



**SATUREJA KHUZESTANICA METANOL, ETANOL ve SU
EKSTRELERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN ve BAZI
KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

HOSSEİN SOLTANZADEH

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2015

Hossein Soltanzadeh tarafından hazırlanan “*Satureja khuzestanica* metanol, etanol ve su ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan ve bazı kanser hücre hatları üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Leyla AÇIK

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Başkan : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Mecit VURAL

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

(Adı Soyadı)

(Tarih)

Satureja khuzestanica METANOL, ETANOL ve SU EKSTRELERİNİN
ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN ve BAZI KANSER HÜCRE HATLARI
ÜZERİNE SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Hossein SOLTANZADEH

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2015

ÖZET

Satureja khuzestanica İran'ın Loristan kentinde yayılım gösteren tek yıllık endemik bir türdür. *S. khuzestanica* İran'ın güney kesimlerinde analjezik ve antiseptik olarak kullanılmaktadır. Ana bileşeni karvakrol (93,9%), eugenol (1,0%), p-simen (0,8%) ve timol (0,6%)'dur. Karvakrol antioksidan özelliğe sahiptir. Bu tıbbi özelliklerinden dolayı cinsin birkaç üyesi alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. *S. khuzestanica* metanol ve etanol özütünün sekiz bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bitki özütleri hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı oldukça iyi antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Metanol özütü daha etkili bulunmuştur. Buna ek olarak, bitki özütleri, 2,2- difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivitesi için denenmiş ve metanol ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Özütlerin plazmit DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Metanol ve etanol özütünün konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak DNA'yı parçalama ve kesme şeklinde etkiler gösterdikleri bulunmuştur. Bitki özütünün sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile HeLa, MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre hattı üzerinde çalışılmıştır. *S. khuzestanica* metanol özütü konsantrasyona bağlı olarak iyi bir sitotoksik etki göstermiştir. Eş zamanlı PZR yöntemi ile Pro-apoptotik kaspaz-3, *Bax* ve *Bcl-2* anti-apoptotik gen ifadeleri incelenmiştir. MCF-7 hücre hattı üzerinde 12,5 µg/ml konsantrasyondaki etanol ve su özütünün apoptotik etkili olduğu tespit edilmiştir. Etanol özütü kanser hücre dizilerinden MCF-7'e en etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile bitkinin potansiyel antikanser aktivitesi olduğu belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.104

Anahtar Kelimeler : *S. khuzestanica*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, sitotoksik aktivite

Sayfa Adedi : 111

Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SATUREJA KHUZESTANICA
EXTRACT (METHANOL, ETHANOL, WATER) AND THEIR CYTOTOXIC AND
APOPTOTIC ACTIVITIES ON SOME CANCER CELL LINES

(Ph. D Thesis)

Hossein SOLTANZADEH

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

May 2015

ABSTRACT

Satureja khuzestanica is an endemic annual plant of Lorestan province, Iran. This plant has been employed as analgesic and antiseptic in the southern parts of Iran. The main components of the wild *S. khuzestanica* were carvacrol (93,9%) eugenol (1,0%) p-cymene (0,8%) and thymol (0.6%). Carvacrol has been found to have significant antioxidant properties. Because of these medical features, several members of this genus have been widely used in alternative medicine. Methanol and ethanol extracts of *S. khuzestanica* were screened for their antimicrobial activity against eight bacteria. Both plant extract showed good inhibitory activity against both gram negative and positive bacteria. The best inhibitory activity was observed with methanol extract. In addition, the plant extracts were tested for their antioxidant activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The methanol extract of *S. khuzestanica* had strong antioxidant activity. The interaction between the extracts and pBR322 plasmid DNA were analyzed by agarose gel electrophoresis. The extracts have strong effect on plasmid DNA, especially methanol extracts which the intensity and mobility of form I. In addition, the cytotoxic activity of the methanol and ethanol and water extract was evaluated on HeLa, MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma and Fibroblast cell line using MTT method, The methanol extract of *S. khuzestanica* showed good cytotoxicity which was concentration dependent. Gene expression of caspase-3, *Bax* (pro apoptotic) and *Bcl-2* (anti apoptotic) were investigated by real time PCR in cytotoxic extracts. According to the results, ethanol and water extract had apoptotic effect in MCF-7 cell line. As a consequence, it is detected that MCF-7 was the most sensitive cell line. This result indicated the potential anticancer activity of this plant.

Science Code : 203.1.104

Key Words : *S. khuzestanica*, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxic Activity

Page Number : 111

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

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

Tez savunma jürimde bulunarak tezin değerlendirilmesinde önemli katkılar sağlayan Sayın Prof. Dr. Sibel SÜMER ve Sayın Prof. Dr Mecit VURAL Sayın Prof.Dr. Güven URAZ Sayın Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU çok teşekkür ederim.

Tezimin konusu olan bitkinin toplanmasında ve teşhis edilmesinde yardımcı olan Sayın Prof.Dr Massoud HOUSHMAND Yard. Doç.Dr. Gholamreza Shahsavari çok teşekkür ederim.

Tez sürecimde ve laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Bil. Uzmanı Biyolog Yağmur ÖNER ve Sayın Yard. Doç.Dr. E.Burcu BALİ ve Sayın Araştırma Görevlisi Betül AYDIN, Betül ÇELİK ve Nageham BAYIN a çok teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Birincil ve İkincil Metabolitler	6
2.2.1. Fenolik bileşikler (Fenol karboksilik asitler)	6
2.2.2. Esansiyel yağlar ve monoterpenler	7
2.2.3. Terpenler	8
2.2.4. Timol ve karvakrol.....	9
2.3. Bitkiler ve Özellikleri	10
2.3.1. Kekik	10
2.3.2. Lamiaceae (Ballıbabagiller).....	13
2.3.3. Satureja	13
2.3.4. Bitkisel İlaçlar.....	15
2.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	16
2.5. Antioksidan Aktivite	16
2.5.1. Serbest radikaller	17

	Sayfa
2.5.2. Antioksidanlar ve antioksidatif etkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	17
2.6. Kanser	18
2.6.1. Kolorektal kanser.....	19
2.6.2. Meme kanseri	20
2.6.3. Osteosarkom.....	21
2.6.4. Serviks kanseri.....	23
2.7. Sitotoksosite	25
2.7.1. Toksikoloji ve toksisite	25
2.8. Apoptoz	26
2.8.1. Apoptozun oluşum mekanizmaları.....	28
2.8.2. Kaspaz 3 (CASP3).....	29
2.8.3. Kaspaz 8 (CASP8).....	30
2.8.4. <i>Bcl-2</i>	31
2.8.5. <i>Bax</i> ve <i>Bak</i> aktivasyonu	31
2.9. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki	32
2.10. İlaç-DNA Etkileşimi.....	33
3. MATERYAL METOT	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Bitki	35
3.1.2. Mikroorganizmalar	35
3.1.3. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	35
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	36
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	36
3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre line	38
3.2. Metot.....	38

	Sayfa
3.2.1. Bitki özütlerinin hazırlanması.....	38
3.2.2. Antimikrobiyal aktivitede kullanılan yöntemler	38
3.2.3. Antioksidan metodlar	39
3.2.4. Bitki özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	40
3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi	43
3.2.6. Hücre ölümünün propidyum iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi	44
3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi	44
3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi	44
3.2.9. Hoechst 33342, Propidiyum iyodür (PI) ile ikili boyama yöntemi	44
3.2.10. Protein izolasyonu.....	45
3.2.11. Western blot analizi	46
3.2.12. İstatistiksel analiz.....	49
3.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu	49
3.3.1. İzole edilen RNA'ların kontrolü	50
3.3.2. cDNA sentezinin yapılması	50
3.3.3. RT-PZR programı.....	51
3.3.4. Eş zamanlı PZR	51
3.4. Özüt-DNA Etkileşiminin Belirlenmesi	54
3.4.1. Agaroz jel elektroforezi.....	54
4. DENEYSEL BULGULAR	55
4.1. Özüt verimliği %	55
4.2. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Etkileri	55
4.2.1. Antimikrobiyal aktivite sonuçları	55
4.2.2. MİK (Minimum inhibisyon Konsantrasyonu) değerinin belirlenmesi	59
4.3. Antioksidan Metodlar	60
4.3.1. DPPH radikal giderme aktivitesi.....	60

	Sayfa
4.3.2. Toplam fenolik içerik miktar tayini.....	61
4.4. Bitki Özütlemlerin Sitotoksik Etkileri	63
4.4.1. Özütlemlerin Hela hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi.....	63
4.4.2. Özütlemlerle muamele edilen Hela dizilerinin sağ kalım eğrilerinin belirlenmesi.....	65
4.4.3. Özütlemlerin insan osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	66
4.4.4. Özütlemlerin insan DLD-1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	67
4.4.5. Özütlemlerin insan MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	68
4.4.6. Özütlemlerin insan fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	69
4.4.7. Özütlemlerin IC ₅₀ değerleri.....	70
4.5. Özütlemlerle Muamele Edilen HeLa Hücre Dizisinde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	72
4.5.1. Propidium iyodür (PI) boyama	72
4.5.2. Apoptotik etkinin DAPI boyama ile belirlenmesi	73
4.5.3. Apoptotik etkinin DiOC6 boyama ile belirlenmesi	75
4.5.4. Hoechst 33342, propidium iyodür (PI) ile ikili boyama yöntemi	78
4.6. Western Blotlama	80
4.7. Genlerin İfade Edilmesinin Eş Zamanlı PZR Ölçümü	81
4.8. Bitki Özütlemlerinin Plazmit DNA Üzerine Etkisi	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Bitkinin lokalitesi ve toplayıcısı	35
Çizelge 3.2. RT-PZR tepkime karışımı	51
Çizelge 3.3. Isı döngü cihazı programı	51
Çizelge 3.4. Eş zamanlı PZR karışımları	53
Çizelge 3.5. Eş zamanlı PZR programı	54
Çizelge 4.1. özütlerinin % verimleri	55
Çizelge 4.2. Bitki özütünün (25µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri	56
Çizelge 4.3. Bitki özütünün (50µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri	56
Çizelge 4.4. Bitki özütünün (100 µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri	57
Çizelge 4.5. Etanol ve methanol özütünün MİK değerleri	59
Çizelge 4.6. Özütlerle muamele edilmiş Fibroblast, MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 hücrelerin IC ₅₀ değerleri	70

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Apoptoza genel bir bakış	28
Şekil 2.2. Kaspaz aktivasyon yolları.....	29
Şekil 2.3. Kaspaz kaskadı	30
Şekil 3.1.Thoma lamı.....	42
Şekil 3.2. MTT'nin reaksiyon şeması	43
Şekil 4.1. Özütlerin DPPH süpürücü aktivitesi.....	61
Şekil 4.2. Gallik asit eğrisi	62
Şekil 4.3. Bitki özütlерinin fenolik içerik miktarları	62
Şekil 4.4. Hela hücre dizisinin metanol özütü ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen hücre canlılık oranı (%)	64
Şekil 4.5. Su özütü ile Hela hücre dizisinin 24 saat muamelesi sonucu oluşan hücre canlılık oranı.....	65
Şekil 4.6. Farklı özütlер ile muamele edilmiş (metanol, etanol ve su) Hela hücrelerinin Tripan mavisi uygulanması sonucu oluşturulan sağ kalım grafiğı.....	66
Şekil 4.7. Metanol, etanol ve su özütlерine maruz kalan Osteosarkoma hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	67
Şekil 4.8. Metanol, etanol ve su özütlерine maruz kalan DLD-1 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	68
Şekil 4.9. Metanol, etanol ve su özütlерine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı.....	69
Şekil 4.10. Metanol, etanol ve su özütlерine maruz kalan Fibroblast hücre dizisinin nispi hücre canlılığı	70
Şekil 4.11. Metanol, etanol ve su özütlерine maruz kalan MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre dizisinin nispi hücre canlılığı	72
Şekil 4.12. <i>Bax</i> /GAPDH geninin mRNA düzeyinde kantitatif ifadesi	81
Şekil 4.13. Kaspaz3/GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini	82
Şekil 4.14. <i>Bcl-2</i> /GAPDH geninin kantitatif ifadesi	82

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>S.khuzistanica</i>	14
Resim 4.1. Etanol özütünün (25 mg/ml) <i>B. subtilis</i> üzerine antimikrobiyal etkisi	58
Resim 4.2. Etanol özütünün (50 mg/ml) <i>B. subtilis</i> üzerine antimikrobiyal etkisi	58
Resim 4.3. Etanol özütünün (100mg/ml) <i>B. subtilis</i> üzerine antimikrobiyal etkisi	58
Resim 4.4. Etanol özütünün (25 mg/ml) <i>E. coli</i> 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi ...	59
Resim 4.5. Metanol özütünün (50 mg/ml) <i>E. coli</i> 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi	59
Resim 4.6. Metanol özütünün (100 mg/ml) <i>E. coli</i> 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi.....	59
Resim 4.7. Etanol özütünün (50 mg/ml) <i>C. albicans</i> üzerine antimikrobiyal etkisi	59
Resim 4.8. Hela hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür).....	73
Resim 4.9. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş Hela 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür)	73
Resim 4.10. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür).....	73
Resim 4.11. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür).....	73
Resim 4.12. Hela hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür).....	74
Resim 4.13. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş Hela 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür).....	74
Resim 4.14. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)	75

Resim	Sayfa
Resim 4.15. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)	75
Resim 4.16. Hela hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc ₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.)	76
Resim 4.17. <i>S. Khuzestanica</i> bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc ₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.).....	76
Resim 4.18. <i>S. Khuzestanica</i> bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc ₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür).....	77
Resim 4.19. <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc ₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür).....	77
Resim 4.20. Kontrol, <i>S. khuzestanica</i> su, metanol, etanol, özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri.....	78
Resim 4.21. Kontrol, <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin metanol, etanol, su, özütü ile muamele edilmiş MCF-7, osteosarkoma hücrelerinin ikili boyama 4x floresan mikroskop görüntüleri	79
Resim 4.22. Kontrol, <i>S. khuzestanica</i> bitkisinin metanol, etanol, su özütü ile muamele edilmiş DLD-1 ve Fibroblast hücrelerinin ikili boyama 4x floresan mikroskop görüntüleri	80
Resim 4.23. PARP protein bantlarının Western blotlama yöntemi ile gösterimi	80
Resim 4.24. (a) Metanol özütünün 24saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (b) Etanol özütünün 24 saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (c) Metanol Metanol özütünün 48saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (d) Etanol Metanol özütünün 48saat plazmit DNA üzerinde etkisi, Kontrol (K).....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

°C	Santigrat derece
A	Absorbans
g	Gram
H	Hidrojen
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
O	Oksijen
V	Volt
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DiOC6	3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilen Diamin Tetra asetik asit
HeLa	Serviks kanseri hücre dizisi
IC50	Hücre canlılığını %50 oranında azaltan derişim
MCF-7	Meme kanseri hücre dizisi

Kısaltmalar**Açıklamalar****MHA**

Mueller Hinton Agar

MİK

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları

MMP

Mitokondri membran potansiteli

MÖ

Milattan Önce

MTT

3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5difenil tetrazolyum

PI

Propidyum İyodür

SD

Standart sapma

SDA

Sabouroud Dextrose Agar

TAE

Tris asetat

TE

Tris-EDT

1. GİRİŞ

Türkiye, dünya bitki ticaretinde, Çin ve Hindistan'dan sonra üçüncü ülke durumundadır. Günümüzde fitoterapi, 19. ve 20. yüzyıllarda kimya ve biyokimya bilimlerindeki gelişmeler ile paralel olarak ilaç sanayiine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuvarlarda tıbbın gereksinimlerine yanıt veren pek çok ilaç geliştirilmiştir. Günümüzde eczanelerde satılan mevcut ilaçların 1/4'i bitkisel kökenlidir ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevleridir ve bunların birçoğunda bitkiden elde edilmek istenen etken madde, laboratuvar ortamında kopya edilmektedir. Çağımızda halk sağlığı için en önemli konulardan biri kanserden korunmadır. Yaklaşık yirmi yıldan beri doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bütün yapay maddeler toksik olarak bilinmektedir ve sağlam hücrelere ciddi zarar vermektedirler. Bu nedenle kanserden korunmak için ya da kemoterapi amacıyla doğal ürünlerin kullanımı kansere yakalanma sıklığını azaltabilir. Tıbbi bitkilerde bulunan, günlük alımla vücudumuza giren antioksidanlar, kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara bir alternatif olabilirler [1].

Kanser, dünyada en ölümcül hastalıklar sıralamasında kalp-damar hastalıklarından sonra gelmektedir. Tüm dünyada meme kanseri, akciğer kanserinden sonra ikinci en yaygın kanser türü olup, kanserden ölüm nedeni sıralamasında beşinci sırada gelmektedir. Günümüzde kanser başta olmak üzere pek çok hastalığa hala kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bu nedenle, tedavi amaçlı yeni yöntemler bulabilmek için son zamanlarda bitkilerde bulunan bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır [2].

Bu tez çalışmasında *Satureja khuzistanica* bitkisinin biyolojik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için bitkinin metanol, etanol ve su özütlerinin antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik etkileri ve plazmit DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Özütlerin 50, 100, 150 mg/ml'lik derişimlerde antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk yöntemi ve minimum inhibisyon konsantrasyonları, MİK yöntemi ile antioksidan etkileri 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivitesi ve fenolik içerik tayini Folin-Ciocalteu reaktifi ile araştırılmıştır. Özütlerin plazmit DNA üzerine etkileri agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Özütlerin sitotoksik etkileri meme kanseri (MCF-7)

ve serviks kanseri (HeLa), DLD-1, Osteosarkoma hücre dizilerinde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) yöntemiyle incelenmiştir. Hücre kültüründe yüksek sitotoksik etkili özütlerin kanser hücre dizileri üzerine farklı süredeki sağ kalımlarına bakılmıştır. Mevcut sitotoksik etkinin kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyip tetiklemediğini araştırmak amacıyla propidyum iyodür (PI), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)3',3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC6) ve İkili boyama floresan boyama yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca Eş zamanlı PZR yöntemi ile Pro-apoptotik *kaspaz-3*, *Bax* ve *Bcl-2* anti-apoptotik gen ifadeleri incelenmiştir. Bu sayede mevcut özütlerin kanser hücreleri üzerine sitotoksik olup olmadığı ve bu sitotoksitenin mekanizması belirlenmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tarihçe

Dünya üzerinde 750 000 -1 000 000 arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan 500 000 kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir. Tedavi maksadıyla kullanılan bitkilerin miktarı, antik çağdan beri, devamlı bir artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog miktarı 250 civarında idi. Grekler döneminde 600 kadar tıbbi bitki tanınıyordu. Arap Fars uygarlığı döneminde bu miktar 4 000 civarına kadar yükselmiştir [3].

Tarih öncesi dönemi: Anadolu insanı yontmataş (paleolitik) çağından (yaklaşık M.Ö.50 000 yılları) beri bitkileri tedavi maksadıyla kullanmaktadır. Hakkari'nin hemen güneyinde yer alan Şanidar mağarasından ortaya çıkartılan Neanderthal mezarlar içinde bulunan bitki örnekleri bu varsayımın sağlam kanıtlarıdır [4].

Mezopotamya uygarlığı: Sümer, Akat ve Asur Uygarlıklarını kapsar. İsa'dan önce 3000 yıllarına kadar uzanmaktadır. İlaçların mühim bir kısmı bitkisel droglar ile hazırlanmaktadır. Lapa, merhem, şurup gibi şekillerde rastlanmaktadır [4].

Hitit uygarlığı: Hititler MÖ 2000 yıllarında Orta Anadolu'ya yerleşerek bir uygarlık kurmuşlardır. Hitit tıbbi ve ilaçları hakkında bilgilerimiz Hitit devletinin baş şehri olan, Boğazköy (Hattuşas) da bulunmuş olan Hitit arşivindeki tabletlere dayanmaktadır. Genel kanı Mezopotamya tababetinde kayıtlı reçetelerde adamotu, badem banotu, buğday, defne, dişotu, hardal, haşhaş, üzüm gibi bir çok bitkisel drogun bir arada kullanıldığı yönündedir. Madensel maddelere az rastlanmaktadır. Her reçetenin sonu "böylece hasta iyi olacaktır " cümlesi ile tamamlanmaktadır [4].

Grek uygarlığı: Akdeniz'in doğu kıyıları ve adalarda oluşmuş bir uygarlıktır. Mezopotamya ve eski Mısır ile yakın ilişkileri bulunduğu anlaşılır. Bu dönemde tedavi ve bitkisel droglar hakkında çok önemli eserler yazılmıştır. Yüzlerce yıl Avrupa ve İslam Tebabetini etkilemiştir. O dönemde Hippocrate (M.Ö.460 – 377), Thephasraste (M.Ö.370 – 287) eserleri İstanbul ve Paris'te bulunmaktadır [3].

Mısır uygarlığı: İlaçlar ve tedavi ile ilgili papirusların en önemlisi MÖ 1550 yıllarında yazıldığı tahmin edilen Ebers Papirusu'dur. Bu belge Alman Gebers tarafından Teb'de Elassaifin mezarında bir mumyanın bacaklarında bulunmuştur. 110 sayfadan oluşan bu belge 700 kadar bitkisel ve madensel drog ve 800'den fazla reçete taşımaktadır. Bu bitkilerden bazıları; acımarul, adasoğanı, ardıç meyvesi, hardal, incir, kişniş ve nar kabuğudur [4].

Roma ve Bizans uygarlığı: Roma ve Bizans uygarlık dönemlerindeki tıp ve kullanılan bitkiler hakkında oldukça geniş bilgiler mevcuttur. Roma ve Bizans dönemlerinde bitkisel drogları toplayan, satan ve bunlardan ilaç veya kozmetik preperatlar hazırlayan bir çok meslek grupları bulunuyordu. Roma – Bizans döneminde tanınmış birçok hekim ve eczacı bulunmaktadır. Paris'te 17. yüzyılda eczacılık okulunda özel bir tören ile tiryak hazırlayan eczacılara dağıtılır. O dönemde yaşayan bir çok eczacının eserleri çeşitli müzelerde bulunmaktadır [4].

İslam uygarlığı: Müslümanlar tarafından ilk hastane Elvelit Bin Abdülmelik tarafından 706 yılında (Hicri 88) Şam'da kurulmuştur. Sonradan Mısır, Suriye, Irak ve Anadolu'da bir çok hastane kurulup çalışmaya açılmıştır. İslam tababeti geniş bir biçimde Hint hekimliğine dayanmaktadır. İslam hekimleri bilhassa Glenus'un kitaplarından yararlanmıştır. İslam hekimleri bitkisel droglar ile tedaviye çok önem vermişlerdir. İslam uygarlığı geldikten sonra Buruni, İbni Sina, İbni Baytar, El Gafiki, Davut Al-Antaki gibi büyük hekimler yetişmiştir. İbni Sina'nın tıp şaheseri, kısaca 'Kanun' diye bilinen kitabıdır. Eser fizyoloji, tedavi ve farmakoloji konularına ayrılmıştır. İbn-i Sina'nın 'Kanun'u 12. yüzyılda Latince'ye çevrildi ve Batı tıp alanında bir patlama tesiri yaptı. Paris Tıp Fakültesi kütüphanesinde bulunan 9 ana kitabın en başında İbn-i Sina'nın Kanun'u yer almıştır. Yazdığı tıbbi eserlerde bitkilerin hangi tür hastalıklara iyi geldiğini açıklamıştır [4].

Selçuklu uygarlığı: Anadolu Selçuklu uygarlık dönemi 1071 – 1308 yılları arasında iki yüzyıl sürmüştür. Bu kadar kısa sürede Anadolu'da büyük şehirlerde sağlık tesisi (Bimaristan Maristan, Darülaifiye ve Darüşifa) kurmuşlardır. Bu sağlık kuruluşları sağlam binaları, yeterli hekim, eczacı ve sağlık kadrosu olan tam teşekküllü hastaneler durumunda idiler. Selçuklular döneminde kullanılan bitkisel droglar ve ilaçlar hakkında özel araştırmalar bulunmaktadır [4].

Osmanlı İmparatorluğu: Osmanlı tababeti genellikle Selçuklu ve İslam tababetinin bir devamıdır. Osmanlı uygarlığı ilk dönemlerinde tıbbi bitkilerle ilgili en mühim kaynak İbni Baytar'ın eserinde Calinos, İbni Sina, İbni Baytar ve Razi gibi yazarların eserlerinden yararlanılarak Türkçe kitaplar önem kazanmıştır. Osmanlı padişahları bu işe çok önem vermiş ve bu dönemde yaşayan Evliya Çelebi gibi kişilerden faydalanılmıştır. 1909 yılında İstanbul Tıp Fakültesine bağlı olarak kurulan Eczacılık Okulunun öğretim programına bitkisel drogları öğretmek amacıyla "Farmekognozi" ismi altında bir ders konulmuştur. Hekimlerin kontrolü altında çalışan personel vakfiyelerde "Taba – 1 Eşribe" "Aşşab" gibi isimler verilmiştir. İlaç hazırlamak için kullanılan droglar ise aktar veya aktart denilen esnaf sınıfı tarafından satılmaktaydı. XVIII .y.y.' da bunların sayısının yalnız İstanbul'da beş yüz olduğu bilinmektedir. Bunlardan bir çoğu Mısır çarşısında çok geniş bir şekilde yer almakta idiler. Dünya harbi sıralarında kontroller belediye ve sağlık müdürlüğü tarafından sıklaştırılmış; Mısır Çarşısı gibi ilaç pazarları niteliğini tamamen kaybetmiş ve baharat çarşıları haline gelmişlerdir. İlaç yapımında hayvansal kökenli droglar, bitkisel kökenli olanlara oranla daha az kullanılmaktadır. Bu nedenle hayvansal droglar hakkında bilgi veren yayınlar çok azdır. Osmanlı İmparatorluğu döneminde insan sağlığı için kullanılan droglar, ilaçlar, aletler ve kitaplara ait örnekler ise 1962 yılında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi bünyesinde kurulmuş olan Türk Eczacılık Müzesi'nde bulunmaktadır [4].

Bitkilerden elde edilen ve günümüzde ilaç olarak kullanılan ikincil metabolitlerden taksol 1967 yılında Amerika Ulusal Kanseri Enstitüsü tarafından porsuk ağacından elde edilmiştir ve paclitaxelTM adıyla göğüs ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Salisin, söğüt ağacı kabuklarından elde edilen bir glikozittir. Alman kimyager Felix Hoffmann tarafından 1897 yılında medikal olarak kullanımı en kolay formu olan asetilsalisilik asit olarak sentezlenmiştir. Günümüzde ise aspirinTM romatizma tedavisinde ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Başta ağrı ve acı önleyici olmak üzere birçok medikal kullanımı olan morfin ise 1804 yılında Alman kimyager Friedrich Sertürner tarafından afyondan (haşhaş) elde edilmiştir. 1952 yılında ise Amerikalı kimyager Marshall D. Gates tarafından tümüyle sentezlenmiştir [5].

2.2. Birincil ve İkincil Metabolitler

Bitkilerde birincil metabolitler olarak adlandırılan ve proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler gibi bitkinin yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan temel makro moleküllerin dışında; organizmanın yaşamsal faaliyetleri için doğrudan gerekli olmayan ancak bitkinin büyüme, savunma, korunma gibi metabolik faaliyetlerini kontrol etme görevleri üstlenen ve organizma tarafından üretilen ikincil metabolitler de bulunmaktadır. Çoğu zehirli olan bu ikincil metabolitler; toplam kütlenin % 0,0001'ini (1ppm) oluştururlar ve elde edilmeleri oldukça zor bir süreçtir. İkincil metabolitler antioksidan, antimikrobiyal, antitümör, antienflamatuvar, sitotoksik gibi biyolojik etkinliklerden sorumlu moleküllerdir.

Fenolik bileşenler taşıdıkları hidroksi (-OH) grupları ile radikal süpürebilme yeteneklerinden dolayı antioksidan etkiden sorumlu moleküllerdir [6].

2.2.1. Fenolik bileşikler (Fenol karboksilik asitler)

C6-C1 iskeletinde fenolik halka ve asit fonksiyonel grubuna sahip organik bileşiklerdir [7].

Flavonoidler

Flavonoidler bitkiler tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin bir sınıfını oluştururlar. Flavonoidler bir fenil halkası ile substitüe olmuş bir 6-halkalıyla bitişik bir benzen halkası içeren (C6-C3-C6) konfigürasyonuna sahip 15 karbon atomu içeren difenilpropanlardır [7, 9].

Bu maddelerin milyar yıldır bitkiler aleminde var oldukları düşünülür 8000' den daha fazla flavonoid bileşiği vardır. Flavonoidler çiçekli bitkilere renk veren maddelerdir [8]. Flavonoidler bir kaç bitkisel olmayan kaynağa da sahiptirler. Satyridae, Lycaenidae ve Papilionidae familyalarındaki kelebeklerin kanat ve gövdelerindeki renkleri oluştururlar [7]. Flavonoidler aynı zamanda insan sağlığı üzerinde önem teşkil eden bileşenlerin en yaygın gruplarından birisidir [8]. Tıp alanında; iltihap önleyici, antialerjik, tümör oluşumunu önleyici, antiviral, şeker hastalığını önleyici, damar koruyucu, antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibe edici olarak kullanılmaktadır. Flavonoidler yapılarında 4 pozisyonda bir karbonil (C=O) ve 5. (ya da 3.) pozisyonda bir hidroksil (OH) grubu içerdiğinden metallerle kompleks yapma yeteneklerine sahiptirler. Metal iyonları ile

flavonoidlerin etkileşimi biyolojik olarak önemlidir [10]. Bu etkileşim flavonoidlerin bazı biyolojik ve antioksidan özelliklerini değiştirebilir. Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarak, sıcak asit ve enzimler ile aglikon ve şekere parçalanabilirler [11].

2.2.2. Esansiyel yağlar ve monoterpenler

Oda sıcaklığında sıvı halde olan bazen de donabilen, kokulu, uçucu, yağimsı karışımlara eterik yağlar (esans) adı verilir. Esansiyel yağlar, yüksek bitkilerde bulunan lipofilik sıvı ve genellikle terpenoid bileşiklerin karışımından oluşmuşlardır. Esansiyel yağların içinde günümüze kadar 3000'den fazla bileşik bulunduğu belirlenmiştir. Esansiyel yağlar bitkilerden mekanik presleme ya da buhar distilasyonu ile elde edilen ve bitkilerin koku ve diğer karakteristik özelliklerini taşıyan uçucu yağ sınıfındandır. Alternatif olarak özütlenip organik çözücü olarak kullanılabilir. Eterik yağlar olarak da adlandırılan esansiyel yağlar bitkinin çeşitli kısımlarından (çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, sürgün, kabuk, meyve ve kök) elde edilebilmektedir [12]. Şimdiye kadar 3000 kadar yağ bilinmekte ve bunların yaklaşık 300 tanesi ticari amaçla kullanılmaktadır Son zamanlarda esansiyel yağlar, bitki ekstraktları ve onların saflaştırılmış ya da sentez edilmiş bileşenleri gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı esansiyel yağlar antimikrobiyal özellikleriyle tanınmaktadır [12]. Antibakteriyal özelliklerinin yanı sıra esansiyel yağlar ve onların bileşikleri; antiviral antimitotik, antitoksijenik [13, 14]. Antiparazitik ve inseksidal özellikler içermektedirler [12]. Monoterpenler bitkilerden elde edilen kokulu karışımlar olan esansiyel yağların başlıca bileşenleridir. Bitkilerin bileşikleri olan monoterpenlerin birçoğu insanların besinlerinde bulunmakta ya da birçoğu besin olarak kullanılmaktadır [15].

Monoterpenler 10-C atomu içeren izoprenoid grubundandır. Esansiyel yağlar ve onların monoterpenoid bileşikleri kozmetikte parfümlerde, yiyecek ve içeceklerde tat verici olarak ve evde sıkça kullanılan deterjanlarda, sabunlarda, oda spreylerinde ve böcek ilaçlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar ve monoterpenler düşük konsantrasyonda kullanıldığında hoş koku ve tat verdiğinden çok eskiden beri bitkilerden elde edilir. Hatta bugün bile gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar ve monoterpenler lipofilik bileşiklerdir ve kolayca hücre membranından geçebilirler; bu sayede akciğer ve deride absorbe edilirler. Bu nedenle monoterpenler ve esansiyel yağlar uzun yıllar boyunca

tıpta göğüs üşütmelerinin tedavilerinde, kas ağrılarına karşı merhem ve kremlerde kullanılmaktadır [16]. Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle monoterpenler, etkili toksik olmayan, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler ve bu ajanlar yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler [17].

2.2.3. Terpenler

Terpenler, doğal ürünlerin en yaygın gruplarından biridir. Bitkilerde ve hayvanlarda birçok farklı işlevleri bulunurken, gıdalarda da aroma bileşenleri olarak önemlidirler. Örneğin turunçgiller, tarçın ve diğer baharat aromaları birkaç terpen ile karakterize edilir. Terpenler hücrelerde mikrozomal lipid peroksidasyonunu ve dokularda yoğunlaşmış oksidatif stresi önlemektedir. Limonen ve sitral (her ikisi de limonda bulunur), kamfur, pinen (çam ağaçları), eugenol (karanfil), anethol, timol, geraniol (gül) ve menthol en yaygın bilinen terpenlerdir. Kimyasal anlamda terpenler, yapısı çeşitli fakat belli sayıda izopren birimlerine sahip olan bir moleküller grubu olarak tanımlanır (methylbuta-1,3-diene, hemiterpen olarak isimlendirilen 5 karbonlu atomdur). Terpenlerin çoğu hidrokarbonlardır; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşiklerde olabilirler. Bu türevler çoğunlukla terpenoidler olarak adlandırılırlar. Mono- ve sesquiterpenler esansiyel yağların temel bileşenleridir [18].

Porsuk (*Taxus*) bitkisinin kabuğundan alınan ve düşük dozlarda kanser hastalığının tedavisinde kullanılan ilacın yapısında diterpenoitler bulunmaktadır. Söz konusu bu bitkisel ilaç taksol olarak bilinmekte ve rahim ve meme kanserinde kullanılmaktadır. Taksolun özelliği onun yapısında bulunan ve çok az bitkisel ilaçta rastlanabilen oksatan fragmenttir. Halızırda taksol yalnız porsuk bitkisinin kabuklarından değil, aynı zamanda biyoteknolojik yöntemlerle de üretilmektedir. Adi porsuk (*T. baccata*) bitkisinin kültür ortamında *in vitro* çoğaltmakla taksol üretici kallus hatları elde edilmiştir. Ferbol diterpenoid memeli hayvanlarda kanser hücrelerinin bölünmesini durdurur [19].

Aromatik özelliklerine göre terpenler

Aromatik maddeler, terpenlerden sonra uçucu yağlarda bulunan önemli bileşik grubudur. Benzen, propilbenzen veya p-simen yapısında olabilirler, asit, alkol, ester, aldehit, keton, fenol ve eter gibi organik fonksiyonel gruplar taşıyabilirler. Uçucu yağların tat ve koku açısından çok önemli, belirgin bazı fizyolojik etkilere sahip kısmını oluştururlar. Tat ve koku sanayinde önemli birçok bileşiğin sentezinde de kullanılırlar [19].

2.2.4. Timol ve karvakrol

Timol (2-isopropyl-5methylphenol), kekik bitkisinden elde edilen doğal bir antiseptiktir. Tıpta, tarımda, kozmetikte ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Timol, monoterpen grubu içerisinde sınıflandırılan bir bileşiktir. Genel olarak bir antimikrobiyal ajandır. Timol'un ağız bakterilerine karşı bakteriosit aktivitesi bulunması nedeniyle genellikle gargaralar da bulunur. Timol'ün kimyasal yapısına bakılarak bu bileşiğin amfipatik ve/veya hidrofobik davranışa sahip olduğu söylenebilir [20]. ATPaz, membran proteinlerinin aktivitesinde, membran geçirgenliğinde, timol etkili bir maddedir. Karvakrol [2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol], *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Cordodothymus* türlerinin de içinde bulunduğu Labiatae familyasının birçok esansiyel yağında bulunan fenolik bir monoterpendir. Yapılan çalışmalarda, karvakrol'un belirgin bir antioksidan, antibakteriyal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Karvakrol hücre membranını K^+ ve H^+ için geçirgen hale getirerek, proton hareket ettirici gücü yok etmekte ve ATP sentezini engellemektedir [21, 22]. Ayrıca insan larinks karsinoması kökenli Hep-2 hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve apoptotik fenotipi indüklediği belirlenmiştir. 60 μg 'ın üzerindeki dozlarda fare myoblast hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir. Timol ve karvakrol düşük konsantrasyonlarda insan besin maddelerinde bulunmaktadır. Karvakrol ve timol antiseptik özelliğe sahip olduklarından tarımda kozmetikte ve gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılırlar [23].

2.3. Bitkiler ve Özellikleri

2.3.1. Kekik

Çok yıllık odunsu bir bitkidir. Yaprakları küçük, gövdesi yatay, odunsu ve dikey dallıdır. Boyu 15–50 cm. kadardır. Çimenlik tarla kıyılarında, orman kıyılarında ve çayırlandaki karınca yuvalarının üstünde yer almaktan hoşlanır. Güneş ve sıcak istediği için, toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelerde çoğalır. Yaz aylarında pembe ya da beyaz renkli çiçekler açar. Dallar çiçek açtığı zaman toplanır. Küçük demetler halinde veya yere serilerek gölge ve havadar yerde kurutulur. Sonra kıyılır veya öğütülür. Akdeniz ülkelerindeki çorak topraklarda, kırlarda ve tepelerde doğal olarak yetişir. Türkiye’de kekik adı altında origanum (Mercanköşk türleri) elde edilen ilaçları satışı yapılmaktadır. Eterli uçucu yağ; Timol (%50 civarında), Karvakrol, Borneol, Cimol, Pimen, Tanen ve flavonlar içerdiği bilinmektedir [24]. Kekik önemli ihraç ürünlerimizden biridir. Türkiye dünya kekik ticaretinin yaklaşık %70’ini elinde tutmaktadır. Türkiye’de kekik olarak tanımlanan Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait pek çok hoş kokulu bitki türü bulunmasına rağmen, özellikle uçucu yağı karvakrol ve timol içeren türler kekik olarak kabul edilmektedir. Bu türler arasında Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra ve Coridothymus cinsleri hem yayılış olarak hem de ekonomik olarak büyük önem taşımaktadır [25].

Kekiğin genel kullanım şekli

Şifalı bitki olarak kekik halk arasında genel olarak kramp çözücü, dezenfekte edici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır. Akciğer ve bronşlar, mide ve bağırsaklar, kekiğin başlıca kullanım alanlarıdır [18].

Bitkinin önemli etken maddesi olan eterli uçucu yağlar kana karışıp, bronşiyal kasları etkileyerek, krampları çözücü özelliktedir. Aynı zamanda o bölgelerde bakteri oluşumunu da önler. Öksürük ve üst solunum yolları iltihabında çay içimi ve gargara biçiminde kullanılmaktadır. Kekik iştah açar ve sindirim sistemini uyarır. Sindirim sisteminde görülen ekşimeler ve kramplı ağrılar bir bardak kekik çayı ile geçiştirilebilir. Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve bağırsak hastalıklarına karşı, çay içiminin yanı sıra, kekik banyoları da çok yararlıdır. Güçsüz, zayıf ve solgun çocuklara da kekik banyosu yaptırılması önerilmektedir. Kekik çayı ile ayrıca adet kanamaları

dengelenmektedir. Adet zamanlarındaki kramplı ağrıları geçirilebilmektedir. Ergenlik sivilceleri iyileştirilebilmektedir [18].

Kekik çayı içimi ve kekikle karıştırılmış bal yenmesiyle organizma güçlendirilebilmektedir. Kekik tentürü ile ovmak suretiyle romatizmal ağrılar, sinirsel rahatsızlıklar tedavi edilebilir. Sıcak kekik yastıkları ağrılı bölgenin üstüne konularak büyük rahatlıklar sağlanabilir. Kekik, öksürük ve mide rahatsızlıklarına karşı başka bitkilerle karıştırılarak daha da başarılı biçimde kullanılabilir. Kekik vücuttaki yağları eritir, bu özelliğinden dolayı vücuttaki suyu atar. Hem kilo vermeye, hem de vücuttaki kan dolaşımını hızlandırdığından dolayı kalbe faydalıdır. Böbrek taşlarının düşürülmesine yardım eder. Adet düzensizliği ve damar sertliğinde de kullanılmaktadır. Kan şekerini düşürür. Salgı bezlerini uyarıp düzenli çalışmasını sağlar. Kekiğin çiçek sapı idrar söktürücüdür. Gaz giderici ve mide bulantısını teskin edici olarak kullanılır. Bağırsak parazitlerine karşı etkidir. Baş ağrılarına iyi gelir. Geçici olarak tansiyonu düşürür. Hafızayı kuvvetlendirir. Uykusuzluğa iyi gelir. Ağız antiseptiğidir. Diş ağrısını giderir. Çocuklarda kansızlığı önler. Egzama ve uyuz tedavisinde kullanılır. Sara krizlerine karşı da önerilir [24]. Antibiyotiğin 1940'larda keşfinden sonra, bitkisel maddelerin antimikrobiyal ajan olarak kullanımında düşüş gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite açısından bakteriyel ve fungal kaynaklı antibiyotiklere daha çok güvenildiği için bitkisel ürünlerin çok az bir kısmı antimikrobiyal madde olarak tercih edilmiştir [26]. Antimikrobiyal maddede olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olup çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok mikroorganizmaları seçmesi gerekmektedir. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir. Virüsler konak hücreye entegre olduklarından, konağa zarar vermeden virüsü etkilemek olanaksızdır. Virüslere etkili ilaçların seçici toksisitesinden hiç söz edilemez. Mantarlarda ökaryot hücre yapısındadır ve memeli hücrelerine benzerler. Bu nedenle antimikrobiyal maddeler için seçici toksisiteden söz edilemez [27]. Günümüzde enfeksiyon hastalıkları etken mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılık deneyi sonuçlarına göre, enfeksiyon etkeninin duyarlı bulunduğu en uygun antimikrobiyal madde ile tedavi edilir.

Türkiye'de benzer kokularından ötürü kekik adıyla bilinen çok fazla sayıda cins ve tür mevcuttur. Bunlar *Thymus* (57 takson), *Origanum* (23), *Satureja* (14 takson), *Thymbra* (4 takson) ve *Coridothymus* (1 tür) cinsidir [28]. Bu cinslerin ortak özellikleri uçucu yağlarının ana bileşenlerinin genellikle karvakrol veya timol ya da her ikisi olmasıdır. İnsanlar arasında yaygın olarak kullanılan, tarımı yapılan ve ticarete sunulan kekikler daha çok *Origanum*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Satureja* cinsleridir. Türkiye'de bu bitkilere ait tür sayısı çok fazladır. Endemizim oranı ise oldukça yüksektir. Örneğin *Origanum* cinsine ait 23 tür bulunmakta olup endemizim oranı ise % 65,2' dir. *Thymus* genusunun 60 taksona ait 39 türü bulunduğu ve endemizim oranının ise % 45 olduğu bildirilmektedir. Halk arasında kekik olarak adlandırılan bazı türler ise şunlardır: *Origanum onites*, *Origanum vulgare*, *Origanum syriacum*, *Origanum minutiflorum*, *Coridothymus capitatus*, *Thymbra spicata*, *Thymbra sintiensii*, *Satureja hortensis*, *Satureja montana*, *Thymus eigii*, *Thymus vulgaris*, *Thymus kotschyanus*, vb. dir. Tüm bu türlerin ortak özelliği yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşenin karvakrol veya timol olmasıdır. Bunlar kekiğin kendine özgü kokusunu veren maddelerdir [18, 27].

Kekik herbasi %2 ila % 8 oranında uçucu yağ içerir. karvakrol veya timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop ve mantar öldürücü özelliğe sahiptir. Bundan dolayı mantar ve bakteri enfeksiyonlarında etkilidir [14]. Kekikten uçucu yağ elde edildikten sonra yan ürün olarak ortaya çıkan yağ altı suyu ise kekik suyu adı altında piyasada satılmaktadır. Bu suyun mide ve bağırsak rahatsızlıklarında olumlu etki yaptığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği, safra miktarında artış sağlayarak sindirimi artırdığına yönelik görüşler bulunmaktadır. Kekik çay olarak kullanıldığında hazmettirici ve gaz giderici etki yaptığı, bileşimindeki fenolik asitler ve monoterpenik fenollerin antioksidan özellikte olduğu belirtilmektedir. Kekikten elde edilen karvakrolun güçlü ağrı kesici ve yara iyileştirici etkisinin olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Kekik baharat olarak, tıpta ve eczacılıkta rahatlatıcı, kan devrini düzenleyici, kansızlık, boğmaca, kellik, diş ve mide ağrılarında, uyuz, nefes kokması, lumbago, bağırsak, romatizma ile bazı kadın hastalıklarında, öksürük şurupları, pastil ve gargara terkiplerinde, gıdaların saklanması (doğal antioksidan), böcek ve yabancı ot, nematot ve virüslerin kontrolünde organik hayvancılıkta yemlerde doğal antibiyotik ve antihelmintik (parazit düşürücü) olarak kullanılabilir. Parfümeri ve kozmetik sanayinde Timol problemlili ciltlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde kekik türlerinden daha çok et yemeklerinde

baharat olarak da faydalanılmaktadır. Kekik'in ayrıca çevre düzenlemesinde süs bitkisi olarak kullanımı da mevcuttur [29].

2.3.2. Lamiaceae (Ballıbabagiller)

Çok yıllık bir bitki olan tıbbi adaçayının kökeni Akdeniz Bölgesi ve kıyısı olan Avrupa ülkeleridir. Lamiaceae familyasına ait bitkilerde gövde dört köşelidir. Yapraklar basit veya parçalı, dekusat dizilişlidir. Çiçekler braktelerin koltuğunda, sık kümeler halinde, her nodusta vertisillastrum durumundadır. Çiçekler erdişi, zigomorfdur. Brakteler yapraklardan farklı veya bunlara benzemektedir. Kaliks beş lobludur, çan şeklinde veya tüpsüdür. Korolla tabanda tüpsü, üstte iki dudaklıdır. Üst dudak iki, alt dudak üç lobludur. Stamen dört tanedir, bazen ikisi körelmiş, diğer iki tanesi verimli kalmıştır. Bu dört stamenden ikisinin filamentleri uzun, diğer iki tanesinin ise kısadır [30, 31].

2.3.3. Satureja

Satureja cinsi, İstanbul başta olmak üzere Sakarya, Zonguldak, Amasya, Samsun, Ankara, Nevşehir, Sivas, Erzincan, Adıyaman, Adana, Diyarbakır, Samsun, Tokat ve Erzurum illerinde yayılış göstermektedir. Bitki tek yıllık olup, gelişmiş yan dallara sahip ve 30–35 cm kadar boylanabilmektedir. Çiçeklerin rengi eflatun, morumsu ve beyazdır. Bitki doğada çoğunlukla kayalık ve erozyona maruz eğimli yerlerde görülmektedir [21]. Türkiye'de ticareti yapılan önemli kekik türlerinden biri de *Satureja* cinsine ait olan türlerdir. Bu türlerin populasyonlarının doğadaki durumları hakkında yeterli bilgiye sahip olmadığımız gibi, tarımı konusunda da yeterli bilgimiz bulunmamaktadır [32].

Satureja toplama zamanı bölgelere göre değişebilmekte, kimi bölgelerde çiçeklenmeden önce hasat yapılırken kimi bölgelerde de çiçeklenme sonrası hasat yapılabilmektedir. Ayrıca, toplama zamanı ve yayılışı lokal ve yıllık iklim şartlarına bağlı olarak da değişebilmektedir. Bununla birlikte, toplama işlemi genellikle Temmuz-Eylül aylarında yapılmaktadır [32].

Satureja Batı Asya ve Doğu Akdeniz bölgesinde yetişmekte olup, Anadolu, Türkmenistan, Kafkasya, Irak ve İran gibi coğrafyalarda da yayılış gösterir. İran'da bu bitkinin 14 türü vardır. Bunlar; *S. edmondi*, *S. bachtiarica*, *S. kallarica*, *S. sahandica*, *S. khuzestanica*, *S.*

isophylla, *S. intermedia*, *S. mutica*, *S. rechingeri*, *S. atropatana*, *S. boissieri*, *S. spicigera*, *S. macrantera*’dır. Bu 14 tür Kermanşah, İlam, İsfahan, Huzistan ve Lorestan bölgelerinde yetişmektedir. *S. khuzestanica* bitkisi, Dr. Ziba Jam tarafından 1994 yılında adlandırılmıştır [33]. Bu bitki yaygın olarak İran’ın güney kesimlerinde ve özellikle Zagros bölgesinde Huzistan ile Lorestan illerinde doğal bir şekilde büyümektedir. Bitki tek yıllık olup, gelişmiş yan dallara sahip ve 20– 35 cm kadar boylanabilmektedir. Çiçeklerin rengi, genellikle mavi ile mor ve beyaz olup bazen de pembe renktedir. Bitki yaprağı yumurta şeklinde olup eni geniştir ve yaprakları çapraz şekildedir. Kullanımı dünyanın pek çok yerinde tedavi amaçlıdır. Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında çiçek açmaktadır [30, 31].

Bu bitki, Huzistan ve Lorestan’ın dağlık alanlarında çatlamış kireçtaşlarının üzerinde ve dağların eteklerindeki tepelerde ve kayalık yamaçlarından toplanmıştır. Bitki Temmuz ayında Lorestan’ın dağlık alanlarında Doktora öğrencisi ile birlikte İranlı Prof.Dr. M.Hushmand ve Dr.R.Shahsavari tarafından toplanıp teşhis edilmiştir.

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Üsttakım: Lamiales

Familiya: Lamiaceae

Cins: Satureja

Tür: *S. khuzestanica*



Resim 2.1. *S.khuzistanica* (Foto; Reza SHAHSAVARI)

2.3.4. Bitkisel İlaçlar

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir araştırmaya göre dünya nüfusunun %70-80'inin temel sağlık hizmetleri uygulamalarında bitkisel ilaçlardan yararlandıkları, ürünleri kullandıkları söz konusudur [53].

Türkiye'de gittikçe artan bir şekilde çeşitli bitkilerin yapraklarından, çiçeklerinden, kabuklarından veya diğer kısımlarından farklı yöntemlerle elde edilen genelde sıvı şeklinde formlar, kanserden diyabete kadar, her türlü hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Çeşitli kaynaklar yanında, bitkilerden de oldukça fazla sayıda ve kanser tedavisinde kullanılan bazı antineoplastik ilaçlar da dâhil, çok önemli ilaçlar elde edilmektedir. Türkiye'nin bu açıdan bir avantajı, çok zengin bir flora (9 000'den fazla bitki türü) sahip olması ve ilaç elde edilebilecek bitkilerin yetişmesidir. Bitkilerden ilaç etken maddesinin elde edilmesinin ötesinde, zaman zaman etken maddeyi saf olarak değil, olası etken maddeyi de içeren bir karışım halinde veya bitkilerin alkol veya eterde eriyebilen kısımlarını içeren sıvı ilaç şeklinde (tentür) kullanılabilmeleri gündeme gelmektedir. Bitkisel ilacın elde edildiği bitkinin yetiştiği yer, mevsim koşulları, bitki yapraklarının veya diğer kısımlarının toplandığı mevsim gibi çok çeşitli faktör, bitkisel ilacın içindeki etken maddenin miktarını ve dolayısıyla etkililiğini değiştirebilmektedir. Bu gerekçeyle bu tür bitkisel ilaçların standardize edilmesi son derece önemlidir [53].

2.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde, hastalık etkeni mikroorganizmanın hangi antibiyotiklere duyarlı ya da dirençli olduğu antimikrobiyal aktivite deneyleri ile belirlenerek ve duyarlı olduğu en uygun antimikrobiyal madde kullanılarak tedavi edilir. Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı temelde iki farklı yöntem (Dilüsyon ve Difüzyon Yöntemi) ile belirlenebilir.

Antibiyotik duyarlılık testleri içinden en sık kullanılanlar:

1. Disk difüzyon testleri
2. Dilüsyon testleri Agar dilüsyon testleri (katı besiyerinde sulandırım testi)
Broth dilüsyon testleri a. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi b. Mikrodilüsyon testleri

3. Gradient strip testleri (E-test)
4. Otomatize yöntemler
5. Moleküler yöntemler

1) Dilüsyon Yöntemi: Bu teknik antimikrobiyal ilaçların MİK (minimal inhibitör konsantrasyonunu) ve MLK (minimal letal konsantrasyonlu) değerlerini belirlemede yardımcı olur. Bu amaçla, Mueller-Hinton buyyonunda antimikrobiyal ilacın 2 veya 10 katlı dilusyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta ilaç içeren seyreltmeleri elde edilir. Üzerlerine, izole edilen test mikroorganizmanın 24-48 saatlik sıvı besiyeri kültüründen 0,1 ml miktarında ekilir ve iyice karıştırıldıktan sonra 24-48 saat 37 °C' de inkube edilir. Tüplerdeki üreme gözle değerlendirilir. Böylece üremenin olmadığı son seyreltme MİK değeri olarak kabul edilir. Ancak, bu noktanın kesin olması için, testin ikili paralel yapılması uygundur. Eğer, süre yetersiz ise uygun bir süre yine inkubasyonda tutulabilir

2) Difüzyon Yöntemi: Kirby-Bauer yöntemi olarak da bilinen bu teknikte, test mikroorganizmanın 6-8 saatlik buyyon kültüründen (hafif bulanık) Mueller-Hinton agar plaklarına 0,1-0,2 ml miktarında ekilir ve bir baget'le iyice yayılır (steril swab'ta aynı amaç için kullanılabilir). Agarın yüzeyi oda sıcaklığında kuruduktan sonra (5-10 dk), agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonda değişik antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ve 24-48 saat inkube edilir. Bu sürenin sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonları kompas veya cetvelle ölçülür ve standart zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı (S), indermediate (İ) ve duyarsız (R) olarak değerlendirme yapılır. Disk difüzyon yöntemi az masraflı, az zahmetli ve kolay uygulanırlığı yanı sıra, bir petri kutusunda 5-6 antibiyotiğe karşı duyarlılığı belirlemek ve en etkili olan ilacı saptamak mümkündür. Bu nedenle çok fazla tercih edilmektedir [27].

2.5. Antioksidan Aktivite

Vücudumuzdaki biyomoleküller her gün oksijen gerektiren birçok reaksiyona uğrarlar. Bu reaksiyonların kaçınılmaz ürünü olarak serbest radikaller ortaya çıkar. Çok reaktif moleküller olan serbest radikaller hücre hasarlarına neden olurlar. Oksidasyon sonucu moleküllerin eşlenmemiş elektronlara bölünmesiyle serbest radikaller oluşur. Oksijen yaşam için metabolizma işlemlerinde gereklidir. Bu metabolizma işlemleri oksidasyon ve redüksiyon (moleküle elektronlar ekleyen kimyasal reaksiyon) kimyasal reaksiyonlarına

bağlıdır. Oksijenin zararlı etkilerinin gözlenmesine bir örnek dilimlenmiş bir elmanın havayla temas edince kahverengiye dönmesidir. Çevremizde bulunan oksitleyici ajanlar serbest radikallerle birleşip hücrelerimize zarar vererek yaşlanmaya ve kronik hastalıklara neden olurlar. Antioksidanlar serbest radikalleri zarar vermeden durdurabilir ve oksidatif reaksiyonları engelleyebilirler [34, 35].

Antioksidanların tek rolünün serbest radikalleri etkisiz hale getirmek olduğu sanılmaktadır. Gerçekte antioksidanlar ve radikaller yaşam biyokimyasının çoğunu etkilerler. Antioksidanlar biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin düzeyini regüle ederler. Böylece zarar vermeden yararlı biyolojik fonksiyonları yerine getirmeleri sağlanır. Kaçınılmaz olarak vücuttaki kritik moleküllere zarar verilir ve böylece hücre yaşamını sürdürmek için onarım sistemlerine gerek duyar [36].

2.5.1. Serbest radikaller

Biyolojik sistemlerin kendi içlerinde serbest radikal oluşumuna neden olan faktörler bulunmaktadır. Ancak bulundukları çevrede maruz kaldıkları kimyasal maddeler ve radyasyon gibi diğer faktörler de bulunur. Bir biyolojik sistem içerisinde sürekli olarak reaktif türlerin oluşmasına neden olan faktörlerin sistem üzerinde güçlü etkileri olabilir [37].

Moleküler oksijen, temel hücre fonksiyonlarında önemli görevler alan birincil biyolojik elektron alıcısıdır. Ancak oksijenin zararlı özellikleri süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit ve hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) elde olmayan nedenlerle oluşmasından kaynaklanır. Eğer azaltılmazsa ROS aerobik hücrelerin önemli bir tehlike kaynağı olabilir ya da ölümlerine neden olabilir. Serbest radikallerin oluşumunun önlenmesinden ve gideriminden antioksidan maddeler sorumludur [38].

2.5.2. Antioksidanlar ve antioksidatif etkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Antioksidanlar

Antioksidanlar iki gruba ayrılır

1- Enzimler

a) Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi b) Süperoksid dismutaz c) Katalaz d) Glutasyon-S-transferaz

2- Enzim olmayanlar

a) Lipid fazda bulunanlar - E vitamini (α -tokoferol) - β -karoten b) Sıvı fazda (Hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar. -C vitamini (Askorbik asit) -A vitamini (retinol) -Melatonin -Ürat -Sistein -Seruloplazmin -Trasferin -Laktoferrin -Miyogloblin [39].

Antioksidatif etkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Oksidasyona neden olan reaksiyonların önlenmesinde antioksidanlar kullanılmaktadır. Bazı bileşikler antioksidatif özelliğe sahiptir. Bir bileşiğin antioksidatif etkisinin belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları DPPH giderim aktivitesinin hesaplanması ve bileşiğin lipid peroksidasyonunu inhibe etme derecesinin saptanmasıdır. DPPH serbest kök bağlama yöntemi, lipid oksidasyonunu önleyen antioksidanlar için kabul edilmiş genel bir mekanizmadır. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığı zaman; bu yöntem, antioksidan aktivitelerin nisbi olarak kısa sürede belirlenmesini sağlamaktadır. Antioksidanların DPPH serbest kökünü bağlama aktivitelerinin, hidrojen (H) iyonu verme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir .

DPPH giderim aktivitesi deneylerin H iyonu verme kapasiteleri, stabil bir serbest kök olan DPPH maddesi kullanılarak araştırılmaktadır. H iyonu verme yatkınlığı olan bir bileşiğin varlığında DPPH kökü indirgenir ve stabil serbest kök formu oluşur. Çalışmanın esası; ortama verilmiş olan DPPH radikallerini süpürebilme yeteneğine dayanmaktadır [39].

2.6. Kanser

Kanser kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere tutulmaktadır. 60 yaşın üzerindeki grupta ise kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. En sık görülen kanserler erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar.

Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir. Kanserın tedavisi ve tanısı birçok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektirmektedir. Erken tanı önemlidir. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olup, onların arkasından kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler uygulanmaktadır. Kemoterapi sitotoksik ilaçlarla yapıldığı için özel bir ihtisas konusudur. Etkili dozlarda, fakat hastayı yan etkilerden koruyarak yapılması gereklidir. Önlemede karsinogenik (kansere yapıcı) maddelerden uzak durmak, temiz ve sağlıklı yaşamak ve uygun bir diyet uygulamak gibi hususlara uyulması kanser sıklığını rahatça yarıya indirebilmektedir [1].

2.6.1. Kolorektal kanser

Kolorektal kanser kolon veya rektumda gelişen kanserdir. Kolorektal kanserler, sıklığı toplumlara göre değişen ve kansere bağlı mortalite ve morbiditenin başta gelen nedenleri arasındadır. Erkeklerde prostat ve akciğer kanserleri, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı, gelişmekte olan ülkelere göre daha fazladır [2].

Kolorektal kanser riski yaşla artmaktadır. Kolorektal kanser 50 yaşından önce nadirdir fakat bu sınırdan sonra, insidansı önemli oranda artar. Genel olarak kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranı erkeklerde kadınlardan %35 daha fazladır. Hasta sayısı ve ölümleri popülasyonların yaşlanmasının ve genişlemesinin bir sonucu olarak hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere artmaktadır. Bu kanser için risk ülkeden ülkeye ve hatta ülkelerin içinde değişmektedir [40].

Histolojik olarak polipler neoplastik (adenom) ya da neoplastik olmayanlar olarak sınıflandırılır. Neoplastik olmayan poliplerin kötü huylu potansiyeli yoktur, neoplastik poliplerin ya da adenomların kötü huylu potansiyeli vardır. Adenomlar mutasyona uğramış epitelium kök hücrelerinin monoklonal türevleridirler. Genellikle, çoğu kolorektal kanserin (>%95) iyi huylu, neoplastik adenomatöz poliplerden (adenomlardan) ortaya

çıkıldığı kabul edilmektedir. Adenomatöz polipler bir veya daha fazla normal hücrenin çoğalmasındaki ve hücrenin olgunlaşma sürecindeki bir hatadan ortaya çıkmaktadır [41].

Coğrafya: Hastalığın dünyadaki dağılımı bölgeler arasında farklılıklar gösterir. Kuzey Amerika ve Yeni Zelanda'da sık görülmektedir. Afrika ve Orta Amerika'da daha az görülür.

Yaş: Kolorektal kanser görülme sıklığı 40 yaşından itibaren artar. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de 93-95 yılları arasında yapılan bir taramada 40 yaşın altındaki hastalarda kolorektal kanser görülme oranı %0,05-0,06 iken aynı oran 40-60 yaş arası %0.6- 0.8 ve 60-80 yaş arasında %3-4 olarak bulunmuştur.

Aile hikayesi ve genetik: Ailede kolorektal kanser bulunması bir diğer risk faktörüdür. Birinci derece bir akrabada kolorektal kanser bulunmasıyla risk 1.7 kat artarken, ikiden fazla kolorektal kanser bulunduğu risk 2,7 kat ve 45 yaş altı akrabalarda kolorektal kanser varlığında 5,3 kat artar.

Şişmanlık; yağdan zengin ve posalı yiyeceklerden fakir beslenme bilinen risk faktörleridir.

Kolorektal kanserle ilişkili diğer durumlar:

İnflamatuvar barsak hastalıklarında kolorektal kanser görülme sıklığı artar [42, 43].

2.6.2. Meme kanseri

Meme karsinomu, kadınlarda görülen en sık kanser türüdür. Her yıl görülen olgu sayıları göz önüne alındığında kuzey Amerika ve kuzey Avrupa ülkeleri ön sıralarda yer alırken, bu sırayı güney Avrupa ve Latin Amerika ülkeleri takip etmektedir. Asya ülkeleri ise bu sıralamada en son sıralarda yer almaktadır. Memenin duktal ve lobüler epitel hücrelerinin anormal kontrol edilemeyen proliferasyonudur. İnsan meme kanseri klonal bir hastalık olup; bir hücrenin somatik ve genetik mutasyona uğrayarak tamamen kontrolsüz çoğalma özelliği göstermesi sonucu oluşur. Meme kanserinin uzunca bir süre invaziv olmayan veya invaziv olduğu halde metastatik olmayan hastalık şeklinde kendini gösterme paterni bulunmaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 210 000 hastada meme kanseri tespit edilmekte olup, 41 000 hasta meme kanseri nedeniyle kaybedilmektedir. Yaşamı boyunca her yedi

kadınlardan birinde meme kanseri tespit edilmektedir. Kadınlardaki kanser vakalarının %32'sini ve kansere bağlı ölümlerin %15'ini meme kanseri oluşturur [44, 45].

Meme kanseri risk faktörleri

Meme kanserinin tam olarak nedeni bilinmemekle beraber genetik ve çevresel pek çok faktör belirlenmiştir. Bu faktörler; ailede meme kanseri öyküsü olması, endojen veya eksojen östrojen maruziyeti, diyet, yaş, meme lezyonu öyküsü, reproduktif öykü ve karsinojenlere maruziyettir. Meme kanseri vakalarının çoğu sporadik olmakla beraber yaklaşık %10 meme kanseri vakasında genetik predispozisyon saptanmıştır.(DNA tamir kontrolü ve hücre büyüme kontrolünde saptanan mutasyonlar gibi). Bunlar *BRCA- 1*, *BRCA-2*, *p53* tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ile daha nadir olarak *PTEN*, *CHEK 2*, *ATM* genlerindeki mutasyonlardır [45].

BRCA-1 geninin ürünü, hücre döngüsünü düzenleyen ve immünohistokimyasal yöntemler ile de gösterilebilen bir fosfoproteindir. *BRCA-1* mutasyonu saptanan meme kanseri olgularında, tümörlerin daha yüksek dereceli olma eğilimi gösterir [46].

Yaş ilerledikçe meme kanseri gelişme riski de artar. Bu risk özellikle 45-50 yaşın üzerindeki kadınlarda belirgin artış göstermektedir. 19 yaşındaki bir kadında meme kanseri gelişme riski 1/19,608 iken, 80 yaşındaki bir kadında bu risk 1/8 dir. Obesite pek çok kanserle özellikle meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca postmenapozal kadınlarda meme kanseri riski; artmış kilo alımı, BMI ve vücut yağ yüzdesi ile korele olarak saptanmıştır. Haftada 3-4 saat düzenli yapılan egzersizin, premenopozal ve post menopozal kadınlarda meme kanseri riskini %30-40 azalttığı gösterilmiştir. Alkolün artan miktarda alımının bu riskle doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir [44].

2.6.3. Osteosarkom

Kemik yapılarını üreten hücrelerden oluşan sarkomdur. Kemiğin en sık görülen primer kötü huylu tümörüdür. Çoğunlukla 20 yaşın altında ve daha çok diz çevresi ve kalçada görülür. Genellikle ilk belirtisi olan büyük bir ağrı ile başlar. Bu ağrı başlarda hafif dozdaki ağrı kesicilerle geçse de, hastalık ilerledikçe ağrılar artar ve hasta hastalıklı olan organını

kullanmada oldukça güçlük çekebilir. Radyografide, pek açık seçik olmayan, saman alevi denen yırtık görünüşte bir alan ve bir kemik zarı mahmuzu görülür [47].

Osteosarkom, genellikle hayatın ergenlik çağı sırasındaki ikinci on yılında ve yaşı artmasına paralel olarak daha sık görülmektedir. Osteosarkom bu nedenle 15 ile 19 yaş arasındaki gençlerde çocukluk ve gençlik çağında görülen kötü huylu hastalıkların büyük bir kısmını (%5'in üzerinde) oluşturmaktadır. Bu hastalık, kız çocuklarda 14 yaş, erkek çocuklarda ise 16 yaş civarında en sık görülür. Erkekler bu hastalığa kadınlardan daha sık yakalanır. Osteosarkomlar çoğunlukla kolların ve bacakların mafsala ilik taşıyan kemiklerinde (metafizler) oluşur. Tüm osteosarkomların % 50'sinden fazlası diz mafsalı bölge-sinde bulunmaktadır [47].

Osteosarkom, osteokondrom ve Ewing sarkoma tümörleri ile birlikte 20 yaş altında görülen en sık 3 tümördür. Bunlar içinde en sık görüleni osteosarkomdur. Osteokondrom ise 2. sıklıkta görülür, ancak iyi huylu bir tümördür. Ewing sarkoma tümörleri de osteosarkom gibi kötü huylu olup, ikisi beraber tüm çocukluk çağı kanserlerinin %6'sını oluşturur. Türkiye'de 15 yaş altında her yıl yaklaşık 150 yeni osteosarkom olgusu beklenmektedir. Pediatrik onkolojideki tüm gelişmelere karşın, osteosarkomdaki sağkalım hızlarında son 10 yılda belirgin değişiklik yoktur. Bu konudaki ilerleme cerrahi alanda daha fazla olmuş, geçen zamanla birlikte daha fazla sayıda hastaya ekstremitte koruyucu cerrahi uygulanmakta ve uzayabilen protezler gibi daha ideal protezler kullanılmaktadır. Tümörlü kemiğin ekstrakorporeal ışınlanarak tekrar yerine konulması gibi yeni yöntemler ise denenmektedir. Hastalık halen çocuk ve ergenlik yaş grubu içinde önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir [47].

Epidemiyoloji: Ergenlik döneminde görülme sıklığı doruğa ulaşan bu tümör, iskelet büyümesinin hızlı olduğu yaşlarda sıktır. Dolayısıyla ergenlik öncesi osteosarkom olguları daha az beklenmektedir. Hastalar genelde erkek çocuklar olup uzun boyludurlar. Osteosarkom, bilateral retinoblastomlu hastalarda da gözlenmektedir. Onüçüncü kromozomdaki *Rb* genindeki (tümör supresör gen, resesif onkogen) delesyonlar ve yeniden gen düzenlenmeleri osteosarkoma yol açabilir. Bir diğer resesif onkogen olan 17. kromozomdaki *p53* geninin germline mutasyon sonucu aktifliğinin giderilmesi (% 25) hastalığın gelişmesinden ve ilerlemesinden sorumlu tutulmuştur. Osteosarkom, ailesel kanser sendromu da denilen Li-Fraumeni sendromunda *p53*'ün etkilenmesine bağlı

görülebilmektedir. Bu sendromda ailede değişik bireylerde menapoz öncesi meme kanseri, beyin tümörü, yumuşak doku sarkomları, adrenokortikal karsinom, lösemi ortaya çıkmaktadır. Bunun dışında eşey olmayan *p53* ve *Rb* mutasyonları da gözlenebilmektedir. Çevresel etmenlerin osteosarkoma yol açabildiğine dair güçlü kanıtlar yoktur. Ancak kemiği ısıtılmış hastalarda ileri dönemde ikincil osteosarkomlar görülebilmektedir. Alkilleyici ilaçlar da nadiren osteosarkoma yol açabilmektedir. Paget hastalığı, osteokondrom, enkondrom, ekzostoz, fibröz displazi gibi bazı kemik lezyonlarında da osteosarkom görülme sıklığı artmış olarak bildirilmekle beraber pratikte ender rastlanan bir durumdur. Ülkemizde pediatrik onkoloji merkezlerince izlenen 443 osteosarkom olgusunun sadece % 1,5’u radyoterapi sonrası, %0,6’sı retinoblastom sonrası, % 0,2’si akut lenfoblastik lösemi sağaltımı sonrası görülmüştür. Osteosarkom, osteoid üreten bir tümördür. Anaplastik stromal hücrelerin ve onların ürettiği osteoid üretiminin gösterilmesi tanı koydurur. Klasik tip osteosarkom, osteoblastik (%50-78), kondroblastik (%4-25), fibroblastik (%4) olarak görülür. Bunun dışında telenjektazik (%1-4), küçük hücreli (<%1), osteoklasttan zengin (<%1), periosteal ve parosteal (%2) tipler de gözlenebilir [48].

2.6.4. Serviks kanseri

Dünya çapında bir sorun olan serviks kanserinden dünyanın her tarafında kadınlar rahatsızdır. Tarama programları, serviks kanserinin azalmasında önemli bir etkiye sahip olmasına rağmen hala kadınlar serviks kanseri nedeniyle ölmektedir. Serviks kanseri Türkiye’de en sık görülen 8. kanser türüdür. Serviks, enfeksiyonların rahme ulaşmasını engellemeye yardımcı, önemli bir bariyer görevi de görmektedir. Gebelik sırasında serviks, bebeği rahim (uterus) içinde tutmaya yardımcı olmak için sıkıca kapalı durumda kalır. Bebek doğmaya hazır olduğunda serviks yaklaşık 10 cm açılarak bebeğin geçmesine izin verir [49].

Serviks hücreleri anormalleşip kontrolsüz bir şekilde büyümeye başladığında serviks kanseri oluşmaktadır. Serviks kanserinin nedeni, insan papillomavirüsüdür (HPV). Yaklaşık 100 HPV tipi mevcuttur. Çoğu düşük riskli tipler olup ancak göz ardı edilebilir bir kısmı serviks kanserine yol açma riskine sahiptir. Ancak yüksek riskli tipleri serviks kanserine yol açabilen anormal hücrelerin gelişmesine neden olabilmektedir. Gerçekten serviks kanseri olgularının çoğuna iki tip HPV (HPV 16 ve 18) neden olmaktadır. Serviks kanseri olgularının aşağı yukarı % 70’inde bu iki tip bulunmuştur [50].

Risk Faktörleri: Bu faktörlerden kaçınmak mümkündür. HPV (human papilloma virüs insan papilloma virüs); 80 den fazla HPV virüsü serviks kanseri için risk faktörü oluşturmaktadır. Yaklaşık olarak 80 kadarı cinsel yolla bulaşarak serviksi enfekte eder. Bu enfeksiyonların yaklaşık yarısı, serviks kanseri ile ilişkilidir. HPV' in genital siğillerin %90' ına ve serviks kanserlerinin %70' ine neden olan iki tipine karşı bir aşı geliştirilmiştir. Bu aşının en az beş yıl süre ile HPV enfeksiyonlarına karşı koruma sağladığı kanıtlanmıştır. Korumanın ne kadar süreceği de halen araştırılmaktadır [51].

Cinsel Öykü; HPV esas olarak cinsel yolla bulaşmaktadır. Cinsel hayata erken başlayan ve çok partner değiştiren kadınlarda serviks kanseri riski artmaktadır. Doğum kontrol yöntemleri ya da spermleri öldüren jeller korunmada önerilebilir. 7 veya daha fazla hamilelik geçiren kadınlarda serviks kanseri riski fazladır [51].

Doğum Kontrol Hapları; 5 yıldan uzun süre doğum kontrol hapı kullanan kadınlarda da serviks kanseri riski artmaktadır. Tarama; Düzenli jinekolojik muayene ve Pap-smear testi serviks kanserinden korunmada yardımcıdır. Serviksdeki değişiklikler, Pap-smear testi ile tespit edilerek kanser gelişmeden tedavi edilebilir. Düzenli Pap-smear testi yaptırmayan kadınlarda serviks kanseri riski artmaktadır. Sigara içmek serviks kanseri riskini artırır. Bazı çalışmalar vitamin ve minerallerin serviks kanseri riskini azalttığını göstermekle birlikte bu henüz kanıtlanmamıştır. Serviks kanseri için risk faktörlerini bilmek onlardan kaçınmada ve korunmada da yardımcı olacaktır. HPV enfeksiyonu çok yaygın olduğundan ve her yaşta görülebileceğinden, cinsel olarak aktif olan kadınlar hayatları boyunca bu riskle karşı karşıya kalabilirler. HPV enfeksiyonları tüm dünya ile birlikte ülkemizde de artmaktadır. HPV'nin 100'ün üzerinde değişik tipi olmasına rağmen kanser yapan tipleri (sıklık sırasına göre) 16, 18, 45, 31 ve 33'dür. Tip 16 servikal kanserlerin % 60'ından sorumlu iken, tip 18 %15'inden sorumlu tutulmaktadır [52].

HPV taşıyıcılığında kişide hangi tipin olduğunu anlamak için bazı özel durumlarda "HPV tiplemesi" yapılabilir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda HPV tiplemesi önemli olup bu laboratuvar koşullarında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemle yapılmaktadır [50].

2.7. Sitotoksisite

2.7.1. Toksikoloji ve toksisite

Sözcük anlamı ile toksikoloji "zehir bilimi" demektir. Zehir ise "canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde" olarak tanımlanabilir. Ancak bugün bu tanım "modern toksikoloji"nin sınırını ve içeriğini belirlemede yetersiz görülmektedir. Zehirlerin kaynakları, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, canlı organizmada uğradığı değişim ve etki mekanizmaları, toksik dozları, zehirlenmelerin tedavileri, zehirlerin izolasyonu, nitel ve nicel analizleri, güvenceli kullanımı için risk analizleri ve standardizasyonlarının yapılması "modern toksikoloji"nin uğraş alanı içine girmektedir [54, 55].

Toksikoloji başlıca, organizmanın normal metabolizması için gerekli olmayan "yabancı kimyasal maddeler: ksenobiyotikler" ile ilgilenir. Ancak canlı organizma için endojen olan maddeler (hormonlar, bazı aminoasitler gibi veya vücut için gerekli ekzojen kaynaklı maddeler de: vitaminler, yemek tuzu gibi) yüksek dozlarda toksik etki gösterirler ve bu nedenle toksikolojinin araştırma alanına girerler [55].

Son yıllarda toksikoloji içinde biyokimyasal toksikoloji bir alt dal olarak ortaya çıkmıştır. Tüm toksikoloji bölümlerinin temelini oluşturan biyokimyasal toksikoloji, ksenobiyotiklerin organizmada uğradıkları değişimleri (absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımı), aktif ara metabolitlerini ve endojen makromoleküllerle etkileşmelerini moleküler düzeyde inceler [55].

Genel olarak kimyasal maddelerin biyolojik sistemlerdeki toksik etkileri, "normal toksik etkiler" ve "beklenmeyen" veya "anormal toksik etkiler" olmak üzere sınıflandırılabilir. Özellikle bu ayırma, ilaçlar açısından ele alınmıştır. İlaç, anormal fizyolojik fonksiyonu normal hale getirmek, bir semptomu düzeltmek veya bir enfeksiyonu ortadan kaldırmak için kullanılan kimyasal maddedir. Böylece belirli bir dozda, belirli bir etki için kullanılır. ilaçla zehir arasındaki nicel fark, doz ile ayrılmaktadır. Bu nedenle her ilacın bir toksik dozu vardır. Ayrıca, ilaçların istenen biyolojik etkiyi sağlamak için kullanılmaları sırasında, "istenmeyen toksik etkiler"i olabilir. Bu durumda ilacın kullanılması da sınırlı olur. İlaçların istenmeyen toksik etkileri farmakolojik ve toksik etkileri deney hayvanlarında incelenmektedir. Sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki edip

hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir. Sıklıkla bölünmekte olan hücreleri seçici olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için de kullanılır. Kemoterapi başarılı olduğunda etkisi en çabuk, önceden hızla bölünen hücrelerin bulunduğu kanserlerde ortaya çıkar. Aynı şekilde yan etkileri de en çok, genellikle çok çabuk bölünen normal hücrelerin bulunduğu doku ve organlarda belirgindir. Ne tüm antineoplastikler sitotoksiktir, ne de tüm sitotoksik bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır [56].

Sitotoksisite kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksisitenin karsinogenesis ve inflamasyonun da içinde bulunduğu patolojik işlemlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sitotoksisite serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir. Ayrıca sitotoksik deneylerle balık hücre hatlarını kullanarak farklı ağır metallerin ve organik bileşiklerin de içinde bulunduğu birçok çevresel kimyasalın sitotoksik etkisi de belirlenebilir [55, 56].

Sitotoksisitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirmesidir. *In vitro* testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir. Sitotoksisite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesini de belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksisite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler neutral red hücrelere deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücre metabolizmayı belirlemek için) ve hücre içi laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite deneyi (hücre lizisini belirlemek için) dir [55].

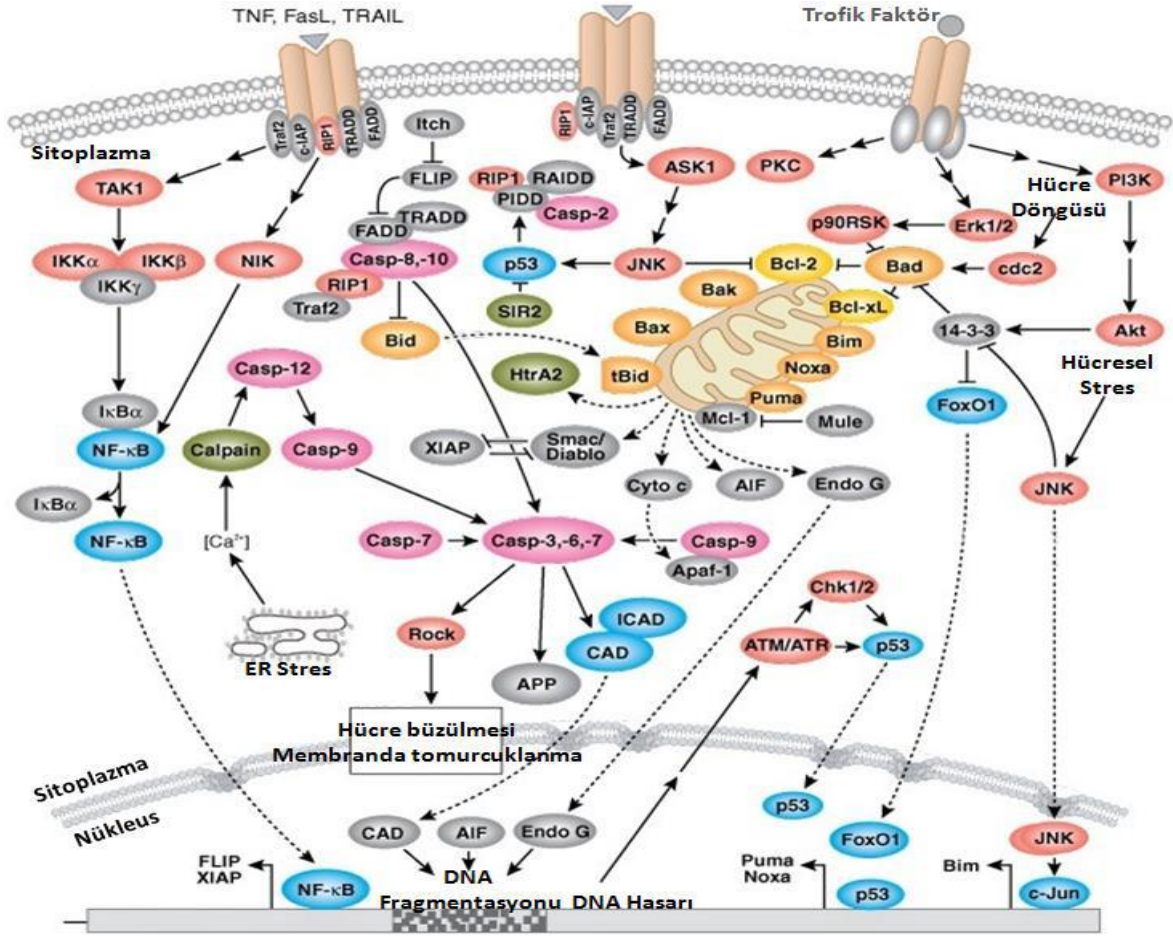
2.8. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de Kerr tarafından tanımlanmıştır. Nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şeklini, hücrenin fizyolojik ölümünü ifade etmek için

kullanılmıştır. Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Teorik olarak gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kontrollü ve programlı ölümü apoptoz olarak tanımlanır [57].

Apoptoz, normal gelişim sırasında ve erişkin organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında özgün hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirleyen bir parametre olduğundan, apoptozun işlevsel mekanizmaları da hücrede bir denge unsuru oluşturmaktadır. Apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artmaktadır. Aksine, eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalarak istenmeyen doku hasarı meydana gelmektedir. Günümüzde insanı da içeren memeliler grubunda üretkenliğin dengelenmesinde apoptozun önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Ayrıca birçok hastalığın genetiğinde de bu değişimler söz konusudur [58].

Apoptoz esnasında gözlenen genetik olaylar hem toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştiriyor olması, hem de bu işlemde tümör baskılayıcı genler ve onkoproteinlerin birlikte yer alıyor olması açısından önemlidir. Hücreyi apoptotik sürece götüren bu genetik olaylarda birçok faktör bulunmaktadır [59]. Şekil 2.1. bu faktörlere genel bir bakış sunmaktadır.



Şekil 2.1. Apoptoza genel bir bakış [57]

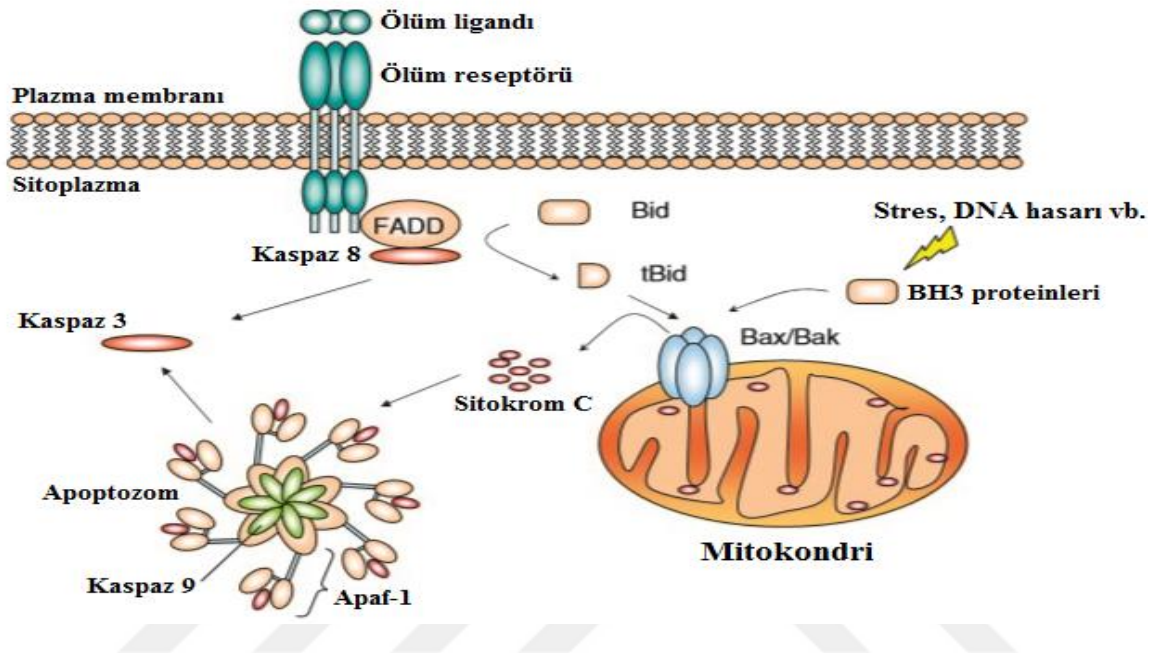
Apoptozun kontrolündeki bozukluklar karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Apoptotik sinyal, dış yolak olarak da bilinen, plazma membran reseptörleri aracılığı ile hücrenin dışından ya da iç veya mitokondriyal yolak olarak da bilinen hücrenin içinden köken alan stres nedeniyle başlatılabilir [60].

2.8.1. Apoptozun oluşum mekanizmaları

Apoptotik sinyal, dış yolak olarak da bilinen, plazma membran reseptörleri aracılığı ile hücrenin dışından ya da iç veya mitokondriyal yolak olarak da bilinen hücrenin içinden köken alan stres nedeniyle başlatılabilir. Dış apoptotik yolak doğrudan sistein aspartik proteazlar olan kaspazların aktivasyonunu tetiklediği zaman $TNF\alpha$ ya da CD95L/FASL gibi proapoptotik ligandların ölüm reseptör sinyallerini tetiklemesiyle ilişkilidir.

İç ve dış yolaklar birbirlerinden farklı olmasına rağmen, dış yolağın iç yolak boyunca apoptozu uyarması ya da tersi gibi birbirine karışan durumlar söz konusu olabilmektedir.

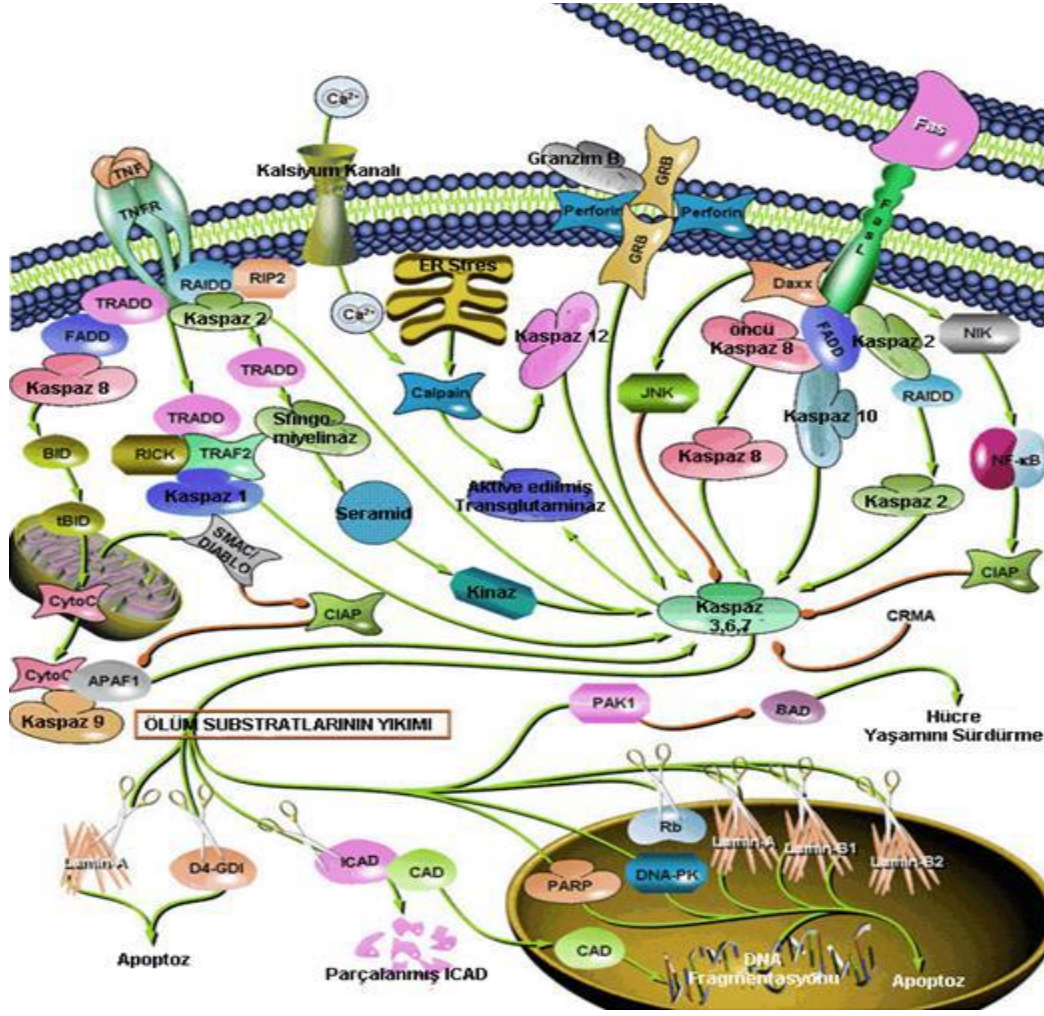
Bu durumda *Bcl-2* ailesi hücre kaderinin belirlenmesinde önemli kontrol noktasını oluşturur. *Bcl-2* anti-apoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir (Şekil 2.2). Kaspazlar, iç ve dış apoptotik yolların temel biyokimyasal efektörleridir ve kırılma ile aktive olurlar [61].



Şekil 2.2. Kaspaz aktivasyon yolları [62]

2.3.2. Kaspaz 3 (CASP3)

Büyüme faktörlerinin ortadan kalkması, hücre döngüsü ve metabolizmasının düzensizliği, hücre arası matriksin bozulması, DNA hasarı, patojenler, toksinler, oksidatif stres, nitrik oksit, hücreye özgü ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ve immünolojik işlemler gibi birçok sinyal yolağı apoptozu başlatabilir. Bu farklı uyarıcıların, ölümün kaçınılmaz fenotipinden sorumlu olan ortak bir hücre yolakta birleştiği düşünülmektedir [63]. Bu hipotezle tutarlı olarak, *Caenorhabditis elegans*'ın hücre ölüm geni *ced-3*'ün memeli homologu olarak tanımlanmış interlökin-1b enzimine işlevsel ve yapısal özellikleri ile benzeyen bir proteaz kaskadı ile ölümün apoptoz merkezli olduğunu doğrulanmıştır (Şekil 2.3). Bu kaskada, kaspaz (sistein aspartat-özgün proteaz) adı verilmektedir [64].



Şekil 2.3. Kaspaz kaskadı [64]

Aktif hale getirilen kaspaz, apoptoz sürecinde proteoliz ile DNA'nın parçalanmasına ve morfolojik değişikliklere katkıda bulunur. PARP içeren birkaç anahtar substratı baskılar. Kaspazların yeni tanımlanmış bir üyesi olan Kaspaz 3 aslında daha önce CPP32/Yama/Apopain olarak adlandırılmıştır. Kaspaz 3, *C. elegans*'da bulunan *ced-3* genine özgü substrata ve homoloji dizisine en yakın kaspazdır. Bununla birlikte kaspaz-3'ün çeşitli apoptotik sistemlerde genellikle en çok aktif edilen kaspaz olduğu gösterilmiş ve hücre ölümü işlemlerinde önemli bir rolü olduğu ileri sürülmüştür [65].

2.8.3. Kaspaz 8 (CASP8)

Apoptoz, mitokondri aracılı içsel bir yolak ya da ölüm reseptörlerinin aktivasyonu şeklinde dışsal bir yolak tarafından başlatılabilir. Ölüm reseptörleri aracılı yolak, reseptörlerin ligandı ile etkileşime girmesi ile uyarılır. Bunu sırasıyla, reseptörle ilişkili ölüm

bölgelerinin, kaspaz 8'in ve kaspaz 3'ün uyarımı izler. Daha sonra kaspaz 3, apoptoza yol açan çeşitli substratları parçalar. Buna karşılık, mitokondri aracılı yolda aktifleşmiş olan kaspaz 8, mitokondri zar geçirgenliğinin değişmesini uyarır. Böylece, Smac/Diablo ve sitokrom c mitokondriden serbest bırakılır. Sitozole çıkan sitokrom c, APAF1 ile birlikte kaspaz 9'u aktif hale getirir. Bu da kaspaz 3'ü aktifleştirir [66, 67]. Sitozole çıkmış olan Smac/Diablo, apoptoz protein ailesinin kaspaza bağlanmasını engelleyen inhibitör ile yarışarak kaspaz 9 aktivasyonunu uyarır Mitokondri aracılı apoptoz, mitokondri zar geçirgenliğini kontrol eden Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir [68].

2.8.4. *Bcl-2*

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (*Bax*, *Bad*, *Bid*, *Bcl-Xs*), bir kısmının ise inhibe ettiği (*Bcl-2*, *Bcl-Xl*) geniş bir ailedir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin proapoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin nisbi oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan *Bcl-2/Bax*'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik kötü huylularda prognostik değer taşıdığı belirtilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. *Bcl-2* ve *Bcl-XL* apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını doğrudan aktifleştiren sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir. *Bax* veya *Bak* gibi proapoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-c'yi serbestleştirirler dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açarlar [69]. Bir hücrenin apoptoza eğilimli olması heterodimer ya da homodimer formundaki *Bcl-2* ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. *Bcl-2* salgılanması sonucu *Bcl-2* homodimerleri şekillenir ve apoptoz inhibe edilir. Oysa aşırı *Bax* apoptozu aktifleştirir. Hücre içi apoptoz sinyalinin verilmesinde *Bcl-2* ile *Bax* proteinlerinin etkileşiminin önemli olduğu görülmüştür [70, 9].

2.8.5. *Bax* ve *Bak* aktivasyonu

Apoptotik uyarı akabinde temel olarak *Bax* ve *Bak* ifade edilir ve *MOMP* uyarılır. Dolayısıyla *Bax* ve *Bak* normal hücrelerde aktif değildir. *Bax* proteinleri, sitozolde monomerler şeklinde bulunurlar ve aktif olmadıkları sürece mitokondri dışı membran ile ilişkileri minimal düzeydedir. *Bax*, aktivasyon sürecinde mitokondriyal dışı membranına

geçer olur. Sonucunda, sitokrom c gibi proapoptotik faktörler mitokondri iç membranından sitozole salınır ve apoptozom oluşumunu takiben kaspaz yolunun aktifleşmesi gerçekleşir. Bak, aktif olmadığı durumlarda bile mitokondriyal dış membranda konumlanabilir. Belli bazı BH3 proteinlerin aktivasyonu, Bax ve Bak'ın oligomerize olmaları ve sonrasında mitokondri dış membranına kararlı şekilde konumlanmaları için gereklidir [71, 72].

2.9. Apoptoz ve Kanser Arasındaki İlişki

Apoptoz ve kanser arasında ters orantılı bir ilişki vardır yani apoptoz kanser hücrelerinin zararına ve organizmanın yararına çalışır. Bir hücrenin DNA'sında oluşan hasar, tamir mekanizmaları ile düzeltilemezse, hasarlı hücre güvenli bir şekilde genetik kontrol mekanizmalarının öncülüğünde yok edilir [73]. Fakat genetik kontrol mekanizmalarını oluşturan proteinlerde (özellikle p53, Rb gibi hücrelerin tamir ve ölüm programlarını yöneten) bir hasar oluştuğunda, hücre apoptoza gidemez ve hasarlı bir şekilde bölünür. Aşırı bölünen bu hücreler neoplazik oluşumun başlangıcını tetikler ve kanser başlar. Kanser hücreleri, apoptoz karşıtı olan *bcl-2*, *c-myc* gibi sağkalım genlerini aşırı derecede ifade ederek ölüme neden olan genleri baskırlarlar [74]. Survivin ve bcl-2 proteinlerinin aşırı ifadeleri tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Survivin'in aşırı ifade düzeyleri nöroblastom ve kolon kanserlerinde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Bazı B hücre lösemileri ve lenfomaları, prostat tümörleri ve nöroblastomlarda Bcl-2 proteinini aşırı düzeyde ifade ederler. Alınması gereken ölüm sinyalleri de böylece önlenir. Çoğunlukla *Bcl-2* geni immunoglobulinin ağır zincir bölgesinin enhancer kısmına birleşir ve translokasyonunu (14 ve 18 kromozomlarda) meydana getirir [56].

Melanoma hücreleri de Apaf-1 geninin ifadesini inhibe ederek apoptozdan kaçarak [75]. Akciğer ve kolon kanser hücreleri ortama çok fazla Fas liganda bağlanan çözünür "decoy" moleküller salgılar, böylece Fas-ligandın Fas proteinine bağlanması engellenmiş olur. Böylece, sitotoksik T-hücreleri kanser hücrelerini öldüremezler [56]. AML hücrelerinde Bcl-2 proteini *c-myc* ile birlikte aşırı artar ve apoptoz oluşumunu önleyerek aşırı hücre çoğalmasını tetikler. Aşırı *Bcl-2* artışı kemoterapiye de direnç göstermekte, lösemik hücrelerin ölümünü engellemektedir. Steroid, glukortikoid (GC) reseptörleri aracılığıyla çekirdek içine girerek ölüm ve farklılaşma mekanizmalarını düzenleyen genlerin aktivasyonunda rol almaktadır [76].

2.10. İlaç-DNA Etkileşimi

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. DNA'yı bağlayan ligandlarla ilişkili etkileşimlerin çeşitli tipleri vardır. Bunlar interkalasyon, kovalent olmayan oluk bağlanma, kovalent bağlama veya çapraz bağlama, DNA'yı kesme ve nükleozit analog birleşmeyi içerir. Bu bağlanma etkileşimlerinin sonuçları, kompleks oluşumu düzenlemek için hem DNA hem de ilaç moleküllerinde değişikliklere yol açar. Çoğu durumda, DNA sarmal yapısındaki değişiklikler, değişmiş termodinamik kararlılık ile sonuçlanır ve DNA'nın işlevsel özelliklerinde değişikliklere sebep olur. Çoğu antitümör ilacı da hedef hücresindeki DNA'ya zarar vererek işlev yapar, yani doğrudan DNA'ya bağlanır ve DNA hasarına neden olur. Bu şekilde DNA kalıbı işlevine engel olabilir, replikasyonu ve DNA sentezini inhibe edebilir. Ayrıca klinik olarak kullanılan birçok antikanser ilacı DNA'ya interkalasyon prosesi ile bağlanmaktadır. Son birkaç yıldır, interkalasyon yapan floresans moleküller oldukça önem kazanmış olup kanser tedavisinde kemoterapi ilacı; biyofiziksel kimya ve moleküler biyolojide floresans uç ve sensör; DNA bozunma reaksiyonlarında fotosensetizer ve floresans lekeleyici olarak kullanılmaktadır. DNA'ya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanan floresans interkalatörler tümör hücrelerinin etrafında seçici olarak toplanıp tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir. İnterkalasyon tipik olarak DNA'nın yapısal bozulmasıyla sonuçlanır ki bu da antikanser etkisini göstermesine neden olmaktadır [77].

Çoğu interkalatör 2-4 baz çifti ile etkileşmektedir ve dizin seçimli interkalasyonla beraber hücrede seçimli bir toksisiteye sahiptir. İnterkalasyonun başka tür DNA bağlanma türleri ile kombine edilmesi veya sentezlenen moleküllerin sahip olacağı enzim inhibisyonu (Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II) özellikleri ile DNA interkalatörlerinin kullanımındaki bu sınırlamanın üstesinden gelinebilir. Örneğin interkalatörün aynı zamanda bir topoizomeraz inhibitörü olduğu yapılar kanserli hücrenin çoğalmasını farklı iki açıdan engellemeyi hedeflemektedir. Mitoxantrone, daunorubicin, doxorubicin, dactinomycin gibi sıklıkla kullanılan antikanser ajanlarının etki mekanizmalarından biri de interkalasyon yapmalarıdır. Bu bileşiklerin topoizomeraz II enzimi üzerinde etkili olarak ya da singlet oksijen üreterek de DNA'ya zarar verdiği bilinmektedir. Bunun dışında yine sıklıkla kemoterapi ajanı olarak kullanılan bleomycin, bakteriden izole edilen bir

glikopeptit antibiyotik olup, yapıda bir interkelasyon bölgesi içermekte ve bununla DNA'ya bağlanmaktadır [77].



3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki

Çalışmada kullanılan *Satureja khuzestanica* lokalite ve toplama tarihi, toplayıcı adı, teşhisi ve sistematigi ile birlikte Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bitkinin lokalitesi ve toplayıcısı

Bitki ismi	Lokalite -Toplama Tarihi	Toplayıcı Adı	Teşhisi ve sistematigi
<i>Satureja khuzestanica</i>	Khuzestan ve Lorestan 20.07.2011	Dr. R. Shahsavari	Dr. R. Shahsavari

3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları (8 bakteri türü ve 2 maya türü) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden temin edilmiştir. Araştırmada *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853) ve 2 adet maya *Candida tropicalis* (ATCC13803), *Candida albicans* Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden ve *Bacillus cereus* (NRL B-3711) Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

12 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 6 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte (İsviçre), 75cm² hücre büyütme kapları (hücre kültürü için) TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 96 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), Etüv Heraus Thermo Electron Company Model: Hera cell 150, Hemostometr Hausser. (Bright-Line, Neubauer Model, 0,1mm derinlikli), Laminar flow HeraSafe Model: 12469 2000. 2. dereceden güvenlik kabin, pipetler Ratiolab (Accupetta), pipet uçları CAPP, Petri kapları (100x20 mm) TPP (Zellkultur Schalen) (İsviçre), Serolojik

pipetler (5ml) TPP, serolojik pipetler (10ml), şırınga filtreleri (0,22 µm) TPP, 5-10-25 cc Şırıngalar, Set Inject, santrifüj Model 5417R Eppendorf, trypsin-edta Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek Israel), Blender (Siemens), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (Beko), terazi (Scaltech), hassas terazi (Sartorius), mikrodalga fırını (Vestel), DNA görüntüleme sistemi (Biometra), rotaevaporotör (Buchi), manyetik karıştırıcı, kar makinesi (Hoshizaki), dikey elektroforez, güç kaynağı (Consort EV 233), sıvı azot kapları, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (ELx808- IU) (Bio-Tek), inverted mikroskop (Olympus), ısıtmalı karıştırıcı, mikrosantrifüj (Beckman Counter), vorteks, çalkalayıcı, membran filtreleri, beher, baget, balon joje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, steril cerrahi eldiven, buzdolabı (+4°C) ve dondurucular (-20oC ve -80oC).

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Antimikrobiyal aktivite için kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler; Mueller Hinton Agar (Merck), Nutrient Broth (Merck), Saboroud Dekstroz Broth (Merck) Saboroud Dekstroz Agar (Merck), NaCl (Merck), %0,9 serum fizyolojik, distile su, DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma), Etanol (Merck) ve Metanol (Sigma) kullanılır. Antioksidan aktivite için kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler; etanol, metanol, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma), Folin-ciocalteu Reaktifi (Merk), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Demir III Klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), Trikloroasetikasit (TCA), Fosfat tamponu, distile su, Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) (Sigma), α - tokoferol (Sigma), askorbik asit (Sigma) ve gallik asit kullanılır(Sigma). Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma), RPMI-1640 besiyeri (içeriği L-glutamine, 2.0g L NaHCO_3) (Pan Biotech GmbH), Fetal Bovine Serum (GIBCO) Fosfat Tampon Çözeltisi(10X)(Sigma), MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyu bromür), tripan mavisi (Merk),isopropanol (Merk).

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Akrilamid (%30): Akrilamid (29,2g) ve bis-akrilamid (0,8g) 100 ml distile suda çözüldü. Çözelti 4°C de saklandı.

Amonyum persülfat (APS)(%10): 0,1g APS 0,9 ml distile suda çözüldü. 4°C de en fazla 1 hafta saklandı.

Askorbik Asit (AA): 0,01 gram AA 10ml metanol içinde çözülerek hazırlandı.

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

DPPH: 0,004 gram DPPH tartıldı ve 100 ml metanol içinde çözüldü. Karanlıkta muhafaza edilerek +4°C de en fazla bir hafta saklandı. Bir hafta sonunda çözelti tekrar hazırlandı.

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

MTT: 100 mg MTT, 20ml PBS içerisinde çözüldü. Çözelti 0,20 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve deneyde kullanılmak üzere ependorfla bölündü. Bu haliyle -20°C de karanlık ortamda saklandı.

Sodyum Dodesil sülfat (SDS) (%10): 1 g SDS 10 ml distile suda çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

TBS (Tris buffered saline)(10X): 87,66g NaCl, 12,11g Tris %37 lik HCl ile pH 8.8'e ayarlanıp 1000 ml distile suyla tamamlandı.

TBST (Tris buffered saline ve Tween 20) (1X): 100 ml (10X) TBS üzerine 2 ml Tween 20 ilave edildi ve 900 ml distile suyla tamamlandı.

Transfer Tamponu: 50 ml 10x yürütme tamponu, 150 ml metanol ile 500 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Yürütme Tamponu: 30,3g Tris-base, 144g Glisin, 10g SDS 1000ml'ye distile su ile tamamlandı.

α-Tokoferol: 0,01 gram α-Tokoferol 10 ml metanol içinde çözülerek hazırlandı.

3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre line

Çalışmada meme kanseri MCF-7 (ATCC HTB-22), serviks kanseri Hela (ATCC CCL-2), DLD-1, ostesarkoma hücre dizileri kullanılmıştır. Malign olmayan hücre dizisi olarak da sağlıklı gönüllülerin dişlerinden elde edilen insan gingival fibroblast hücre dizisi (HGF) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitki özütlerinin hazırlanması

Araştırmada kullanılan *S. khuzestanica* serin ve rutubetsiz bir ortamda serilerek 1 hafta süreyle kurutulmuştur. Kurutulmuş bitkilerin çiçek ve yaprakları 100 gram tartılıp blender yardımıyla toz haline getirilmiş ve bitki numunesinin üzerine 10 katı kadar çözücü eklenip karanlıkta oda sıcaklığında 14 gün bekletilmiştir. İki günde bir çözücü yenilenerek masere edilmiştir. Wathman no 1 kâğıdıyla süzülüp rotary evaporatörde 50°C’de (Metanol ve Etanol) ve düşük basınçta uzaklaştırılarak kuru özütler elde edilmiştir. Su özütü ise gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek rotary evaporatörde 45°C’de ve düşük basınçta uzaklaştırılarak kuru özütler elde edilmiştir.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivitede kullanılan yöntemler

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite deneyleri için hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite tayini için elde edilmiş olan etanol ve metanol özütleri dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde farklı konsantrasyonlar olacak şekilde (25, 50, 100 mg/ml) çözülmüştür. Su özütleri ise 25, 50, 100 mg/ml konsantrasyonlarda distile suda çözülerek hazırlanmıştır. 0,45 µm milipor filtreden geçirilerek koyu renkli şişeler veya steril ve alüminyum folyo ile kaplı tüplere aktarılmıştır.

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Antibakteriyel etki çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde göre kullanılan bakteri kültürlerini aktif hale getirebilmek için Nutrient Broth (NB), maya kültürlerini aktifleştirebilmek için ise Saboroud Dekstroz Broth kullanılmıştır. Agar

kuyucuk yönteminde %0,9 NaCl içerisinde 0,5 Mc Farland standardına göre ayarlanmış bakteri çözeltisi hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından 100 µl alınarak besiyerine drigalski özesiyle yayılmıştır. Hazırlanan agar üzerinde 7-8 mm çapında kuyular açılarak, açılan kuyulara farklı konsantrasyondaki bitki özütlerinden (0,45 µm'lik membran filtre kullanılarak ve steril edilerek) konulmuştur. İki saat buzdolabında bekletilerek bakteriler için 37⁰C'de 24 saat, mayalar için ise 30⁰C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra inhibasyon zonu ölçülerek mm olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma her bir özüt için üç kere tekrarlanıp, elde edilen sonuçların ortalaması ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Negatif kontrol olarak bitki özütlerini çözdüğümüz DMSO kullanılmıştır.

MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerinin belirlenmesi

Özütler 25 mg/ml konsantrasyondan başlayarak DMSO ile seyreltilir. Katı besiyerinden % 0,9 NaCl'ye öze yardımıyla alınan bakteriler 0,5 Mc Farland standardına göre ayarlanır. 96 kuyucuk içeren elisa plakların her bir kuyucuğuna 95µl nutrient broth konulur. Seyrelttiğimiz özütlerden 100µl ilave edilir. Üzerine 5 µl bakterilerden eklenerek elisa cihazında absorbansı ölçülür. Kuyucuklardaki son hacim 200 µl olarak ayarlanır. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılır. Gecelik inkübasyondan sonra tekrar Elisa cihazında absorbansı 600 nm'de ölçülür. Etüv öncesi ve etüv sonrası çıkan değerler karşılaştırılır.

3.2.3. Antioksidan metodlar

DPPH radikal giderme aktivitesi

Bu yöntem, antioksidan bileşiklerin mor renkli kararlı bir bileşik olan DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) radikalini indirgeme yeteneklerinin ölçümüne dayanmaktadır. Bitki özütlerinin serbest radikal giderim aktiviteleri % 0,004 DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) çözeltisi etanolde hazırlanarak kullanılır. Tüplere 1 ml istenilen konsantrasyondaki özütler konulur. Daha sonra 1 ml DPPH çözeltisi eklenir. 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilir. 517 nm'de absorbans değerleri ölçülür. Kontrol olarak 1ml çözücü ve 1ml DPPH kullanılır. Standart olarak aynı konsantrasyonlarda hazırlanan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), askorbik asit (AA)ve α-tokoferol kullanılır. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır:

Serbest radikalın % inhibisyon değeri: $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$

Test en az üç kez farklı zamanlarda tekrarlanır. Çalışmada 50 -500 µg/ml konsantrasyonları arası hazırlanan metanol, etanol ve su özütünün ve pozitif kontrol BHT'nin %0,004 lük DPPH çözeltisinin renk açılım kapasitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemde yoğun mor renkli radikal çözeltisi, antioksidan etkiye sahip özüt ile karıştırıldığında, antioksidan bileşik ortama bir hidrojen atomu vermekte ve böylece DPPH radikali kararlı ve radikal olmayan DPPH şekline dönüşmektedir (Chen, 1999). DPPH radikalının yoğun mor rengi kaybolarak indirgenme sonucu sarı renkli DPPH molekülü oluşmaktadır.

Toplam fenolik içerik miktar tayini

Özütlerin toplam fenolik içerik miktarları gallik aside eşdeğer mg özüt olacak biçimde aşağıdaki formülden hesaplanmıştır

$$Y = 0,0085x - 0,0209 \quad (R^2; 0,9858)$$

Toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik aside eşdeğer olarak belirlenir. Özütlerden 100 µl tüplere dağıtılmıştır. Üzerine 200 µl %50 Folin-Ciocalteu reaktifi eklenir. 3 dk bekletilir, 1 ml %2 Na₂CO₃ çözeltisi konulur ve iyice çalkalanır. Karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. 760 nm'de Shimadzu-1700 UV spektrofotometresinde absorbans değerleri okunur. Test en az üç kez farklı zamanlarda tekrarlanır.

3.2.4. Bitki özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Bitki özütlerinin hazırlanması

Mevcut özütlerin hücre dizileri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile 10 mg/ml'lik stok özüt çözeltileri hazırlanmıştır. Etanol özütünü çözmek için gerekli miktarda tartılan özüt üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) ilave (mevcut en yüksek özüt derişimindeki oranı %1'i geçmeyecek şekilde) edilmiştir. Çözdürülen özüt üzerine azar azar besiyeri ilave edilerek çözdürme işlemine devam edilmiş ve stok çözelti gerekli hacme tamamlanmıştır. Su özütünde ise stok çözeltiler besiyeri içinde çözülmüştür. Hazırlanan

stok çözelti 0,22 µm por çaplı, şırıngalı filtreden geçirilerek steril edilmiş kapaklı tüplere alınmış ve çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4°C’de saklanmıştır.

Hücre serilerinin stoklanması

Yeterli hücre sayısı yoğunluğuna ulaşan hücre serileri, PBS ile yıkandıktan sonra, 1X tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılıp besiyeri eklenip, 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında besiyeri yardımıyla hücre süspansiyonu hazırlanır. Süspanse hücre kültürlerinin canlılık oranları ve hücre yoğunluğu belirlenir. Hücre kültüründe kullanılan hücre dizilerini en uygun saklama şekli -86°C veya -150°C sıcaklıkta bekletmektir. Bu sıcaklık değerlerinde hücrenin organellerinin korunması amacıyla DMSO ya da gliserol gibi kryoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Hemen çalışılmayacak hücreler RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri ile santrifüj edilmiş ve süpernant uzaklaştırılarak pelet %10 DMSO ve %90 fetal sıgır serumu (FBS) içeren çözelti ile karıştırılarak buz üzerinde dondurulmuştur. Belirli hacimde cryotüplere paylaştırılan hücreler dondurulup sıvı azot tankında saklanmıştır.

Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada belirtilen donmuş hücre dizileri 37°C su banyosunda çözündürülmüş ve ortamdaki DMSO’nun uzaklaştırılması için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile 2 kez yıkanmıştır. Hücreler besiyeri içinde süspanse edildikten sonra % 10 FBS, 100 U/ml streptomisin ve 100 µg/ml penisilin içeren RPMI-1640 vasatlarında gereksinime göre 25 ve 75 cm²’lik flasklarda %5 CO₂ varlığında 37°C’de üretilmiştir. Hücrelerin besiyerleri iki üç gün aralıklarla değiştirilmiştir. Çalışma boyunca, pH çok önemli olduğu için her gün besiyerinin rengi, hücrelerin morfolojik görünüşleri ve çoğalma hızları ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması

Hücreler bulundukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkanmış ve flask için 3 mL Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca besi ortamı eklenip 1000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Üstte kalan çözelti uzaklaştırılıp,

pellet besi ortamı ile çözülmüş ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenip 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur.

Hücre sayımı

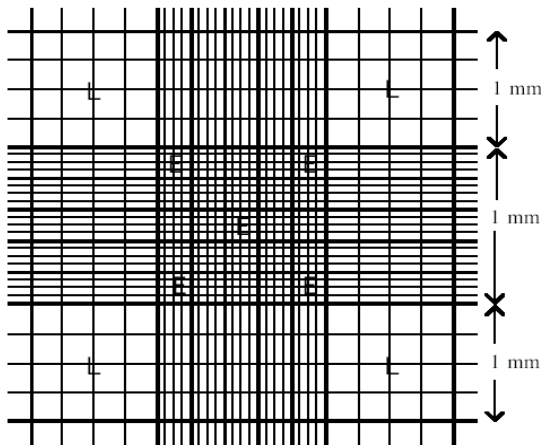
Hücreler pasajlanırken yeni kültüre istenen miktarda almak için hemositometrede sayılmıştır. Hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamında yapılmıştır. Şekil 3.1'deki sayım için hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp tripan mavisile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım pipetle homojenize edilmiş ve lam üzerine 10 µl bırakılarak yayılmıştır. Hücreler thoma lamında görülen 4 büyük karede sayılmış ve hücrelerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Tripa n mavis i, ölü hücrelerin içine girme özelliğinde olduğu için, sayım yaparken koyu mavi renkli görülen hücreler ölü, açık renkte görülen parlak hücreler canlı olarak sayılmıştır. Hücre sayımından sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı} = A \times B \times C \times 104$$

A = Hücre içeren besiyerinin hacmi (ml)

B = Seyreltme faktörü

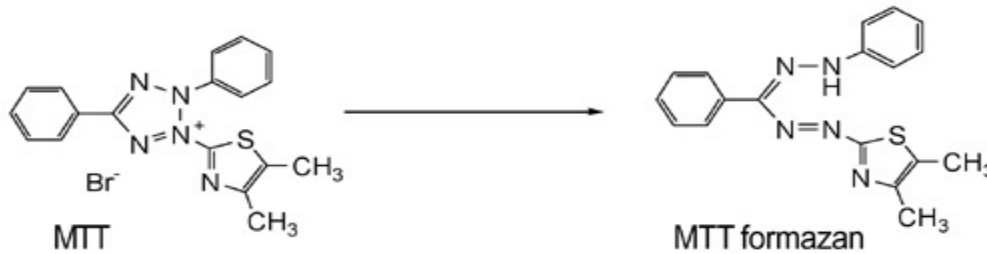
C = Canlı hücrelerin ortalama sayısı



Şekil 3.1. Thoma lamı

MTT (Metiltiazotetrazolium) canlılık metodu (Hücre proliferasyon testi)

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik bir test olan MTT (tetrazolium tuzu 3-[4,5- dimethythiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) testidir. MTT yöntemi ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir (Şekil3.2). Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyası ile inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Optik yoğunluk ölçülerek formazan oluşumu saptanabilir. Alternatif olarak test örneği çevresindeki formazan ışık veya elektron mikroskobu ile belirlenebilir.



Şekil 3.2. MTT'nin reaksiyon şeması

3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi

Tripan mavisi yöntemi ile canlı hücre yüzdesi belirlenmektedir. Hücreler canlılıklarını kaybetmemişlerse membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için boyanmamaktadırlar. Membran bütünlüğü bozulduğu için ölü hücreler ise boyayı içine alarak mavi renkte görünmektedir. Bu özelliklerine dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile hücre canlılığı yüzde olarak hesaplanabilmektedir. Hücre dizilerinin zamana bağlı olarak hücre canlılığını %50 oranında azaltan etanol veya su özütlerine verdikleri cevabı belirleyebilmek için her bir kuyucuğa 5×10^4 hücre olacak şekilde hücreler 12 kuyucuklu kültür petrilere ekilmiştir. Daha sonra 0 ile 96 saat arasında etanol ve su

özütleri hücrelere uygulanmıştır. Her 24 saatte bir tripsin ile kaldırılmış hücreler %0,4 tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak hemositometre lamında mikroskopta sayılmıştır.

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

Hücrelerin ölüm oranları, PI boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler kuyucuk başına 1×10^5 olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiş, etanol özütü ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS ile yıkanmıştır. Besiyeri çekilmeden PI boyası ($1 \mu\text{g/ml}$) hücreler üzerine eklenmiştir. 15 dakika bekletildikten sonra floresan mikroskobu altında görüntüleme yapılmıştır. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.

3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi

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

3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Etanol özütü hücreler üzerine 24 saat uygulanmıştır. Sonrasında PBS ile yıkanmış ve 4 nM 3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC_6) floresan probu ile 15 dakika boyunca muamele edilmiştir. $\Delta\psi\text{m}$ değişimi floresan mikroskopta (Olympus, Japan) (Excitation/emission = 488 nm / 525 nm) gözlenmiştir. DiOC_6 ile boyanan canlı hücrele floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.

3.2.9. Hoechst 33342, Propidiyum iyodür (PI) ile ikili boyama yöntemi

İkili boyama yöntemi için, MCF-7, osteosarkoma, DLD-1 ve Fibroblast hücreleri 6 kuyulu petrilere ekilmiştir. petrilere 2ml içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24

saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben, hücrelerin süpernatantları 15ml'lik falkonlara toplandı ve bir kez 1ml PBS ile yıkama yapıp tekrar aynı falkonlara toplandı. Hücreleri toplamak amacıyla 200µl tripsin pipetlendi ve 4 dakika 37 °C'de bekletildi. Süre sonunda hücreler, ilgili falkonlara toplandı ve bu süspansiyon 800rpm'de 4 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonunda supernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine, PBS içerisinde konsantrasyonları 1µg/ml PI, 1mg/ml RNaz ve 10µg/ml olan ikili boyama çözeltisinden 100µl pipetlendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda bu süspansiyondan 20µl temiz bir lam üzerine alındı ve lamel ile kapatılarak, bileşiklerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi. İkili boyanan apoptotik nükleuslu hücreler floresan mikroskop alanında parlak mavi renkli ve lekeli olarak görülür.

3.2.10. Protein izolasyonu

Bu aşamada, ilaç uygulanan flasklarıda bulunan hücre süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol flaskının süpernatantı uzaklaştırıldı. Flasklara 10ml soğuk PBS ilave edilip hücreler“scraper” (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C'de 1000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,5ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde çözeltiler 1,5ml'lik tüplere aktarıldı ve +4°C'de 10 000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantları 0,5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

Proteinlerin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının ölçülmesi

BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albümin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultra saf dH₂O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. ml'sinde 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

BCA ölçümünün yapılması

Biçinkoninik asit (BCA) protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu çözelti, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik çözücülerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma-Aldrich) ve 96 kuyuluk plate (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100µl standart ve 10µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultra saf dH_2O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10µl örnekler 90µl, standartlar ise 100µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH_2O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200µl çalışma ayıracı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de (FLASHScan S12) okundu.

3.2.11. Western blot analizi

Western Blot analizi hücrelerden elde edilen bir protein karışımında, aranan (hedef) proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. İmmüno-blotlama olarak da adlandırılan tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak üç aşamada gerçekleştirilir:

- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılması sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membranın sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ve son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır.

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western Blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Elektrik akımı etkisiyle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içerdiğinden denatüre protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında, proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler. SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat(SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır. Akrilamid ve bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü yavaşlatan bir 'moleküler elek' olarak davranır. Bu nedenle ayırım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilite temeline dayanmaktadır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayırımında kullanılırlar.

Proteinlerin yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 50µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve sample buffer ve reducing agent 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 400C'de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 60 dakika 150V yürütme yapıldı.

Proteinlerin transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (Invitrogen) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

Bloklama

β -Aktin için, TBS-T içerisinde %5'lik süt (Santa Cruz) çözeltisi hazırlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

PARP için, kitin içerisinde yer alan 4ml Blocker Part A ve 2ml Blocker Part B 14ml ultrasaf H₂O ile tamamlanarak bloklama çözeltisi hazırlandı. 30 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 2 defa 5 dakika 20ml ultrasaf H₂O ile yıkama yapıldı.

Birincil antikor

Anti-Aktin antikor (Santa Cruz), 1:1000 olacak şekilde 1%'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

Anti-PARP antikor (Cell Signalling), 1:1000 olacak şekilde bloklama çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 4 defa 5 dakika, kitin içerisinde yer alan 20 ml yıkama çözeltisi (1X) ile yıkama yapıldı.

İkincil antikor

β -Aktin için, Anti-Mouse (Amersham Biosciences) 1:5000 olacak şekilde 1%'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 1,5 dakika ve ardından 1 defa 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Bu yıkama işlemi üç defa yapıldı.

PARP için, Anti-Rabbit 1:5000 olacak şekilde bloklama çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 4 defa 5 dakika, kitin içerisinde yer alan 20ml yıkama çözeltisi (1X) ile yıkama yapıldı.

PARP/Aktin proteinlerinin belirlenmesi

Bu yöntem ile SDS-PAGE ile protein bantları halinde ayrılmış olan lizatlar elektrik akımı ile bir membrana aktarıldı. Membrana aktarılmış proteinlerden araştırılmak istenene karşı antikorlar ve anti-antikorlar ile bir deteksiyon yapıldı. Bu deteksiyon ile ilgilenilen protein tespit edildi.

Karanlık oda işlemleri

Nitroselüloz üzerine transfer edilmiş olan proteinler karanlık odada, kemiluminesans kit (β -Actin için Amersham, PARP için Invitrogen) kullanılarak oluşan ışıma X-ray filmlere aktarıldı. Kemiluminesans kit protokolünde belirtildiği gibi, bu kitin iki bileşeninden 1:1 (β -Actin), 1:20 (PARP) oranında alınarak her bir membran için 2,5ml kullanıldı ve membran bu solüsyon ile iyice ıslatıldı. Ardından 5 dakika bekletildi. Membranın altına üstüne asetat film konuldu. Asetatların üzerinde sıvı kalmamasına dikkat edilerek bir X-ray film kasetine yerleştirildi. X-ray film ile 1, 5, 10 ve 30 dakika sürelerle membran ile film bekletildi. Bu süreler sonunda filmler, karanlık odada film banyo makinesinde basılarak bant görüntüleri elde edildi.

3.2.12. İstatistiksel analiz

Çalışmada her bir deney en az 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar $\pm$ standart sapma (SD)'larına göre ifade edilmiştir. İstatistiksel analizde gruplar arası karşılaştırmalar için SPSS 15 programı kullanılmıştır ayrıca Deney grupları arasında pozitif veya negatif korelasyonu tespit etmek amacıyla SPSS 15 programındaki Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Bulunan değerin $p < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche) kullanılarak yapıldı. Bu aşamada ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara

toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler scraper (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C’de 800rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 200µl PBS eklenerek al-ver yapıldı. Kitin içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirildi ve lysis-binding tamponundan falkonlara 400µl eklenerek tüm hacim, birleştirilmiş tüplere (üst kısımda yer alan filtre tüp içerisine) aktarıldı ve 8000g’de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Ortamdaki total DNA’yı uzaklaştırmak amacıyla kitin içerisinde yer alan DNaz inkübasyon tamponundan 100µl pipetlenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda, DNaz inkübasyon tamponunu uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla kitin içerisinde yer alan 1 numaralı yıkama çözeltiden 500µl eklenerek 8000g’de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. İkinci bir yıkama için kitin içerisinde yer alan 2 numaralı yıkama çözeltiden 500µl eklenerek 8000g’de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Son olarak 2 numaralı yıkama çözeltiden 200µl eklenerek 13 000g’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, koleksiyon tüpü uzaklaştırıldı ve filtre tüpler, steril 1,5ml’lik tüpler ile birleştirilerek, filtrede tutulan total RNA’nın tüp içerisinde eldesi için 70µl elusyon tamponu, filtre tüpe pipetlendi ve 8000g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

3.3.1. İzole edilen RNA’ların kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA’ların kalitesi ve miktarları Nanodrop™ (ThermoScientific) cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 2 µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50ng/µl ile 600ng/µl arasında bulundu.

3.3.2. cDNA sentezinin yapılması

Elde edilen RNA’ların saflık ve miktar değerleri NanoDrop ND-1000 spektrofotometre cihazında ölçülerek belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA

sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.2 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. RT-PZR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre Değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1Mm	2 µl
Random hegzamerler	60 Mm	2 µl
RNaz inhibitörü	20 unite (U)	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 U	0.5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

3.3.3. RT-PZR programı

Otomatik ısı döngü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA'lardan cDNA elde edildi.

Çizelge 3.3. Isı döngü cihazı programı

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

Reaksiyonu durdurmak için tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve Eş zamanlı PZR analizi için kullanılmak üzere -20oC'de saklandı.

3.3.4. Eş zamanlı PZR

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır. LightCycler (Şekil.1.3) sisteminin uygulanmasında; yalnızca çift zincirli

DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber green 1) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green 1 miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir [78].

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green 1 ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green 1 boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir. LightCycler'in diğer bir uygulama şekli, hedefe özgül problar kullanmaktır. Burada problarla testin özgüllüğü arttırılmıştır. Problardan biri 3' ucundan floresans boyayla işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boyayla (acceptor dye) işaretlenmiştir. Problar, hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluoresance resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğer bir ifadeyle PZR siklusu süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır. TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda raportör florokrom (6- carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6- carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Probla hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör

florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uğtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanması takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uğtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır. Eş zamanlı PZR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir.

caspaz-3, *Bad*, *Bax* ve *Bcl-2* mRNA miktarları, Eş zamanlı PZR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, LightCycler®480ProbesMaster(vial1), RealTimereadyAssay ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. *caspaz-3*, *Bax* ve *Bcl-2* gen ifadenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

Çizelge 3.4. Eş zamanlı PZR karışımları

Su	LightCycler®480ProbesMaster (vial1)	RealTimereadyAssay	cDNA
4 µl	10 µl	1 µl	5

Eş zamanlı PZR karışımları (Çizelge 3.4) hazırlandıktan sonra 96'lık kuyulu mikrolakaya dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Mikrolaka yerleştirildikten sonra LC cihazında (Çizelge 3.5) belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PZR tepkmesi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. Eş zamanlı PZR programı

Program 1. Ayrılma

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Ramp oranı
95°C	10 dk	1	4.4 (°C/s)

Program 2. Primer bağlanması ve uzama (hibridizasyon ve polimerizasyon)

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Ramp oranı (°C/s)
95°C	10s	45	4.4
60°C	30s	45	2.2
72°C	1s	45	4.4

Program 3. Soğutma

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı	Ramp oranı
40°C	30s	1	2.2

3.4. Özüt-DNA Etkileşiminin Belirlenmesi

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

3.4.1. Agaroz jel elektroforezi

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

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Özüt verimliği %

Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstre miktarları metanol, etanol ve su özütünün yüzde verimleri aşağıdaki gibi hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Yüzde verim (g/g): $\text{ekstraksiyon sonrası elde edilen kuru özüt} \div \text{Başlangıçta tartılan kuru bitki miktarı} \times 100$

Çizelge 4.1. özütlerinin % verimleri

Bitki özütleri	% verim (g/g)
Etanol	16,8
Metanol	17,5
Su	22,54

S. khuzestanica bitkisinin etanol, metanol ve su özütünün % verimliliği sırasıyla 16,8; 17,5; 22,54 hesaplanmıştır. En çok % verimlilik su özütünde olduğu gözlenmiştir.

4.2. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Etkileri

4.2.1. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Etanol, metanol ve su özütleri patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir özüt için 3 farklı konsantrasyon (25, 50 ve 100 mg/ml) hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak, bitki özütlerini çözdüğümüz %50 DMSO kullanılmış ve hiçbir etki görülmemiştir. Pozitif kontrol olarak bakteriler için kloramfenikol (C) ve ampisillin (Amp), mayalar için ketokonazol kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Bitki özütünün (25µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapı± mm) DMSO: %50 Dimetilsulfoksit, Amp: Ampislin 10µg/ml, C: Kloramfenikol (30µg/ml), Keto: Ketokonazol (50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı Patojen bakteriler ile etkileri sonucu oluşan zon çapları

Mikroorganizmalar	Etanol özüt	Metanol özüt	Su özüt	DMSO	Amp	C	Keto
<i>B. cereus</i>	19,6 ±0,5	17,6 ±0,4	-	-	10,0 ± 1,0	23,4 ± 0,7	Ç
<i>B. subtilis</i>	18,3 ±0,4	15 ±0,4	-	-	30,3 ± 0,5	31,0 ± 1,0	Ç
<i>S. aureus</i>	14 ± 1,2	14 ±0,4	-	-	35, ± 0,0	29,6 ± 0,5	Ç
<i>E.coli</i> (25922)	13,6 ±0,4	14,6 ±0,5	-	-	20,3 ± 0,5	26,6 ± 1,1	Ç
<i>E. coli</i> (35218)	18.6 ±0,5	15,6 ±0,4	-	-	R	10,5 ± 0,7	Ç
<i>E. fecalis</i>	17.3 ±0,4	14 ±0,4	-	-	30,0± 0,0	29, ± 1,0	Ç
<i>P. vulgaris</i>	13,2 ±0,6	14,8 ±1,4	-	-	R	30,3± 0,5	Ç
<i>P. aureginosa</i>	16 ±0,4	17 ±0,4	-	-	R	R	Ç
<i>C. albicans</i>	16 ±0,5	14.6 ±0,4	-	-	Ç	ç	30.3± 0,5
<i>C. tropicalis</i>	14 ±0,4	15 ±0,4	-	-	Ç	ç	29,0± 0,5

Çizelge 4.3. Bitki özütünün (50µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapı± mm) DMSO: %50 Dimetilsulfoksit, Amp: Ampislin 10µg/ml, C: Kloramfenikol (30µg/ml), Keto: Ketokonazol (50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı Patojen bakteriler ile etkileri sonucu oluşan zon çapları

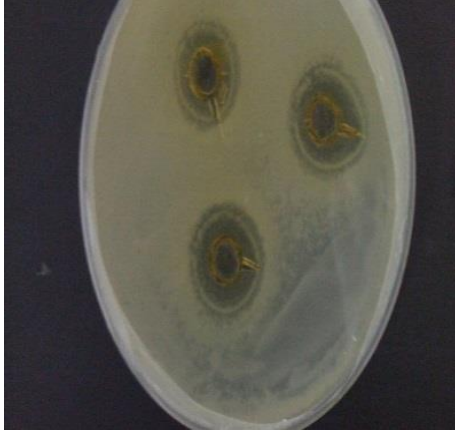
Mikroorganizmalar	Etanol özüt	Metanol özüt	Su özüt	DMSO	Amp	C	Keto
<i>B. cereus</i>	20,3 ±0,4	20.6 ±0,4	-	-	10,0 ± 1,0	23,4 ± 0,7	Ç
<i>B. subtilis</i>	19,6 ±0,5	18,6 ±0,4	-	-	30,3 ± 0,5	31,0 ± 1,0	Ç
<i>S.aureus</i>	21,6 ±0,4	17,6 ±1,3	-	-	35, ± 0.0	29,6 ± 0,5	Ç
<i>E. coli</i> (25922)	16,6 ±0,4	17,3 ± 0,4	-	-	20,3 ± 0,5	26,6 ± 1,1	Ç
<i>E. coli</i> (35218)	17,6 ±1,5	17,6 ±0,5	-	-	R	10,5 ± 0,7	Ç
<i>E. fecalis</i>	16,6 ±0,4	16,6 ±0,4	-	-	30,0± 0,0	29, ± 1,0	Ç
<i>P. vulgaris</i>	15,2 ±0,5	15,8 ±0,5	-	-	R	30,3± 0,5	Ç
<i>P. aureginosa</i>	17 ±0,4	18 ±0,4	-	-	R	R	Ç
<i>C. albicans</i>	20 ±0,4	17.6 ±0,0	-	-	Ç	ç	30.3± 0,5
<i>C. tropicalis</i>	18 ±0,4	17 ±0,4	-	-	Ç	ç	29,0± 0,5

Çizelge 4.4. Bitki özütünün (100 µg/ml) bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri (zon çapı± mm) DMSO: %50 Dimetilsulfoksit, Amp: Ampisilin 10µg/ml, C: Kloramfenikol (30µg/ml), Keto: Ketokonazol (50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı Patojen bakteriler ile etkileri sonucu oluşan zon çapları

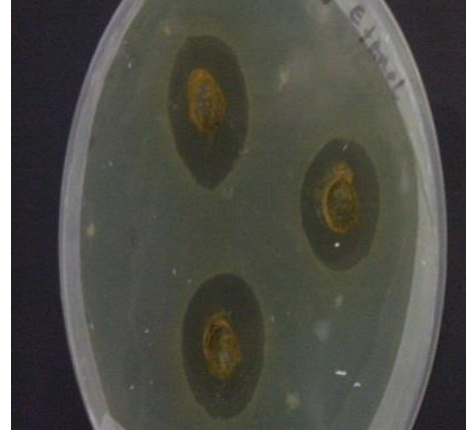
Mikroorganizmalar	Etanol özüt	Metanol özüt	Su özüt	DMSO	Amp	C	Keto
<i>B. cereus</i>	21,3 ±0,4	20,6 ±0,0	-	-	10,0 ± 1,0	23,4 ± 0,7	Ç
<i>B. subtilis</i>	22 ±0,4	21,6 ±0,4	-	-	30,3 ± 0,5	31,0 ± 1,0	Ç
<i>S. aureus</i>	22 ±0,0	22,6 ±0,4	-	-	35, ± 0,0	29,6 ± 0,5	Ç
<i>E. coli</i> (25922)	18,3 ±0,5	19,6 ±0,4	-	-	20,3 ± 0,5	26,6 ± 1,1	Ç
<i>E. coli</i> (35218)	20 ±0,4	19 ±0,4	-	-	R	10,5 ± 0,7	Ç
<i>E. fecalis</i>	17,3 ±0,4	17,3 ±1,4	-	-	30,0± 0,0	29, ± 1,0	Ç
<i>P. vulgaris</i>	17,5 ±0,4	17,8 ±0,4	-	-	R	30,3± 0,5	Ç
<i>P. aurescens</i>	18,5 ±1,4	19,4 ±0,5	-	-	R	R	Ç
<i>C. albicans</i>	22,3 ±0,4	21 ±0,4	-	-	Ç	Ç	30,3± 0,5
<i>C. tropicalis</i>	20 ±0,0	19 ±0,4	-	-	Ç	Ç	29,0± 0,5

Methanol, etanol ve su özütünün antimikrobiyal etkisine agar kuyucuk yöntemiyle bakılmış ve her bir özüt için 3 farklı konsantrasyon (25, 50,100mg/ml) hazırlanmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak %50 DMSO kullanmıştır. Mayalar için ketokonazol (5µg/ml) bakteriler için pozitif kontrol olarak ampisilin (10µg/ml)ve kloramfenikol (30µg/ml) kullanmıştır. Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4 'de sırayla 25, 50 ve100 mg/ml metanol ve etanol özütlerinin bakterilere ve mayalara karşı etkili olduğu görülmektedir. Su özütü bakteri ve mayalara karşı etkili olmamıştır.

Sonuç olarak metanol ve etanol özütünün bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin konsantrasyona bağlı olduğu saptanmıştır. Konsantrasyon arttıkça metanol ve etanol özütünün aktivitesinin arttığı ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğu($P>0,05$) tespit edilmiştir. Ayrıca özütün mayalara karşı antifungal bir aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan %50 DMSO` nun da mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal bir etkisi görülmemiştir. Etanol ve methanol özütün konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkisi Resim 4.1- 4.7 te gösterilmiştir.



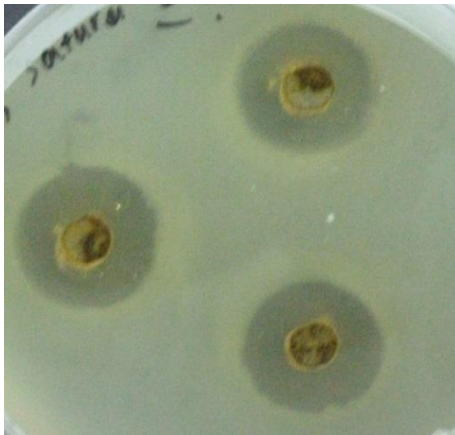
Resim 4.1. Etanol özütünün (25 mg/ml) *B. subtilis* üzerine antimikrobiyal etkisi



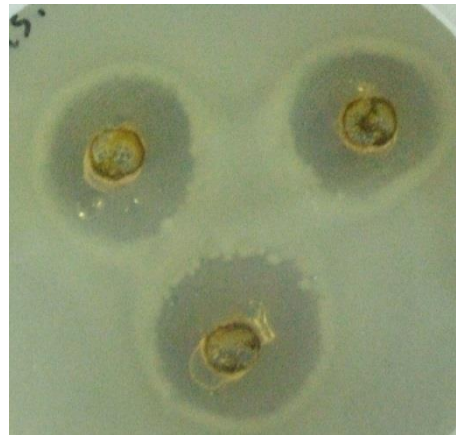
Resim 4.2. Etanol özütünün (50 mg/ml) *B. subtilis* üzerine antimikrobiyal etkisi



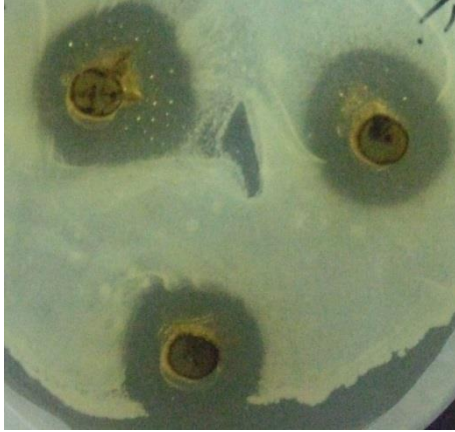
Resim 4.3. Etanol özütünün (100mg/ml) *B. subtilis* üzerine antimikrobiyal etkisi



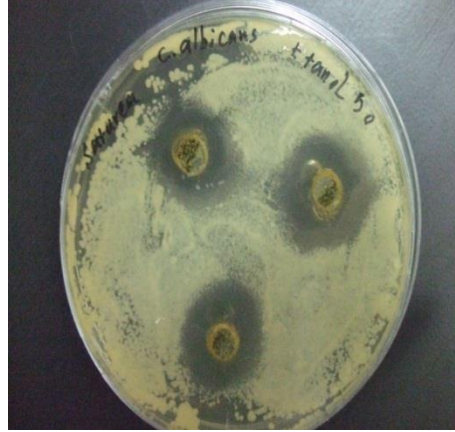
Resim 4.4. Etanol özütünün (25 mg/ml) *E. coli* 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.5. Metanol özütünün (50 mg/ml) *E. coli* 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.6. Metanol özütünün (100 mg/ml) *E. coli* 35218 üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.7. Etanol özütünün (50 mg/ml) *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkisi

4.2.2. MİK (Minimum inhibisyon Konsantrasyonu) değerleri”

Çizelge 4.5. Etanol ve methanol özütünün MİK değerleri (mg /ml)

Mikroorganizmalar	Etanol özütü	Metanol özütü
<i>B. cereus</i>	25	25
<i>B. subtilis</i>	12,5	12,5
<i>S.aureus</i>	12,5	12,5
<i>E. coli</i> (25922)	6,25	6,25
<i>E. coli</i> (35218)	6,25	12,5
<i>E.fecalis</i>	12,5	6,25
<i>P. vulgaris</i>	25	12,5
<i>P.aureginosa</i>	6,25	12,5
<i>C. albicans</i>	6,25	6,25
<i>C. tropicalis</i>	12,5	12,5

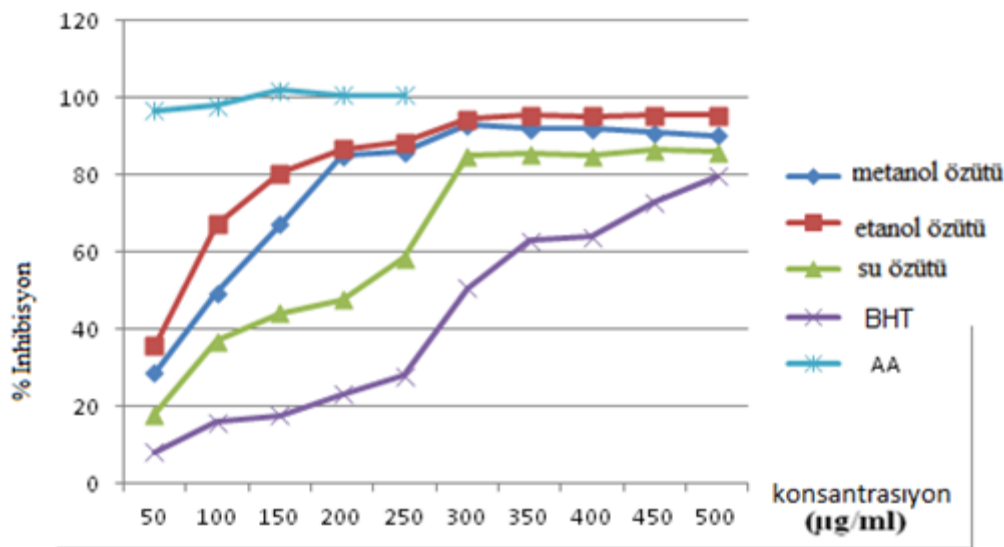
Çalışma sonucunda elde edilen MİK değerleri Çizelge 4,5’de gösterilmiştir. Çizelge 4,5’de görülebileceği gibi özütlerin MİK değerlerinin 6,25 mg/ml ile 25 mg/ml arasında değiştiği gözlenmiştir. Etanol özütünün en etkili olduğu bakterilerin *E. coli* ve *P. aureginosa* (6,25 mg /ml) olduğu sonra sırayla *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. fecalis* (12,5 mg /ml) ve *P. vulgaris* (25 mg /ml) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5göre metanol özütünün en etkili olduğu bakterilerin *E. coli* (25922) ve *E. fecalis* (6,25 mg /ml) olduğu sonra sırayla *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *E. coli* (35218), *P. aureginosa* (12,5 mg /ml), ve *B. cereus* (25 mg /ml) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki özütün de mayalarda *C. albicans*(6,25 mg/ml) ve *C. tropicalis* (6,25 mg/ml) olduğu tespit edilmiştir. Metanol ve etanol özütünün bakteriler arası zon büyüklüğünde anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($P>0,05$). Pearson korelasyon testine göre MİK ve agar kuyucuk yöntemleri arasında metanol özütünün %67 korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir ($P>0,05$). Etanol özütüne baktığında %36 korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P<0,05$).

4.3. Antioksidan Metodlar

4.3.1. DPPH radikal giderme aktivitesi

Bu yöntem, antioksidan bileşiklerin mor renkli kararlı bir bileşik olan DPPH radikalini indirgeme yeteneklerinin ölçümüne dayanmaktadır. Çalışmada 50-500 $\mu\text{g/ml}$ derişimleri arası hazırlanan metanol, etanol, su özütleri, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve askorbik asit (AA)'nin serbest radikal süpürücü etkilerine DPPH yöntemi kullanılarak bakılmıştır. %0,004'lük DPPH çözeltisinin moru renginin açılım kapasitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Özütlerin DPPH süpürücü aktivitesi

Şekil 4.1 de görüleceği gibi 300µg/ml konsantrasyondaki etanol, metanol, su özütü ve BHT ve AA'nin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla % 94,4 ± 1,2; %93,6 ± 0,40 ;%85.± 0,3; %50,77 ± 0,5; %100 olarak bulunmuştur. 50 µg/ml konsantrasyondaki AA standartlarının radikal süpürücü aktiviteleri ise %96,76±1 olarak tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri özütün veya standardın serbest radikali süpürdüğü % inhibisyon değerinin yarısına karşılık gelen konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir. Özütlerin ve kontrolün IC₅₀ değerleri sırasıyla şu şekildedir: AA 4,3±0,3 µg/ml > BHT 27,5±0,2 µg/ml > etanol özütü 47,7±0,8 µg/ml metanol özütü 51,3±0,8 µg/ml > su özütü 65,5±0,5 µg/ml .

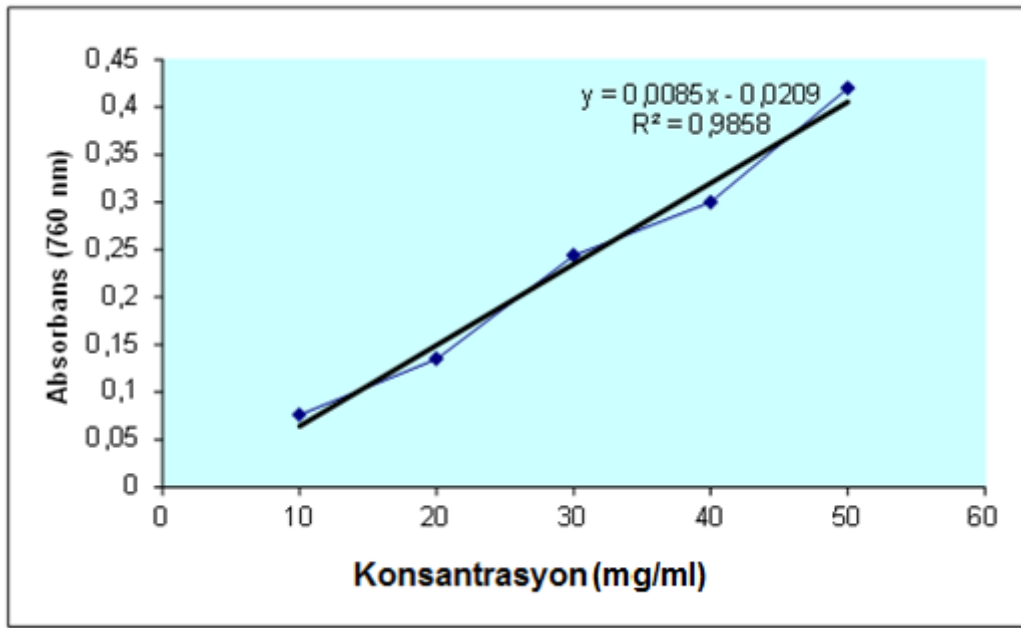
4.3.2. Toplam fenolik içerik miktar tayini

Toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik aside eşdeğer olarak belirlenir. Fenolik içerik deneyini yaparken ilk olarak gallik asit için bir standart eğri oluşturması gerekir (Şekil 4.2). Özütlerin Üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi ve Na₂CO₃ ekledikten sonra karışım oda sıcaklığında 1 saat bekledikten sonra 760 UV spektrofotometresinde absorbans değerleri okunur. Sonra özütlerin toplam fenolik içerik miktarları gallik asit eşdeğer mg özüt olacak biçimde aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$Y=0,0085x-0,0209$$

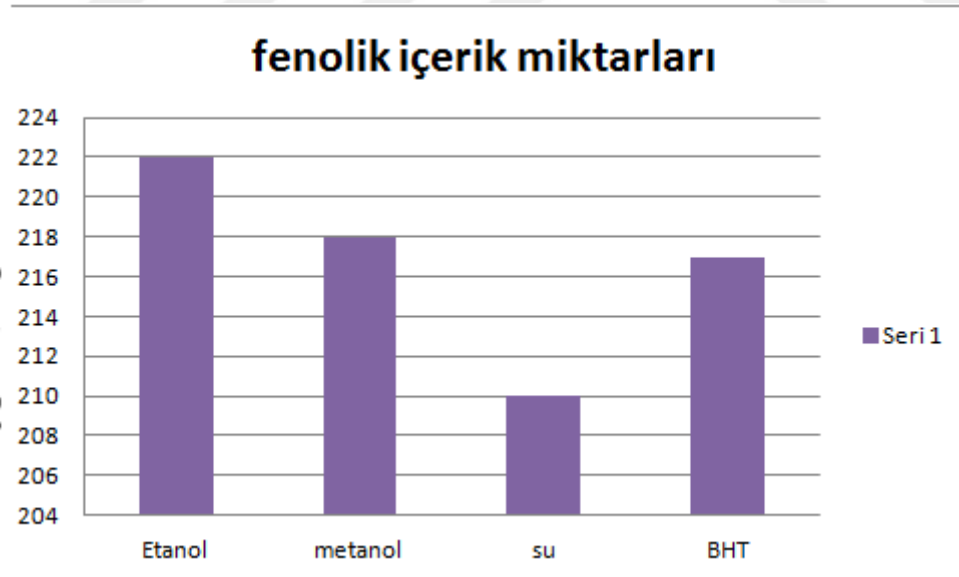
Y=absorbans

X=ml başına düşen mg gallik asit miktarıdır.



Şekil 4.2. Gallik asit eğrisi

Gallik asit eğrisine göre hesaplanan metanol, etanol ve su özütlerinin fenolik içerik miktarları Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3. Bitki özütlerinin fenolik içerik miktarları

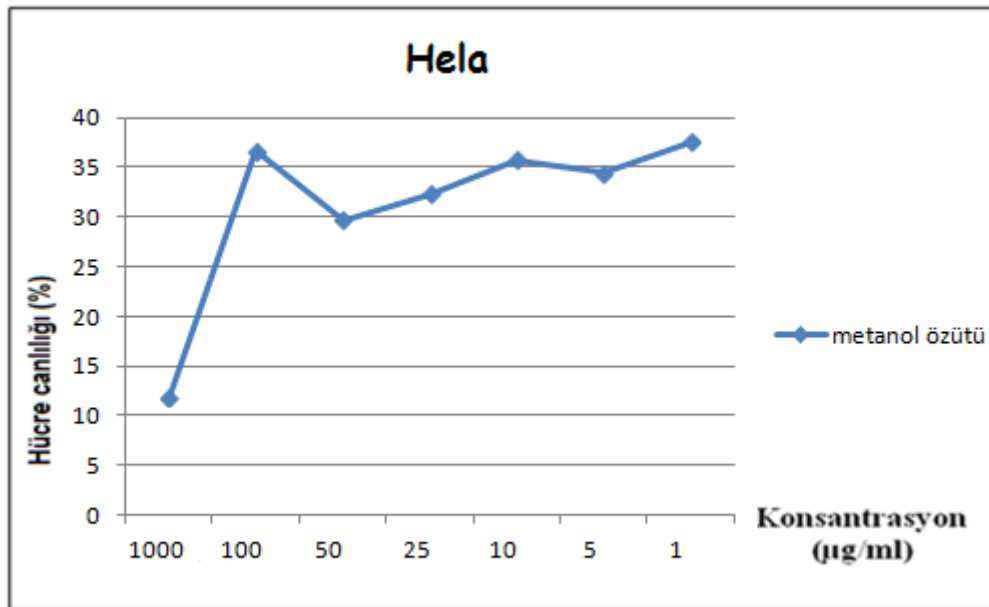
Şekil 4.3'te özütlerin fenolik içerik miktarlarına bakıldığında metanol özütünün $218,45 \pm 1,004$ µg GAE/mg özüt, etanol özütünün $222,55 \pm 0,946$ µg GAE/mg özüt ve su özütünün $210,67 \pm 0,926$ µg GAE/mg özüt fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Standart olarak kullanılan BHT'nin ise $217,24 \pm 0,99$ µg GAE/mg fenolik içeriğe sahip

olduğu görülmektedir. Sonuçlar DPPH radikali süpürücü aktivitesi en yüksek olan etanol özütünün (IC_{50} : $47,7 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$) toplam fenolik içeriğinin de yüksek olduğunu, DPPH radikali süpürücü aktivitesi en düşük olan su özütünün (IC_{50} : $65,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$) toplam fenolik içeriğinin de düşük olduğu gözlenmiştir. Özütlerin ve standardın fenolik içerik miktarları en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: etanol özütü > metanol özütü > BHT > su özütü. Özütlerin fenolik içeriğiyle, IC_{50} değerleri arasında Pearson korelasyon testine göre % 51,7 negatif korelasyon tespit edilmiştir.

4.4. Bitki Özütlerin Sitotoksik Etkileri

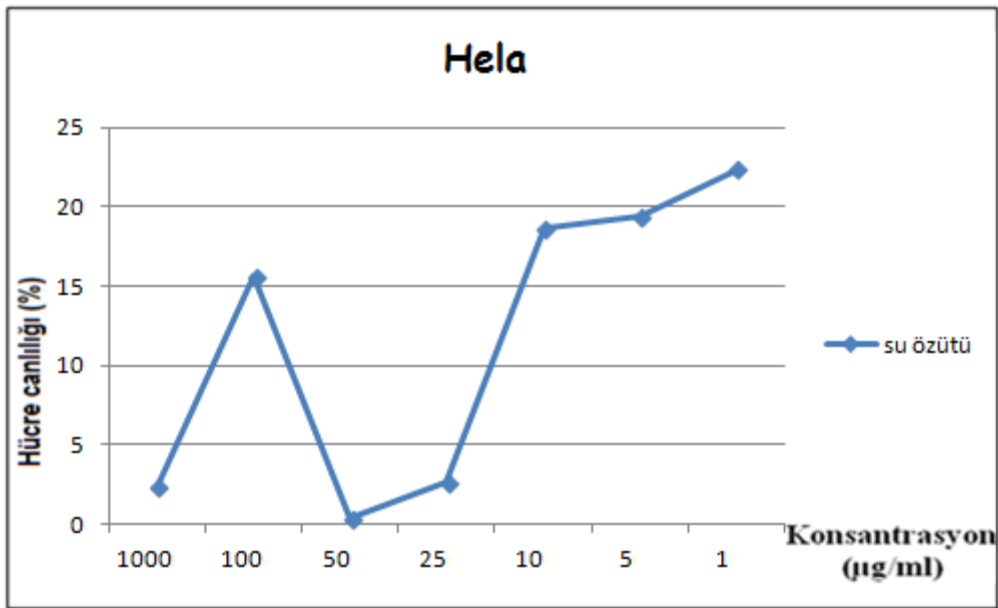
4.4.1. Özütlerin Hela hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

Su ve metanol özütleri (1000-1 $\mu\text{g/ml}$ derişimleri arasında) 24 saat süreyle HeLa hücre dizileri üzerine uygulanmıştır. Ayrıca bitki özütleri (3,125-100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlar arasında) MCF-7, DLD-1, osteosarkoma ve fibroblast hücre dizileri üzerine de 24 saat uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası elisa cihazında absorbansları ölçülmüş ve hücre canlılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.4 ve 4.5).



Şekil 4.4. Hela hücre dizisinin methanol özütü ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen hücre canlılık oranı (%)

Şekil 4.4’da görülebileceği gibi metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücre dizisi hücre canlılık oranları 1000 $\mu\text{g/ml}$ ’de, $20,79 \pm 0,118$; 100 $\mu\text{g/ml}$ ’de $27,17 \pm 0,366$; 50 $\mu\text{g/ml}$ ’de $29,93 \pm 0,296$; 25 $\mu\text{g/ml}$ ’de $34,40 \pm 0,323$; 10 $\mu\text{g/ml}$ ’de $34,01 \pm 0,357$; 5 $\mu\text{g/ml}$ ’de $40,88 \pm 0,344$; 1 $\mu\text{g/ml}$ ’de $46,75 \pm 0,375$ olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonlarda özütün sitotoksik etkisi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0,05$) göstermiştir.



Şekil 4.5. Su özütü ile Hela hücre dizisinin 24 saat muamelesi sonucu oluşan hücre canlılık oranı

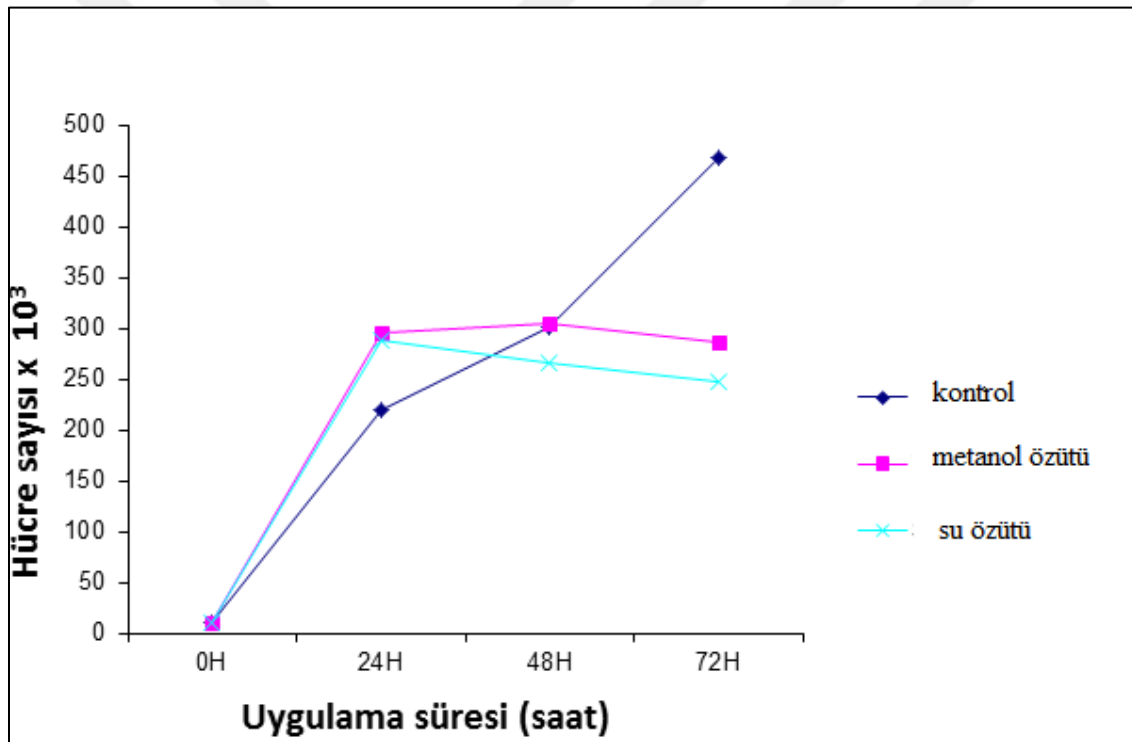
Şekil 4.5 da görülebileceği gibi HeLa hücre dizisi metanol özütü ile 24 saat muamele edildiğinde metanol özütü için 1000 $\mu\text{g/ml}$ ’de $92,54 \pm 0,024$; 100 $\mu\text{g/ml}$ ’de $93,38 \pm 0,156$; 50 $\mu\text{g/ml}$ ’de $102,64 \pm 0,003$; 25 $\mu\text{g/ml}$ ’de $79,56 \pm 0,026$; 10 $\mu\text{g/ml}$ ’de $90,51 \pm 0,186$; 5 $\mu\text{g/ml}$ ’de $84,58 \pm 0,194$; 1 $\mu\text{g/ml}$ ’de $92,09 \pm 0,223$ hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Özütün sitotoksik etkisi uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0,05$) içermektedir.

Çalışmada metanol ve su özütlerinin derişime bağılı olarak HeLa hücre dizileri üzerine sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. metanol özütünün HeLa hücre dizisi üzerine IC_{50} değeri $66 \pm 0,005$ $\mu\text{g/ml}$, su özütü ise IC_{50} $44.88 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç

olarak HeLa hücre dizisi üzerine metanol özütünün su özütünden daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

4.4.2. Özütlerle muamele edilen Hela dizilerinin sağ kalım eğrilerinin belirlenmesi

Çalışmada HeLa kanser hücre dizilerinin metanol ve su özütünün 0, 24, 48, 72 saat süreyle hücrelerle muamele edilmesi sonucunda hücrelerin sağ kalımları belirlenmiştir. Çalışmada kontrol grubu olarak, özüt ile muamele edilmemiş HeLa kanser hücre dizileri kullanılmıştır. Şekil 4.6'de metanol, etanol ve su özütü varlığında HeLa hücre dizilerinin zamana bağlı sağ kalım grafiklerini göstermektedir.



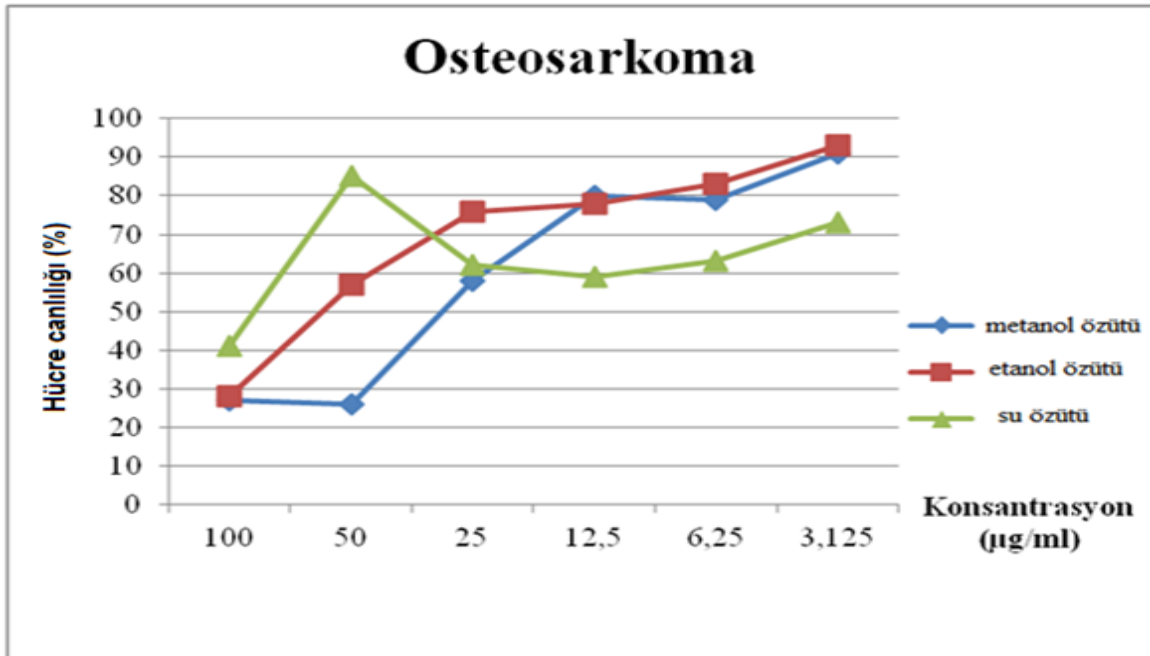
Şekil 4.6. Farklı özütler ile muamele edilmiş (metanol ve su) Hela hücrelerinin Tripan mavisi uygulanması sonucu oluşturulan sağ kalım grafiği

Özütlerle muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre sayısının 24 saat sonra düzenli olarak çoğaldığı görülmektedir. Metanol ve su özütlerine bakıldığında ise 24 saatten sonra hücre sayılarında azalma olduğu görülmektedir. Özütlerin 24 saat sonra etkili olduğu görülmektedir.

4.4.3. Özütlerin insan osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Metanol, etanol ve su özütünün Osteosarkoma hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak özüt ile muamele edilmemiş osteosarkoma kanser hücre dizileri kullanılmıştır.

Osteosarkoma hücre dizisi metanol özütü ile muamele edildiğinde metanol özütü için 100 µg/ml'de %27; 50µg/ml'de %26; 25 µg/ml'de %62; 12,5 µg/ml'de %80; 6,25 µg/ml'de %79; 3,125 µg/ml'de %91 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Etanol özütü ise 100 µg/ml'de %28; 50µg/ml'de %57; 25 µg/ml'de %76; 12,5 µg/ml'de %78; 6,25 µg/ml'de %83; 3,125 µg/ml'de %93 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün konsantrasyona bağlı olarak osteosarkoma hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak osteosarkoma hücre dizisinde metanol ve etanol özütünün su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: etanol > metanol>su. Şekil 4,7'de ise 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında metanol, etanol ve su özütünün maruz kalan osteosarkoma hücre dizisinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.

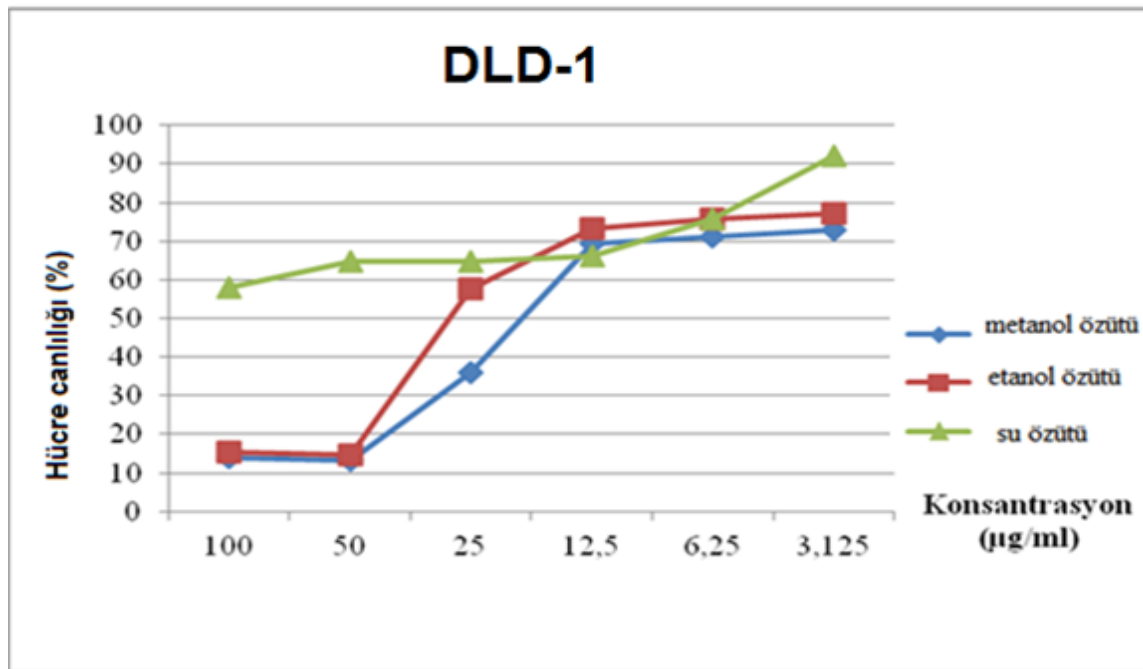


Şekil 4.7. Metanol, etanol ve su özütlerine maruz kalan Osteosarkoma hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

4.4.4. Özütlerin insan DLD-1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Metanol, etanol ve su özütünün DLD-1 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak özüt ile muamele edilmemiş DLD-1 kanser hücre dizileri kullanılmıştır. DLD-1 hücre dizisi metanol özütü ile muamele edildiğinde metanol özütü için, 100 µg/ml'de %13,8; 50µg/ml'de %13,4; 25 µg/ml'de %36; 12,5 µg/ml'de %69,2; 6,25 µg/ml'de %71; 3,125 µg/ml'de %73 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Etanol özütü ise 100 µg/ml'de %15,5; 50µg/ml'de %14,7; 25 µg/ml'de %57,6; 12,5 µg/ml'de %73,3; 6.25 µg/ml'de %75,6; 3,125 µg/ml'de %77,2 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün konsantrasyona bağlı olarak DLD-1 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak DLD-1 hücre dizisinde metanol ve etanol özütünün su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: etanol > metanol>su. Şekil 4,8'de ise 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında metanol, etano ve su özütünün maruz kalan DLD-1 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.



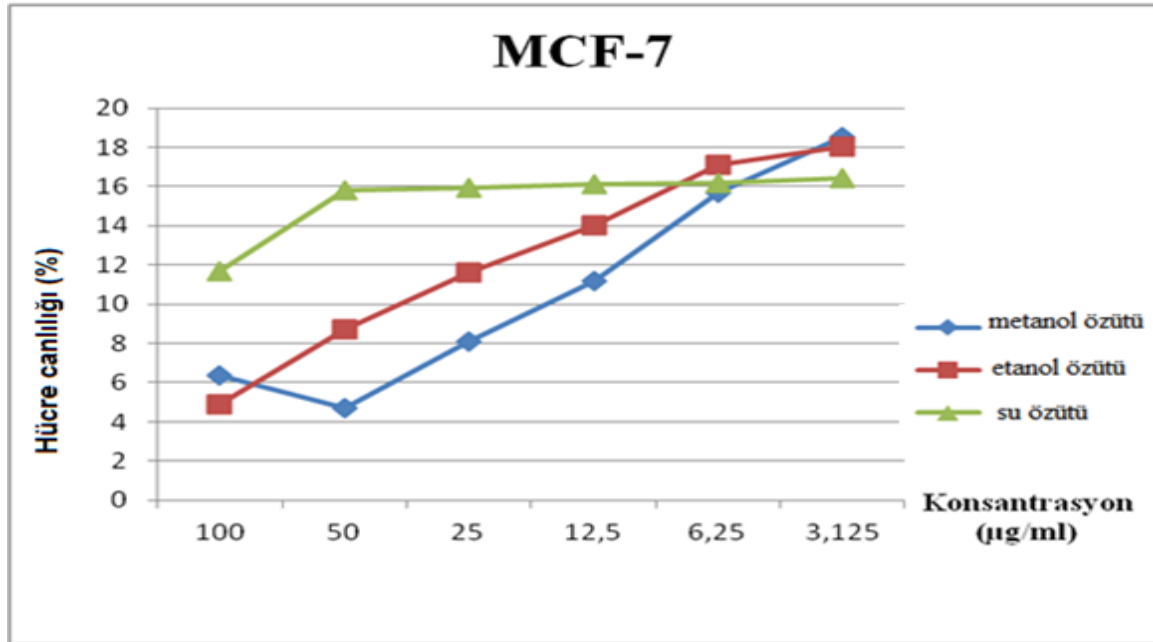
Şekil 4.8. Metanol, etanol ve su özütlerine maruz kalan DLD-1 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

4.4.5. Özütlerin insan MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Metanol, etanol ve su özütünün MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak özüt ile muamele edilmemiş MCF-7 kanser hücre dizileri kullanılmıştır. MCF-7 hücre dizisi metanol özütü ile muamele edildiğinde metanol özütü için, 100 µg/ml'de %6,4; 50µg/ml'de %4,7; 25 µg/ml'de %8,1; 12,5 µg/ml'de %11,2; 6,25 µg/ml'de %15,7; 3,125 µg/ml'de %18,5 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Etanol özütü ise 100 µg/ml'de, %4,9; 50µg/ml'de %8,7; 25 µg/ml'de %11,6; 12,5 µg/ml'de %14; 6.25 µg/ml'de %17,1; 3,125 µg/ml'de %18 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün konsantrasyona bağlı olarak MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak MCF-7 hücre dizisinde metanol ve etanol özütünün su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: etanol > metanol>su.

Şekil 4,9'de ise 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında metanol, etanol ve su özütünün maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Metanol, etanol ve su özütlerine maruz kalan MCF-7 hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

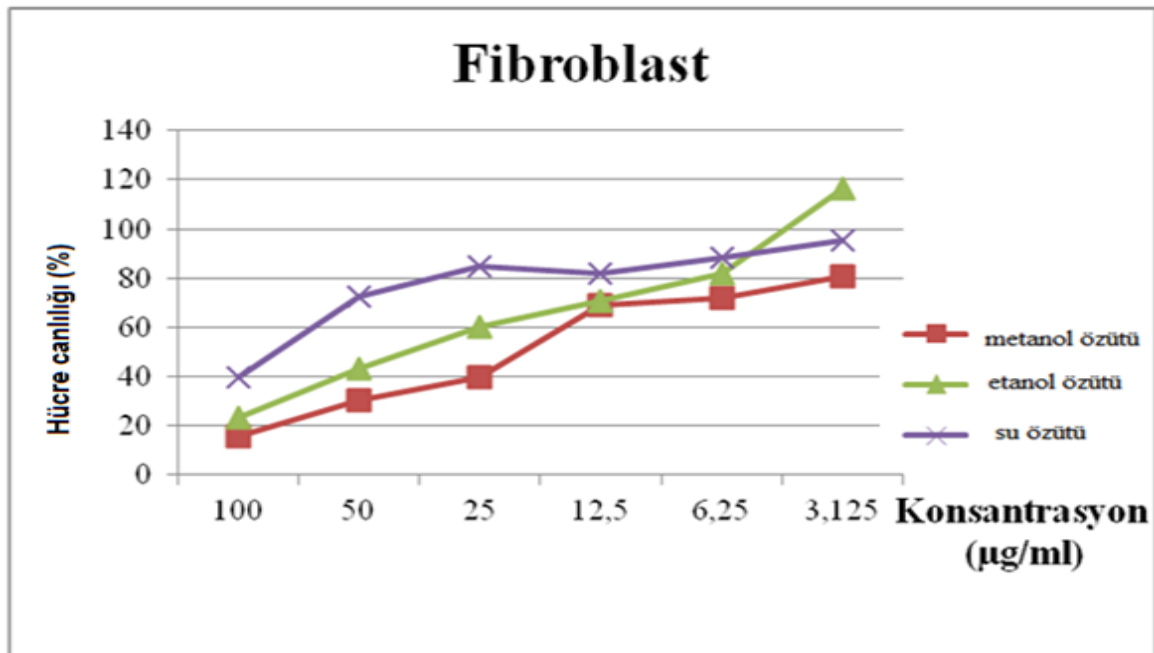
4.4.6. Özütlerin insan fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Metanol, etanol ve su özütünün fibroblast hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak özüt ile muamele edilmemiş fibroblast kanser hücre dizileri kullanılmıştır.

Fibroblast hücre dizisi metanol özütü ile muamele edildiğinde metanol su özütü için, 100 µg/ml'de, %15,8; 50 µg/ml'de, %30,6; 25 µg/ml'de %39,8; 12,5 µg/ml'de %69,1; 6,25 µg/ml'de %72,1; 3,125 µg/ml'de %80,5 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Etanol su özütü için ise 100 µg/ml'de %23,6; 50 µg/ml'de, %43,6; 25 µg/ml'de %60,1; 12,5 µg/ml'de %70,8; 6,25 µg/ml'de %81,7; 3.125 µg/ml'de %116,4 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün konsantrasyona bağlı olarak fibroblast hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak fibroblast hücre dizisinde metanol ve etanol özütünün su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: etanol > metanol > su.

Şekil 4.10'de ise 3,125-100 µg/ml derişimleri arasında metanol, etanol ve su özütünün maruz kalan fibroblast hücre dizisinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.



Şekil 4.10. Metanol, etanol ve su özütlerine maruz kalan Fibroblast hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

4.4.7. Özütlere IC_{50} değerleri

Metanol, etanol ve su özütünün DLD-1 hücre dizisi için IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekildedir; 26,92 $\mu\text{g/ml}$, 36,03 $\mu\text{g/ml}$, 120,75 $\mu\text{g/ml}$. Ayrıca metanol, etanol ve su özütünün Osteosarkoma hücre dizisi için IC_{50} değerleri ise sırasıyla 47,94 $\mu\text{g/ml}$, 63,56 $\mu\text{g/ml}$ ve 65,24 $\mu\text{g/ml}$. MCF-7 hücre dizisi için <3,125'tir. Fibroblast hücrelerinde metanol, etanol ve su özütünün IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekildedir; 34,86 $\mu\text{g/ml}$, 53,92 $\mu\text{g/ml}$, 84,41 $\mu\text{g/ml}$.

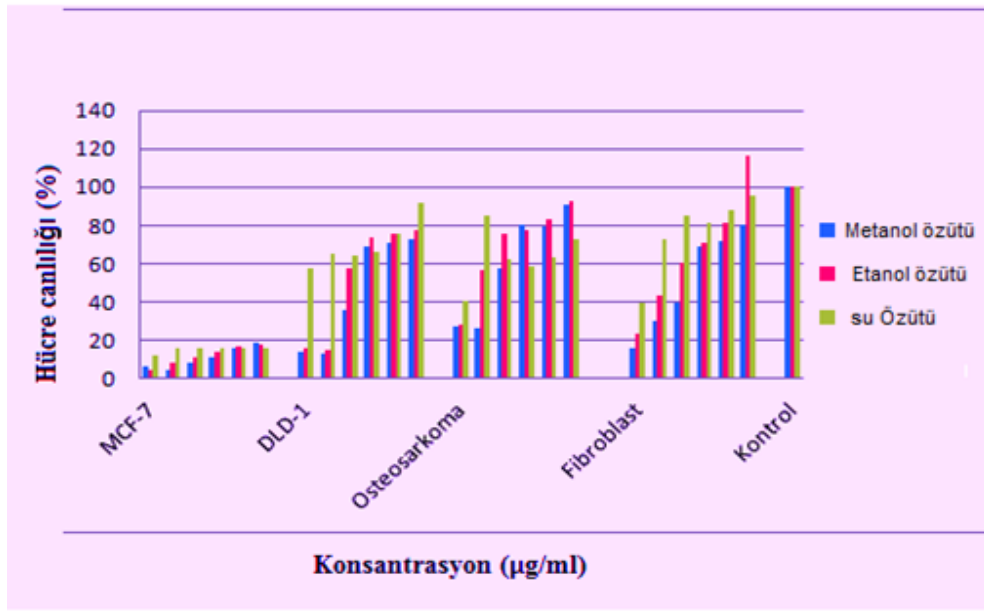
Çizelge 4.6. Özütlere muamele edilmiş Fibroblast, MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 hücrelerin IC_{50} değerleri

Hücre Hattı	Özüt İsmi	IC_{50} Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)
Fibroblast	Metanol	34,86
	Etanol	53,92
	Su	84,41
MCF-7	Metanol	<3,125
	Etanol	<3,125
	Su	<3,125
Osteosarkoma	Metanol	47,94
	Etanol	63,56
	Su	65,24
DLD-1	Metanol	26,92
	Etanol	36,03
	Su	120,75

Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün derişime bağılı olarak MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre dizileri üzerine sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca özütlere etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: MCF-7 > DLD-1 > Osteosarkoma > Fibroblast

MCF-7 hücre dizisi üzerinde DLD-1 ve Osteosarkoma'ye göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre dizisi üzerine metanol özütünün etanol ve su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca etanol özütü su özütü göre tüm hücre hatlarında daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak her üç kanser hücre dizisinde de metanol özütünün etanol ve su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



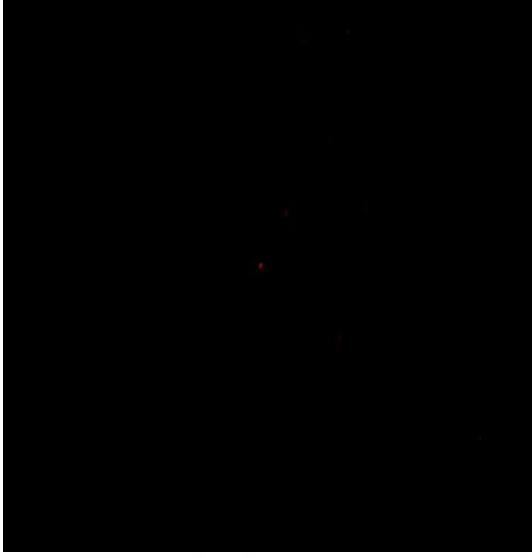
Şekil 4.11. Metanol, etanol ve su özütlerine maruz kalan MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre dizisinin nispi hücre canlılığı

4.5. Özütle Muamele Edilen HeLa Hücre Dizisinde Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

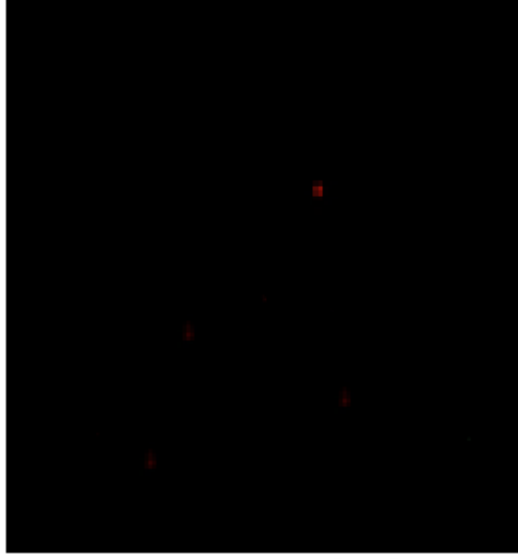
Çalışmada HeLa hücre dizileri 10 mg/ml derişimdeki etanol özütü ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonra özütün HeLa üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla propidium iyodür (PI), 3',3'- 6,4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve diheksiloksakarbosiyenin iyodid (DiOC6) floresan boyamaları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

4.5.1. Propidium iyodür (PI) boyama

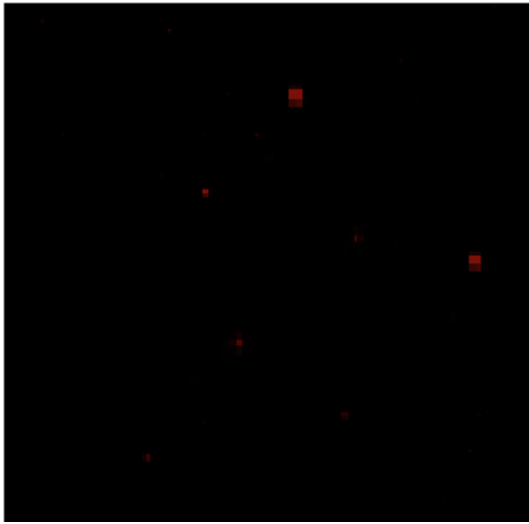
PI boyası membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyama özelliğindedir. 10 mg/ml derişimde özütlerle muamele edilmiş ve edilmemiş HeLa hücre dizisindeki ölü hücreler PI boyama ile belirlenmiş ve floresan mikroskopunda görüntülenmiştir ((Resim4.8-Resim 4.11) Özüt ile muamele edilmeyen HeLa hücrelerinin 4x büyütmedeki floresan mikroskop görüntülerinde ölü hücre bulunmadığından fotoğraf karesi siyah olarak görülmüştür Etanol özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinde ise ölü hücrelerin PI ile kırmızı renk verdiği görülmüştür. Sonuç olarak 10 mg/ml derişimdeki etanol özütünün HeLa hücrelerinin hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir.



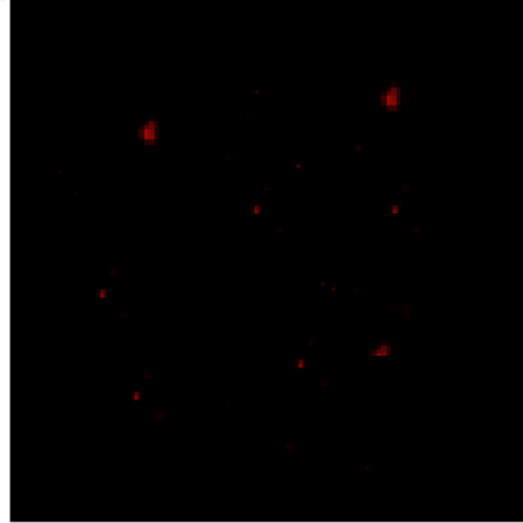
Resim 4.8. HeLa hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür)



Resim 4.9. *S. khuzestanica* bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş HeLa 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür)



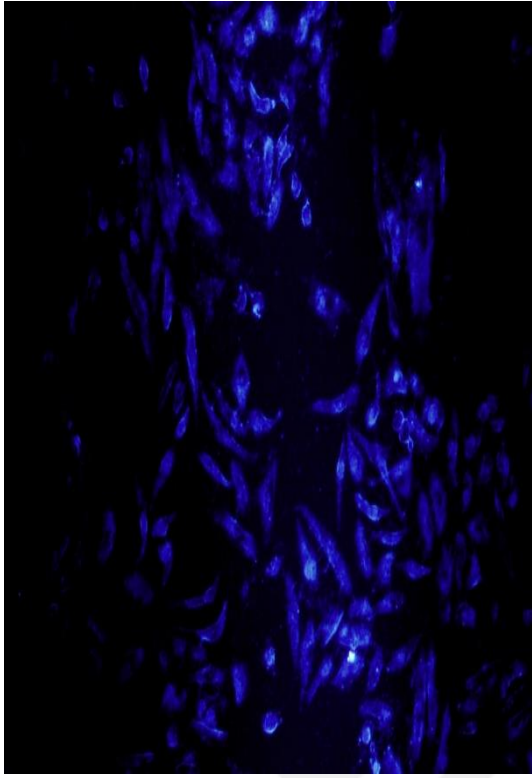
Resim 4.10. *S. khuzestanica* bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür)



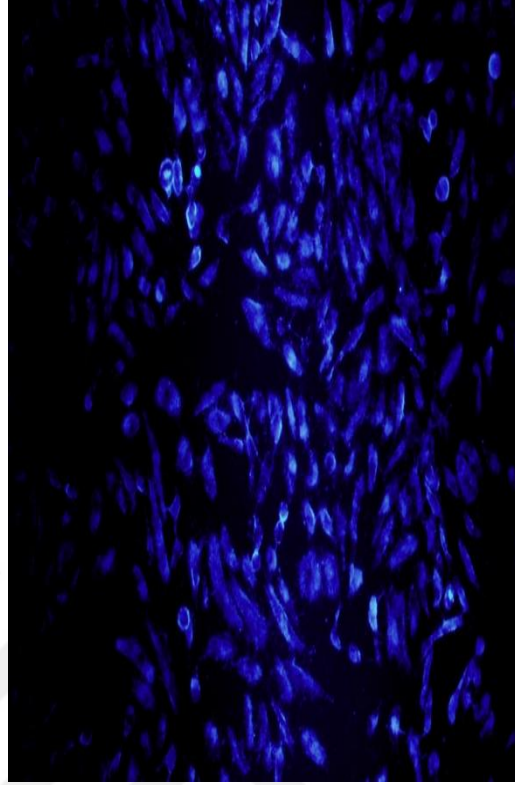
Resim 4.11. *S. khuzestanica* bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür)

4.5.2. Apoptotik etkinin DAPI boyama ile belirlenmesi

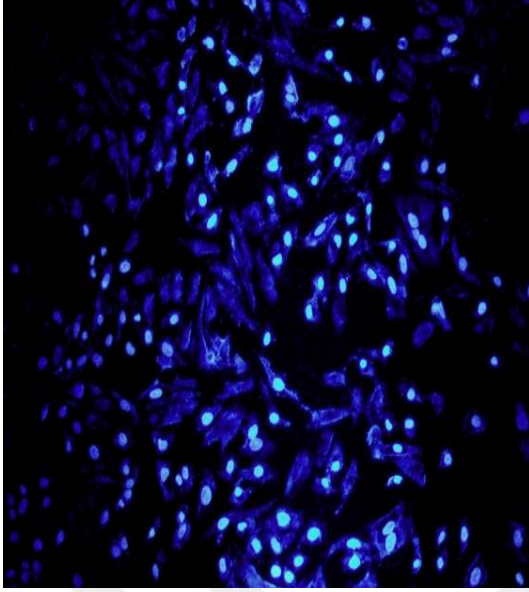
Çalışmada 10 mg/ml derişimdeki metanol, etanol ve su özütünün HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiştir. Apoptotik nükleuslu hücreler floresan mikroskop alanında parlak mavi renkli olarak görülmüştür. DAPI ile boyanmış kontrol grubu HeLa hücrelerinin ve özütlerle muamele edilmiş olan HeLa hücrelerinin 4x büyütmedeki ışık ve floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.12 - 4.15'da verilmiştir. HeLa hücrelerinde parlak mavi lekeli olmayan hücreler normal nükleuslu olup, kontrol grubunda fazla miktarda bulunmuştur. Özütle muamele edilmeyen HeLa hücrelerine göre özüt uygulanmış olan hücrelerde apoptotik nükleusların daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Sonuç olarak DAPI boyamada, kontrol grubu HeLa hücrelerinde apoptotik nükleuslu hücreler çok az sayıdayken, metanol etanol ve su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinde apoptotik hücreler görülmüştür. Özütler HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğu söylenebilir. Methanol ve etanol özütü ile muamele edilen Hela hücrelerinin sayısı su özütüne göre daha fazla görülmektedir. Bu durumda metanol ve etanol özütü ile muamele edilen Hela hücrelerinin daha fazla apoptotik etkili olduğu görülmektedir.



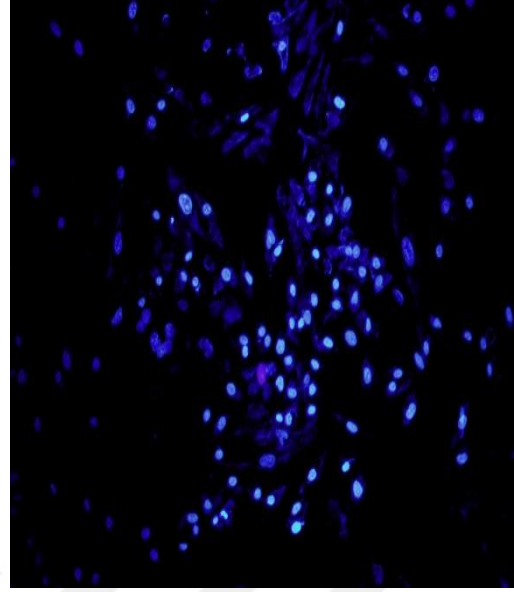
Resim 4.12. Hela hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)



Resim 4.13. *S. khuzestanica* bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş Hela 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)



Resim 4.14. *S. khuzestanica* bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)

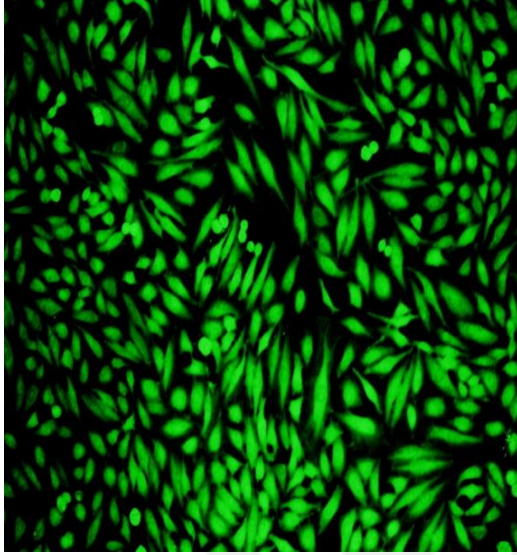


Resim 4.15. *S. khuzestanica* bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri (DAPI ile boyanan apoptotik hücrelerin nükleik asitlerin mavi renkte görülür)

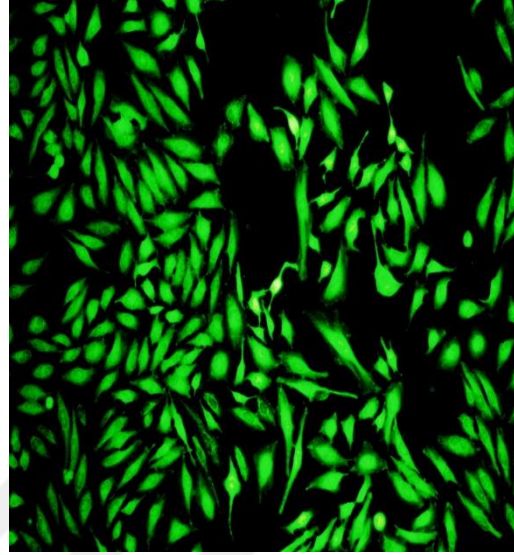
4.5.3. Apoptotik etkinin DiOC6 boyama ile belirlenmesi

DiOC6 canlı hücreleri boyayan, yeşil floresan renk veren, mitokondriye özel voltaj bağımlı bir boya olduğundan erken apoptotik hücrelerdeki mitokondriyal değişimleri göstermek için kullanılmaktadır. Erken apoptotik hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) azaldığından dolayı hücrelerin DiOC6 boya alımı da azalmaktadır. Çalışmada 10 mg/ml derişimdeki özütlerle 24 saat muamele edilmiş HeLa hücreler ve muamele edilmemiş kontrol grubu HeLa hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyelini belirlemek amacıyla DiOC6 boyama yöntemi kullanılmıştır. Özüt ile muamele edilmiş HeLa hücreleri ve kontrol grubu olan HeLa hücrelerinin DiOC6 boyama sonrasında 4x büyütmede floresan mikroskop görüntüleri Resim 4.16- Resim 4.19'da verilmiştir. Resimlerde görülebileceği gibi, kontrol grubu olan HeLa hücreleri floresan mikroskopta yeşil renk vermiştir. Alandaki çoğu hücre apoptoza gitmediği için hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olmamış ve alandaki hücreler yeşile boyanmıştır. Etanol ve metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin kontrol grubuna göre DiOC6 ile boyanan hücre sayısının daha az olduğu görülmüştür. Özüt ile muamele edilen hücrelerin

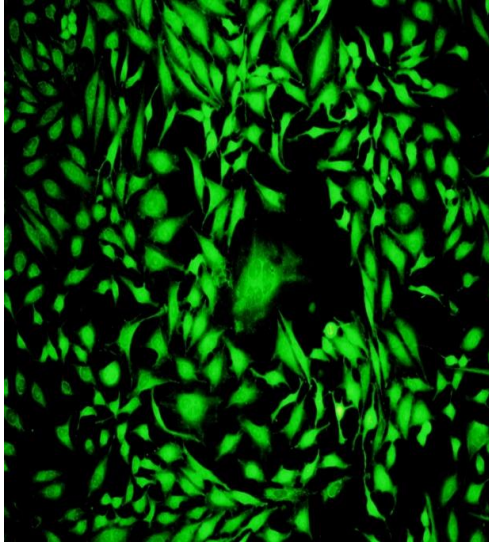
DiOC6 ile daha az boyandığı dolayısıyla mitokondriyal membran potansiyelinde azalma olduğu için apoptoza gittiği tespit edilmiştir.



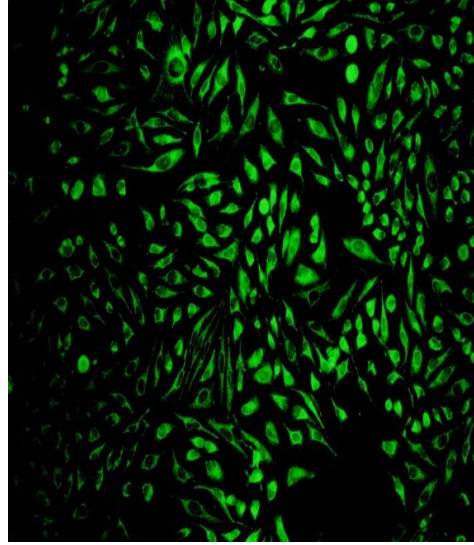
Resim 4.16. HeLa hücrelerinin (Kontrol) 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.)



Resim 4.17. *S. Khuzestanica* bitkisinin su özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc₆ ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.)

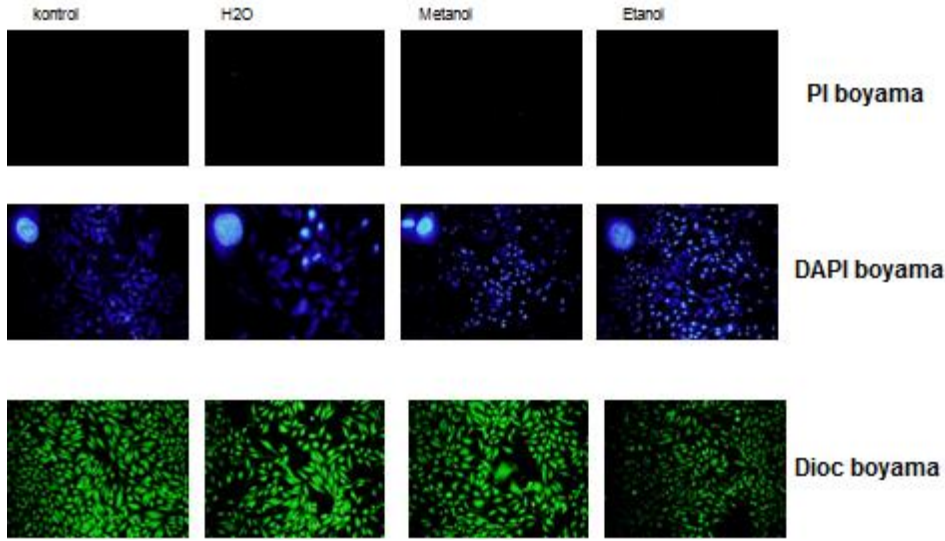


Resim 4.18. *S. Khuzestanica* bitkisinin etanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc6 ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.)



Resim 4.19. *S. Khuzestanica* bitkisinin metanol özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri. (Dioc6 ile boyanan canlı hücreler floresan mikroskopta yeşile renkte görülür.)

Metanol, etanol ve su özütünün PI, DAPI ve DiOC6 boyamaları Hela hücreleri üzerinde etkisi Resim 4.20 'de görülmektedir. PI boyamada metanol ve etanol özütünün su özütüne göre kanser hücrelerinin ölümünde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. DAPI boyamada da metanol ve etanol özütü ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik nükleus görüntüsünün su özütüyle muamele edilen hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. DiOC6 boyamada ise metanol ve etanol özütü ile muamele edilen hücrelerin su özütüne göre mitokondriyal membran potansiyelinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak tüm floresan boyamalarda metanol ve etanol özütünün suya göre etkili olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.20. Kontrol, *S. khuzestanica*'nın su, metanol, etanol, özütü ile muamele edilmiş Hela hücrelerinin 4x floresan mikroskop görüntüleri

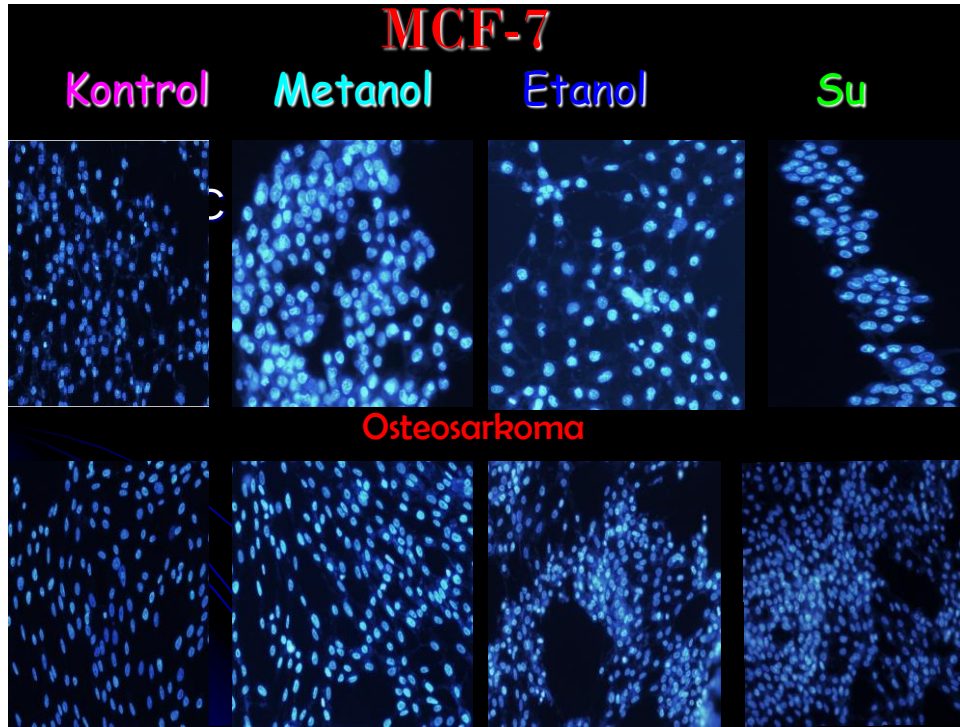
4.5.4. Hoechst 33342, propidiyum iyodür (PI) ile ikili boyama yöntemi

Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen dolayısıyla hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik / nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır.

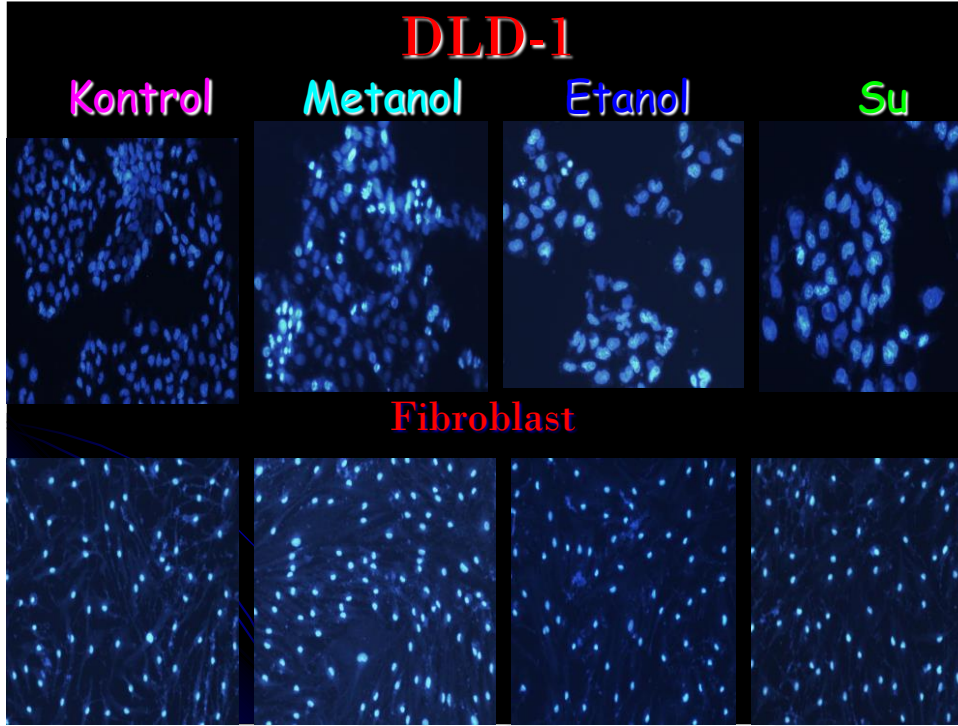
Propidium iyodür (PI), sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik ve ya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır.

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları bozulmamış (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptoz/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler canlı olmayan boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran bozulmamış olmasından dolayı bu boyalarla boyanamazlar. Yani PI negatifve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadır. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile canlı olmeyen boyalar ile boyanmaya başlarlar. İkili boyama yöntemi kullanılarak bileşiklere maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdek normal hücrelere göre daha küçük olmalıdır. Apoptotik nükleuslu hücreler floresan mikroskop alanında parlak mavi renkli ve

lekeli olarak görülmüştür. Bu amaçla, bileşiklerin hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için ikili boyama yöntemi kullanıldı. Etanol ve metanol özütü ile muamele edilmiş MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücrelerinin kontrol grubuna göre en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: Metanol > etanol > su. Sadece fibroblast hücrelerde anlamlı bir sonuç bulunamadı (Resim 4.21 ve Resim 4.22).



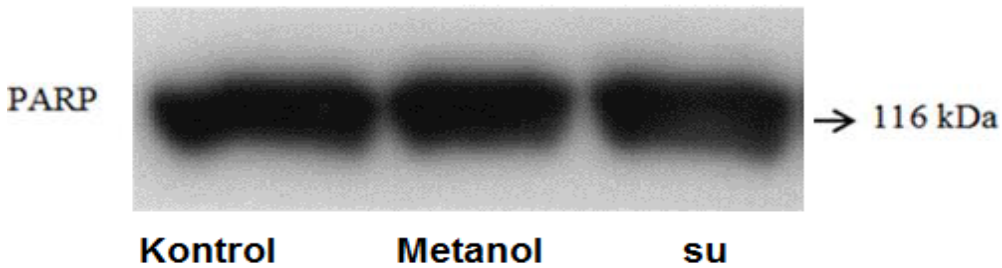
Resim 4.21. Kontrol, *S. khuzestanica* bitkisinin metanol, etanol, su, özütü ile muamele edilmiş MCF-7, osteosarkoma hücrelerinin ikili boyama 4x floresan mikroskop görüntüleri



Resim 4.22. Kontrol, *S. khuzestanica* bitkisinin metanol, etanol, su özütü ile muamele edilmiş DLD-1 ve Fibroblast hücrelerinin ikili boyama 4x floresan mikroskop görüntüleri

4.6. Western Blotlama

Çalışmada floresan boyamalarda metanol özütünün su'ya göre apoptotik etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metanol ve su özütünün HeLa hücre dizileri üzerindeki apoptotik etkisi Western Blotlama yöntemiyle de araştırılmıştır. 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol özütü ile muamele edilen ve edilmeyen (kontrol) HeLa hücrelerinin PARP proteinleri izole edilmiş ve Western blotlamaları yapılmıştır (Resim 4.23).

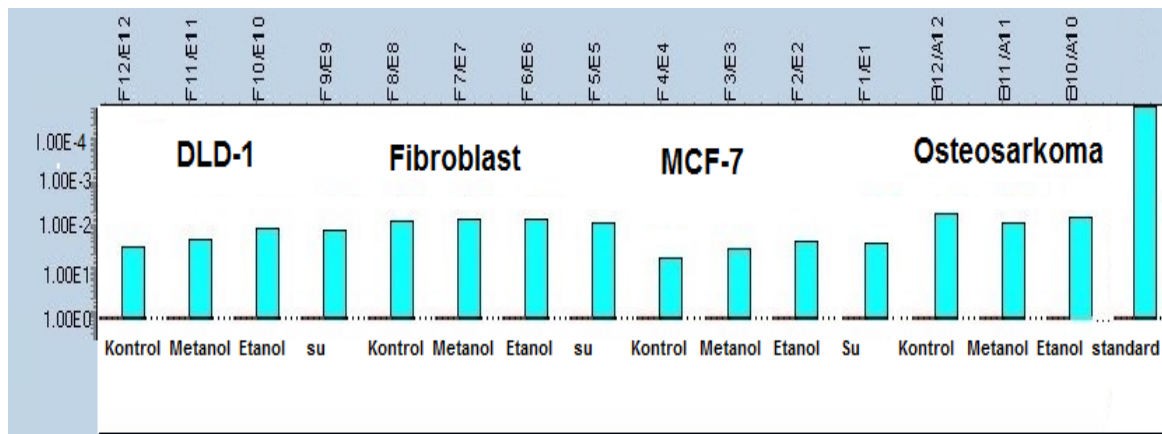


Resim 4.23. PARP protein bantlarının Western blotlama yöntemi ile gösterimi

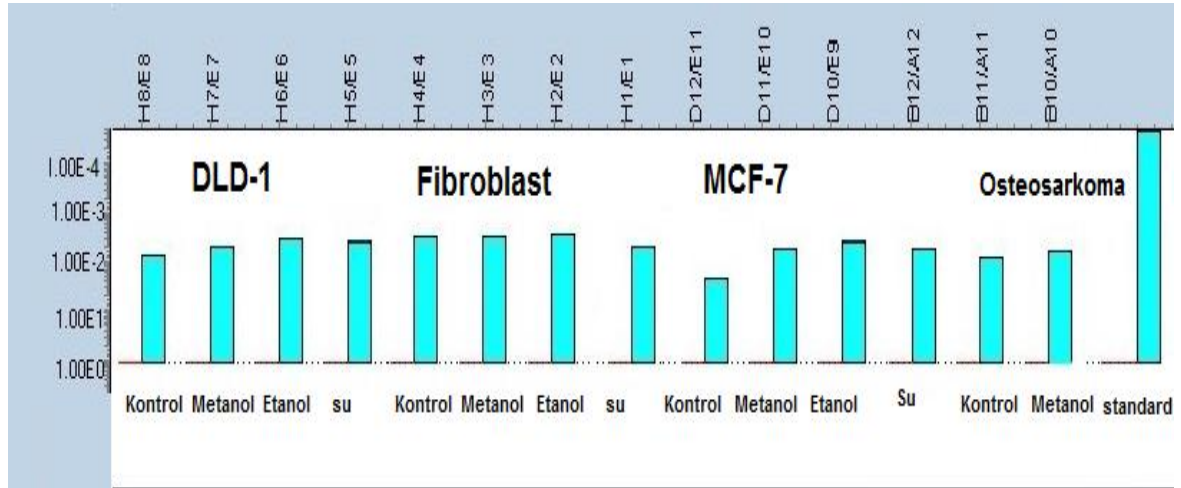
Resim 4.23’da Western blotlama yönteminde özüt uygulanan ve uygulanmayan grupların Poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) protein bantları görülmektedir. Bilindiği üzere kaspazların ve PARP’ın aktivasyonu apoptoz uyarılmasında önemli bir biyomarkırdır. 116 kDa büyüklüğündeki PARP proteinine ait bantlar, hem kontrol hem de özüt uygulanan grupta aynı hizada görülmektedir. Metanol ve su özütü uygulanan HeLa hücrelerinin PARP protein büyüklüğünün kontrol grubununki ile aynı olduğu görülmüştür. PARP proteini parçalanmamış ve dolayısıyla özüt uygulanan grupta hücrelerin apoptoza gitmediğini görülmüştür. Sonuç olarak Western blotlama yöntemi ile 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol ve su özütünün HeLa üzerinde apoptotik etkili olmadığı tespit edilmiştir.

4.7. Genlerin İfade Edilmesinin Eş Zamanlı PZR Ölçümü

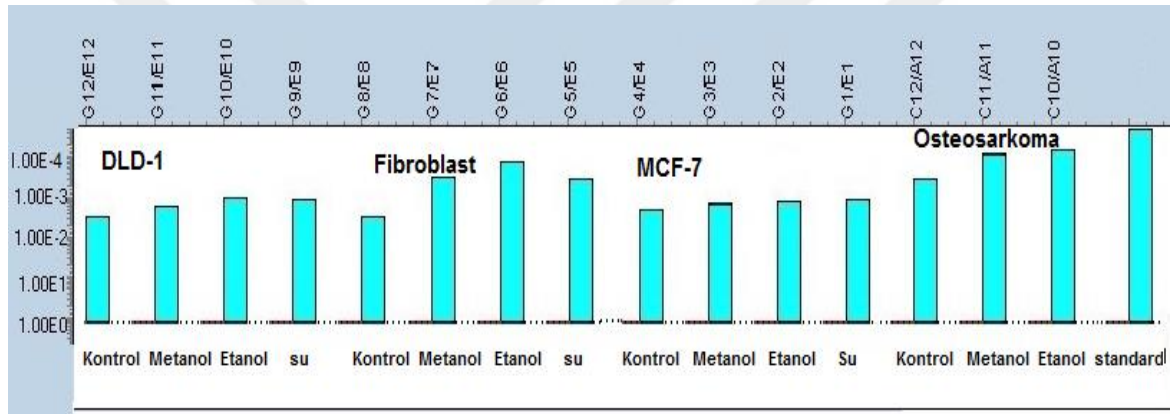
Çalışmada floresan boyamalarda metanol ve etanol özütünün su’ya göre apoptotik etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metanol, etanol ve su özütünün MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 ve fibroblast hücre dizileri üzerindeki pro-apoptotik (*Kaspaz-3* ve *Bax*) ve anti-apoptotik (*Bcl-2*) genlerin mRNA ifade düzeylerine eş zamanlı PZR yöntemiyle de araştırılmıştır. 12,5 µg/ml konsantrasyondaki metanol, etanol ve su özütü ile muamele edilen ve edilmeyen (kontrol) MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 ve fibroblast hücrelerinin RNA’ları izole edilmiş ve eş zamanlı PZR yapılmıştır. *Bax/GAPDH*, *Kaspaz 3/GAPDH*, *Bcl2/GAPDH* geninlerin mRNA düzeyinde kantitatif ifadesi belirlenmiştir (Şekil 4.12-4.14).



Şekil 4.12. *Bax/GAPDH* geninin mRNA düzeyinde kantitatif ifadesi



Şekil 4.13. Kaspaz3/GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesi



Şekil 4.14. *Bcl-2*/GAPDH geninin kantitatif ifadesi

Pro-apoptotik (*caspaz-3* ve *Bax*) ve anti-apoptotik (*Bcl-2*) genlerin mRNA ifade düzeylerine normalize etmek için seçilen GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren eş zamanlı PZR tepkimesi Şekil 4.12 -4.14'da gösterilmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta C_t(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta C_t(\text{kontrol-örnek})}}$$

Eşitlikte belirtilen C_t , tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin C_t değerleri arasındaki farkı göstermektedir.

Şekil.4.13. ve 4.14. göre Fibroblasta kontrol ve özütler arasında bir farklılık görülmediğinden dolayı özütün Fibroblast hücreleri üzerinde apoptotik bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

MCF-7 hücre dizisi üzerinde DLD-1 ve Osteosarkoma'ye göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma hücre dizisi üzerine etanol ve su özütü metanol özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca etanol özütü su özütüne göre tüm hücre hatlarında daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak eş zamanlı PZR yönteminde MCF-7 üzerinde 12,5 µg/ml konsantrasyondaki etanol ve su özütünün apoptotik etkili olduğu tespit edilmiştir. Etanol özütü kanser hücre dizilerinden MCF-7da en etkili bulunmuştur.

4.8. Bitki Özütlerinin Plazmit DNA Üzerine Etkisi

DMSO'da çözülerek 1×10^4 µM olarak hazırlanan metanol ve etanol özütlerinin plazmit DNA üzerine etkisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Bileşiklerin DMSO içerisindeki çözeltileri 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 µM olacak şekilde farklı derişimlerde hazırlandıktan sonra plazmit DNA ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra DNA-özüt karışımı agaroz jel ile elektroforezde yürütülerek UV görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilmiştir. Etkili özüt olan metanol ve etanol özütlerinin 24 ve 48 saat süreyle plazmit DNA üzerine etkisini gösteren elektrofotogramlar Resim 4.24'de verilmiştir.

Metanol özütüyle plazmit DNA'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde ve yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür. Ancak derişim azaldıkça form II hareketliliğinde en düşük üç derişimde değişiklik olmadığı görülmüştür. En yüksek derişimde form III hareketliliğinde azalma olmuştur. Beşinci derişimde ise form III sonrasında form I oluştuğu görülmüştür. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda çoğalma olduğu görülmüştür (Resim 4.24(A)).

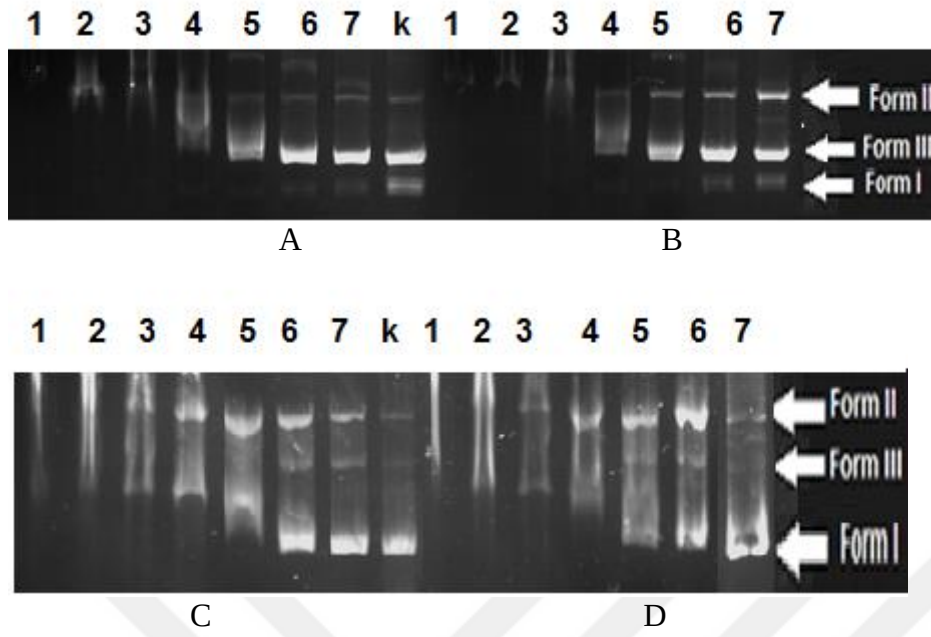
Etanol özütüyle plazmit DNA'nın 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde ve yoğunluğunda artış olduğu

görülmüştür. Ancak derişim azaldıkça form II hareketliliğinde en düşük üç derişimde değişiklik olmadığı görülmüştür. En yüksek derişimde form III hareketliliğinde azalma olmuştur. Dördüncü derişimde ise form III sonrasında form I oluştuğu görülmüştür. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda çoğalma olduğu görülmüştür (Resim 4.24 (B)).

Metanol özütüyle plazmit DNA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, form I (süper sarmal form), form II (açık halkasal form) ve form III (doğrusal form) oluşumu gözlenmiştir. altıncı derişimden sonr form III oluştuğu görülmüştür. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde çoğalma olduğu görülmüştür.

En düşük beşinci derişimde ise form I kaybolmuş ve form III gözlenmiştir. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form I yoğunluğunda çoğalma olmuştur. Ancak derişim azaldıkça form I hareketliliğinde en düşük üç derişimde değişiklik olmadığı ve yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür. (Resim 4.24 (C)).

Etanol özütüyle plazmit DNA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, en yüksek dört derişimde form III kaybolmuş ve sonra derişim azaldıkça form III hareketliliğinde azalma olmuştur. Yüksek derişimden düşük derişime gidildikçe form II hareketliliğinde yoğunluğunda çoğalma olduğu görülmüştür. İlk dört yüksek derişimde form I hareketliliğinde ve yoğunluğunda azalma olduğu görülmektedir. Son üç düşük derişimde form I yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür (Resim 4.24 (D)).



Resim 4.24. (A) Metanol özütünün 24saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (B) Etanol özütünün 24 saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (C) Metanol özütünün 48saat plazmit DNA üzerinde etkisi, (D) Etanol özütünün 48saat plazmit DNA üzerinde etkisi, Kontrol (K)



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkileri kullanarak tedavi etme yöntemi olan fitoterapi, tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bitkilerin önemli bir ilaç kaynağı olduğu düşünüldüğünde, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilerek ve standardizasyonları yapılarak kullanılması gerekir. Pek çok ülkede kanser, kalp hastalıklarından sonra en fazla ölüme neden olan hastalık grubunu oluşturmaktadır. Türkiye ve ABD'deki kanser hastaları arasında alternatif tıbbı başvuranların oranı sırasıyla % 30-70; % 30-75 arasında değişebilmektedir. Bu durum farklı ülkelerin florasından muhtemel anti kanser ajanların ortaya çıkarılması alanındaki yoğun çabalar için itici güç oluşturmaktadır. Günümüzde aktif olarak kullanılan anti kanser ilaçlarının sınırlı tipte kansere karşı etki gösterebilmeleri ve benzer nedenlerle, bütün dünyada kanser araştırma laboratuvarları yoğun bir şekilde sentetik ve doğal kaynaklardan yeni kemoterapotik madde arama çalışmaları yürütmektedirler [79].

Kanser dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Kanser tedavisinde, doğal ürünlerden elde edilen yeni ilaçlardan yararlanabilir. Doğal ürünler kanser tedavisi için kullanılan mevcut ilaç ajanların çoğu için bir temel oluşturmak adına hizmet etmektedir. Daha etkili ve daha az toksik anti kanser ilaçların geliştirilmesi gerekliliği, farmakolojik olarak aktif olan yeni kaynaklar keşfetmek için araştırmalara yol açmıştır. Doğal ürünler kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Antikanser ilaçları geliştirmek için iyi bir aday olabilirler. Bitkilerden izole edilen taksol ve vinkristin gibi birçok kemoterapötik ilaç, anti-kanser bileşiklerini keşfetmede önemli bir potansiyel olmuştur. Bu nedenle, bitkisel kaynaklı yeni antikanser tedaviler için aktif bileşikler umut verici olabilirler. Özellikle endemik bitki kaynaklarından ilaç geliştirme programları, hala yeni sitotoksik ajanlar keşfetmek için önemli bir araç olmaya devam etmektedir. Bu nedenle *S. khuzestanica* daha öncelerden anti-kanser özelliği çalışılmadığı için bu çalışmada bulduğumuz sonuç literatüre ilk defa girecektir [79].

Çalışmamızda *S. khuzistanica* bitkisinin metanol, etanol, su özütlerinin farklı derişimlerdeki antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik etkileri ve plazmit DNA ile etkileşimleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, endemik *S. khuzistanica* bitki özütlerinin 25, 50, 100, mg/ml derişimlerdeki antimikrobiyal etkisine agar kuyucuk ve MİK yöntemiyle bakılmıştır. Bitkinin etanol özütünün mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, 25 mg/ml’de etanol özütünün *B. cereus*’daki zon çapının $19,6 \pm 0,5$ mm, *E. coli* ‘deki (ATCC 35218) zon çapının $18,6 \pm 0,5$ mm, *B. subtilis*’deki zon çapının $18,3 \pm 0,4$ mm, *E. faecalis*’deki zon çapının $17,3 \pm 0,4$ mm, *C. albicans*’daki zon çapının $16 \pm 0,5$ mm, *P. aureginosa*’daki zon çapının $16 \pm 0,4$ mm, *S. aureus*’daki zon çapının $14 \pm 1,2$ mm, *C. tropicalis*’daki zon çapının $14 \pm 0,4$ mm, *P. vulgaris*’daki zon çapının $13,2 \pm 0,6$ mm, *E. coli*’deki (ATCC 25922) zon çapının $13,6 \pm 0,4$ mm olduğu tespit edilmiştir. Bitkinin su özütünün mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Metanol ve etanol özütü su özütüyle kıyaslandığında daha fazla türde bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve daha geniş çapta inhibisyon zonuna sahip olduğu saptanmıştır. Bakterilerin MİK değerlerinin 6,25-50 mg/ml derişimde değiştiği tespit edilmiştir.

Hayouni ve ark. (2007), farklı yöntemler ve farklı polariteye sahip çözücüler kullanarak yaptıkları araştırmaları sonucunda % özütlerin verimleri miktarları üzerine polar çözücülerin apolar çözücülerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak, çalışmamızda kullanılan bitkilerde ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon % verimleri genel olarak su > etanol >aseton sıralaması şeklindedir. [80]. Bu sonuçlar bizim çalışma bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Bizim çalışmada *S. khuzistanica* bitkisinin etanol, metanol ve su özütlerinin yüzde verimlilikleri araştırılmıştır ve Bitki özütleri içinde yüzde verimliliğe göre en verimli su özütü olarak bulunmuştur.

Başer ve ark. (2004), Türkiye’de doğal olarak 14 *Satureja* türünün bulunduğunu, halk arasında baharat ve bitki çayı olarak tüketildiğini, ayrıca mide ağrılarına karşı ve anti diyabetik ve anti depresan olarak kullanıldığını belirtmektedirler. Yerel olarak; Çibriska, çibrika, yer kekiği, çay kekiği, karanfil çayı, ebem kekiği, dağ anugu, çam kekiği ve kekik olarak adlandırılmaktadır. Türkiye’nin doğusunda doğal olarak bulunmakta olup, Edirne, Bursa, Balıkesir, İzmir, Denizli, Eskişehir, Konya ve Kayseri’de kültürü yapılmaktadır. *Satureja hortensis* bitkisinden toplanan 20 adet yabani ve kültür örneklerinin GC-MS de analiz edilmesi sonucu, yabani formlarında uçucu yağ oranı % 1,28-4,75 iken ana bileşen timol (% 29-43), kültür formlarda ise uçucu yağ oranı % 1,30-2,67 iken ana bileşen karvakrol (% 42-63) olarak bulunmuştur. *S. hortensis*’in kültüre alınmış formlarında

karvakrol, doğal formlarında ise timol ana bileşen olarak belirlenmiştir. Türkiye'nin doğusunda yetişen bitki örnekleri yağlarında timol'ün (%29-43) ana bileşen olarak tespit edilmesine karşın batısında yetişenlerde ana bileşenin karvakrol olduğu saptanmıştır [28]. *Sefidkon ve Jamzad Iran. (2004)*, *Satureja* türlerinden suyla damıtma ve gaz kromatografisinde elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri türlere göre şunlardır: *Satureja mutika* ana bileşenler karvakrol % 30,9, timol % 26,5, γ -terpinen % 14,9, psimen %10,3 olmak üzere 45 bileşen tespit edilmiştir. *Satureja macrantha*'nın ana bileşenleri p-simen% 25,8, limonen % 16,3, timol % 8,1 olmak üzere 65 bileşen bulunmuştur. *Satureja intermedia*'nin uçucu yağında ana bileşenler timol % 32,3, γ -terpinen % 29,3, p-simen % 14,7 olmak üzere 38 bileşen olarak tespit edilmiştir [31]. Tüm bu türlerin ortak özelliği yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşenin karvakrol veya timol olmasıdır. Bunlar kekiğin kendine özgü kokusunu veren maddelerdir. Karvakrol ve timol hücre membranını geçirgen hale getirerek, proton hareket ettirici gücü yok etmekte ve ATP sentezini engellemektedir. Ayrıca bu maddeler tümör gelişmesini engelleyici bir etkiye sahiptirler. Bizim bu bitkinin seçmemiz en önemli sebeplerimizden biri, bu bitkinin karvakrol ve timol oranı yüksek olmasıdır.

Gouyon ve ark. (1986), *Thymus vulgaris* populasyonlarından kemotipleri(timol ve karvakrol) kireç taşı tepeliklerinde ve yüksek yaylalarda doğal olarak yetişmektedir. Bu kemotipler arasında hassas bir ilişki bulunmaktadır. Toprak tipinde bir değişimin olduğu yerlerde kemotipler arasında birkaç metrede bile farklılıklar bulunabilmektedir [81]. *Svoboda ve ark. (1994)*, Tarlada kültürünü yaptıkları *Satureja thymbra* uçucu yağını, Haziran ayı başlangıcında % 1 iken Ağustos'a kadar % 3.5 ulaştığını belirtmişlerdir. En yüksek uçucu yağ üretiminin zamanı Ağustos olduğunu açıklamışlardır [82]. Bizim çalışmamızda *S. Khuzistanica* toprak sıcaklığının fazla olduğu yerlerde İran'ın sıcak güney kesimlerinde Lorestan'ın dağlık alanlarında çatlamış kireçtaşlarının üzerinde ve dağların eteklerindeki tepelerde Temmuz ayında toplanmıştır.

Sefidkon ve ark. (2005), İran'da kültürü yapılan *Satureja hortensis* ve *Satureja khuzistanica* tam çiçeklenme döneminde toplanmış ve üç farklı şekilde (Güneşle kurutma, 45 derecelik fırında kurutma ve gölgede kurutma) kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki parçaları üç şekilde damıtılmıştır (su ile damıtma, su ve buhar ile damıtma, sade buhar ile damıtma). Damıtıldıktan sonra GC ve GC/MS yöntemleriyle uçucu yağ bileşenleri elde edilmiştir. İstatistiksel analizler sonucu üç kurutma yöntemiyle elde edilen uçucu yağların

miktarlarında kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir. Uçucu yağ oranları fırında kurutma da % 1,06, gölgede kurutma da % 0,94, güneşte kurutmada % 0,87 olmuştur. Su ile damıtma yöntemi (%0,94) buharla damıtmaya göre % 0,27 daha fazla yağ içeriği elde edilmiştir. Farklı kurutma metotlarıyla 23 bileşen tespit edilmiştir. Ana bileşenler karvakrol % 46-48,1, γ - terpinen % 37,7-39,4 tür. Farklı damıtma metotlarıyla elde edilen yağlarda 17 bileşen bulunmuştur. Ana bileşenler karvakrol % 12,3- 46, γ - terpinen % 37,7- 70,4'tür. Kurutma metotlarının *Satureja hortensis*'in yağ bileşenleri üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır. Damıtma yöntemlerinin farklılığı asıl bileşenleri % 1 oranında değiştirmiştir. Buharla damıtma metodu karvakrolün değerini düşürmüş γ - terpinenin değerini yükseltmiştir. Sonuç olarak suyla damıtma en iyi sonuçları vermiştir [83]. Ziombra ve Fraszczak. (2008), İspanya'da *Satureja hortensis*'te verim için uygun ekim ve hasat tarihlerinin saptanması için yapılan araştırmada; 7, 14, 21 ve 28 Nisanda ekim yapılmış ve bitkileri çiçeklenme öncesi, çiçeklenme başlangıcı ve tam çiçeklenme dönemlerinde hasat edilmiştir. En uygun ekim zamanının 14 ile 21 Nisan olduğu, hasat zamanının ise çiçeklenme başlangıcı ve tam çiçeklenme zamanı olduğu belirtilmektedir [84]. Bizim çalışmamızda *S. khuzistanica* en yüksek uçucu yağ üretiminin zamanı yani tam çiçeklenme döneminde toplanmış, serin ve rutubetsiz bir ortamda serilerek 1 hafta süreyle kurutulmuştur.

Adıgüzel ve ark. (2007), Yaptıkları çalışmalarda *Satureja hortensis*'in metanol özütü ile uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Artvin Yusufeli ilçesinde tam çiçeklenme döneminde toplanan *Satureja hortensis*'te uçucu yağın % 1,13 olduğunu, 30 bileşen tespit edildiğini, uçucu yağın ana bileşenlerinin timol (% 40,54), γ - terpinen (% 18,56), karvakrol (% 13,98) ve p-simen (% 8,97) olduğunu, uçucu yağının 25 bakteri, 8 mantar ve bir maya üzerinde inhibe edici etki gösterdiğini bildirmişlerdir özütlerin 20 mg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite *S. aureus* ATCC 25923 (16 mm zon çapı), *Acinetobacter lwoffii* ATCC 19002 (14mm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (11mm), *E.coli* ATCC 25922 (15mm), bakterileri üzerinde orta derecede *C. albicans* ATCC 10239 (16mm) mayası üzerinde ise güçlü bir etkisi olduğunu bulmuşlardır. Bu veriler yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir fakat Çalışmamızda kullanılan özütün bu çalışmaya göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca Gram negatif bakterilerin pozitiflere göre daha dirençli olduğunu ve en dirençli olan bakterinin *P. vulgaris* olduğunu belirlenmişlerdir [85].

Kılıç (2006), *Thymbra spicata*'in uçucu yağlarının antimikrobial etkisini çalışmış ve bitkinin uçucu yağının *C. albicans* mayasına ve *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* bakterilerine karşı aktif olduğunu kaydetmiştir. Bitki uçucu yağlarında karvakrol, p-cymene, beta-myrcene, gamma-terpinene, a-terpinene ve trans-caryophyllene maddelerini belirlemiştir. Bitkinin biyolojik aktivitesinin yüksek olması bu maddeler nedeniyledir. *T. spicata* etanol ve metanol özütlerinin antioksidant aktivitesi çalışmışlar ve bitkinin total kolesterol seviyesini düşürdüğünü kaydetmişlerdir. *T. spicata* bitkisi terpenoid, iridoid glycosides ve flavonoidlerce zengin olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan bitkinin özütünün de hem denenilen bakterilere hem de *C. albicans* ve *C. tropicalis* mayasına karşı oldukça aktif olduğu gözlenmiştir.[86].

Burt (2003), *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Pimenta racemosa* ve *Eugenia caryophyllata* *E. coli* bakterisine karşı denenmiş, *Origanum* ve *Thymus* türlerinde elde edilen uçucu yağların, diğer iki bitkiden elde edilen yağlara göre, *E. coli* bakterisine karşı daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır [87]. *Moazeni ve ark. (2012)*, Yaptıkları çalışmalarda *S.khuzistanica* bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Yapılmış oldukları çalışmalarında *S.khuzistanica* elde edilen uçucu yağının, idrar yolu enfeksiyonları oluşturan (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ve *Candida albicans*) patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon ve mikrodilüsyon metotlarını kullanarak araştırmışlardır. uçucu yağının, *E.coli* bakterisine karşı 18,6 mm inhibisyon zone, 25 µg/mL MİK değeri oluşturarak güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir buna ilaveten, uçucu yağın diğer test mikroorganizmalarına karşı ise orta derecede bir aktivite oluşturmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, *S.khuzistanica* uçucu yağının belirli bir aktiviteye sahip olduğunu, enfeksiyonların tedavisinde yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi uçucu yağın karvakrol (94,9%) olduğu bildirmişlerdir[88]. *Majid ve ark. (2010)*, *S.khuzistanica*'nın uçucu yağıyla yapılan çalışmada bu bitkinin antibakteriyel, antifungal, (*Cryptococcus neoformans*) etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır [89]. Bizim çalışmamızda metanol ve etanol özütünün bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal etki olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etki göstermesi literatürdeki *S.khuzistanica* türünün metanol etkisiyle uyumlu bulunmuştur. Çalışmada 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlardaki su özütlerinde antimikrobiyal etki tespit edilememiştir. Uçucu yağ bileşenlerinin bu yağların

antimikrobiyal aktivite özellikleri ve etki mekanizmaları üzerinde etkili olduğunu yapılan çalışmalarla belirtmişlerdir. Timol ve karvakrol benzer yapılara sahip fenolik bileşenler olmalarından, yapılarında delokalize elektronlar bulundurlar ve hidroksil grubu taşırlar bu özelliklerinden dolayı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Ayrıca birçok bitki türünden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmalarda gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Bazı araştırmalarda Gram (-) bakterilerin Gram (+) bakterilerden farklı olarak hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bir dış zara sahip olmaları, bu bakterilerin uçucu yağların antibakteriyel etkilerine karşı daha az hassas olmalarının nedeni olarak gösterilmiştir. Birçok çalışma, farklı bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal etkilerinin de farklı olduğunu göstermektedir. Bu durumun, bitkinin içeriğinde bulunan kimyasal kompozisyonundan, testlerde kullanılan mikroorganizma türünden, eğer bitki ekstraksiyonu yapılmış ise ekstraksiyonda kullanılan çözücünden veya yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini düşünmektedir.

Cosentino ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada Sardunya adasına ait *Thymus* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini (MİK) ve uçucu yağ kompozisyonunu araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına bakılacak olursa, mayanın (*C. albicans*) en duyarlı, sonrasında sıra ile Gram (+)'ler (*B. Cereus* ve *S. Aureu*) ve Gram (-)'ler (*P. aeruginosa*, *E. coli* ve *P.vulgaris*) olduğu görülmüştür. En duyarlı mikroorganizmanın *C. albicans*, en dirençli mikroorganizmanın ise *P. vulgaris* olmuş [90]. *Azaz ve ark. (2004)*, *Thymus* türleri üzerinde yaptıkları antimikrobiyal aktivite çalışmasında, uçucu yağların *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. Albicans* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve MİK yöntemleri kullanılarak çalışılmış, *C. albicans*'a karşı MİK yönteminde güçlü antimikrobiyal etkinin olduğu saptanmıştır. Bu bulgular bizim çalışma sonuç ile paralellik göstermektedir. Disk difüzyon metodu ile yapılan çalışma sonucunda *E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin aynı seviyede güçlü etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [91].

Giordani ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada *Origanum* ve *Thymus* türlerine ait uçucu yağlar MIC yöntemi kullanılarak *C. albicans*'a karşı etkisinin olup olmadığı araştırılmış, sonucunda güçlü antifungal etkisinin olduğu bulunmuştur. Antifungal aktivite olarak bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir [92].

Altundağ ve Aslım. (2005), yaptıkları çalışmada, iki *Origanum* ve iki *Thymus* türünden elde ettikleri uçucu yağları, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. Uçucu yağların tüm mikroorganizmalara karşı yüksek oranda etkili olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda farklı olarak, *P. vulgaris*'ya karşı güçlü bir etki saptanmamıştır [93].

İtalya'nın güney bölgesinde yetişen iki *Thymus* türüne ait uçucu yağlar ile yapılan çalışmada *De Martino ve ark. (2009)*, bu yağların *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *B. cereus* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini MİK değerleri bulunarak karşılaştırılmıştır ve uçucu yağların tüm bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da bakterilere karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu benzer şekilde saptanmıştır [94].

Çetin ve ark. (2011), *Thymus* ve *Origanum* uçucu yağları ile yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *C. albicans* 'a karşı uçucu yağların inhibisyon zon çapı ve MİK değerlerini ölçmüşler, sonuçlara göre en fazla antimikrobiyal aktiviteyi maya formunda olan *C. albicans*'a karşı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Ayrıca farklı olarak, bizim çalışmada *B. cereus*'ya karşı güçlü bir etki saptanmamıştır [95].

Sadeghi-Nejad ve ark. (2011), araştırdıkları çalışmalarında *S.khuzistanica* bitkisinin *Leishmania*'ya karşı güçlü aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir ve bu çalışmada *S.khuzestanica* yaprak metanol ve etanol özütünün 2,4 ve 2,8 konsantrasyonları, promastigotlarının büyümesini engellemektedir [96].

Majd ve ark. (2009), DPPH yöntemi ile yapmış oldukları çalışmada, *S. khuzistanica* bitki özütlerinin antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Yapmış olduğu başka bir çalışmada aynı yöntemi ve aynı bitkinin değişik özütlerini kullanmalarına rağmen elde edilen inhibisyon değerleri, antioksidan açıdan aktif denemeyecek kadar düşük bulunmuştur. Bu durumu, çeşitli aktivite çalışmalarında kullanılacak olan bitkilerin yetiştiği ekolojiye, gelişim dönemine ve hasat mevsimine, bitkinin kullanılan kısımlarına, bitkisel ekstraksiyonların elde ediliş yöntemine, çözümlerin polaritesine ve türüne yada çalışmanın yöntemine göre sonuçları ciddi ölçüde değiştirebileceğinin bir göstergesi olduğunu söyleyerek açıklamışlardır. Fenolik madde miktarı fazla olan özütün antioksidan

aktivitesinin de fazla olacağı düşüncesinin her zaman doğru olmadığını söyleyebiliriz. Daha önceki çalışmalarda bazı araştırmacılar, bitkilerdeki fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon bulurken bazıları bu iki belirleme arasında böyle bir ilişki bulunmadığını vurgulamışlardır. Araştırmacılar, toplam antioksidan aktivitenin her zaman fenolik madde miktarına bağlı olmadığını, ancak antioksidan aktivite belirlemede önemli bir parametre olduğu sonucuna varmışlardır [97]. *Botsoğlou ve ark. (2002)*, tarafından yapılan çalışmada, büyüme performansı üzerine kekik esansiyel yağı ve alfa-tokoferol asetat ilavesinin etki göstermediği, alfa-tokoferol asetat ilavesinin kekik esansiyel yağından daha yüksek antioksidan statüye sahip olduğu bununla birlikte kekik esansiyel yağının ise doza bağımlı olarak antioksidan statüyü yükseltebildiği bildirilmektedir [21]. Bu sonuçlar bizim çalışma bulgularımız ile, DPPH aktivitesi ve fenolik içerik arasında literatürde bazı elde edilen sonuçlardaki gibi pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, bu türlerin özütlerinin önemli oranda serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Gülçin ve ark. (2007), tarafından Lamiaceae familyasından *Ocimum basilicum*'in antioksidan ve serbest radikal giderme aktiviteleri farklı metotlar ve özüt türleri kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada, fesleğenin su ve etanol özüt ile etkinlik/aktivite belirlemek için 1,1-diphenyl-2 pioryl-hydrazyl (DPPH) serbest radikal giderme, süperoksit anyon giderme, ferrik tiyosiyanat metodu, güç indirgeme, hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktivitesi belirleme yöntemleri kullanılmıştır. Deneyler su ve etanol özütlerinin konsantrasyona bağlı antioksidan aktiviteleri olduğunu ortaya koymuştur. Toplam antioksidan aktivite ferrik tiyosiyanat metodu ile belirlenmiştir. 50 µg/mL konsantrasyonda su ve etanol özütlerinin linoleik asit peroksidasyonu üstündeki inhibisyon etkisi sırasıyla %94,8 ve %95,5 bulunmuştur. Diğer taraftan BHA, BHT ve α-tokoferol gibi antioksidan maddelerin 50 µg/mL konsantrasyonda linoleik asit peroksidasyonu üstündeki yüzde inhibisyon oranları sırasıyla %97,1, %98,5 ve %70,4 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca su ve etanol özütlerinin DPPH radikal giderme, superoxid anyon giderme, güç indirgeme, hidrojen peroksit giderme ve metal şelatlama aktivitelerinin etkili olduğu belirlenmiştir [98]. *Alismail ve ark. (2004)*, dereotu tohumlarının su ekstraktının radikal giderme aktivitesinin etanol ekstraktına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Gelinciğin DPPH radikali giderme aktivitesi incelendiğinde özellikle su ve etanol ekstraktlarında yüksek aktiviteler gözlenmiştir [99]. *Miliauskas ve ark. (2004)*, bazı aromatik bitki ekstraktlarıyla yaptıkları çalışmada aseton, metanol ve etil asetat ekstraktları

arasında DPPH radikali gidermede en etkili özütüm metanol özütü olduğunu bildirerek, antiradikalik aktiviteyi Toplam fenolik madde içeriği ile ilişkilendirmişlerdir [100]. Bizim çalışmamızda metanol ve etanol özütünün su özütüne göre DPPH süpürücü aktivitesi ve fenolik içeriği daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca etanol özütünün metanol özütüne göre DPPH süpürücü aktivitesi daha yüksek bulunmuştur.

Bagheri ve ark. (2013), S. khozestanica uçucu yağının DPPH yöntemiyle antioksidan etkisine bakmışlardır. Uçucu yağının ($IC_{50} = 50,14 \pm 0,05 \mu g/ml$) DPPH radikal süpürücü aktivitesinin konsantrasyona bağlı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. $0,1 \text{ mg/ml}$ konsantrasyonda en yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite gözlemlemişlerdir. Referans bileşikler olan askorbik asit ($IC_{50} = 5,3 \pm 0,08 \mu g/ml$) ve rutin ($IC_{50} = 3,89 \pm 0,1 \mu g/ml$) ile kıyaslandığında, uçucu yağın daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [101]. Doğal antioksidanlar arasında önemli rol oynayan bitkisel polifenol içeriği bitki türü, tarımsal proses, ışık iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi pek çok dış etkenden etkilenir. Ayrıca çözücü ve ekstraksiyon proseslerindeki çeşitlilik de fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinin sorumluları arasındadır. DPPH aktivitesi ve fenolik içerik arasında literatürde elde edilen sonuçlardaki gibi pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmada bitki özütlerinin fenol içeriği ve antioksidan aktiviteleri arasında bir ilişki tespit etmişlerdir. Bu yüzden çalışmadaki *S. khozestanica* polar özütündeki gibi(etanol özütü) daha fazla fenolik bileşik daha yüksek potansiyelli radikal süpürücü aktiviteye neden olmaktadır.

Bizim çalışmamızda *S. khuzistanica* belirli konsantrasyonda metanol, etanol ve su özütü ile muamele edilen HeLa, MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 ve fibroblast hücrelerinin sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin anlaşılması amacıyla PI, DAPI ve DiOC6 ve ikili boyamaları yapılmıştır. PI ve ikili boyamada metanol ve etanol özütünün su özütüne göre kanser hücrelerinin ölümünde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. DAPI boyamada da metanol ve etanol özütü ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik nükleus görüntüsünün su özütüyle muamele edilen hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. DiOC6 boyamada ise metanol ve etanol özütü ile muamele edilen hücrelerin su özütüne göre mitokondriyal membran potansiyelinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak tüm floresan boyamalarda metanol ve etanol özütünün suya göre etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada metanol, etanol ve su özütünün derişime bağlı olarak MCF-7, DLD-1, Osteosarkoma ve Fibroblast hücre dizileri üzerine sitotoksik etki gösterdiği tespit

edilmiştir. Ayrıca özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: MCF-7 > DLD-1 > Osteosarkoma > Fibroblast. Metanol ve etanol özütü su özütüyle kıyaslandığında daha fazla etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Özütlerin etkisi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir; metanol > etanol > su. Eş zamanlı PZR yönteminde MCF-7 üzerinde 12,5 µg/ml konsantrasyondaki etanol ve su özütünün apoptotik etkili olduğu tespit edilmiştir. Etanol özütü kanser hücre dizilerinden MCF-7'da en etkili bulunmuştur.

Kaeidi A ve ark. (2013), Yaptıkları çalışmalarda *S.khuzistanica* bitkisinin uçucu yağının diyabet tedavisinde nöroprotektif etkisiyle hücresel hasarı hiperglisemiye (PC13 hücrelerinde) karşı özellik gösterdiğini ortaya koymuştur [102]. *Stammati ve arkadaşlarının. (1999)*, yaptığı bir çalışmada timol'un toksik etkisi mikrobiyal ve memeli hücre kültürü yöntemleri ile araştırılmıştır. Hep-2 hücreleri kullanılarak timolun toksik etkisi Neutral Red (NR) , koloni formasyonu ve toplam protein içeriği yöntemleri ile değerlendirilmiş ve timolun doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Doğal bir bileşik olan karvakrol ve kekik uçucu yağının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, kekik esansiyel yağının hücrelerin çoğalımı üzerinde inhibe edici etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kekik uçucu yağının, yüksek oranlarda karvakrol ve timol içermesi olabilir. Doğal bileşikler, yayılımı durdurulması zor kanser tiplerinin gelişiminin önlenmesinde, durdurulmasında ya da geri dönüşümünde kullanılabilir. Yapılan literatür araştırmalarına göre karvakrol'un antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve inseksidal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [103]. Bu veriler yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar Lamiaceae familyasının önemli derecede sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmektedir.

Akalın ve ark. (2011), Yaptığı bir çalışmada karvakrol'un H-ras transform edilmiş 5RP7 ve N-ras transform edilmiş CO25 hücreleri üzerine apoptotik etkileri bakılmıştır ve karvakrol'un kemoterapötik ajan olabilme olasılığının incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar göre karvakrol'un her iki hücre üzerinde de zamana ve doza bağımlı sitotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. IC₅₀ değeri 5RP7 hücreleri için 0.04 mg/mL ve CO25 hücreleri için ise 0.1 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu değerler doğrultusunda, karvakrol her iki hücre tipinde morfolojik değişime neden olduğu halde akım sitometrisi kullanılarak tespit edilen fosfotidilserin hareketliliği yalnızca 5RP7 hücrelerinde gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, geç

apoptoz mekanizmasının göstergesi olan DNA'nın merdiven görünümü, IC₅₀ değerinde ya da altındaki bir değerde H-ras onkogenine sahip hücrelerde gözlenirken, N-ras onkogenine sahip hücrelerde gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, H-ras hücrelerinin N-ras hücrelerine oranla karvakrol'e daha hassas olduğunu göstermiştir [106]. *Zeytinoğlu ve arkadaşlarının. (1998)*'ın çalışmasında karvakrol'un melanoma hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, *in vivo* çalışmada ise ratlarda DMBA ile indüklenen tümör oluşumu üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Hücre çoğalmasına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise, karvakrol'un A549 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır. Karvakrol ile ilgili bir diğer çalışmada karvakrol'un CO25 hücrelerinde etkisi MTT yöntemi ile araştırılmış, karvakrol'un IC₅₀ değerinin 60 µg/ml olduğu bulunmuştur özütün normal hücrelere toksik etkisinin olmadığı, kanserli hücreler üzerine ise hem antikanser hem antiproliferatif aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir [25]. Çalışmada metanol, etanol ve su (100-3.125µg/ml) özütlerinin DLD-1, MCF, osteosarkoma hücre dizileri üzerine zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak bizim çalışmamızda farklı olarak, normal fibroblast hücrelerde toksik etkisinin olduğu tespit etmişlerdir.

Çetinus ve ark. (2013).Yaptığı bir çalışmada kekik uçucu yağının insan DLD-1 kolorektal kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edip etmediği, eğer ediyorsa bu inhibisyona antioksidan etkisinin katkısı incelenmiştir. İnsan DLD-1 kolorektal kanser hücrelerine kekik uçucu yağı uygulayarak, uçucu yağın hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Xcelligence Sistemi) ile değerlendirilmiştir. Ayrıca kekik uçucu yağının antikanser etkinlik gösterdiği konsantrasyonların normal hücrelerde sitotoksik olup olmadığını belirlemek amacıyla L929 fibroblast hücrelerine de aynı konsantrasyonları uygulanmıştır. Daha sonra kekik uçucu yağının antioksidan etkinliğini DPPH yöntemini kullanarak değerlendirdik. Kekik uçucu yağı uygulanan DLD-1 hücreleri, konsantrasyona bağımlı olarak hücre indeksinde azalan değerler göstermiştir. IC₅₀ değeri 0,347 mg/mL olarak bulunmuştur. Diğer taraftan kekik uçucu yağı L929 fibroblast hücreleri üzerine uygulandığında sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Bu deney için IC₅₀ değeri 22 mg/mL olarak bulunmuştur. Bunun yanında kekik uçucu yağı DPPH yönteminde güçlü antioksidan etkinlik göstermiştir. Sonuç olarak Kekik uçucu yağının antiproliferatif ve antioksidan etkileri dikkate alındığında, kolorektal kanser tedavisinde alternatif bir seçenek olabileceği sonucuna varılmaktadır. Bu sonuçlar bizim çalışma bulgularımız ile paralellik göstermektedir [105].

Ghavami ve ark. (2010)'ın çalışmasında %0,12- %1 DMSO'nun etkisine HFFF (Normal fibroblast hücre dizisi)'de ve AGS kanser hücre dizisinde bakmışlardır. Buldukları sonuçlarda HFFF hücrelerinde kanser hücrelerine göre DMSO'nun IC50 değerlerinin daha düşük olduğunu görmüşlerdir. Dolayısıyla HFFF'nin DMSO'nun etkisine kanser hücrelerinden daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmadaki sonuca göre bizim yaptığımız çalışmada da metanol özütünü çözerken kullanılan DMSO konsantrasyonu fibroblast hücreleri üzerine kanser hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki göstermiş olabilir. Çünkü metanol ve etanol özütünün kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkisi fibroblast hücreleri üzerindeki etkiden istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) göstermiş ve kanser hücre dizileri üzerinde çok daha etkili bulunmuştur.(106;107)

Yeni anti kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı en çok kullanılan yöntemlerden biri de kanser hücrelerde sitotoksikite testidir. Anti kanser ilaçları tümör hücrelerine seçici olması gerekirken, bazen tüm hücreleri öldürebilir. Bu yüzden *in vitro* toksisite testlerinde en az toksik olan bileşikler seçilmelidir. Sitotoksikite bir molekülün bir hücredeki bir veya daha çok önemli hedefle moleküler etkileşiminin sonucu olarak ortaya çıkar. Dolayısıyla sitotoksikitede belli başlı temel hedefler DNA, RNA ve bu moleküllerle ilgili enzimler ve reaksiyon kademeleri (replikasyon, onarım, transkripsiyon, DNA polimeraz, RNA polimeraz, topoizomeraz, telomeraz), protein biyosentezi ve membran işlevi ve proteinleri olarak açıklanabilir. Çeşitli ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri nekrozis ve apoptoz olmak üzere iki yol üzerinden gerçekleşir. Kanser tedavisinde kullanılan veya kullanılacak ilaçların sitotoksik etkilerinin apoptotik yol üzerinden gerçekleştiğinin gösterilmesi tercih edilen bir özelliktir. Zira kanserin ortaya çıkışını tetikleyen önemli mekanizmalardan biri kanserleşmeye doğru yol alan normal bir hücrenin apoptotik mekanizmalarının bozulması ve hücrenin anti-apoptotik sinyal yollarının apoptotik yollar üzerine hakim bir konuma geçmesidir. Günümüzde kullanılan sitotoksik anti tümör ilaçlarının pek çoğunun duyarlı hücrelerde apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin zararsız bir şekilde ortadan kaldırılması kemoterapideki en temel yaklaşımlardan biridir ve sonuçta da apoptozun uyarılması anti kanser ilaç araştırması ve geliştirilmesinde önemli bir stratejidir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların pek çoğu apoptozu uyarak etkilerini gösterirler [79; 2].

Bu tez çalışmasında *S. khuzistanica* bitkisinden elde edilen metanol ve etanol özütünün DNA ile etkileşimi plazmit DNA üzerinde bakılmıştır. Plazmit DNA üzerindeki bir

iplikçikte kesim oluşursa, süper sarmal form gevşeyerek daha yavaş hareket eden açık dairesel olan form II oluşur. Her iki iplikçik de kesilirse, I ve II formları arasında göç eden doğrusal bir form yani form III meydana gelir [106].

Pham ve arkadaşları tarafından, *Alangium javanicum* ve *Alangium grisolleoides* bitkilerinden diklorometan-metanol özütü hazırlanmış ve bu özütün Cu^{2+} varlığında DNA kesimine sebep olduğu tespit edilmiştir. özüt fraksiyonlandırılarak DNA kesimine sebep olan aktif bileşik bulunmaya çalışılmıştır. *A. javanicum*’dan Javaniside ve *A. grisolleoides* Alangiside maddelerinin Cu^{2+} varlığında DNA kesiminde etkili olduğu belirlenmiştir [108]. Ma ve arkadaşları tarafından, *Commiphora africana*’nın metanol-su ekstraktının Cu^{2+} varlığında DNA’yı kestiği gözlemlenmiş. Ham özüt fraksiyonlandırılarak, DNA kesimine sebep olan aktif bileşik saflaştırılmış ve bu bileşik phellamurin olarak adlandırılmıştır [109]. Cottreau ve arkadaşları’nın çalışmasında antiviral, antitümör ve antibakteriyal gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip tetrasiklin olan Jadomycinlerin DNA kesim aktiviteleri araştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi deneyleri sonucunda jadomycin ailesinin bazı üyelerinin DNA kesim ajanı olarak davrandığı, kesimin Cu(II) varlığında veya fotokesim ile arttığı tespit edilmiştir [110] bu çalışmalarda her bileşiğın doza bağlı olarak DNA hareketliliğini değiştirerek etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışması sonucunda, özütlerin her ikisinde de derişime ve inkübasyon süresine bağlı olarak plazmit DNA’nın hareketliliğinde, yoğunluğında ve parçalanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar, bu tez çalışmasıyla benzer ve yakın ilişkili bulunmuştur. Ancak metanol özütünün etanol özüte göre, plazmit DNA’nın hareketliliği ve yoğunluğu üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Yang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, bir seri bakır (II) kompleksi sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Komplekslerin DNA kesim aktiviteleri plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiş ve komplekslerin bakır varlığında konsantrasyona bağlı olarak DNA kesimi gerçekteştirdiği tespit edilmiştir [111]. İlter ve arkadaşları sentezledikleri yeni spirociklik monoferrosenilsiklotrifosfazenlerin, antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırmıştır. Ayrıca, bileşiklerin DNA üzerine etkilerini incelenmişlerdir. Bu maddelerin bazılarının, patojen bakteriler üzerine, tüberküloz referans suşuna ve klinik suşlara da etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bileşiklerin plazmit DNA ile etkileşimleri sonucu DNA hareketliliği ve yoğunluğunda etkili olduğu gösterilmiştir [112]. Bu çalışmalarda Sentezlenen her bileşiğın doza bağlı

olarak DNA hareketliliğini değiştirerek etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

S.khuzistanica bitkisi özütleri ile yapılan antimikrobiyal, antioksidan, özüt-DNA etkileşimi ve sitotoksik aktivite çalışmaları sonucunda, metanol ve etanol özütünün mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkili olduğu ve sahip olduğu bu antimikrobiyal etkisinin yüksek fenolik içeriğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Etanol özütünün metanol özütüne göre daha fazla DPPH süpürücü aktivitesinin ve fenolik içeriğinin daha yüksek olması düşünülmektedir. Etanol ve metanol özütünün HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin incelenmesinde PI, DAPI ve DiOC6 floresan boyama sonuçları birbirini desteklemektedir. Ayrıca MCF-7, Osteosarkoma, Dld-1 ve fibroblast hücrelerinde ikili boyama floresan boyama sonuçları aynı şekilde birbirini desteklemektedir. Metanol ve etanol özütlerinin pBR322 plazmit DNA'sı üzerine derişime ve inkübasyon süresine bağlı olarak plazmit DNA'nın hareketliliğinde, yoğunluğunda ve parçalanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Eş zamanlı PZR yönteminde MCF-7 üzerinde 12,5 µg/ml konsantrasyondaki Etanol ve su özütünün apoptotik etkili olduğu tespit edilmiştir. etanol özütü kanser hücre dizilerinden MCF-7da en etkili bulunmuştur.

Bu çalışmada sonuç olarak, *S.khuzistanica* bitkisi özütlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkiye sahip olduğu, MCF-7, Osteosarkoma, DLD-1 hücrelerinde belirli derişimde apoptotik etkili olduğu bulunmuştur. Bu bitkiyle yapılacak olan daha sonraki çalışmalarda bu özütün içeriğindeki maddeler araştırılarak, etken maddenin tespit edilmesi ve biyolojik etkilerinin araştırılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca *Satureja* türleriyle yapılmış olan biyolojik aktivite çalışmaları literatürde çok sınırlıdır. Bu yüzden bu türün ve başka türlerinin farklı özütlerinin ve bu tez de çalışılmış olan metanol, etanol ve su özütlerinin diğer kanser hücre dizileri üzerinde apoptotik etkili olup olmadığı ve etkili ise bu etkinin moleküler mekanizmasının nasıl olduğunun aydınlatılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Reed, J.C. (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. ***Current Opinion in Oncology***, 11(1), 68-75.
2. Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A. and Ward, E. (2003). Cancer statistics, ***Cancer Journal for Clinicians***, 53(1), 5-26.
3. Baytop, A. (1998). ***Farmasötik botanik***. Ankara; Ankara Üniversitesi Basımevi.
4. Baytop, A. (1984). ***Türkiye’de bitkiler ile tedavi***. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fak Yayınları.
5. Gates, M., Tschudi, G. (1956). The Synthesis of Morphine. ***Journal of American Chemical Society***, 74(4), 1380-1393.
6. Alam, K., Nagi, N., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Rikabi, AC. ve Al- Bekairi A.M. (1999). The protective action of thymol againts carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. ***Pharma Research***, 40(2), 159-63.
7. Rice-Evans, C.A., Packer, L. (2003). ***Flavonoids in health and disease revised and expanded***. United States of America; Marcel Dekker, 43-44.
8. Kumar, K., Sinha, K. (2004). Resurgence of natural colourants. ***A holisticview Natural Product Letters***, 18(1), 59-84.
9. Jin, Z., El-Deiry, W. (2005). Overview of cell death signaling pathways. ***Cancer Biology & Therapy***, 4(2), 139-163.
10. Hajji, E., Nkhili, E., Tomao, V. and Dangles, O. (2006). Interactions of quercetin with iron and copperions: complexation and autoxidation. ***Radical Research***, 40(3), 303-320.
11. Burak, M., Çimen, Y. (1999). Flavonoids and their antioxidant properties. ***Turkish Journal of Medical Sciences***, 19(5), 296-304.
12. Burt, S. (2004), Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods. ***İnternational Journal of Food Microbiology***, 94(3), 223-253.
13. Bishop, C.D. (1995). Antiviral activity of the essential oil of melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (Tea Tree) against tobacco mosaic virus. ***Journal of Essansial Oil Research***, 7, 641-644.
14. Akgül, A., Kıvanç, M. ve Sert, S. (1991). Effects of carvacrol on growth and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. ***Sciences des Aliments***, 11, 361-370.
15. Elegbede, J. A., Flores, R. and Wang, R.C. (2003). Perilly alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in Broto and A549 cells cultured in vitro, ***Life Sciences***, 73(22), 2831-2840.

16. Muhbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A. and Felix, R. (2003). Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. **Bone**, 32(4), 372-380.
17. Loza-Tavera, H.(1999). Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 464, 49-62.
18. Sokmen, A., Gullice, M. ve Tepe, B. (2003). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanolextracts of endemic Thymus spathulifolius. **Food Control**, 15(8), 627-634.
19. Barbour, E.K., Sharif, M.A., Sagherian, V.K., Harbe, A.N., and Talhouk, S.N. (2004). Screening of selected indigeneous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal Etnopharmacol**, 93(1), 1-7.
20. Sanchez, M.E., Turina, A.V., Danial, A.G., Nolan, M.V. and Perillo, M.A. (2004). Surface activity of thymol implication for an eventual pharmacological activity. **Colloids and Surfaces B**, 34(2), 77-86.
21. Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Florou-Paneri, P., Christaki, E., ve Spais, A.B. (2002). Effects of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast meat, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science**, 43(2), 223-230.
22. Ultee, A., Kets, E.P.W. and Smid, E.J.(1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(10), 4606-4610.
23. Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fülöp, L., Varro, A., and Nanasi, P.P. (2004). Effects of terpenoid derivatives on calcium current in canine in and human ventricular cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**, 487, 29-36.
24. Benli, M., Yiğit, N. (2005). Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (Thymus vulgaris) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. **Mikrobiyoloji Dergisi**, 3(8), 1-8.
25. Zeytinoğlu, M., Aydın, S., Öztürk, Y. ve Başer K. (1998). Inhibitory Effects of Carvacrol on DMBA. **Acta Pharmaceutica Turcica**, 40(2), 93-98.
26. Cowan, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology**, 12(4), 564-582.
27. Akyüz, E. (2007). Polygonumbistorta ssp carneum bitki ekstraktlarının kromatografik yöntemlerle kimyasal bileşiminin belirlenmesi ve antioksidan ve antibakteriyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
28. Başer, K.H.C., Özek, T., Kırmır, N. ve Tümen, G. (2004). A comparative study of the essential oils of wild and cultivated Satureja hortensis. **Journal Of Essential Oil Research**, 16, 422- 424.

29. Zeytinoğlu, H., Incesu, Z., ve Başer, K. (2003). Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10(4), 292-299.
30. Shahsavari, R1., Ehsani, A., Houshmand, M., Salehnia, A., and Ahangari, G.(2009). Plasma glucose lowering effect of the wild Satureja khuzestanica Jamzad essential oil in diabetic rats: role of decreased gluconeogenesis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(2),140-145.
31. Sefidkon, F., Jamzad, Z. (2004a). Chemical composition of the essential oil of three iranian satureja species. In S. Mutica, S. Macrantha and S. Intermedia (Eds.). *Food Chemistry*, 91(1), 1–4.
32. Burda, S., Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(46), 2774-2779.
33. Jamzad, Z. (1994). A new species of the genus Satureja (Labiatae) from Iran. *Iranian journal botanic*, 6, 215-218.
34. Chen, Y., Wang, M. and Rosen, T. (1999). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical-Scavenging Active Components from Polygonum multiflorum Thunb. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47(6), 2226-2228.
35. Milbury, P. E., Richer, A. C. (2007). Understanding the antioxidant controversy scrutinizing the fountain of youth. United States of America; *Praeger Publishers*, 31-79.
36. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2006). *Free radicals in biology and medicine (4th edition)*. United Kingdom: Oxford University Press, 84-96.
37. Ozdoğan, N. (2007). *HPLC-DAD isolation of antioxidant compounds in Aesculus hippocastanum bark extract and cytotoxic effects on HL-60 cells*, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-13.
38. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
39. Turan, E. (2005). *Sarı ulak tarsus zeytini ve siyah çaydan elde edilen fenolik ekstraktların antioksidan etkilerinin araştırılması*, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
40. Winawer, S. (2007).Colorectal cancer screening. *Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 21(6), 1031-1048.
41. Ribeiro, M., Priolli, G., Miranda, C. and Arçari, P. (2008). Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 7(4), 267-272.
42. Willet, W. (1999). Goals for nutrition in the year 2000. *Cancer Journal for Clinicians*, 49, 331-52.

43. Giovannucci, E., Ascherio, A. and Rim, B.(1995). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in man. ***Annals of Internal Medicine***, 122(5), 327-334.
44. Anthony, S., Fauci, B., Dennis, L. and Kasper, H. (2008). ***Principles of Internal Medicine (17th Edition)***. United States of America; McGraw Hill Professional, 563-570.
45. Ravdin, P.M. (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. ***New England Journal of Medicine***, 356(16), 1670-4.
46. Fattaneh, A., Tavassoli, D. (2003). ***Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs***. France; Lyon: International Agency for Research on Cancer Press, 10(4) , 48- 54.
47. Burak, Z., Moretti, L., Ersoy, Ö., Tamgaç, F. ve Baflıdemir, G. (2003). Ppm-Tc-MIBI imaging as a predictor of therapy response in osteosarcoma compared with multidrug-resistance-associated protein and p-glycoprotein expression. ***Journal of Nuclear Medicine***, 44(9), 1394-401.
48. Kager, L., Zoubek, A., and Potechger, U. (2003). Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. ***Journal of Clinical Oncology***, 21(10), 2011-2018.
49. Akhan, E. (2007). Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri. ***Ankem Dergisi***, 21(2), 96-98.
50. Yanıkoğlu, H. (2006). ***Servikal kanser taramasında asetikasit sonrası inspeksiyonla (VIA), servikal smear'in karşılaştırılması***, Yayınlanmamış Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
51. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V, Manos, M., Meijer, J., and Muñoz, N.(1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. ***Journal of Pathology***,189(1), 12-9.
52. Castle, PE., Wacholder, S., Lorincz, T., Scott, R., and Schiffman, A. (2002). prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. ***Journal of the National Cancer Institute***, 94(18), 1406-1414.
53. Chan, K. (2003). Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. ***Chemosphere***,52 (9), 1361-1371.
54. Dökmeçi, I. (1994). ***Toksikoloji–Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi***. Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri, 1-50.
55. Vural, N. (2005). ***Toksikoloji***. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi.
56. Özçimen, A. (2005). ***Steroid'in HL-60 (Akut Miyeloid Lösemi) hücre hattında apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi***, Yayınlanmamış Doktora Tezi, ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

57. Cohen, J. (1999). Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. ***Journal of Allergy and Clinical Immunology***, 103(4), 548- 554.
58. Searle, J., Kerr, F., and Bishop, J. (1982). Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. ***Pathology Annual Journal***, 17(2), 229-259.
59. Thompson, E.B. (1994). Apoptosis and steroid hormones. ***Molecular Endocrinology***, 8(6), 665-73.
60. Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. ***Nature***, 407(6805), 770-776.
61. Chen, M., Wang, J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signalling pathways. ***Apoptosis***, 7(4), 313-319.
62. Li, R., An, J., Chen, Z., and Zhang, G. (2008). Expression of cyclinD1 splice variants is differentially associated with outcome in non-small cell lung cancer patients. ***Human Pathology***, 39(12), 1792-801.
63. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. ***Science***, 267(5203), 1456 – 1462.
64. Alnemri, S., Livingston, J. and Nichoson, D.W. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. ***Cell***, 87(2), 171-172.
65. Kim, H., Yeo, M., Kim, M. and Chun, B. (2000). Role of caspase-3 in apoptosis of colon cancer cells induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. ***International Journal of Colorectal Disease***, 15(2), 105-111.
66. Riedl, J., Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. ***Nat Rev Mol Cell Biol***, 5(11), 897-907.
67. Schwartzman, R., Cidlowski, A. (1993). Apoptosis the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. ***Endocrine*** , 14(2), 133-150.
68. Du C Fang, M., Wang, X. (2000). A mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. ***Cell***,102(1), 33 - 42.
69. Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria. ***Genes to Cell*** , 3(11), 697-707.
70. Crow, M.T., Mani, K., Nam,Y.-J. and Kitsis, R.N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. ***Circulation Research***, 95, 957-970.
71. Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with bax . ***Plos Biology***, 6(6), 147-148.
72. Kuwana, T., Newmeyer, D.D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. ***Current Opinion in Cell Biology***, 15, 691-699.

73. Lozano, G., ve Elledge, S. J. (2000). p53 sends nucleotides to repair DNA, *Nature*, 404, 24-25.
74. Curtin, F., Cotter, T.G. (2003). Apoptosis: Historical perspectives. *Assays Biochemistry*, 39, 1-10.
75. Schroter, M., Peli, J., Hane, M., Tschopp, J. and Reichmann, E. (2000). Fasdependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance. *Oncogene*, 19(14), 1794- 1800.
76. Lotem, J., ve Sachs, L. (2002), Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*, 21(21), 3284-3254.
77. Martinez, R., Chacon-Garcia, L.(2005). The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. *Current Medicinal Chemistry*, 12(2), 127-151.
78. Kubista, M., Andrade, M., Bengtsson, M., and Forootan, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
79. Rasoul-amini, S. Khalaj, A., and Shafiee, A. (2006). Anti-tumor activity of new quinoline derivatives in human breast cancer T47D cells. *International Journal of Cancer Research*, 2(2), 102-108.
80. Hayouni, A., Abedrabba, M. (2007). The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities of Tunisian *Quercus coccifera* . *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
81. Gouyon, P.H., Guillermin, J.L. and Valdeyron, G. (1986). Polymorphisms and environmet: The adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, 57, 59-66.
82. Svoboda, R., Putievsky, E. (1985). Composition of Essential Oils of *Thymbra spicata* and *Satureja thymbra* Chemotypes. *Planta Medica*, 4, 337-338
83. Sefidkon, F., Abbasi, K., and Khaniki, G.B. (2005). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *satureja*. *Food Chemistry*, 99(1), 19–23.
84. Ziombra, M., Fraszczak, B. (2008). Effect of sowing and harvest date on yielding in summer savory (*Satureja hortensis* L.) herbage. *Nauka Przyroda Technologie*, 2(1), 1-5.
85. Adıgüzel, A., Özer, H., Kılıç, H. ve Çetin, B. (2007). Screening of Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Satureja hortensis* on Foodborne Bacteria and Fungi. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(2), 81-89.
86. Kılıç, T. (2006). Analysis of Essential Oil Composition of *Thymbra Spicata* *Spicata* Antifungal, Antibacterial and Antimycobacterial Activities. *Z Naturforsch C*, 61(5),324-328.
87. Burt, A. (2003). Antibacterial Activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*, 36, 162-167.

88. Moazeni, M., Saharkhiz, M. and Hoseini, A. (2012). In vitro scolicidal effect of *Satureja khuzistanica* (Jamzad) essential oil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2(8),616-620.
89. Majid, Z., Amirrajab, N. (2010). In vitro antifungal activity of *Satureja Khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, 26(4), 880-884.
90. Cosentino, S., Pisano, B., Arzedi, E. ve Palmas, F. (1999). In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian *Thymus* Essential Oils. **Letters in Applied Microbiology**, 29(2), 130-135.
91. Azaz, A. D., Irtem, H. A., Kurkcuoğlu, M. ve Baser, K. H. (2004). Composition and the *in vitro* Antimicrobial Activities of the Essential Oils of some *Thymus* Species. **Z. Naturforsch**, 59(3), 75-80.
92. Giordani, R., Regli, P., Mikail, C., Abou, L. ve Portugal, H. (2004). Antifungal Effect of Various Essential Oils Against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, 18(12), 990-995.
93. Altundağ, Ş. ve Aslım, B. (2005). Kekiğin Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 03(07), 5-14.
94. De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S., ve Senatore, F. (2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of *Thymus* Growing Wild in Southern Italy. **Molecules**, 14(11), 4614-4624.
95. Çetin, B., Çakmakci, S. ve Çakmakci, R. (2011). The Investigation of Antimicrobial Activity of *Thyme* and *Oregano* Essential Oils. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 35(2), 145-154.
96. Sadeghi-Nejad¹, B., Saki², J., and Khademvatan, S. (2011). *In vitro* antileishmanial activity of the medicinal plant - *Satureja khuzestanica* Jamzad. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(24), 5912-5915.
97. Majd, A., Nejad-sattari, T., and Doosti, B. (2009). Chemical composition of *Satureja Khuzestanica* Jamzad (Lamiaceae) essential oils produced during ontogenesis and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil. **Journal of Sciences**, 18, 51-60.
98. Gülçin, I., Elmasta, M., ve Aboulenein, H. (2007). Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. **Phytotherapy Research**, 21; 354–361.
99. Alismail, M., Aburjai T. (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. **Journal of The Science of Food and Agriculture**. 84, 173-178.
100. Miliauskas, G., Vanbeek, A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, 85, 231-237.

101. Bagheri, S., Ahmadvand, H. (2013). Antioxidant properties and inhibitory effects of *Satureja khuzestanica* essential oil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 3(1), 22–27.
102. Kaeidi, A., Esmaeili-Mahani, S., and Abbasnejad, M. (2013). *Satureja khuzestanica* attenuates apoptosis in hyperglycemic PC12 cells and spinal cord of diabetic rats. **Journal of Natural Medicines**, 67(1), 61-9.
103. Stamatii, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alokomi, H.-L. and Wright, A.(1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian. **Food and Chemical Toxicology**, 37(8), 813-23.
104. Akalın, G., İncesu, Z. (2011). The effects of carvacrol on apoptosis of H-ras and N-ras transformed cell lines. **Turkish Journal of Pharmaceutical**, 8 (2), 105-116.
105. Çetinus, E., Temiz,T., Ergül, M., ve Altun, A. (2013). Thyme essential oil inhibits proliferation of DLD-1 colorectal cancer cells through antioxidant effect. **Cumhuriyet Medical Journal**, 35, 14-24.
106. Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E. (2003). characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 97 (4), 364–369
107. Ghavami, G., Sardari, S. (2010). Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines. **journal of medicinal plant research**, 4 (22), 2411-2417.
108. Pham, V.C., Ma, J., Thomas, S.J., Xu, Z., Hecht, S.M. (2005). Alkaloids from *Alangium javanicum* and *Alangium grisolleoides* that mediate Cu²⁺ dependent DNA strand scission. **Journal of Natural Product**, 68(8), 1147-1152.
109. Ma, J., Jones, S. (2005). A dihydroflavonol glucoside from *Commiphora africana* that mediates DNA strand scission. **Journal of Natural Product**, 68(1), 115-117.
110. Cottreau, K.M., Spencer, C. (2010). Diverse DNA-cleaving capacities of the jadamycins through precursor-directed biosynthesis. **Organic Letters**, 12(6), 72-75.
111. Yang, X.B. (2008). Synthesis, and bindin and cleavage activities of the copper (II) complexes of estrogen-macrocyclic conjugates. **Medicinal Chemistry**, 16, 3871-3877.
112. İlter, E. E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Açık, L., Yavuz, M., Bali, E. B., Solak, A. O., Büyükkaya, F., Dal, H., ve Hökelek, T. (2010). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes. **Polyhedron**, 29: 2933–2944

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Hossein SOLTANZADEH
 Uyuğu : IRAN
 Doğum tarihi ve yeri : 21.09.1981, Bonab
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 5070946922
 Faks : -
 e-mail : hossein.soltanzadeh@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Science, Research (IAU,Tehran)Üniversitesi	2009
Lisans	Marand Üniversitesi	2007
Lise	Shahid karami Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2011	Bonab Üniversitesi	Öğretmen
2007-2009	National Institute of Genetic Engineering	Yardımcı araştırmacı

Yabancı Dil

Türkçe, İngilizce

Yayınlar

Tumer, Y., Koc, Y., Asmafiliz, N., Kılıc, Z., Hokelek, T., Soltanzadeh, H., Acık,L., Lutfi, M., ve Solak, A. (2015). Phosphorus–nitrogen compounds part 30 Syntheses and structural investigations, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of vanillinato-substituted NN or NO spirocyclic monoferrocenyl cyclotriphosphazenes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20, 165–178.

Elmas, G., Okumuş, A., Koç, Y., Soltanzadeh, H., Kılıç, Z., Hökelek, T., Dal, H., Açık, L., Üstündağ, Z., Dündar, D., ve Yavuz, M. (2014). Phosphorus-nitrogen compounds Part 29 Syntheses, crystal structures, spectroscopic and stereogenic properties, electrochemical investigations, antituberculosis, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of ansa-spiro-ansa cyclotetraphosphazenes *European Journal of Medicinal Chemistry*, 87, 662-676

Soltanzade, H., Sanati, M., Ataei, M., Houshmand, M., and Nabavi, M. (2007). Analysis of the mitochondrial DNA Polymerase Gamma mutation in patients With Multiple sclerosis. *Iranian Biomedical Journal*, 11(1), 80-81.

Soltanzade, H., Sanati, M., Ataei, M., Houshmand, M., and Nabavi, M. (2011). Investigation of mitochondrial DNA Polymerase Gamma (POLG) in patients with multiple sclerosis. *Modern Genetic Journal*, 18, 61-65.

SEMPOZYUM VE KONGRELER

Soltanzade, H., Giuseppe, S., Renato, C., Simona, M., and Baldi, E. (2014, March). Optimization and isolation of CD117 from Amniotic fluid and chorionic villi stem cells for regenerative medicine. Paper presented at the 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Bosnia Herzegovina

Soltanzadeh, H., Acık, L. (2014, March). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Satureja khuzestanica*. Oral presented at the 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Bosnia Herzegovina.

Soltanzade, H., Sanati, M., Ataei, M., Houshmand, M., and Nabavi, M. (2010, June). BRCA1 and BRCA2 mutation in Iranian breast cancer patients. European Society of Human Genetics, Gothenburg, Sweden.

Soltanzade, H., Sanati, M., Ataei, M., Houshmand, M., and Nabavi, M. (2008, May). Molecular investigation of mitochondrial DNA Polymerase Gamma (POLG) mutations in patients with multiple sclerosis: a study of 60 cases. Oral presented at the 15th International Congress of neurology and electrophysiology, Iran.

Soltanzade, H., Ataei, M., Nabavi, M., Houshmand, M., and Sanati, M. (2008, May). Analysis of the CAG repeat and A467T and W748S POLG mutations in Iranian patients With Multiple sclerosis. Oral presented at Congress European Society of Human Genetics Barcelona, Spain.

Soltanzade, H., Sanati, M., Ataei, M., Houshmand, M., Nabavi, M. (2007, May). Analysis of the mitochondrial DNA Polymerase Gamma mutation in patients With Multiple sclerosis Oral presented at 1st International Congress on Health Genomics Biotechnology and Iranian Congress of Genetic Disorder and Disabilities, Tehran Iran.

Soltanzade, H. (2008, May). Symposium on Application of Advanced molecular methods for diagnosis of human genetic disease held in the National Institute of Genetic Biotechnology Engineering (NIGEB), Tehran, Iran.

Soltanzade, H. (2007, may). Workshop; molecular method (DNA extracted -RT PCR - gene cloning in Plants and analysis data). The 3 congress of Medicinal Plants Shahed University, Tehran Iran.

Soltanzade, H. (2007, Jun). Workshop; Integrated Information Network. ProQuest Springer workshop The trainee has gained both theoretical and practical knowledge of working in the above environments platform National Institute of Genetic Biotechnology Engineering, Tehran Iran.

Soltanzade, H. (2007, Jun). Workshop; Integrated Information Network IDL Science Direct Scopus The trainee has gained both theoretical and practical knowledge of working in the above environments platform National Institute of Genetic Biotechnology Engineering, Tehran Iran.

Hobiler

Futbol, Santur



GAZİ GELECEKTİR..