



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lawsonia inermis* (KINA)' İN FARKLI BAKTERİ SUŞLARI
ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL VE CAPAN-1 PANKREAS
KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKARSİNOJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA MALAS
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

KIRIKKALE 2022

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık 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.

.....

Büşra MALAS

...../...../2022

ÖZET

Lawsonia inermis (KINA)' İN FARKLI BAKTERİ SUŞLARI ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL VE CAPAN-1 PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİKARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

Temmuz 2022, 85 sayfa

Kanser, dünyanın birçok bölgesinde başta gelen ölüm sebeplerinden biri olmasının yanında yaşam süresinin artmasının önünde büyük bir engel olarak yer almaktadır. Çağımızda kanserinde dahil olduğu birçok hastalığa karşı yeni ilaçlar geliştirebilmek amacıyla çeşitli bitkisel ürünler ile ilgili araştırmalar katlanarak artmaya devam etmektedir. Son yıllarda, çeşitli bitkisel ürünlerin farklı kanser türlerine karşı umut verici antikanser etkinliği belirlenmiştir. Bu bağlamda tez çalışmasında, farklı coğrafyalarda halk arasında yaygın kullanımı olan, *Lawsonia inermis* (kına) bitkisinden elde edilen metanol, kloroform, su, aseton ekstraktlarının lawsone (2-hidroksi-1,4-naftokinon) naftokinon standartının antikanser ve antibakteriyel potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, pankreas kanseri hücre hattı olan CAPAN-1 ve L929 fibroblast hücrelerinde sitotoksitenin belirlenebilmesi için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) testi, hücre ölüm modunun belirlenebilmesi için ikili boyama testi (double staining) uygulandı. Ayrıca bitkinin barındırdığı biyoaktif bileşen içeriğinden dolayı *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı agar disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testi yapıldı. MTT testi sonucunda CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde en güçlü antiproliferatif etki kloroform ekstraktı ve lawsone standartın da görüldü. Bu ekstraktlarda en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL konsantrasyonda % canlılık sırasıyla 28,2±0,21 ve 32,3±2,5 olarak belirlendi. Bitkinin metanol ekstraktı, su ekstraktı ve aseton ekstraktında antiproliferatif etki artan konsantrasyonla bağlantılı olarak yüksek bulundu. L929 fibroblast hücrelerinde ise 4 ekstrakt ve lawsone standartı için azalan doza bağlı hücre canlılığı arttı. Hücre ölüm modunun belirlenmesi için yapılan ikili boyama testinde Hoechst (33342) ve Propidium iyodür (PI) fluoressan boyaları kullanılarak CAPAN-1 pankreas kanseri ve L929 fibroblast hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik hücre % indeksleri incelendi. Sonuçta sadece *L. inermis*'in kloroform ekstraktında denenen 3 konsantrasyonda da (100 µg/mL, 25 µg/mL, 6,25 µg/mL) CAPAN-1 için apoptotik hücre % indeksi, nekrotik hücre % indeksine göre yüksek bulundu. L929 fibroblast hücresi için ise 25 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücre % indeksi nekrotik hücre % indeksine göre yüksek bulundu. Bu sonuç MTT testi sonucunu ile uyumlu bulundu.

Diğer ekstraktlar için değişen dozlarda değişen % indeksler hesaplandı. Agar disk difüzyon ve MİK testlerinden elde edilen sonuçlara göre *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gözlemlendi. Disk difüzyon testinde *S. aureus* için en etkili sonuç $8\pm 3,46$ 'lık zon çapı ile aseton ekstraktında görülürken, *E.coli* için en etkili sonuç 7 ± 1 'lik zon çapı ile su ekstraktında görüldü. Yapılan MİK testi sonucunda en etkili sonuç lawsone standartında görüldü. Lawsone standartı için *S.aureus* ve *E.coli* suşlarına karşı sırasıyla 0,125 mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonları MİK olarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, antimikrobiyal etki, antikarsinojenite, CAPAN-1, *Lawsonia inermis*, sitotoksisite.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL EFFECTS ON DIFFERENT BACTERIAL STRAINS AND ANTICARCINOGENIC EFFECTS ON CAPAN-1 PANCREAS CANCER CELLS OF *Lawsonia inermis* (HENNA)

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Pharmacology and Toxicology, Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüsamettin EKİCİ

Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

July 2022, 85 pages

Cancer is one of the leading causes of death in many parts of the world, as well as a major obstacle to increasing life expectancy. In our age, research on various herbal products continues to increase exponentially in order to develop new drugs against many diseases, including cancer. In recent years, promising anti-cancer efficacy of various herbal products against different types of cancer has been determined. In this context, the thesis study, it was aimed to investigate the anticancer and antibacterial potentials of the lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) naphthoquinone standard of methanol, chloroform, water, acetone extracts obtained from the *Lawsonia inermis* (henna) plant, which is widely used among the people in different geographies. For this purpose, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was used to determine cytotoxicity in pancreatic cancer cell line CAPAN-1 and L929 fibroblast cells, and double staining test was applied to determine cell death mode. In addition, agar disc diffusion and minimum inhibition concentration (MIC) tests were performed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains due to the bioactive component content of the plant. Chloroform extract and commercial lawsone had the strongest antiproliferative effect in CAPAN-1 pancreatic cancer cells as a result of MTT test. In these extracts, at the highest concentration of 100 µg/mL, the % viability was determined as 28.2±0.21 and 32.3±2.5, respectively. The antiproliferative effect of the plant's methanol extract, water extract and acetone extract was found to be higher with increasing concentration. In L929 fibroblast cells, on the other hand, decreased dose-dependent cell viability increased for 4 extracts and commercial lawsone. In the double staining test performed to determine the cell death mode, Hoechst (33342) and Propidium iodide (PI) fluorescent dyes were used to examine the % indices of apoptotic and necrotic cells in CAPAN-1 pancreatic cancer and L929 fibroblast cells. As a result, the percentage of apoptotic cells for CAPAN-1 was found to be higher than the % index of necrotic cells in all 3 concentrations (100 µg/mL, 25 µg/mL, 6.25 µg/mL) tested only in the chloroform extract of *L. inermis*. For L929 fibroblast cells, the apoptotic cell % index was found to be higher than the necrotic cell % index at a concentration of 25 µg/mL. This result was found to be compatible with the MTT test result. For other extracts, varying percentage indices

were calculated at varying doses. According to the results obtained from agar disc diffusion and MIC tests, antimicrobial effect was observed against *S. aureus* and *E. coli* microorganisms. In the disk diffusion test, the most effective result for *S. aureus* was seen in acetone extract with a zone diameter of 8 ± 3.46 , while the most effective result for *E. coli* was seen in water extract with a zone diameter of 7 ± 1 . As a result of the MIC test, the most effective result was seen in the lawsone standard. For lawsone standard, 0.125 mg/mL and 0.5 mg/mL concentrations against *S. aureus* and *E. coli* strains, respectively, were determined as MICs.

Key Words: *Lawsonia inermis*, CAPAN-1, cytotoxicity, apoptosis, anticarcinogenicity, antimicrobial.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Hüsamettin Ekici'ye, ikinci danışman hocam Doç. Dr. Begüm Yurdakök Dikmen'e, aldığımız eğitim aşaması boyunca engin bilgilerinden yararlandığım Prof. Dr. Ender Yarsan ve Prof. Dr. Emine Baydan hocalarıma, yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ebru Yıldırım'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca analizlerimin yapılmasında emeği geçen Prof.Dr. Siyami Karahan, Prof.Dr. Mustafa Türk, Prof. Dr. Füsün Temamoğulları, Doç.Dr. Mustafa Yipel, Dr. Öğr. Üyesi Yaşar Şahin, Dr. Öğr. Üyesi Enes Güncüm, Dr. Aytuna Çerçi, Dr. Esra Arat, Dr. Ogün Bozkaya, Öğr. Gör. Salih Erat, Canan Çakır Çoban ve Zeynep Üstünel'e teşekkür ederim. Ayrıca her zaman arkamda durup, desteklerini ve şefkatlerini üzerimden eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Büşra MALAS
KIRIKKALE-2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	2
1.2. Pankreas.....	3
1.3. Pankreas Kanseri Gelişimi ve Epidemiyolojisi	5
1.3.1. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri.....	7
1.3.1.1. Yaş.....	7
1.3.1.2. Etnik Köken, Genetik Faktörler ve Kalıtsal Hastalıklar	8
1.3.1.3. Kronik Pankreatit	8
1.3.1.4. Diyabet	9
1.3.1.5. Alkol.....	9
1.3.1.6. Sigara.....	9
1.3.1.7. Beslenme Biçimi ve Obezite	9
1.4. <i>Lawsonia inermis</i> L.	10
1.4.1. <i>Lawsonia inermis</i> L. Botanik Özellikleri	10
1.4.2. <i>Lawsonia inermis</i> L.'in Antikarsinojenik Etkisi	12
1.4.2.1. <i>Lawsonia inermis</i> L.'in Antimikrobiyal Etkisi.....	14
1.5. Apoptoz	14

1.6. Çalışmanın Amacı	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Bitki Materyali	17
2.2. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	17
2.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	17
2.2.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	18
2.3. Bitki Materyali Ekstraksiyon Aşaması.....	18
2.4. Antimikrobiyal Aktivite Testi	19
2.4.1. Agar Disk Difüzyon Testi	19
2.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi	21
2.5. Hücre Kültürü.....	22
2.5.1. CAPAN-1 Pankreas Kanseri Hücresinin <i>İn Vitro</i> Kültürlerinin Hazırlanması	22
2.5.2. L929 Fibroblast Hücresinin <i>İn Vitro</i> Kültürlerinin Hazırlanması	23
2.6. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	23
2.7. MTT Metodu ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	24
2.8. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi	25
2.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler.....	27
3. BULGULAR	28
3.1. Örneklerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi.....	28
3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MiK) Değerleri.....	33
3.3. Sitotoksite Testi Sonuçları	34
3.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi	39
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. <i>L. inermis</i> 'in 4 farklı ekstraktı ve lawsone standartının test mikroorganizmaları üzerine gösterdiği antimikrobiyal aktivite inhibisyon zon çapları.....	28
3.2. <i>L. inermis</i> 'in 4 farklı ekstraktı ve lawsone standartının test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri.....	34
3.3. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e ait kloroform, su, metanol, aseton ekstraktlarının ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanseri hücresi üzerine yüzde canlılık değeri	35
3.4. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e ait kloroform, su, metanol, aseton ekstraktlarının ve lawsone standartının L929 fibroblast hücreleri üzerine yüzde canlılık değeri	37
3.5. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e 4 farklı ekstraktın ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanser hücresine ait % apoptotik ve nekrotik indeksi.....	40
3.6. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e ait 4 farklı ekstraktın ve lawsone standartının L929 pankreas kanser hücresine ait % apoptotik ve nekrotik indeksi.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler.....	4
1.2. Lawsoneun yapısal formülü.....	11
1.3. <i>L. inermis</i> 'in kurutulmuş hali.	11
1.4. <i>L. inermis</i> 'in yaş hali.	12
1.5. <i>L. inermis</i> ve bazı lawsone türevi antikanser moleküller.....	13
1.6. Apoptoz aşamaları	15
2.1. <i>L.inermis</i> 'in toplandığı konum.	17
2.2. Soxhlet cihazı	19
2.3. MTT testi uygulamasında plakalardan vasatın çekilmesi işlemi.	25
2.4. İkili boyama testi uygulamasında kullanılan ikili boyama çözeltisinin plakalara eklenmesi.	27
3.1. <i>L. inermis</i> 'e ait su ekstraktının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı.....	29
3.2. <i>L. inermis</i> 'e ait su ekstraktının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı.....	29
3.3. <i>L. inermis</i> 'e ait metanol ekstraktının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı	30
3.4. <i>L. inermis</i> 'e ait metanol ekstraktının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı.....	30
3.5. <i>L. inermis</i> 'e ait kloroform ekstraktının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı .	31
3.6. <i>L. inermis</i> 'e ait kloroform ekstraktının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı	31
3.7. <i>L. inermis</i> 'e ait aseton ekstraktının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı.....	32
3.8. <i>L. inermis</i> 'e ait aseton ekstraktının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı	32
3.9. Lawsone standartının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı.....	33
3.10. Lawsone standartının <i>E. coli</i> üzerinde oluşturduğu zon çapı	33
3.11. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e ait, su, metanol, aseton, kloroform ekstraktlarının ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri üzerine etkisine ait % canlılık grafiği.	35
3.12. Farklı konsantrasyonlarda <i>L. inermis</i> 'e ait su, metanol, aseton, kloroform ekstraktlarının ve lawsone standartının L929 fibroblast hücreleri üzerine etkisine ait % canlılık grafiği.	37

3.13. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen CAPAN-1 pankreas kanseri hücresine ait apoptotik ve nekrotik hücre fotoğrafları.....	41
3.14. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen L929 Fibroblast hücresine ait apoptotik ve nekrotik hücre fotoğrafları	44



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
CAPAN-1	İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetikasit
FBS	Fötal bovine serum
g	Gram
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
L929	Fibroblast Mouse C3 / An connective tissue (Fare)
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
PBS	Phosphate buffered saline
PDAK	Pankreatik Duktal Adenokarsinoma
PI	Propidyum iyodür
rpm	Dakikada devir sayısı

1. GİRİŞ

Tıbbi özelliklerinden dolayı bitkiler hastalıklara karşı önemli bir rol oynamaktadır. Bitkilerden elde edilen primer ve sekonder metabolitler doğrudan veya dolaylı şekilde ilaç endüstrisinin temelini oluşturmaktadır. Tarih boyunca insanlar birçok hastalığı bitkileri kullanarak tedavi etmeye çalışmıştır. Günümüzdeki kullanılan reçeteli ilaçların büyük bir kısmı (aspirin, kinin, vimbilastin, rezerpin vb.) bitki kaynaklı etken maddelerden meydana gelmektedir (Malas ve Ekici, 2022).

Monotipik bir cins olan *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae), sağlık ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılmakta ve halk arasında mehndi, henna veya kına olarak bilinmektedir. Gerçekleştirilmiş çalışmalar sonucunda *L. inermis*'in özlerinin ve saflaştırılmış bileşenlerinin; antipiretik, analjezik, antifungal, antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojenik, antimikrobiyal, immünomodülatör, hepatoprotektif gibi çeşitli aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra alerjenik veya kanserojenik herhangi bir etkiye sahip olmadığı çalışmalar da vardır. Lawsone naftokinonunu moleküllerinin ve türevlerinin bazı kanser tiplerine karşı etkili olduğu ve antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip olarak çok sayıda antikanser fitokimyasalının ana özelliğini taşıdığı yapılan önemli çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Malas ve Ekici, 2022).

Pankreas, onikiparmak bağırsağı, mide ve kalın bağırsakla komşu olup karın bölgesinin arka kısmında yer alan, vücuttaki önemli görevleri yerine getiren, tüketilen besinlerin sindirimini ve bunlardan sağlanan glukozun kanda gereken seviyelerde bulunmasını sağlayan, yaklaşık 15 cm uzunluğundaki bir organdır. Pankreasta meydana gelen en küçük bir hasar bile, tüm vücudu etkileyecek sonuçlar doğurabilmektedir. Pankreasın herhangi bir kısmında çoğalmaya eğilimli kötü huylu kitleler pankreas kanseri olarak isimlendirilmektedir. Pankreasta meydana gelen kanserler, genellikle organın baş bölümünde yayılım göstermektedir. Pankreas kanserleri arasında en sık rastlanan tür adenokanserdir. Adenokanser, hızlı şekilde ilerleyebilen ve çevre dokularda metastaz yapabilen bir kanser çeşididir.

1.1. Kanser

Kanser, mutasyonlar sonucu oluşan, çeşitli doku, organ ve hücre tipinde gelişebilen ölümcül bir hastalıktır. Hücre büyümesi ve farklılaşmasını etkileyen mutasyonlar sonucu kontrol edilemeyen hücre çoğalması ile meydana gelmektedir. Genlerde oluşan mutasyonlar ile primer tümör hücreleri farklı fenotipik özellikler kazanır. Bu nedenle tümör hücreleri kontrolsüz ve sınırsız olarak çoğalır (Keleg, Büchler, Ludwig, Büchler ve Friess, 2003; Hanahan ve Weinberg, 2000). Tümör hücreleri çevrelerinden bağımsız olarak yaşar ve metastaz göstererek başka organ ve dokuların da işlevlerini etkiler (Hanahan ve Weinberg, 2000). Normal hücreler, ortamdaki büyüme faktörlerinin miktarına göre belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar ve ardından hücre döngüsünün G0 evresine girerler. Kanseri hücreleri ise normal hücrelerin aksine hücre döngüsünün G0 evresinde durmazlar ve kontrolsüz çoğalmaya devam ederler (Kouzarides, 2007).

Hücrede kanserleşme başladığında 3 büyük değişiklik meydana gelir:

- **Ölümsüzleşme:** Kanseri hücresi, sınırsız büyüme ve bölünme yeteneği kazanır.
- **Transformasyon:** Kanseri hücresi, normal büyüme kısıtlamalarını algılamada başarısız olur. Tümör, büyümesi için gerekli olan kanı anjiyogenez adı verilen süreçle temin eder.
- **Metastaz:** Kanseri hücreleri çoğunlukla oluştukları yerden ayrılıp vücudun başka yerlerine doğru göçer ve göçtükleri yerde çoğalarak normal dokunun yerini alır. Metastaz adı verilen bu süreç, kanseri hücrelerinin kan dolaşımına, lenf damarlarına ya da diğer dokulara girme yeteneği kazanmasıyla gerçekleşir. Kanseri yayılım göstereceği bölge tümör tipine göre değişiklik göstermektedir (Allison, 2012).

Kanserileşen hücreler yeni özellikler kazanır. Bu özellikler kalıtsal olarak yavru hücrelere aktarılır.

- ✓ Kanserileşen hücreler üreme kontrollerini kaybederler. Gereksiz çoğalmayı engelleyen inhibisyon mekanizması etkisiz kalmaktadır.
- ✓ Kanserileşen hücrelerde, hücrenin antijenik özellikleri değişir.
- ✓ Hücrelerin morfolojisi değişmektedir. Kanseri hücrelerinde çekirdek büyüktür ve şekli bozuktur. Sitoplazmalar ise normal hücreye göre daha az bulunmaktadır.

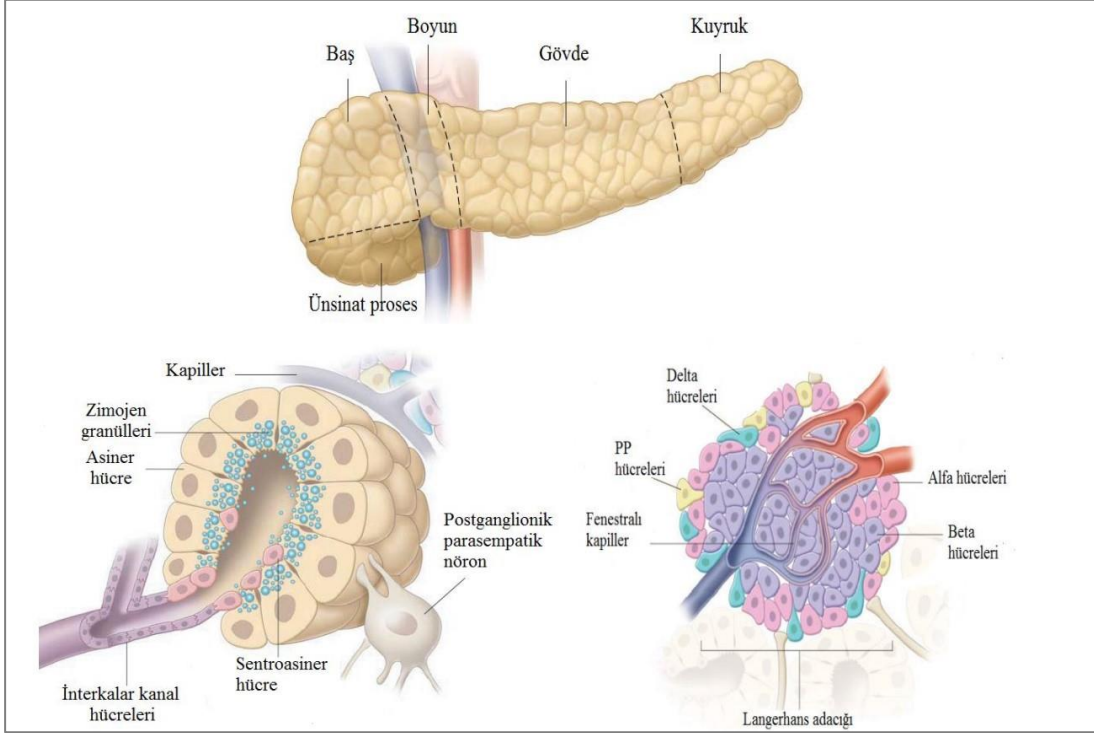
- ✓ Hücrelerde DNA ve RNA sentezi artış göstermektedir.
- ✓ Kanserleşen hücre dokuya özgülüğünü kaybeder. Hücre kökeni farketmeksizin özgülüğü tamamen değişir ve kan ya da lenf yoluyla herhangi bir dokuya yerleşebilme yeteneği kazanır.
- ✓ Hücrede pirimidin katabolizması ve ribonükleotid redüktaz aktivitesi artış gösterir.
- ✓ Bazı kanserlerde hücreler parathormona benzer bir büyüme faktörü sentezler ve bunun sonucunda hiperkalsemiye, dolayısıyla ölüme sebep olurlar.
- ✓ Kanserleşen hücrelerde, hücrelerin izozim profillerinde fetal yapıya benzeyen değişiklikler meydana gelir.
- ✓ Kanserleşen hücrede diferansiyasyon (farklılaşma) gerilemektedir.
- ✓ Kanserleşen hücrelerde, özel fonksiyonlu bazı proteinler sentezlenememeye başlar.
- ✓ Kanserleşen hücrelerin metabolizması değişir. Anaerobik solunum oranı ve şeker alınımları artış gösterir. Hücreler oksijenli ortamda anaerobik glikoliz yaparlar. Bu durum “warburg etkisi” olarak adlandırılır. Glukoneogenez artar. Glukoneogenezde harcanan enerji glikolizde üretilen enerjiden fazla olduğu için kanser hücresi normal hücrelerin ürettiği enerjiyi de kullanırlar. Bu nedenle kanser hücreleri asalak olarak tanımlanırlar (Dilsiz 2009, Yöntem ve Ünalı, 2011).

Kanserler, meydana geldiği hücre tipine göre genellikle dört grupta sınıflandırılmaktadır. Lenfomalar ve lösemiler, beyaz kan hücrelerinin (lenfosit, lökosit) gerekenden yüksek miktarda üremesiyle ortaya çıkmaktadır. Kanserlerin % 85’ini oluşturan karsinomalar; meme deri, ürogenital ve bez dokulardan köken almaktadır. Kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezodermden gelişen doku tümörleri ise sarkoma olarak adlandırılmaktadır (Dilsiz, 2009).

1.2. Pankreas

Pankreas; duodenum ile dalak arasında bulunan, şekli kabaca çekice benzeyen, sarımsak renkli, retroperitoneal bir salgı bezidir. Ortalama 15-20 cm uzunluğunda olup 70-150 gr ağırlığındadır. Pankreas baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 kısımdan meydana gelmektedir. Pankreasın şişkin sağ ucu baş, dar olan orta kısmı

gövde, gövde ile baş birleşiminin bulunduğu bölge boyun, ince ve uzun son bölümü ise kuyruk olarak adlandırılmaktadır (Menteş, 1975; Slack, 1995; Öztürk, 2015). Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Pankreasın anatomik yapısı ve pankreatik hücreler (Avcı, 2015).

Pankreas önemli hormonların ve sindirim enzimlerinin, sentezlenip, depolanıp, salgılandığı bir organdır. Pankreasın endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki ayrı salgı fonksiyonu vardır. Ekzokrin kısım; protein ve yağ sindirimi için gereken, günde yaklaşık olarak 1200 mL pankreatik sıvı salgılayan kısımdır. Pankreasın %98-99'luk bir bölümünü kaplayan ekzokrin kısım asiner ve kanal hücrelerinden oluşur. Asiner hücreler, başlıca amilazlar, nükleazlar, proteazlar, amilazlar ve lipazlar olmak üzere en az 22 sindirim enziminin üretimden sorumludur. Ekzokrin kısmın enzim salgılayan ünitesini oluşturan asiniler; asiner hücrelerin dallanmış kanal sisteminin uçlarında üzüm salkımına benzer şekilde kümeleşmesiyle meydana gelmektedir. Enzimler burada genellikle aktif olmayan öncüller halinde sentezlenir ve duodenuma girdikten sonra aktifleşir. Ekzokrin pankreasın kanal hücreleri ise su ve elektrolit salınımından sorumlu kısımdır. Endokrin kısım ise; karbonhidrat metabolizmasını kontrol eden hormonları salgılamaktadır. Pankreasın %1-2'sini oluşturan endokrin kısmı ise Langerhans adacık hücrelerinden meydana gelmektedir. Langerhans adacıkları, sıkı bir şekilde ekzokrin dokuya gömülmüş şekildedir. Başlıca; Pankreatik polipeptit (PP),

Alfa (α), Beta (β) ve Delta (δ) hücreleri olmak üzere 4 çeşit endokrin hücre vardır. PP hücreleri pankreatik polipeptit, α hücreleri glukagon, β hücreleri insülin ve amilin, δ hücreleri somatostatin salgılar (Rovasio, 2010; Şimşek 1993; Slack 1995).

1.3. Pankreas Kanseri Gelişimi ve Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri; hem endokrin hem de ekzokrin hücrelerden gelişebilmektedir. Pankreas kanserlerinin %95'i ekzokrin hücrelerden, %5'i endokrin hücrelerden köken almaktadır. Ekzokrin kanserlerin en yaygın tipi duktal epitel hücrelerden gelişen adenokarsinomlardır (Singh, Upadhyay, Srivastavas ve Shankar, 2015; DiMaio, 2015). Ekzokrin parankimden köken alan duktal adenokarsinom, malign pankreatik neoplazilerin %90 kadarlık kısmını oluşturmaktadır (Braunwald vd., 2004). Endokrin pankreas kanserleri genellikle adacık hücre tümörleri veya nöroendokrin tümör olarak; daha az yaygın şekilde ise somatostatinomalar, insülinomalar, VIPoma'lar, PPoma'lar, gastrinomalar, glukagonomalar şeklinde sınıflandırılabilir (Singh vd., 2015). Pankreas kanserlerinin; %57'si pankreasın baş kısmında, %9'u gövdede, %8'i kuyrukta, %6'sı birden çok kısımda oluşurken; %20'lik bir bölümün anatomik yeri saptanamamaktadır (Alberts ve Grothey, 2004).

İnvaziv özellikteki pankreatik duktal adenokarsinomlar, invaziv olmayan öncü lezyonlardan gelişmektedir. Pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller musinöz neoplazi (IPMN) ve musinöz kistik neoplazi (MCN) üç öncü lezyondur (Yonezava, Higashi, Yamada ve Goto, 2008).

Pankreas kanserinin en önemli lezyonu olan PanIN'ler, küçük pankreatik kanallarda yerleşmiş, 5 mm'den küçük çaplara sahip olan, mikroskopik epitelyal lezyonlardır. PanIN'lerin, çapı 1 cm'den büyük olan IPMN'ler ile farkı; makroskopik lezyon olmayışlarıdır (Hruban, Maitra, Kern ve Goggins, 2007). Epitelyal atipi derecesine göre; minimal atipi (PanIN-1A/B), orta atipi (PanIN-2) ve yüksek atipi (PanIN-3) olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. PanIN-1 lezyonları, PanIN-1A (düz tip) ve PanIN1B (papiller tip) olarak ikiye ayrılır (Distler, Aust, Weitz, Pilarsky ve Grützmann, 2014). PanIN-2 lezyonları papiller yapıdadır. PanIN-2 lezyonları yalancı çok katlı epitel epitel hücreler bulundurmaktadır. PanIN-3 lezyonları sitolojik atipi gösterirler. PanIN-3'de kribriform ve papiller yapılar bulunmaktadır (Wilde, Hruban ve Maitra, 2012; Hruban, Maitra, Goggins ve 2008). PanIN-1 ve PanIN-2 normal

pankreatik yapıda bulunmanın yanı sıra, %60'tan fazla karsinomlu yapıda da bulunduğu için klinik açıdan önemsiz sayılmaktadır. PanIN-3 lezyonları yaygın olarak invaziv karsinom durumunda gözlemlenmesi sebebiyle büyük bir klinik öneme sahiptir (Reid, Bagci ve Adsay, 2013). PanIN lezyonlarındaki genetik anomaliler; lezyonlardaki histolojik ilerlemeyi anlamak için önemlidir. PanIN-1 lezyonlarının %36'sında, PanIN-1B lezyonlarının %44'ünde, PanIN-2 ve PanIN-3 lezyonlarının %87'sinde K-ras geni mutasyonu tespit edilmiş ve mutasyon artışının neoplazi gelişimini etkilediği belirlenmiştir (Hruban, Goggins, Parsons ve Kern, 2000; Löhr, Klöppel, Maisonneuve, Lowenfels ve Lüttges, 2005). CDK2NA/p16 gen mutasyonları PanIN-2 lezyonları ile; SMAD4/DPC4, BRCA2 ve TP53 gen mutasyonları PanIN-3 ile bağdaştırılmaktadır (Wilentz vd., 2000; Hruban vd., 2008).

Müsin üreten epitel hücrelerin papiller çoğalması sonucu meydana gelen; aşırı müsin üretimi ve pankreatik kanalların kistik genişlemesiyle IPMN adı verilen makroskobik epitelyal neoplaziler ortaya çıkmaktadır. IPMN'ler kistik lezyonların heterojen grupları içinde yer alır ve kistik pankreatik neoplazilerin %20'sini, ekzokrin pankreatik neoplazilerin %3'ünü oluştururlar (Hruban vd., 2007; Distler vd., 2014; Kosmahl vd., 2004).

IPMN'ler, pankreasın ana ya da yan kanallarından gelişen lezyonlardır. Ana kanal tip IPMN (IPMN-MD) ve yan kanal tip IPMN (IPMN-BD) şeklinde klinik olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Ana kanal tip IPMN'lerin %60'lık bir kısmı yüksek derece displazi gösterirken, %45'lik kısmı invaziv karsinomla ilişkilendirilmektedir (Salvia vd., 2004). IPMN'ler, immünohistokimyasal boyanma özellikleri ve histolojik yapılarına göre ise; ana kanaldan köken alan gastrik, yan kanallardan köken alan intestinal, pankreatobiliyer ve onkositik tip olarak alt gruplara ayrılır (Distler vd., 2014; Klöppel, Kosmahl ve Lüttges, 2005). İntestinal tip, en sık görülen alt grup olmakla beraber genelde pankreasın baş kısmında oluşurken, pankreatobiliyer tip, genellikle pankreas başı ana kanalında oluşmaktadır (Ban, Naitoh ve Mino-Kenudson, 2006).

Duktal sistem ile iletişimi olmayan ve ayırt edici over-tip stromaya sahip olan MCN'ler; septasyonlu kist oluşturan, müsin üreten epitelyal neoplaziler olarak tanımlanır. Çoğunlukla pankreasın gövde ve kuyruk kısımlarında yerleşim gösteren lezyonlardır. Ortalama büyüklükleri 6-10 cm olan MCN'ler tek, multiloküler ya da uniloküler olarak gözlemlenebilirler (Fukushima ve Fukayama, 2007). MCN'ler

kadınlarda erkeklere oranla çok daha fazla görülen tümörlerdir (Hruban vd., 2007). MCN'ler; düşük MCN, orta MCN ve ileri MCN olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Zamboni, Scarpa ve Bogina, 1999). K-ras ve TP53 mutasyonları MCN lezyonlarında yaygın olarak gözlenmektedir (Avcı, 2015).

İnsan solid kanserlerinin en ölümcüllerinden biri olan pankreas kanseri, gastrointestinal kanserler arasında ikinci en sık görülen kanser çeşididir (Søreide ve Sund, 2015). Pankreas kanseri; kötü seyir özelliği göstermesiyle sebebiyle, dünya genelinde yılda 331 bin kişinin ölümünden sorumludur. Dünyada, görülme sıklığı açısından 12. sırada yer alan pankreas kanseri, kansere bağlı ölüm nedeni olması açısından ise 7. sırada yer almaktadır (Ferlay vd., 2015). Erkeklerde daha çok görülen pankreas kanseri genellikle 40-85 yaşlarında ortaya çıkmaktadır. Mortalitesi yüksek bir malignite olan pankreas kanserinin Türkiye'de erkeklerde görülme sıklığı 2002 yılında yüz binde 3.1 iken, 2016 yılında 5.7'ye yükselmiş, kadınlar da 2016 yılı için 3.6 olarak belirlenmiştir. Türkiye'de erkeklerde en çok görülen 10 kanserden biridir (Koçatakan ve Ataseven, 2021).

1.3.1. Pankreas Kanseri Risk Faktörleri

Etiyolojisi henüz tam anlaşılammış olan pankreas kanserinin oluşumunda birçok faktörün etkili olabileceği belirtilmektedir (Muniraj, Jamidar ve Aslanian, 2013). Risk faktörleri doğrudan hastalığa sebep olmasa da, bu faktörlere uzun süre maruz kalmak kanser gelişimini etkilemektedir. Pankreas kanserinin tedavisinde karşılaşılan zorluklar sebebiyle risk altında bulunan bireylerin bu faktörler ciddi bir öneme sahiptir (Decker vd., 2010).

1.3.1.1. Yaş

Artan yaş ile birlikte pankreas kanserindeki ölüm oranı ve görülme sıklığında artmaktadır (Muniraj vd., 2013). Yaşamın ilk 30-40 yılı pankreas kanseri riski açısından düşük olsa da; hasta bireylerin çoğunda 60-80 yaşlarında hastalık gelişim gösterirken, tanı koyma yaşı ortalama 72'dir. Daha genç hasta gruplarının pankreas kanserine yaklaşımının sebebinin genetik faktörlerden dolayı olabileceği belirtilmiştir (Pandol vd., 2012).

1.3.1.2. Etnik Köken, Genetik Faktörler ve Kalıtsal Hastalıklar

Pankreas kanseri için ırksal farklılıklar araştırıldığında; Afro-Amerikalılar, Yeni Zelanda yerlileri, Kuzey Avrupa halkı gibi bazı gruplarda insidansının yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Zavoral, Minarikova, Zavada, Salek ve Minarik, 2011; Silverman vd., 2003).

Pankreas kanserinin %10'luk bir kısmı aile ile ilişkilendirilmekte ve genetik bir temele dayandırılmaktadır (Wörmann ve Algül, 2013). BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları ailesel pankreas kanserlerinde en çok tanımlanan mutasyonlardır. Pankreas kanseri riski BRCA1 mutasyonu varlığında 2,26 kat artarken, BRCA2 mutasyonu varlığında 3,5-8 kat artış göstermektedir (Ferrone vd., 2009).

Genetik mutasyonlar ve aile temelli aktarımların yanı sıra, bazı kalıtsal hastalıkların da pankreas kanseri oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Peutz-Jeghers sendromu, otozomal dominant olarak kalıtılan genetik bir hastalıktır. Hastaların %50'den fazlası tümör baskılayıcı işlevi olan STK11/LKB1 geninde mutasyon taşımaktadır. Etkilenmiş bireylerde pankreas kanseri gelişim riski normal popülasyona göre 132 kat daha fazladır (Seicean ve Seicean, 2012; Poruk, Firpo, Adler ve Mulvihill, 2013; Latchford vd., 2006). Pankreas kanseri ayrıca; ailesel atipik multiple mole-melanom, Li fraumeni sendromu, ailesel adenomatöz polipozis sendromu, ataksitelanjijektazi sendromu, kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser, multipl endokrin neoplazi tip I sendromu, Von Hippel-Lindau sendromu gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (Avcı, 2015; Aşık, 2015).

1.3.1.3. Kronik Pankreatit

Pankreas kanserine ön tanı da olabilen kronik pankreatitin pankreas kanseri gelişimi ile ilgili bir risk faktörü olduğu ve zamana bağlı olarak risk artışına sebep olduğu yapılan çalışmalar sonucu doğrulanmıştır. Çalışmalarda kronik pankreatit tanısı ile ortaya çıkan pankreas kanseri riskinin orantılı olduğu gözlemlenmiştir (Wörmann ve Algül, 2013). 5 yıllık kronik pankreatit öyküye sahip olan hastalar ile gerçekleştirilen bir çalışmada pankreas kanseri gelişimi açısından insidans oranınının 14,4 olduğu belirlenmiştir (Ulubaşoğlu, 2011).

1.3.1.4. Diyabet

Pankeas kanseri için önemli bir risk faktörü olan diyabet, ayrıca pankreas kanserinin erken bir bulgusu olarak kabul edilmektedir. Hastalarda uzun süreli diyabet durumunun, olmayan hastalara oranla pankreas kanseri oranını 2 kat arttırma riski taşıdığı belirtilmiştir (Yadav ve Lowenfels, 2013). Diyabetin, Tip 1 diabetes mellitus ve tip 2 diabetes mellitus çeşitleri incelendiğinde pankreas kanserinde sırasıyla 2 ve 1,8 kat risk artışına sebep oldukları belirtilmiştir (Becker, Hernandez, Frucht ve Lucas, 2014).

1.3.1.5. Alkol

Bazı organlarda kanser için kesin risk faktörü olma özelliğine sahip olan alkol, pankreas kanseri için bu kesinliğe sahip olmayıp şüphesini devam ettirmektedir. Alkol ile pankreas kanseri ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ikisi arasındaki ilişki doğrulanamamış olsada alkol tüketim düzeyine göre kanser oluşum riski değişkenlik göstermektedir. Düşük ve orta seviyedeki alkol tüketiminin risk artışına sebep olmadığı ancak; günlük 30 g veya fazlasının tüketilmesinin %22'lik bir risk artışına sebep olabileceği belirtilmiştir (Dusek vd., 2010, Maisonneuve ve Lowenfels, 2010).

1.3.1.6. Sigara

Sigara kullanımı pankreas kanserinde, akciğer kanserinde olduğu gibi doğrudan bir etken olmamakla beraber, yine de önemli bir çevresel faktördür (Maisonneuve ve Lowenfels, 2010). Sigara yapımında kullanılan tütün malzemesinde bulunan karsinogen özellikteki N-nitrozaminlerin ve metabolitlerinin, pankreas üzerindeki karsinogenik etkisi, bu maddenin duodenumdan pankreas kanalı içine geri akışı ile ilişkilendirilmiştir (Harnack vd., 1997). Sigara kullanımının yaklaşık %25'inde etkili bir risk faktörü olmasının yanı sıra, pasif içicilikte önemsiz bir risk artışına sebep olmaktadır (Wolfgang vd., 2013, Lowenfels ve Maisonneuve, 2006)

1.3.1.7. Beslenme Biçimi ve Obezite

Taze meyve ve sebze tüketiminin kanser oluşum riskini azalttığı, doymuş yağlardan oluşan beslenme biçiminin ise kanser oluşumunu tetiklediği ve omega-3 yağ asidi içeren besinlerinde kansere karşı koruyucu olabileceği bildirilmiştir (Krejs, 2010; Zavoral vd., 2011). Hem kadınlarda hem de erkeklerde obezite kanser oluşumu için

risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Obeziteli bireyler normal vücut ağırlığına sahip bireylere göre %20 daha fazla risk altındadır (Zavoral vd., 2011, Muniraj vd., 2013).

1.4. *Lawsonia inermis* L.

1.4.1. *Lawsonia inermis* L. Botanik Özellikleri

Kına (*L. inermis*), kınagiller (Lythraceae) familyasından çiçekli bir bitkidir. Kına ağacı, tüysüz, çok dallı ve orta boylu bir çalı olarak tasvir edilir. Boyu 1,8 ile 7,6 metre arasındadır, yaprakları eliptiktir ve ortalama yaprak boyutları 1,5-5 cm x 0,5-2 cm' dir. Kına ağacı meyveleri 4-8 mm çapında, küçük ve kahverengi kapsüllerdir (Şekil 1.3. ve Şekil 1.4.). *L. inermis*; kinonlar, fenilpropanoidler, flavonoidler, terpenoidler, fenolikler, yağ asitleri, karbonhidratlar, proteinler, tanenler, alkaloidler, ksantanlar, kumarin, glukozitler, naftokinon, saponinler, triterpenoidler, steroller ve dioksin türevlerini içeren bir bitkidir. *L. inermis* yapraklarında **lawsone** (hennotannik asit (2-hidroksi-1, 4-naftokinon)) adı verilen kırmızı-turuncu renklere sahip bir pigment bulundurmaktadır (Malas ve Ekici, 2022). *L. inermis*'in ana etken maddesi olan (hennotannik asit (2-hidroksi-1, 4-naftokinon))'nun kimyasal yapısı Şekil 1.2'deki gösterilmiştir.

Kına yaprakları, çiçekleri, tohumları, kökleri ve kök kabuğu geleneksel tıpta romatoid artrit, diyabet, baş ağrısı, cüzzam, ülser, ateş, ishal, lökori, kalp hastalığı, hepatoprotektif gibi birçok rahatsızlığı tedavi etmek için kullanılır (Chetty, 2008; Chauadhary, Goyal ve Poonia 2010). Yapracağının yapısında yer alan turuncu-kırmızı pigment; eller, tırnaklar ve ayaklar için süsleme amacıyla ve ayrıca saç boyası olarak kullanılır. Çiçekleri hoş bir kokuya sahip olduğu için parfüm yapımında kullanılmaktadır. Morluklar için çiçeklerin infüzyonu önerilirken, çiçeklerin kaynatılması emmenagog olarak tanımlanmaktadır. Arıtılmış tereyağı ile güçlendirilen tohumlar dizanteriye karşı etki göstermektedir. Güçlü formdaki tohumlar ise karaciğer bozuklukları ve ilgili problemler için iyi bir ilaç olma özelliğine sahiptir. Kök kısmının, bel soğukluğu ve uçuk enfeksiyonu için güçlü bir ilaç olduğu kabul edilmektedir (Chauadhary vd., 2010).

Çeşitli sınıfları temsil eden yaklaşık yüz bitki bileşeni, *L. inermis*'in tüm bölümlerinden tanımlanmıştır . Kumarinler, flavonoidler ve naftokinonlar dahil olmak üzere fenolik bileşikler özellikle kına ekstraktlarında yaygındır (Semwal, 2014).



Şekil 1.2. Lawsoneun yapısal formülü (Garg, Tripathi, Batav ve Singh (2017)).



Şekil 1.3. *L. inermis*'in kurutulmuş hali.



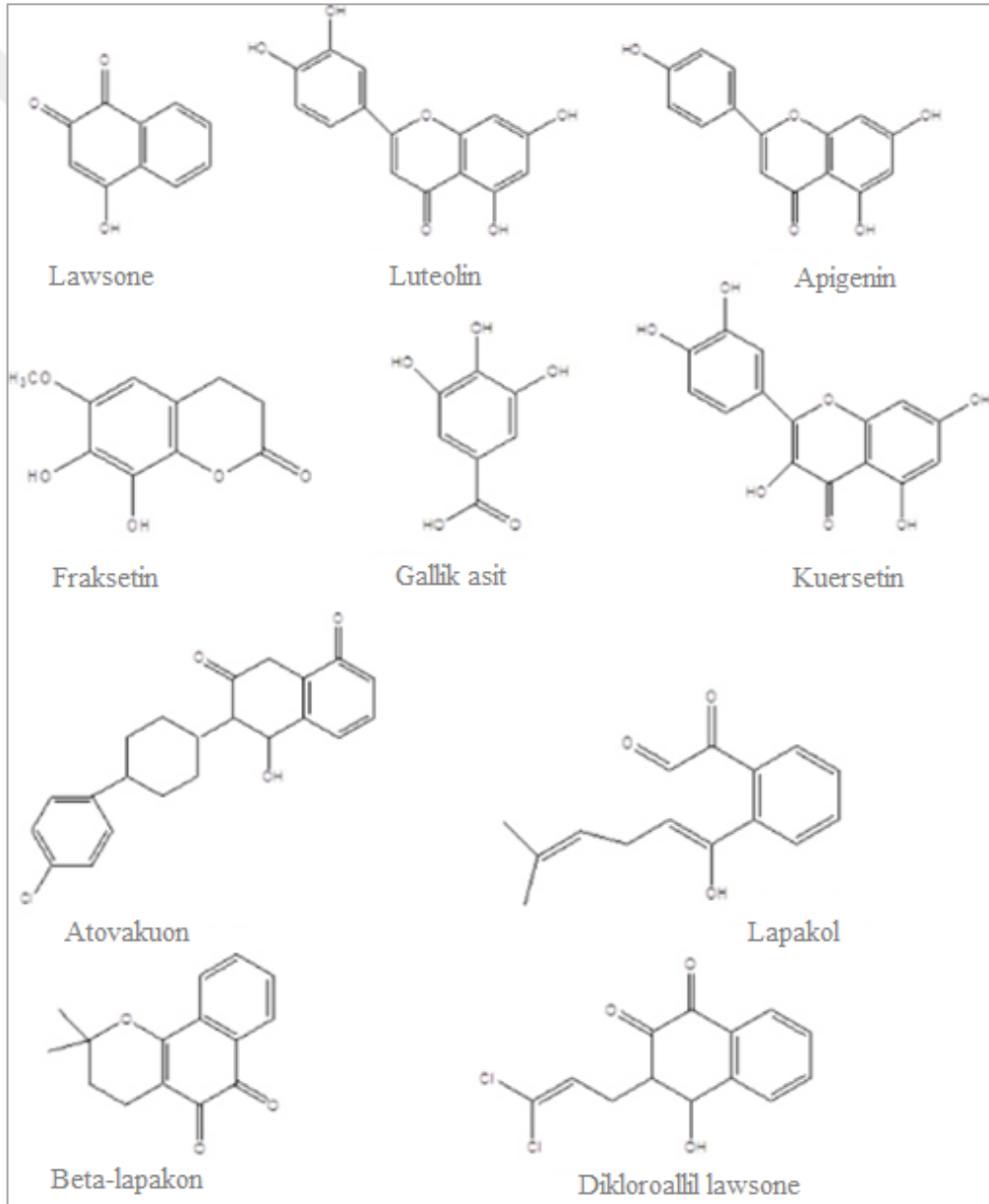
Şekil 1.4. *L. inermis*'in yaş hali.

1.4.2. *Lawsonia inermis* L.'in Antikarsinojenik Etkisi

Kanser oluşumunu engelleyen veya tümörün büyümesini önleyen maddeler antikarsinojenik maddelerdir. Kanserın moleküler ve genetik temelının anlaşılmaya başlaması, kanser ilacı için yeni ilaçların seçiciliğini sağlamış ve antikanser ilaç keşif programı için önemli bir hedef haline gelmiştir (Pierotti, Schichman, Sozzi ve Croce, 2000). Endrini, Rahmat, İsmail, Taufiq-yap (2011) insan karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) yaptıkları çalışma ile apoptotik olayların uçucu yağ ile indüklendiğini kanıtlamışlardır. Priya, Ilanevil, Kaleeswaran, Srigopalram ve Ravikumar (2011), *L. inermis* ekstrelerinin, farelerde DLA (Dalton's lymphoma ascites) kaynaklı tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada kına tozunun kanserli hücreler üzerindeki etkisi araştırılmış ve hücre içi serbest radikallerin, hidrojen peroksit seviyesinin yükseldiğini, apoptozun uyarılmasına yol açan hidrojen iyonu konsantrasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir (Ozaslan, Zumurtdal, Daglıoğlu, Kılıc ve Karagöz, 2009). 2-hidroksi-1,4-naftokinon ve kloroasetaldehitten sentezlenen Furano-1, 2-naftokinon, G (2) / M hücre döngüsü durmasının durdurulması ve apoptozun teşvik edilmesiyle A549'un (akciğer kanseri hücreleri) büyümesini durdurduğu bulunmuştur (Kamei, Koide, Kojima, Hashimoto ve Hasegawa, 1998).

Başka bir antikarsinojenik özelliğini belirleme çalışmasında, *L. inermis*'in ekstraktının (çözücü olarak kloroform kullanılarak) insan göğüs (bağımlı hormon, MCF-7; bağımlı

olmayan hormon, MDA-MB-231), kolon (Caco-2), karaciğer (HepG2) karsinoma hücre hatları ve normal insan karaciğer hücre hatları (Chang Liver) üzerinde mikrokültür tetrazolyum tuzu (MTT) tahlili ile incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlarda, kına ekstraktının HepG2 ve MCF-7'ye karşı sitotoksik etki gösterdiğini ve sırasıyla IC₅₀ değerinin 0.3 ve 24.85 µg/mL olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, incelenen konsantrasyonda Caco-2 ve MDA-MB-231 hücre hatlarından IC₅₀ değerlerinin elde edilmediği ve bu ekstraktın normal insan karaciğer hücre hatlarına karşı IC₅₀ değerini göstermediği sonucuna ulaşılmıştır (Singh ve Luqman, 2014). *L. inermis* ve bazı lawsone türevlerinden rapor edilen antikanser moleküller Şekil 1.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. *L. inermis* ve bazı lawsone türevi antikanser moleküller (Singh ve Luqman, 2014).

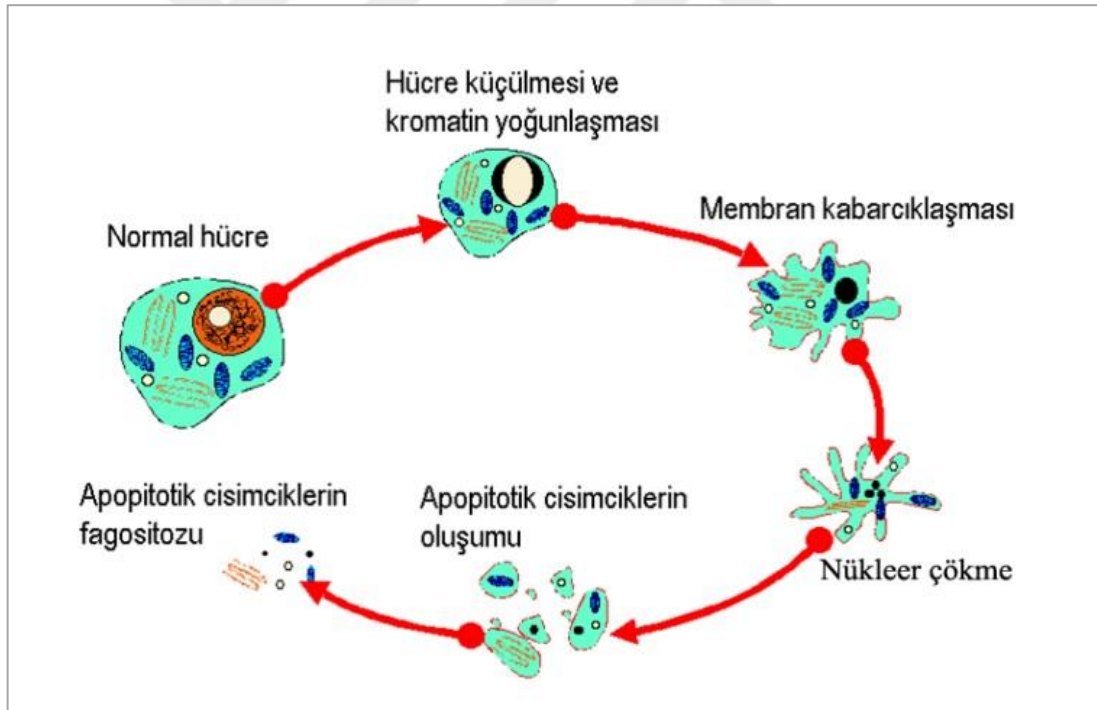
1.4.2.1. *Lawsonia inermis* L.'in Antimikrobiyal Etkisi

Bitki türlerinin antimikrobiyal taramalarından bazıları için için gram pozitif ve gram negatif bakteriler kullanılır. Yapılan bir çalışmada test edilen bitkiler içinde test edilen bütün bitki türleri arasında, *L. inermis* etil asetat ekstresinin bakterilere karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir (Ali, Julich, Kusnick ve Lindequist, 2001). Dama, Poul ve Jadhav (1999) *L. inermis*'in antimikrobiyal özelliklerini anlayabilmek adına *in-vitro* kinonik bileşikler üzerinde çalışmışlardır. Lawsone üzerinde yapılan genotoksik bir çalışmada ise bunun *Salmonella typhimurium* suşu TA98 için zayıf bir bakteriyel mutajen olduğunu ve TA2637 suşu için daha açık bir şekilde mutajen olduğunu ileri sürmüşlerdir (Kirkland ve Marzin, 2003). *L. inermis*'in tüketici için, alerjen, kanserojen, genotoksik risk barındırmadığı yapraklarının sulu özütü ile rapor edilmiştir (Baba-Moussa vd., 1997). *L. inermis* yapraklarının, sulu, metanol ve kloroform ham özütlerinin farklı patojenik bakteri suşlarının büyümesini inhibe ettiği ve *in vitro* antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Saadabi, 2007; Malekzadeh, 1968; Habbal, Ai-Jabri, El-Hag, Al-Mahrooqi ve Al-Hashmi, 2005). *L. inermis*'in tüberkülostatik aktivitesini belirlemek için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda, 6 µg/mL bitkinin, Lowenstein Jensen besiyerinde balgamdan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve Tüberküloz basillerin büyümesini engellediği ve tüberkülostatik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, kobaylarda ve farelerde 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunun, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ile enfeksiyonun ardından deneysel tüberkülozun belirgin bir çözünürlüğüne sebep olduğu bildirilmiştir (Sharma, 1990).

1.5. Apoptoz

Programlı hücre ölümü olan apoptoz; hücrelerin yaşamı ve ölümü arasında kurduğu denge ile homeostatik bir mekanizma olmasının yanı sıra, zararlı ajanlara ve hastalıklara karşı hücrelerin geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır (Ouyang vd., 2012; Norbury ve Hickson, 2001). Apoptotik hücrelerde hücre morfolojisindeki değişikliklerin ardından, DNA fragmantasyonu ve protein çapraz bağlanması gibi olaylar gözlemlenmektedir. Apoptotik hücredeki değişiklikler sırasıyla; hücre küçülmesi ve kromatin yoğunlaşması, membran kabarcıklaşması, nükleer çökme, apoptotik cisimciklerin oluşumu ve apoptotik cisimciklerin fagositozu şeklindedir (Gültekin, Karaoğlu ve Küçükateş, 2008).

Apoptoz 4 aşamadan oluşur (Şekil 1.6.). İlk olarak çekirdekte meydana gelen ve geri dönüşümsüz olup hücre ölümünü sağlayan DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Bununla birlikte sitoplazma büzülmesi sonucu hücrenin hacmi azalır. Hücre yüzeyine paralel demetler olacak şekilde, hücre iskeleti elemanları tekrar düzenlenir. Mitokondriyal membran kanallarında geçirgenliğin değişime uğraması sonucu mitokondriyal fonksiyon kaybı meydana gelir. Mitokondrinin bütünlüğünün bozulması nedeniyle mitokondriyal transmembran potansiyeli düşer ve elektron transport zinciri bozulur. Kaspaz adı verilen proteolitik enzimlerin aktive olması, Sitokrom-c gibi proteinlerin sitoplazmaya salınımı ile başlar. Böylece Sitokrom-c, Bcl-2 proteinlerinin etkisi altında apoptozu başlatır. Bu aşamanın ardından fosfolipidlerin gibi belirli moleküllerin plazma zarının sitoplazmik iç yüzeyinden dış yüzeyine geçmesi sonucu membranın fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir ve membran kabarcıklaşması gerçekleşir. Son aşamada apoptotik cisimcikler oluşuktan sonra hücre parçalanması gerçekleşir ve cisimcikler fagositik hücrelerce ortadan kaldırılır (Ross, 2014).



Şekil 1.6. Apoptoz aşamaları (Aşık, 2015).

Apoptoz mekanizması, intrinsik (içsel veya mitokondriyal yolak), ekstrinsik (dışsal veya ölüm reseptör yolağı) ve sitotoksik T hücrelerinden salınan granzim A ve granzim B ile uyarılan perforin/granzim yolağı olmak üzere üç farklı yolak ile gerçekleşmektedir (Sun ve Peng, 2009). Öldürücü fazda kaspaz-3 aktivasyonu ile dışsal, içsel ve granzim B uyarılı perforin/granzim yolakları öldürücü fazda kaspaz-3

aktivasyonuyla gerçekleşmektedir. Granzim A uyarılı perforin/granzim yolağı ise kaspaz bağımsız hücre ölümünü aktive etmektedir (Elmore, 2007).

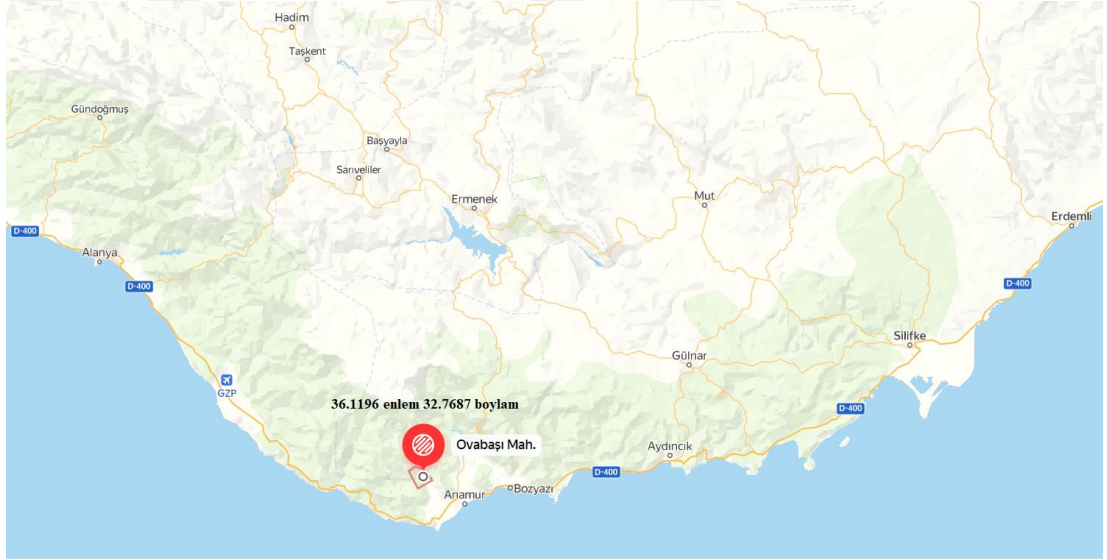
1.6. Çalışmanın Amacı

L. inermis tıbbi açıdan önemli etkilere sahip moleküller içeren bir bitkidir. Bu bitki kullanılarak kozmetik ve sağlık alanlarında birçok gelişme yaşanmıştır. Çeşitli kanserler üzerine yapılan çalışmalarda farklı hücre hatları kullanılmış, deney hayvanları üzerinde çalışmalar yapılmış ve umut verici sonuçlara ulaşılmıştır. Ancak bu bitkinin CAPAN-1 hücre hattındaki antikanser etkinliği ile ilgili kesin bir bilgi elde edilmemiştir. Bu çalışmanın amacı; *L. inermis*'in CAPAN-1 hücrelerinde MTT testi ile sitotoksosite tayini yaparak antiproliferatif etkisini ve ikili boyama testi ile % apoptotik, nekrotik indeksi hesaplayarak hücre ölüm modunu belirlemektir. Buna ek olarak bitkide bulunan biyoaktif bileşenlerden kaynaklı olabilecek antimikrobiyal aktivitenin, agar disk difüzyon ve MİK deneyleriyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunun, bitkinin antikanser ve antimikrobiyal etkinlik potansiyeli ile ilgili bir fikir vermesi ve bu konuda ileride yapılabilecek çalışmalara alt yapı oluşturması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada Türkiye'nin Mersin ili Anamur ilçesinde 36.1196 enlem 32.7687 boylam konumundan *L. inermis* L. bitkisi toplanmıştır (Şekil 2.1.). Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Herbaryumunda *L. inermis* L. olduğu onaylanarak bitkiye MKUBK-H-0016 numarası verilmiştir.



Şekil 2.1. *L.inermis*'in toplandığı konum.

2.2. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar süresince kullanılan ekipmanlar; Soxhlet cihazı (BÜCHİ B-811, İsviçre) , Rotary evaporatör (BÜCHİR-210, İsviçre) Inverted mikroskop (Leica DM6000B, Almanya), Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam, Türkiye), CO2 inkübatör (Binder CB150, Almanya), Hücre sayım cihazı (Invitrogen, USA), Elisa okuyucu (BIOTEK, USA), Soğutmalı Santrifüj (Rotina 380R Hettich, Almanya) , Otoklav (Nüve OT 23B- Türkiye), Hassas terazi (Precisa XB220A- İsviçre), Mikropipet (20 µm, 100 µm, 1000 µm) (Corning, USA) , Floresan

Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu (Leica, Almanya), Saf su cihazı (Purelab OptionR15, Almanya), Ultrasonic Banyo (WiseClean WUC-D06H, Kore), Vortex (Heidolph- Reax top, Almanya) .

2.2.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Bitki ekstraksiyon aşamasında kullanılan; metanol (Sigma-Aldrich, Almanya), aseton (Sigma-Aldrich, Almanya), kloroform (Sigma-Aldrich, Almanya), lawsone standardı (Sigma-Aldrich, Japonya) firmasından temin edilmiştir.

In vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılan L929 fibroblast hücresi Türkiye Şap Enstitüsü'nden, CAPAN-1 pankreas kanseri hücresi ve antimikrobiyal çalışmalarında kullanılan; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* mikroorganizmaları ATCC firmasından temin edilmiştir.

In vitro hücre kültürü deneylerinde kullanılan; DMEM (Biological industries, USA), IMDM (Biological industries, USA), Fötal bovine serum (Biological industries, USA), Penicillin streptomisin (Biological industries, USA), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (İsolab, Almanya), Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Sigma, Almanya), Tripsin EDTA (Biological industries, USA), MTT (Serva, Almanya), Tripkan blue (Invitrogen, USA), Propodium iyodür (Serva, İsrail), Hoechst 33342 (Serva, İsrail), RibonukleazA (Serva, İsrail), İzopropanol (Sigma, ABD), 48 Kuyucuklu plate (Corning, ABD), 96 Kuyucuklu plate (Corning, ABD), 75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Corning, ABD), firmalarından temin edilmiştir. *In vitro* antimikrobiyal deneylerde kullanılan Mueller-Hinton broth (Merck) firmasından temin edilmiştir.

2.3. Bitki Materyali Ekstraksiyon Aşaması

L. inermis bitki materyali ekstraksiyonu Bozkaya vd. (2022)'nin belirttiği yöntem ile yapılmıştır. *L. inermis* bitkisinin tohumundan, yapraklarından ve dallarından homojen olmasına dikkat edilerek; 10 g hassas terazide tartılmıştır. Havan yardımı ile ezilerek daha küçük parçalara ayrılması sağlanmıştır. Soxhlet cihazında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2.). Tartılarak havan içerisinde dövülen tohum, yaprak ve dallar süzgeç kağıdı ile hazırlanan kartuşun içerisine koyularak Soxhlet cihazına yerleştirilmiştir. 250 mL'lik bir balon joje içerisine 140 mL metanol ilave edilmiştir. Isıtıcı üzerinde 18 °C'de, 20 kademe ayarında, 20 döngülü olacak şekilde ekstrakte edilmiştir. Metanol ekstresi rotary evaporatörde 50 °C sıcaklıkta uçurulmuştur. Aynı

soxhlet cihazında, 10 g daha tartılarak havan yardımıyla ezilen bitki parçaları, 250 mL'lik bir balon joje içerisine, bu kez 140 mL distile su ilave edilerek, ısıtıcı üzerinde 18 °C' de, 20 kademe, 7 döngülü olacak biçimde ekstrakte edilmiştir. Su ekstresi rotary evaporatörde 66 °C sıcaklıkta uçurulmuştur. Aynı şekilde soxhlet cihazında 250 mL'lik bir balon joje içerisine bu kez 140 mL kloroform eklenerek ısıtıcı üzerinde 20 °C'de 20 kademe ayarında 14 döngülü olacak biçimde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Kloroform ekstresi rotary evaporatörde 60 °C sıcaklıkta uçurulmuştur. Aynı soxhlet cihazında 250 mL'lik balon joje içerisine 140 mL aseton eklenerek ısıtıcı üzerinde 50 °C sıcaklıkta 20 kademe 10 döngülü olacak biçimde ekstrakte edilmiştir. Daha sonra aseton ekstresi rotary evaporatörde 60 °C sıcaklıkta uçurulmuştur. Hazırlanan tüm ekstraktlar kullanılmaya kadar +4 °C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 2.2. Soxhlet cihazı (BÜCHI B-811, İsviçre).

2.4. Antimikrobiyal Aktivite Testi

2.4.1. Agar Disk Difüzyon Testi

L. inermis'in antimikrobiyal aktivitesinin agar disk difüzyon yöntemi ile tayini Çerçi (2011)' nin belirttiği yöntem ile yapılmıştır. *L. inermis* bitkisine ait su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve bitkiye ait lawsone standartının mikroorganizmalara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite, agar

disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Öncelikle kullanacağımız tüm malzemeler steril edilmiştir. Kullanacağımız besiyeri Mueller Hinton Agar üretici firmanın önerdiği şekilde uygun miktarda tartılmıştır. Distile su içerisinde çözdürülmüştür. Hazırladığımız besiyeri otoklav içerisinde 121 °C’de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Soğutularak steril petri kaplarına 20-25 mL dökülmüştür, +4 °C’ye kaldırılmıştır. Besiyeri katılaştıktan sonra 1 gece etüvde bekletilip sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanılmıştır. Öncelikle boş diskler içerisine %10 DMSO’da çözdürülerek çözeltileri hazırlanan lawsone standartı, su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve metanol ekstraktı 20 µL olacak biçimde emdirilmiştir. Bir süre kuruması beklenilmiştir. Uygulamada son DMSO konsantrasyonu %1’i geçmemiştir. Deneyin gerçekleştirilmesi için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 stok kültürlerinden, Tryptic Soy Agar (TSA)’da 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır. *S. aureus* ve *E.coli* 24 saatlik taze kültürlerinden alınarak steril serum fizyolojiğe aktarılmıştır. 0.5 Macfarland bulanıklık standartına eşdeğer bulanıklıkta mikroorganizma süspansiyonu hazırlanmıştır. 0.5 Macfarland bulanıklığı OD600’de 0,08-0,1 aralığında tespit edildi. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonundan eküvyon çubuğu ile içerisinde Mueller Hinton Agar bulunan petrilere ekim yapılmıştır. Eküvyon çubuğu süspansiyon içine daldırılmıştır, sıvıyı emmesi sağlanmıştır. Eküvyon çubuğunu çıkartırken fazla sıvının tüp iç duvarına hafifçe bastırılarak atılması sağlanmıştır. Petrinin tüm yüzeyine ekim yapıldığından emin olmak için süspansiyondan çıkarılan eküvyon çubuğu ile; petri ortasından + şeklinde 2 çizgi ve toplamda 3 çakışan çizgi çizilerek 60°lik dönüşlerle süspansiyondan alınan sıvının tüm yüzeye dağıtılması sağlanılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra antimikrobiyal aktivitesi denenecek olan *L.inermis*’e ait toplam 5 örneğin (su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, metanol ekstraktı, lawsone standartının) emdirildiği diskler ve mikroorganizmalar için kontrol olarak seçilmiş kloramfenikol antibiyotiği içeren hazır diskler, aralarında en az 22 mm boşluk olacak şekilde agar üzerine yerleştirilmiştir. Diskler petri çeperinden en az 14 mm uzağa yerleştirilmiştir. Çalışmamız *S. aureus* ve *E. coli* için 3 tekrar olacak biçimde yapılmıştır. Daha sonra ekim yapılmış ve disk yerleştirilmiş petriler 37 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında mikroorganizmaların üremediği bir zon oluşumu gözlemlenmiştir. Oluşan her zonun çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Ortalamaları alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.4.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Testi

L. inermis'e ait su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve bitkiye ait lawsone standartının minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite tayini için stoklanmış olan kültürler *S. aureus* ve *E.coli* Trpytic Soy Agar (TSA) besiyerinde 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra çoğalan her mikroorganizmadan öze yardımı ile yaklaşık 5 koloni alınıp, 5 mL steril serum fizyolojik içerisine daldırılmıştır. Öze birkaç kez döndürülmüştür. Vorteks yaparak tam anlamıyla karışması sağlanmıştır. Daha sonra ELİSA okuyucuda 600 nm'de absorbens değeri okutulmuştur. 0.5 McFarland değerinde (10^5 CFU/mL) okumasını istediğimiz absorbens değerleri 0,08-0,10 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Okutulan absorbens değerlerine göre koloni veya serum fizyolojik ilavesi yapılmıştır.

Bu aşamaların ardından mikrodilüsyon yönteminde kullanılan steril, U tabanlı, 96 kuyucuklu plakalara 100 µL Mueller Hinton Agar (500 mL distile su içerisine 17 g Mueller Hinton Agar eklenmiştir, otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır.) besiyeri eklenmiştir. %10 DMSO'da çözdürülerek çözeltileri hazırlanan lawsone standartı, su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, metanol ekstraktı ve kloramfenikol antibiyotiği ilk kuyucuklara 100 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. 6 konsantrasyon (%100, %50, %25, %12,5, %6,25, %3,12) boyunca çift katlı dilüsyon yapılmıştır. Uygulamada son DMSO konsantrasyonu %1'i geçmemiştir. MacFarland 0.5 bulanıklılığına ayarlanan mikroorganizmalar, serum fizyolojik ile 1/10 oranında seyreltilip 5 µL alınarak kuyucuklara inölüke edilmiştir ve inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların değerleri ayarlandıktan sonra hücre sayısında değişiklik yaşanmaması için 30 dakika içinde kullanılmıştır. Kullandığımız plakanın 6 kuyucuğuna sadece MHA besiyeri eklenerek sterilite kontrolü yapılmıştır. Farklı 6 kuyucuğuna MHA besiyeri ve mikroorganizmalar eklenerek üreme kontrolü yapılmıştır. Yapılan uygulamalardan sonra plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Ancak 96 kuyucuklu plaka içerisinden sıvının inkübasyon sırasında buharlaşmadığından emin olmak için plakalar ağzı kilitli poşetler içinde saklanmıştır. Kilitli poşetlerin içine nemli bir kağıt havlu koyulmuştur. İnkübasyon sonrasında mikroorganizma üremesine bakılmıştır. Mikroorganizma üreme kontrol kuyucuğunda üreme olduğu, sterilite kontrol kuyucuğunda üreme olmadığı tespit edildikten sonra,

MİK değerleri saptanmıştır (Çerçi, 2011). Mikroorganizma üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyon bakteriler için MBK, inkübasyon sonunda mikroorganizmaların üremesinin yavaşladığı ilk konsantrasyon MİK değeri olarak değerlendirilmiştir.

2.5. Hücre Kültürü

2.5.1. CAPAN-1 Pankreas Kanseri Hücresinin *İn Vitro* Kültürlerinin Hazırlanması

Donmuş şekilde -195°C’de sıvı azot içerisinde bulunan kriyotüplerdeki CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri (24. Pasaj), sıvı azot tankından alınarak inkübatöre koyulmuştur. İnkübatörde çözünmesi sağlanmıştır. %89 IMDM, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin karışımından oluşan besiyeri ortamı hazırlanmıştır. İnkübatörde çözdürülen CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri falkon tüpe aktarılmıştır. Üzerine hazırladığımız besiyerinden 2 mL ekleyerek, 2 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır. Kalan pellet 18 mL besiyeri ile karıştırılıp 3 adet 75cm²’lik flaska transfer edilmiştir. Hücre çoğalmasına yardımcı olmak için her bir flask içerisinde 60’ar µL olacak biçimde L-Glutamin eklenmiştir. Flasklar 37°C’de %5 CO₂ barındıran inkübatöre koyulmuştur. Flasklar kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının gözlemlenmesi için 24 saatte bir, mikroskopik inceleme yapılarak kontrol edilmiştir. İki günde bir flasklardaki besiyeri değiştirilmiştir. 75 cm²’lik flasklarda çoğaltılan hücreler, flaskları tamamen kapladıklarında ve flask yüzeyi yetersiz gelmeye başladığında, Tripsin/EDTA kullanılarak flask yüzeyinden enzimatik yolla kaldırılmıştır. Bunun için flasklardaki vasatlar atılarak 2,5’er mL PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmıştır. PBS flasklardan atıldıktan sonra 2’şer mL Tripsin/EDTA ilavesiyle (% 5 CO₂ , 37°C, >% 90 nem) 3-4 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin flask yüzeyine tutunup tutunmadığı, inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için flasklara 4’er mL IMDM ekleyerek oluşturduğumuz karışım 15 mL’lik falkon tüplere aktarılmıştır. 2 dakika 2000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Falkon tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklenmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak, 10 µL tripan blue ile eppendorf içerisinde pipetle karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Bu homojen karışımdan 10 µL alınarak hücre sayım kasetine koyulmuştur. Otomatik sayım cihazında hücre sayımı yapılmıştır.

2.5.2. L929 Fibroblast Hücresinin *In Vitro* Kültürlerinin Hazırlanması

Donmuş şekilde -195°C 'de sıvı azot içerisinde bulunan kriyotüplerdeki L929 fibroblast hücreleri (27. Pasaj), sıvı azot tankından alınarak inkübatöre koyulmuştur. İnkübatörde çözünmesi sağlanmıştır. %89 DMEM, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin karışımından oluşan besiyeri ortamı hazırlanmıştır. İnkübatörde çözdürülen L929 fibroblast hücreleri falkon tüpe aktarılmıştır. Üzerine hazırladığımız besiyerinden 2 mL ekleyerek, 2 dakika 2000 rpm'da santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım dikkatli bir şekilde atılmıştır. Kalan pellet 18 mL besiyeri ile karıştırılıp 3 adet 75cm^2 'lik flaska transfer edilmiştir. Hücre çoğalmasına yardımcı olmak için her bir flask içerisine 60'ar μL olacak biçimde L-Glutamin eklenmiştir. Flasklar 37°C 'de %5 CO_2 barındıran inkübatöre koyulmuştur. Flasklar kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının gözlemlenmesi için 24 saatte bir, mikroskopik inceleme yapılarak kontrol edilmiştir. İki günde bir flasklardaki besiyeri değiştirilmiştir. 75cm^2 'lik flasklarda çoğaltılan hücreler, flaskları tamamen kapladıklarında ve flask yüzeyi yetersiz gelmeye başladığında, Tripsin/EDTA kullanılarak flask yüzeyinden enzimatik yolla kaldırılmıştır. Bunun için flasklardaki vasatlar atılarak 2,5'er mL PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmıştır. PBS flasklardan atıldıktan sonra 2'er mL Tripsin/EDTA ilavesiyle (% 5 CO_2 , 37°C , >% 90 nem) 3-4 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin flask yüzeyine tutunup tutunmadığı, inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için flasklara 4'er mL IMDM ekleyerek oluşturduğumuz karışım 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. 2 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılmıştır. Falkon tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklenmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonundan 10 μL alınarak, 10 μL tripan blue ile ependorff içerisinde pipetle karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Bu homojen karışımdan 10 μL alınarak hücre sayım kasetine koyulmuştur. Otomatik sayım cihazında hücre sayımı yapılmıştır.

2.6. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

L. inermis bitkisinden elde edilen kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, metanol ekstraktı, su ekstraktı ve lawsone standartının tam çözünmesini sağlamak amacıyla %10 DMSO eklenerek, 1 mg/mL olacak şekilde DMEM ile çözümleri hazırlanmıştır. Bitkiye ait her bir ekstraktan ve lawsone standartından 1 mg tartılmasının ardından

üzerlerine 100 µL DMSO, 900 µL besiyeri eklenmiştir. Sonikatör ile tamamen ekstraktların çözünmesi sağlandıktan sonra, UV ışık altında 15 dakika boyunca sterilizasyonları sağlanmıştır.

2.7. MTT Metodu ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT, XTT, MTS ve WST-1 testleri yapılmaktadır. Pozitif yüklü bir bileşik olan MTT, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçer. Ancak diğer testler negatif yüklü bileşiktir ve hücre membranını geçemezler. Dolayısıyla hücre membranını geçebilmek için fenazin metil sülfat vb. ara elektron alıcı moleküllerin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmada MTT testi tercih edilmiştir (Tokur ve Aksoy, 2017).

MTT metodu, hücre proliferasyon testlerinde metabolik aktivitenin ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır. Metodun çalışma ilkesi temelde; proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesiyle, tetrazolyumu (sarı) kullanarak formozan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin ELİSA okuyucuda absorbans olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006).

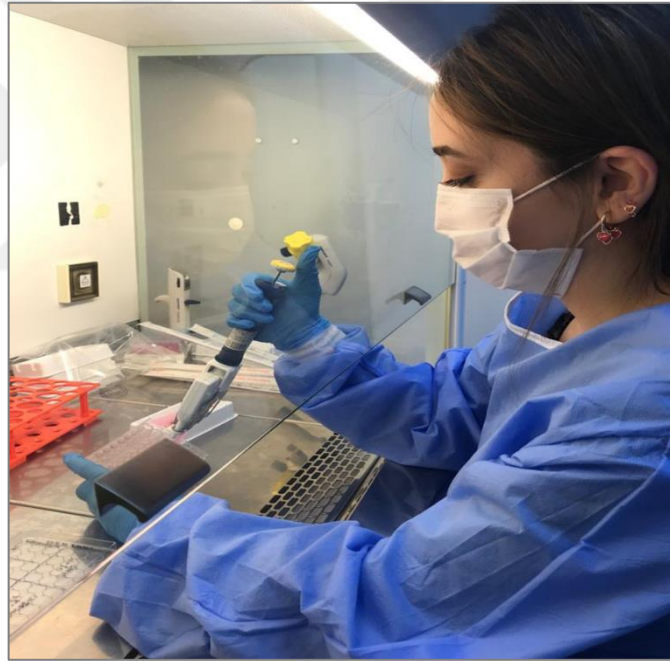
Hücre sayısı yeterli duruma geldiğinde CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri, 2 adet 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Aynı şekilde çalışmada kontrol amacıyla kullanılan L929 fibroblast hücreleri de 2 adet 96 kuyucuklu plakaya, plate düzeninin tasarlanmasının ardından her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon (%5 CO₂, 37°C, >%90 nem) süresiyle hücrelerin yüzeye tutunmaları sağlanmıştır. 24 saatin sonunda besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.3.). Uygulamaya başlamadan önce %10 DMSO ile hazırladığımız su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, metanol ekstraktı ve lawsone standartı 7 farklı konsantrasyon (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 µg/mL) şeklinde ilave edilmiştir. Her bir örnek için anlamlı sonuçlar elde edebilmek amacıyla 4 tekrarlı çalışılmıştır. Ektiğimiz plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Her bir plaka için plaka düzeni aynı şekilde oluşturulmuştur. Negatif kontrol olarak yalnızca besiyeri, pozitif kontrol olarak %20 DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun tek başına etkisini görmek içinde, %10'luk DMSO ayrıca kuyucuklara eklenmiştir.

Her plaka için 24 saat inkübasyondan sonra vasat atılmıştır. Kuyucuklara 50 µL MTT solüsyonu (1 mg/1 mL fenol redsiz besiyeri ile seyreltilir, 0,2 µm filtreden geçirilir ve

solüsyon kullanılabildiği kadar +4°C’de saklanır.) ilave edilmiştir. Hiç ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanan plakalar 2 saat boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki MTT çözeltisi çekilmiş, 100 µL izopropanol eklenmiştir. 570 nm’de ELİSA okuyucuda okuma gerçekleştirilmiştir (Melekoğlu, Ekici, Arat ve Karahan, 2011). Negatif kontrol kuyucuklarından alınan absorbansların ortalaması % 100 olarak kabul edilmiştir ve kontrol absorbans değerleri arasında %15’ten fazla fark olmaması gereklidir. Test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile karşılaştırma yapılmıştır ve karışımların sitotoksitesisi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Fotakis ve Timbrell, 2006):

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = ((\text{OD570}(\text{numune})) / (\text{OD570}(\text{negatif kontrol}))) \times 100$$

MTT sonuçlarına göre IC₅₀ hesaplanmasında GraphPad Prism (Software ver. 6) kullanılmıştır.



Şekil 2.3. MTT testi uygulamasında plakalardan vasatın çekilmesi işlemi.

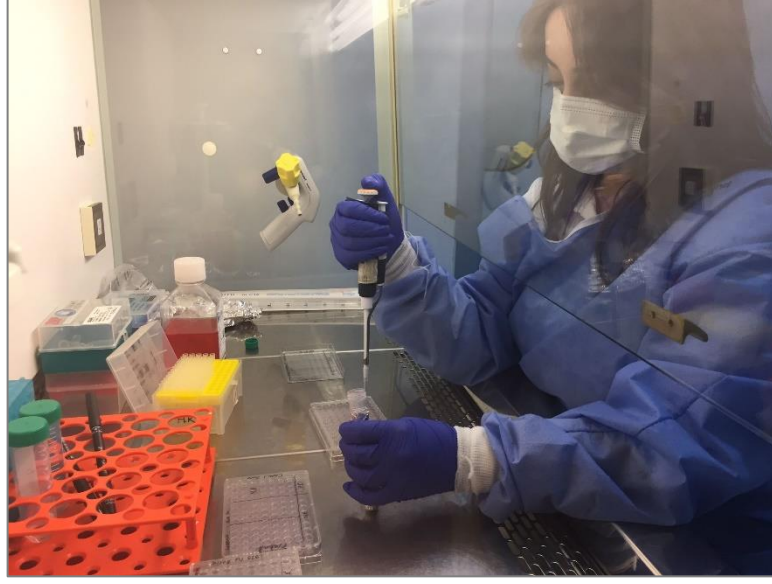
2.8. İkili Boyama Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Gösterilmesi

İkili boyama metodunda hücre çekirdeği boyanarak görünür hale gelir, bu sayede apoptoz ve nekroz tayini yapılabilmektedir. Sitoplazmik RNA’yı yok eden ve böylece sitoplazmanın boyanmasını engelleyen Ribonükleaz A -20 °C’de saklanmıştır. Canlı hücreleri sönük mavi renkte, apoptotik hücreleri ise parlak beyaz renkte boyayan ve böylece gerçek apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlayan Hoechst (33342) boyası

+4 °C’de saklanmıştır. Canlı hücre zarından geçemeyen, ancak ölü hücre zarından geçerek DNA ve RNA’yı kırmızıya boyayan ve bu sayede sekonder nekrozu gösteren Propidium iyodür boyası ise +4 °C’de saklanmıştır. İkili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekrozun tayini için öncelikle ikili boyama çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mL PBS’ de 10 mg RNA içeren Ribonükleaz A, 1 mL PBS’de 200 µg içeren Hoechst (33342) ve 1 mL PBS’de 100 µg Propidium iyodür içeren stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltileri kullanılana kadar +4 °C’de saklanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerinden, 10 mL PBS içerisine; 100 µL RNAaz, 500 µL Hoechst ve 100 µL propidium iyodür çözeltilerinden ilave edilerek çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

İkili boyama yöntemi ile apoptoz ve nekroz varlığının değerlendirilebilmesi için 48 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Rutin hücre açma ve çoğaltma prosedürü uygulanmıştır. Hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra L929 ve CAPAN-1 hücreleri 2’şer adet olacak şekilde toplamda 4 adet 48 kuyucuklu plakaya, kuyucuk başına 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Hücreler 37°C’de %5 CO₂ ortamında, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Plakadaki hücrelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarının gözlemlenmesinin ardından, kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan ekstraktlar 3 tekrar ve 3 farklı konsantrasyon (100 µg/mL, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL) olacak şekilde uygulanmıştır. Negatif kontrol grubuna besiyeri, pozitif kontrol grubuna ise %20 DMSO eklenmiştir. Plakalar 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılarak her kuyucuğa 70 µL ikili boyama çözeltisi eklenmiştir (Şekil 2.4.). Işığa duyarlı boyalar kullandığımız için 48 kuyucuklu plakalar, alüminyum folyo ile sarılıp hiç ışık almayan karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda floresan ataçmanlı inverted mikroskop ile DAPI filtresi altında her kuyucuktan görüntüleme yapılarak, tüm hücreler içerisinde apoptoza uğrayan hücrelerin tespiti sağlanmıştır. Nekroza uğrayan hücrelerin belirlenmesi içinse, FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) altında her kuyucuktan görüntü alınmıştır. Nekrotik hücre ve apoptotik hücre sayıları, uyguladığımız her bir örneğin farklı konsantrasyonlarında sayılmıştır. Bütün hücreler içinde apoptoz ve nekroza uğrayan hücrelerin yüzdesi ve standart sapması hesaplanmıştır (Melekoğlu vd. 2011), sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 2.4. İkili boyama testi uygulamasında kullanılan ikili boyama çözeltisinin plakalara eklenmesi.

2.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait kloroform, su, metanol, aseton ekstraktlarının ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanseri hücresi ve L929 fibroblast hücreleri üzerine için % canlılık hesaplanmıştır. % canlılıkların karşılaştırılmasında OneWay ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi (*post hoc*) uygulanmıştır. Yapılan analizlerde IBM SPSS 20.0 paket programından faydalanılmıştır. $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edilmiştir.

Apoptoz ve nekroza uğramış hücreler ikili boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Bu verilerin değerlendirilmesinde inverted mikroskopta, DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Öncelikle tüm hücreler sayılmıştır. Apoptoza uğramış ve nekroza uğramış hücrelerde sayılarak bu sayıların % değerleri hesaplanmıştır. İkili boyama metodu iki tekrarlı, MTT testi en az üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Örneklerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi

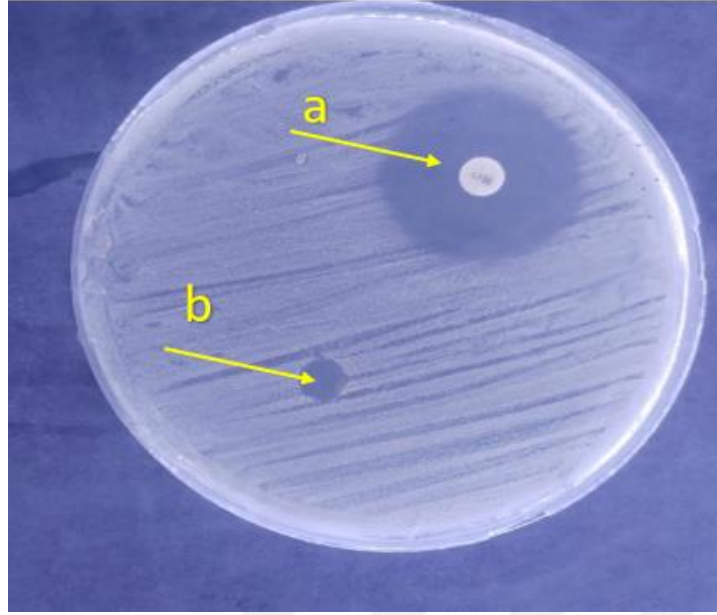
L. inermis bitkisine ait 4 farklı ekstrakt; metanol ekstraktı, su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, lawsone standartı ve pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel (kloramfenikol) ilacın test mikroorganizmaları olan *S. aureus* ve *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkileri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İnhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür ve Çizelge 3.1’de ve Şekil 3.1-3.10’da gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan *S. aureus* ATCC 25923 gram pozitif bakteri iken; *E. coli* ATCC 25922 gram negatif bakteridir.

L. inermis bitkisinin metanol ekstraktı, aseton ekstraktı, kloroform ekstraktı, su ekstraktı ve lawsone standartı kullanılan her iki test mikroorganizması üzerinde de antimikrobiyal etki göstermiştir.

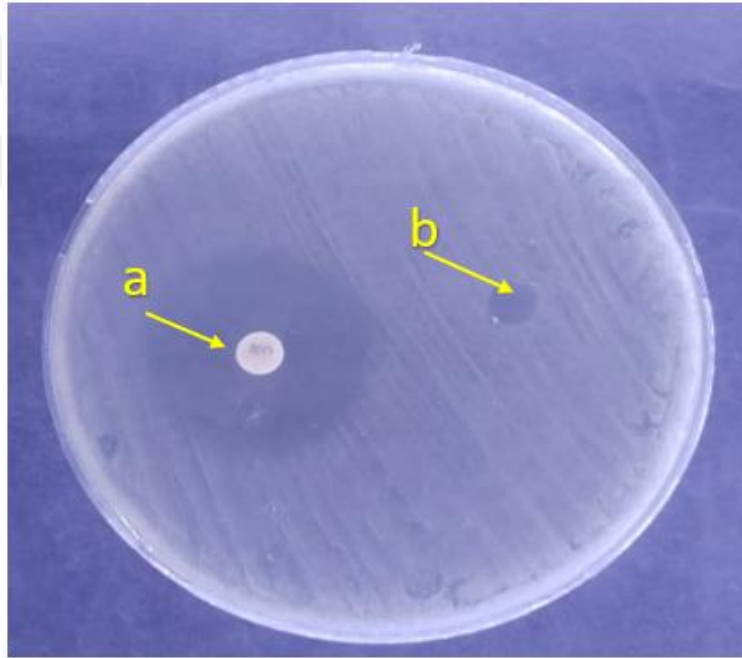
Çizelge 3.1. *L. inermis*’in 4 farklı ekstraktı ve lawsone standartının test mikroorganizmaları üzerine gösterdiği antimikrobiyal aktivite inhibisyon zon çapları (mm).

Mikroorganizmalar	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı	Kloroform Ekstraktı	Lawsone
<i>E. coli</i>	7±1	6,16±0,28	6,66±1,15	6,33±0,57	6±0
<i>S. aureus</i>	6,16±0,28	7±1	8±3,46	7,33±2,30	6,83±1,04

L. inermis bitkisine ait su ekstraktı *S. aureus* suşuna karşı 6,16±0,28 mm’lik zon çapı oluşturmuştur. Yine bitkiye ait su ekstraktı’nın *E. coli* suşuna karşı 7±1 mm’lik bir zon çapı oluşturduğu gözlenlenmiştir.

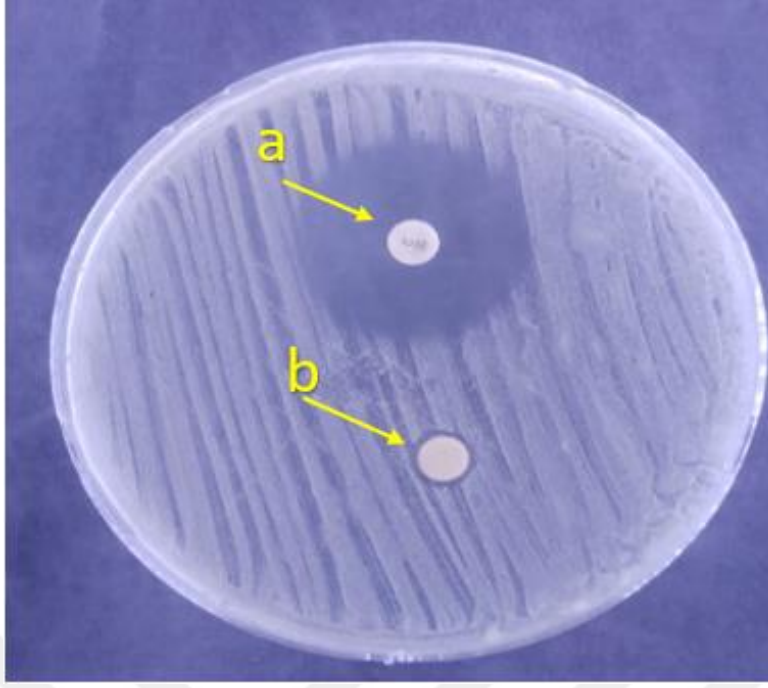


Şekil 3.1. *L. inermis*'e ait su ekstraktının *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* su ekstraktı).

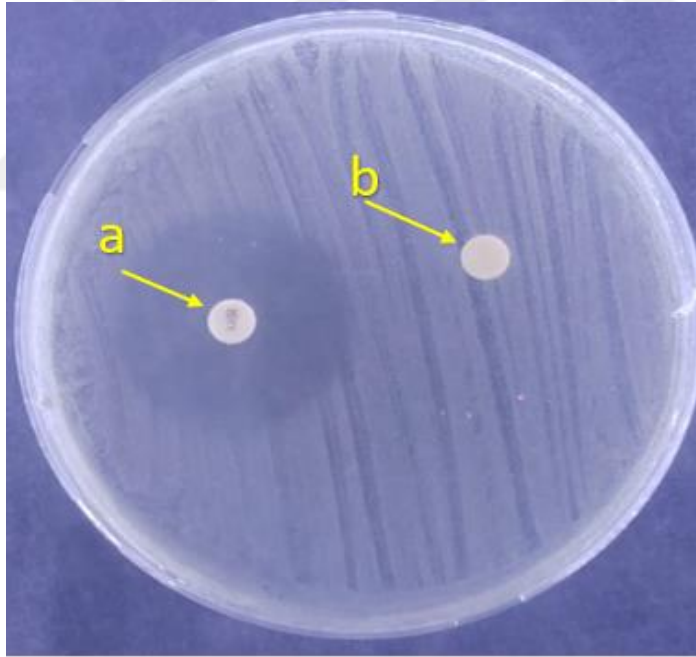


Şekil 3.2. *L. inermis*'e ait su ekstraktının *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* su ekstraktı).

L. inermis bitkisinin metanol ekstraktı *S. aureus* suşuna karşı 7 ± 1 mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur. *E. coli* suşuna karşı ise $6,16\pm 0,28$ mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur.

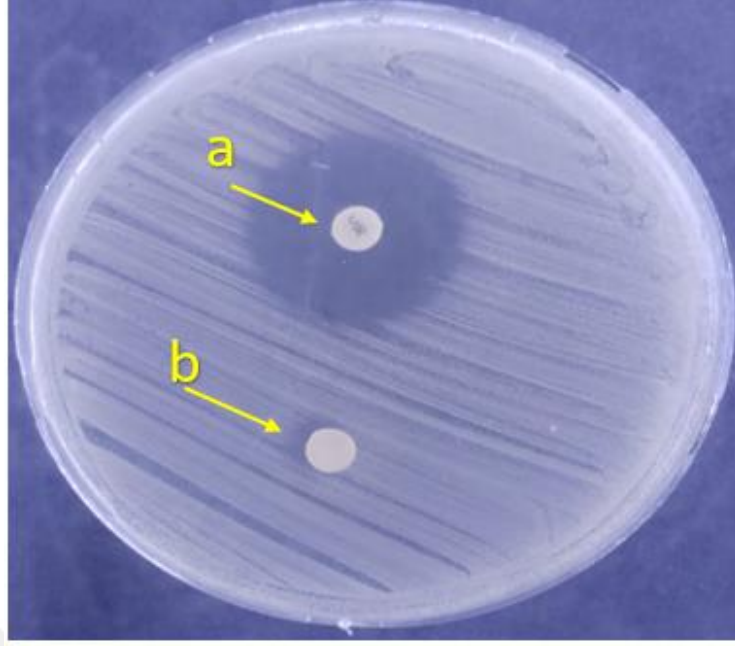


Şekil 3.3. *L. inermis*'e ait metanol ekstraktının *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* metanol ekstraktı).

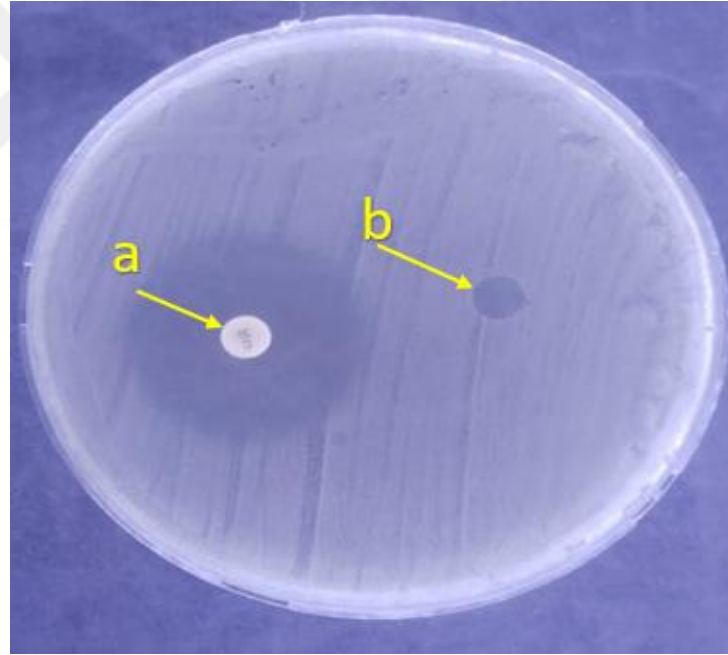


Şekil 3.4. *L. inermis*'e ait metanol ekstraktının *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* metanol ekstraktı).

L. inermis bitkisinin kloroform ekstraktı *S. aureus* suşuna karşı $7,33 \pm 2,30$ mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur. *E. coli* suşuna karşı ise $6,33 \pm 0,57$ mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur.

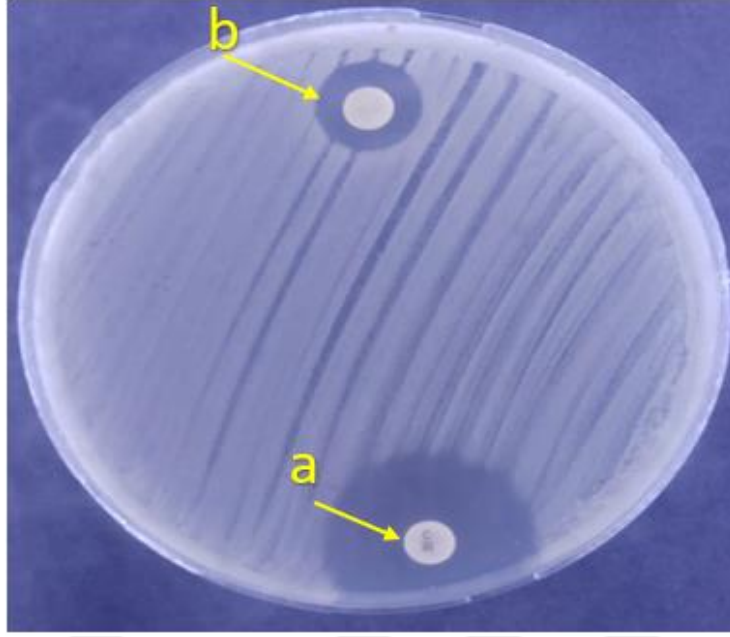


Şekil 3.5. *L. inermis*'e ait kloroform ekstraktının *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloroamfenikol, b: *L. inermis* metanol ekstraktı).

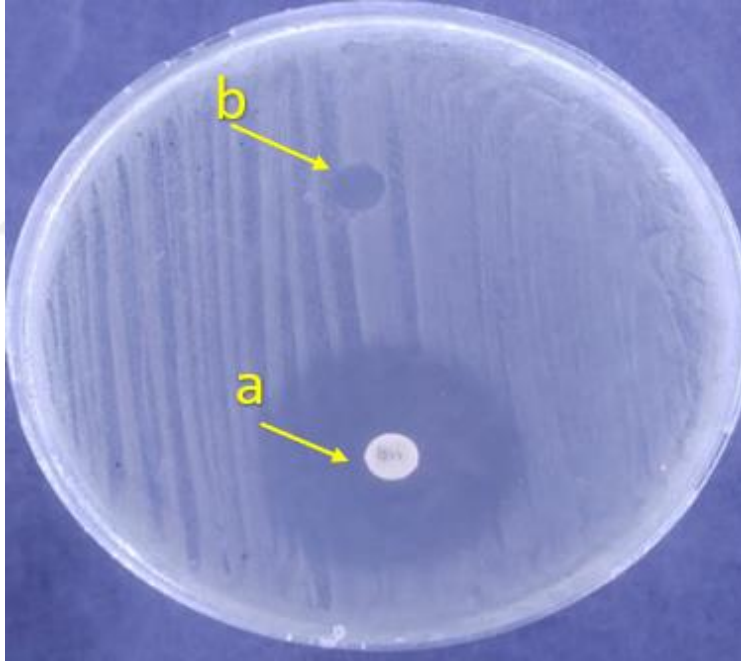


Şekil 3.6. *L. inermis*'e ait kloroform ekstraktının *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloroamfenikol, b: *L. inermis* metanol ekstraktı).

L. inermis bitkisinin aseton ekstraktı *S. aureus* suşuna karşı $8\pm 3,46$ mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur. Bu duyarlılık tüm ekstraktlar içerisinde görülen en güçlü duyarlılık olmuştur. *E. coli* suşuna karşı $6,66\pm 1,15$ mm'lik zon çapı ölçülmüştür.

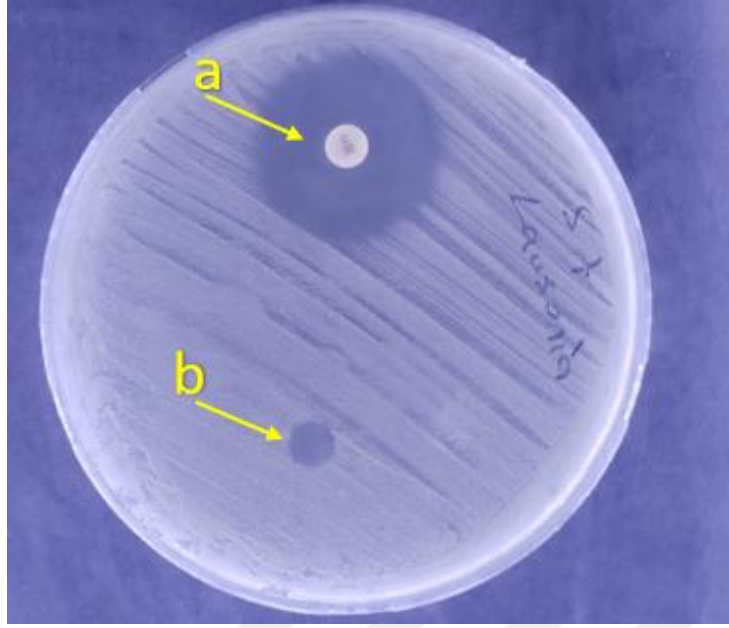


Şekil 3.7. *L. inermis*'e ait aseton ekstraktının *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* aseton ekstraktı).

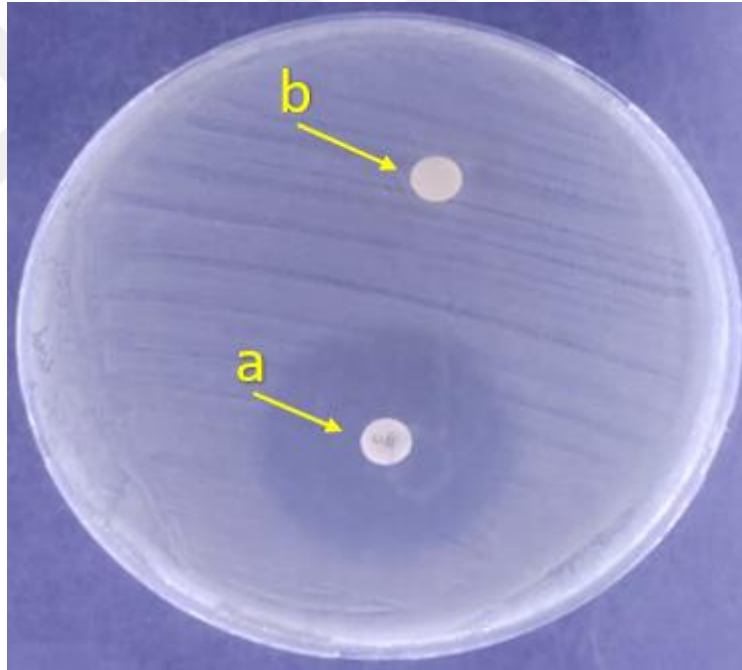


Şekil 3.8. *L. inermis*'e ait aseton ekstraktının *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol, b: *L. inermis* aseton ekstraktı).

Lawsone standartı *S. aureus* suşuna karşı $6,83 \pm 1,04$ mm'lik bir zon çapı oluşturmuştur. *E. coli* suşuna karşı ise 6 ± 0 mm'lik bir zon çapı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.9. Lawsone standartının *S. aureus* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol b: lawsone standartı).



Şekil 3.10. Lawsone standartının *E. coli* üzerinde oluşturduğu zon çapı (a: kloramfenikol b: lawsone standartı).

3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MiK) Değerleri

Yapılan antibiyogram testine ek olarak bitkiye ait aseton ekstraktı, kloroform ekstraktı, metanol ekstraktı, su ekstraktı, lawsone standartı ve pozitif kontrol olarak kullanılan antibakteriyel (kloramfenikol) ilaç için MİK çalışması yapılmıştır. Bakteriler üzerindeki MİK değerleri Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. *L. inermis* ' in 4 farklı ekstraktı ve lawsone standartının test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri (mg/mL).

MİKROORGANİZMALAR	MİK Değerleri (mg/mL)				
	Su ekstraktı	Aseton ekstraktı	Kloroform ekstraktı	Metanol ekstraktı	Lawsone
<i>S. aureus</i>	0,5	1	1	1	0,125
<i>E. coli</i>	1	1	1	1	0,5

L. inermis bitkisinin su ekstraktı için yapılan MİK çalışmasında, bulanıklık tayininin farklı gözler şahitliğinde karşılaştırılması sonucunda *S. aureus*, için 1 mg/mL konsantrasyonu MBC (minimum bakterisidal konsantrasyon) değeri olarak belirlenmiş olup 0,5 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. *E. coli* için 1 mg/mL konsantrasyonun değeri olduğu tespit edilmiştir. Yine *L. inermis* bitkisinin aseton ekstraktı için yapılan MİK çalışmasında *S. aureus*, için 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde *E. coli* için de 1 mg/mL konsantrasyonunun MİK değeri olduğu tespit edilmiştir. *L. inermis* bitkisinin metanol ekstraktı ile yapılan MİK çalışmasında bulanıklık tayinin farklı gözler şahitliğinde yapılması sonucu *S. aureus* için 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. *E. coli* içinde 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. *L. inermis* bitkisinin lawsone standardı için yapılan MİK çalışmasında *S. aureus* için 0,25 mg/mL konsantrasyonu MBC değeri olarak belirlenmiş olup 0,125 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. *E. coli* için ise 1 mg/mL konsantrasyonu MBC değeri olarak belirlenmiş ve 0,5 mg/mL konsantrasyonu da MİK değeri olarak belirlenmiştir. *L. inermis* bitkisinin kloroform ekstraktı için yapılan MİK çalışmasında bulanıklık tayinin farklı gözler şahitliğinde karşılaştırılması sonucu *S. aureus* için 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiş olup, *E. coli* için de 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.3. Sitotoksosite Testi Sonuçları

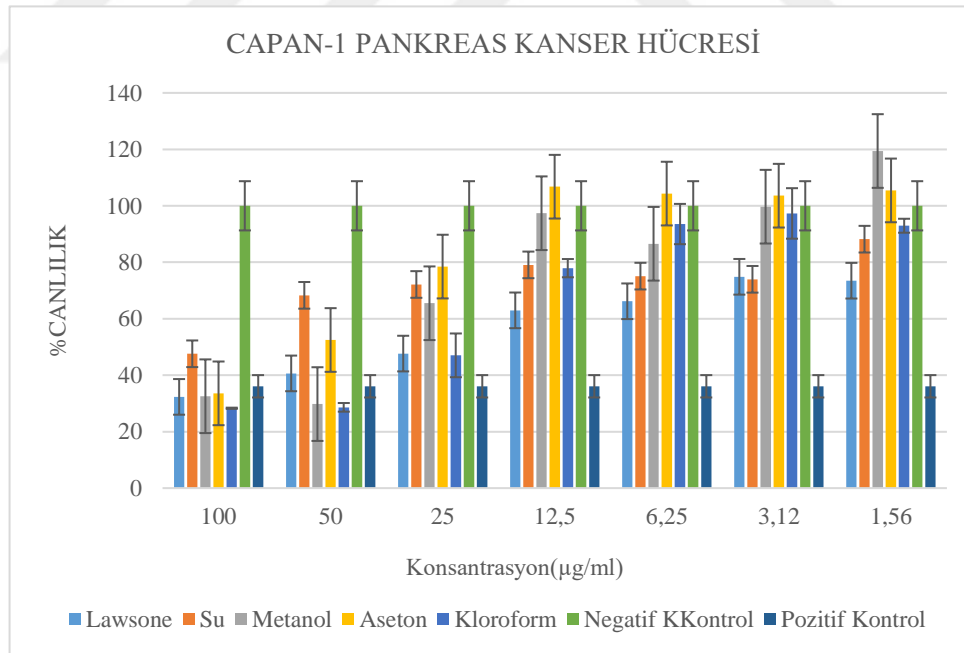
Çalışmada *L. inermis* bitkisine ait aseton ekstraktı, kloroform ekstraktı, metanol ekstraktı, su ekstraktı ve bitkinin önemli bir naftokinonu olan lawsonea ait standartın CAPAN-1 pankreas kanser hücre hattı ve L929 fibroblast hücre hattı üzerindeki toksisitesi MTT testi ile belirlenmiştir. Kontrol olarak hücreler üzerine sadece besiyeri eklenmiştir. 570 nm'deki spektroskopik ölçümden sonra, örneklerden elde edilen absorbans değerleri ile kontrol grubundan elde edilen absorbans değeri kullanılarak % canlılık değerler elde edilmiştir .

L. inermis'e ait lawsone standartı, su ekstraktı, metanol ekstraktı, aseton ekstraktı ve kloroform ekstraktının uyguladığımız CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri üzerine etkisine ait toksisite sonuçları Çizelge 3.3 ve Grafik 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait kloroform, su, metanol, aseton ekstraktlarının ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanseri hücresi üzerine yüzde canlılık değeri (ortalama±Standart hata).

Konsantrasyon (µg/mL)	CAPAN-1 PANKREAS KANSER HÜCRESİ				
	Lawsone	Kloroform Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı
100	32,3±2,5 ^a	28,2±0,21 ^a	47,5±3,1 ^b	32,5±3,1 ^a	33,5±4,2 ^a
50	40,6±3,1 ^a	28,6±1,53 ^a	68,2±7,5 ^b	29,7±4,8 ^a	52,4±3,6 ^c
25	47,6±3,3 ^a	47,0±7,7 ^a	72,1±7,3 ^{bc}	65,4±4,8 ^b	78,4±6,6 ^c
12,5	62,9±2,3 ^a	77,9±3,2 ^{ab}	79,0±4,1 ^b	97,3±10,8 ^c	106,7±5,5 ^c
6,25	66,1±8,8 ^a	93,5±7,1 ^{bc}	75,0±3,7 ^a	86,5±3,8 ^b	104,3±11,7 ^c
3,12	74,8±6,7 ^a	97,3±8,9 ^b	73,9±3,3 ^a	99,6±7,3 ^b	103,5±5,15 ^b
1,56	73,4±11,0	92,9±2,4	88,1±4,8	119,4±7,4	105,4±5,6
Negatif kontrol (Besiyeri)	100±1,4				
Pozitif kontrol (%20 DMSO)	36,0±3,9				

^{a, b, c}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. (P<0,05).



Şekil 3.11. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait, su, metanol, aseton, kloroform ekstraktlarının ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri üzerine etkisine ait % canlılık grafiği.

Bitkiye ait su ekstraktı için Çizelge 3.3. ve Şekil 3.11'de görüldüğü gibi CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde 100 µg/mL konsantrasyonda canlılık %47,5±3,1 olarak hesaplanmış olup bu konsantrasyonda antiproliferatif etki göstermiştir. 50 µg/mL

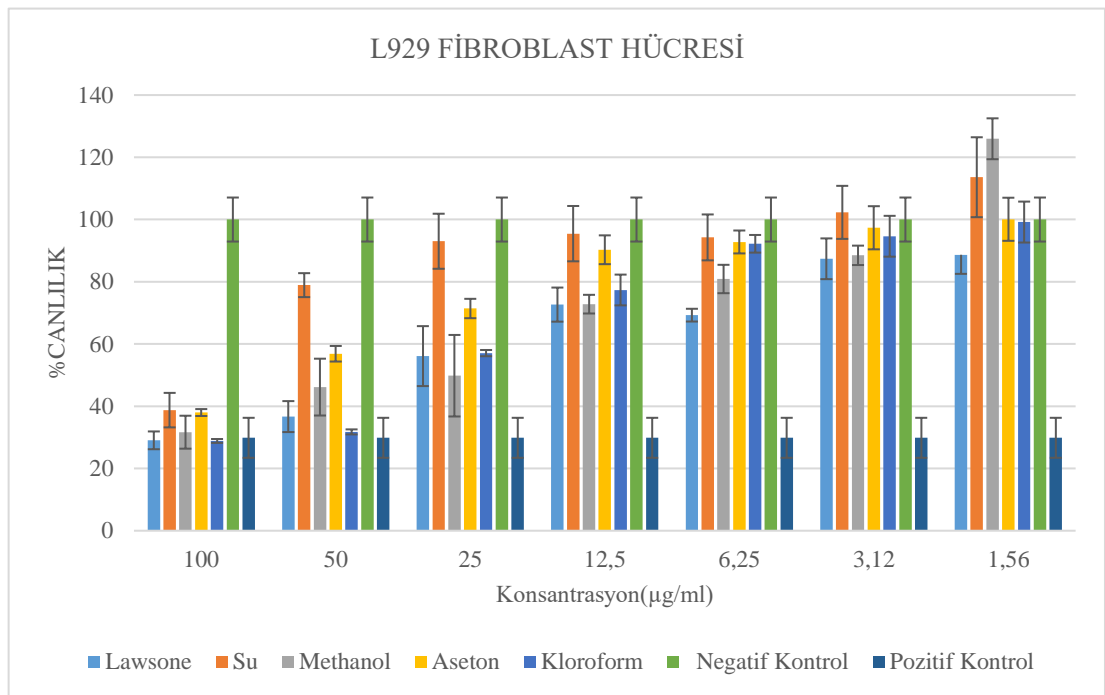
konsantrasyondan itibaren canlılığın artış gösterdiği belirlenmiştir ve bu konsantrasyonda canlılık $68,2 \pm 7,5$ olarak hesaplanmıştır. Bitkinin aseton ekstraktında ise CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda canlılık $33,5 \pm 4,2$ olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyonda antiproliferatif etki göstermiştir. 50 mg/mL konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiştir. Ve canlılık $52,4 \pm 3,6$ olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan $1,56 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda canlılık $105,4 \pm 5,6$ olarak hesaplanmış olup konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Metanol ekstraktı için CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde $100 \mu\text{g/mL}$ ve $50 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla $32,5 \pm 3,1$ ve $29,7 \pm 4,8$ olarak hesaplanmıştır ve bu konsantrasyonlarda antiproliferatif etki göstermiştir. $25 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyondan itibaren canlılıkta artış görülmüştür ve canlılık $65,4 \pm 4,8$ olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan $1,56 \mu\text{g/mL}$ 'de canlılık $119,4 \pm 7,4$ olarak hesaplanmıştır ve konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Bitkiye ait kloroform ekstraktı için Şekil 2.'de görüldüğü gibi CAPAN-1 hücrelerinde $100 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$ ve $25 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla $28,2 \pm 0,21$, $28,6 \pm 1,53$ ve $47,0 \pm 7,7$ olarak hesaplanmış ve hücreler için antiproliferatif etki göstermiştir. $12,5 \text{ mg/mL}$ konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiştir. Canlılık $77,9 \pm 3,2$ olarak hesaplanmıştır. Lawsone standartı için ise $100 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$ ve $25 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla $32,3 \pm 2,5$, $40,6 \pm 3,1$ ve $47,6 \pm 3,3$ olarak hesaplanmış ve hücrenin bu 3 konsantrasyonda antiproliferatif etki göstermiştir. $12,5 \text{ mg/mL}$ konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiştir ve canlılık $62,9 \pm 2,3$ olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.3'e göre CAPAN-1 pankreas kanseri hücresi üzerine yüzde canlılık değeri karşılaştırıldığında $100 \mu\text{g/mL}$ dozda su ekstraktı diğer ekstraktlardan istatistiki olarak farklı bulundu ($P < 0,05$). $50 \mu\text{g/mL}$ dozda su ve aseton ekstraktlarında önemli bir artış görüldü. $25 \mu\text{g/mL}$ dozda lawsone standartı ile kloroform ekstraktında ve aseton ile su ekstraktları arasında ($P < 0,05$) benzerlik görülürken, aseton ekstraktında diğer ekstraktlara göre önemli bir artış ($P < 0,05$) görüldü. $12,5 \mu\text{g/mL}$ dozda lawsone standartı ile kloroform ekstraktları arasında ($P < 0,05$) benzerlik görüldü. $6,25 \mu\text{g/mL}$ dozda lawsone standartı ile su ekstraktı arasında ($P < 0,05$) benzerlik görülürken; kloroform ekstraktı hem metanol hem de aseton ekstraktlarıyla ($P < 0,05$) benzerlik gösterdi. $3,12 \mu\text{g/mL}$ dozda lawsone ve su ekstraktları ile kloroform, metanol ve aseton ekstraktları arasında ($P < 0,05$) benzerlik görüldü.

L. inermis'in önemli bir naftakinonu olan lawsonea ait standart, su ekstraktı, metanol ekstraktı, aseton ekstraktı ve kloroform ekstraktının uyguladığımız L929 fibroblast hücreleri üzerine etkisine ait toksisite sonuçları Çizelge 3.4. ve Şekil 3.12.'de verilmiştir. Yapılan MTT testi sonucunda CAPAN-1 pankreas kanseri hücre hattında su ekstraktı, metanol ekstraktı, aseton ekstraktı, kloroform ekstraktı ve ticari lawsone standardı için IC₅₀ değerleri yaklaşık olarak sırasıyla; 100.1 µg/mL, 36.03 µg/mL, 58.23 µg/mL, 31.81 µg/mL ve 21.27 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait kloroform, su, metanol, aseton ekstraktlarının ve lawsone standartının L929 fibroblast hücreleri üzerine yüzde canlılık değeri (ortalama±Standart hata).

Konsantrasyon (µg/mL)	L929 FİBROBLAST HÜCRESİ				
	Lawsone	Kloroform Ekstraktı	Su Ekstraktı	Metanol Ekstraktı	Aseton Ekstraktı
100	29,0±2,8 ^a	28,8± 0,6 ^a	38,7± 5,5 ^b	31,6±5,2 ^{ab}	37,9±1,1 ^{ab}
50	36,6±4,9 ^a	31,7± 0,8 ^a	78,9± 3,8 ^b	46,1±9,1 ^a	56,8±2,5 ^c
25	56,1±9,6 ^{ab}	57,0± 1,0 ^{ab}	93,0± 8,8 ^c	49,8±13,1 ^a	71,4±3,11 ^b
12,5	72,6±5,4 ^{ab}	77,3± 4,9 ^b	95,4± 8,8 ^c	72,8±3,0 ^a	90,2±4,6 ^c
6,25	69,2±2,0 ^{ab}	92,2± 2,8 ^b	94,2± 7,3 ^c	80,8±4,5 ^{ab}	92,7±3,6 ^c
3,12	87,3±6,5 ^a	94,6± 6,5 ^a	102,3± 8,5 ^b	88,4±3,1 ^a	97,3±6,9 ^{ab}
1,56	88,6±6,1	99,1± 6,5	113,5± 12,8	125,9±6,5	100,0±6,9
Negatif Kontrol (Besiyeri)	100±7,0				
Pozitif kontrol (%20 DMSO)	29,8±6,3				

^{a, b, c}: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. (P< 0,05)



Şekil 3.12. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait su, metanol, aseton, kloroform ekstraktlarının ve lawsone standartının L929 fibroblast hücreleri üzerine etkisine ait % canlılık grafiği.

Çizelge 3.4. ve Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi, bitkiye ait su ekstraktı için L929 fibroblast hücrelerinde 100 µg/mL konsantrasyonda canlılık %38,7±5,5 olarak hesaplanmış ve toksik etki gösterdiği görülmüştür. 50 µg/mL konsantrasyondan itibaren canlılığın artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda canlılık %68,29±7,56 olarak hesaplanmıştır. Bitkinin aseton ekstraktında ise L929 fibroblast hücrelerinde 100 µg/mL konsantrasyonda canlılık %37,9±1,1 olarak hesaplanmış ve toksik etki gösterdiği görülmüştür. 25 mg/mL konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiş olup, canlılık %56,8±2,5 olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan 1,56 µg/mL konsantrasyonda canlılık %100,0±6,9 olarak hesaplanmıştır. Konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Metanol ekstraktı için L929 hücrelerinde en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL konsantrasyonda canlılık %31,6±5,2 olarak hesaplanmıştır ve toksik etki gösterdiği görülmüştür. 50 µg/mL konsantrasyondan itibaren canlılıkta artış görülmüştür. Canlılık %46,1±9,1 olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan 1,56 µg/mL' de canlılık %125,9±6,5 olarak hesaplanmıştır ve konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Bitkiye ait kloroform ekstraktı için Çizelge 3.4.'te görüldüğü gibi L929 fibroblast hücrelerinde 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla %28,8±0,6 ve %31,7±0,8 olarak hesaplanmış olup toksik etki gösterdiği görülmüştür. 25 mg/mL konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiştir ve canlılık %57,0±1,0 olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan 1,56 µg/mL'de canlılık %99,1± 6,5 olarak hesaplanmış olup konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Lawsone standardı için ise 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla %29,0±2,8 ve %36,6±4,9 olarak hesaplanmış ve toksik etki gösterdiği görülmüştür. 25 mg/mL konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının artış gösterdiği belirlenmiştir ve canlılık %56,1±9,6 olarak hesaplanmıştır. En düşük konsantrasyon olan 1,56 µg/mL'de canlılık %88,6±6,1 olarak hesaplanmış olup konsantrasyona bağlı hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Yapılan MTT testi sonucunda L929 fibroblast hücre hattında su ekstraktı, metanol ekstraktı, aseton ekstraktı, kloroform ekstraktı ve ticari lawsone standardı için IC₅₀ değerleri yaklaşık olarak sırasıyla; 83.51 µg/mL, 36.07 µg/mL, 63.44 µg/mL, 32.74 µg/mL ve 30.95 µg/mL olarak bulunmuştur. Çizelge 3.4'e göre L929 fibroblast hücreleri üzerine yüzde canlılık değeri karşılaştırıldığında 100 µg/mL dozda lawsone standardı ve kloroform ekstraktı, metanol ve aseton ekstraktları arasında (P<0,05) benzerlik görülürken; su ekstraktı sadece metanol ve aseton ekstraktları ile

benzerlik ($P<0,05$) gösterdi. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarda su ekstraktında diğer ekstraktlara göre önemli bir artış ($P<0,05$) görüldü. 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarda su ve aseton ekstraktları arasında (P<0,05) benzerlik görülürken, aynı zamanda diğer ekstraktlara göre önemli bir artış ($P<0,05$) görüldü. 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozda aseton ekstraktı hem lawsone standartı, kloroform ve metanol ekstraktları ile hem de su ekstraktı ile benzerlik ($P<0,05$) gösterdi.

3.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

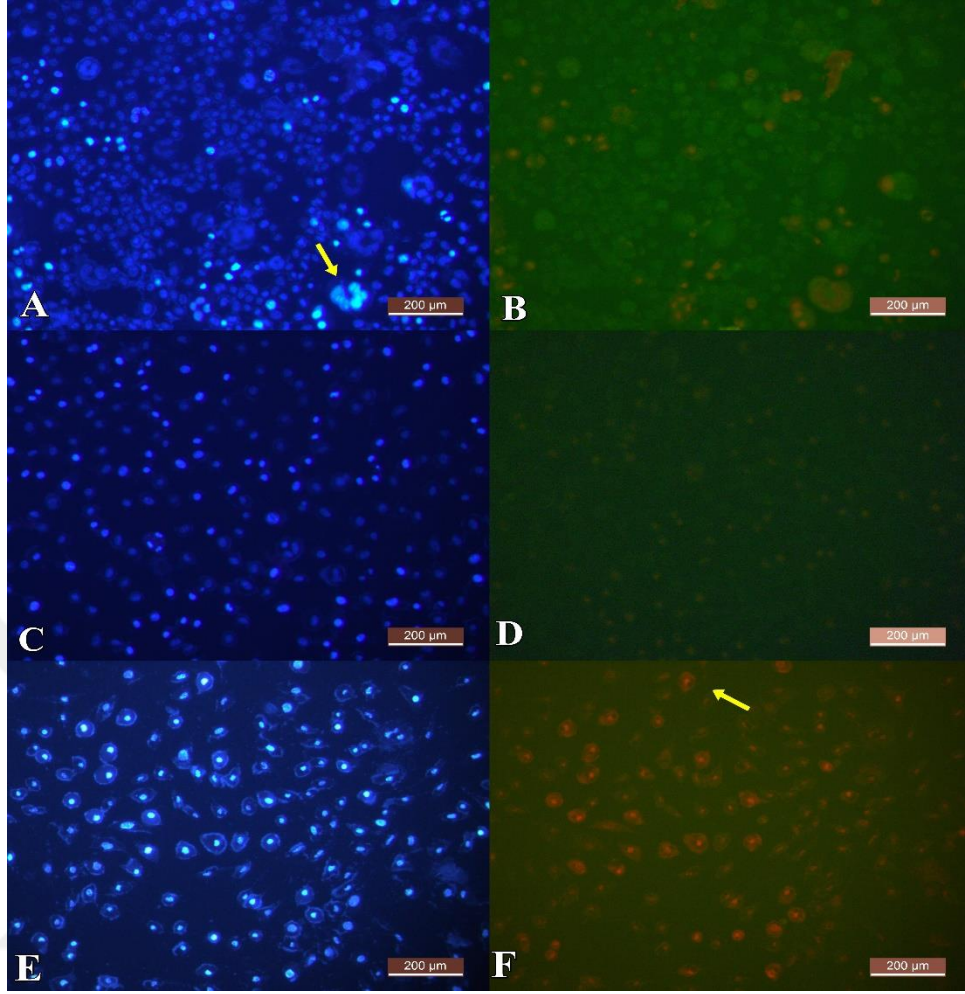
İkili boyama yönteminde kullanılan Hoechst 33342 ve Propodium iyodür boyalarından; Hoechst 33342 boyası canlı hücre zarından geçip hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamaktadır. Apoptotik hücreleri, diğer çekirdeği açık maviye boyanmış hücrelerden ayırt eden en önemli belirteç; çekirdeklerinin parçalanması, daha parlak mavi olması ve çekirdek sınırlarının bozulmasıdır. Bu yöntemde kullanılan ikinci boya olan PI ise, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçip, nekroza uğramış hücrelerin çekirdeklerini kırmızıya boyar.

CAPAN-1 pankreas kanseri ve L929 fibroblast hücreleri üzerine *L. inermis* bitkisine ait su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı, metanol ekstraktı ve lawsone standartının apoptotik ve nekrotik etkileri ikili boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ farklı ve 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve ticari lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanser hücresine ait % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları Çizelge 3.5.'te verilmiş, floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.13.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e 4 farklı ekstraktın ve lawsone standartının CAPAN-1 pankreas kanser hücresine ait % apoptotik ve nekrotik indeksi.

Konsantrasyon	Capan-1 Hücre Hattı									
	Lawsone		Su		Metanol		Aseton		Kloroform	
	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz
100 µg/mL	31,03±3,1	27,44±4,8	NA*	NA*	33,33±2,3	26,39±3,3	27,13±4,1	23,42±1,8	26,27±3,8	23,34±5,2
25 µg/mL	21,12±2,7	26,17±2,4	9,54±0,7	14,32±1,3	18,71±0,7	15,86±2,9	14,57±2,2	6,29±0,5	21,97±3,6	16,99±4,8
6,25 µg/mL	16,11±2,3	18,27±1,0	1,85±0,2	1,01±0,2	3,60±0,4	5,41±0,6	0,73±0,5	1,83±0	1,98±1,0	1,57±1,1
	Negatif Kontrol				Pozitif Kontrol (%20 DMSO)			Kontrol (%10 DMSO)		
	% Apoptoz		% Nekroz		% Apoptoz		% Nekroz	% Apoptoz		% Nekroz
	2,06±0,3		1,20±0,1		14,19±0,5		35,16±1,1	6,22±0,7		19,15±1,7

(*) Fotoğraflarda hücre morfolojisi görülemediğinden indeks yapılamamıştır.



Şekil 3.13. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyaarı kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen CAPAN-1 pankreas kanseri hüresine ait apoptotik ve nekrotik hücre fotoğrafları; A) CAPAN-1 Pankreas kanseri hücrelerinde Kloroform ekstraktına ait 25 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücrelerin fotoğrafı, B) Kloroform ekstraktına ait 25 µg/mL konsantrasyonda nekrotik hücrelerin fotoğrafı, C) negatif kontrol grubuna ait apoptotik hücrelerin fotoğrafı, D) negatif kontrol grubuna ait nekrotik hücrelerin fotoğrafı, E)pozitif kontrol grubuna ait apoptotik hücrelerin fotoğrafı, F) pozitif kontrol grubuna ait nekrotik hücrelerin fotoğrafı (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 20X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 200 µm mesafeyi göstermektedir).

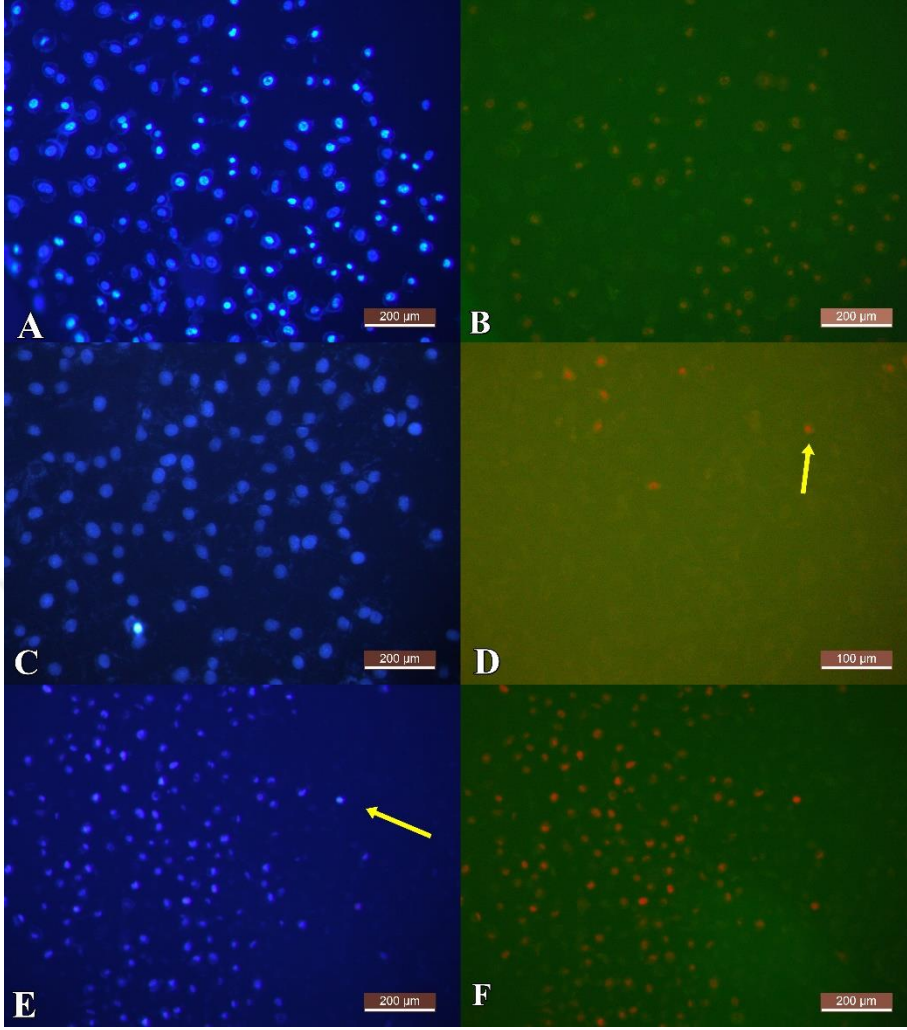
Su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve lawsone standartı için yüksek konsantrasyona doğru CAPAN-1 hücre hattında apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi konsantrasyona ve hücre canlılığına bağlı artmıştır. CAPAN-1 pankreas kanser hüresinde lawsone standartı, aseton ekstraktı ve metanol ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonda apoptotik indeksin nekrotik indekse göre yüksek olduğu görülmüştür. Su ekstraktında ise 100 µg/mL konsantrasyonda apoptotik ve nekrotik indeks sırasıyla $1,85 \pm 0,2$ ve $1,01 \pm 0,2$ olarak görülmüştür. Kloroform ekstraktında ise 100 µg/mL, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda apoptotik indeks nekrotik indekse göre yüksek görülmüştür. CAPAN-1 hücre hattı için elde edilen sonuçlar, MTT testi sonuçlarını desteklediği tespit edilmiştir.

100 µg/mL, 25 µg/mL farklı ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve lawsone standartının L929 Fibroblast hücrelerine ait % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları Çizelge 3.6.'da verilmiş, floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.14.'te gösterilmiştir.



Çizelge 3.6. Farklı konsantrasyonlarda *L. inermis*'e ait 4 farklı ekstraktın ve lawsone standartının L929 pankreas kanser hücresine ait % apoptotik ve nekrotik indeksi

Konsantrasyon	L929 Fibroblast Hücre Hattı									
	Lawsone		Su		Metanol		Aseton		Kloroform	
	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz	% Nekroz
100 µg/mL	21,74±4,5	54,49±3,7	37,47±3,3	20,54±4,2	29,14±2,7	24,82±1,8	27,75±1,7	24,71±2,2	29,19±2,8	26,96±2,2
25 µg/mL	16,11±1,4	25,06±1,8	6,59±1,1	5,69±1,6	3,81±1,0	5,71±1,4	16,79±2,3	12,18±2,1	20,52±3,6	16,75±3,3
6,25 µg/mL	6,77±1,0	14,59±1,5	5,76±0,5	6,61±0,2	5,25±0,7	7,13±0,7	5,49±1,0	4,34±1,0	1,00±0,2	3,65±0,2
	Negatif Kontrol				Pozitif Kontrol (%20 DMSO)		Kontrol (%10 DMSO)			
	% Apoptoz	% Nekroz			% Apoptoz	% Nekroz	% Apoptoz		% Nekroz	
	2,07±0,5	3,95±0,7			10,45±1,5	38,00±1,7	4,64±0,6		17,98±1,9	



Şekil 3.14. Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür boyaları kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen L929 Fibroblast hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücre fotoğrafları; A) L929 Fibroblast hücrelerinde Kloroform ekstraktına ait 25 µg/mL konsantrasyona ait apoptotik hücrelerin fotoğrafı, B) Kloroform ekstraktına ait 25 µg/mL konsantrasyona ait nekrotik hücrelerin fotoğrafı, C) negatif kontrol grubuna ait apoptotik hücrelerin fotoğrafı, D) negatif kontrol grubuna ait nekrotik hücrelerin fotoğrafı, E) pozitif kontrol grubuna ait apoptotik hücrelerin fotoğrafı, F) pozitif kontrol grubuna ait nekrotik hücrelerin fotoğrafı (Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 20X büyütmede çekilmiştir. Ölçek, 200 µm mesafeyi göstermektedir).

Su ekstraktı, metanol ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve lawsone standartı için yüksek konsantrasyona doğru L929 fibroblast hücre hattında apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi konsantrasyona ve hücre canlılığına bağlı artmıştır. L929 fibroblast hücrelerinde lawsone standartı için 100 µg/mL, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda nekrotik indeks apoptotik indekse göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Su ve aseton ekstraktları için 100 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda % apoptotik indeksin nekrotik indeksten yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metanol ekstraktında 100 µg/ml’de apoptotik indeks nekrotik indeksten yüksek görülürken, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda nekrotik indeks artış göstermiştir.

Kloroform ekstraktı ise 100 µg/mL, 25 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücre indeksinin nekrotik hücre indeksinden yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar MTT testi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.



4. TARTIŞMA

Geçmişte, günümüzdeki kadar yaygın olmayan kanser insidansı, muhtemelen değişen yaşam tarzı, alışkanlıklar ve artan yaşam beklentileri sebebiyle endişe verici bir şekilde artmaktadır (Roy ve Saikia, 2016). Öyle ki her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşımaktadır (Mackay, Jemal, Lee ve Parkin, 2006). Kanser, normal hücrelerin homeostatik feed-back mekanizmaların kontrolünden çıkarak; kontrolsüz ve spontan olarak çoğalabilen ve metastaz gerçekleştirebilen hücre şekillerine dönüşmesi olayıdır (Bağdatoğlu, 2008). Malign hücre popülasyonunun kontrolsüz yayılım gösterdiği otonom süreç neoplastik büyüme olarak adlandırılmaktadır. Birçok etkenin rol oynadığı neoplazi patogeneğinde karmaşık moleküler mekanizmalar tam anlamıyla tanımlanamamıştır. Kanser tipine göre kanser hücreleri, çeşitli moleküler ve biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Kanser oluşumu genetik yatkınlık, karsinogen miktarı, karsinogen etkisinde kalma süresi ve uyarıcı etkenlerin varlığı olarak ifade edilen dört faktöre bağlıdır (Bağdatoğlu, 2008; Gürel, 2007; Doğan, 2004). Pankreas kanseri, genetik ve epigenetik değişikliklerin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Şahin, Taşpınar ve Sungurluoğlu, 2007). Hastalığın tanısında karşılaşılan zorluklar, pankreas kanserinin saldırgan olma özelliği ve tedavilerin yetersiz kalması sebebiyle hastalarda yaşama süresi, tanıdan sonra %5'inde 5 yıl kadardır (Güneyi, 2005). Kronik pankreatit, diyabet, insektisitler, sigara ve metalürjik kokular mortalitesi yüksek olan pankreas duktal adenokarsinomu (PDAK) riskini artırır. PDAK; kötü prognozludur ve retroperitoneal alana, komşu sinirlere, komşu lenf nodlarına ve karaciğere erken dönemde metastaz yapmaktadır (Kızmaz, 2011; Perek, 2002). Kanser tedavisinde hormonlar, cerrahi, immünoterapi, kemoterapi, radyasyon ana yaklaşımlardır. Bitkilerin kanser tedavisinde kullanımı geçmişe dayanmaktadır ve günümüzde de önemli bir yeni ilaç kaynağı olmaya devam etmektedir. Bitkiler, uçucu yağlar, steroidler, alkaloidler, glikozitler, terpenler, fenoller ve tanenler gibi aktif ikincil metabolitlerin varlığı sebebiyle tıbbi öneme sahiptir. İnsan yaşam kalitesinin artırılmasında şifalı bitkiler önemli bir rol oynamaktadır (Yang vd., 2013; Kim, Choi ve Lee, 2013). *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae) yaygın şekilde “kına” olarak bilinir

ve Asya ile Orta Doğu'da geleneksel bir tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Jeyaseelan, Jenothiny, Pathmanathan ve Jeyadevan, 2012). Yapılan çalışmalar, *L. inermis*'in antiülser, antelmintik, antioksidan, antimikrobiyal, antihiperglisemik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Philip, Madhumitha ve Mar, 2011; Egual ve Giday 2009; Habbal vd., 2011). Bu çalışmada pankreas kanserine etkisi ile ilgili oldukça kısıtlı sayıda literatür bulunan *L. inermis* bitkisine ait 4 farklı ekstrakt ve lawsone standartının *in vitro* hücre kültürü ortamında antikanser etkinliğini belirlemek amacı ile hücre proliferasyonu üzerine etkisinin ve sitotoksik etkilerinin; bunun yanı sıra gram negatif ve gram pozitif bakteriye karşı antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında yapılan antimikrobiyal etkinlik testinde *L. inermis* bitkisine ait metanol ekstraktı, su ekstraktı, kloroform ekstraktı, aseton ekstraktı ve lawsone standartının test edilen mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) üzerine antimikrobiyal etkileri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve MİK testi kullanılarak belirlenmiştir. Papageorgiu, Assimopoulou, Couladouros, Hepworth ve Nicolaou (1999) yaptıkları çalışmada *L. inermis*'in fitokimyasal bileşenlerinin sadece gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve gram negatif bakteriler için etkisiz olduğu kanaatine varmışlardır. Ancak bunun aksine bu çalışmada *L. inermis*, test edilen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın kullanılan ekstraktların konsantrasyonlarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışmaya benzerlik gösteren bir çalışmada ise; *L. inermis*'e ait yaprak kısımlarının antimikrobiyal etkinliği, *S. aureus*, *K.pneumonia*, *E.coli* ve *P. aeruginosas* suşlarına karşı agar kuyu difüzyon yöntemi kullanarak test edilmiş ve tüm mikroorganizmalara karşı önemli antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir (Al-Rubiay, Jaber, AlMhaawe ve Alrubaiy, 2008). Benzer şekilde Gull, Sohail ve Aslam (2013) yaptıkları çalışmada *L. inermis*'in antimikrobiyal aktivitesini agar disk difüzyon ve MİK deneyleri ile dört gram negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella spp.*, *Shigella sonnei*) ve üç gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) olmak üzere yedi bakterinin klinik izolatlarına karşı araştırmıştır. Çözücü olarak metanol, kloroform, aseton ve su kullanmış ve *L. inermis*'in hem gram pozitif hem de gram negatif bakteri suşlarına karşı kayda değer antimikrobiyal aktivite sergilediğini belirlemişlerdir. *E. coli* için aseton, su ve alkol ekstraktları için MİK

değerlerini sırasıyla 9.27 mg/mL, 8.64 mg/mL, 32-64 mg/mL konsantrasyon olarak kaydetmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise *E. coli* için aseton, su ve metanol ekstraktı ile yapılan MİK testinde konsantrasyonlar 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu farklılığının nedeni yüksek ihtimalle bitkinin toplandığı iklim koşullarının farklı olması ve dolayısıyla bitkide yer alan biyoaktif bileşenlerin düzeylerinin değişken olmasına bağlanılabilir.

Yapılan başka bir çalışmada ise Rabbani, Etemadifar ve Karamifard (2015) *Melissa officinalis* ve *L. inermis*'e ait ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada yanık yarası enfeksiyonlarına karşı bitkilere ait ekstraktlar (etanol ve su ekstraktı) kullanarak agar kuyu difüzyon ve MİK testleri yapmışlardır. Çalışma sırasında *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşlarını kullanmışlardır. Agar kuyu difüzyon deneyi sonucunda *L. inermis*'in sulu ekstrelerinin test edilen tüm bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ve sulu ekstreler için 3 mg/mL dozda *S. aureus*'un büyümesinin engellediği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise *L. inermis*'e ait su ekstraktı için *S. aureus* suşuna karşı 1 mg/mL dozda 6,16±0,28 mm'lik bir zon çapı gözlemlenmiştir. Bu noktada bu çalışma Rabbani vd. (2015) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yine aynı çalışmada *L. inermis*'in kurutulmuş yapraklarının ve kuru toz sulu ekstraktlarının tüm bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiş olup, çalışmamızda da *L. inermis*'e ait su ekstraktı; *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Rabbani vd. (2015) çalışmalarında *L. inermis*'in alkollü yaprak ekstraktının, sulu yaprak ekstraktından daha fazla antibakteriyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Fakat yapılan bu çalışmada *L. inermis*'e ait metanol ekstraktının *S. aureus*'a (*S. aureus*'a karşı 7±1 mm'lik zon çapı ve *E. coli*'ye karşı 6,16±0,28 mm'lik zon çapı) karşı daha fazla antibakteriyel etki gösterirken, su ekstraktının *E.coli* suşuna (*Staphylococcus aureus*'a 6,16±0,28 mm'lik zonçapı ve *E. coli*'ye karşı 7±1 mm'lik zon çapı) karşı daha fazla antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin kullanılan alkol çözücüsünün farklı olmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. MİK deneyi sonucunda ise *L. inermis* yapraklarının ve tozunun sulu ekstraktları *S. aureus* için 8 mg/mL'lik en düşük MİK değerini verdiği ve *L. inermis* yapraklarının sulu ekstresinin hiçbir standart suş üzerinde öldürme etkisi göstermediğini belirtmişlerdir. Bunun aksine yapılan bu çalışmada *L. inermis*'in sulu ekstresinin *S. aureus* için MİK değeri 0,5

mg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılık; ekstraksiyon sırasında kullanılan cihaz, kullanılan bitki miktarı, kullanılan çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi gibi faktörlerdeki değişimlerden kaynaklanabilir.

Bir başka çalışmada ise Arun, Purushotham, Jayarani ve Vasantha (2010) *L. inermis*'e ait yaprak kısımlarının antibakteriyel etkinliğini; n-hekzan, kloroform ve metanol ekstraktları ile *S. aureus*, *E. coli*, *K.pneumonia*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* suşlarına karşı kuyu difüzyon yöntemi ve MİK testi ile araştırmışlardır. Yapılan MİK deneyi sonucunda metanol ekstraktının 62,5 µg/mL konsantrasyonunun *S. aureus*'a karşı daha aktif olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise MİK değerleri *S. aureus* ve *E. coli* için 1 mg/mL konsantrasyon olarak kaydedilmiştir. MİK değerindeki bu farklılık kullanılan bitki kısımlarının farklı olmasıyla açıklanabilir.

Al-rubiary vd. (2008) çalışmalarında çeşitli cilt hastalıklarından izole edilen bakteri kültürlerine karşı *L. inermis* yapraklarının su, alkol ve yağlı ekstraktlarının antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 74 farklı hastadan *S. aureus*, *S. epidermis*, *Beta hemolitik streptokok* ve *P. aeruginosa* türlerinin kültürleri alınmış ve *L. inermis* yapraklarının 3 farklı ekstraktını hazırlanmışlardır. Bu ekstraktlar ile yapılan MİK deneyinde hem alkollü hem de yağlı özlerin *S. aureus* üzerinde aynı MİK değerine (0,5 µg/mL) sahip olduğu görülmüştür. Ekstraktların MİK değerleri karşılaştırıldığında, alkollü ekstraktların izole edilmiş bakterilere karşı belirgin antibakteriyel etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Su ekstraktlarının alkollü ve yağlı ekstraktlara kıyasla herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermediği belirtilmiştir. Fakat yapılan bu çalışmanın *L. inermis*'in su ekstraktı ile yapılan kısmında, *S. aureus* için MİK değerini 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. *E. coli* için ise 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Sukanya vd. (2009) aralarında *L. inermis*'inde bulunduğu bazı şifalı hint bitkilerinin antimikrobiyal etkinliğini *E. coli*, *S. aureus* ve *R. solanacearum*'a karşı agar disk difüzyon yöntemi kullanarak belirlemeyi hedeflemişlerdir. Bitkilere ait yaprakları metanol, etanol, etil asetat ve kloroform gibi farklı çözücüler kullanılarak ekstre etmişler ve *S. aureus* için *L. inermis*'e ait metanol ekstraktının 6 mm'lik bir zon çapı oluşturduğu sonucuna varmışlardır. Bu sonuca benzer olarak yapılan bu çalışmada *L. inermis*' in metanol ekstraktının *S. aureus*'a karşı 7±1 mm'lik bir zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir.

Yine başka bir çalışmada Rahmoun vd. (2010) kına yapraklarının *in vitro* antimikrobiyal etkinliğini dört patojenik bakteri suşuna (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) karşı MİK ve agar disk difüzyon deneyleri ile değerlendirmişlerdir. 6 farklı çözücü ile yaptıkları ekstraksiyonun ardından disk difüzyon metodu sonucunda lawsoneun yanı sıra sadece DMSO, etanol ve etil asetat ekstraktlarının iki gram pozitif bakteriye (*S.aureus* ve *E.faecalis*) karşı aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Fakat sulu, kloroformlu ve dietil eterle hazırladıkları ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite göstermediğini ifade etmişlerdir. Çalışmada DMSO ve etanol ekstraktlarının tüm suşlara karşı aktivite gösterdiğini; dietil eter, kloroform, soğuk su ve sıcak su ekstraktlarının ise tüm suşlara karşı herhangi bir aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise disk difüzyon testinde kloroform ve su ekstraktlarında sırasıyla $7,33\pm 2,30$ ve $6,16\pm 0,28$ olarak belirlenen antimikrobiyal etki görülmüştür. Yine *L. inermis*'e ait kloroform ve metanol ekstraktları için yapılan MİK testinde *S. aureus* için 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Bu farklılığın nedeni her iki çalışmada da ekstraksiyon sırasında sadece bitkiye ait yaprak kısımları kullanılırken, yapılan bu çalışmada ekstraksiyon sırasında bitkinin tohum, yaprak, çiçek kısımlarının kullanılması ile açıklanabilir.

Jeyaseelan vd. (2012) bazı patojenik bakterilere karşı *L. inermis*'in farklı soğuk organik solvent ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini ortaya çıkarmak için; meyve, çiçek ve yapraklarının tozlarını ortam sıcaklığında sürekli olarak diklorometan (DCM), etil asetat ve etanol ile ekstrakte etmişlerdir. Ekstrakte edilerek çözücülerini uçurulan bitki kısımlarını, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E.coli* ve *P. aeruginosa* olmak üzere toplam 4 bakteri üzerinde agar kuyu difüzyon testi ve MİK testi ile denemişlerdir. Yapılan testler sonucunda test edilen özler arasında meyve, çiçek ve yaprağın etil asetat ve etanol özlerinin, yine aynı bitki parçalarının diklorometan (DCM) özlerine kıyasla tüm test bakterilerine karşı daha yüksek inhibisyon sergilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca çiçek ve meyvenin etil asetat ekstraktlarının tüm test bakterilerine karşı verdiği sonuçların yaprak kısmının etil asetat ekstraktının sonuçlarından daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yaprak özütleri arasında ise yaprağın etanol özütünün etil asetat ve DCM (diklorometan) özütlerine kıyasla tüm test bakterilerinde daha yüksek inhibisyona sahip olduğunu görmüşlerdir. Yine yapılan MİK çalışmalarında ise tüm test mikroorganizmalarının inhibitör etkisinin doza bağlı

olarak değişkenlik gösterdiğini, bununla birlikte konsantrasyon arttıkça antibakteriyel aktiviteninde arttığını tespit etmişlerdir. Elebeedy vd. (2022) ise yaptıkları çalışmalarında *L. plantarum* ve *L. inermis* yapraklarının etanol ekstraktlarının ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığında *S. aureus* için antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Antibakteriyel aktiviteleri MİK testi yaparak değerlendirmişlerdir. *S. aureus*'ta *L. plantarum* ve *L. inermis*'in MİK değerlerini sırasıyla 13 mg/mL ve 0,0725 mg/mL olarak bulmuşlardır. *L. plantarum* ve *L. inermis*'in birlikte uygulanmasının, *L. plantarum*'un MİK değerini 2 mg/mL'ye kadar düşürürken, *L. inermis*'in MİK değerinin artmasına sebep olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak *L. plantarum* ve *L. inermis* kombinasyonunun, enfekte yaranın iyileşmesinde sinerjistik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan bu çalışmada da metanol ekstraktı ile yapılan MİK çalışmasında *S. aureus* için 1 mg/mL konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Ahmad ve Beg (2001) yaptıkları çalışmada *L. inermis*'in etanol ekstraktının antimikrobiyal etkinliğini agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Zon çaplarını; *S. aureus* için 31-40 mm ve *E. coli* için 10-20 mm arasında tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise *L. inermis*'e ait metanol ekstraktı ile *S. aureus* için yapılan agar disk difüzyon testinde 7±1 mm'lik bir zon çapı ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada gerçekleşen zon çapı değerindeki düşüşün test disklerine emdirilen ekstrakt miktarından kaynaklanabileceği tahmin edilmiştir.

Nigussie, Davey, Legesse, Fekadu ve Makonnen (2021) yaptıkları çalışmada 3 tıbbi bitkinin (*L. inermis*, *A. indica*, *A. aspera*) metanol ekstraktlarının 11 farklı bakteri suşuna karşı antibakteriyel etkisini belirlemek için agar kuyu difüzyonu ve MİK yöntemini kullanmışlardır. Kullanılan ekstraktların antibakteriyel aktivitesini belirlemek için Kirby-bauser tekniğini kullanmışlardır. Çalışma sonucuna göre *L. inermis*'in üç konsantrasyonunun tümünün (100 mg/mL, 200 mg/mL ve 400 mg/mL) test edilen bakteri türlerine karşı standart ilaçlarla karşılaştırılabilir düzeyde önemli aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. *L. inermis*'in *S. aureus* ve *E.coli* izolatlarına karşı geleneksel ilaç sefoksitin ile karşılaştırılabilir oranda olağanüstü aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Nigussie vd. (2021)'nin yaptıkları çalışmada, *L. inermis* için belirlenmiş yüksek antimikrobiyal etkinliğin yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yaptıkları MİK testinde üç bitki yaprağının metanol ekstraktlarının test edilen tüm bakterilere karşı farklı MİK değeri gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda elde ettikleri MİK değerlerinin, *L.*

inermis yapraklarının metanol ekstraktlarının *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı daha güçlü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda *L. inermis* özütlerinde *S. aureus*'a karşı da güçlü antibakteriyel aktivite gözlemlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise bu çalışmalara benzer şekilde *L. inermis*'in metanol ekstraktının *S. aureus* ve *E.coli* için antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu değerlendirilmiştir.

Soliman vd. (2017) yaptıkları çalışmada *Calligonum comosum* ve bir kına bitkisi naftokinonu olan lawsoneu birlikte kullanarak yaptıkları MİK deneyi sonucunda *E. coli*'ye karşı güçlü bakterisidal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Lawsone 200 µg/mL konsantrasyonda *E.coli* için yaklaşık %90 oranında büyüme inhibisyonuna neden olduğunu saptamışlardır. Bakteri suşları için lawsoneun etkili MİK konsantrasyonunu 220-240 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

Rahmoun vd. (2012) bir başka çalışmalarında lawsone ve bazı yeni naftokinon türevlerinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesini agar disk difüzyonu ve MİK testleri ile belirlemişlerdir. Lawsone için yaptıkları agar disk difüzyon çalışmasında, *E.coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı 17-25 mm'lik zon çapları oluşturduklarını belirlemişlerdir. *E.coli* için 512 µg/mL ve *S.aureus* için 256-512 µg/mL MİK değeri kaydetmişlerdir. Çalışma sonucunda lawsone naftokinonunun önemli antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise lawsone standartı *S. aureus* ve *E.coli* için 1 mg/mL konsantrasyonda sırasıyla 6,83±1,04 mm ve 6±0 mm'lik zon ile antibakteriyel etki göstermiştir. Bununla birlikte, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına için MİK değerleri sırasıyla 0,5 mg/mL ve 0,125 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Soliman vd. (2017), Rahmoun vd. (2012) lawsone çalışmalarına benzer olarak yaptığımız deneylerde de test mikroorganizmalarında antibakteriyel aktivite görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile birlikte diğer 2 çalışmanın birbirinden farklı MİK değerlerine sahip olmasının nedeni uygulama sırasında lawsoneun çözdürüldüğü konsantrasyonların birbirinden farklı olmasıyla açıklanabilir.

Hücrelerin, sağlıklı olup olmadıkları ile ilgili bilgi veren en iyi göstergeler; canlılık düzeyleri ve/veya proliferasyon oranlarıdır. Hücre sağlığı ve metabolizmasını, fiziksel veya kimyasal maddelerin konsantrasyonu, uygulama süresi ve sıcaklığı gibi unsurlar etkilemektedir. Bu fiziksel ve kimyasal maddeler ise; hücre zarlarının yıkımı, protein sentezinin inhibisyonu ve reseptörlerin geri dönüşümsüz bağlanması gibi farklı

mekanizmaları indüklerlerse hücrede toksisite meydana gelir. Bu nedenle, *in vitro* hücre canlılığı testi veya sitotoksisite testi, ilaç ve kimyasalların sitotoksik etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslantürk, 2018).

Kapsamlı literatür taramasında pankreas kanseri hücre hattı olan CAPAN-1 için *L. inermis*'in etkilerinin araştırıldığı çalışmaların kısıtlı olduğu görülmüştür.

Kumar vd. (2016) yaptıkları çalışmada *L. inermis* yapraklarının su ekstraktlarının antiradikal, DNA koruyucu ve antiproliferatif aktivitesini değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. *L. inermis*'in sitotoksik etkisini farklı kanser hücre hatlarına (Hela, MCF-7, A549, C6 ve COLO-205) karşı MTT deneyi kullanarak değerlendirmişler ve yapılan MTT deneyi sonucunda su ekstraktının Hela hücrelerine karşı 1000 µg/mL' de %61.68'lik orta derecede antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ekstraktın minimum dozda (31,25 µg/mL) hücre büyümesinin %28.06'sını inhibe ettiğini belirtmişlerdir. MCF-7 hücrelerinde en düşük konsantrasyonda hiçbir antiproliferatif etki gözlenmezken, en yüksek konsantrasyonda %48.63 sitotoksisite gözlemlenmişlerdir. Ekstraktın %57.73 sitotoksisite ile A549 hücrelerine karşı orta derecede büyüme önleyici etki gösterdiğini, C6 glioma hücre hattında hücrelerin büyümesini %59.43 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. COLO-205 hücre hattında aktivitenin en düşük konsantrasyonda (25 µg/mL) %25.19 ve en yüksek konsantrasyonda (500 µg/mL) %75.49 olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada gerçekleştirilen MTT deneylerinde su ekstraktının CAPAN-1 pankreas kanseri hücresinde en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL konsantrasyonda %47,5±3,1'lik bir antiproliferatif etkisi olduğu görülmüştür. Bu antiproliferatif etki farkının çalışmalarda kullanılan kanser hücre hatlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Kumar, Kaur, Kumar ve Kaur (2015) yaptıkları bir çalışmada, hekzan ve kloroformu çözücü olarak kullanarak yaptıkları ekstraksiyon sonucunda *L. inermis*'in çeşitli kanser hücre hatlarında (Hela, MCF-7, A549, C6 glioma) antiproliferatif potansiyelini incelemiştir. Hekzan ekstraktı ve kloroform ekstraktının en yüksek konsantrasyonda test edilen tüm hücre hatlarında %60'tan fazla büyüme inhibisyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da benzer şekilde kloroform ekstraktı tüm ekstraktlar içerisinde CAPAN-1 pankreas kanseri hücreleri için en güçlü antiproliferatif etkiyi göstermiştir. En yüksek konsantrasyonun CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde %70'in üzerinde büyüme inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir.

2-Hidroksi-1,4-naftokinon, yani lawsone, *L. inermis* yapraklarında bulunan karakteristik bir bileşiktir. Lawsone ve glikozitleri saç ve cilt proteinlerine bağlanarak onları boyar (Oda vd., 2018). Bu çalışmada lawsone standardı için CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde 100 µg/mL, 50 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla %32,3±2,5; %40,6±3,1 ve %47,6±3,3 olarak hesaplanmış ve bu 3 konsantrasyonda antiproliferatif etki gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Sarala, Madhukara Naik, Rami Reddy ve Sujatha (2020) yaptıkları çalışmada *L. inermis* yaprak ekstresi kullanılarak yeşil sentez ile nFe₂O₄ nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Hazırladıkları çinko ferrit nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksik aktivitesini MTT testi kullanarak meme kanseri (MCF-7) hücre hattına karşı değerlendirmişlerdir. Deney sonucunda hücre canlılığının 25, 50, 100, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla %60, %53, %44, %32 ve %24 oranında önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada Ishteyaque vd. (2020) *L. inermis*'in etanol ekstraktının insan akciğer kanseri (A549), kolorektal kanser (DLD1) ve hepatosellüler karsinom (HepG2) kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisini MTT testi ile gözlemlenmişlerdir. Sonuç olarak hücre hatlarında; 5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 µg/mL konsantrasyonlarda etanol ekstraktının konsantrasyona bağlı önemli büyüme önleyici aktivite sergilediğini ifade etmişlerdir. Hücrelerin canlılığının A549, DLD1 ve HepG2'de sırasıyla %43, 45 ve %47'ye kadar düştüğünü belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise bitkinin metanol ekstraktı için CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla; %32,5±3,1 ve %29,7±4,8 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan hücre hatları farklı olsada *L. inermis* bitkisinin farklı ekstraktlarının hücreler üzerinde benzer antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

İnsanlık tarihin başlangıcından itibaren bitkilerden gıda, yakacak, koku ve tat verici, ilaç gibi birçok alanda faydalanmışlardır. Şifalı bitkilerden elde ettikleri özütler ile hastalıkları tedavi etmeye çalışmışlardır. Günümüzde alternatif tıp adı altında bitkiler ile tedavi yöntemlerine devam edilmektedir. Bunun yanı sıra drog adı verilen bitki özütleri sentezi pahalı olan ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Bitki özütleri kullanılarak elde edilen ilaçların ciddi bir yan etkisi olmaması ve olumlu etkilerinin fazla olmasından dolayı bitkisel ilaç araştırmaları ilgi duyulan bir araştırma alanıdır. George vd. (2010) yaptıkları çalışmada Bangladeş halk tıbbında kanserde dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan Bangladeş'e özgü bitkilerden

Shimizu vd. (2013) yaptıkları çalışmada *O. sanctum*'un yapraklarından hazırlanan uçucu yağ ve etanol ekstraktının pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve metastazı engelleyip engellemediğini araştırmışlardır. Uçucu yağ ve etanol ekstraktının hazırlanmasının ardından 3 insan pankreas hücresi (A₅PC-1, MiaPaCa, Capan-1) üzerinde MTT deneyi yapmışlardır. Deney sonucunda *O. sanctum*'un etanol ekstraktı ve yapraklarının uçucu yağının pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediğini bildirmişlerdir. Park vd. (2022) yaptıkları çalışmada Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey.)'in toksisitesini değerlendirmek için farklı insan dokularından elde edilen 6 kanser hücre hattında siyah ginseng ekstraktlarının (BGE) sitotoksitesini MTT testi ile belirlemişlerdir. BGE'nin sitotoksik aktivitesini 6 farklı kanser hücre hattı (A-431, A549, HT-29, NCI-N87, Capan-1 ve HepG2) kullanarak analiz etmişlerdir. Yapılan sitotoksikite testi sonucunda BGE'nin etkinliğini doğrulamışlardır. BGE 1250 µg/mL'de doza bağımlı bir şekilde test edilen en küçük dozdan (312,5 µg/mL) hücre hatlarının canlılığının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. CAPAN-1 için bu dozu 2500 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise CAPAN-1 için en yüksek antiproliferatif etki *L. inermis*'in kloroform ekstraktında 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda canlılık sırasıyla %28,2±0,21 ve %28,6±1,53 olarak hesaplanmıştır. Farklı bitki ve bitki kaynağından elde edilen bileşenlerin CAPAN-1 pankreas kanseri hücre hattı için farklı konsantrasyonlarda, farklı düzeyde antiproliferatif etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada ölüm modunu belirleyebilmek adına floresan boyalar olan Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür kullanılarak ikili boyama yapılmış ve floresan mikroskopta görüntülenmiştir. CAPAN-1 ve L929 hücrelerinin Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür (PI) ile boyanması sonucu, CAPAN-1 için kloroform ekstraktında ise 100 µg/mL, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda % apoptotik indeks nekrotik indekse göre yüksek görülmüştür. L929 hücresi ile karşılaştırıldığında, L929 hücrelerinde de 25 µg/mL konsantrasyonda apoptotik hücre indeksinin nekrotik hücre indeksinden fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar MTT testi sonucunu desteklemiştir.

Kumar vd. (2015) yaptıkları çalışmada *L. inermis*'in kloroform ve hekzan ekstraktlarını Hela hücreleri üzerinde apoptoz ve nekroz tayini ile incelemişlerdir. Sonuçta, hücre çekirdeklerinde yoğunlaşma ve parçalanma gözlemlemişlerdir.

Bununla birlikte kontrol hücrelerinde herhangi bir yoğunlaşma ve parçalanma olmadan belirgin bir çekirdek formunda kaldığını ifade etmişlerdir. Kloroform ekstraktının farklı kanser hücreleri üzerinde apoptotik ölümü tetiklemesinin nedeninin anti-apoptotik genlerin aşağı regülasyonuna yol açmasından kaynaklanmasıyla açıklanabilir.

Ishteyaque vd. (2020) yaptıkları çalışmada insan akciğer kanseri (A549), kolorektal kanser (DLD1) ve hepatosellüler karsinom (HepG2) kanser hücre hatları üzerinde çalışmışlardır. Hücrelerdeki apoptoz ve nekrozu Hoechst 33528 ve propidium iyodür (PI) boyalarını kullanarak kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmantasyonu şeklinde gözlemlemişlerdir. Propidium iyodür ile boyanmış hücre hatlarında 300 µg/mL'de kına özütünün orta düzeyde floresan ışması gösterdiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde yapılan bu çalışmada da CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde *L. inermis*'e ait kloroform ekstraktının 100 µg/mL, 25 µg/mL ve 6,25 µg/mL konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini apoptotik yoldan gerçekleştirdiği belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asya ve Orta Asya'da *L. inermis*, saçları ve vücudu boyamak için kozmetik amaçla kullanılıyor olmasına rağmen, çeşitli sitotoksik ve kemopreventif ajanları içermektedir. Bu çalışmada *L. inermis* bitkisinin *in vitro* ortamda antimikrobiyal etkinlik ve pankreas kanseri üzerine yararlı etkisi olduğu görülmüştür.

Antimikrobiyal etkinin incelenmesi için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) analizi ve agar disk difüzyon deneyleri sonucunda; *S. aureus*'a karşı en güçlü antimikrobiyal etki agar disk difüzyon deneyinde aseton ekstraktında görülürken, *E.coli* için en güçlü antimikrobiyal etki su ekstraktında görülmüştür. MİK deneyi sonucunda ise *S. aureus* ve *E.coli* için en güçlü etki lawsone standartında görülmüştür.

Ekstraktların sitotoksik etkilerini incelemek için CAPAN-1 ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde MTT testi verileri dikkate alındığında; CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde tüm ekstraktlar antiproliferatif etki gösterirken, en etkili cevap kloroform ekstraktında görülmüştür. L929 fibroblast hücreleri için tüm ekstraktlarda ilk iki konsantrasyonda sitotoksik etki görülürken, konsantrasyon azalışına bağlı hücre canlılığında artış görülmüştür.

Yapılan ikili boyama testi sonuçları incelendiğinde; L929 fibroblast ve CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde kloroform ekstraktında 25 µg/mL konsantrasyonda % apoptotik indeks, % nekrotik indekse göre daha yüksek tespit edilmiş ve iki hücre hattı içinde bu sonuçlar MTT testi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Kınanın çeşitli kısımlarından elde edilen ham özütler tedavi edici uygulamalara sahiptir ancak; modern ilaçlar biyolojik aktivitesi, etki mekanizması, farmakoterapötik etkileri ile toksisitesinin kapsamlı bir şekilde araştırılmasından ve uygun standardizasyon ile klinik denemelerden sonra geliştirilebilir. *L. inermis*'in fitokimyası, farmakolojik özelliklerinin belirlenebilmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın, *L. inermis* bitkisinden yeni ajanların elde edilmesi ve etkilerinin belirlenmesine yönelik birçok bilimsel çalışmaya ışık tutacağı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada GC-MS analizi ile bitkinin kimyasal içeriğinin

detaylı belirlenmemiş olması da göz önünde bulundurularak, bitkiye ait GC-MS analizlerinin yapılması sonraki çalışmalar için yararlı olacaktır. Bununla birlikte yapılacak çalışmalarda *in vivo* deneylere de yer verilmesi, bitkinin tıbbi kullanımını için son derece önemli sonuçlar doğuracağı kanısına varılmıştır.



KAYNAKLAR

Abdelraouf, A., Alyazji, Amany, A., Abu-Gheneima, N.A. (2011). Antibacterial, antifungal and synergistic effect of *Lawsonia inermis*, *Punica granatum* and *Hibiscus sabdariffa*. *Annals of Alquds Medicine*, Cilt: 7.

Ahmad, I., Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of ethnopharmacology*, 74(2), 113-123.

Alberts, R.S., Grothey. A. (2004). Gastrointestinal tract cancers. In: Manual of clinical oncology. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 213-9.

Ali, N.A.A., Julich, W.D., Kusnick, C., Lindequist, U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol*, 74(2):173-179.

Allison, L.A. (2012): *Temel Moleküler Biyoloji* (Çev: A.O. Beldüz).Ankara: Palme Yayıncılık.

Al-Rubiay, K. K., Jaber, N. N., Al-Mhaawe, B. H., Alrubaiy, L. K. (2008). Antimicrobial efficacy of henna extracts. *Oman medical journal*, 23(4), 253.

Arun, P., Purushotham, K. G., Jayarani, J. J., Vasantha, K. (2010). *In vitro* antibacterial activity and flavonoid contents of *Lawsonia inermis* (Henna). *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1178-1181.

Aslantürk, Ö.S. (2018). *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, Genotoxicity- A Predictable Risk to Our Actual World, *Intech Open*, London, p: 1-17.

Aşık, E. (2015). Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*,Konya.

Avcı, A. (2015). Juglonun PANC-1 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Baba-Moussa, F., Nacoulma, O., Ouattara, A., Nguyen, H.P., Akpagana, K., Bouchet, P. (1997). Antibacterial activity of total aqueous extracts of *Combretum micranthum* *Lawsonia inermis* and *Waltheria indica* plants from west African pharmacopoeia. *Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines* 11(12):197-203

Ban, S., Naitoh, Y., Mino-Kenudson, M. (2006). Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas: Its histopathologic difference between 2 major types. *Am J Surg Pathol*, 30, 1561–9.

Becker, A.E., Hernandez, Y.G., Frucht, H., Lucas, A.L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*, 20, 11182-98.

Bozkaya, O., Ekici, H., Gün, Z., Arat E., Ekici, S., Yiğitoğlu, M., Vargel, İ. (2022). Investigation of *in vitro* antibacterial, cytotoxic and *in vivo* analgesic effects of silver nanoparticles coated with *Centella asiatica* plant extract. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.

Braunwald, E., Fauci, Kasper, Hauser, Longo ve Jameson (2004). *Onkoloji ve Hematoloji. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri*. Çeviren: Y. Sağlıkler. Ankara: Nobel Yayıncılık.

Chaudhary G., Goyal S., Poonia P. 2010. *Lawsonia inermis* Linnaeus: A Phytopharmacological Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2010; 2(2): 91-98

Chetty KM. Flowering plants of Chittoor, Edn 1, Andhra Pradesh, 2008, pp. 132.

Çerçi, N. A. (2011). Ankara ili ve çevresindeki akarsularda bulunan bazı tatlı su balıklarından izole edilen gr (-) bakterilerin izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin incelenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Dama, L.B., Poul, B.N., Jadhav., B.V. (1999). Antimicrobial activity of Naphthoquinonic compounds. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring*, 8:213-215.

Decker, G.A., Batheja, M.J., Collins, J.M., Silva, A.C., Mekeel, K.L., Moss, A.A., Nguyen, C.C., Lake, D.F., Miller, L.J. (2010). Risk factors for pancreatic adenocarcinoma and prospects for screening. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 6, 246-54.

Dilsiz, N. (2009). *Moleküler Biyoloji 2*. Baskı”, Palme yayıncılık, Ankara, 197-198.

DiMaio, C.J. (2015). Pancreatic cysts and tumors. In: Mount sinai expert guides: Gastroenterology. *John Wiley & Sons*, 304-22.

Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*. 2014, 11.

Doğan, A. L., Güç, D. (2004). Sinyal İletim Mekanizmaları Ve Kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*;35:34-42

Dusek, L., Muzík, J., Gelnarová, E., Fínek, J., Vyzula, R., Abrahámová, J. (2010). Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol*, 23, 311-24.

Eguale, T., Giday, M. (2009). *In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. *Int J Green Pharm* 3:29–34.

Elebeedy, D., Ghanem, A., El-Sayed, M., Fayad, E., Ali, O. A. A., Alyamani, A., Abdelgeliel, A. S. (2022). Synergistic Antimicrobial Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lawsonia inermis* Against *Staphylococcus aureus*. *Infection and Drug Resistance*, 15, 545.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.

Endrini, S., Rahmat, A., Ismail P., Taufiq-yap, Y.H. (2007). Comparing of the Cytotoxicity Properties and Mechanism of *Lawsonia inermis* and *Strobilanthes crispus* extract against several cancer cell lines. *Journal of Medical Sciences*, 1098-1102.

Ferrone, C.R., Levine, D.A., Tang, L.H., Allen, P.J., Jarnagin, W., Brennan, M.F., Offit, K., Robson, M.E. (2009). BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 27, 433-8.

Fotakis, G. ve Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177.

Fukushima, N., Fukayama, M. (2007). Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: pathology and molecular genetics. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14, 238–42.

Garg, R.K., Tripathi, R., Batav N., Singh R.K. (2017). Phytochemical High Performance Thin Layer Chromatography based Estimation of Lawsone in *Lawsonia inermis* (Henna) obtained from Two Natural Habitats and Dye Products Collected from Local Market. *Medicinal & Aromatic Plants*, 6.

George, S., Bhalerao, S. V., Lidstone, E. A., Ahmad, I. S., Abbasi, A., Cunningham, B. T., Watkin, K. L. (2010). Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative medicine*, 10(1), 1-11.

Gull, I., Sohail, M., Aslam, M.S. (2013). Phytochemical, toxicological and antimicrobial evaluation of *Lawsonia inermis* extracts against clinical isolates of pathogenic bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12, 36.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E. (2008). Hücrede apoptoz vsağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 36, 120-30.

Güneyi, A. (2005). Periampuller Bölge Tümörlerinde Pilor Koruyucu Pankreatikoduodenektominin Yeri. Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi. *İstanbul Üniversitesi*, İstanbul.

Habbal, O., Hasson, S.S., El-Hag, A.H., Al-Mahrooqi, Z., Al-Hashmi, N., Al-Bimani, Z., Al-Balushi, M.S., Al-Jabri, A.A. (2011). Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* Linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 1:173–176.

Habbal, O.A., Ai-Jabri, A.A., El-Hag, A.H., Al-Mahrooqi, Z.H., Al- Hashmi, N.A. (2005). In-vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna) - A pilot study on the Omani henna. *Saudi Medical Journal* 26:69-72.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*,100 (1):57-70.

Harnack, L.J., Anderson, K.E., Zheng, W., Folsom, A.R., Sellers, T.A., Kushi, L.H. (1997). Smoking, alcohol, coffee, and tea intake and incidence of cancer of the

exocrine pancreas: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 1081-86.

Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E., (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 2969–72.

Hruban, R.H., Maitra, A., Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*, 1, 306–16

Hruban, R.H., Maitra, A., Kern, S.E., Goggins, M., (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 36, 831-49.

Ishteyaque, S., Mishra, A., Mohapatra, S., Singh, A., Bhatta, R. S., Tadigoppula, N., Mugale, M. N. (2020). *In vitro*: cytotoxicity, apoptosis and ameliorative potential of *Lawsonia inermis* extract in human lung, Colon and Liver Cancer cell line. *Cancer Investigation*, 38(8-9), 476-485.

Jeyaseelan, E. C., Jenothiny, S., Pathmanathan, M. K., Jeyadevan, J. P. (2012). Antibacterial activity of sequentially extracted organic solvent extracts of fruits, flowers and leaves of *Lawsonia inermis* L. from Jaffna. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(10), 798-802.

Kamei, H., Koide, T., Kojima, T., Hashimoto, Y., Hasegawa, M. (1998). Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 13, 185-188.

Kanarığ Gürel, D. (2007). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi.Yüksek Lisans Tezi. *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Adana 2007:100.

Keleg, S., Büchler, P., Ludwig, R., Büchler, M.W., Friess, H. (2003). Invasion and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer*, 2:14, 1-7.

Kızmaz, M. (2011). Pankreasın İnfiltratif Duktal Adenokarsinomlarında Nerve Growth Factor ve Glial Cell - Derived Neurotrophic Factor Ekspresyonunun Perinöral İnvazyon ve Prognostik Faktörler İle İlişkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Isparta.

Kim, J.I., Choi, H.J., Lee, J.S. (2013). Anticancer and antimicrobial activities of 13(E)-labd-13-ene-8 α ,15-diol from *Brachyglottis monroi*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56:49–51.

Kirkland, D. ve Marzin, D. (2003). An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1 4-naphthoquinone the natural dye ingredient of Henna. *Mutat Res* 537(2):183-199.

Kloppel, G., Kosmahl, M., Luttges, J. (2005). Intraductal neoplasms of the pancreas: Cystic and common. *Pathologe* 2005, 26, 31–6.

- Kosmahl, M., Pauser, U., Peters, K., Sipos, B., Lüttges, J., Kremer, B., Klöppel, G., (2004). Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal. *Virchows Arch*, 445, 168–78.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128: 693-705.
- Krejs, G.J. (2010). Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis*, 28, 355-8.
- Kumar, M., Chandel, M., Kaur, P., Pandit, K., Kaur, V., Kaur, S., Kaur, S. (2016). Chemical composition and inhibitory effects of water extract of Henna leaves on reactive oxygen species, DNA scission and proliferation of cancer cells. *EXCLI journal*, 15, 842.
- Kumar, M., Kaur, P., Kumar, S., Kaur, S. (2015). Antiproliferative and apoptosis inducing effects of non-polar fractions from *Lawsonia inermis* L. in cervical (HeLa) cancer cells. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(2), 249-260.
- Latchford, A., Greenhalf, W., Vitone, L.J., Neoptolemos, J.P., Lancaster, G.A., Phillips, R.K. (2006). PeutzJeghers syndrome and screening for pancreatic cancer. *Br J Surg*, 93, 1446-55.
- Liu, J. W., Cai, M. X., Xin, Y., Wu, Q. S., Ma, J., Yang, P., Huang, D. S. (2010). Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 1-7.
- Liu, P., Ying, Q., Liu, H., Yu, S. Q., Bu, L. P., Shao, L., Li, X. Y. (2020). Curcumin enhances anti-cancer efficacy of either gemcitabine or docetaxel on pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*, 44(4), 1393-1402.
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P. (2006). Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20, 197-209.
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., Lüttges, J. (2005). Frequency of Kras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*, 7, 17–23.
- Mackay, J., Jemal, A., Lee, N.C., Parkin, D.M. (2006). Kanser Atlası. *Atlanta: Amerikan Kanser Derneği*, 2006.
- Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B. (2010). Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis*, 28, 645-56.
- Malas, B. ve Ekici, H. (2022). *Lawsonia inermis* (Kına) ve Farmakolojik Özellikleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* , 15 (1), 121–131.
- Malekzadeh, F. (1968). Antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* L.. *Appl Microbiol* 16:663-664.

Melekoğlu, A., Ekici, H., A. R. A. T., & Karahan, S. (2020). Evaluation of melamine and cyanuric acid cytotoxicity: an *in vitro* study on L929 fibroblasts and CHO cell line. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67(4), 399-406

Menteş, N.K. (1976). Klinik Gastroenteroloji. 3. Baskı. İzmir: *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, 475.

Muniraj, T., Jamidar, P.A., Aslanian, H.R. (2013). Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. *Dis Mon*, 59, 368-402.

Nigussie, D., Davey, G., Legesse, B. A., Fekadu, A., Makonnen, E. (2021). Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-10.

Norbury, C.J., Hickson, I.D. (2001). Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 367-401.

Oda, Y., Nakashima, S., Kondo, E. (2018). *Lawsonia inermis* bitki parçaları ve dallardan nörit büyüme hızlandırıcıları arasındaki lawson içeriklerinin karşılaştırılması . *J Nat Med* 72, 890-896.

Ouyang, L., Shi Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., Bao, J.K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45, 487-98.

Ozaslan, M., Zumrutdal, M.E., Daglıoğlu, K., Kılıc, I.H., Karagoz, I.D. (2009). Antitumoral effect of *L. inermis* in mice with EAC. *International Journal of Pharmacology* 263-267.

Öztürk, K. (2015). Anti-Vegfr-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge Edilmiş Gemsitabin Yüklü Dendrimerlerin Pankreas Kanserine Aktif Hedeflendirilmesi ve *In Vitro/In Vivo* Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. *Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Pandol, S., Gukovskaya, A., Edderkaoui, M., Dawson, D., Eibl, G., Lugea, A. (2012). Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol*, 2, 127-34.

Papageorgiou, V., Assimopoulou, A. N., Couladouros, E., Hepworth, D., Nicolaou, K., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Couladouros, E.A., Nicolaou, K.C., Assimopoulou, A.N., Assimopoulou A.N. (1999). The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *A Journal Of The German Chemical Society*. 3, 270-301.

Park, J. S., Kim, S. H., Han, K. M., Kim, Y. S., Kwon, E., Paek, S. H., Kang, B. C. (2022). Efficacy and safety evaluation of black ginseng (*Panax ginseng* CA Mey.) extract (CJ EnerG): broad spectrum cytotoxic activity in human cancer cell lines and 28-day repeated oral toxicity study in Sprague-Dawley rats. *BMC complementary medicine and therapies*, 22(1), 1-13.

Perek, S. (2002). Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi*, 28: s. 215-230.

Philip, J.P., Madhumitha, G., Mar, S.A. (2011). Free radical scavenging and reducing power of *Lawsonia inermis* L. seeds. *Asian Pac J Trop Med* 4:457–461.

Pierotti, M.A., Schichman, S.A., Sozzi, G., Croce, C.M. (2000). Oncogenes. *In Cancer Medicine*, R.C. Bast, 56-66.

Poruk, K.E., Firpo, M.A., Adler, D.G., Mulvihill, S.J. (2013). Screening for pancreatic cancer: why, how, and who?. *Ann Surg*, 257, 17-26.

Priya, R., Ilanevil, S., Kaleeswaran, B., Srigopalram, S., Ravikumar, S., (2011). Effect of *Lawsonia inermis* on tumor expression induced by Dalton's lymphoma ascites in Swiss albino mice. *Saudi journal of biological sciences*, 18, 353-359.

Rabbani, M., Etemadifar, Z., Karamifard, F. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens. *Comp Clin Pathol* 25, 59–65.

Rahmoun, M. N., Benabdallah, M., Villemin, D., Boucherit, K., Mostefa-Kara, B., Ziani-Cherif, C., Choukchou-Braham, N. (2010). Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica*, 2(6), 320-326.

Rahmoun, N. M., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Benabdallah, M., Villemin, D., Choukchou-Braham, N. (2012). Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Medecine et maladies infectieuses*, 42(6), 270-275.

Reid, M.D., Bagci, P., Adsay, N.V. (2013). Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all?. *J Surg Oncol*, 107, 67-77.

Rosdi, M. N. M., Daud, N. N. N. M., Zulkifli, R. M., & Yaakob, H. (2015). Cytotoxic effect of *Annona muricata* Linn leaves extract on Capan-1 cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(5), 045-048.

Ross, M.H. (2014). *Hücre Nükleusu*, , Histoloji ve Konu Anlatımı ve Atlas, Altıncı baskından çeviri, Ankara, Palme Yayıncılık, 86-88.

Rovasio, A.R., (2010). Development and structure of the pancreas. In: Pancreatic cancer. USA: Springer, 27-38.

Roy, P. S. ve Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*, 53(3), 441.

Saadabi, M.A.A. (2007). Evaluation of *Lawsonia inermis* L. (Sudanese Henna) Leaf extracts as an antimicrobial agent. *Res J Bio Sci* 2(4):419-423.

Sarala, E., Madhukara Naik, M., Vinuth, M., Rami Reddy, Y. V., Sujatha, H. R. (2020). Green synthesis of *Lawsonia inermis*-mediated zinc ferrite nanoparticles for magnetic studies and anticancer activity against breast cancer (MCF-7) cell lines. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 31(11), 8589-8596.

- Seicean, A., Seicean, R. (2012). Risk factors in pancreatic cancer. In: Pancreatic cancer-molecular mechanism and targets. *Croatia: InTech*, 1-16.
- Semwal, B.R., Semwal, D.K., Combrinck, S., Cartwright-Jones, C., Viljoen, A. (2014). *Lawsonia inermis* L. (henna): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Ethnopharmacology*. 155, 80-103.
- Sharma, V.K. (1990). Tuberculostatic activity of henna *Lawsonia inermis* Linn *Tubercle*, 71(4):293-296.
- Shimizu, T., Torres, M. P., Chakraborty, S., Soucek, J. J., Rachagani, S., Kaur, S., Batra, S. K. (2013). Holy Basil leaf extract decreases tumorigenicity and metastasis of aggressive human pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*: potential role in therapy. *Cancer letters*, 336(2), 270-280.
- Silverman, D.T., Hoover, R.N., Brown, L.M., Swanson, G.M., Schiffman, M., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Schwartz, A.G., Liff, J., Pottern, L.M., Fraumeni, J.F. (2003). Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology*, 2003; 14, 45-54.
- Singh DK, Luqman S, (2014). *Lawsonia inermis* (L.): A perspective on anticancer potential of Mehndi/Henna *Biomedical Research and Therapy* 2014, 1(4):112-120.
- Singh, D., Upadhyay, G., Srivastava, R.K., Shankar, S. (2015). Recent advances in pancreatic cancer: biology, treatment, and prevention. *Biochim Biophys Acta*, 1856, 13-27.
- Slack, J.M., 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121, 1569-80.
- Soliman, S. S., Alsaadi, A. I., Youssef, E. G., Khitrov, G., Noreddin, A. M., Husseiny, M. I., Ibrahim, A. S. (2017). Calli essential oils synergize with lawsone against multidrug resistant pathogens. *Molecules*, 22(12), 2223.
- Søreide, K., Sund, M. (2015). Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer. *Cancer Lett.* 356, 281-8.
- Sukanya, S. L., Sudisha, J., Hariprasad, P., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., Fathima, S. K. (2009). Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. *African journal of biotechnology*, 8(23).
- Sun, Y. ve Peng, Z.L. (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J*, 85, 134-40.
- Şahin, F., Taşpınar, M., Sunguroğlu, A. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27: s560-566.
- Şimşek, H. (1993). Pankreasın yapısı ve konjenital anomaliler. In: Gastroenteroloji. *Ankara: Hekimler Yayın Birliği*, 917-23.

- Tokur, O., ve Aksoy, A. (2017). *In vitro* sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Tubay Bağdatoğlu, Ö. (2008). Gastrointestinal Kanserli Hastalarda G Protein β 3 Geni (GNB3) C 825T Polimorfizminin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mersin.
- Ulubaşoğlu, P. (2011). Pankreas Kanserli Hastaların Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Zonguldak.
- Wilde, R.F., Hruban, R.H., Maitra, A. (2012). Reporting precursors to invasive pancreatic cancer: pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal neoplasms and mucinous cystic neoplasm. *Diagn Histopathol*, 18, 17–30.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res*, 60, 2002–6.
- Wolfgang, C.L., Herman, J.M., Laheru, D.A., Klein, A.P., Erdek, M.A., Fishman, E.K., Hruban, R.H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63, 318-48.
- Wörmann, S.M., Algül, H. (2013). Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Front Oncol*, 3, 282.
- Yadav, D., Lowenfels, A.B. (2013). The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 144, 1252-61.
- Yang, J.Y., Cho, K.S., Chung, N.H., Kim, C.H., Suh, J.W., Lee, H.S. (2013). Constituents of volatile compounds derived from *Melaleuca alternifolia* leaf oil and acaricidal toxicities against house dust mites. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56:91–94.
- Yang, J.Y., Lee, H.S. (2015). Antimicrobial activities of active component isolated from *Lawsonia inermis* leaves and structure-activity relationships of its analogues against food-borne bacteria. *J Food Sci Technol* 52, 2446–2451 (2015).
- Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., Goto, M. (2008). Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver*, 2, 137-54.
- Yöntem, M. ve Ünaldı, M. (2011). *Biyokimya*. Konya: Aybil Yayıncılık
- Zamboni, G., Scarpa, A., Bogina, G. (1999). Mucinous cystic tumors of the pancreas: Clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol*, 1999, 23, 410–22.
- Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 17, 2897-908.