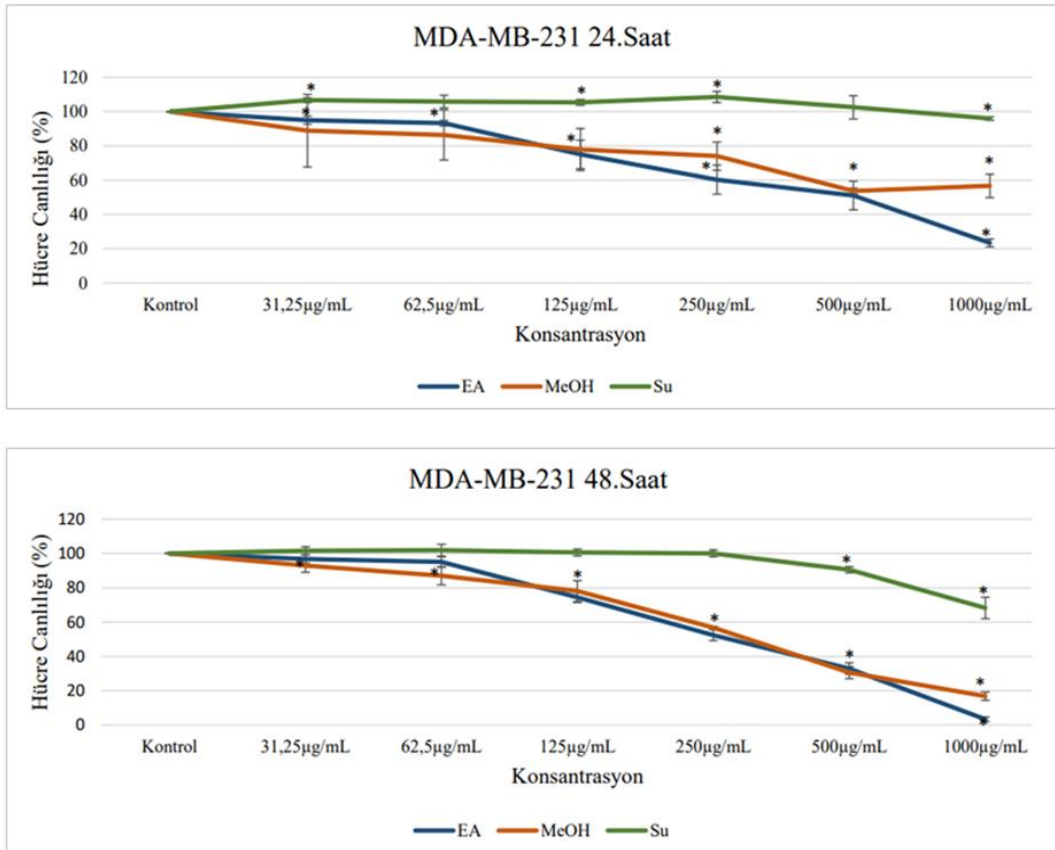
Hypericum salsolifolium bitkisinin su ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatte ki etkisine bakıldığında Şekil 4.6' de görüldüğü üzere hücre canlılığında önemli bir azalma olmamıştır. Hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %68,21'inin canlı kaldığı belirlenmiş ve IC₅₀ değeri 48. saat için 1379 µg/mL olarak bulunmuştur.



Su MDA-MB-231 48.Saat



Şekil 4.6 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri



Grafik 4.1 *Hypericum salsolifolium* ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde canlılık oranları. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. * p<0,05.

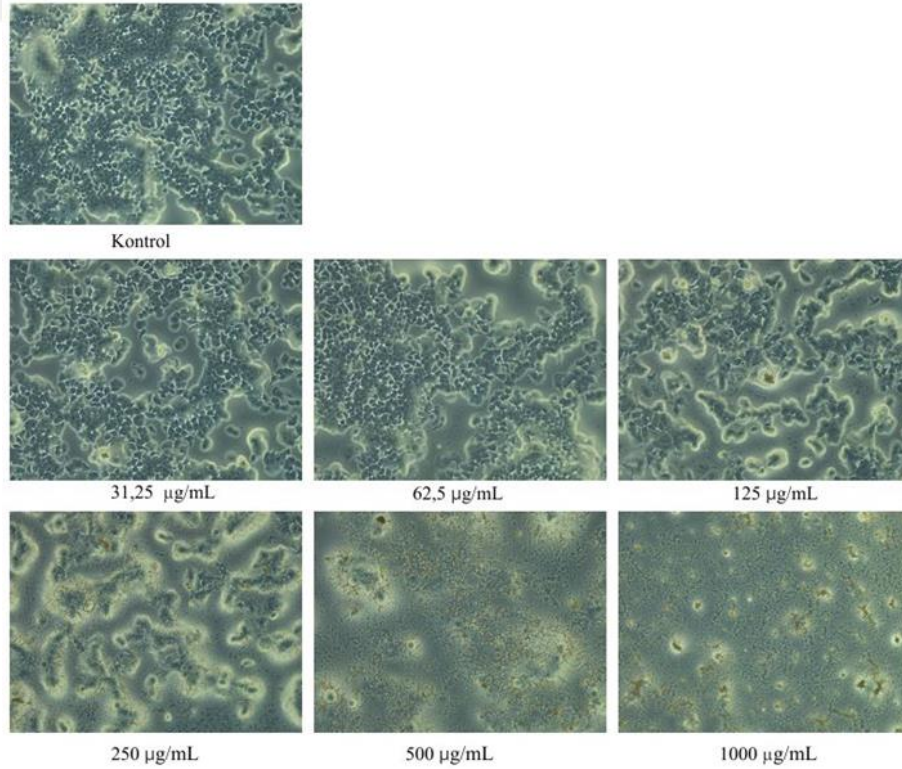
Tablo 4.1 Ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Ekstrakt konsantrasyonu	Hücre Canlılığı (%)					
	24.saat			48.saat		
	EA	MeOH	Su	EA	MeOH	Su
Kontrol	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0
31,25 µg/mL	95,02±2,3	88,85±15,2	106,66±1,3	96,73±2,4	92,90±2,4	101,55±2,3
62,5 µg/mL	93,24±1,6	86,38±14,6	105,84±3,7	95,05±3,0	87,01±3,5	101,87±3,4
125 µg/mL	75,02±8,3	77,91±12,2	105,39±1,7	74,39±3,0	78,08±0,7	100,53±2,0
250 µg/mL	60,29±8,4	74,03±8,2	108,56±3,2	52,42±3,1	56,74±6,0	100,04±2,0
500 µg/mL	50,99±8,3	53,66±1,6	102,53±6,7	32,91±3,3	30,56±5,2	90,51±1,8
1000 µg/mL	23,36±2,3	56,64±6,8	95,99±1,8	3,38±1,2	16,83±3,8	68,21±6,2

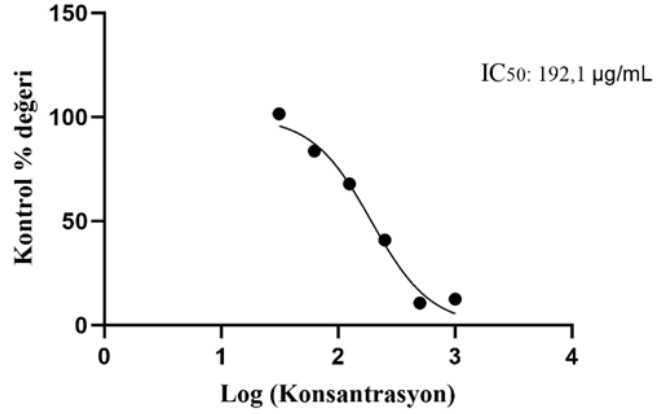
Antikanser aktivite bulgularına göre MDA-MB-231 hücre hattında 24 ve 48. saatlerde en düşük hücre canlılığına ve IC₅₀ değerine sahip ekstraktın etil asetat olduğu tespit edilmiştir. Etil asetat ekstraktı ile karşılaştırıldığında metanol ekstraktı hücre canlılığını daha az etkilemiştir. Ayrıca su ekstraktının hücre canlılığında en az azalma gösterdiği belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda ekstraktların MDA-MB-231 kanser hücrelerine karşı canlılık oranında meydana getirdiği etki Grafik 4.1’de gösterilmiştir. Hücre canlılık oranı yüzdesel (%) olarak Tablo ‘de belirtilmiştir.

4.1.2 Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları

Hypericum salsolifolium bitkisinin etil asetat ekstraktının MCF-7 hücre hattı için 24. saatteki etkisi göz önüne alındığında, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %12,52’sinin, 500 µg/mL konsantrasyonda %10,73’ünün, 250 µg/mL konsantrasyonda ise %40,96’sının canlı kaldığı belirlenmiştir. 24. saat için IC₅₀ değeri 192,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).

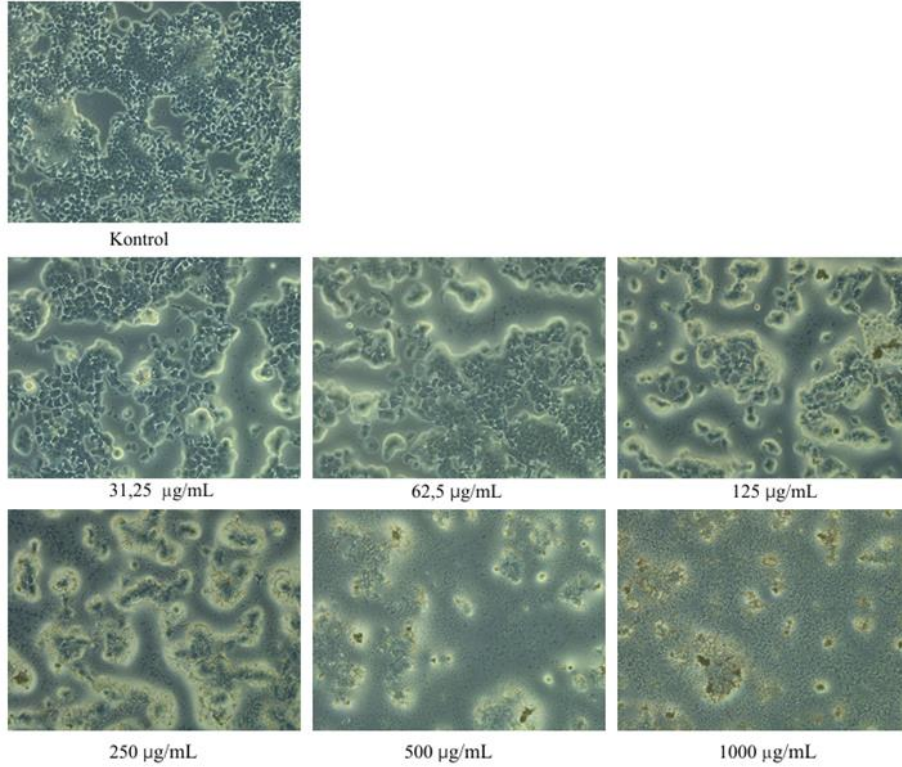


EA MCF-7 24.Saat

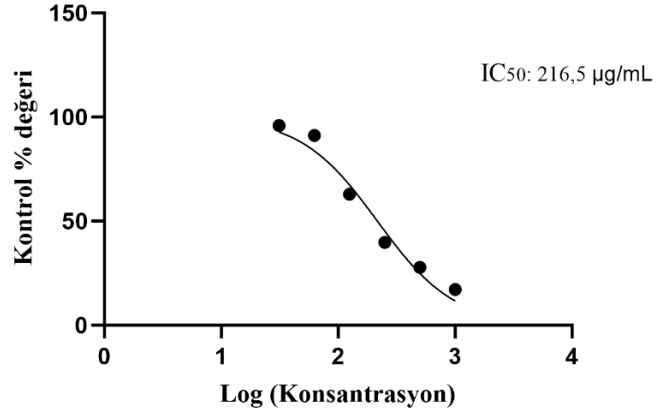


Şekil 4.7 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 24 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin etil asetat ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi değerlendirildiğinde, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %17,22 'inin, 500 µg/mL konsantrasyonda %27,75'inin ve 250 µg/mL konsantrasyonda %39,78'inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri ise 48. saat için 216,15 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

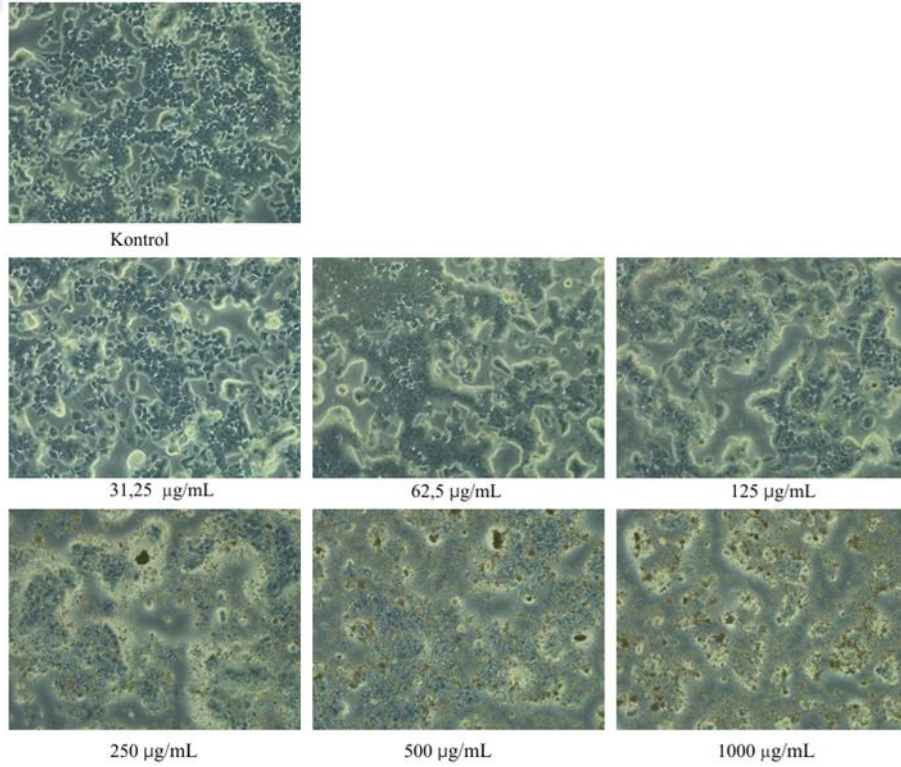


EA MCF-7 48.Saat

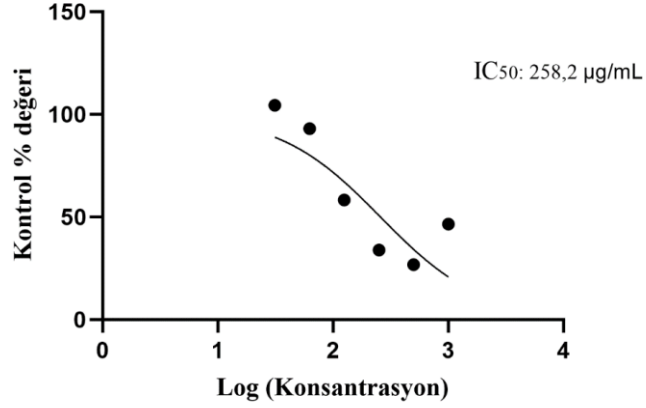


Şekil 4.8 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin metanol ekstraktının MCF-7 hücre hattı için 24. saatteki etkisine bakıldığında, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %46,60'ının canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri ise 24. saat için 258,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).

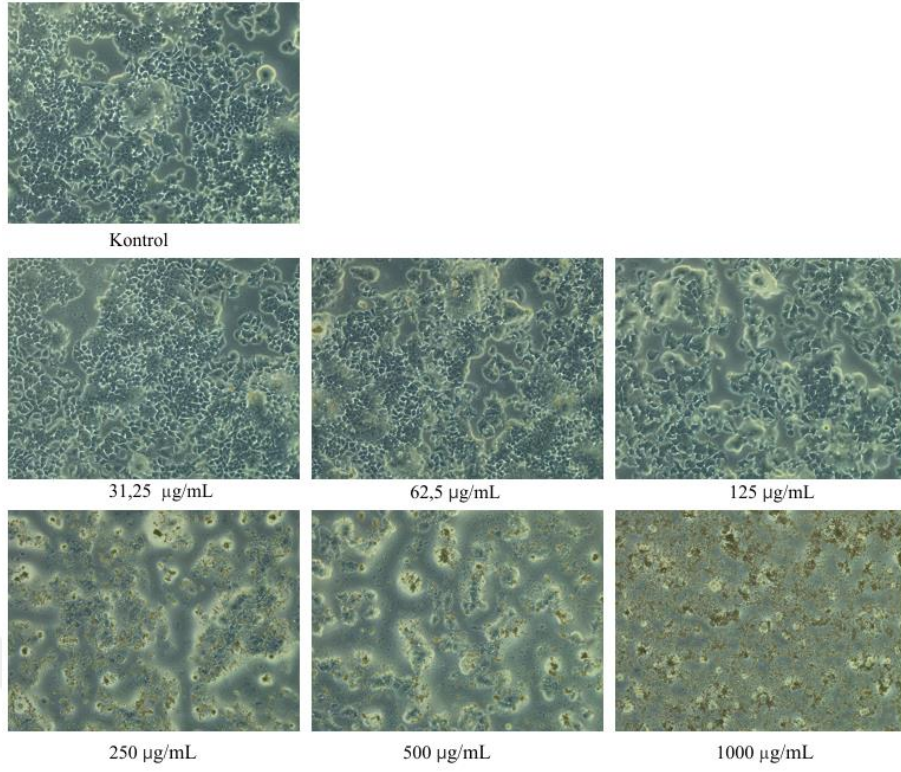


MeOH MCF-7 24.Saat

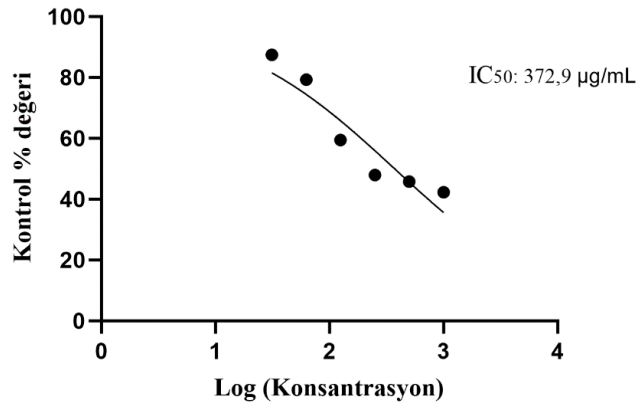


Şekil 4.9 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 24 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin metanol ekstraktının MCF-7 hücre hattına karşı 48. saatteki etkisi göz önüne alındığında, hücrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda %42,31 'inin, 500 µg/mL konsantrasyonda %45,81'inin, 250 µg/mL konsantrasyonda ise %47,96'sının canlı kaldığı gözlemlenmiştir. IC₅₀ değeri 372,9 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).

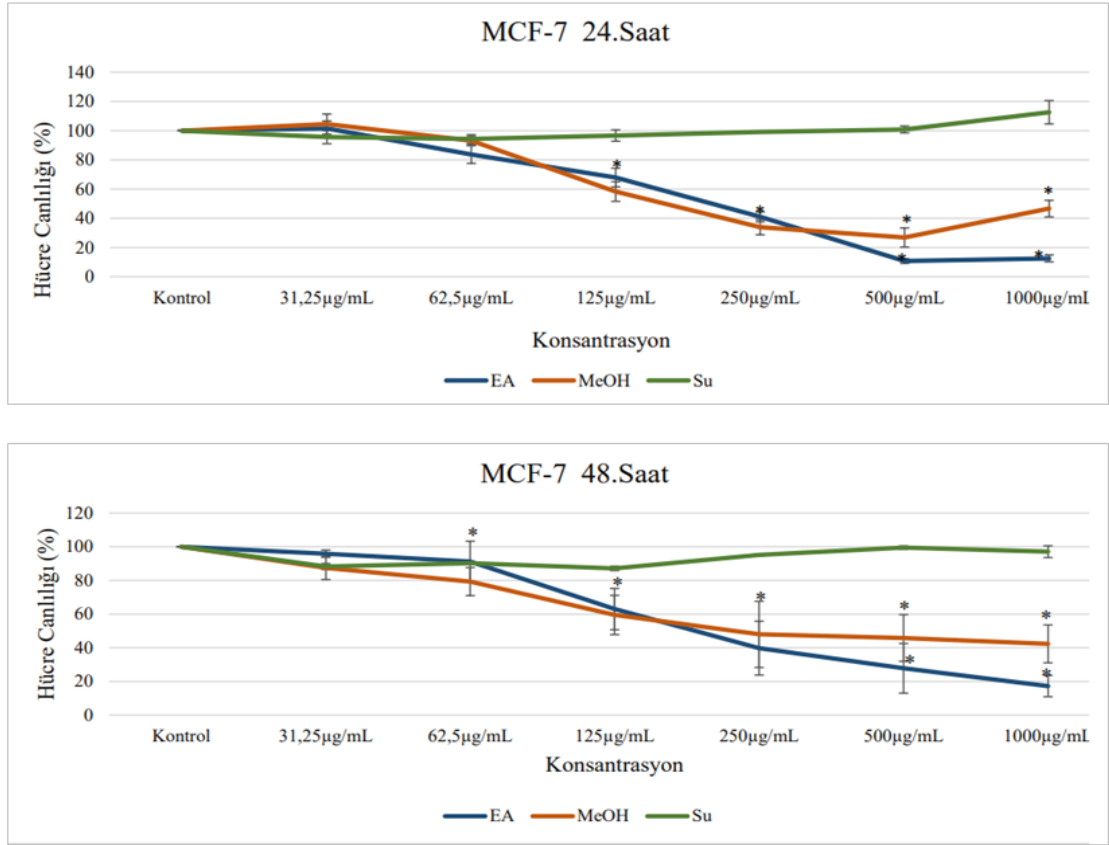


MeOH MCF-7 48.Saat



Şekil 4.10 Metanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saatteki morfolojik görüntüleri ve IC₅₀ değeri.

Hypericum salsolifolium bitkisinin su ekstraktının MCF-7 hücre hattı için 24 ve 48. saatteki etkilerine bakıldığında hücre canlılığın %50'nin üzerinde kalması nedeniyle IC₅₀ hesaplanamamıştır.



Grafik 4.2 *Hypericum salsolifolium* ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde canlılık oranları. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. * $p < 0,05$.

Tablo 4.2 Ekstraktların MCF-7 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

Ekstrakt konsantrasyonu	Hücre Canlılığı (%)					
	24.saat			48.saat		
	EA	MeOH	Su	EA	MeOH	Su
Kontrol	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0	100 \pm 0,0
31,25 µg/mL	101,5 \pm 7,2	104,49 \pm 9,7	95,54 \pm 6,3	95,90 \pm 2,1	87,42 \pm 6,8	88,28 \pm 1,7
62,5 µg/mL	83,63 \pm 8,5	93,10 \pm 4	94,30 \pm 4,1	91,20 \pm 12,1	79,31 \pm 8,3	90,21 \pm 0,7
125 µg/mL	67,89 \pm 9	58,28 \pm 9,4	96,66 \pm 5,5	62,96 \pm 12,2	59,47 \pm 11,6	87,13 \pm 1,2
250 µg/mL	40,96 \pm 4,7	33,88 \pm 7,3	99,15 \pm 0,4	39,78 \pm 15,9	47,96 \pm 19,6	95,21 \pm 0,5
500 µg/mL	10,73 \pm 2,2	26,83 \pm 9,2	100,81 \pm 3	27,75 \pm 14,7	45,81 \pm 13,8	99,44 \pm 1,0
1000 µg/mL	12,5 \pm 3,3	46,60 \pm 8	112,5 \pm 11,2	17,22 \pm 6,2	42,31 \pm 11,2	97,07 \pm 3,5

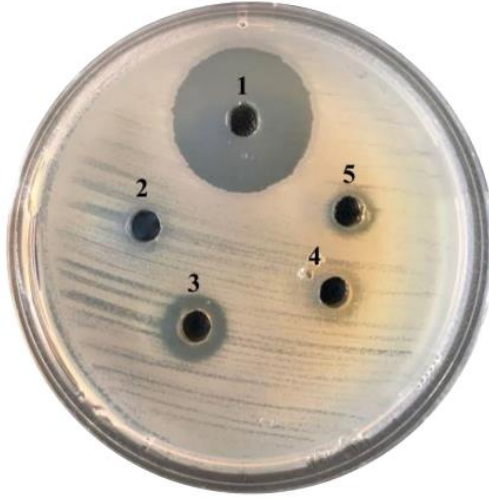
Antikanser aktivite bulgularına göre MCF-7 hücre hattı için 24 ve 48. saatlerdeki hücre canlılığını en çok etkileyen ve en düşük IC₅₀ değerinin elde edildiği ekstrakt etil asetat olmuştur. Metanol ekstraktının hücre canlılığını daha az etkilediği, su ekstraktının ise hücre canlılığında azalma göstermediği gözlemlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda MCF-7 kanser hücreleri üzerinde ekstraktların canlılık oranı etkisi Grafik 4.2’de gösterilmiştir. Hücre canlılık oranı yüzdesel (%) olarak Tablo 4.2’de belirtilmiştir.

4.2 Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Ekstraktların antimikrobiyal etkinliği agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılmıştır.

4.2.1 Agar Kuyucuk Difüzyon Testi

Hypericum salsolifolium’ un toprak üstü kısmından hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri, mikroorganizma suşları üzerinde agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek zon çapları 11 mm ile *B. subtilis* ve 8 mm ile *S. aureus* bakterilerine karşı elde edilmiştir (Şekil 4.11). Pozitif kontrol olarak kullanılan levofloksasin antibiyotiğinin zon çapı *B. subtilis* için 26 mm iken *S. aureus* için 22 mm olarak ölçülmüştür



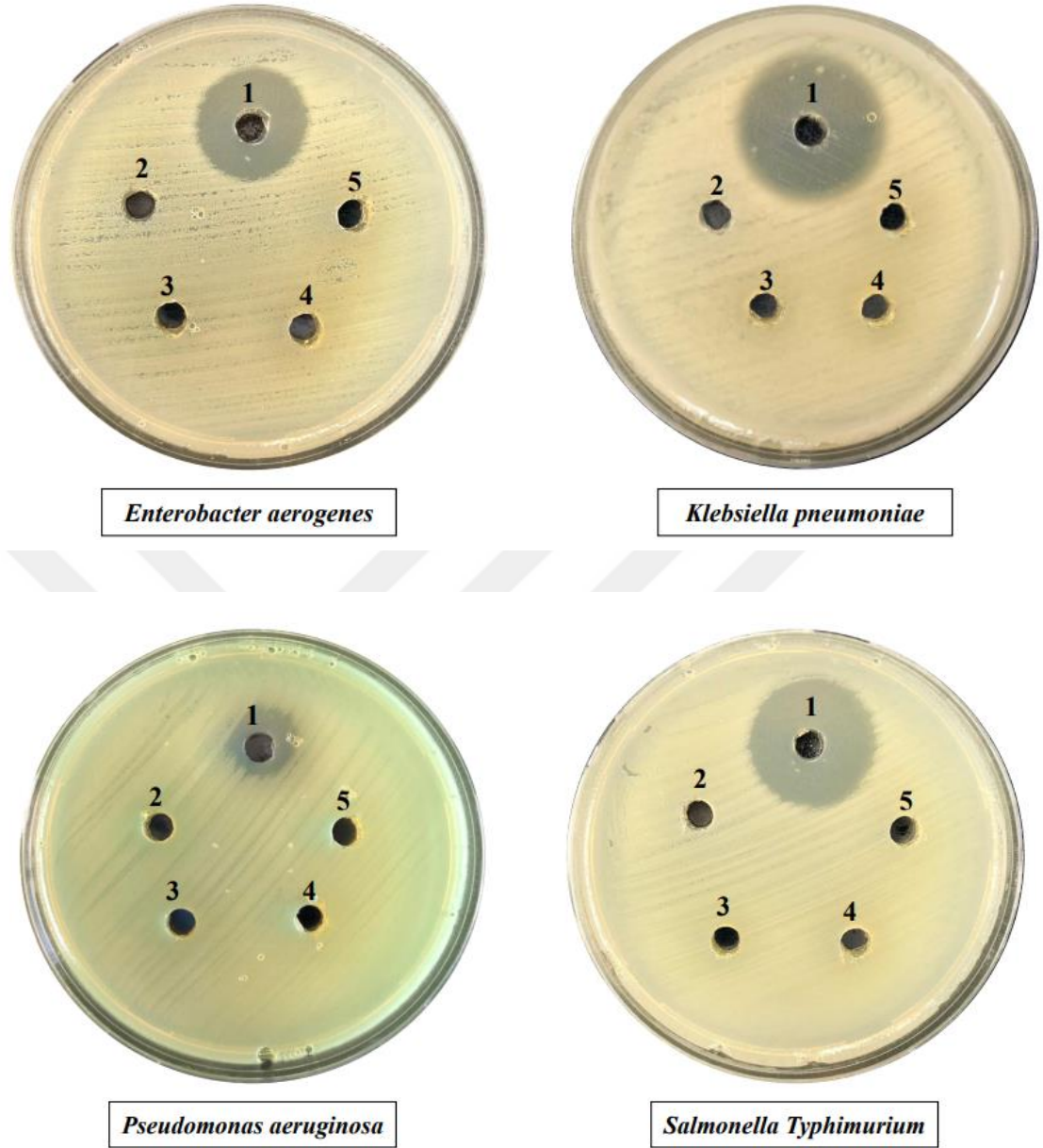
Bacillus subtilis



Staphylococcus aureus

Şekil 4. 11 Antimikrobiyal aktivite sonucu oluşan zon çapları. (1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).

Diğer mikroorganizmalara karşı etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi gözlenmemiştir. Bu bakterilere karşı levofloksasinin zon çapları şu şekilde ölçülmüştür: *Acinetobacter haemolyticus* 30 mm, *Escherichia coli* 33 mm, *Enterobacter aerogenes* 20 mm, *Enterococcus faecalis* 20 mm, *Klebsiella pneumoniae* 25 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 12 mm, *Salmonella Typhimurium* 24 mm, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *S. Typhimurium*'un agar kuyucuk diffüzyon test sonuçları Şekil 4.12'de gösterilmiştir



Şekil 4.12 *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *S. Typhimurium*'a karşı ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri (1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).

4.2.1.1 MİK ve MBK Değerleri

Agar kuyucuk diffüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi tespit edilen etil asetat ekstraktının *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. Buna göre *B. subtilis* için MİK ve MBK değerleri 1000 µg/mL olarak tespit edilirken *S. aureus* için sırasıyla 1000 µg/mL 2000 µg/mL olarak saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan levoflaksasin antibiyotiğinin MİK değeri *B. subtilis* için 0,5 µg/mL

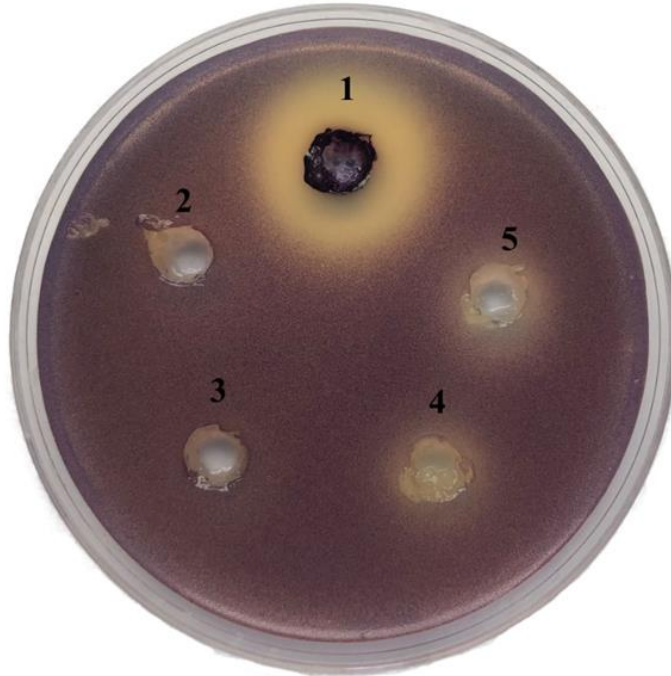
iken *S. aureus* için 1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO çözücüsünün MİK değeri her iki suş için >%10 olarak tespit edilmiştir.

4.3 QS İnhibisyon Test Bulguları

Hypericum salsolifolium bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının QS inhibitör etkinlikleri *C. violaceum* CV026 ve *S. aureus* biyoindikatör ATCC 25923 suşlarına karşı sırasıyla viyolasin pigment üretimi inhibisyon ve biyofilm inhibisyon testleri ile testi ile araştırılmıştır

4.3.1 Viyolasin İnhibisyon Testi

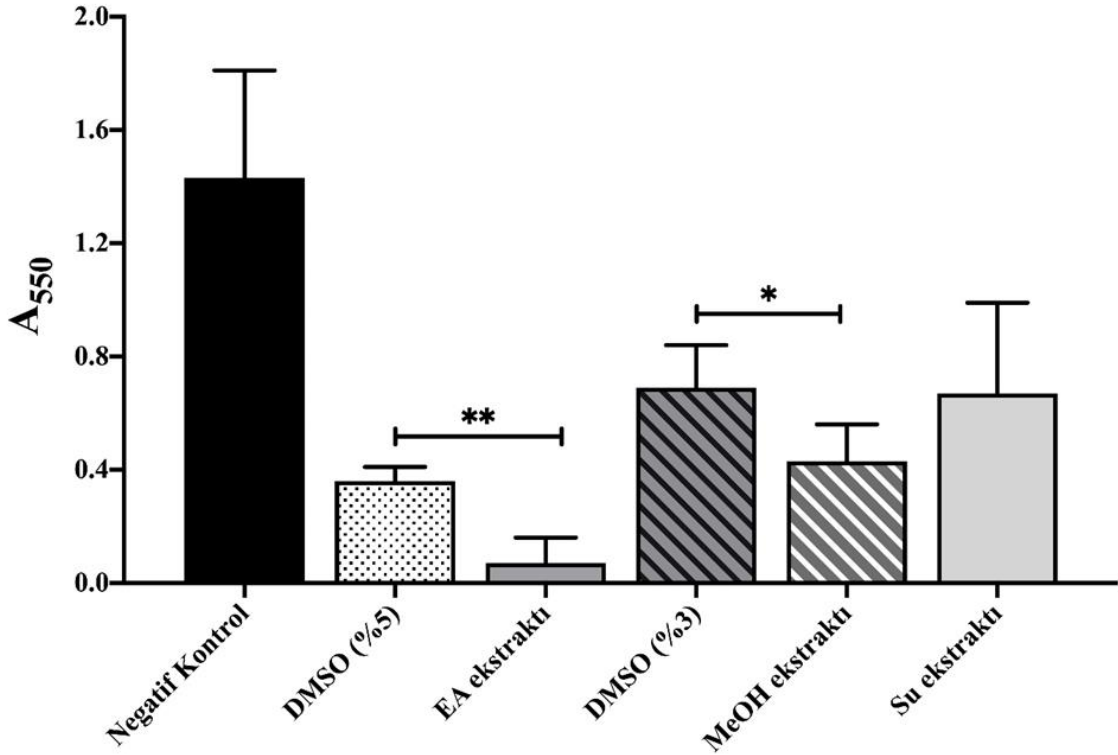
H. salsolifolium'un toprak üstü kısmından hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının *C. violaceum* CV026'da viyolasin üretimini engelleme potansiyeli yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak ekstraktların çalışılan konsantrasyonlarda viyolasin pigment üretimini engelleyici bir etki göstermediği tespit edilmiştir (şekil 4.13).



Şekil 4.13 Ekstraktların *C.violaceum* CV026'da viyolasin üretimini engelleme potansiyeli (1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3: Etil asetat ekstraktı, 4: Metanol ekstraktı, 5: Su ekstraktı).

4.3.2 Biyofilm İnhibisyon Testi

Hypericum salsolifolium bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan etil asetat, MeOH ve su ekstraktlarının biyofilm inhibitör etkinliği *S. aureus* suşu üzerine kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır. Etil asetat ekstraktının test edilen konsantrasyonu %5 DMSO içerdiği için biyofilm inhibitör etkinliği %5 DMSO içeren kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde etil asetat ekstraktının biyofilm oluşumunu %81,5 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. MeOH ve su ekstraktlarının ise test edilen konsantrasyonu %3 DMSO’da çözüldüğü için bu ekstraktların biyofilm inhibitör etkinlikleri sadece %3 DMSO uygulanmış kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre de MeOH ekstraktı biyofilm oluşumunu %37,7 oranında inhibe ederken su ekstraktı ise %2,3 oranında inhibe etmiştir (Grafik 4.3).



Grafik 4.3 *Hypericum salsolifolium* ekstraktlarının *S. aureus* suşu üzerine biyofilm inhibitör etkinliği. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir. * p<0,05 ** p<0,01. Negatif kontrol: Hiçbir madde uygulanmamış kuyucuklarda ölçülen absorbans değeri. EA ekstraktı, %5 DMSO uygulanmış kuyucuklarla; MeOH ve su ekstraktları ise %3 DMSO uygulanmış kuyucuklarla karşılaştırılmıştır.

5. TARTIŞMA

Bitki materyallerinin ekstrakte edilmesi, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. En yaygın kullanılan yöntemler arasında soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon, infüzyon, dekoksiyon, perkolasyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonikasyon ekstraksiyonu bulunmaktadır (Türk & Giray, 2020). Ekstraksiyon yöntemleri elde edilen ekstraktın verimini (elde edilen bileşik miktarını), fitokimyasal içeriğini ve diğer özelliklerini belirlemede önemlidir (Stéphane vd., 2021). Çalışmada kullanılan ekstraktların verimi yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Metanol ekstraktının %2,02 oranıyla en yüksek verime sahip olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla su (%1,94) ve etil asetat takip etmiştir (%1,6). En düşük verim etil asetat ile elde edilmesine rağmen, bu çözücüyle elde edilen ekstrakt en etkili sonuçları göstermiştir. Bu durum, etil asetatın spesifik bileşiklerin ekstraksiyonunda diğer çözücülere göre daha seçici olabileceğini düşündürmektedir. Etil asetat, biyolojik olarak aktif bileşiklerin ekstraksiyonunda daha verimli olabilir, bu da daha düşük verime rağmen yüksek biyolojik aktiviteye sahip bileşikler elde edilmesini sağlayabilir.

Kanser, bir dizi genomik veya moleküler değişiklik sonucunda hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalmasına yol açan, etkilenen bölgelerde doku kütlelerinde artışa neden olan heterojen bir hastalıktır. Normal şartlar altında bir hücre belirli bir yaşam sürecine sahip olabilir ve bu süreç sonunda belirli sinyaller alarak programlanmış hücre ölümüne geçebilir. Bu durum organizmanın sağlıklı ve genç hücrelerle yenilenmesine olanak sağlar. Kanser hücreleri ise normal hücreler için gerekli olan oksijen ve besin gibi temel faktörleri kullanarak çoğalma avantajı elde edebilirler. Bağışıklık sistemini kandırır ve kendi ihtiyaçlarını karşılamak için diğer hücrelerin fizyolojisinden yararlanabilir (Anand vd., 2023). Kanseri tedavi etmek için kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler olmak üzere birçok tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Fakat, her ilaçta olduğu gibi bu tedavilerinde birçok yan etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavilerinde şifalı bitkilerden faydalanılarak alternatif tedavi yöntemleri benimsenmektedir (El Orfi vd., 2022).

Çalışmamızda *Hypericum salsolifolium* bitkisinin toprak üstü kısmından hazırlanan EA, MeOH ve su ekstraktlarının, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerine antikanser aktivitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. 24. ve 48. saatlerde çeşitli konsantrasyonlardaki (31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) etkiye bakılmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine EA ekstraktının hücre canlılık aktivitesi değerlendirildiğinde en iyi etki 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonda gözlenmiştir. EA ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı 48. saat için %32,91 olarak hesaplanmıştır. EA ekstraktının hücre canlılığı 24. saat için 1000 µg/mL konsantrasyonda %23,36, 48. saat için ise %3,38 olarak belirlenmiştir. MeOH ekstraktı ise 48. saat sonunda 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda en iyi etkiyi göstermiş ve hücre canlılık oranı sırasıyla %30,56 ve %16,83 olarak belirlenmiştir. Süre sonunda, çalışılan konsantrasyonlardaki antikanser aktivite incelenmiş ve hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü belirlenmiştir.

MCF-7 hücre hattına karşı EA ekstraktının 24 ve 48. saatlerdeki etkisi incelendiğinde, en etkili sonuçların 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlemlendiği görülmüştür. EA ekstraktının 24. saatte hücre canlılığı 250 µg/mL konsantrasyonda %40,96, 500 µg/mL konsantrasyonda %10,73 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda %12,52 olarak belirlenmiştir. 48. saatte hücre canlılığı ise 250 µg/mL konsantrasyonda %39,78, 500 µg/mL konsantrasyonda %27,75 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda %17,22 olarak hesaplanmıştır. MeOH ekstraktında ise 48. saate kıyasla 24. saatte hücre canlılığında daha belirgin bir azalma görülmüştür. Su ekstraktının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde 24 ve 48 saatlik sürelerde çalışılan konsantrasyonlarda, hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmemiş ve hücre canlılık oranının kontrol grubuna kıyasla %50' nin üstünde olduğu belirlenmiştir.

Hücreleri yarıya düşüren inhibitör konsantrasyon değeri olarak bilinen IC₅₀ değeri, GraphPad Prism 8.0 versiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Test edilen saatler ve hücre hatları dikkate alındığında en düşük IC₅₀ değeri EA ekstraktında elde edilmiştir. Test edilen saatler için düşük IC₅₀ değeri, ekstraktın etkinliğini göstermektedir. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, EA ekstraktının en düşük IC₅₀ değeri 48. saatte belirlenmiş ve bu değer 270,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. MCF-7 hücre hattı için ise EA

ekstraktının en düşük IC₅₀ değeri 24. saatte belirlenmiş ve 192,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. MeOH ekstraktının IC₅₀ değeri MDA-MB-231 hücre hattında 48. saatte 294,0 µg/mL, MCF-7 hücre hattında ise 24. saatte 258,2 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Su ekstraktının etkisi incelendiğinde, hücre hatlarına karşı test edilen saatler ve konsantrasyonlar göz önünde bulundurulduğunda hücre canlılığının %50'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Su ekstraktının MCF-7 hücre hattı için test edildiği saatlerde IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

MDA-MB-231 hücre hattında en etkili sonuçlar 48 saatte elde edilmiştir. MDA-MB-231 daha agresif ve dirençli bir hücre hattıdır. Bitki ekstraktları etkisini daha uzun bir inkübasyondan sonra göstermiş olabilir. MCF-7 hücre hattı daha düşük maligniyete sahip bir hücre hattı olduğu için ekstraktların etkili olduğu aşama 24 saatlik bir süre içinde olabilir. 48 saat sonra ekstrakt bileşenleri hücre ile etkileşime girip etkisini azaltabilir. Bu nedenle 24.saatte hücre canlılığında daha belirgin bir azalmanın olduğu düşünülebilir. Bitki ekstraktlarının hücreler tarafından algılanması, metabolize edilmesi ve etkili bileşenlerin çeşitli konsantrasyonlarda farklılık göstermesi hücreden hücreye farklılık gösterebilir. Ekstraktlar, hücre hatlarına karşı antikanser etkilerini içerdikleri bileşikler sayesinde sergilemiş olabilir. Bitkilerde bulunan flavonoidler çeşitli antikanser etkiler göstermektedir. Karsinogenez sürecinde çeşitli sinyal iletim yolları ile etkileşime geçmekte ve metastazı azaltmaktadır. Flavonoidler, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı azaltabilir, hücre döngüsünü durdurarak kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini engelleyebilir, apoptoz ve otofajiyi uyarabilir (Kopustinskiene vd., 2020; Mutha vd., 2021). Literatürde meme kanseri hücrelerinde izorhamnetin, genkwanin, akasetin, silimarin, eriositrin, icariin, kaempferol, silibinin, apigenin ve luteolin gibi belirli flavonoidlerin antikanser özellik gösterildiği belirtilmiştir (Park vd., 2022). Ayrıca vanilik asit, anti-inflamatuar, anti-metastatik, antioksidan ve anti-apoptotik etkiler olmak üzere çeşitli özelliklere sahiptir (Kiliç Altun, 2020). Keser ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *H. scabrum* çiçeklerinden elde edilen ekstraktların fitokimyasal içerik analizi ve sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. İçerik analizinde başlıca kateşin, vanilik asit, K vitamini ve ergosterol bulunmuştur. Ekstraktlar MCF-7 (insan meme adenokarsinomu), HCT 116 (insan kolon karsinom hücre hattı) ve LNCaP (Prostat lenf nodu karsinomu) hücre hatlarına karşı güçlü antikanser aktivite göstermiştir (Keser vd., 2020). Literatürde

bulunan başka bir çalışmada ise farklı solventlerle hazırlanan *H. salsolifolium* bitki ekstraktlarının fenolik bileşik içeriği araştırılmıştır. İçerik analizinde siringik asit ve vanilik asit en yüksek değerde bulunmuştur. Ayrıca yüksek düzeyde Ca, K ve Mg elementlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ekstraktların A549 (Akciğer Kanseri Epitel) ve BEAS-2B (Akciğer Normal Epitel) hücre hatları üzerinde antikanser etki gösterdiği ifade edilmiştir (Agan vd., 2023). Bizim çalışmamızda da ekstraktların meme kanseri hücre hatları üzerinde uygulanan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında bir azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni bu bileşiklerden kaynaklı olabilir.

Flavonoidler, çeşitli sinyal yollarını hedef alarak da antikanser etki göstermektedir. Tümör baskılayıcı gen olarak da bilinen p53, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Flavonoidler çeşitli kanser türlerinde p53 sinyal yolunu etkileyerek B hücreli lenfoma 2'yi (Bcl-2) inhibe etmekte ve kanserde önemli bir düzenleyici yolu baskılamaktadır. Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonu prostat kanseri, meme kanseri, B hücreli lenfomalar ve kolorektal kanserde belirtilmiştir (Qian vd., 2022; Rahman vd., 2021). Yapılan bir çalışmada kuersetinin, MCF-7 insan meme kanseri hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Bunun nedeninin Bcl-2 protein ekspresyonunun aşağı ve Bax ekspresyonunun yukarı regülasyonundan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Duo vd., 2012) Literatürde, luteolin'in meme kanseri için umut vadeden bir bileşik olduğu belirtilmektedir. Luteolin meme kanseri hücrelerinde Bax/Bcl-2 ve Kaspaz-3 seviyelerini arttırmakta ve apoptozun uyarılmasında bir rol oynamaktadır. Ayrıca bir çalışma luteolin'in G2/M ve S aşamalarında hücre döngüsünü durdurduğunu ve MDA-MB-231 hücrelerinde büyümeyi engellediğini açıklamıştır (Çetinkaya ve Baran, 2023). PI3K/Akt hücre içi sinyal iletiminde önemli olan bir dizi protein kompleksidir. Bu kompleksin temel bileşenleri ise fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt) adı verilen enzimlerdir. Bu sinyal yollarının bozulması ya da engellenmesi tümör büyümesini, metastazı ve invazyonu tetiklemektedir. Bu sinyal yolu mTOR adlı bir serin/treonin kinaz dahil olmak üzere birçok hedef proteini aktive hale getirmektedir. Aktif olan mTOR hücre büyümesi ve protein sentezi gibi çeşitli fonksiyonlarda görev almaktadır. Yapılan bir çalışmada apigenin bileşiğinin karaciğer kanser hücrelerinde apoptoz ve otofajiyi indüklediğini ve bunu PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu engelleyerek

gerçekleştirdiğini öne sürmektedir (Javed vd., 2021; Yang vd., 2018). Tangeritin, 3-hidroksiflavon, 3',4'-dihidroksiflavon, 2',3'-dihidroksiflavon, fisetin, apigenin, daidzein ve genistein gibi flavonoidlerin de antikanser etki gösterdiği bilgisi literatürde mevcuttur. Bu bileşenler hücre döngüsünü durdurarak kanserojen metabolizmasını düzenlemektedir (Berk vd., 2022).

Bizim çalışmamızda da antikanser etki gösteren ekstraktların içeriğinde yukarıda belirtilen bileşiklerin çeşitli sinyal yollarını etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamız, etil asetat ekstraktlarının bileşiminin kanser hücrelerini hedef alan ve daha belirgin bir antikanser etkisine yol açan biyoaktif bileşikler içerebileceğini düşündürmektedir. Etil asetat yarı polar bir çözücü olarak kabul edilirken metanol, polar bir çözücü olarak sınıflandırılır. Bir solventin polaritesi, biyoaktif bileşiklerin doğal kaynaklardan ekstraksiyonunda önemli rol oynamaktadır. Çünkü farklı bileşikler, farklı polaritelerdeki solventlerde değişen çözünürlüklere sahiptir (Oon vd., 2021; Pringgenies vd., 2021). Etil asetat ekstraktlarının neden kanser hücrelerine karşı metanol ve su ekstraktlarından daha etkili olduğunun ardındaki mekanizmaların tam anlamıyla anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının kimyasal içerikleri farklı olabilir ve bu farklılıklar ekstraktların biyolojik etkilerini belirleyebilir. Etil asetat ekstraktında bulunan bazı özel bileşikler, kanser hücreleri üzerinde daha etkili olabilir. Bu bileşenlerin belirlenmesi ve karakterize edilmesi, etkili bileşenlerin tespiti için önemlidir. Ayrıca, etil asetat ekstraktındaki bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri gen ekspresyonu düzeyinde incelenebilir. Ekstraktın hangi gen ekspresyonlarını etkilediği belirlenerek etkili mekanizmalar aydınlatılmalıdır.

Antibiyotik direnci tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. Her geçen yıl bakterilerde yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmakta ve yaygınlaşmaktadır. Bu nedenle hastalıklarla mücadele etmede yeni ve etkili antimikrobiyal ihtiyaçlara olan talep artmaktadır. Bu çalışmada *H. salsolifolium*'un toprak üstü kısmından elde edilen ekstraktların bazı patojenlere karşı antimikrobiyal ve anti-QS özellikleri araştırılmıştır.

Antimikrobiyal analiz, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 2921, *Enterobacter aerogenes* ATCC

13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* referans suşları ile yapılmıştır.

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi, çeşitli mikroorganizmalara karşı agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle test edilmiş ve ekstraktın etkili suşlara karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) sıvı mikrodilüsyon deneyi ile gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen MİK değerleri üzerinden minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlenmiştir. Sadece etil asetat ekstraktı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Mikroorganizma uygulanan ekstrakta ne kadar duyarlı ise kuyucuk etrafında oluşmasını beklediğimiz zon çapları da o kadar geniş olmaktadır. EA ekstraktı uygulaması sonucunda en yüksek zon çapları *B. subtilis* (11 mm) ve *S. aureus* (8 mm) bakterilerine karşı elde edilmiştir. *B. subtilis* için MİK ve MBK değerleri 1000 µg/mL olarak saptanmıştır. *S. aureus* için MİK ve MBK değerleri sırasıyla 1000 µg/mL ve 2000 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Literatürde, çeşitli çözücüler kullanılarak *Hypericum* cinsine ait bitkilerin çeşitli kısımlarından hazırlanan ekstraktların mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada agar kuyucuk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon analizi deneyleri yapılarak *Hypericum atomarium* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Agar kuyucuk difüzyon testi sonuçlarına göre en geniş zon çapı *Bacillus* türlerinde elde edilmiş ve bu durumu *S. aureus* suşu takip etmiştir. MİK değerlerinde bakıldığında etil asetat ve kloroform ekstraktlarının Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu görülmüştür (Önem vd., 2023). Saddiqe ve arkadaşlarının (2020) yaptığı bir çalışmada *Hypericum* türlerinden elde edilen farklı solvent ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi Gram pozitif (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve Gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. aerogenes*) bakteri türlerine karşı mikrodilüsyon yöntemi testi ile değerlendirilmiştir. En belirgin antibakteriyel etki *H. olympicum* türünde, özellikle fenolik ve flavonoid içerikleri açısından zengin olduğu tespit edilen etil asetat ve n-butanol ekstraktları tarafından sergilenmiştir (MİK 0.001- 0.1 mg/mL). Başka bir çalışmada *Hypericum* türlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi disk difüzyon testiyle yapılmıştır. Ekstraktlar *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae ve *Proteus vulgaris* bakterilerine ve maya kültürlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (Dulger vd., 2005). Literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar bizim sonucumuzla uyumludur. Bizim sonuçlarımızda da Gram-pozitif bakteri suşları ekstraktlara Gram-negatif bakterilerden daha duyarlıydı. Ekstraktlara karşı duyarlılıktaki farklılıklar bakterilerin hücre duvarı yapısından kaynaklanabilir. Gram-negatif bakteriler, Gram-pozitif bakterilerin aksine bir dış zara ve periplazmik boşluğa sahiptir. Gram-negatif bakterilerde bulunan, lipopolisakarit açısından zengin olan dış zar çeşitli antibiyotiklere karşı bir bariyer görevi görmektedir. Gram-pozitif bakteriler ise bir dış zar ve hücre duvarı konfigürasyonundan yoksundur (Shuaib vd., 2013).

H. perforatum 'dan elde edilen etanolik ekstraktının antibakteriyel aktivitesinin belirlendiği çalışmada, ekstraktın *Pseudomonas glycinea* ve *Azotobacter chroococcum* türlerine karşı yüksek duyarlılık gösterdiği ancak *Klebsiella pneumoniae* üzerine herhangi bir etkisi göstermediği açıklanmıştır (Milosevic vd., 2007). Başka bir çalışmada, *Hypericum perforatum* subsp. ve *H. perforatum* subsp. *angustifolium* ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Test edilen Gram-pozitif bakterilere karşı ekstraktlar inhibisyon göstermiş ve zon çapları 10 ila 28 mm arasında ölçülmüştür. En yüksek zon çapı ise metanol uygulaması sonucunda *E. faecalis*'e karşı elde edilmiştir. *H. perforatum* subsp. *angustifolium* türünden elde edilen diklorometan ekstraktı *H. perforatum* subsp.' a göre kıyaslandığında *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis* bakterilerine karşı daha güçlü etki göstermiştir (21-28 mm zon çapı). *E. faecalis*'e karşı aktivite ise her iki alt tür için de benzer sonuç vermiştir. Araştırmacılar ekstraktların antimikrobiyal aktivite göstermesinin nedenini içeriğindeki flavonoidler, fenolik asitler, hiperisinler ve tanenlerden kaynaklı olduğunu düşünmektedir (Males vd., 2006). Bir başka çalışmada, *H. scabrum* ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon ve seri dilisyon analizi ile incelemişlerdir. Ekstraktların *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Ganji vd., 2017).

Hypericum scabrum'un farklı kısımlarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği çalışma, MeOH, n-heksan ve diklorometan kök ekstraktlarının *B. subtilis*, *C. albicans* ve *C. tropikalis* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu bildirmiştir (MİK = 156,25-312,5 µg/mL). Köklerden elde edilen

ekstraktların test edilen mikroorganizmalara karşı etkili olmadığı görülmüştür. Toprak üstü kısmından elde edilen n-heksan ekstraktı en iyi etkiyi *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı göstermiştir. Çiçek kısmından elde edilen etil asetat ekstraktı test edilen mikroorganizmalar üzerinde en iyi etki gösterdiği açıklanmıştır (Ergin vd., 2022). Marčetić ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, *H. aegypticum subsp. Webbii* ve *H. perforatum*'dan elde edilen esansiyel yağ ve MeOH ekstraktının antimikrobiyal etkisi mikrodilüsyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. *H. perforatum* türüyle kıyaslandığında *H. webbii*'nin MeOH ekstraktı *B. Subtilis* (MİK 50 µg/ml), *E. faecalis* (MİK 50 µg/ml), *Staphylococcus epidermidis* (MİK 100 µg/ml) ve *Micrococcus luteus*'a suşlarına karşı daha iyi aktivite göstermiştir. Ancak bizim çalışmamızda *H. salsolifolium* ekstraktları *S. aureus* ve *B. subtilis* suşları hariç bakterileri inhibe etmemiştir. Bunun nedeninin ekstraktların elde edildiği bitki kısmı, kullanılan ekstraksiyon yöntemi ve solventten kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Etki mekanizmalarını ve antimikrobiyal tedavideki potansiyel uygulamalarını daha iyi anlamak için bu bileşikleri tanımlamak ve izole etmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma, literatür araştırmalarına göre *H. salsolifolium* türünün antimikrobiyal ve anti-QS etkilerinin incelendiği ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Çalışmada *H. salsolifolium*'un toprak üstü kısmından elde edilen EA, MeOH ve su ekstraktlarının sentezlenen viyolasin ve biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkileri QS mekanizmasıyla araştırılmıştır.

Deney sonuçları incelendiğinde test edilen konsantrasyonlarda ekstraktların *C. violaceum* CV026 suşunda viyolasin pigment üretimini engelleyici bir etki göstermediği tespit edilmiştir. *C. violaceum* AHL sinyal molekülünü kullanarak viyolasin üretimini düzenlemektedir. *Ferula elaeochytris Korovin*'in kök ekstraktının antimikrobiyal ve anti-QS aktivitelerinin araştırıldığı çalışma ekstraktın viyolasin pigment üretimini engelleyememesinin nedenini ekstrakttaki bileşiklerin AHL molekülleri ile olan ilişkisine bağlamıştır (Alkateeb vd., 2020). Fratianni ve arkadaşları (2013) yaptığı bir çalışmada, *H. connatum*'un etanolik ve etil asetat ekstraktlarının *C. violaceum* DSM 30191 suşu üzerinde QS inhibitör özelliklerini araştırmıştır. Herhangi bir miktarda etil asetat ekstraktı (10 ila 100 µg arasında) için

QS aktivitesi gözlenmemiştir. Etanol ekstraktı 50 µg konsantrasyonda 7.3 mm, 100 µg konsantrasyonda ise 9.3 mm'lik bir inhibisyon göstermiştir. Araştırmacılar bu davranışı etanol ekstraktında apigeninin QS aktivitesini sinerjistik olarak güçlendirebilecek rutin varlığına bağlayarak yorumlamışlardır. Etil asetat ekstraktındaki diğer flavonoidlerin, bu özelliği güçlendirmesinin pek olası olmadığı ifade edilmiştir. Ayrıca *H. connatum*'un antimikrobiyal aktivitesini de değerlendirmişlerdir. Etil asetat ekstraktı, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı etanolik ekstraktan daha etkili bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (Fratianni vd., 2013).

Biyofilm oluşumu, bakterileri konakçının bağışıklık sistemi ve antibiyotiklerin saldırısına karşı korumaktadır. *S. aureus* biyofilm oluşturan en yaygın bakteri suşlarından biridir. *S. aureus* biyofilm oluşturmak için bir yardımcı düzenleyici faktör (Agr) ve LuxS/AI-2 olmak üzere iki sistem kullanmaktadır. Bu sistemler, bakterinin çevresel koşullara uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır (Peng vd., 2023).

Literatürde belirtilen birçok çalışma, çeşitli organizmalardan elde edilen biyolojik materyallerin, farklı bakteri türlerinde biyofilm oluşumunu inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Sekonder metabolitler başta olmak üzere bitkilerden elde edilen bileşikler anti-biyofilm aktivitesi için önemli kaynaklardır. Yapılan bir çalışmada, *H. perforatum*'dan elde edilen etanolik ekstraktların antibakteriyel ve anti-biyofilm özellikleri *C. albicans*, *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı araştırılmıştır. Etanolik ekstraktların *S. aureus* biyofilmini %56,85 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir. Poliüretan malzeme ile birleştirildiğinde ise biyofilm oluşumunu %92,85 oranında inhibe etmiştir. Ayrıca ekstraktlar, *S. aureus*'a karşı güçlü bir inhibitör aktivite göstermesine rağmen, *C. albicans* ve *E. coli*'ye karşı herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir (Nazlı vd., 2019). *H. atomarium* Boiss'in metanol ve kloroform ekstraktlarının biyofilm oluşumunu araştırıldığı çalışmada metanol ekstraktı biyofilm oluşumunu %62 oranında inhibe ederken kloroform ekstraktı %52 oranında inhibisyon göstermiştir. Bu ekstraktların ana bileşenlerinin a-pinen, (+)-kateşin ve (-)-epikateşin olduğu belirtilmiştir (Önem vd., 2023). Başka bir çalışmada, *H. lydium*'un su ve etanol ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve MRSA izolatına karşı potansiyel antibakteriyel aktivitesi incelenmiş, antibakteriyel aktiviteye sahip ekstraktların biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Etanol ekstraktı MRSA

ve *S. aureus* biyofilmlerini inhibe etmiştir. Su ekstraktı ise test edilen bakteri suşlarına karşı herhangi bir etki göstermemiştir (Aygül & Şerbetçi, 2020). Yapılan çalışmalar ekstraktların *S.aureus* suşunda biyofilm oluşumunu inhibe edici etki gösterdiğini belirtmiştir.

Mevcut deney sonuçlarımız, *S. aureus* suşunda QS mekanizmasıyla düzenlenen biyofilm oluşumunun ekstraktların 500 mg/mL konsantrasyonunda kontrol grubuna göre inhibe edildiğini göstermiştir. En iyi inhibisyon etil asetat ekstraktında gözlenmiş ve biyofilm oluşumunu kontrole göre (%5 DMSO) %81,5 oranında anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir ($p<0.01$). Metanol ve su ekstraktları biyofilm oluşumunu kontrole göre (%3 DMSO) sırasıyla %37,7 ve %2,3 oranında inhibe etmiştir. Biyofilm oluşumunun inhibe olmasının nedeni ekstraktların, *S. aureus*'da biyofilm sentezi için QS yollarını engellemesinden dolayı olabilir. Bitki ekstraktları içerdikleri bileşikler sayesinde Agr ve LuxS sistemini inhibe etmiş ya da sinyal algılanmasını engelleyerek biyofilm oluşumunu baskılamış olabilir. Etil asetatla elde edilen bitki ekstraktları içerdiği bazı bileşikler nedeniyle anti-yapışma özelliğine sahip olabilir. Bu özellikler yüzeye bakteri yapışmasını engelleyerek biyofilm oluşumunun başlangıç aşamalarını önleyebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *H. salsolifolium* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan EA, MeOH ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal ve anti-QS aktivitelerini araştıran ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Antikanser aktivitenin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına karşı değerlendirilmesi sonucunda en iyi etki EA ekstraktında görülmüş bunu MeOH ekstraktı takip etmiştir. Sonuçlar bu ekstraktların kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyici bir etkisi olduğunu ve kanser tedavisinde umut verici bir terapötik yöntem olabileceğini göstermektedir. İleri çalışmalarda ekstraktların etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için moleküler düzeyde araştırmalar yapılabilir. Ekstraktların apoptotik yollara etkisi, hücre döngüsü ve metastaz inhibisyonu üzerine etkinliği değerlendirilebilir. Etkili ekstraktların toksik etkileri değerlendirilerek güvenli doz aralıkları belirlenebilir. Ayrıca farklı kanser hücre hatlarının ekstraktlar üzerindeki etkinliğinin incelenmesi, kanser tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesi açısından önemlidir.

Çalışılan konsantrasyonlarda, EA ekstraktının *B. subtilis* ve *S. aureus* suşları üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Antimikrobiyal analiz için daha kapsamlı bir tarama yaparak ekstraktların çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri incelenebilir. Ayrıca, etil asetat ekstraktının piyosiyanın pigment üretimi, elastaz üretimi ve swarming hareketi gibi quorum sensing (QS) sistemi ile regüle edilen diğer virülans faktörlerini inhibe etme yetenekleri araştırılabilir. Bu tür araştırmalar, ekstraktların QS mekanizmalarını nasıl etkilediğini daha iyi anlamamızı sağlayabilir. Bitki ekstraktlarının bakteri hücrelerindeki gen ifadesini nasıl etkilediğini belirlemek için transkriptomik analizler yapılabilir. Bu analizler bitki ekstraktlarının bakterilere karşı etki mekanizmalarını anlamak için önemlidir. Ekstraktların test edilen konsantrasyonlarda viyolasin pigment üretimini inhibe etmediği saptanmıştır. Sonuçlar, EA ekstraktının anti-biyofilm ajanları geliştirilmesi için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Etil asetat ekstraktı mevcut antibiyotikler ile kombinasyon halinde kullanılarak antibiyotik direncinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKÇA

- Abbas, A., Naqvi, S. A. R., Rasool, M. H., Noureen, A., Mubarik, M. S., & Tareen, R. B. (2021). Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial screening of seriphidium oliverianum plant extracts. Dose-response, 19(1), 15593258211004739.
- Agan, V., Koyuncu, I., Agan, F. Z., & Balos, M. M. (2023). Analysis of content profiles, antioxidant and anticancer properties in endemic Hypericum salsolifolium. *Applied Sciences* 2023, Vol. 13, Page 7300, 13(12), 7300. <https://doi.org/10.3390/APP13127300>
- Ahmed, A., Ahmad, A., Li, R., Waleed, A. A., Fatima, M., Mushtaq, B. S., ... & Bai, Z. (2021). Recent advances in synthetic, industrial and biological applications of violacein and its heterologous production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(11), 1465.
- Deveci, H. A., Nur, G., Ali Kırpık, M., Harmankaya, A., & Yıldız, Y. (2016). Fenolik bileşik içeren bitkisel antioksidanlar. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 26-32.
- Akgöz, Y. (2013). Derleme/Review Türkiye Florası'na Ait Hypericum L. cinsinin tehlike kategorileri ve bulunan yeni türleri. *Journal of The Institute of Natural & Applied Sciences*, 18(1), 62–69.
- Alkateeb, A., Akar, S., Çorum, O., Çelik Altunoğlu, Y., Baloğlu, M. C., Kiraz, M., Çöplü, N., & Tüfekci, E. F. (2020). Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of giant fennel (*Ferula elaeochytris* Korovin) from the Hatay region. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 36(3), 214–220. <https://doi.org/10.15312/EURASIANJVETSCI.2020.281>
- Altındal, D. (2019). Determination of genetic diversity of natural sage populations in Muğla region of Turkey. *International journal of environmental science and technology*, 16, 5219-5226.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., ... & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116.
- Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., ... & de la Lastra, J. M. P. (2023). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases*, 10(4), 1367-1401.
- Asan, H. S. (2021). Phenolic compound contents of hypericum species from Turkey. *Propagation and Genetic Manipulation of Plants*, 43-68.

- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Author, C. (2020). Anticancer activity of leaves extract of *Hypericum mysorense* L. ~ 172 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(6), 172–175. <https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i6c.12877>
- Aygül, A., & Şerbetçi, T. (2020). The antibacterial and antivirulent potential of *Hypericum lydium* against *Staphylococcus aureus*: Inhibition of growth, biofilm formation, and hemolytic activity. *European Journal of Integrative Medicine*, 35, 101061.
- Baqutayan, S. M. S. (2012). The effect of anxiety on breast cancer patients. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 34(2), 119–123. <https://doi.org/10.4103/0253-7176.101774>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.
- Berk, Ş., Kaya, S., Akkol, E. K., & Bardakçı, H. (2022). A comprehensive and current review on the role of flavonoids in lung cancer—Experimental and theoretical approaches. *Phytomedicine*, 98, 153938.
- Caldeira, G. I., Gouveia, L. P., Serrano, R., & Silva, O. D. (2022). *Hypericum* genus as a natural source for biologically active compounds. *Plants*, 11(19), 2509.
- Cesur, S., & Demiröz, A. P. (2013). Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 109(1007), 1-5.
- Çetinkaya, M., & Baran, Y. (2023). Therapeutic potential of luteolin on cancer. *Vaccines*, 11(3), 554.
- Chen, Q., Di, L., Zhang, Y., & Li, N. (2020). Chemical constituents with cytotoxic and anti-inflammatory activity in *Hypericum sampsonii* and the antitumor potential under the view of cancer-related inflammation. *Journal of ethnopharmacology*, 259, 112948.
- Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T., Chinedu Ikem, J., Victor Chigozie, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of clinical laboratory analysis*, 36(9), e24655.
- Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Pseudomonas methods and protocols*, 631-641.

- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü; apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.
- DeLisa, M. P., & Bentley, W. E. (2002). Bacterial autoinduction: looking outside the cell for new metabolic engineering targets. *Microbial Cell Factories*, 1, 1-9.
- Dulger, B. A. Ş. A. R. A. N., Gonuz, A. H. M. E. T., Bilen, S., & Jäger, A. K. (2005). Antimicrobial studies on three *Hypericum* species from Turkey. *South African Journal of Botany*, 71(1), 100-103.
- Dulger, G., & Dulger, B. (2014). Antifungal activity of *Hypericum havvae* against some medical *Candida* yeast and *Cryptococcus* species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 405-408.
- Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., & Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular medicine reports*, 5(6), 1453-1456.
- El Orfi, N., Boutayeb, S., Haddou Rahou, B., & Errihani, H. (2022). Use of medicinal plants by cancer patients under chemotherapy in the northwest of Morocco (Rabat area): cross-sectional study. *Journal of evidence-based integrative medicine*, 27, 2515690X221128036.
- El-Chaghaby, G. A., Mohammed, F. S., Rashad, S., Uysal, I., Koçer, O., Lekesiz, Ö., ... & Sevindik, M. (2024). Genus *Hypericum*: General Properties, Chemical Contents and Biological Activities. *Egyptian Journal of Botany*, 64(1), 1-26.
- Ergin, K. N., Karakaya, S., Göger, G., Sytar, O., Demirci, B., & Duman, H. (2022). Anatomical and phytochemical characteristics of different parts of *Hypericum scabrum* L. Extracts, essential oils, and their antimicrobial potential. *Molecules*, 27(4), 1228.
- Eroğlu Özkan, E., Özbek Çelik, B., & Mat, A. (2019). Antimicrobial activities of five endemic *Hypericum* species from Anatolia compared with *Hypericum perforatum*. <https://doi.org/10.12991/jrp.2018.115>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
- Fратиanni, F., Nazzaro, F., Marandino, A., Fusco, M. D. R., Coppola, R., De Feo, V., & De Martino, L. (2013). Biochemical composition, antimicrobial activities, and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *Hypericum connatum* Lam.(Guttiferae). *Journal of medicinal food*, 16(5), 454-459.

- Gambhir, S. S. (2008). Molecular imaging of cancer: from molecules to humans. Introduction. *J Nucl Med*, 49(2), 1S-4S.
- Ganji, A., Salehi, I., Sarihi, A., Shahidi, S., & Komaki, A. (2017). Effects of Hypericum Scabrum extract on anxiety and oxidative stress biomarkers in rats fed a long-term high-fat diet. *Metabolic brain disease*, 32, 503-511.
- Ghorbanpour, M., Hadian, J., Nikabadi, S., & Varma, A. (2017). Importance of medicinal and aromatic plants in human life. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_1
- Ginovyan, M., Petrosyan, M., & Trchounian, A. (2017). Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-017-1573-Y>
- Gogacz, M., Peszke, J., Natorka-Chomicka, D., Ruszała, M., & Dos Santos Szewczyk, K. (2023). Anticancer Effects of Propolis Extracts Obtained Using the Cold Separation Method on Breast Cancer Cell Lines. *Plants*, 12(4), 884.
- Gucalp, A., Traina, T. A., Eisner, J. R., Parker, J. S., Selitsky, S. R., Park, B. H., ... & Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 173, 37-48.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hasan, H. H., Husain, S. A., Sardar, A. S., & Hamasalih, R. M. (2023). Phylogenetic Relationships among some Species of the Genus Hypericum (Hypericaceae) in Kurdistan-Region Iraq. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 15(2), 24-31.
- Jain, N., Nitisa, D., Pirsko, V., & Cakstina, I. (2020). Selecting suitable reference genes for qPCR normalization: a comprehensive analysis in MCF-7 breast cancer cell line. *BMC Molecular and Cell Biology*, 21, 1-19.
- Jaradat, N. (2022). Qualitative, quantitative, cytotoxic, free radical scavenging, and antimicrobial characteristics of Hypericum lanuginosum from Palestine. *Molecules*, 27(14), 4574
- Javed, Z., Sadia, H., Iqbal, M. J., Shamas, S., Malik, K., Ahmed, R., ... & Sharifi-Rad, J. (2021). Apigenin role as cell-signaling pathways modulator: implications in cancer prevention and treatment. *Cancer Cell International*, 21, 1-11.
- Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists. *Journal of Breast Imaging*, 3(1), 12-24.
- Kakouri, E., Trigkas, P., Daferera, D., Skotti, E., Tarantilis, P. A., & Kanakis, C. (2023). Chemical characterization and antioxidant activity of nine Hypericum species from Greece. *Antioxidants*, 12(4), 899.
- Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'Tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., ... & Issad, T. (2013). O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen

receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PloS one*, 8(7), e69150.

- Karaca, M., Ince, A. G., & Elmasulu, S. (n.d.). Chemical compositions of volatile and nonvolatile secondary metabolites in thyme (*Theymus L.*). Retrieved December 23, 2023, from <https://www.researchgate.net/publication/366641993>
- Keser, S., Keser, F., Kaygili, O., Tekin, S., Demir, E., Turkoglu, I., ... & Kirbag, S. (2020). Phytochemical compounds and antiradical, antimicrobial, and cytotoxic activities of the extracts from *Hypericum scabrum L.* Flowers. *Natural product research*, 34(5), 714-719.
- Keskin, C. (2015). Antioxidant, anticancer and anticholinesterase activities of flower, fruit and seed extracts of *Hypericum amblysepalum HOCHST.* *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(7), 2763-2769.
- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12).
- Kiliç Altun, S. (2020). Phenolic Characterization of some propolis samples of Anatolia. *Araştırma Dergisi Journal of Bahri Dagdas Animal Research*, 9(2), 97–104.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/NU12020457>
- Kothari, V., Sharma, S., & Padia, D. (2017). Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(8), 744-752.
- Kumar, P., & Nath Tripathi, V. (2021). Quorum Sensing in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Chhattisgarh Journal of Science and Technology*, 18(2), 973–7219.
- Li, P., Yin, R., Cheng, J., & Lin, J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680.
- Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*, 19(1), 12.
- Lu, X., & Kang, Y. (2007). Organotropism of breast cancer metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(2–3), 153–162. <https://doi.org/10.1007/S10911-007-9047-3>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers*, 13(17), 4287.

- Ma, Y., Xu, Y., Yestrepky, B. D., Sorenson, R. J., Chen, M., Larsen, S. D., & Sun, H. (2012). Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation.
- Mahendrakumar, M., Nirmalraj, S., Ravikumar, M., Bharath, B., Seeni, S., & Perinbam, K. (2017). Pharmacognostic, Phytochemical and Physicochemical Investigations of *Hypericum hookerianum* Wight & Arn.(Hypericaceae) of Palni Hills, India. *Pharmacognosy Journal*, 9(6).
- Maleš, Ž., Brantner, A. H., Sović, K., Hazler Pilepić, K., & Plazibat, M. (2006). Comparative phytochemical and antimicrobial investigations of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (DC.) Gaudin. *Acta Pharmaceutica*, 56(3), 359-367.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310.
- Marčetić, M. D., Milenković, M. T., Lakušić, D. V., & Lakušić, B. S. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of *Hypericum aegypticum* subsp. *webbii* (Spach) N. Robson. *Chemistry & Biodiversity*, 13(4), 427–436.
- Matić, I. Z., Ergün, S., Đorđić Crnogorac, M., Misir, S., Aliyazicioğlu, Y., Damjanović, A., ... & Petrović, N. (2021). Cytotoxic activities of *Hypericum perforatum* L. extracts against 2D and 3D cancer cell models. *Cytotechnology*, 73, 373-389.
- Milosevic, T., Solujic-Sukdolak, S. L. A. V. I. C. A., & Sukdolak, S. (2007). In vitro study of ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. on growth and sporulation of some bacteria and fungi. *Turkish Journal of Biology*, 31(4), 237-241.
- Mir, M. A., & Din, I. M. U. (2023). Molecular Subtypes of Breast Cancer and CDK Dysregulation. In *Therapeutic potential of Cell Cycle Kinases in Breast Cancer* (pp. 133-148). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Mohammed, F., Rashid-Doubell, F., Taha, S., Cassidy, S., & Fredericks, S. (2020). Effects of curcumin complexes on MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation. *International journal of oncology*, 57(2), 445-455.
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 151-164.
- Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future journal of pharmaceutical sciences*, 7, 1-13.
- Nabeeh Jaafar, F., Ahmed AL-Bayati, M., Kareem Musafer, H., Abdul Azeez, M., Kareem Raheem, Z., & Author, C. (n.d.). Quorum sensing and its correlation with virulence factors. *South Asian Res J Pharm Sci*, 4(3), 60–69.

- Nakamura, H., & Maeda, H. (2023). Cancer Chemotherapy. *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* 401–427.
- Nazlı, O., Baygar, T., Dönmez, Ç. E. D., Dere, Ö., Uysal, A. İ., Aksözek, A., ... & Aktürk, S. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activity of polyurethane/*Hypericum perforatum* extract (PHPE) composite. *Bioorganic Chemistry*, 82, 224-228.
- Okyay, B. (2021). *Hypericum thymopsis Boiss. (Hypericaceae) Üzerinde Fitokimyasal ve Biyoaktivite Çalışmaları* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- Oon, Y. N., Chen, R. J., Kuan, J. M., & Sit, N. W. (2021). RESEARCH ARTICLE Bioactivity of medicinal plant extracts against human fungal pathogens and evaluation of toxicity using Vero cells. *Tropical Biomedicine*, 38(3), 469-475.
- Önem, E., Özaydın, A. G., & Sarısu, H. C. (2023). In vitro antibacterial-antibiofilm effect of *Hypericum atomarium* Boiss and chemical composition. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, e20412.
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., & Kariptaş, E. (2023). The determination, monitoring, molecular mechanisms and formation of biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 259-277.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2, 270-278.
- Park, M. Y., Kim, Y., Ha, S. E., Kim, H. H., Bhosale, P. B., Abusaliya, A., Jeong, S. H., & Kim, G. S. (2022). Function and application of flavonoids in the breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 7732, 23(14), 7732.
- Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2022). A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism. *Antibiotics*, 12(1), 12.
- Prazdnova, E. V., Gorovtsov, A. V., Vasilchenko, N. G., Kulikov, M. P., Statsenko, V. N., Bogdanova, A. A., ... & Chikindas, M. L. (2022). Quorum-sensing inhibition by Gram-positive bacteria. *Microorganisms*, 10(2), 350.
- Pringgenies, D., Sari, E., Widianigsih, W., & Nateewathana, A. (2021). Exploration of bioactive compounds potency of extract *Namanereis* SP. (Polychaeta: Annelida) as an antibacterial agent against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 26(3).
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in oncology*, 12, 985363.

- Raghu Chandrasekhar, H., Vasanth Raj, P., Venkata Rao, J., & Udupa, N. (2009). Anticancer activity of *Hypericum mysorens*. *2nd International Conference on Biomedical and Pharmaceutical Engineering, ICBPE 2009 - Conference Proceedings*.
- Rahman, N., Khan, H., Zia, A., Khan, A., Fakhri, S., Aschner, M., ... & Saso, L. (2021). Bcl-2 modulation in p53 signaling pathway by flavonoids: A potential strategy towards the treatment of cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11315.
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-18.
- Saddiqe, Z., Naeem, I., Hellio, C., Patel, A. V., & Abbas, G. (2020). Phytochemical profile, antioxidant and antibacterial activity of four *Hypericum* species from the UK. *South African Journal of Botany*, 133, 45-53.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*, 12(12), 3313.
- Shareef, M., Ashraf, M. A., & Sarfraz, M. (2016). Natural cures for breast cancer treatment. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(3), 233-240.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food research international*, 57, 176-195.
- Shuaib, M., Ali, A., Ali, M., Panda, B. P., & Ahmad, M. I. (2013). Antibacterial activity of resin rich plant extracts. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(4), 265-269.
- Simpson, M. G. (2010). Diversity and classification of flowering plants: eudicots. *Plant systematics*, 2010, 275-448.
- Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast cancer—epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers*, 14(10), 2569.
- Stéphane, F. F. Y., Jules, B. K. J., Batiha, G. E., Ali, I., & Bruno, L. N. (2021). Extraction of bioactive compounds from medicinal plants and herbs. *Nat Med Plants*.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

- Surmuş Asan, H. (2019). The Studies on The endemic Hypericum Species from Turkey. *Batman University Journal of Life Sciences Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9(2). 253-268.
- Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109821.
- Taşar, N., GEDİK, O., & KÜRŞAT, M. (2022). Türkiye’de Yayılış Gösteren Hypericum L. Cinsine Ait 3 Taksonun Uçucu Yağ Bileşenleri. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(2), 435-440.
- Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Türk, M., & Giray, E. S. (2020). Yıllık Pelinotunun (*Artemisia annua* L.) Kimyasal Kompozisyonu ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesinde Sub ve Süperkritik Akışkanların Etkisi. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 35(3), 631-646
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14.
- Van-Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8(1), 47.
- Wu, X., Wang, H., Xiong, J., Yang, G. X., Hu, J. F., Zhu, Q., & Chen, Z. (2024). *Staphylococcus aureus* biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics. *Biofilm*, 100175.
- Yang, J., Pi, C., & Wang, G. (2018). Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 699-707.
- Yi, L., Dong, X., Grenier, D., Wang, K., & Wang, Y. (2021). Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics. *Science of The Total Environment*, 763, 143031.
- Yılmazoğlu, E., Hasdemir, M., & Hasdemir, B. (2022). Recent Studies on Antioxidant, Antimicrobial, and Ethnobotanical Uses of *Hypericum perforatum* L.(Hypericaceae). *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 9(2), 373-394.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.
- YuV, A., OYu, S., & TYu, K. (2021). Ontogenesis, Biochemical composition, and biological Activity of *Hypericum scabrum* L. (Hypericaceae Juss.): An

Overview. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 12(2), 30–44.

