

***ACHILLEA TERETIFOLIA* WILLD. ÖZÜTLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif Burcu BALI

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2012
ANKARA**

Elif Burcu BALİ tarafından hazırlanan “*ACHILLEA TERETIFOLIA* WILLD. ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL, ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ” adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mecit VURAL

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Ferit AVCU

.....

Hematoloji Anabilim Dalı, GATA

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

03/12/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Elif Burcu BALİ

**ACHILLEA TERETIFOLIA WILLD. ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL,
ANTIOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Elif Burcu BALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Aralık 2012

ÖZET

Bu çalışmada *Achillea teretifolia* Willd.'ın su ve metanol özütlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla özütlerin antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ile, antioksidan etkileri ise 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivite ve Folin-Ciocalteu reaktifli fenolik içerik tayini ile incelendi. Özütlerin sitotoksik etkileri HeLa (Serviks Kanseri), MCF-7 (Meme Kanseri), DU145 ve PC-3 (Prostat kanseri) ve insan gingival fibroblast (HGF) hücre dizileri üzerinde 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemiyle belirlendi. Sitotoksisite propidium iyodür (PI), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve 3',3'-diheksiloksakarbo siyanin iyodür (DiOC₆) floresan boyama yöntemleriyle de araştırıldı. Sitotoksik etkili özütlerde Western blotlama ile apoptotik yolağı uyaran aktif kaspaz-9 ve poli ADP riboz polimeraz (PARP) proteinleri araştırıldı. Sonuçlara göre, metanol özütünün bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkili iken, su özütünün antimikrobiyal bir etki göstermediği tespit edildi. Antioksidan aktivitede ise, metanol özütünün suya göre DPPH süpürücü aktivitesi ve fenolik içeriği daha yüksek bulundu. Özütlerin 0,001-25 µg/ml konsantrasyon aralığında ve 24 saat sürede PC-3 ve DU145 hücre dizilerine karşı sitotoksik bir etkisi bulunmazken, MCF-7 (IC₅₀>100µg/ml) ve HeLa'ya (Metanol IC₅₀: 0,0055±0,0040 µg/ml, Su IC₅₀: 0,10±0,05 µg/ml) karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. PC-3 ve

DU145 hücre dizilerinin daha yüksek konsantrasyondaki özütlerle muamelesi sonucu su (PC-3 için $IC_{50}:1,30\pm0,03$ mg/ml, DU145 için $IC_{50}:1,30\pm0,05$ mg/ml) ve metanol (PC-3 için $IC_{50}:0,35\pm0,06$ mg/ml, DU145 için $IC_{50}:0,40\pm0,05$ mg/ml) özütünde sitotoksik etki saptandı. HGF'ye karşı ise su özütü etkisizken, metanol özütünde 48 saatte konsantrasyona bağlı sitotoksik etki tespit edildi. Floresan boyama ve Western blotlama sonuçlarına göre metanol özütünün HeLa hücre dizisini PARP ve kaspaz-9 enzimlerini aktive ederek apoptoza götürdüğü belirlendi. Sonuç olarak özütlere en duyarlı kanser hücresinin HeLa olduğu ve metanol özütünün tüm deneysel çalışmalarda su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edildi.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : *Achillea teretifolia* Willd., antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik etki
Sayfa Adedi : 139
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND
CYTOTOXIC EFFECTS OF *ACHILLEA TERETIFOLIA* WILLD.**

EXTRACTS

(Phd Thesis)

Elif Burcu BALI

GAZI UNIVERSITY

SCIENCE AND TECHNOLOGY ENSTITUTE

November 2012

ABSTRACT

In this study, it is aimed to investigate antimicrobial, antioxidant and cytotoxic effects of *Achillea teretifolia* Willd. extracts. On this way, the extracts were analysed for antimicrobial and antioxidant activity by agar well diffusion, minimum inhibition concentration (MIC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and phenolic content detection with Folin-Ciocalteu reactive. Cytotoxic effects of the extracts were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) method on HeLa (Cervix cancer), MCF-7 (breast cancer), DU145, PC-3 (prostate cancer) and human gingival fibroblast (HFG) cells and also by propidium iodide (PI), 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) and 3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆) fluorescence dyes. Active caspase-9 and poli ADP ribose polimerase (PARP) proteins were investigated by Western blotting in cytotoxic extracts. According to the results, only methanol extract had antimicrobial effect against some bacteria. In antioxidant result, methanol extract had higher DPPH scavenging effect and phenolic content than water extract. Although the extracts at 0,001-25 µg/ml concentration range had no cytotoxic effects on PC-3 and DU145 in 24 hours, they were effective on MCF-7 (IC₅₀>100µg/ml) and HeLa (methanol IC₅₀: 0,0055±0,0040 µg/ml, water IC₅₀: 0,10±0,05 µg/ml). As a result of treatment with higher concentrations of the extracts on PC-3 and DU145, there was cytotoxic

effects of the extracts on PC-3 (water $IC_{50}:1,30\pm0,03$ mg/ml, methanol $IC_{50}:0,35\pm0,06$ mg/ml) and DU145 (water $IC_{50}:1,30\pm0,05$ mg/ml, methanol $IC_{50}:0,40\pm0,05$ mg/ml). Water had no cytotoxic effect on HGF, but according to concentrations, methanol in 48 hours had cytotoxic effects. In fluorescence dyes and Western blotting results, methanol extract had an apoptotic effect activating PARP and caspase-9 enzymes on HeLa cell line. As a consequence, it is detected that HeLa was the most sensitive cell line and in all of the experiments, methanol extract was more effective than water extract.

Science Code : 203.1.104
Key words : *Achillea teretifolia* Willd., antimicrobial, antioxidant, cytotoxic effect
Page Number : 139
Adviser : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca karşılaştığım zorluk ve sıkıntılara çözüm bulmamda bana yön veren, tez çalışmalarının gerçekleşmesi için maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a,

Tez çalışmalarım süresince bitkileri toplamama ve teşhis etmeme yardımcı olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mecit VURAL'a,

Deneysel çalışmalarım süresince bana yol gösteren, bazı sitotoksik aktivite çalışmaları için laboratuvar imkanlarını kullanmama izin vererek tez çalışmalarımın hızlanmasına yardımcı olan çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ferit AVCU'ya,

Tez savunma jürimde bulunarak tezin değerlendirilmesinde önemli katkılar sağlayan sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK ve Sayın Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na

Doktora süresince bana destek olan çalışma arkadaşlarım Sayın Bil. Uzmanı Biyolog Filiz Sezen BİRCAN, M. Pınar ELÇİ ve Meral SARPER'e ve Sayın Biyolog Yağmur ÖNER ve Z. Betül ÇELİK'e,

Tezin gerçekleşmesinde en önemli role sahip olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyerek benim bugünlere gelmemi sağlayan aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM....

Ayrıca, tezin yapılmasında 05/2012-66 kodlu proje ile maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. <i>Asteraceae (Compositae)</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	7
2.2. <i>Achillea</i> Cinsi Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.3. Türkiye’de Tedavi Amaçlı Kullanılan <i>Achillea</i> Türleri.....	9
2.4. <i>Achillea teretifolia</i> Willd.....	10
2.5. <i>Achillea teretifolia</i> Willd.’ın Teşhis Anahtarı.....	11
2.6. <i>Achillea teretifolia</i> Willd.’ın Sistematigi.....	15
2.7. Bazı <i>Achillea</i> Türleriyle Yapılan Biyolojik Etki Çalışmaları.....	15
2.7.1. Bazı <i>Achillea</i> türlerinin antimikrobiyal etkileri.....	15
2.7.2. Bazı <i>Achillea</i> türlerinin antioksidan etkileri.....	17
2.7.3. Bazı <i>Achillea</i> türlerinin sitotoksik etkileri.....	18
2.8. Antioksidanlar.....	20
2.8.1. İnsanda serbest radikallere karşı savunma sistemleri.....	21

Sayfa

2.8.2. Bitkilerde Bulunan Antioksidan Maddeler	23
2.9. Kanser.....	27
2.9.1. Prostat kanseri.....	28
2.9.2. Meme kanseri.....	30
2.9.3. Serviks (Rahim Ağzı) kanseri.....	32
2.9.4. Kanser ve antioksidanlar.....	33
2.10. Apoptoz.....	35
2.10.1. Kaspazlar.....	36
2.10.2. Apoptozun oluşum mekanizmaları.....	37
2.10.3. Apoptoz ve kanser.....	41
2.10.4. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	42
3. MATERYAL VE METOT.....	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Bitki.....	46
3.1.2. Mikroorganizmalar.....	47
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	47
3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	48
3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	48
3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre dizileri.....	50
3.2. Metot.....	50
3.2.1. Bitkinin kurutulması.....	50
3.2.2. Bitki özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi.....	51
3.2.3. Bitki özütlerinin antioksidan etkilerinin belirlenmesi.....	52
3.2.4. Bitki özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	54
3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi.....	56
3.2.6. Hücre ölümünün propidyum iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi.....	57

	Sayfa
3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi.....	57
3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi ($\Delta\psi_m$).....	57
3.2.9. Protein izolasyonu.....	57
3.2.10. Western blotlama.....	58
3.2.11. İstatistiksel analiz.....	59
4. DENEYSEL BULGULAR.....	60
4.1. Özütlerin % Verimleri.....	60
4.2. Özütlerin Antimikrobiyal Etkileri.....	60
4.2.1. Agar kuyucuk yöntemi.....	60
4.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sonuçları.....	67
4.3. Özütlerin Antioksidan Etkileri.....	68
4.3.1. DPPH yöntemi.....	68
4.3.2. Toplam fenolik içerik tayini.....	70
4.4. Özütlerin Sitotoksik Etkileri.....	71
4.4.1. Özütlerin prostat kanserli hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi.....	71
4.4.2. Özütlerin insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	79
4.4.3. Özütlerin HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	85
4.5. Özütlerle Muamele Edilen HeLa ve MCF-7 Hücrelerinin Sağ Kalım Eğrilerinin Belirlenmesi.....	87
4.6. Özütlerle Muamele Edilen HeLa Hücrelerinin Floresan Boyamaları.....	89
4.6.1. Propidium iyodür (PI) boyama.....	89
4.6.2. DAPI boyama.....	93
4.6.3. DiOC ₆ boyama.....	96

	Sayfa
4.7. Western Blotlama.....	100
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR.....	117
EKLER.....	132
EK-1.....	133
ÖZGEÇMİŞ.....	135

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Antioksidan içeren bazı gıdalar.....	22
Çizelge 2.2. Antioksidan vitaminlerin en iyi gıda kaynakları.....	22
Çizelge 4.1. <i>A. teretifolia</i> özütlerinin % verimleri.....	60
Çizelge 4.2. 25 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları antimikrobiyal zon çapları (mm).....	63
Çizelge 4.3. 50 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları antimikrobiyal zon çapları (mm).....	64
Çizelge 4.4. 100 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdukları antimikrobiyal zon çapları (mm).....	65
Çizelge 4.5. Metanol özütünün MİK değerleri.....	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Prostat kanserinin evrelendirilmesi.....	29
Şekil 2.2. İnsan papilloma virüsü.....	32
Şekil 2.3. Memeli hücrelerinde görülen iç ve dış apoptotik yollar.....	39
Şekil 2.4. Islak kapillar blotlama.....	45
Şekil 4.1. Bitki özütlerinin DPPH süpürücü aktivitesi.....	68
Şekil 4.2. Özütlerin ve standartların (BHT, AA ve α -tokoferol) DPPH süpürücü aktivite için IC ₅₀ değerleri.....	69
Şekil 4.3. Gallik asit eşdeğer eğrisi.....	70
Şekil 4.4. Bitki özütlerinin fenolik içerik miktarları.....	71
Şekil 4.5. 0,01-25 μ g/ml konsantrasyonları arasında su ve metanol özütlerine maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı.....	73
Şekil 4.6. 50-450 μ g/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı (Çizgi grafik).....	74
Şekil 4.7. 50-450 μ g/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı (Bar grafik).....	74
Şekil 4.8. 0,6-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı (Çizgi grafik).....	75
Şekil 4.9. 0,6-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı (Bar grafik).....	75
Şekil 4.10. 50-450 μ g/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF'nin nispi hücre canlılığı (Çizgi grafik).....	81
Şekil 4.11. 0,1-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan HGF hücrelerinin nispi hücre canlılığı (Bar grafik).....	82

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF, DU145 ve PC-3 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı (Çizgi grafik).....	83
Şekil 4.13. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF, DU145 ve PC-3 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı (Bar grafik).....	84
Şekil 4.14. 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol ve su özütlerine maruz kalan HGF, HeLa ve MCF-7 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı (Çizgi grafik).....	85
Şekil 4.15. 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol ve su özütlerine maruz kalan HGF, HeLa ve MCF-7 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı (Bar grafik).....	86
Şekil 4.16. Özütlerin varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği.....	87
Şekil 4.17. Özütlerin varlığında tripan mavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin sağ kalım grafiği.....	88

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>A. teretifolia</i> Willd.'ın fotoğrafı.....	10
Resim 3.1. <i>A. teretifolia</i> Willd.'ın arazide çekilen fotoğrafı.....	46
Resim 4.1. 25 mg/ml metanol özütünün <i>B. cereus</i> bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi.....	66
Resim 4.2. 50 mg/ml metanol özütünün <i>B. cereus</i> bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi.....	66
Resim 4.3. 100 mg/ml metanol özütünün <i>B. cereus</i> bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi.....	66
Resim 4.4. PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı.....	78
Resim 4.5. 50 µg/ml metanol özütü varlığında PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı.....	78
Resim 4.6. 450 µg/ml metanol özütü varlığında PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı.....	78
Resim 4.7. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.....	90
Resim 4.8. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	90
Resim 4.9. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	90
Resim 4.10. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	90
Resim 4.11. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	91
Resim 4.12. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	91

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	91
Resim 4.14. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	91
Resim 4.15. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	92
Resim 4.16. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi	92
Resim 4.17. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	92
Resim 4.18. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	92
Resim 4.19. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi	94
Resim 4.20. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi	94
Resim 4.21. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi	94
Resim 4.22. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi	94
Resim 4.23. Metanol özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	95
Resim 4.24. Metanol özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi.....	95
Resim 4.25. Su özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	95
Resim 4.26. Su özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi.....	95

Resim	Sayfa
Resim 4.27. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.....	97
Resim 4.28. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi.....	97
Resim 4.29. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.....	97
Resim 4.30. DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	97
Resim 4.31. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi	98
Resim 4.32. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi.....	98
Resim 4.33. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.....	98
Resim 4.34. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	98
Resim 4.35. Su özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.....	99
Resim 4.36. Su özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi.....	99
Resim 4.37. Su özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.....	99
Resim 4.38. Su özütü ile muamele edilen DiOC ₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi.....	99
Resim 4.39. PARP ve Kaspaz-9 protein bantlarının Western blotlama yöntemi ile gösterimi.....	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat derece
A	Absorbans
g	gram
kDa	kilo Dalton
mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
α	alfa
μ g	mikrogram
μ l	mikrolitre
μ M	mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

AA	Askorbik Asit
AİP	Apoptoz İnhibitör Proteini
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DiOC ₆	3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil

Kısaltmalar**Açıklama****DSÖ**

Dünya Sağlık Örgütü

DU145

Androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizisi

EDTA

Etilen diamin tetra asetik asit

ER

Endoplazmik Retikulum

FBS

Fetal Bovine Serum

FSH

Folikül Stimüle Edici Hormon

HeLa

Serviks kanseri hücre dizisi

HGF

İnsan gingival fibroblast hücre dizisi

HPV

İnsan papilloma virüsü

IC₅₀

%50 İnhibisyon konsantrasyonu

MCF-7

Meme kanseri hücre dizisi

MIK

Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

MMP

Mitokondri membran potansiteli

MDMG

Mitokondri dışı membran geçirgenliği

MTT3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolyum
bromid**PARP**

Poli (ADP riboz) polimeraz

PBS

Fosfat tampon çözeltisi

PC-3

Androjen bağımsız prostat kanseri hücre dizisi

PI

Propidyum İyodür

ROT

Reaktif oksijen türleri

SD

Standart sapma (standart deviation)

SDS

Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGESodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel
elektroforezi

1. GİRİŞ

Türkiye değişik iklim ve ortam koşullarına sahip olması ve üç floristik bölgenin birleştiği bir kesimde bulunması nedeniyle bitki türü bakımından Avrupa ülkelerine göre daha zengin bir ülkedir [Baytop, 1999]. Güney Avrupa ile Güney Batı Asya floraları arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşma merkezinin Anadolu oluşu, muhtemelen ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşma ile ilgili olarak tür endemizminin yüksek oluşu bu zenginliğin diğer nedenlerini oluşturmaktadır [Dağcı ve ark., 2002]. Türkiye’de bulunan doğal bitki türü sayısı 10 754 civarında olup bu bitkilerin 3,708’i endemiktir (endemizm oranı %34,8) [Cosge ve ark., 2009].

Gelişmekte olan çoğu ülke ile birlikte Türkiye’de geleneksel bitkisel ilaçların yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Türkiye’de bitkisel ilaç çalışmaları ile ilgili çeşitli kayıtlar mevcuttur. Bugüne kadar insan sağlığı için kullanılan bitkisel ilaçların sadece %25’i 10 000 çiçekli bitki türünden elde edilmiştir [Ulukanlı ve ark., 2005].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya popülasyonunun yaklaşık %80’inin öncelikli sağlık ihtiyaçlarını geleneksel bitkisel ilaçlardan karşıladığını tahmin etmektedir [Kumar ve ark., 2006]. Dünya’daki 250 000 çiçekli bitki türlerinden 20 000’den fazlası (%10) şifalı bitki olarak sınıflandırılmaktadır. Doğadan insanlar tarafından toplanan bu bitkiler dünyada sağlığın korunmasında temel bir faktördür [Cosge ve ark., 2009]. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [Toroğlu ve ark., 2006]. Bunların çoğu geleneksel olarak kullanılan ilaç ve insektisitlerin ana kaynağını oluşturmaktadır [Çetin ve ark., 2006]. Özellikle bitkilerin yağları ile kök, yaprak, dal ve çiçeklerinden elde edilen özütleri ham ve işlenmemiş gıda koruması, alternatif ilaç ve doğal tedaviler için kullanılmaktadır. Ayrıca bitki özütleri kozmetik ve parfümeri endüstrilerinde de çok önemlidir [Çetin ve ark., 2006; Benli ve ark., 2007]. Türkiye’de gıda, baharat veya ilaç olarak kullanılan yabani bitkilerin sayısı 500 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu miktarın Avrupa ülkelerinde kullanılan tıbbi bitki miktarı ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu

görülmektedir. Örneğin Fransa’da bilinen tıbbi bitki miktarı 1500 kadardır [Baytop, 1999].

Türkiye’de tıbbi bitkiler hastalıkların tedavisinde önemli bir role sahiptir [Kültür, 2007]. Tıbbi bitkiler yüzyıllardır aktif biyomoleküllerin önemli bir kaynağını oluşturmakta ve drog olarak kullanılan kısımları (yaprak, çiçek, tohum, kök, kabuk vs.) içlerindeki etkili bileşikler nedeniyle hastalıkları iyileştirmektedir [Baytop, 1999; Dulger ve Gonuz, 2004]. Birçok hastalığı tedavi etmek ve önlemek için bunların düşük yan etkileri ve yararlı özelliklerinden dolayı tıbbi bitkilerin kullanımı dünya çapında artmaktadır. Tıbbi bitki ürünlerinin kimyasal kompozisyonlarına olan ilgi beslenmede ve biyokimyasal araştırmalarda bunların kullanımlarını daha da arttırmaktadır [Başgel ve ark 2006]. Bitki kökenli ilaçlar özellikle gelişmekte olan ülkelerde bazı hastalıklarla savaşmak için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Yaygın hastalıkları (soğuk algınlığı vb.) tedavi etmek için dünya popülasyonunun yaklaşık %60-80’i hala geleneksel bitkisel ilaçlara dayanmakta ve sanayileşmiş toplumlarda geleneksel bitkisel ilaçların kullanımına yönelik artan bir güven gözlenmektedir [Mothana ve ark., 2010; Uysal ve ark., 2010].

Son yıllarda sentetik kökenli ilaçların yan etkilerinin fazla olması, özellikle antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı organizmaların direnç oluşturmaları gibi sebepler doğal bitkisel kaynakların önemini daha da çok arttırmıştır [Dağcı ve ark., 2002]. Bitkisel materyaller eski medeniyetlerden beri enfeksiyon hastalıklarını içeren hastalıklarla savaşmak için önemli bir kaynak olarak değişmeden kalmaktadır [Doğan ve ark., 2010]. Klasik klinik uygulamalar bitki yağlarının sistit, intestinal enfeksiyonlarını iyileştirmek ve çocukların kulak enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanımını içermektedir. Yaygın şekilde gıda olarak kullanılan bazı bitkilerin de antimikrobiyal etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Örneğin, *Allium sativum* (sarımsak) standart antibiyotiklerle kıyaslanabilen bir antimikrobiyal etki göstermektedir [Abascal ve ark., 2002].

Araştırmacılar bakteri, fungi, virüs ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarına karşı geniş spektrumlu yeni antibiyotikleri geliştirmek için uzun

yıllardır çalışmaktadırlar. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı ilaç direncinin oluşumuna neden olmaktadır [Karaalp ve ark., 2009]. İnsana yönelik patojen mikroorganizmalardaki çoklu ilaç direnci enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan ticari antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel alınmasına bağlı olarak gelişmektedir. Bu nedenle bilim adamları çoklu direnç geliştiren bakterilere karşı yeni antimikrobiyal maddeler geliştirmeye çalışmaktadır [Doğan ve ark., 2010]. Benzoin ve emetin gibi mikroorganizmaların üremesini engelleyen yeni bileşikler bitkilerden izole edilmektedir. Bitkilerden elde edilen antimikrobiyal bileşikler şu an kullanılan antibiyotiklerden farklı bir mekanizmayla bakterilerin üremesini engellemektedir [Eloff 1998; Talib ve ark., 2010]. Bu nedenle son yıllarda bitkiler ile ilgili araştırmalarda önemli bir artış vardır [Eloff 1998]. Birçok çalışma ile bitkilerin *in vitro* mikrobiyal direnci gidermekte olduğu ve antibiyotiklerle sinerjik olarak etkileştiği gösterilmiştir [Abascal ve ark., 2002].

Son birkaç yıldır, tıbbi bitkilerin ve özütlerinin antioksidan ve radikal süpürücü özelliklerine olan ilgi de büyük bir oranda artmaktadır. Antioksidanların ekzojen kaynağını sağlayan bitkiler, hücrelerin doğal savunma sistemlerine yardımcı olabilmektedir. Bu yüzden, geleneksel olarak geniş çapta kullanılan bitkilerin ve bitki özütlerinin antioksidan ve radikal süpürücü özelliklerinin değerlendirilmesi gerekir [Giorgi ve ark., 2009]. Ayrıca işlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianizol (BHA) gibi bazı sentetik antioksidan bileşiklerin yan etkilere sahip olabileceği rapor edilmiştir [Mavi ve ark., 2004; Unal ve ark., 2008]. Antioksidanca zengin besinlerin diyetle alımı ile insanlarda görülen birçok hastalığın meydana gelme sıklığı arasında zıt bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Bu yüzden, doğal antioksidan kaynaklarının belirlenmesi ile ilgili araştırmalar önem taşımaktadır [Mavi ve ark., 2004].

Antioksidanlar vücutta bulunan özellikle serbest radikal gibi bazı toksik maddelerin oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Beta karoten, askorbik asit ve α -tokoferol gibi antioksidanların, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu önlediği kanıtlanmıştır [Serteser ve ark., 2009].

İnsan dahil tüm aerobik organizmalar oksidatif hasara karşı koruyucu olan antioksidan savunmaya sahiptir [Mavi ve ark., 2004]. Enzimatik (Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) ve enzimatik olmayan (glutatyon, vitamin C ve E) antioksidan savunma sistemleri oksidanların ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, güçlü antioksidan içeren gıdaların reaktif oksijen türleri (ROT)'nin neden olduğu düzensizliklere karşı potansiyel koruyucu bir etki gösterdiğini belirtmektedir. Antioksidanlar ROT'leri ortadan kaldırmakta veya oksidatif zincir reaksiyonunun başlaması veya çoğalmasını erteleyebilmektedir. Reaktif oksijen türleri protein, DNA ve lipid gibi temel biyomoleküllerin yüksek oranda hasarına neden olmaktadır. Bu yüzden antioksidanlar reaktif oksijenlerin neden olduğu bu hasarı tamir edebilmekte veya önleyebilmektedir [Ardestani ve Yazdanparast, 2007; Esmaili ve ark., 2010].

İnsan vücudundaki antioksidan sistemlerin önemli bir kısmı beslenme içeriğine bağlıdır [Ebrahimzadeh ve ark., 2009]. Antioksidanlar geniş çapta çeşitli meyve ve sebzelerde, bitki özütlerinde, meşrubatlarda, şifalı bitkilerde, baharat ve yarı sentetik ürünlerde bulunmaktadır [Reddy ve ark., 2003]. Doğal antioksidanlarca zengin gıdaların tüketimi, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ile ilişkilendirilmiştir [Kratchanova ve ark., 2010].

Bitkiler hastalıkları tedavi etme potansiyeline sahip olan birçok biyoaktif sekonder metabolitin zengin kaynaklarıdır. Bu metabolitlere örnek olarak flavonoidler, fenoller, fenolik glikozitler, doymamış laktonlar, sülfür bileşikler, saponinler, glukozinolatlar ve siyanogenik glikozitler verilebilir [Talib ve ark., 2010]. Fenolik bileşikler, bitki aleminde geniş oranda bulunan ve gıda, kozmetik ve farmosötikal endüstrilerde çoklu uygulamalara sahip olan sekonder bitki metabolitlerinin geniş bir heterojen grubunu oluşturmaktadır [Banerjee ve Bonde, 2011]. Antioksidan aktiviteye sahip tipik fenolik bileşikler büyük oranda fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Kafeik asit, ferulik asit ve vanilik asidi içeren fenolik asitler, bitki aleminde yaygındır [Spiridon ve ark., 2011]. Fenolik bileşikler tarafından sahip olunan antioksidan kapasite esas olarak, bunların indirgeyici ajanlar olarak rol oynamalarına izin veren redoks özelliklerine, hidrojen verilerine, singlet oksijen bastırıcılarına veya

metal şelatörlerine bağlıdır. Antioksidanlar olarak rol oynamalarının yanısıra, bu bileşikler antialerjik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antitrombotik, kardioprotektif ve vazodilatör etkiler gibi geniş çaplı tıbbi özellikler sergilemektedir [Banerjee ve Bonde, 2011].

Doğal ürünler, ilaç hammaddelerinin zengin kaynaklarıdır. Çeşitli yapıdaki birçok yeni doğal bileşik bitkilerden izole edilmektedir. Şu an kullanılabilir ilaçların %50'den fazlası doğal bileşiklerdir ve kanser durumunda ise bu oran %60'dan daha fazladır. Bu durum ilaç firmaları ve yeni ilaç araştırmalarına kendini adanmış enstitülerin artan ilgilerinden kaynaklanmaktadır [Gordaliza, 2007].

Türkiye'de bitkisel tedavilere olan ilgi hızlı bir şekilde artmaktadır. Bitkisel karışımlar geleneksel Türk ilacının çok önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada, 550 sağlıklı yetişkinde şifalı bitki kullanımının yaygınlığı %72,5 olarak tespit edilmiştir. Tıbbi bitkiler (özellikle *Urtica dioica*) kanser hastaları arasında sıklıkla hastalığa çare olarak kullanılır ve Türkiye'deki en popüler alternatif kanser tedavisidir [Gözüm ve Ünsal, 2004].

Çeşitli bitki kökenli bileşikler başarılı bir şekilde hala kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae) bitkisinden elde edilen *Vinca* alkaloidleri içeren vinblastin (Velban®) ve vincristin (Oncovin®), lignan türevleri olan etoposid ve teniposid verilebilir [Rocha ve ark., 2001; Mesquita ve ark., 2009; Sardari ve ark., 2009; Junior ve ark., 2010]. Son zamanlarda antikanser ilaçlara karşı oluşan bir direnç söz konusudur. Bu yüzden daha etkili ve daha az toksik ilaçların farmasötikal sanayi tarafından araştırılması ve geliştirilmesi gerekli olmaktadır. Diyetle veya tıbbi bitkilerden alınan birçok maddenin ve kanseri engelleyici ve antitümöral ajanların birçok deneysel karsinogenez modelinde etkili olduğu bilinmektedir [Russo ve ark., 2005].

Bu tez çalışmasında *Achillea teretifolia* Willd. bitkisinin biyolojik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için bitkinin su ve metanol özütlerinin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. Özütlerin 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyondaki antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk, antioksidan etkileri 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) süpürücü aktivite ve Folin-Ciocalteu reaktifli fenolik içerik tayini yöntemleriyle araştırılmıştır. Özütlerin sitotoksik etkileri androjen bağımsız prostat (DU145, PC-3), meme (MCF-7), serviks kanseri (HeLa) ve insan gingival fibroblast (HGF) hücre dizilerinde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) yöntemiyle incelenmiştir. Hücre kültüründe yüksek sitotoksik etkili özüt/özütlerin kanser hücre dizileri üzerine farklı süredeki sağ kalımlarına bakılmıştır. Mevcut sitotoksik etkinin kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyip tetiklemediğini araştırmak amacıyla propidyum iyodür (PI), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 3',3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC₆) floresan boyama yöntemleri kullanılmıştır. Son olarak da Western Blotlama yöntemiyle apoptotik yolağın önemli biyomarkırları olan aktif poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) ve kaspaz-9 proteinlerinin mevcudiyeti araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Asteraceae (Compositae)* Familyasının Genel Özellikleri

Asteraceae Angiospermilerin en geniş familyalarından biridir. Son sınıflandırmaya göre 4 alt familyaya ve 17 tribusa ayrılmaktadır. Amerika'nın Güneybatısı, Meksika, Güney Brezilya, Orta ve Güneybatı Asya ve Avustralya'ya kadar uzanan çeşitli bölgelerde geniş çapta yayılış göstermektedir. Familyanın coğrafik orijininin filogenetik olarak Güney Amerika olduğu kabul edilmektedir. Bugüne kadar familya içerisinde 1535 cins ve 26 000 tür rapor edilmiştir [Dogan ve ark., 2009].

Asteraceae familyası Türkiye Florası'na göre 136 cins ve 1195 tür ile temsil edilmektedir. Buna göre hem tür hem de cins bakımından floramızın en zengin familyasıdır. Familyanın tür sayısı bakımından en büyük cinslerini; *Centaurea* L. (180 tür), *Hieracium* L. (103 tür) ve *Cirsium* Mill. (58 tür) oluşturmaktadır. *Asteraceae* aynı zamanda en çok endemik türe sahip bir familyadır. Bu familya toplam 446 endemik tür içermektedir ve endemizm oranı % 37,3'tür [Davis ve Tan, 1988; Güner ve ark., 2000; Davis, 1975].

Asteraceae (Compositae) kozmopolit bir dağılıma sahiptir. Bu familyadaki bitkilerin habitat tercihi ve yaşam formları çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik tropikal ve kurak çevrelerdeki sucül, otçul, çalimsı formları ve tropikal yağmur ormanlarındaki ağaçları içermektedir. Familyadaki bitkilerin çoğu otsudur. Çalı veya ağaç formunda olanların sayısı azdır. Bazıları süt içeren otsulardan ve nadiren tırmanıcı bitkilerden oluşur. Çeşitli özelleşmiş morfolojik karakterlerinin (kapitulum, yüksek oranda indirgenmiş ve değişmiş çiçekler, alt durumlu yumurtalıklar, birleşik anterler) bir arada bulunması familyanın doğallığını desteklemektedir. Familya bitkilerinin çoğu Compositae tipi salgı tüyü ve örtü tüyü taşır. İçerdikleri bileşikler nedeniyle bitkilerin çoğu eczacılıkta, gıda endüstrisinde ve lateksinden dolayı diğer sanayi alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca *Asteraceae* türleri sebzeler (marul, enginar, hindiba), yağ kaynakları (ay çiçeği, aspir), insektisitler (pire otu) ve bahçe süs bitkileri (krizantem, dalya, kadife çiçeği ve diğer birçok bitki) olarak geniş ekonomik

bir öneme de sahiptir [Jansen ve Palmer, 1987; Baytop, 1998; Seçmen ve ark., 2000].

2.2. *Achillea* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

Achillea L. ılıman kuşakta bulunan, *Asteraceae* (*Compositae*) familyasına ait çok yıllık bir cinstir [Davis, 1975]. Çeşitliliğinin merkezi, tüm seksiyonlarının olduğu yer olan Güney Doğu Avrupa ve Güney Batı Asya'dır. Yara iyileştirilmesinde bitkileri kullanan Achilles'den sonra isimlendirildiği için mitolojik bir geçmişe sahiptir. *Achillea* L. cinsinin yeryüzünde tanımlanan tür sayısının yaklaşık 140'a ulaştığı tahmin edilmektedir [Ünlü ve ark., 2002; Çelik ve Akpulat, 2008; Arabacı ve Budak, 2009]. Türkiye'de *Achillea* cinsi beş seksiyondan oluşan 46 türe (52 takson) sahiptir. Bunların 23'ü Anadolu'ya endemiktir [Davis, 1975; Güner ve ark., 2000; Arabacı ve Yıldız, 2006; Çelik ve Akpulat, 2008; Arabacı ve Budak, 2009]. *A. ketenoglui* H. Duman ve *A. milliana* H. Duman türleri Türkiye Florası kitabının ikinci ek cildinde (11. cilt) sonradan tanımlanmış türlerdendir [Güner ve ark., 2000]. Ayrıca Türkiye'deki türleri tip örneğinden bilinen ve sinonim olarak kabul edilen *Achillea boissieri* Hausskn. ex Boiss.'in ayrı bir tür olduğuna karar verilmiştir [Arabacı ve Yıldız, 2006]. *Achillea hamzaoglui* Arabacı&Budak ve *Achillea sivasica* Çelik & Akpulat türleri de literatürde yayınlanan yeni türlerdir [Çelik ve Akpulat, 2008; Arabacı ve Budak, 2009].

Achillea L. Dünya çapında geniş dağılımlı ve eski çağlardan beri kullanılan bir tıbbi bitkidir. *Achillea* türlerinin fitokimyasal araştırmaları bu cinsten elde edilen birçok bileşiğin yüksek oranda biyoaktif olduğunu ortaya çıkarmıştır. *Achillea* türlerinin büyük bir çoğunluğu tedavi edici uygulamalara sahiptir. Bu türler Anadolu'nun en önemli ekonomik bitkileridir [Saeidnia ve ark., 2011]. Bazı *Achillea* türleri çeşitli amaçlar için halk ilacı olarak kullanıldığından dolayı etnofarmakolojik bir öneme de sahiptir [Ünlü ve ark., 2002]. Bazı türlerden hazırlanan bitki çayları çok sıklıkla diüretik, abdominal ağrı için, diareye karşı, mide gazı ve menstrasyonu düzenleyici, yara iyileştirme amacıyla kullanıldığı ve bu türlerin uçucu yağlarının ve çeşitli özütlerinin antiinflamatuvar, analjezik, antimikrobiyal, antioksidan, spazmolitik,

insan eritrosit ve lökosit koruyucu, hemostatik, digestif ve kolagog etkileri olduğu rapor edilmiştir [Küpeli ve ark., 2007; Akkol ve ark., 2009; Demirci ve ark., 2009]. Ayrıca *Achillea* türleri kozmetikte güzel koku üretiminde, tarımda bitki korumada kullanılmaktadır [Akkol ve ark., 2009].

2.3. Türkiye’de Tedavi Amaçlı Kullanılan *Achillea* Türleri

Achillea cinsinin, halk arasında en yaygın ve en geniş kullanıma sahip birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılan türü *Achillea millefolium*’dur. Anadolu’da oldukça yaygın yetişen *A. millefolium* halk arasında, ağrı kesici, kas gevşetici, sindirimi kolaylaştırıcı, diüretik, antiseptik, iştah açıcı, gaz söktürücü, adet söktürücü ve hemoroid tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. *A. millefolium* anti-inflamatuar etkisi sebebi ile halk arasında yara iyileştirici olarak kullanılmıştır. Ayrıca gastrit, böbrek ve karaciğer bozukluklarına karşı oldukça etkilidir. Bitki içerisinde bulunan achillein isimli acı madde, kanamayı durdurucu etki göstermektedir ve yapraklarından elde edilen özüt, patojenlerin gelişimini engellemektedir [Baytop, 1999; Popovic ve ark., 2002; Candan ve ark., 2003; Applequist ve Moerman, 2011].

Türkiye’de *A. aleppica* DC. (Yılan çiçeği), *A. armenorum* Boiss. et Hausskn. (Baytaran), *A. biebersteinii* Afan. (Pire otu, Sarı civanperçemi), *A. kotschy* Boiss, *A. multifida* (DC.) Boiss. (Ebülmülük), *A. nobilis* L. (Ayvadana, Ayıdanası, Kurtotu), *A. setacea* Waldst. Et Kit. (Tilkikuyruğu, Yılandili), *A. wilhelmsii* C. Koch., *Achillea phrygia* Boiss. et Ball, *Achillea vermicularis* Trin. tedavi amaçlı kullanılan diğer *Achillea* türleridir [Baytop, 1999; Küpeli ve ark., 2007].

2.4. *Achillea teretifolia* Willd.

Çok yıllık, 20-35 cm boyunda, gövde yuvarlak, boyuna çizgili, yatık-tomentos tüylü veya tüysüz. Yapraklar dağınık tüylü, şeritsi-ipliksi, eğri büğrü, orta yapraklar, 15-30 x 0.5-1 mm, tüsü parçalı, parçalar kiremitvari dizili, bölünmemiş veya nadiren 3 loblu, 0.5 x 0.3 mm, dişçikli. Kapitullar (başçık şeklindeki çiçek durumu) 10-40 adet ve şemsiyemsi, korimboz 3-7 cm eninde. Kapitula sapı 4-13 mm. Involukrum (brakte topluluğu) yuvarlaksı, tabanda çukurcuklu, 3-5 mm boyunda ve eninde. Fillariler yumurtamsı-mızraksı, hafifçe sivri veya kör uçlu, dağınık tüylü, iç fillariler darca şeffaf kenarlı. Dilsî çiçekler 5-7 adet, beyaz renkli, 2-3 mm, tüpsü çiçekler 20-45 adet, sarı renkli. Step, kayalık yamaçlar, konifer ormanları, subalpin çayırlar ve 900–2150 m yüksekliklerde yetişir [Resim 2.1.]. Çiçeklenme zamanı haziran-temmuz aylarıdır. İç Anadolu, Güney ve Güneydoğu Anadolu’da yayılış gösterir ve İran-Turan elementine ait endemik bir türdür [Davis, 1975; Ertekin, 2002].



Resim 2.1. *A. teretifolia* Willd.'in fotoğrafı A. Genel görünüşü, B. Yaprak, C. Korimbus, D. Çiçekler [Arabacı, 2006].

2.5. *Achillea teretifolia* Willd.'ın Teşhis Anahtarı

A. teretifolia Willd.'ın Türkiye Florası'na göre teşhis anahtarı aşağıdaki gibidir [Davis, 1975].

1. Yapraklar bölmesizden 3–4-pinnatisekte kadar, linear, lanseolat ve oblongtan genişçe ovata kadar; segmentler ne transvers ne imbrikat

A Grubu

2. Yapraklar 1–2-pinnatisekt, filiform ya da linear, nadiren daha geniş (linear-oblong; *A. armenorum*); segmentler küçük, transvers, imbrikat ya da biraz ayrı

B Grubu

A Grubu

1. Yapraklar tam, oblongdan linear-lanseolata kadar

2. Dilsî çiçekler 7–8 (-10), dilsî çiçekler beyaz, 4–8 mm

1. *biserrata*

2. Dilsî çiçekler 4–5 (-9), dilsî çiçekler sarı, 1–1,5 mm

8. *sieheana*

1. Yapraklar pinnatifitten pinnatisekte kadar

3. Gövdenin orta kısmındaki yapraklar oblongdan geniş ovata kadar 8–20 × 3–7 cm

4. Birincil segmentler her kenarda 10–15 adet; dilsî çiçekler 2–4, sarı, 0,7–1 mm

36. *filipendulina*

4. Birincil segmentler her kenarda 4–6 tane; dilsî çiçekler 4–5, beyaz, 1,5–2,5 mm

30. *grandifolia*

3. Gövdenin orta kısmındaki yapraklar lineardan oblong-ovata kadar, 5×3 cm'den daha büyük değil

5. Korimbus seyrek; kapitulümler 4–20 (*A. latiloba*'da 80'e kadar), pedunkul 2,5–15 mm, dilsî çiçekler beyaz, 2–5 mm

6. Gövdenin orta kısmındaki yapraklar segment çiftli, 1-pinnatifit, 15–20 ya da daha fazla, rakis 2–3 mm genişlikte

29. *latiloba*

6. Gövdeye ait orta yapraklar 2–3-pinnatisekt, eksen 1mm'den daha geniş değil

7. Yapraklar seyrek, kalkık tüylü 3. *multifida*

7. Yapraklar sık, basık, ipeksi-tomentos 2. *fraasii* var. *troiana*

5. Korimbus sık, kapitula çok sayıda (20-) 50–150 ve daha fazla, pedinkul 1-4 mm, dilsî çiçekler beyaz ya da sarı, 0,5–2 mm

8. Yapraklar sık, basık ya da $\pm$ basık, yünsü ya da ipeksi-tomenyos; dilsî çiçekler sarı, 0, 5–1 mm

9. Bazal yapraklar basık, yünsü-tomentos, birincil segmentler dişli ya da loblu, 1–2 x 0,5–1 cm

37. *clypeolata*

9. Bazal yapraklar $\pm$ basık ipeksi-tomentos, birincil segmentler pinnatisekt, 0,2–0,7 x 0,1–0,4 cm

38. *coarctata*

8. Yapraklar seyrek, basık ya da $\pm$ sık, kalkık, ipeksi ya da tomentos değil; dilsî çiçekler sarı ya da beyaz, 0,8–2 mm

10. Dilsî çiçekler altın sarısı

11. Yapraklar $\pm$ homomorfik, bazal yapraklar gövde yapraklarına benzer, uç segmentler kılçıklı ya da linear, 1–6 x 0,2–1 mm, rakis 1mm kadar genişlikte

39. *biebersteinii*

11. Yapraklar heteromorfik, bazal yaprakların son lobları 4 x 0,3–0,8 mm kadar genişlikte, gövdenin üst yaprakları geniş, loblu ya da 1-pinnatisekt, segmentler 10 x 1,5–4 mm kadar, rakis 2–4 mm genişlikte

40. *cappadocica*

10. Dilsî çiçekler yüzde beyaz ya da alt yüzü beyaz, üst yüzü krem ya da soluk sarı

12. Dilsî çiçekler her iki yüzde beyaz

13. Yapraklar heteromorfik, bazal yaprakların uç segmentleri ve/veya rakis gövde yapraklarınınkinden belirgin olarak dar

14. Gövde tabanda stolonlu; bazal yapraklar 2–3-pinnatisekt, rakis genellikle dişli; gövdenin orta kısmındaki yapraklar oblong-ovat, 2–3 x 1–2 cm

34. *kotschy*

14. Gövde tabanda stalonsuz; bazal yapraklar 2-pinnatisekt, rakis dişli değil; gövdenin orta kısmındaki yapraklar linear-oblong, 3–7 x 1–2 cm

33. *crithmifolia*

13. Yapraklar homomorfik, bazal yaprakların son lobları gövde yapraklarına benzer

15. Yaprakların uç segmentleri akuminat, kılçıksız, 0,1–0,3 (0,5) mm genişlikte, genellikle sık; dilsî çiçekler 1–1,2 mm; involukrum 3–4,5 x 1,5–3 mm

32. *setacea*

15. Yaprakların uç segmentleri mukronat, dar oblong, 0,2–0,5 mm genişlikte, sık değil; dilsî çiçekler 1,5–2,5 mm; involukrum 4–5,5 x 2,5–4 mm

31. *millefolium*

12. Dilsî çiçekler üst yüzeyde krem ya da soluk sarı

16. Gövdenin orta kısmındaki yapraklar linear-oblong, 3–7 x 1–2 cm, birincil segmentler düzensiz bölünmüş, rakis dişli değil

33. *crithmifolia*

16. Gövdenin orta kısmındaki yapraklar oblong-ovat, 2–5 x 1–3 cm, birincil segmentler ± düzenli 1-pinnatifitten 1-pinnatisekte kadar, rakis genellikle dişli

35. *nobilis*

B Grubu

1. Dilsî çiçekler 8–15, 4–12 mm

2. Dilsî çiçekler sarı

3. İnvolum 9–10 x 10–15 mm; fillariler geniş saydam kenarlı

4. *membranacea*

3. İnvolum 4–6 x 4,5–10 mm; fillariler dar saydam kenarlı

6. *oligocephala*

2. Dilsî çiçekler beyaz ya da krem rengi (genellikle kuruduklarında ise soluk sarı)

4. Gövde 1-kapitulalı; dilsî çiçekler 6–8 mm

7. *sipikorensis*

4. Gövde 1–3-kapitulalı; dilsî çiçekler 4–4,5 mm

5. *brachypylla*

1. Dilsî çiçek 3–8, genellikle 4–6 (*A. armenorum*'da nadiren 10 ya da *A. monocephala*'da 14 kadar), 0,5–4,5 mm, genellikle 1–3 mm

5. İnvolükrum oblong-silindirik, boyu eninin yaklaşık 2 katı

6. En alttaki fillariler triangular-ovattaan lanseolata kadar, basık tüylü

21. *aleppica*

6. En alttaki fillariler subulat, lineardan linear-lanseolata kadar, $\pm$ kalkık tüylü

22. *pseudoaleppica*

5. İnvolükre oblong-ovoidden yarıküresele kadar, boyu eninin 1,5 katından fazla değil

7. Gövde derin oluklu; dilsî çiçekler sarı

8. İnvolükrum yarıküresel ya da biraz basık, 5–6 x 6–8 mm

17. *magnifica*

8. İnvolükrum ovattan yarıküresele kadar, 3–4,5 x 2,5–4 (5) mm

9. Yapraklar seyrek düzenlenmiş, imbrikat değil, linear-lanseolat, basit ya da 3 parçalı, segmentler kuspilat, tam kenarlı

18. *tenuifolia*

9. Yapraklar sık ya da seyrek, imbrikat, 3 parçalı, segmentler oblongdan lanseolata, kenarlar dentrikulate

16. *lyconica*

7. Gövde yuvarlak, boyuna çizgili, oluklu değil, dilsî çiçekler beyaz ya da sarı

10. Dilsî çiçekler beyaz ya da krem rengi (*A. spinulifolia*'da genellikle kurduğunda soluk sarı)

11. Dilsî çiçekler 8–10; yapraklar linear oblong, 0,5–1 cm

25. *armenorum*

11. Dilsî çiçekler 5–8; yapraklar linear, 1–4 cm

12. Korimbler genellikle 10–40 kapitulumlu; involükrum 3–6 mm genişlikte

13. Bitki narin, gövde tabanda 1,5 mm çapında; fillariler subakut ya da obtus, dar saydam kenarlı; dilsî çiçekler 1,5–3 mm

23. *teretifolia*

2.6. *Achillea teretifolia* Willd.'ın Sistematığı

Son sınıflandırma sistemlerine göre *Achillea* cinsinin sistematikteki yeri şu şekildedir [Arabacı, 2006].

Alem: Plantae
 Altalem: Tracheobionta
 Bölüm: Magnoliophyta
 Sınıf: Magnoliopsida
 Altsınıf: Asteridae
 Üsttakım: Asterales
 Takım: Asterales
 Familya: Asteraceae
 Altfamilya: Asteroideae
 Kabile: Anthemideae
 Altkabile: Achilleinae
 Cins: *Achillea*
 Tür: *A. teretifolia*

2.7. Bazı *Achillea* Türleriyle Yapılan Biyolojik Etki Çalışmaları

2.7.1. Bazı *Achillea* türlerinin antimikrobiyal etkileri

Candan ve arkadaşları, *A. millefolium subsp. millefolium* Afan.'ın metanol özütlerinin ve uçucu yağlarının antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda metanol özütlerinin suda çözünmeyen kısımlarının ya çok düşük antimikrobiyal etki gösterdiğini ya da hiç etki göstermediğini belirlemişlerdir. Buna rağmen uçucu yağın antimikrobiyal özellik gösterdiğini saptamışlardır [Candan ve ark., 2003].

Barbour ve arkadaşları, Lübnan'da yabani yetişen ve halk ilacı olarak kullanılan 27 bitki türünün farklı kısımlarından elde edilen su ve metanol özütlerinin

antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. İki farklı lokaliteden toplanan *A. damascena*'nın su özütü test mikroorganizmalarından sadece *Staphylococcus aureus* üzerinde etkili olurken, metanol özütünün *Escherichia coli* hariç tüm test mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğunu tespit etmişlerdir [Barbour ve ark., 2004].

Barış ve arkadaşları, *A. biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*) bitkisinin metanol özütü ve uçucu yağının antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Buna göre uçucu yağın 6 bakteri (*Acinetobacter baumannii*-A8, *Bacillus macerans*-A199, *Bacillus subtilis*-A57, *E. coli*-A1, *S. aureus*-A215, *S. aureus*-ATCC-29213) 14 fungus ve *Candida albicans*-A117 mayasına karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Metanol özütünde ise antimikrobiyal etki gözlememişlerdir [Barış ve ark., 2006].

Tajik ve arkadaşları, *A. millefolium* L.'nin çeşitli kısımlarının alkolik özütlerinin bazı mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör fonksiyonun potansiyelini değerlendirmişler ve bu potansiyeli penisilin ailesinden bazı antibiyotiklerle kıyaslamışlardır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar deneyde iki kategoriye ayrılmıştır. Kontrol (*S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC1730, *E. coli* ATCC 25922) ve klinik olarak izole edilen mikroorganizmalar (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*) ve 2 fungi (*Aspergillus niger* ve *C. albicans*) deneyde çalışılmıştır. Özütlere karşı en hassas mikroorganizmanın *S. aureus* suşları olduğunu tespit etmişlerdir [Tajik ve ark., 2008].

Unal ve arkadaşları Türk geleneksel ilaçlarında çeşitli hastalıklara çare olarak kullanılan, aralarında *A. biebersteinii* Afan. ve *A. millefolium* L. subsp. *millefolium* türlerinin de olduğu 25 bitkiden elde edilen çeşitli özütlerin 10 patojen bakteri ve 1 mayaya (*C. albicans*) karşı antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. *A. biebersteinii* bitkisinin metanol ve aseton özütünün *Bacillus megaterium* A59 bakterisine karşı antimikrobiyal etkili olduğunu tespit etmişler, diğer *Achillea* türünde ise bir etki gözlememişlerdir [Unal ve ark., 2008].

2.7.2. Bazı *Achillea* türlerinin antioksidan etkileri

Souri ve arkadaşları *A. wilhelmsii* C. Koch ve *A. tenuifolia* Lam. türlerinin de dahil olduğu toplam 60 bitki özütünün antioksidan etkisini incelemişlerdir. *A. wilhelmsii* türünün antioksidan etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [Souri ve ark., 2004].

Conforti ve arkadaşları *A. ligustica* All.'un çiçekli kısımlarından elde edilen özütlerin polar olmayan içeriğini ve toplam fenol miktarını çalışmışlardır. Özütün polar olmayan fraksiyonunun ana bileşiğinin triterpen moretenol (%17,228) olduğunu, bunu takiben stigmast-6-en-3 β -ol, veridiflorol ve β -amyrin (sırasıyla %7.524, %5.078 ve %4.470) bileşiklerinin de olduğunu tespit etmişlerdir. Metanol özütünün daha yüksek radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır [Conforti ve ark., 2005].

Nickavar ve arkadaşları İran'ın 6 *Achillea* türünün (*A. micrantha*. Willd Asteraceae, *A. filipendula*. Lam., *A. millefolium*. L., *A. tenuifolia*. Lam., *A. vermicularis*. Trin ve *A. wilhelmsii*. C. Koch.) (Asteraceae) etanol özütlerinin antioksidan etkilerini çalışmışlardır. Buna göre *A. micrantha* ve *A. millefolium* türlerinin doğal radikal süpürücü kaynakları olduğunu tespit etmişlerdir [Nickavar ve ark., 2006].

Barış ve arkadaşları *A. biebersteinii* Afan.'ın metanol özütleri ve uçucu yağlarının antioksidan etkilerini iki farklı yöntemle araştırmışlardır. Her iki yöntemde de özütün uçucu yağdan daha iyi antioksidan kapasite gösterdiğini tespit etmişlerdir [Barış ve ark., 2006].

Wojdyło ve arkadaşları Polonya'da yetişen aralarında *A. millefolium*'un da bulunduğu toplam 32 baharat özütünün fenolik içeriklerini ve antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Analiz edilen türlerde baskın flavonoidleri kuersetin, luteolin, apigenin, kaempferol ve isorhamnetin olarak belirlerken, ana fenolik asitleri kafeik, p-kumarik, ferulik ve neo-klorojenik asit olarak tespit etmişlerdir. *A. millefolium* türünün bulunduğu *Compositae* familyalarının en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. *A. millefolium* ve bazı türlerin

antioksidan etkisinin fenolik asitlerden özellikle kafeik ve p-kumarik asitten kaynaklandığını tespit etmişlerdir [Wojdyło ve ark., 2007].

Bozin ve arkadaşları *A. millefolium* (Adanson) Koch *s.l* türlerinin (*A. collina* Becker ex Heimerl *s.l.* ve *A. pannonica* Scheele) uçucu yağlarının *in vitro* antioksidan etkilerini serbest radikal süpürücü etki ve lipid peroksidasyonu yöntemleriyle araştırmışlardır. *A. pannonica* uçucu yağının diğerine göre daha yüksek radikal süpürücü etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Lipid peroksidasyonunda ise *A. collina* uçucu yağının daha güçlü bir antioksidan etki gösterdiğini belirlemişlerdir [Bozin ve ark., 2008].

Tarawneh ve arkadaşları içlerinde *A. fragrantissima* türünün de bulunduğu 4 tıbbi bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilen metanol özütlerinin antioksidan etkisini çalışmışlardır. Bitki özütlerinin antioksidan etki gösterdiğini ve sonuçların bu bitki türlerinin tıbbi amaçla geleneksel kullanımını kısmen desteklediğini tespit etmişlerdir [Tarawneh ve ark., 2010].

2.7.3. Bazı *Achillea* türlerinin sitotoksik etkileri

Li ve arkadaşları *Achillea millefolium* L. çiçeğinin metanol özütünden Achillinin A (2 β ,3 β -epoksi-1 α ,4 β ,10 α -trihidroksiguai-11(13)-en-12,6 α -olide,1) adlı yeni bir guaianolide izole etmişlerdir. Achillinin A'nın *in vitro* antiproliferatif etkisi beş farklı insan akciğer tümör hücre dizisi (A549, RERF-LC-kj, QG-56, PC-6 ve QG-90) üzerinde değerlendirilmiş ve cisplatin ile sonuçlar kıyaslanmıştır. Deneysel sonuçlar Achillinin A'nın A549, RERF-LC-kj ve QG-90 hücrelerine yönelik potansiyel antiproliferatif etki sergilediğini göstermiştir. Etkinin cisplatinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir [Li ve ark., 2011].

Trifunovic ve arkadaşları *A. clavennae* L. bitkisinin çeşitli kısımlarını inceleyip bu bitkiden sekiz guaianolid (1-8), üç bisabolen (9-11), dört flavonol (12-15), sesamin (lignan) ve isofraksidin (kumarin) bileşikleri elde edilmişlerdir. 2, 8, 9 ve 12

maddelerinin antiproliferatif etkileri HeLa, K562 ve Fem-X insan kanser hücre dizileri üzerine test edilmiştir. Guaianolidler 2 (9a-asetoksiartecanin) ve 8 (apressin) tüm hücre dizilerine karşı önemli oranda sitotoksik bulunurken inducumenon (9) orta seviyede etki göstermiştir. En aktif bileşiğin sitotoksik olarak da bilinen flavonol centaureidin (12) olduğu tespit edilmiştir [Trifunovic ve ark., 2006].

Saeidnia ve arkadaşları İran'da endemik bir bitki olan *A. talagonica* Bioss. etil asetat özütünün sitotoksik etkisine Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach) yöntemiyle bakmıştır. Özütten üç ana bileşen izole edilmiştir. İzole edilen bileşenler β -sitosterol (1), salvigenin (5- hidroksi 4', 6, 7- üç metoksi flavon) (2) ve santoflavon (5- hidroksi 4', 3', 6, 7- tetra metoksi flavon) (3) olarak tanımlanmıştır. Sonuçta etil asetat özütünün sitotoksik etki gösterdiği ve bundan sadece santoflavon (3) bileşeninin sorumlu olduğu tespit edilmiştir [Saeidnia ve ark., 2009].

Ali ve arkadaşları, saponince zengin olan *A. wilhelmsii* C. Koch'un da içinde olduğu iki bitkiden elde edilen ham saponinin sitotoksik etkilerini Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach) yöntemiyle incelemişlerdir. Bitkilerden elde edilen ham saponinlerin sitotoksik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçta bu ham saponinlerin sitotoksik bileşenlerin mükemmel kaynakları olabileceğini tespit etmişlerdir [Ali ve ark., 2011].

Sathiyamoorthy ve arkadaşları İsrail'de, içlerinde *A. fragrantissima* Forrsk. ve *A. santolina* Forrsk.'un bulunduğu 66 bitkinin antitümör etkisini hastaların metastatik dokularından izole edilen iki melanoma hücre dizisi (BG ve GA) üzerinde test etmişlerdir. Sonuçta *A. fragrantissima* dahil olmak üzere üç bitki türünün her iki hücre dizine karşı en göze çarpan sitotoksik etkiye sahip olduklarını tespit etmişleridir [Sathiyamoorthy ve ark., 1999].

2.8. Antioksidanlar

Antioksidanlar ortamdaki bulunan oksijeni alıkoyarak oksidasyon reaksiyonlarının başlamasını veya ilerlemesini engelleyen bileşiklerdir [Okcu ve Keleş, 2009]. Antioksidan bileşiklerin potansiyel kaynaklarını sebzeler, meyveler, tohum yağları, hububat ürünleri, kabuklar, kökler, baharatlar, şifalı bitkiler, ham bitki ilaçları gibi çeşitli tipte bitki materyalleri oluşturmaktadır [Kahkonen ve ark., 1999].

Normal oksidatif metabolizma, potansiyel olarak tehlikeli oksidanları yani serbest radikalleri fazla miktarda üretmektedir [Stanner ve ark., 2003]. Serbest radikaller atomik yörüngede eşleşmemiş elektron taşıyan, kararsız, hücrelerin duyarlı kısımlarına saldırarak hasara yol açan moleküllerdir [Okcu ve Keleş, 2009]. Hücrelere ve dokulara birçok yoldan zarar verebilirler. Örneğin, biyomoleküller ve hücre bileşenlerine hasar verebilir, özel sinyal yollarının aktive olmasını tetikleyebilir, toksik ürünler üretebilir, enzim aktivitesi, gen ifadesini değiştirebilir ve normal tamir mekanizmalarını bozabilirler. Antioksidanlar, serbest radikallerle uyarılan doku hasarını radikallerin oluşumunu önleyerek, onları ortamdan süpürerek veya ayrışmalarını sağlayarak önlemektedir [Stanner ve ark., 2003].

Sağlıklı bireylerde, serbest radikallerin üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge mevcuttur. Denge, antioksidan seviyelerinin azalması veya serbest radikallerin üretiminin artması lehine olduğunda oksidatif stres oluşmaktadır [Parejo ve ark., 2002]. Oksidatif stres reaktif oksijen türleri (ROT) gibi genelde yüksek reaktif moleküllerinin aşırı oluşumu ve/veya tamamen kaldırılamaması olarak tanımlanmaktadır [Ardestani ve Yazdanparast, 2007]. Oksidatif stresin, özellikle yaşlanmaya bağlı olarak Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif bozukluklarda neden olabileceği yaygın bir şekilde bilinmektedir. Dahası oksidatif hasar kanser, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, katarakt ve inflamasyon gibi birçok kronik hastalığı başlatabilmekte ve ilerletebilmektedir [Parejo ve ark., 2002].

2.8.1. İnsanda serbest radikallere karşı savunma sistemleri

İnsan vücudu serbest radikaller ve diğer ROT'ye karşı çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptir. Savunmanın zararlı oksidanların konsantrasyonlarını azaltan glutatyon peroksidazlar, süperoksit dismutazlar ve katalazları içeren enzim sistemleri oluşturmaktadır. Süperoksit dismutazlar süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene katalitik parçalanmasında önemli olan antioksidan enzim ailesidir. Katalaz özgül olarak hidrojen peroksidin parçalanmasını katalizler. Glutatyon peroksidazlar ise hidroperoksitlerin indirgenmesinde önemli olan selenyum içeren antioksidan enzim ailesidir [Langseth, 1995].

Beslenme serbest radikallere karşı vücudun enzimatik savunmasını sürdürmede anahtar rol oynamaktadır. Bu enzimlerin katalitik aktivitesi veya yapısında selenyum, bakır, manganez, çinko içeren çeşitli temel mineraller bulunmaktadır. Bu minerallerin temini yetersiz olduğunda, enzimatik savunmalar bozulabilir. Savunmanın ikinci kısmını antioksidanlar olarak rol oynayan küçük moleküler ağırlıklı bileşikler oluşturmaktadır. Bunlar okside olan kimyasal maddelerle reaksiyona girererek zarar verici etkilerini azaltırlar. Glutatyon, ubikinol ve ürik asit gibi bazıları normal metabolizma tarafından üretilir. Diğer antioksidan maddeleri içeren bazı gıdalar Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir. Bu gıdalarda bulunan antioksidanların çoğu fenolik veya polifenolik bileşiklerdir [Langseth, 1995].

Diğer küçük moleküler ağırlıklı antioksidanlar besinlerde bulunmaktadır. Bunların en iyi bilinenlerini E vitamini (α - tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve karotenoidler oluşturmaktadır [Langseth, 1995]. C vitamininden farklı olarak bu antioksidanların her bir grubu yapısal olarak farklı birçok bileşik içerir. Bugüne kadar 600 farklı karotenoid tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık 50 kadarı insan diyetinde mevcut olabilir [Diplock ve ark., 1998]. Çizelge 2.2.'de antioksidan vitaminlerin gıda kaynakları gösterilmektedir. Çizelgede meyve ve sebze olmak üzere gıdalar iki kategori olarak vurgulanmaktadır [Langseth, 1995].

Çizelge 2.1. Antioksidan içeren bazı gıdalar [Langseth, 1995; Bagchi ve Puri 1998].

Ürün	Antioksidanlar
Soya fasulyesi	İzoflavonlar, fenolik asitler
Yesil çay, siyah çay	Polifenoller, kateşinler
Kahve	Fenolik esterler
Kırmızı sarap	Fenolik asit
Biberiye, Adaçayı ve diğer baharatlar	Karnosik asit, rosmarik asit
Narenciye ve diğer meyveler	Biyoflavonoidler, kalkonlar
Soğan	Kuersetin, kaempferol
Zeytin	Polifenoller
Hardal/ Zerdeçal	Kurkumin
Mantar	Kantaksantin

Çizelge 2.2. Antioksidan vitaminlerin gıda kaynakları [Langseth, 1995].

Antioksidan Türü	Gıda Kaynakları
E Vitamini	Bitkisel yağlar, tohum yağları, buğday tohumu, meyveler, et, kümes hayvanları, balık.
C Vitamini	Özellikle narenciye meyveler, çilek, kavun, domates, yeşil yapraklı sebzeler, brokoli ve karnabahar gibi lahana ailesindeki sebzeler.
Karotenoidler	
β -Karoten	Sarı-portakal rengi sebzeler ve meyveler, koyu yeşil sebzeler.
α - Karoten	Havuç
Likopen	Domates
Lutein ve Zeaksantin	Koyu yeşil renkli yapraklı sebzeler, brokoli
β -Kriptoksantin	Narenciye meyveler

2.8.2. Bitkilerde Bulunan Antioksidan Maddeler

Bitkiler, fenolik asitler ve flavonoidler, tokoferoller (E Vitamini), karotenoidler, askorbik asit (C Vitamini), tanenler, lignanlar ve ligninler gibi temel antioksidanları içermektedir. Bunlar özellikle bitkilerin yaprakları, çiçeklenen dokuları, gövde ve kabuk gibi odunsu kısımlarında bulunurlar. Bitkinin normal büyüme gelişimi, enfeksiyon ve yaralanmalara karşı savunması için önemlidirler. Ayrıca bunların antioksidan etkilerinin yanısıra başka etkilerinin de olduğu rapor edilmiştir [Kahkonen ve ark., 1999; McCune ve Johns, 2002].

Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler, bitki alemindeki yaygın sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturmaktadır. Bunlar bitkinin büyümesi ve hayatta kalması için temel olan birçok işlevi gerçekleştiren bitki metabolizmasının ürünleridir. Bir veya daha fazla hidroksil grup taşıyan bir veya birden fazla aromatik halkadan meydana gelmişlerdir. Bunlar bu yapılarına bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Her bir sınıf hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna ve bileşiminde bulunan diğer atomlarına göre alt kategoriye ayrılmaktadır [Hannum, 2004; Podsdek, 2007].

Fenolikler reaktif oksijen türlerinin elektron verme özelliklerine bağlı olarak bunları süpürücü etki göstermektedir. Bunların antioksidan etkinlikleri hidroksil gruplarının sayısı ve bulunduğu yerin yanı sıra farklı sistemlerdeki kararlılıklarına bağlıdır. Birçok *in vitro* çalışmaya göre, fenolik bileşikler vitaminler ve karotenoidlerden daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir [Podsdek, 2007]. Bunlar ayrıca bitkilerin patojen, parazit ve predatörlere karşı dirençli olmalarını sağlayarak doğal pestisitler olarak rol oynarlar [Drewnowski ve Gomez-Carneros, 2000].

Fenolik bileşikler gıdalarda basit moleküllerden çok geniş oligomerlere kadar büyük bir aralıkta bulunmaktadır. Bunlar birçok gıda ve içeceğin sertlik ve acılığından sorumludurlar. Gıdalardaki fenolik bileşikler sıklıkla glikozitler olarak mevcuttur. Bağlı şekerler bu bileşikleri daha fazla suda çözünabilir kılmaktadır. Buna rağmen,

çok yüksek moleküler ağırlıklı oligomerler genellikle suda çözünmez. Bunlara ilaveten, benzoik asit veya sinamik asit türevleri gibi diğer fenolik bileşikler meyve ve sebzelerde tanımlanmıştır. Bitkisel gıdalarda yüzlerce farklı fenolik bileşik mevcut olmasına rağmen bunların yaklaşık üçte ikisi flavonoid, dörtte biri fenolik asit olarak yaygın bir şekilde tüketilmektedir [Drewnowski ve Gomez-Carneros, 2000; Hannum, 2004; Podsdek, 2007].

Flavonoidler

Polifenollerin en yaygın olan ve çeşitlilik gösteren grubu karbon (C) iskeletinin (C6–C3–C6) üzerine kurulu olan flavonoidlerdir [Podsdek, 2007]. Flavonoidler potansiyel antioksidanlar olarak bilinmektedir [Hannum, 2004]. 5000'in üzerinde flavonoid mevcuttur. Bunlar genellikle flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavinler ve antosiyanidin alt sınıfları içinde gruplandırılmaktadır. Kateşinler ve kuersetin gibi özgün bileşikler bu alt sınıfların içerisinde yer almaktadır Flavonoidler geniş çeşitlilikte biyolojik etkiye sahiptir. Bunların en önemlisini antioksidan aktivite, kılcal damarları koruyucu etki, çeşitli safhadaki tümörlere karşı inhibitör etki oluşturmaktadır. Bunların kanseri önlemesiyle olan ilişkisi, antitumörjenik ve antiproliferatif yeteneklerinden, güçlü antioksidan kapasitelerinden, hücresel sinyal, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve anjiyogenezde yer almalarından kaynaklanmaktadır [Neuhouser, 2004; Podsdek, 2007].

Hem flavonoidler hem de fenolik asitler sinerjik olarak askorbat ve tokoferol gibi diğer antioksidanlarla birlikte çalışabilirler. Bunların bu vitaminler üzerinde az da olsa etkili oldukları bilinmektedir [Hannum, 2004].

C vitamini

C vitamini (L-askorbik asit, C vitaminin diğer ismidir) suda çözünen önemli antioksidanlardan biridir. Taze sebze ve meyvelerde yaygın olup insan diyetindeki C vitamininin %85'inden fazlası burdan temin edilmektedir. Birçok bitki askorbik asidi D-glukoz ve D-galaktozdan sentezler. Buna rağmen, insanlar L-gluonolakton oksidaz

yokluğuna bağlı olarak askorbik asiti sentezleyemez. L-askorbik asit ve dehidroaskorbik asit C vitamininin ana besin formunu oluşturmaktadır [Podsede, 2007; Szajdek ve Borowska; 2008]. Askorbik asit ve oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbik asiti içeren C vitamini, insan vücudunda birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. L-askorbik asidin biyolojik işlevleri enzim kofaktörü, radikal süpürücü ve plazma membranında elektron taşınmasında verici veya alıcı, α - tokoferolün yeniden üretimi, insanda kemiklerde, ligamentlerde ve kan damarlarında bulunan hücrelerin gelişimine yardımcı olmasıdır. Ayrıca vücudun enfeksiyon ve strese karşı cevap vermesine ve demirin uygun bir şekilde kullanımına da yardım etmektedir [Podsede, 2007; Serteser ve ark., 2009].

Karotenoidler

Karotenoidler (karotenler ve ksantofiller) birçok meyve ve sebzede bulunan sarı, turuncu ve kırmızı pigmentlerdir. Bunların çeşitleri A vitamininin öncülleridir (örneğin β -karoten, γ -karoten, ve β -kriptoksantin) ve konjuge çift bağlarından dolayı hem radikal süpürücü hem de singlet oksijen bastırıcı özelliktedir. Serumda daha düşük β -karoten seviyelerinin mevcudiyeti, daha yüksek oranda kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla bağlantı göstermektedir [Podsede, 2007].

E vitamini

Karotenoidlere ilaveten, E vitamini yağda çözünen antioksidan grubuna aittir. Sebzelere ilaveten, katı yağlar, sıvı yağlar ve taneli hububatlar E vitaminin ana kaynağını oluşturmaktadır. Bunun biyolojik aktivitesi özellikle α - tokoferol olmak üzere tokoferoller ve tokotrienollerini içermektedir. E vitamini kötü huylu kolesterolün (LDL) oksidasyonunu engellediğinden dolayı koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir [Podsede, 2007]. Ayrıca hücre membranının lipid kısımlarının ve geçiş moleküllerinin kararlılığını sağlayarak serbest radikaller, ağır metaller, zehirli bileşikler, ilaçlar ve radyasyondan hücreleri korumaktadır. Tokoferoller doku, deri ve kan damarlarında serbest radikallerin zarar verici etkilerini de önlemektedir [Serteser ve ark., 2009].

Tanenler

Yüksek moleküler ağırlıklı polifenoller bitki tanenleri olarak bilinmektedir. Bunlar darı ve arpa, nohut, keçiboynuzu, kuru fasülye ve baklagiller, meyve, çay, şarap ve hayvan yemi olan çeşitli bitkilerde yayılış göstermektedir [Drewnowski ve Gomez-Carneros, 2000]. Tanenler, proantosiyanidinler olarak bilinen yoğunlaştırılmış hidrolize edilemeyen tanenler ve gallik asit, elajik asitin esterleri gibi hidrolize edilebilen tanenlerden oluşmaktadır. Bunlar meyve ve meyve ürünlerinin özelliklerinin şekillenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Meyve ve meyve sularının rengindeki değişiklikler ve tart tadından sorumludurlar. Antosiyaninlerce zengin meyvelerde, tanenler kopolimerler oluşturmak için antosiyaninlere bağlanarak onları sağlamlaştırır. Birçok meyve yoğunlaştırılmış tanenleri içermektedir. Hidrolize edilebilen tanenlerle (gallik ve elajik asidin türevleri) daha az sıklıkla karşılaşılır. Bunlar çilek, ahududu ve böğürtlende bulunmaktadır [Szajdek ve Borowska; 2008].

Lignanlar

Lignanlar yapısal olmayan fenolik metabolitlerle yakından ilişkili yaygın bir gruptur. Fitoöstrojen grubundan sekonder bitki içerikleridir. Sekoizolarisirezanol ve matairezanol özellikle keten tohumu, tohum yağları ve tahıl gibi bitkisel gıdalarda oluşan ana lignanlardır. Bitki savunmasında rol alırlar. Biyosidal ve antioksidan özellikler içerirler. Birçoğu tıpta kullanılır. Özellikle meme ve prostat kanserine karşı antikanser ajanlar olarak kullanılmaktadırlar. Zayıf östrojenik aktivitelerinin dışında, antikanser etkilerinin nedeni antioksidan etkilerinden dolayıdır [Lewis ve ark., 1998; Niemeyer ve Metzler, 2003].

Ligninler

Fenolik maddeler damarlı bitkilerdeki tüm organik karbonun %30-40'ını oluştururlar. Bunlardan ligninler çoğunlukta olan metabolitlerdir [Pouteau ve ark., 2003]. Lignin bitki dokularında oluşan, üç sinamil alkolden (*p*-kumaril, koniferil ve

sinapil alkoller) türevlenen fenilpropanoid ünitelerinden oluşan polimerik bir maddedir. Selülozdan sonra ikinci en yaygın polimerdir. Kompleks yapılarına bağlı olarak, ligninler endüstriyel kullanımı oldukça sınırlı olan düzensiz polimerlerdir. Kağıt ve selüloz endüstrisinin atık ürünleri olarak görülmekte ve selüloz sürecinin enerji dengesi için yakıt olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ligninler bitki hücre duvarlarına sağlamlık kazandırır, bitkide su taşınmasını kolaylaştırır ve duvar polisakkaritlerinin parçalanmasını engeller. Bu yüzden patojenlere, böceklerle ve diğer herbivorlara karşı ana savunma hattı olarak rol oynarlar [Hatfield ve Vermerris, 2001; Pouteau ve ark., 2003].

2.9. Kanser

Kanser hücrenin genetik materyali tarafından kontrol edilen hücre bölünmesinin normal ilerlemesinde düzensizlik oluşumu ile ortaya çıkan bir hastalıktır [Reddy ve ark., 2003]. Kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm nedenidir. DSÖ raporuna göre her yıl, 10 milyonun üzerinde yeni kanser vakasına tanı konulmaktadır [Sardari ve ark., 2009; Ghavami ve ark., 2010].

Kanser yaklaşık 200 hücre tipini etkilemektedir. Organları ve dokuları istila eden hücre ölümü, farklılaşma ve proliferasyon kontrolünün kaybı hastalığın temel özelliğidir [Mesquita ve ark., 2009]. Virüsler, kimyasal karsinojenler, kromozomal düzensizlikler, tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar veya kendiliğinden transformasyon kanserin oluşum nedenlerindendir [Reddy ve ark., 2003].

Kanserler, hücre tipine bağlı olarak genellikle dört gruba ayrılmaktadır. Kanserinin iki tipi olan lösemiler ve lenfomalar beyaz kan hücreleri olan lökosit ve lenfositlerin gereğinden çok üremesinden dolayı oluşmaktadır. Sarkomalar, kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezoderminden gelişen dokuların tümörleridir. Karsinomalar ise kanserlerin %85'ini oluşturmakta ve bunlar bezler, meme, deri ve ürogenital dokulardan (prostat, rahim ağzı gibi) köken almaktadır [Devita ve ark., 1997].

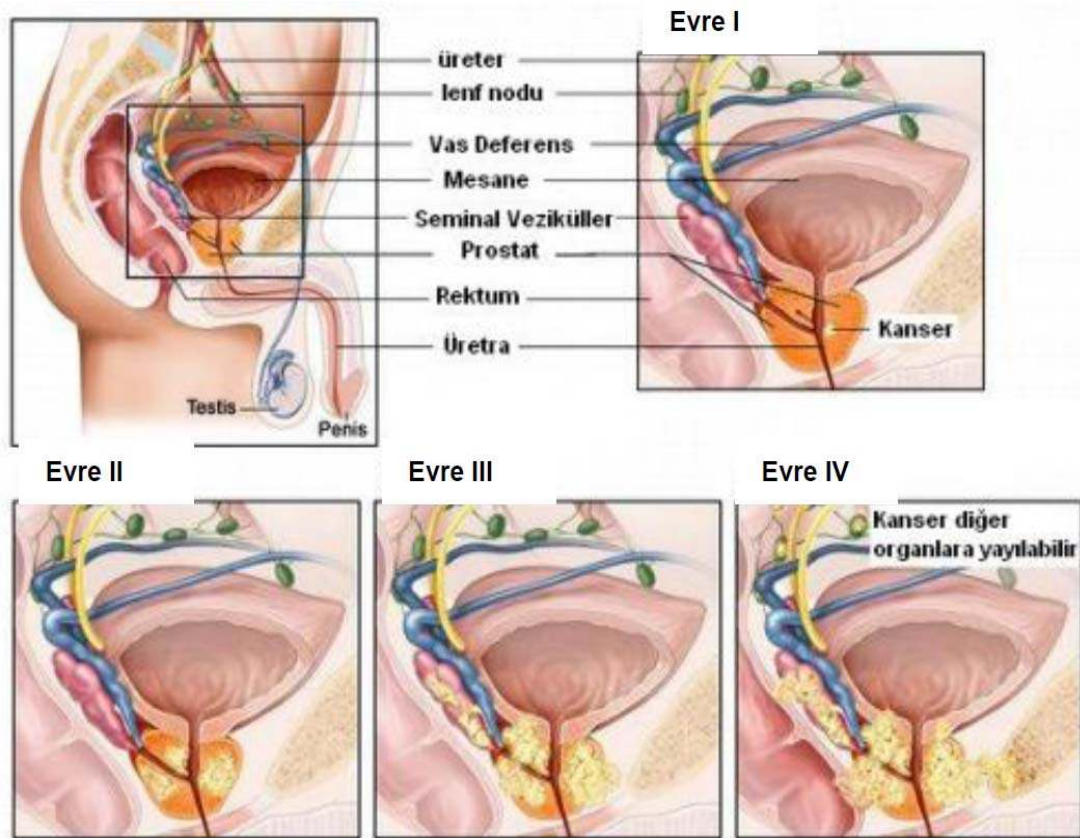
2.9.1. Prostat kanseri

Batı dünyasında prostat kanseri erkeklerde görülen en yaygın kanser olup akciğer kanserinden sonra erkeklerde görülen en sık ölüm nedenidir [Kumar ve ark., 2006]. Ülkemizde ise en sık tanı konan altıncı kanserdir [Polat ve ark., 2009]. Prostat kanseri prostat bezinde çoğunlukla adenokarsinoma olarak ortaya çıkan, heterojen ve genellikle çok odaklı olarak seyreden 50 yaş ve üzeri erkeklerin hastalığıdır [Foster ve ark., 2000; Kosova ve Arı, 2011]. Tanısında günümüzde uygulanan standart yaklaşımda ilk basamağı rektal tuşe ve serum prostata özgün antijen (PSA) düzeyinin tayini oluşturur. PSA normalde serumda düşük konsantrasyonda bulunabilen bir proteaz olup prostat kanseri tanısında ve takibinde kullanılan en önemli belirteç konumundadır [Harman, 2011]. Son yıllarda yoğun bir biçimde PSA tarama programları uygulanmakta ve bunun sonucunda sistematik prostat biyopsisi gereksinimi belirgin biçimde artmaktadır. Prostat kanserinin erken tanısı için kullanılan üç testten biri olan transrektal ultrasonografi (TRUS) hastalığın tanısı için altın standart yöntem olan sistematik prostat biyopsisine öncülük yapmaktadır [Ünsal ve ark., 2006].

Prostat, erkek genital sisteminin en büyük aksesuar bezi olup erkek üretrasının başlangıç kısmını oluşturur. Kısmen tubuloalveoler bezlerden kısmen de bu bezlerin arasını dolduran ara dokudan yapılmış olan prostat bezi 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında iri bir ceviz büyüklüğünde olup, yaklaşık 18-20 gr ağırlığında androjen bağımlı bir organdır [Novara ve ark., 2006; Kosova ve Arı, 2011]. Buna rağmen, androjenik olmayan hormonlar da insan prostatındaki düzenleyici olaylar üzerinde önemli bir etki göstermektedir. Prostat çeşitli hipotalamik-hipofiz hormonları için hedeftir ve kendi başına otokrin ve parakrin kontrol mekanizmaları boyunca büyümenin düzenlenmesini etkileyen çeşitli peptid hormonları, büyüme faktörleri ve nöropeptitleri sentezler. Dahası folikül stimüle edici hormon (FSH) androjen yokluğunda bile prostatta sentezlenmektedir. Bu yüzden prostat endokrin bir bez olarak düşünülebilir [Porter ve ark., 2001].

Yeni teşhis edilmiş prostat kanserlerinin %30-35'i lokal ileri veya metastatik kanserlerdir [Yazıcı ve ark., 2003]. Prostat kanseri I-IV arasında evrelendirilmektedir (Şekil 2.1.) [Pienta, 1998]. İleri evrede, prostat kanserinin büyüme ve gelişimi androjen bağımsız olmakta ve androjen işlev kaybı tedavisini etkisiz hale getirmektedir. İleri prostat kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç gelişimi hastalığın tedavisinde kemoterapatik ajanları yetersiz kılmaktadır [Agarwal ve ark., 2002].

Prostat kanseri erkeklik hormonu testosteron ile ilişkili olduğundan hastalığın tedavisinde testosteronun prostat kanser dokusu gelişimini yavaşlatması veya önlemesine odaklanılmaktadır. Porter ve ark. yaptığı bir çalışmada, FSH'nin prostat kanser patojenezini ve ilerlemesini etkileyebileceğini ve değişen FSH üretiminin aktif tedavide ipucu olabileceğini öne sürmektedir [Porter ve ark., 2001].



Şekil 2.1. Prostat kanserinin evrelendirilmesi [Pienta, 1998].

Prostat kanseri ölümleri kanserin kemiklere, lenf nodlarına ve androjen bağımlıdan androjen bağımsız kanser gelişiminin ilerlemesine yönelik metastazdan kaynaklanmaktadır [Kim ve ark., 2008]. Prostat kanserinin androjen bağımlı basamağı androjen işlev kaybı tedavisi ile etkili bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Buna rağmen hastaların çoğunluğunda kanser, androjen işlev kaybı tedavisine artık cevap vermeyen androjen bağımsız olan ölüm basamağına ilerlemektedir [Kim ve ark., 2008; Chang ve ark., 2010]. Büyük bir çaba sarfedilmesine rağmen, androjen bağımsız prostatik kanser hücrelerinin proliferasyonunu kontrol eden etkili olabilecek kemoterapötik bir ajan bulunamamıştır [Tapia-Vieyra ve Mas-Oliva, 2001; Yua ve ark., 2009].

2.9.2. Meme kanseri

Meme kanseri kadınlarda görülen en yaygın kanserdir [Parton ve ark., 2001; Hostanska ve ark., 2004; Moongkarndi ve ark., 2004; Tan ve ark., 2005; Jo ve ark., 2005] ve kadınlardaki tüm kanserlerin %18'ini oluşturmaktadır [Parton ve ark., 2001]. Kadınlarda kanserle ilişkili ikinci ölüm nedenidir ve gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde istikrarlı bir şekilde artmaktadır [Moongkarndi ve ark., 2004; Rahman ve Sarkar, 2005]. Bu kanser 40 ve 55 yaş arası kadınlarda dünya çapında ölüme neden olmaktadır [Kuo ve ark., 2007]. Bu kanser türü aynı zamanda erkeklerde de görülmektedir fakat bu oran kadınlardakinden 100 kat daha azdır [Moongkarndi ve ark., 2004].

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre, kadın erkek birlikte değerlendirildiğinde Türkiye'de ilk on kanser türü içerisinde akciğer, prostat ve deriden sonra meme kanseri dördüncü sırada yer almaktadır. Yine bu verilere göre meme kanseri kadınlarda yüzbinde 35,47'lik görülme sıklığı ile ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri görülme riski yaş ile artmaktadır. Batı toplumunda tüm meme kanserlerinin %5-7'si 40 yaş altında iken, Türkiye'de bu oran %20 civarındadır [Bozdoğan ve ark., 2010].

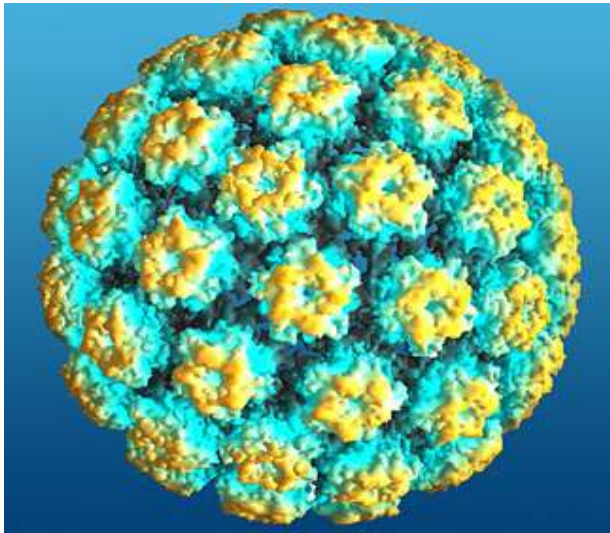
Meme kanseri genel olarak cerrahi ve radyoterapi ile kontrol edilmektedir. Ayrıca yardımcı olarak kemoterapi ve hormon tedavileri ile desteklenmektedir [Kuo ve ark., 2007]. Östrojen reseptörü meme kanser etiyolojisinde ve ilerlemesinde önemli bir düzenleyici anahtar ve tedavi edici bir hedeftir. Östrojen reseptör sinyal yolunu bloke eden endokrin terapisi meme kanseri tedavisinde en önemli sistematik tedavilerden biridir. Tamoksifen gibi antiöstrojenler sistematik kemoterapiyle kıyaslandığında etkinliğinden ve düşük toksisitelerinden dolayı, östrojen reseptör pozitif meme karsinomalı kadınlar için yardımcı bir tedavi olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Fulvestrant (Faslodeks), metaztatik hormon pozitif meme kanserinde klinik olarak kullanılan daha yeni bir östrojen reseptör antagonistidir ve östrojen reseptörünün parçalanmasına neden olur. Böylece östrojene hassas gen transkripsiyonunu ortadan kaldırır. İlave olarak, üçüncü kuşak aromataz inhibitörleri (anastrozol, letrozol ve eksemestan) postmenopozal kadınlardaki adrenal olarak türevlenen androjenlerin östrojenlere dönüşümünü engeller ve daha iyi etkinlik ve toleranslılık sağlar [Fu ve ark., 2007].

Östrojen gibi üreme hormonlarının, kanser gelişiminin yanısıra hücre proliferasyonu ve DNA hasarı üzerindeki etkilerinin meme kanser riskinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Erken menarş (<12 yaş), daha geç yaşta menopoz (>55 yaş), daha geç yaşta ilk hamilelik (>30 yaş) ve daha az sayıda hamilelik kadının meme kanseri riskini kadın üreme hormonlarının seviyelerini etkileyerek arttırmaktadır [Li ve ark., 2009].

Epidemiyolojik veriler çevresel ve davranışsal faktörlerin popülasyonlar arası kanser sıklığını belirlemede genetik faktörlerden daha önemli olduğunu göstermektedir [Sharma ve ark., 2004]. Meme kanserinin etiyolojisi genetik, hormonal ve belki de besin il ilgili faktörlerin kompleks etkileşimini içermektedir [Ray ve ark., 2010]. Meme kanser sıklığı ve ölüm oranlarındaki uluslararası farklılıkların endojen hormonal ortam, yaşam tarzı, çevresel faktörler, genetik yatkınlık, ülkelerdeki mamografik tarama faaliyetlerindeki önemli farklılıklardan kaynaklandığı belirtilmiştir [Jo ve ark., 2005].

2.9.3. Serviks (Rahim Ağız) kanseri

Serviks kanseri kadınları etkileyen ikinci en yaygın kanserdir ve az gelişmiş ülkelerde kanser ölümlerinin ana nedenidir [Green ve ark., 2001]. Dünya çapında her yıl tahmini 371 000 serviks kanseri vakasına tanı konulmaktadır. Bunlar, kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Serviks kanseri, tüm kanserler arasında yedinci, kadınlar arasında meme ve kolorektal kanserlerinden sonra üçüncü sıradadır [Franco ve ark., 2001]. Türk popülasyonunda ise görülme sıklığı (%5,31) bakımından serviks kanseri onuncu sırada yer almaktadır [Gökçe ve ark., 2011].



Şekil 2.2. İnsan Papilloma Virüsü [<http://www.istanbulgenetik.com/hpv-dna-testi/>].

Serviks kanseri geniş yaş aralığı ile ilişkili olmasına rağmen, genellikle 50 veya 60'lı yaşlarda oluşur. Ortalama görülme yaşı 54'tür. Buna rağmen, hastalığın ön aşaması olan epitel içinde oluşan lezyonlar sıklıkla 40 yaş altı daha genç kadınlarda oluşmaktadır. Servikal intraepitelyal neoplazi (SİN) olarak bilinen bu öncül lezyonlar serviks epitelini saran anormal büyüme ile karakterize edilir ve çeşitlilik sergileyen düzensiz olgunlaşma dereceleri gösterir. Hem epitel içi lezyonlar (örneğin SİN) hem de serviks kanseri türleri sıklıkla insan papilloma virüsü (HPV) taşımaktadır. Serviks epiteline taşınmadaki yetenekleri farklılık gösteren çeşitli tipte HPV'ler mevcuttur. Tip 6, 11, 42, 43 ve 44 gibi düşük risk taşıyan HPV'ler yaygın olarak viral

kondiloma ve genellikle istilacı kanser olarak ilerlemeyen, serviks epitelinde orta seviyede anormal büyüme gösteren (SİN I) değişikliklerle ilişkilidir. Bu düşük risk taşıyan HPV'ler hemen hemen serviks kanserli kadınlarda görülmez. Buna karşın 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 gibi yüksek risk taşıyan HPV'ler ise çoğunlukla serviks kanserli hastalarda gözlemlenmiştir [Cannistra ve Niloff, 1996; Franco ve ark., 2001; Waggoner, 2003].

HPV'ler genom büyüklükleri yaklaşık 8000 baz çifti olan DNA virüsleridir. DNA benzerliği temel alınarak tanımlanan 100'den fazla HPV tipi mevcuttur. Bunların 40'tan fazlası anogenital bölgeyi enfekte etmektedir [Franco ve ark., 2001]. Şekil 2.2.'de insan papilloma virüsü gösterilmektedir.

Yüksek oranda seksüel aktiviteye sahip kadınların yaşamlarının bazı dönemlerinde virüs ile bir veya birkaç kez enfekte oldukları görülmektedir. Erken yaşta cinsel aktivite, çok eşlilik, çok eşli olan cinsel partnere sahip olmak ve sigara içmek serviks kanseri için çeşitli risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır. HPV ile enfekte olup kalıcı enfeksiyon veya serviks kanseri gelişimi görülen kadınlar hormonal gebelik önleyicilerin kullanımı gibi diğer faktörlerden de etkilenebilir. Yapılan son çalışmalarda 5 yıldan daha fazla doğum kontrol ilacı kullanan kadınlarda HPV-DNA pozitif serviks kanseri riskinin arttığı ileri sürülmektedir [Cannistra ve Niloff, 1996; Smith ve ark., 2003].

2.9.4. Kanser ve antioksidanlar

Kanser oluşumunun oksidatif hipotezi, kanserojenlerin hücrelerdeki DNA ve RNA'ya zarar veren, bu hücreleri kötü huylu değişikliklere hazırlayan ROT'leri ürettiğini ileri sürmektedir. DNA'ya yönelik oksidatif hasarın çoğunluğu iç kontrol ve tamir sistemleri tarafından düzeltilir. Antioksidanların serbest radikaller ve oksidanları nötralize ederek hücre hasarını önlediği böylece kanser gelişimini engellediği ileri sürülmektedir [Stanner ve ark., 2003].

Epidemiyolojik alışmalar meyve ve sebze içeren fitokimyasallarca zengin beslenmenin belirli tipteki insan kanser riskinin azalmasına yönelik katkı sağladığını göstermiştir [Seeram ve ark., 2006].

Kanserli hastalarla ilgili son araştırmalar, hastaların birçoğunun (%25'ten %84'e) sıklıkla tavsiye edilen beslenmeden daha yüksek dozlarda antioksidanlar içeren ek gıdalar kullandıklarını göstermektedir. Kanserli hastalar tedavinin yararlarını arttırmak, yan etkilerini hafifletmek ve/veya genel sağlık durumunu sürdürmek veya geliştirmek için kanser tedavisi süresince ve sonrasında antioksidan destekleyiciler almaktadırlar. Buna rağmen, herhangi bir antioksidan takviyesinin amaçlanan herhangi bir dozu için etkinliğe sahip olduğu henüz ispatlanamamıştır [Ladas ve ark., 2004].

In vitro ve *in vivo* alışmalar belirli antioksidanların seçici bir şekilde tümör hücrelerinin gelişimini engellediğini, hücresel farklılaşmayı uyarabildiğini ve hücre içi redoks basamaklarını sitotoksik tedavinin etkilerini arttırarak değiştirebildiğini göstermektedir. Kemoterapi tedavisinden sonra kanser hastalarındaki antioksidan kaybının nedeni hastaların tedavinin başlangıcından önce kanser hücreleri tarafından antioksidanlarının tüketilmesi şeklinde olabilir. Belki de kanser hücreleri antioksidan vitaminleri sağlıklı hücrelerden daha etkili bir şekilde kullanmaktadır. Bu yüzden antioksidanların plazmada dönüşüm seviyeleri azalmaktadır. Bu hipotez, kanser hastalarının tedavinin başlangıcından önce bile kontrolden daha düşük seviyede antioksidana sahip olmalarıyla desteklenmektedir. Bu gözlemler düşük antioksidan durumunun neoplastik aktiviteyle ve sonradan sağlığın bozulması ile ilişkili olabileceğini ileri sürmekte ve antioksidan takviyesinin kanser hastaları için yararlı olabileceği fikrini desteklemektedir [Ladas ve ark., 2004].

2.10. Apoptoz

Apoptoz, gelişim, morfogenez, doku yenilenmesi, bağışıklığın düzenlenmesi ve aynı zamanda birçok patolojik olay için önemli olan programlı hücre ölüm sürecidir [Nunez ve ark., 1998; Fiers ve ark., 1999]. Bu süreçte hücre ölümünün apoptotik olabilmesi için hücre yüzeyinde çıkıntı oluşumu, normalde plazma membranının iç kısmında bulunan fosfatidil serinin hücre yüzeyine çıkması, sitozolik yoğunlaşma, protein çapraz bağlanması ve hücrenin büzülmesi, nüklear yoğunlaşma, nüklear DNA'nın önce büyük parçalara daha sonra nükleozomal fragmentlere ayrışması ve son olarak da plazma membran yıkımı olmaksızın apoptotik cisimcikler içerisinde ölü hücrelerin paketlenmesi gözlenmelidir. Apoptotik cisimcikler fagositik hücreler tarafından tanınmakta ve ortadan kaldırılmaktadır. Bu yüzden apoptozda, ölmekte olan hücrenin çevresindeki inflamasyon yokluğu da önem taşımaktadır [Fiers ve ark., 1999; Edinger ve Thompson, 2004].

Apoptoz, toksik kimyasal maddeler, kemoterapötikler, iyonize radyasyon ve oksidanların dahil olduğu çeşitli uyarıcılarla başlatılabilmektedir. Reaktif oksijen türleri ve oksidatif hasar, apoptozun başlamasını etkilemektedir [Wei ve ark., 2001]. Apoptoz ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) hem mitokondri, hem plazma membranı ve hem de genom üzerinde oluşturdukları hasara bağlı olarak da başlatılabilmektedir [Kiess ve ark., 1998].

Programlı hücre ölümü olarak da tanımlanan apoptoz hassas bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenin başarısızlığı gelişimsel kusurlar, otoimmün hastalıklar, nörodejenaratif bozukluklar veya kanser gibi patolojik koşulların oluşumuna neden olmaktadır [Lu ve ark., 2000; Jin ve El-Deiry, 2005]. Apoptozun düzenleyici mekanizmaları çok karmaşık olup, kaspazların aktivasyonu apoptozda yer alan temel mekanizmalardan birini oluşturmaktadır [Sanmartín ve ark., 2008].

2.10.1. Kaspazlar

Nematod *Caenorhabditis elegans* ile yapılan genetik analizler, hücre ölüm süreci için ihtiyaç duyulan *ced-3* ve *ced-4* adlı iki geni tanımlamıştır [Nunez ve ark., 1998]. *C. elegans* *ced-3* geninin klonlaması bu genin amino asit dizisinin memelilerdeki interlökin-1 β -dönüştürücü enzim ile %29 benzerlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır [Lincz, 1998]. Bu enzim hücre ölümünün kritik bileşenleri olan sistein proteazların ilk göstergesini sağlamaktadır. Bu gözlemler *ced-3* ile benzerlik gösteren sistein proteaz ailesinin tanımlamasını sağlamıştır. Bu sistein proteazlar hücrelerde aktif olmayan haberciler olarak sentezlenir ve apoptoz indüksiyonunu takiben aktif enzimleri oluşturmak için parçalanabilirler [Nunez ve ark., 1998; Jin ve El-Deiry, 2005]. Bu proteazların katalitik özelliklerini yansıtmak için kaspazlar olarak isimlendirilmişlerdir [Lincz, 1998].

Bugüne kadar memelilere ait yaklaşık 14 adet kaspaz tanımlanmıştır [Jin ve El-Deiry, 2005]. Bunların çoğu apoptoz sürecinde rol almaktadır [Nunez ve ark., 1998]. Kaspazlar işlevlerine göre 3 grupta sınıflandırılabilir [Jin ve El-Deiry, 2005].

- 1) İnflamatuvar Kaspazlar: Kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14'ü içermektedir. Apoptoz yerine inflamasyonda yer alır.
- 2) Apoptozu Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz-2, -8, -9 ve -10'u içermektedir.
- 3) Apoptozu Yürütücü (Efektör) Kaspazlar: Kaspaz-3, -6 ve -7'yi içermektedir [Jin ve El-Deiry, 2005].

Kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu, DNA tamir mekanizması proteinlerinin aktifliğinin giderilmesi ve parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Bu proteinler DNA bağımsız protein kinazları ve poli (ADP riboz) polimerazları (PARP) içermektedir. PARP kaspazın en iyi bilinen substratlarından birisidir [Huerta ve ark., 2006].

PARP (poli (ADP riboz) polimeraz)

Poli (ADP-riboz) polimeraz kaspaz-3 gibi efektör kaspazlar tarafından enzim aktivitesinin kaybıyla 89-25 kDa'luk fragmentlere parçalanabilen 116 kDa büyüklüğünde nüklear bir DNA tamir enzimidir [Cha ve ark., 2004; Huerta ve ark., 2006]. DNA hasarı ile aktive edilen DNA tamiri, transkripsiyonun düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve hücre ölümünde rol oynamaktadır [Son ve ark., 2009]. Polimeraz ADP-riboz ünitelerinin DNA, histonlar ve çeşitli DNA tamir enzimlerine ilavesini katalizler ki, bu durum replikasyon, transkripsiyon, farklılaşma, gen ifadesinin düzenlenmesini, protein parçalanması kadar çeşitlilik gösteren hücresel süreci etkilemektedir [Ratnam ve Low, 2007].

PARP'ın proteolitik parçalanması ilk olarak kemoterapi ile uyarılan apoptozda tanımlanmıştır [Rosenthal ve ark., 2001]. Bu enzimin parçalanması apoptoz sürecinde önemli bir olaydır [Sun ve ark., 1999]. PARP'ın parçalanmış şekli olan 89 kDa'luk monoklonal antikorlar ticari olarak mevcuttur. Monoklonal antikor, flow sitometri ile olduğu kadar immünohistokimyasal ve Western analizlerde de kullanılabilmektedir [Huerta ve ark., 2006].

2.10.2. Apoptozun oluşum mekanizmaları

Memelilerde dış sinyallerin iletiminde, bir hücrenin içindeki dış (ölüm reseptör yolu) veya iç (mitokondri yolu) olarak adlandırılan iki temel apoptotik yolak tetiklenmektedir. Dış yolak, hücre yüzey reseptörlerine ölümü uyaran ligandların bağlanması gibi dış sinyalleri oluşturan apoptotik uyaranlar tarafından aktive edilir. Diğer durumlarda, apoptoz radyasyon veya kimyasal maddeler, büyüme faktörünün yokluğu veya oksidatif stres tarafından uyarılan DNA hasarını içeren iç sinyalleri takiben başlatılır. Mitokondrinin yanısıra endoplazmik retikulum (ER) iç yolakta yer alan ikinci bir bileşendir. Genellikle iç sinyaller mitokondrinin dahil olduğu yol aracılığıyla başlatılmaktadır [Jin ve El-Deiry, 2005].

Mitokondri yolağı (İç yolak)

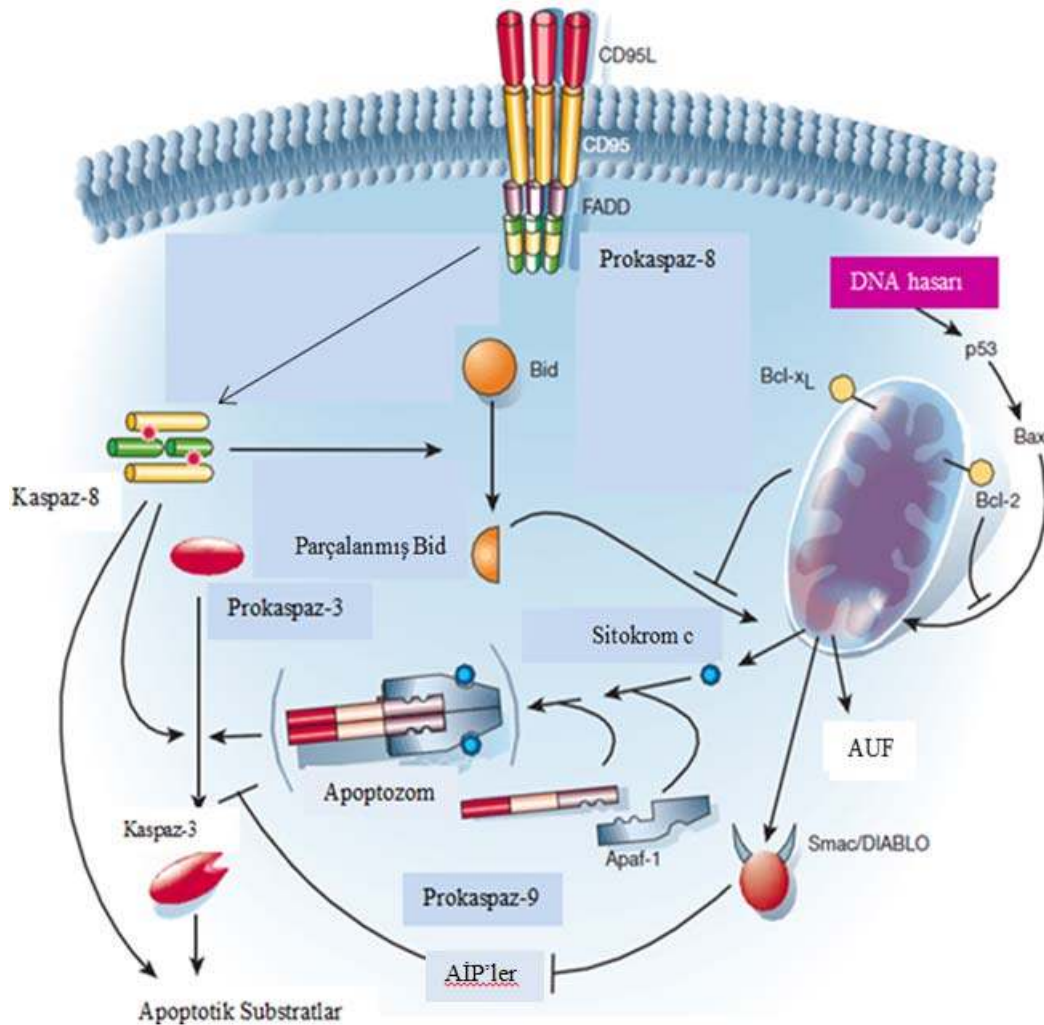
İç apoptotik sürecin işleyişindeki en önemli olay mitokondride gerçekleşmektedir. Mitokondri yolağındaki esas olay mitokondri dış membran geçirgenliği (MDMG)'dir. MDMG esas olarak Bcl-2 aile üyeleriyle ilişkilidir ve bu üyeler tarafından kontrol edilmektedir. MDMG, apoptozda yer alan moleküllerin salınımı boyunca veya hücre canlılığı için esas olan mitokondri işlevlerinin kaybıyla hücre ölümünü hızlandırmaktadır [Jin ve El-Deiry, 2005].

Memelilerde yaklaşık 20 adet Bcl-2 aile üyesi bulunmaktadır. Bcl-2 ailesi şu şekilde gruplandırılabilir: Antiapoptotik üyeler (örneğin Bcl-2 ve Bcl-xL [Bcl-x proteinin uzun izoformu]) ve ilave alt bölümlere ayrılan proapoptotik üyeler. Bu proapoptotik üyelerden bazıları şunlardır: (a) Çoklu domain içeren proapoptotik üyeler (Bax [Bcl-2–ilişkili X proteini] ve Bak [Bcl-2–antagonisti veya öldürücü), (b) Bcl-2 Homoloğu (BH) sadece proapoptotik üyeler (örneğin Bid, Bad [Bcl-2-hücre ölümünün antagonisti] Bim [Bcl-2 ile etkileşen hücre ölümü düzenleyicisi], Bmf [Bcl-2 dönüştürücü faktör]. Anti-apoptotik üyeler hücre canlılığını düzenlerken, pro-apoptotik üyeler hücre ölümünü sağlamaktadır [Crow ve ark., 2004; Jin ve El-Deiry, 2005].

MDMG, sitokrom c gibi mitokondriye ait çözünebilen iç membran proteinlerinin salınımı ve temel mitokondri işlevlerinin bozulmasını içeren iki mekanizma ile hücre ölümünü sağlamaktadır. Mitokondriden salınan moleküllerin çoğu kaspaza bağlı apoptoz uyarımında yer almaktadır. Fakat bazıları hücre ölümünü kaspaza bağlı olmayan yoldan yürütebilir [Jin ve El-Deiry, 2005].

Mitokondriden salınan ilk tanımlanmış protein sitokrom c'dir [Jin ve El-Deiry, 2005]. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir [Norberg ve ark., 2010]. Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak için sitokrom c ihtiva eder. Mitokondride stres oluşumu durumlarında serbestleşen sitokrom c, apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır [Chu ve ark., 1989; Gleason ve ark., 1992]. Sitokrom c'nin

mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğine işaret eder. Sitokrom c, mitokondriden apoptozu-uyaran faktör (AUF) ile birlikte sitoplazmaya salınır [Norberg ve ark., 2010]. Sitoplazmik protein olan apoptotik proteazı aktive eden faktör-1'e (APAF1) bağlanır ve onu aktifleştirir, ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks aktif olmayan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktifleştirir. Aktif kaspaz-3 de kaspazın deoksiribonükleotit inhibitörünü (ICAD) kaspaz aktif deoksiribonükleotit (CAD) haline getirir ve kaspaza bağlı apoptoz mekanizması başlar (Şekil 2.3.) [Ricci ve ark., 2003; Shen ve ark., 2010].



Şekil 2.3. Memeli hücrelerinde görülen iç ve dış apoptotik yolaklar [Hengartner, 2000].

Endoplazmik retikulum yolağı (İç yolak)

Mitokondriler iç yolakta merkezi bir organel olarak bilinir. Buna rağmen, bazı durumlarda endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ölüm yolunda önemli rol oynar. Belki de mitokondri aracılı hücre ölümüne bağımsız bir şekilde aracılık eder. Örneğin seramid, araşidonik asit ve ilginç olarak oksidatif stres gibi uyarıcıların etkili bir ölüm için ER ölüm yolağına ihtiyaç duydukları gözlemlenmiştir. ER'nin hücre ölümüne neden olduğu mekanizmalar çok az anlaşılabilmesine rağmen, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2})'un artışı bu yolakta merkezi bir rol oynamaktadır. ER Ca^{+2} depolarının mitokondrinin yanısıra ER membranında da yer alan proapoptotik Bax ve Bak proteinleri ile arttırıldığı düşünülmektedir [Crow ve ark., 2004].

Ölüm reseptör ve mitokondri ile ilişkili apoptotik yolaklar iyi tanımlanmıştır. Her bir yolak kaspazlarla ilişkilendirilmiş özgün süreçleri içermektedir. ER stresi ile uyarılan apoptoz ile bağlantılı kaspazlar henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır. ER stresi ile ilgili farklı çalışmalarda kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9 ile ilgili süreçler gözlemlenmiştir [Szegezdi ve ark., 2006]. ER stresi ile ilişkili apoptoz nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynayabilmektedir [Jin ve El-Deiry, 2005].

Ölüm Reseptör Yolağı (Dış yolak)

Ölüm reseptör yolağı, CD95 ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) gibi ölüm reseptör ailesinin üyeleri tarafından tetiklenmektedir. CD95 ligandının CD95 ölüm reseptörüne bağlanması, ölümü uyaran sinyal kompleksinin oluşumunu ve reseptör gruplarını uyarır. Bunlar, adaptör molekül FADD (Fas ile ilişkili ölüm domain proteini) aracılığıyla prokaspaz-8 moleküllerine doğrudan bağlanır. Bu bağlanma mekanizması kaspaz-8'in aktivasyonuna sebep olur. Aktif kaspaz-8 efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktiveleştirerek apoptozu başlatır (Şekil 2.3) [Hengartner, 2000].

Ölüm reseptörü ve mitokondri yolakları kaspaz-3 aktivasyonu ile birleşmektedir. Kaspaz-3'ün aktif hale geçmesi ve inaktivitesi, AİP (Apoptoz inhibitörü protein)'ler

ve mitokondriden salınan Smac/DIABLO proteinleri tarafından birbirine zıt olarak gerçekleşir [Hengartner, 2000]. Smac/DIABLO proteini ölüm reseptörüyle ilişkili apoptozda önemli bir koruyucu rol oynamaktadır. Bu protein mitokondri dışı membran geçirgenliği üzerinden mitokondriye salınan AİP'lerin antogonisti bir proteindir. AİP'ler aktiveştiren kaspazları engelleyerek apoptoz için durdurucu olarak rol oynamaktadır. Smac/DIABLO kaspazlara benzer bir şekilde AİP'lere bağlanır. Böylece yarışmalı inhibitör olarak işlev gösterir. Kaspaz koaktivatörü Smac/DIABLO AİP'lerin engelleyici aktivitesini nötralize etmek için apoptoz süresince sitokrom c ile birlikte salınır ve sitokrom c'ye bağlı kaspaz aktivasyonunu destekler (Şekil 2.3.) [Jin ve El-Deiry, 2005].

Ölüm reseptörü ve mitokondri yolları arasındaki çapraz etkileşim ve birliktelik Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan Bid tarafından sağlanmaktadır. Bid'in kaspaz-8 tarafından parçalanması Bid proteinin ölümcül aktivitesini arttırmaktadır. Parçalanmış Bid mitokondriye taşınır ve bu sırada mitokondriden sitokrom c çıkışı olur (Şekil 2.3.). Bu iki yolağın bu karşılıklı birlikteliği çoğu zaman çok az oranda gerçekleşmektedir. Çoğunlukla bu iki yolağın her biri bağımsız bir şekilde düzenlenmektedir [Hengartner, 2000].

2.10.3. Apoptoz ve kanser

Apoptoz ve kanser arasındaki ilişki son zamanlarda bir ilgi odağıdır. Apoptoz, etkili antikanser tedavisi hakkında birçok ipucu sağlamaktadır ve birçok kemoterapötik ajan antikanser etkilerini kanser hücrelerinde apoptozu uyatarak göstermektedir. Bu yüzden apoptoz uyarımı antikanser tedavisinin etkinliğini gösteren en önemli mekanizmadır [Yang ve ark., 2006; Hsu ve ark., 2011].

Kemoterapötik ilaçların tümör hücrelerinde apoptozu uyatarak sitotoksik etkilerini gösterdiklerine dair kanıtlar fazlalaşmıştır. Apoptozun bozulmasının hücre ölümsüzlüğü ve karsinogenez ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu yüzden neoplastik hücrelerde apoptoz uyarımı kanser tedavisinde hayati öneme sahiptir [Tan ve ark., 2005].

Genellikle, preneoplastik veya neoplastik hücrelerin büyüme oranları hücre gelişimlerinin ve hücre ölüm mekanizmalarının düzensizliği veya işlev bozukluğundan dolayı normal hücrelerinkinden daha hızlı olmaktadır. Bu yüzden apoptozun veya hücre döngüsünün durdurulmasının uyarımı karsinogenezin gelişimi ve ilerlemesini engellemek ve vücuttan genetik olarak hasar görmüş veya neoplastik hücreleri kaldırmak için mükemmel bir yaklaşım olabilir [Seeram ve ark., 2006; Ray ve ark., 2010].

Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge kemoterapi, radyoterapi ve son zamanlarda hormonal tedavilere cevap olarak tümörün büyümesi veya ilerlemesinin belirlenmesinde hayati önem taşımaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavilerin tümü apoptozun uyarılmasında kısmen rol almaktadır. Bu yüzden moleküler ve biyokimyasal seviyelerde apoptozun, kontrolünün ve düzenlenmesinin gözden geçirilmesi ile bireysel tümörlerin biyolojisini tanımlamak ve bunu klinik avantaja dönüştürmek mümkündür. Bu ilişkileri anlamak tümörün gerilemesi ve tedavinin etkinliği için kişiye özel tedaviye izin verebilmektedir [Parton ve ark., 2001].

2.10.4. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, genel olarak 5 grupta incelenebilmektedir [Tekişoğulları, 2010].

- Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri (Hematoksilen ve Giemsa boyama ile ışık mikroskopunda, 6,4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Propidyum iyodür (PI) ve Hoeschst boyası ile flouresans mikroskopunda görüntüleme).
- Biyokimyasal Yöntemler (Western Blotlama, Flow Sitometri).
- Histokimyasal Yöntemler (Anneksin V, Kaspaz-3 yöntemi, TUNEL, M30).
- İmmünojenetik Yöntemler (ELISA, Flourimetrik yöntem).
- Moleküler Biyoloji Yöntemleri (Real time Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile apoptotik genlerin ifadesi, DNA mikroarrayler).

DAPI, PI ve DiOC₆ Boyama

DAPI, floresan boyama ile hücre DNA'sında meydana gelen değişimi gözlemlemekte kullanılan bir boyadır. Aynı anda canlı ve ölü hücreleri boyamak için kullanılabilen mavi renkli floresan özellikli bir proteindir [Kemp ve Brouwer, 2004]. DNA'ya özgün bir prob olup DNA'nın küçük oluğundaki A-T bazlarınca zengin dizilere bağlanarak floresan bir kompleks oluşturur [Mi ve ark., 2005]. DNA'ya bağlandığında, floresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır [Kemp ve Brouwer; 2004]. Bu reaktif, DNA fragmentleşmesini gözlemlemek için kullanılmaktadır. DNA fragmentleşmesi apoptoz için tanımlayıcı olan bir işlemdir. DAPI akım sitometri, kromozom boyaması, histokimya ve biyokimyadaki DNA görüntülenmesi ve miktarının tespiti için DNA-ölgün prob olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [Mi ve ark., 2005]. Propidyum iyodür (PI) ise geç apoptoz boyunca ve membran bütünlüğü bozulduğu için hücre ölümü sırasında hücrelerden içeri daha hızlı giren, normal hücrelerin membranından geçemeyen bir nükleik asit boyasıdır [Özgen ve ark., 2000].

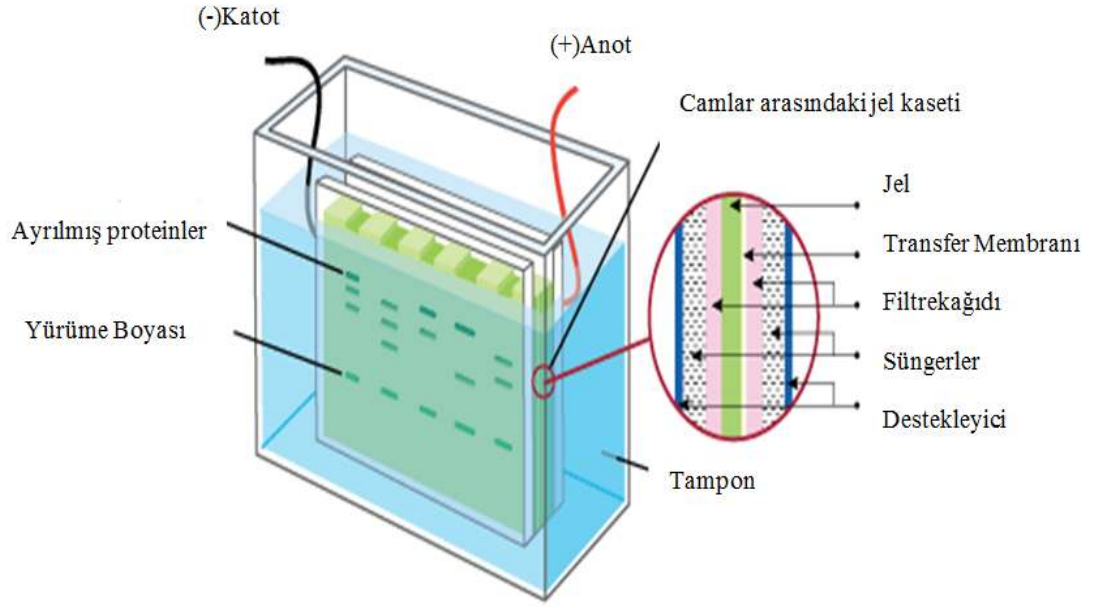
Apoptoz aynı zamanda membran yüzeyindeki fosfatidilserinin (PS) açığa çıkması ve mitokondri membran potansiyeli (MMP) kaybının oluşumu ile bir arada gerçekleşir. Son çalışmalar mitokondrideki değişikliklerin apoptotik kaskadın kritik olaylarını ortaya çıkardığını göstermektedir. MMP'nin azalması apoptozun erken geri dönüşümlü basamakları boyunca karşılaşılan değişiklikler arasındadır ve çeşitli hücre tiplerinde sitokrom c salınımından önce meydana gelir. MMP'nin çöküşü doğrudan hücre ölümünün işaretidir. MMP'deki değişiklikler 3',3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC₆) alımı ile belirlenmektedir [Mi ve ark., 2005; Morselli ve ark., 2010]. DiOC₆, mitokondriye özgü voltaja bağlı katyonik floresan bir boyadır [Özgen ve ark., 2000; Tessitore ve ark., 2009]. Apoptotik hücrelerdeki MMP'nin azalması akım sitometri analizi ile gösterildiği gibi DiOC₆ alımının azalması ile de ilişkilidir ve MMP analizi apoptoz çalışmaları için güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir [Özgen ve ark., 2000; Mi ve ark., 2005].

Western Blotlama

Blotlama, protein ve nükleik asitlerin belirlenmesi amacıyla hibridizasyon veya prob teknolojileri ile paralel olarak kullanılan bir yöntemdir [Hodinka, 1998; Kricka, 1999]. Western blotlama ise elektroforez işlemiyle poliakrilamit jelde yürütülen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir [Burnette, 1981]. Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel (SDS-PAGE) üzerinde yürütülür. SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden birisidir [Harlow, 1988].

Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin membrana aktarımı (blotlama), özgün olmayan reaksiyonları engellemek için membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Destek tabakaya (membran) transfer sırasında jel ile destek tabaka karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır [Burnette, 1981; Harlow, 1988; Harper ve Coles, 1996].

Proteinlerin destek tabakaya transferinde kullanılan yöntemlerden biri ıslak kapillar yöntemidir. Bu yöntemde transfer işlemi jel elektroforezine benzer bir şekilde tampon çözeltisi içinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.). Destek tabakanın özgül olmayan proteinle bloklanmasında ucuz, temini kolay ve etkin olması nedeniyle, yağsız süttozu tercih edilmektedir [Burnette, 1981]. Özgün antikorlar olarak poliklonal ya da monoklonal antikorlar (Mak) kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımının avantajı, bunların yalnızca tek bir epitopa (antijenik determinant) özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından kaynaklanmaktadır [Fowler, 1995].



Şekil 2.4. Islak kapillar blotlama [[http://www.leinco.com / general_wb](http://www.leinco.com/general_wb)].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki

Çalışmada 15.06.2009 ve 28.06.2011 tarihlerinde toplanan *Achillea teretifolia* Willd. türü bitki materyali olarak kullanılmıştır. *A. teretifolia* bitkisi Ankara: Hüseyin Gazi Dağından 1200 m yükseklikteki bozkır ve kayalık yamaçlardan toplanmıştır. Bitkinin toplanması Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Mecit Vural, Prof. Dr. Leyla AÇIK, doktora öğrencisi E. Burcu Bali ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitki türünün teşhisi ve sistematigi Prof. Dr. Mecit Vural tarafından yapılmıştır. Bitkisel materyale ait herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır.



Resim 3.1. *A. teretifolia* Willd.'ın arazide çekilen fotoğrafı (Foto: E. Burcu Bali)

3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışmada yer alan antimikrobiyal aktivite deneylerinde 8 adet bakteri ile 2 adet maya kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter faecalis* ATCC 292112 ve *Proteus vulgaris* ATCC 8427, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterileri ve *Candida albicans* ATCC 10231 mayası Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711 bakterisi Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden *Candida tropicalis* ATCC 13803 mayası Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Mueller hinton agar (Merck), Nutrient broth (Merck), Saboroud dekstrozu broth (Merck), Sabouroud dekstrozu agar (Merck), NaCl (Merck), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma), galik asit (Sigma), α - tokoferol (Sigma), askorbik asit (Sigma), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (Sigma), Folin reaktifi (Merck), etanol (Merck), metanol (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma), RPMI-1640 besiyeri (İçeriği L-glutamine, 2.0 g/L NaHCO₃) (Pan Biotech GmbH), fetal bovine serum (GIBCO), fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Ca⁺⁺ ve Mg⁺ içermeyen) (Hyclone), penisilin-streptomisin (Sigma), tripsin-edta çözeltisi (10X) (Sigma), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), tripan mavisi (Merck), izopropanol (Merck). Çalışmada kullanılan bütün besiyerleri 121°C'de 1,5 atm/Hg basınçta 20 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan aletler ve cihazlar

12 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 6 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte (İsviçre), 75cm² hücre büyütme kapları (hücre kültürü için) TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), 96 kuyucuklu hücre petrileri TPP (Zellkultur Testplatte) (İsviçre), Etüv Heraus Thermo Electron Company Model: Hera cell 150, Hemostometr Hausser. (Bright-Line, Neubauer Model, 0.1mm derinlikli), Laminar flow HeraSafe Model: 12469 2000. 2. dereceden güvenlik kabin, pipetler Ratiolab (Accupetta), pipet uçları CAPP, Petri kapları (100x20 mm) TPP (Zellkultur Schalen) (İsviçre), Serolojik pipetler (5ml) TPP, serolojik pipetler (10ml), şırınga filtreleri (0,22 µm) TPP, 5-10-25 cc şırıngalar, Set Inject, santrifüj Model 5417R Ependorf, tripsin-edta Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek Israel), blender (Siemens), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu (Beko), terazi (Scaltech), hassas terazi (Sartorius), mikrodalga fırını (Vestel), DNA görüntüleme sistemi (Biometra), rotaevaporotör (Buchi), manyetik karıştırıcı, kar makinesi (Hoshizaki), dikey elektroforez, güç kaynağı (Consort EV 233), sıvı azot kapları, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (ELx808-IU) (Bio-Tek), inverted mikroskop (Olympus), ısıtmalı karıştırıcı, mikrosantrifüj (Beckman Counter), vorteks, çalkalayıcı, membran filtreleri, beher, baget, balon joje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, steril cerrahi eldiven, buzdolabı (+4°C) ve dondurucular (-20°C ve -80°C).

3.1.5. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanması

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

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

Tris (1 Molar): 12,1 g Tris tartılarak pH 6,8’e ayarlanacak şekilde 100 ml distile suda çözüldü. Çözelti 4°C’de saklandı.

Tris (1,5 Molar): 18,2 g Tris tartılarak pH 8,8'e ayarlanacak şekilde 100 ml distile suda çözüldü. Çözelti 4°C'de saklandı.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.6. Hücre kültüründe kullanılan hücre dizileri

Çalışmada androjen bağımlı androjen bağımsız DU145 (ATCC HTB81) ve PC-3 (ATCC CRL1435) prostat kanseri, meme kanseri MCF-7 (ATCC HTB-22), serviks kanseri HeLa (ATCC CCL-2) hücre dizileri kullanılmıştır. Malign olmayan hücre dizisi olarak da sağlıklı gönüllülerin dişlerinden elde edilen insan gingival fibroblast hücre dizisi (HGF) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitkinin kurutulması

Ankara, Hüseyin Gazi Dağından toplanan *A. teretifolia* bitkisinin toprak üstü kısımları oda sıcaklığında gölgeli bir ortama serilerek 1 hafta süreyle kurutulmuştur. Kurutulan bitkisel materyal küçük parçalara ayrıldıktan sonra 100 gram bitki blender yardımıyla toz haline getirilmiş ve üzerine 500 ml metanol ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 2 hafta boyunca iki günde bir çözücü yenilenerek masere edilmiştir. Elde edilen sıvı metanol özütü rotary evaporatörde 45°C'de çözücüsünden ayrılmış ve katı özüt elde edilmiştir. Su özütü ise 50 gram kurumuş bitki örneği üzerine 1000 ml distile su konularak gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek hazırlanmıştır. Elde edilen sıvı özüt -80°C' de dondurulmuş daha sonra liyofilizatörde kurutularak katı su özütü elde edilmiştir. Bitkinin su ve metanol ekstraksiyonu sonrası kuru ağırlıkları da belirlenmiş ve % verimleri hesaplanmıştır.

3.2.2. Bitki özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Bitki özütlerinin hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite tayini için metanol özütü 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde %50 dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Su özütleri ise yine aynı konsantrasyonlarda distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Özütler antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılmadan önce 0,45µm çapındaki filtrelerden geçirilmiştir. DMSO ve distile su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerek DMSO gerekse distile su içinde çözülerek hazırlanan özütler koyu renkli ve kapaklı şişelerin içerisinde antimikrobiyal aktivite deneyleri yapılmaya kadar +4°C’ de muhafaza edilmiştir.

Agar kuyucuk yöntemi

Elde edilen bitki özütlerinin antimikrobiyal aktiviteleri Perez ve arkadaşlarının 1990’da yayınladıkları agar kuyucuk difüzyon yöntemi değiştirilerek çalışılmıştır. Bu yöntemde göre kullanılan bakteri kültürlerini aktif hale getirebilmek için Nutrient Broth (NB), maya kültürlerini aktiveştirebilmek için ise Saboroud Dekstroz Broth kullanılmıştır. Stok kültürlerden alınan bakteri kültürleri ayrı ayrı 4–5 ml sıvı vasatta süspanse edilerek, 2-5 saat arasında etüvde inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda izotonik sodyum klorür (%0,9 NaCl) çözeltisi kullanılarak kültürlerin 0.5 Mc farland ayarına uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar besiyerine, maya süspansiyonu ise Saboroud Dekstroz Agar besiyerine 100 µl drigarski özesi ile yayılmıştır. Ardından steril delgeç yardımıyla petride uygun aralıklarla 8 mm çapında kuyular açılmıştır. Kuyulara her bir özütten 100 µl (25, 50 ve 100 mg/ml) aktarılmıştır. Özüt eklenen petriyer bakteriler için 37°C’de 24 saat, mayalar için ise 30°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oluşan zon çapları (mm) ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca çözücü olarak kullanılan DMSO’da kuyucuklara konulmuş ve DMSO’nun mikroorganizmalar üzerinde etkisinin olup olmadığı denenmiştir. Çalışmalar en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi

Çalışmada kullanılan özütlerin MİK değerleri Zgoda ve arkadaşlarının, 2001’de yayınladıkları mikrodilüsyon yöntemi değiştirilerek çalışılmıştır. Metanol özütünün 0,195-100 mg/ml’lik konsantrasyon serileri yarı yarıya seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. 96’lık mikropalakların her bir kuyucuğuna 95µl NB konulmuştur ve üzerlerine 100 µl hacimde 0,195-100 mg/ml konsantrasyon aralığındaki özütler ilave edilmiştir. Son olarak, her kuyucuğa 5 µl mikroorganizma süspansiyonu konulmuştur. Son kuyucuğa pozitif kontrol olarak 195 µl besiyeri, 5 µl mikroorganizma konulmuştur. Kuyucuklardaki son hacim 200 µl olarak ayarlanmıştır. Etüve konmadan önce plakların üstü kapatılarak mikropalak okuyucuda 300 rpm’de 20 sn çalkalama yapılmış ve 600 nm’de etüve konmadan önce okuması yapılmıştır. Daha sonra plateler üstü kapatılarak 37°C’de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda tekrar 600 nm’de platelerin okuması yapılmış ve etüv öncesi ve sonrası sonuçlar kıyaslanmıştır. MİK değeri büyümenin olmadığı en düşük numune konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Testler en az iki tekrar çalışılmıştır.

3.2.3. Bitki özütlerinin antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Bitki özütlerinin hazırlanması

Bitki özütleri 2,2’-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yönteminde kullanılmak üzere 50-250 µg/ml konsantrasyonları arası çalışılmıştır. Fenolik içerik tayini için özütler 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bitki özütleri antioksidan aktivite deneyleri için kendi çözücülerinde hazırlanmıştır. Özütler koyu renkli şişelerde +4°C’de çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

DPPH yöntemi

Özütlerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri Blois (1958) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntem kararlı serbest radikal DPPH’nin elektron veya hidrojen atomları veren bir antioksidan varlığında bu kimyasal tarafından süpürülmesi ile

karakteristik mor rengin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Dolayısıyla antioksidan madde ne kadar güçlü etki gösterirse, DPPH'nin mor renginin o derece açılması beklenir. Deneyde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan özütlerden 1ml alınarak, 1ml %0,004'lük metanolik DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçülerek boş kontrole (1ml metanol+1ml DPPH) karşı değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), askorbik asit (AA) ve α - tokoferol kullanılmıştır. Özütlerin boş kontrol testleri ve pozitif kontrollerin absorbans değerleri kullanılarak DPPH'nin % inhibisyonu aşağıdaki formüle göre değerlendirilerek sonuçlar grafiğe alınmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / A_{\text{Kontrol}} \times 100$$

Toplam fenolik içerik miktar tayini

Özütlerin toplam fenolik içerik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak Singleton ve Rossi (1965) tarafından modifiye edilen Folin Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, gallik asit, su ve metanol özütlerinin çözeltileri 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. 100 μ l özüt üzerine 200 μ l Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildikten 3 dakika sonra 1 ml %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda numunelerin absorbansları 760 nm'de Shimadzu-1700 UV spektrofotometresinde ölçülmüştür. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak μ g gallik asite eşdeğer mg özüt olacak biçimde belirlenmiştir.

$$A = 0,0085 \text{ gallik asit } (\mu\text{g}) - 0,0209 \quad (R^2: 0,9858)$$

3.2.4. Bitki özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Bitki özütlerinin hazırlanması

Mevcut özütlerin hücre dizileri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile 10 mg/ml'lik stok özüt çözeltileri hazırlanmıştır. Metanol özütünü çözmek için gerekli miktarda tartılan özüt üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) ilave (mevcut en yüksek özüt konsantrasyonundaki oranı %1'i geçmeyecek şekilde) edilmiştir. Çözdürülen özüt üzerine azar azar besiyeri ilave edilerek çözdürme işlemine devam edilmiş ve stok çözelti gerekli hacme tamamlanmıştır. Su özütünde ise stok çözeltiler besiyeri içinde çözülmüştür. Hazırlanan stok çözelti 0,22 µm por çaplı, şırıngalı filtreden geçirilerek, steril edilmiş kapaklı tüplere alınmış ve denemelerde kullanılıncaya kadar +4 °C' de saklanmıştır.

Hücrelerin dondurulması

Hücre kültüründe kullanılan hücre dizilerini en doğru saklama yöntemi -86°C veya -150°C sıcaklıkta bekletmektir. Bu sıcaklık değerlerinde hücrenin organellerinin korunması için DMSO ya da gliserol gibi kryoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Çalışmada hemen kullanılmayacak hücreler RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri ile santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak pelet %10 DMSO ve %90 fetal sıgır serumu (FBS) içeren çözelti ile karıştırılarak dondurulmuştur. Dondurma işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Belirli hacimde cryotüplere paylaştırılan hücreler dondurulup sıvı azot tankında saklanmıştır.

Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmada belirtilen donmuş hücre dizileri 37°C'de su banyosunda çözdürülmüş ve ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile 2 kez yıkanmıştır. Hücreler besiyeri içinde süspanse edildikten sonra % 10 FBS, 100 U/ml streptomisin ve 100 µg/ml penisilin içeren RPMI-1640 vasatlarında gereksinime göre 25 ve 75 cm²'lik flasklarda %5 CO₂ varlığında 37°C'de

üretilmiştir. Hücrelerin besiyerleri iki üç gün aralıklarla değiştirilmiştir. Çalışma boyunca pH için özellikle önemli olduğundan her gün besiyerinin rengi, hücrelerin morfolojik görünümleri ve çoğalma hızları ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir.

Hücre kültürlerinin pasajlanması

Hücre kültürlerini pasajlamak amacıyla, hücrelerin besiyeri steril cam pastör pipetleriyle uzaklaştırılmıştır. Kalan serum ve ortamın da uzaklaştırılıp tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen steril PBS ile hücreler iki kez yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra flask içine 3 ml tripsin/EDTA konulmuştur. Farklı hücrelere ve farklı pasajlara göre değişen 2-5 dakika 37 °C’de % 5 CO_2 ’li etüvde bekletilmiş ve hücrelerin flasktan kaldırılması sağlanmıştır. Tripsin üzerine yaklaşık 6-7 ml besiyeri ilave edilerek tripsin aktivitesi sonlandırılmıştır. Flask içindeki hücreler 15 ml falkon tüp içine alınıp 20°C’ de, 2000 rpm’de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. Pipetaj ile hücreler süspansiyon haline getirilerek hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre sayımı

Hücreler pasajlanırken yeni kültüre istenen miktarda alınmak amacıyla hemositometrede sayılmıştır. Hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamında yapılmıştır. Sayım için hücre süspansiyonundan 50 µl alınıp tripan mavisiyle 100 µl’ye tamamlanmıştır. Karışım pipetle homojenize edilmiş ve lam üzerine 10 µl verilerek yayılmıştır. Hücreler thoma lamında görülen 4 büyük karede sayılmış ve hücrelerin aritmetik ortalamaları alınmıştır. Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğinde olduğundan sayım yaparken koyu mavi gözüken hücreler ölü, açık renkteki parlak hücreler canlı olarak sayılmıştır. Hücre sayımından sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edilmiştir.

Toplam canlı hücre sayısı = $A \times B \times C \times 10^4$

A = Hücre içeren besiyerinin hacmi (ml)

B = Seyreltme faktörü

C = Canlı hücrelerin ortalama sayısı

Hücre proliferasyon testi

Çalışmada kullanılan 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2, 5-difeniltetrazolium bromid (MTT) testi Ferrari ve ark. (1990) ve Ural ve ark. (2006) yöntemine göre yapılmıştır. Uygun vasat içindeki DU145 ve PC-3 hücrelerinden 100 µL alınarak kuyucuk başına 400/mm³ olacak şekilde 96'lık mikropatelere dağıtılmıştır. Sonra her kuyucuğa 100 µL vasat ve 20 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Plateler % 5 CO₂ varlığında 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Sonra hücrelerin üzerindeki vasat uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL isopropil-HCl eklendikten sonra plateler 4 saat karanlıkta, hava almadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Açığa çıkan renk 570 nm dalga boyunda okutulmuş ve canlı hücrelerin yüzde oranı ve yüzde sitotoksitesi hesaplanmıştır. MCF-7 ve HeLa hücreleri için ise kuyucuk başına 10 000 hücre ekilmiş ve aynı yöntem kullanılmıştır.

3.2.5. Hücre sağ kalım eğrisinin belirlenmesi

Hücre dizilerinin zamana bağlı olarak hücre canlılığını %50 oranında azaltan su veya metanol özütlerine verdikleri cevabın belirlenebilmesi amacı ile herbir kuyucuğa 5×10^4 hücre olacak şekilde hücreler 12 kuyucuklu kültür petrilere ekilmiştir. Daha sonra 0 ile 96 saat arasında su ve metanol özütleri hücrelere uygulanmıştır. Her 24 saatte bir tripsin ile kaldırılmış hücreler %0,4 tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak hemositometre lamında mikroskopta sayılmıştır.

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

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

3.2.7. Apoptotik hücrelerin DAPI boyama ile belirlenmesi

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre petrilere ekilmiştir. Bitki özütleriyle 24 saat inkübasyon sonrası PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücrelerin çekirdeklerini görebilmek için PBS içerisinde hazırlanan 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Moleküler Prob) ile 15 dakika boyunca hücreler boyanmıştır. Daha sonra floresan mikroskopunda incelenerek her bir görüş alanında 100 hücre olacak şekilde sayım yapılmıştır.

3.2.8. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi ($\Delta\psi\text{m}$)

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre petrilere ekilmiştir. Bitki özütleri hücreler üzerine 24 saat uygulanmıştır. Sonrasında PBS ile yıkanmış ve 4 nM 3, 3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC_6) floresan prob ile 15 dakika boyunca muamele edilmiştir. $\Delta\psi\text{m}$ değişimi floresan mikroskopta (Olympus, Japan) (Eksitasyon/emisyon = $488 \text{ nm} / 525 \text{ nm}$) gözlenmiştir.

3.2.9. Protein izolasyonu

Hücrelerden protein izole edebilmek amacıyla 6 kuyucuklu petrilere 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Bitki özütleri için seçilen dozların hücrelere uygulanmasından sonra protein izole edilmiştir. Hücre ekstraksiyon tamponu (%1 nonidet p40, %0,5 deoxycholate, % 0,1 SDS, 1mM Sodyum florid (NaF), 1mM sodyum orthovanadate (Na_3VO_4), taze eklenmek üzere 1 mM

fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT) ve 40 µl proteaz inhibitör) içerisine alınmış ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika 13200 rpm'de 4°C'de santrifüjlenmiştir. Örneklerin sıvı kısmı yeni bir tüpe alınarak 80°C'de saklanmıştır. Bradford yöntemi ile BSA standartları üzerinden çizilen standart grafiğe göre miktarları belirlenmiştir (Biorad, Bradford çözeltisi). Total proteinler 595 nm absorbans değerinde ölçülmüştür.

3.2.10. Western blotlama

Western blotlama yöntemi için protein miktarı 30 µg olacak şekilde örnekler seçilmiştir. Laemmli tamponu 2x (Sigma) ve 30 µg protein örnekleri 1:1 oranında karıştırılmış 95°C'de 5 dakika tutulmuştur. %12 sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforez (SDS-PAGE) için hazırlanarak, örnekler protein belirteçler ile birlikte 75 Volt'da 2.5 saat SDS içeren yürütme tamponunda yürütülmüştür. Örnekler daha sonra Polivinil diflorür (PVDF) membrana transfer edilmiştir. Süt tozu ile 2 saat oda sıcaklığında 3D orbital rotatorda çevrilmiştir. 5'er dakikalık 3 kez TBST ile yıkama sonrasında 1:1000 oranında seyreltilerek anti-PARP veya anti-kaspaz-9 ile +4°C'de gece boyunca immünoiblotlaması yapılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 1 saat süre ile uygun anti-tavşan ikincil antikor (Santa Cruz, 1:3000) ile muamele edilmiştir. Ardından 15'er dakikalık TBST ile iki yıkama ve 15 dakikalık PBS ile yıkama sonrasında oda sıcaklığına kemiluminisans madde (Lumilight, Roche) ile 1 dakika boyunca etkileştirilmiştir. Sonra streç filme sarılan membranlar, ışık geçirmez kasetlerde karanlık odaya götürülmüştür. Geliştirici ve sabitleyici film (Kodak X-OMAT) ile istenilen görüntü elde edilinceye kadar yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.2.11. İstatistiksel analiz

Çalışmada her bir deney en az 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar $\pm$ standart sapma (SD) larına göre ifade edilmiştir. İstatistiksel analizde gruplar arası karşılaştırmalar için SPSS 15 programındaki ANOVA ve X-Plot v. 2.81 programı kullanılarak gerektiği hallerde student's *t* test uygulanarak değerlendirmeler yapılmıştır. Deney grupları arasında pozitif veya negatif korelasyonu tespit etmek amacıyla SPSS 15 programındaki Pearson korelasyon testi kullanılmıştır. Bulunan değerin $p < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Özütlerin % Verimleri

Çalışmada kullanılan *Achillea teretifolia* bitkisinden elde edilen metanol ve su özütünün yüzde verimleri aşağıdaki gibi hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

$$\text{Yüzde Verim (g/g)} : \frac{\text{Ekstraksiyon sonrası elde edilen kuru özüt}}{\text{Başlangıçta tartılan kuru bitki miktarı}} \times 100$$

Çizelge 4.1. *A. teretifolia* özütlerinin % verimleri

Özütler	% Verim (g/g)
Metanol	16,29
Su	14,38

4.2. Özütlerin Antimikrobiyal Etkileri

4.2.1. Agar kuyucuk yöntemi

Metanol ve su özütünün antimikrobiyal etkisine agar kuyucuk yöntemiyle bakılmıştır. Bunun için her bir özütten 25, 50 ve 100 mg/ml olacak şekilde 3 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak %50 DMSO kullanılmıştır. Bakteriler için pozitif kontrol olarak 10 µg/ml ampisilin ve 30 µg/ml kloramfenikol, mayalar için 50 µg/ml ketokonazol kullanılmıştır. Su ve metanol özütlerine karşı mikroorganizmaların oluşturdukları zon çapları Çizelge 4.2.-4.4.'te verilmiştir. Buna göre, su özütü bakteri ve mayalara karşı aktif bulunmamıştır (Çizelge 4.2.-4.4.).

Çizelge 4.2.'ye bakıldığında 25 mg/ml metanol özütünün sırasıyla *S. aureus* ATCC 25923 ($15,6 \pm 0,4$ mm), *B. subtilis* ATCC 6633 ($12,6 \pm 0,8$ mm) ve *B.cereus* NRRL-B-3711 ($10,6 \pm 0,5$ mm) bakterilerine karşı aktif olduğu ve bakterilerin zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0,05$) olduğu gözlenmiştir. Etkili olan *B. cereus* bakterisinin pozitif kontrol ampisilin ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$), kloramfenikol ile anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda özütün *B. cereus* bakterisine karşı standart ampisilinle hemen hemen aynı zon çapını gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.3.'e bakıldığında 50 mg/ml metanol özütünün sırasıyla *S. aureus* ATCC 25923 ($16,6 \pm 0,5$ mm), *B. subtilis* ATCC 6633 ($16,0 \pm 0,0$ mm), *B. cereus* NRRL-B-3711 ($14,6 \pm 0,5$ mm) ve *P.vulgaris* ATCC 8427 ($11,3 \pm 0,5$ mm) bakterilerine karşı etkili olduğu görülmüştür. 50 mg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal etkili bakterilerin zon çapı ile ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerinin zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p < 0,05$) belirlenmiştir. *B. subtilis* ve *S. aureus* bakterilerinin bu konsantrasyonda aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Özütün *P. vulgaris* bakterisine karşı da antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4.'e bakıldığında ise 100 mg/ml metanol özütünün sırasıyla *S. aureus* ($18,3 \pm 0,5$ mm), *B. subtilis* ($17,5 \pm 1,5$ mm), *B. cereus* ($17,0 \pm 0,8$ mm) ve *P. vulgaris* ($13,0 \pm 0,5$ mm) bakterilerine karşı etkili olduğu görülmektedir. Bu konsantrasyonda bakterilerin zon çapları arasındaki anlamlı farkın azaldığı *S. aureus*, *B. subtilis* ve *B. cereus* zon çapları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak metanol özütünün bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin konsantrasyona bağlı olduğu saptanmıştır. Konsantrasyon arttıkça metanol özütünün aktivitesinin arttığı ve bu sonucun istatistiksel olarak anlamlılığının azaldığı gözlenmiştir. Pozitif kontrollerle 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlu metanol özütü ile kıyaslandığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Özütün denenen mayalara karşı antifungal

bir aktivitesi mevcut değildir. Negatif kontrol olarak kullanılan %50 DMSO'nun mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal bir etkisi görülmemiştir. Metanol özütünün konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkisi Resim 4.1.-4.3.'te gösterilmiştir. Resim 4.1-4.3'te 25, 50 ve 100 mg/ml özüt konsantrasyonlarında zon çaplarının konsantrasyon artışıyla birlikte büyüdüğü dolayısıyla özütün *B.cereus* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin konsantrasyona bağlı artış gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 4.2. 25 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları antimikrobiyal zon çapları (mm)
DMSO* :%50 Dimetilsülfoksit, Amp** : Ampisilin (10µg/ml), C :Kloramfenikol (30µg/ml), Keto***: Ketokonazol (50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı. One Way Anova testine göre her bir sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,05).

Mikroorganizmalar /Özütler (25 mg/ml)	Metanol Özütü	Su Özütü	DMSO *	Amp **	C#	Keto ***
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	-	-	20,3±0,5 ^a	26,6±1,1 ^a	Ç
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	R	10,5±0,7 ^b	Ç
<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-3711	10,6±0,5 ^a	-	-	10,0±1,0 ^b	23,4±0,7 ^c	Ç
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,6±0,8 ^b	-	-	30,3±0,5 ^c	31,0±1,0 ^d	Ç
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,6±0,4 ^c	-	-	35,0±0,0 ^d	29,6±0,5 ^d	Ç
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	R	R	Ç
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	-	-	-	R	30,3±0,5 ^d	Ç
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	30,0±0,0 ^c	29,0±1,0 ^d	Ç
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	Ç	Ç	30,3±0,5 ^a
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	-	-	-	Ç	Ç	29,0±0,5 ^a

Çizelge 4.3. 50 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları antimikrobiyal zon çapları (mm)
DMSO* :%50 Dimetilstilfoksit, Amp** : Ampisilin (10µg/ml), C :Kloramfenikol (30µg/ml), Keto*** : Ketokonazol (50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı. One Way Anova testine göre her bir sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,05).

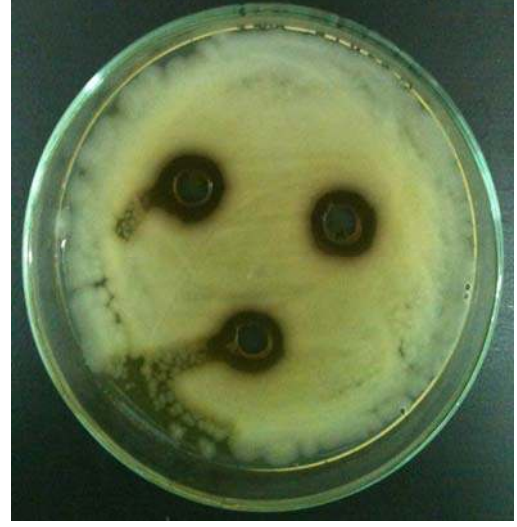
Mikroorganizmalar /Özütler (50 mg/ml)	Metanol Özütü	Su Özütü	DMSO*	Amp**	C#	Keto***
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	-	-	20,3±0,5 ^a	26,6±1,1 ^a	Ç
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	R	10,5±0,7 ^b	Ç
<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-3711	14,6±0,5 ^a	-	-	10,0±1,0 ^b	23,4±0,7 ^c	Ç
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,0±0,0 ^b	-	-	30,3±0,5 ^c	31,0±1,0 ^d	Ç
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16,6±0,5 ^b	-	-	35,0±0,0 ^d	29,6±0,5 ^d	Ç
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	R	R	Ç
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	11,3±0,5 ^c	-	-	R	30,3±0,5 ^d	Ç
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	30,0±0,0 ^c	29,0±1,0 ^d	Ç
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	Ç	Ç	30,3±0,5 ^a
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	-	-	-	Ç	Ç	29,0±0,5 ^a

Çizelge 4.4. 100 mg/ml konsantrasyondaki özütlerin patojen mikroorganizmalara karşı oluşturdıkları antimikrobiyal zon çapları (mm)
DMSO* :%50 Dimetilsülfoksit, Amp** : Ampisilin (10µg/ml), C :Kloramfenikol (30µg/ml), Keto*** : Ketokonazol
(50µg/ml), R: Dirençli, Ç: Çalışılmadı. One Way Anova testine göre her bir sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasında anlamlı bir fark vardır (p<0,05).

Mikroorganizmalar /Özütler (100 mg/ml)	Metanol Özütü	Su Özütü	DMSO*	Amp**	C#	Keto***
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-	-	-	20,3±0,5 ^a	26,6±1,1 ^a	Ç
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	R	10,5±0,7 ^b	Ç
<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-3711	17,0±0,8 ^a	-	-	10,0±1,0 ^b	23,4±0,7 ^c	Ç
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17,5±1,5 ^a	-	-	30,3±0,5 ^c	31,0±1,0 ^d	Ç
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,3±0,5 ^a	-	-	35,0±0,0 ^d	29,6±0,5 ^d	Ç
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	R	R	Ç
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	13,0±0,5 ^b	-	-	R	30,3±0,5 ^d	Ç
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	30,0±0,0 ^c	29,0±1,0 ^d	Ç
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	Ç	Ç	30,3±0,5 ^a
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	-	-	-	Ç	Ç	29,0±0,5 ^a



Resim 4.1. 25 mg/ml metanol özütünün *B. cereus* bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.2. 50 mg/ml metanol özütünün *B. cereus* bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi



Resim 4.3. 100 mg/ml metanol özütünün *B. cereus* bakterisi üzerine antimikrobiyal etkisi

4.2.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sonuçları

Çalışmada antimikrobiyal etkili bulunan metanol özütünün minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri Çizelge 4.5.'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Metanol özütünün MİK değerleri

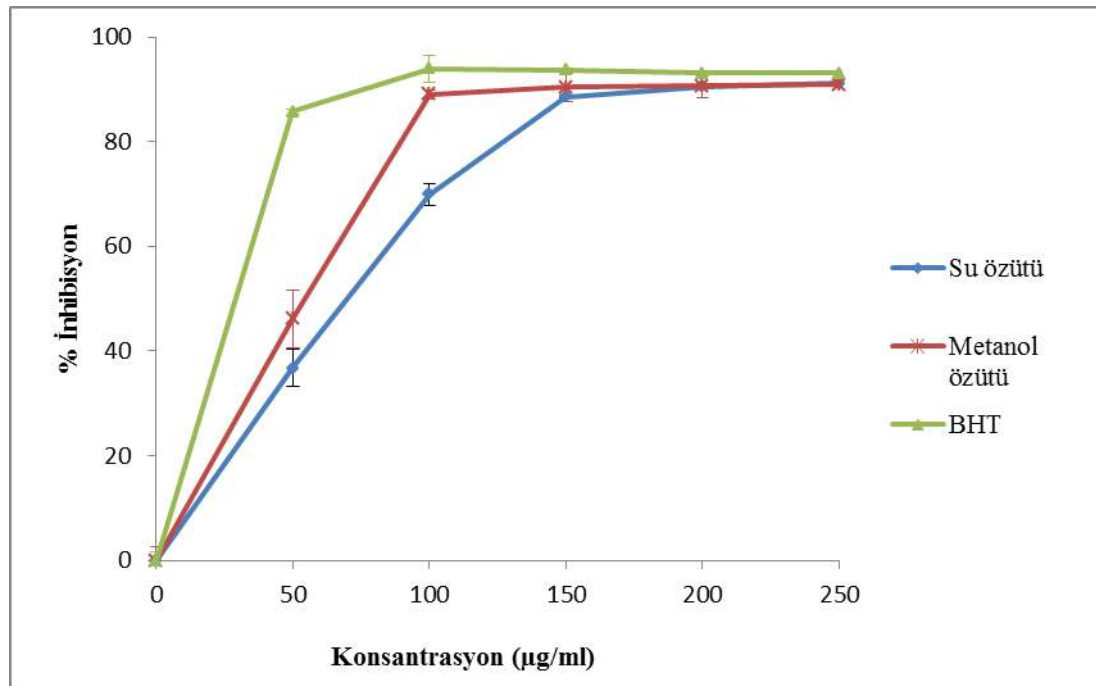
Mikroorganizmalar	Metanol özütü
	MİK (mg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-3711	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	50

Çizelge 4.5.'e göre bitkinin metanol özütünün en etkili olduğu bakterinin *S. aureus* (6,25 mg/ml) olduğu sonra sırasıyla *B. cereus* (12,5 mg/ml), *B. subtilis* (25 mg/ml) ve *P. vulgaris* (50 mg/ml) olduğu tespit edilmiştir. MİK sonuçları agar kuyucuk yöntemiyle kıyaslandığında 100 mg/ml konsantrasyonda zon çapı en küçük olan *P. vulgaris*'in (13,0±0,5 mm) MİK değerinin en yüksek (50 mg/ml), zon çapı en büyük olan *S. aureus* bakterisinin MİK değerinin en düşük olduğu (6,25 mg/ml) tespit edilmiştir. Pearson korelasyon testine göre MİK ve agar kuyucuk yöntemleri arasında %87,5 negatif korelasyon tespit edilmiştir.

4.3. Özütlerin Antioksidan Etkileri

4.3.1. DPPH yöntemi

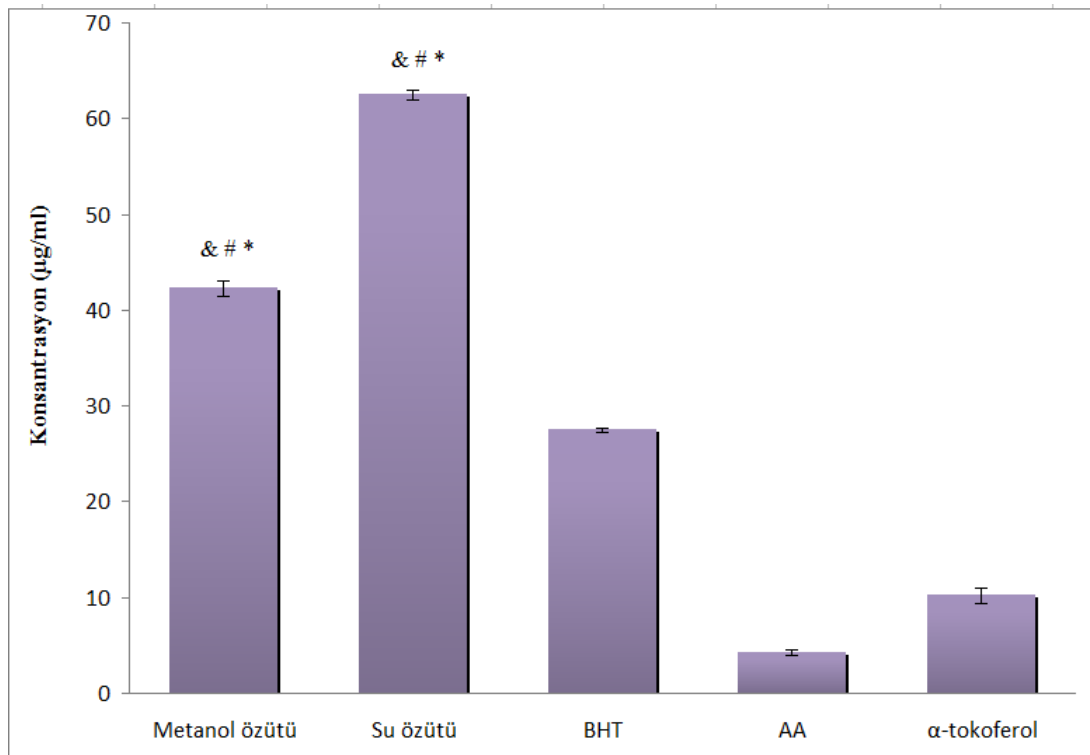
Çalışmada 50-250 µg/ml konsantrasyonları arası hazırlanan bitkinin metanol ve su özütünün ve pozitif kontrol BHT'nin %0.004'lük DPPH çözeltisinin renk açılım kapasitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontroller (AA ve α - tokoferol) 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml konsantrasyonda çalışılmıştır. Bitkinin metanol ve su özütü ile pozitif kontrol BHT'nin DPPH süpürücü aktivitesi Şekil 4.1.' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Bitki özütlerinin DPPH süpürücü aktivitesi

Şekil 4.1' e göre 250 µg/ml konsantrasyondaki su, metanol özütü ve BHT'nin radikal süpürücü aktiviteleri sırasıyla %91,10±0,48, %90,94±1,06 ve %93,13±0,40 olarak bulunmuştur. 50 µg/ml konsantrasyondaki AA ve α -tokoferol standartlarının radikal süpürücü aktiviteleri ise sırasıyla %98,14±1,42 ve %94,12±2,59 olarak tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri özütün veya standardın serbest radikali süpürdüğü % inhibisyon değerinin yarısına karşılık gelen konsantrasyon değeri olarak

belirlenmiştir. Şekil 4.2.'de özütlerin IC_{50} değerleri görülmektedir. Şekil 4.2.'ye göre özütlerin standartlara göre IC_{50} değerlerinin daha yüksek olduğu dolayısıyla DPPH süpürücü aktivitelerinin standartlara göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Özütlerin ve standartların DPPH süpürücü aktivitesi en yüksekten en düşüğe sırasıyla şu şekildedir: AA (IC_{50} : $4,3 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$) > α -tokoferol (IC_{50} : $10,2 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$) > BHT (IC_{50} : $27,5 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$) > Metanol özütü (IC_{50} : $42,3 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$) > Su özütü (IC_{50} : $62,5 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$).

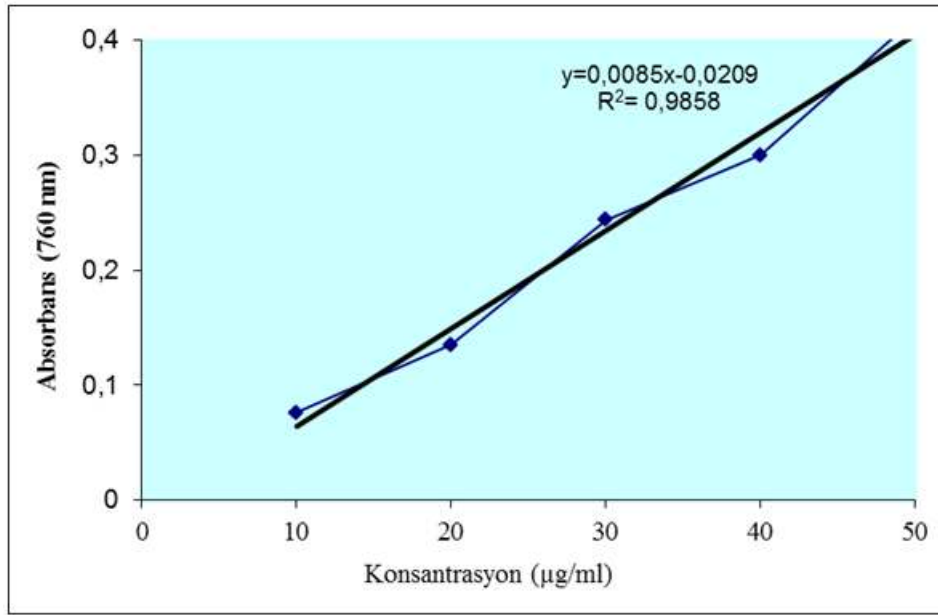


Şekil 4.2. Özütlerin ve standartların (BHT, AA ve α -tokoferol) DPPH süpürücü aktivitelerinin IC_{50} değerleri. Sonuçlar kontrolün yüzdesi $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. (n = 3, &: $P < 0,05$ BHT'ye karşı istatistiksel fark, #: $P < 0,05$ AA'ya karşı istatistiksel fark, *: $P < 0,05$ α -tokoferole karşı istatistiksel fark).

4.3.2. Toplam fenolik içerik tayini

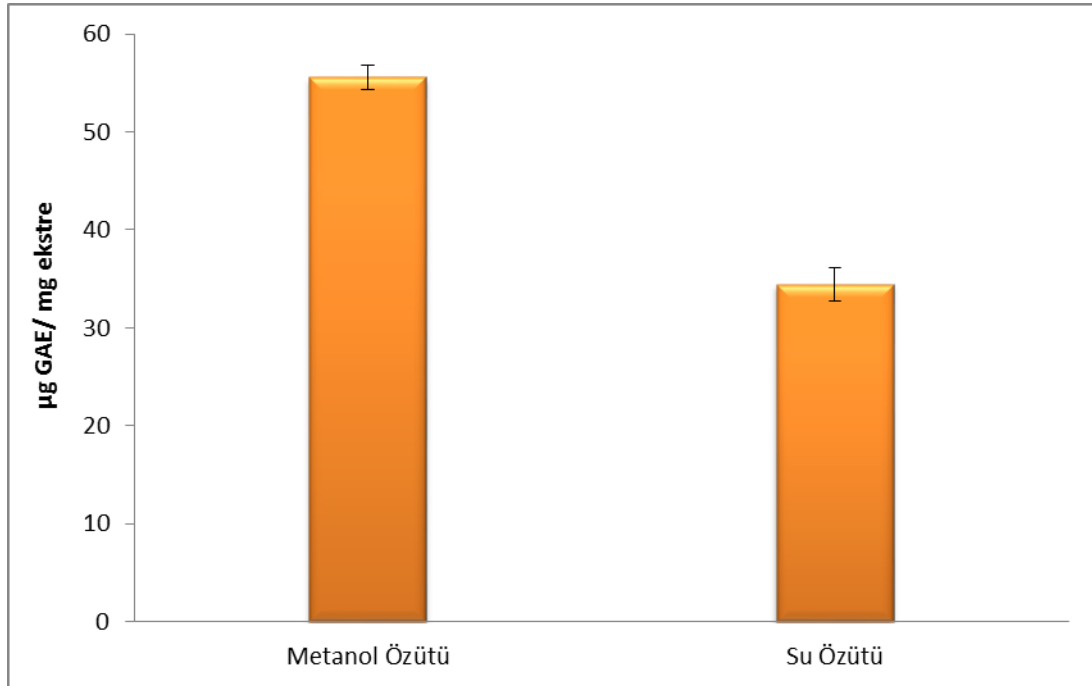
Özütlerin toplam fenolik içerik miktarları μg gallik asite eşdeğer mg özüt olacak biçimde aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).

$$A = 0,0085 \text{ gallik asit } (\mu\text{g}) - 0,0209 \quad (R^2: 0,9858)$$



Şekil 4.3. Gallik asit eşdeğer eğrisi

Gallik asit eğrisine göre hesaplanan metanol ve su özütünün fenolik içerikleri Şekil 4.4.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Bitki özütlerinin fenolik içerik miktarları

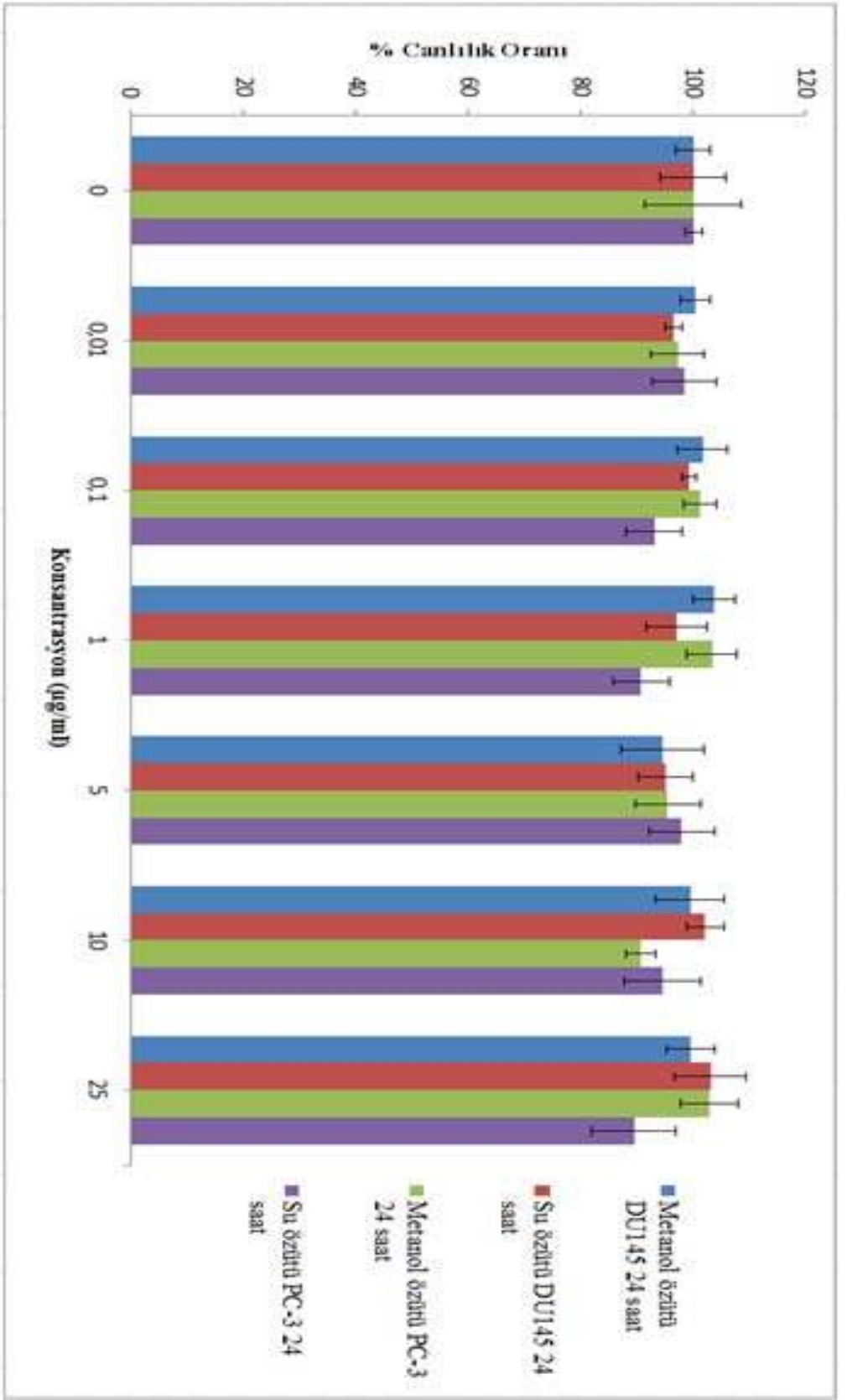
Şekil 4.4'te bitki özütlerinin fenolik içerik miktarlarına bakıldığında metanol özütünün ($55,60 \pm 1,25$ µg GAE/mg özüt) su özütüne ($34,45 \pm 1,74$ µg GAE/mg özüt) göre daha fazla fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Sonuçlar DPPH radikali süpürücü aktivitesi daha yüksek olan metanol özütünün ($IC_{50}: 42,3 \pm 0,8$ µg/ml) toplam fenolik içeriğinin de yüksek olduğunu göstermektedir. Özütlerin fenolik içeriğiyle IC_{50} değerleri arasında Pearson korelasyon testine göre % 99,2 negatif korelasyon tespit edilmiştir.

4.4. Özütlerin Sitotoksik Etkileri

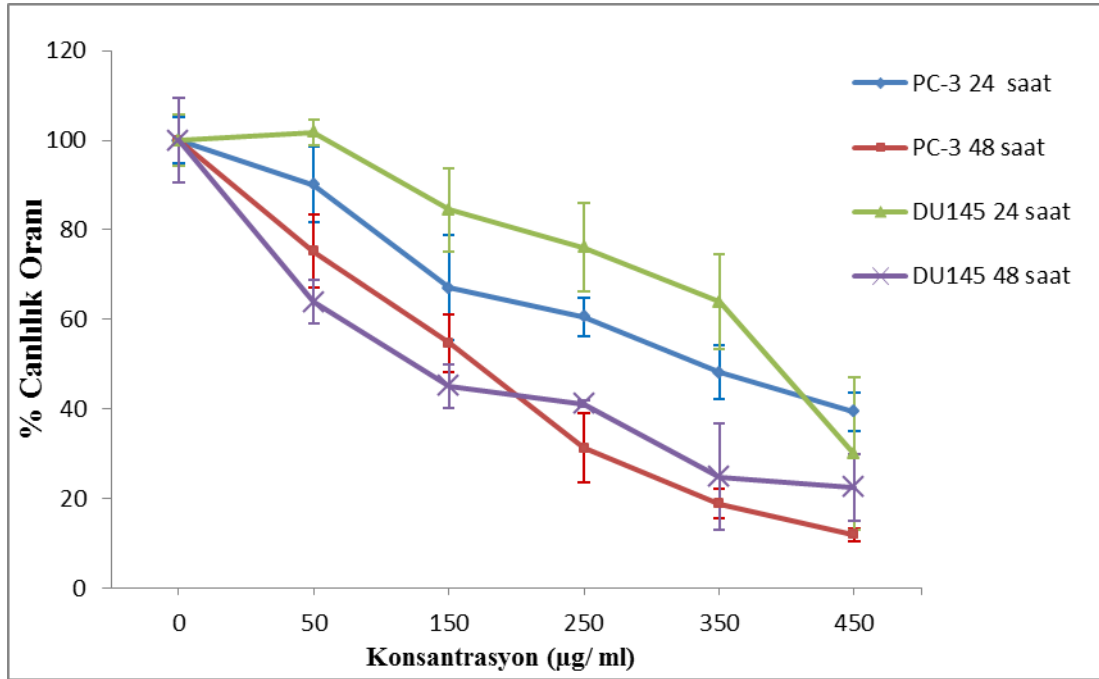
4.4.1. Özütlerin prostat kanserli hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

Çalışmada kullanılan bitkinin su ve metanol özütleri 0,01-25 µg/ml konsantrasyonları arasında PC-3 ve DU145 prostat kanserli hücre dizileri üzerine 24 saat uygulanmıştır. Su ve metanol özütünün farklı konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.

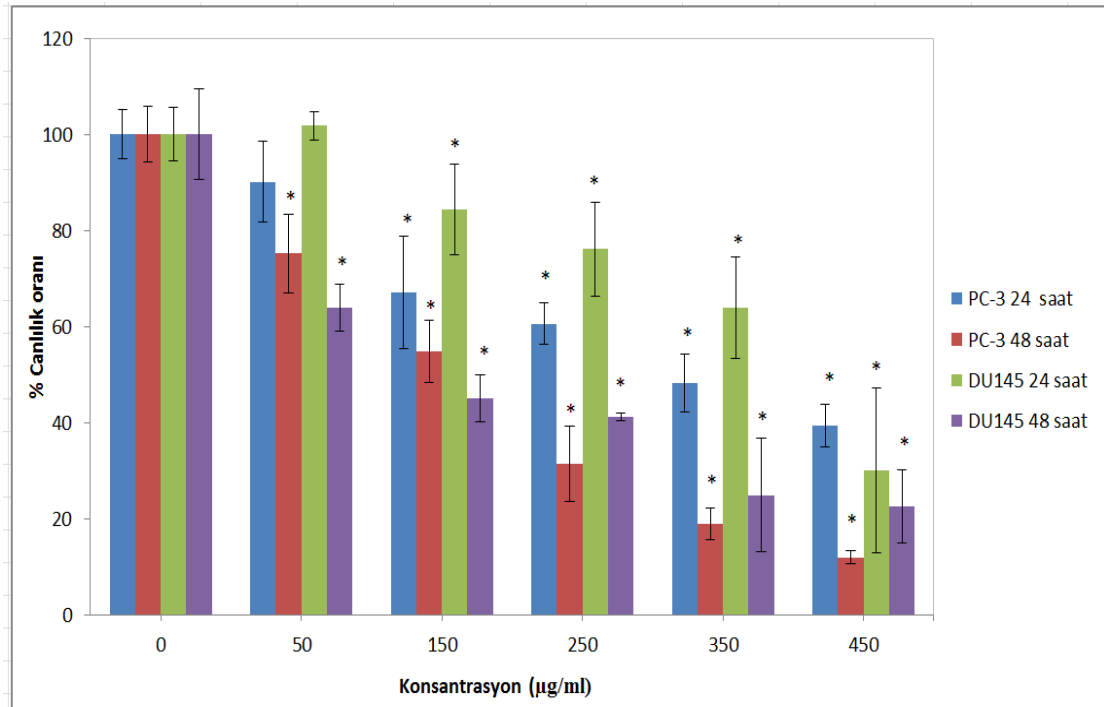
Ayrıca, özütlerin androjen bağımsız DU145 ve PC-3 hücre dizileri için süreye (24 ve 48 saat) ve daha yüksek doza bağlı etkileri de incelenmiştir. Bu hücre dizileri üzerine farklı konsantrasyonlardaki bitkinin su (0,6-1,4 mg/ml) ve metanol (50-450 µg/ml) özütleri uygulanmıştır. Şekil 4.6.-4.9.'da özütlere maruz kalan kanserli hücre dizilerin nispi hücre canlılıkları gösterilmiştir.



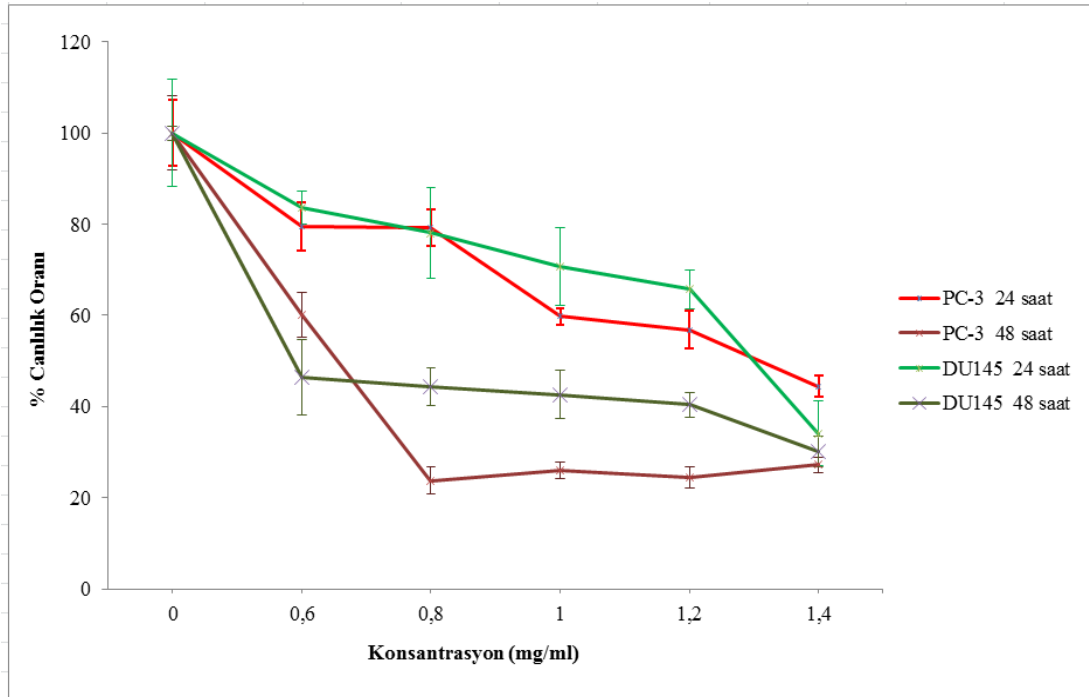
Şekil 4.5. 0,01-25 µg/ml konsantrasyonları arasında bitkinin su ve metanol özütlere maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı



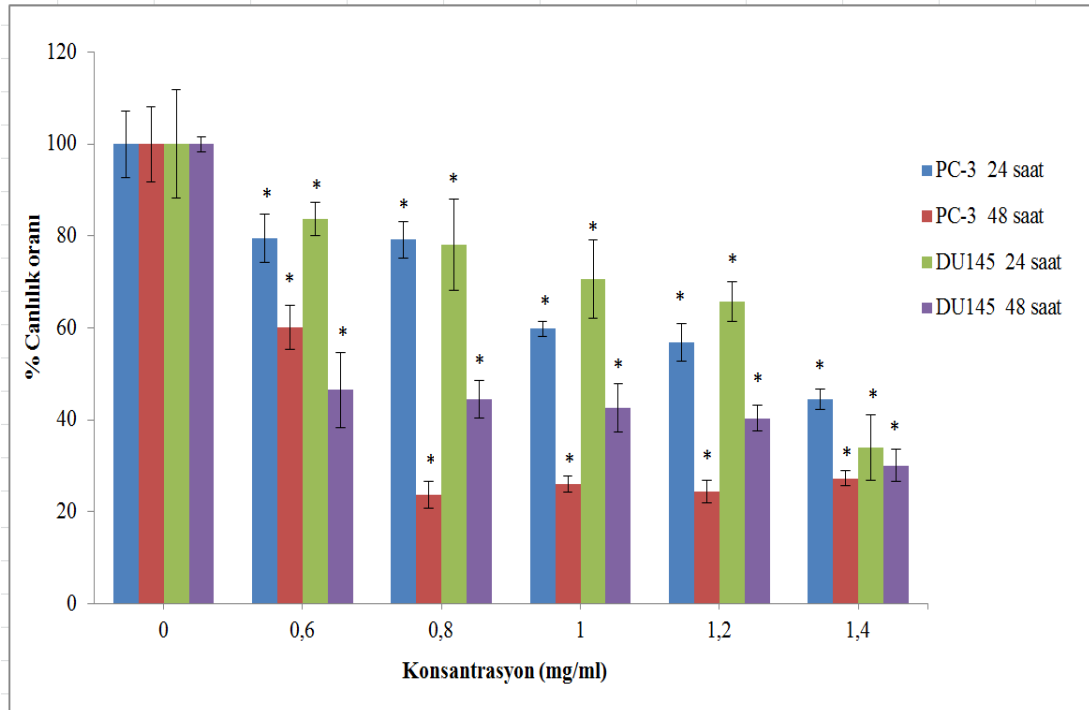
Şekil 4.6. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı.



Şekil 4.7. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi ± SD olarak ifade edilmiştir. (n = 6, *: P<0,05 kontrole karşı istatistiksel fark).



Şekil 4.8. 0,6-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı.



Şekil 4.9. 0,6-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan DU145 ve PC-3 hücrelerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. (n = 6, *: P<0,05 kontrole karşı istatistiksel fark).

Şekil 4.5.'e göre prostat kanseri hücre dizileri üzerine su ve metanol özütünün 0,01-25 µg/ml konsantrasyonlarda sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.

Şekil 4.6. ve 4.7.'ye göre, DU145 hücre dizisi metanol özütü ile 24 ve 48 saat muamele edildiğinde 50 µg/ml'de sırasıyla %101,78±2,93 ve %63,95±4,92, 150 µg/ml'de sırasıyla %84,43±9,42 ve %45,07±4,94, 250 µg/ml'de sırasıyla %76,12±9,75 ve %41,20±5,53, 350 µg/ml'de sırasıyla %63,89±10,60 ve %24,85±11,86, 450 µg/ml'de sırasıyla %30,03±17,15 ve %22,48±7,55 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. 24 saat sürede 50 µg/ml konsantrasyondaki özütün DU145 hücre dizisi üzerine kontrole göre anlamlı bir fark içeren sitotoksik bir etkisi görülmemiştir ($p>0,05$). Buna rağmen 24 ve 48 saat sürede uygulanan diğer konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir fark ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Şekil 4.6.- 4.7.'ye göre, PC-3 hücre dizisi metanol özütü ile 24 ve 48 saat muamele edildiğinde 50 µg/ml'de sırasıyla %90,11±8,45 ve %75,19±8,21, 150 µg/ml'de sırasıyla % 67,07±11,73 ve % 54,73±6,44, 250 µg/ml'de sırasıyla %60,58±4,27 ve % 31,32±7,82, 350 µg/ml'de sırasıyla % 48,18±6,00 ve % 18,88±3,34, 450 µg/ml'de sırasıyla %39,37± 4,38 ve %11,88±1,35 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. 24 saat sürede 50 µg/ml konsantrasyondaki özütün PC-3 hücre dizisi üzerine kontrole göre anlamlı bir fark içeren sitotoksik bir etkisi görülmemiştir ($p>0,05$). Buna rağmen 24 ve 48 saat sürede uygulanan diğer konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir fark ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Şekil 4.8. ve 4.9.'a göre, DU145 hücre dizisi su özütü ile 24 ve 48 saat muamele edildiğinde 0,6 mg/ml'de sırasıyla %83,61±3,64 ve %46,46±8,2, 0,8 mg/ml'de sırasıyla %78,10±10,02 ve %44,43±4,13, 1 mg/ml'de sırasıyla %70,67±8,57 ve %42,66±5,20, 1,2 mg/ml'de sırasıyla %65,71±4,21 ve %40,38±2,76, 1,4 mg/ml'de %34,05±7,09 ve %30,10±3,45 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Özütün sitotoksik etkisi uygulanan tüm süre ve konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) içermektedir.

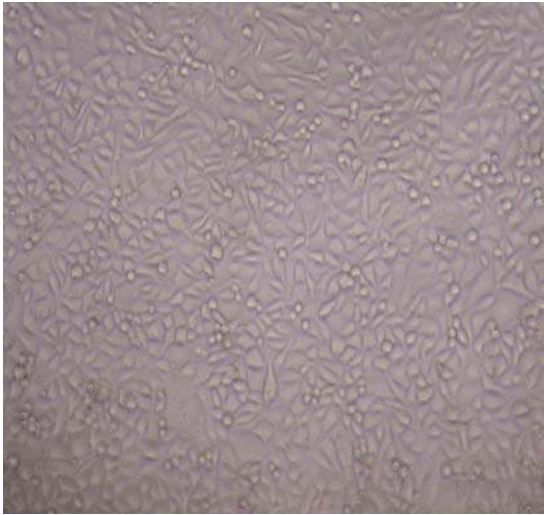
Şekil 4.8. ve 4.9.'a göre, PC-3 hücre dizisi su özütü ile muamele edildiğinde 0,6 mg/ml'de 24 ve 48 saatte sırasıyla %79,50±5,26 ve % 60,11±4,86, 0,8 mg/ml'de sırasıyla %79,19±3,98 ve % 23,70± 2,96, 1 mg/ml'de sırasıyla % 59,77±1,73 ve % 25,99±1,76, 1,2 mg/ml'de sırasıyla %56,81± 4,14 ve %24,39± 2,34, 1,4 mg/ml'de % 44,46± 2,28 ve % 27,25±1,68 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Özütün sitotoksik etkisi uygulanan tüm süre ve konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) içermektedir.

Çalışma sonucunda metanol ve su özütünün konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları tespit edilmiştir. Her iki özüt için her iki hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik etkinin 48 saatte daha da artış gösterdiği görülmüştür. Metanol özütünün 24 ve 48 saatte DU145 hücre dizisi üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 0,40±0,05 mg/ml ve 0,14±0,04 mg/ml olarak tespit edilirken, PC-3 hücre dizisi üzerine 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 0,35±0,06 mg/ml ve 0,17±0,07 mg/ml olarak belirlenmiştir. Su özütünün ise DU145 hücre dizisi için 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 1,30±0,05 mg/ml ve 0,58±0,04 mg/ml iken PC-3 hücre dizisi için IC_{50} değerleri sırasıyla 1,30±0,03 mg/ml ve 0,66±0,03 mg/ml olarak tespit edilmiştir. PC-3 ve DU145 hücre dizileri üzerinde 24 ve 48 saat sürede metanol özütünün IC_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık ($p>0,05$) bulunamamıştır. Dolayısıyla metanol özütü PC-3 ve DU145 hücre dizilerine aynı oranda etkilidir. Su özütünün IC_{50} değerleri 24 saatte PC-3 ve DU145 hücre dizileri için anlamlı bir fark içermezken, 48 saat sürede anlamlı bir fark tespit edilmiştir. 48 saatte su özütünün DU145 hücre dizisi üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar metanol özütünün su'ya göre 24 ve 48 saatte daha etkili olduğunu göstermektedir. Metanol özütünün PC-3 hücre dizisi üzerine etkisi kontrol grubu, 50 µg/ml ve 450 µg/ml özüt ile 24 saat muamele edilen grup için Resim 4.4.-4.6.'da gösterilmektedir.



Resim 4.4. PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı. Işık mikroskobunda hücre morfolojileri belirlenmiştir.



Resim 4.5. 50 µg/ml metanol özütü varlığında PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı. Işık mikroskobunda hücre morfolojileri belirlenmiştir.



Resim 4.6. 450 µg/ml metanol özütü varlığında PC-3 hücre dizisinin 24 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığı. Işık mikroskobunda hücre morfolojileri belirlenmiştir.

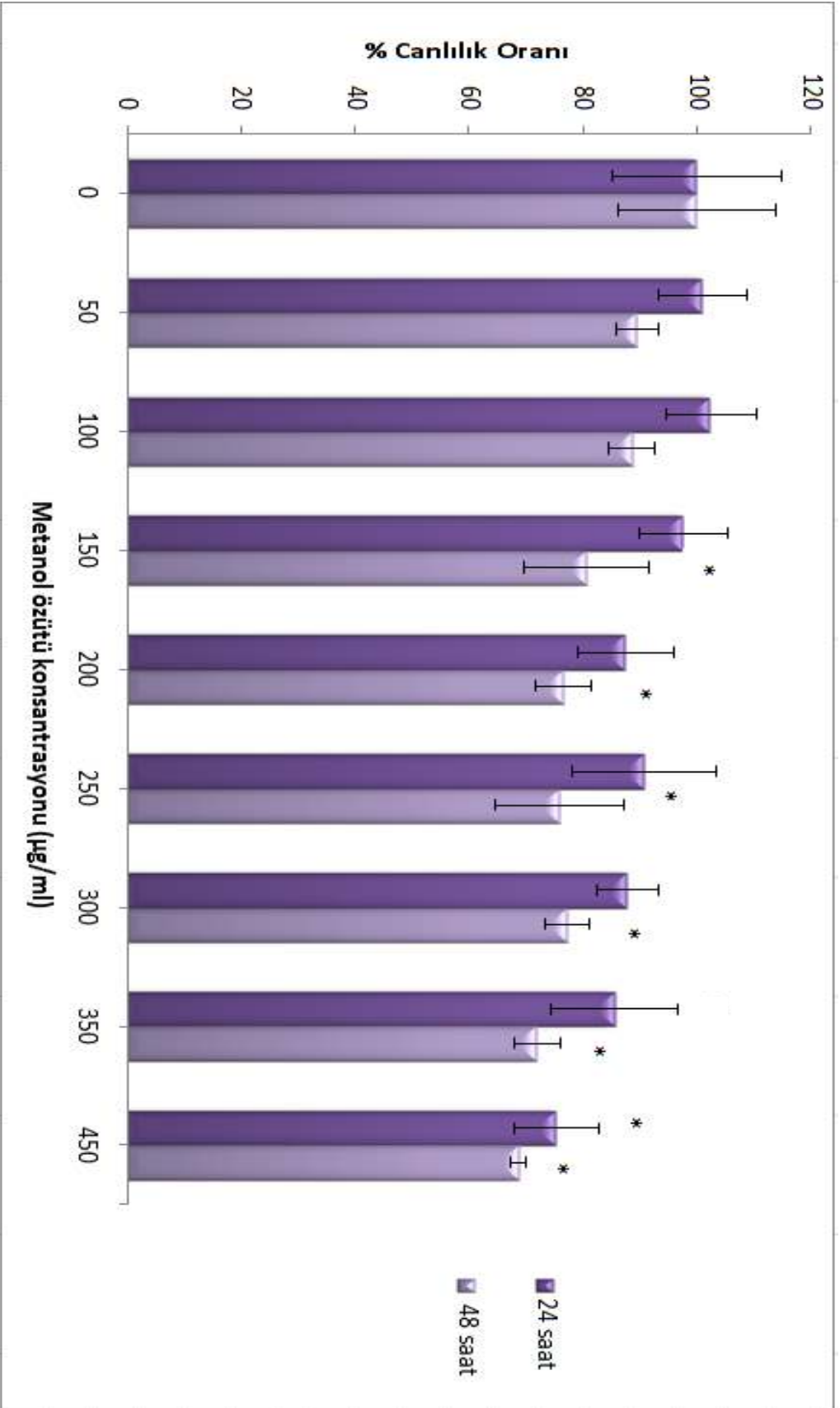
4.4.2. Özütlerin insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Çalışmada kontrol grubu olarak sağlıklı gönüllülerin dişlerinden elde edilen insan gingival fibroblast hücre dizisi (HGF) kullanılmıştır. HGF'nin deneyde kullanımı için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na başvurulmuş ve etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul belgesi Ek-1'de (sayfa 133) sunulmuştur. DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerine 24 ve 48 saat süre ile uygulanan metanol (50-450 µg/ml) ve su (0,1-1,4 mg/ml) özütü konsantrasyonları HGF üzerine de uygulanmıştır. Su ve metanol özütlerine maruz kalan HGF'nin 24 ve 48 saat süredeki nispi hücre canlılığı Şekil 4.10.- 4.11.'de gösterilmektedir.

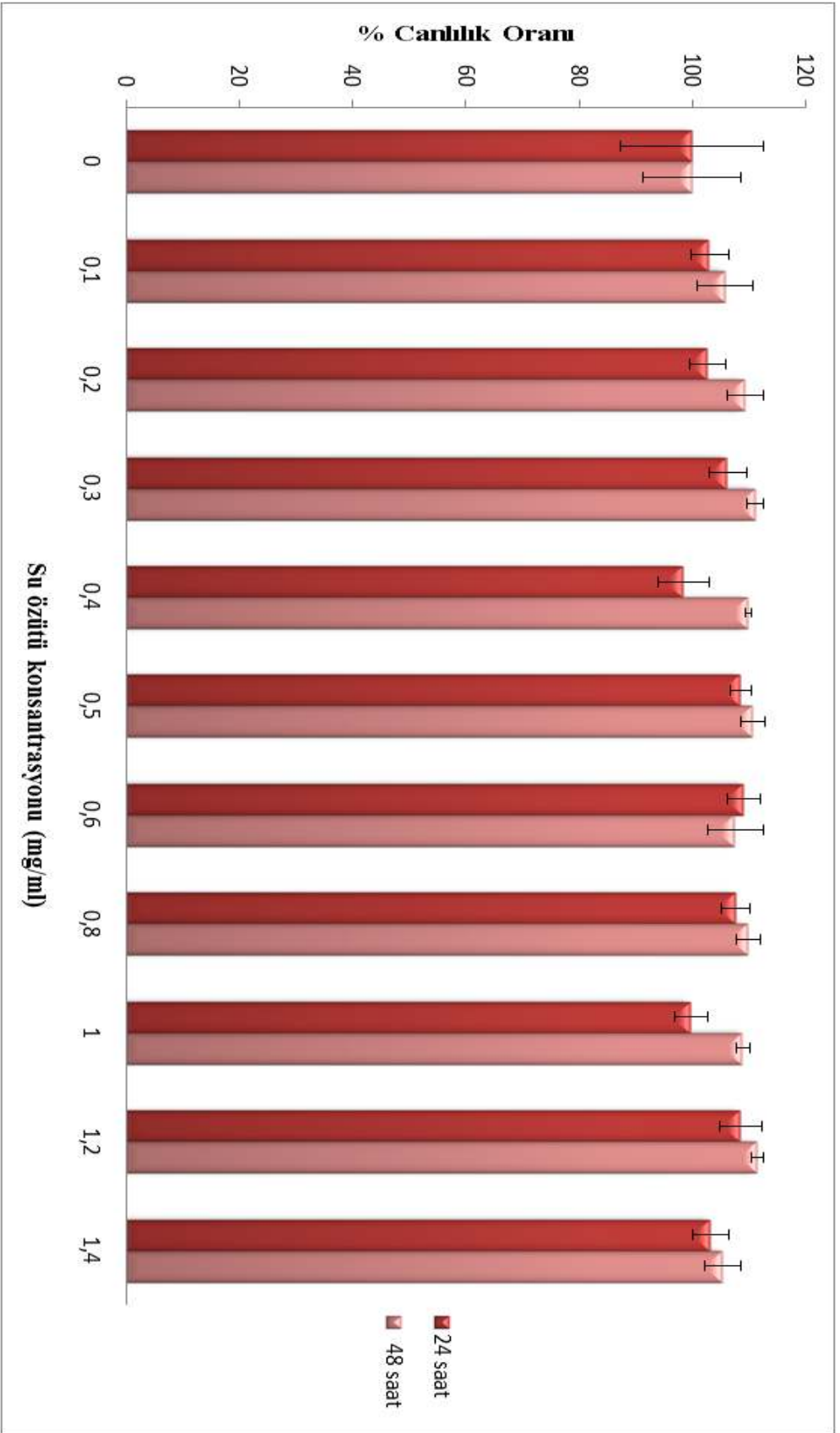
Şekil 4.10.'a göre 24 saatte metanol özütünün gingival fibroblastlar üzerine 50 -350 µg/ml konsantrasyon aralığında sitotoksik etkisi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) içermemektedir. Dolayısıyla bu konsantrasyonlar arasında metanol özütünün HGF üzerine sitotoksik bir etkisi yoktur. Buna karşın 150-350 µg/ml özüt aralığında DU145 ve PC-3 hücrelerine karşı kontrole göre metanol özütü anlamlı bir fark içermektedir ($p<0,05$) (Şekil 4.12.). 24 saat süre 450 µg/ml'de metanol özütü ile muamele edilen HGF hücre canlılığının $75,38\pm 8,13$ olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Özütün 48 saat sürede ise 150-450 µg/ml konsantrasyonları arasında HGF hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Bu konsantrasyon aralığında özütü muamele edilen HGF hücre canlılığının $89,56\pm 4,04$ -% $68,67\pm 7,22$ arasında değiştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak metanol özütünün 24 saatte 450 µg/ml'de ve 48 saat sürede doz artışıyla birlikte HGF hücrelerinin proliferasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Buna rağmen kanser hücre dizileri metanol özütüne HGF kontrol grubundan çok daha fazla duyarlıdır (Şekil 4.12.).

0,1-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan HGF hücrelerinin nispi hücre canlılığı Şekil 4.11.'de gösterilmektedir. Buna göre su özütünün HGF hücreleri üzerine uygulanan konsantrasyonlar ve sürede nispi hücre canlılığını azaltmadığı, dolayısıyla HGF üzerine sitotoksik bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

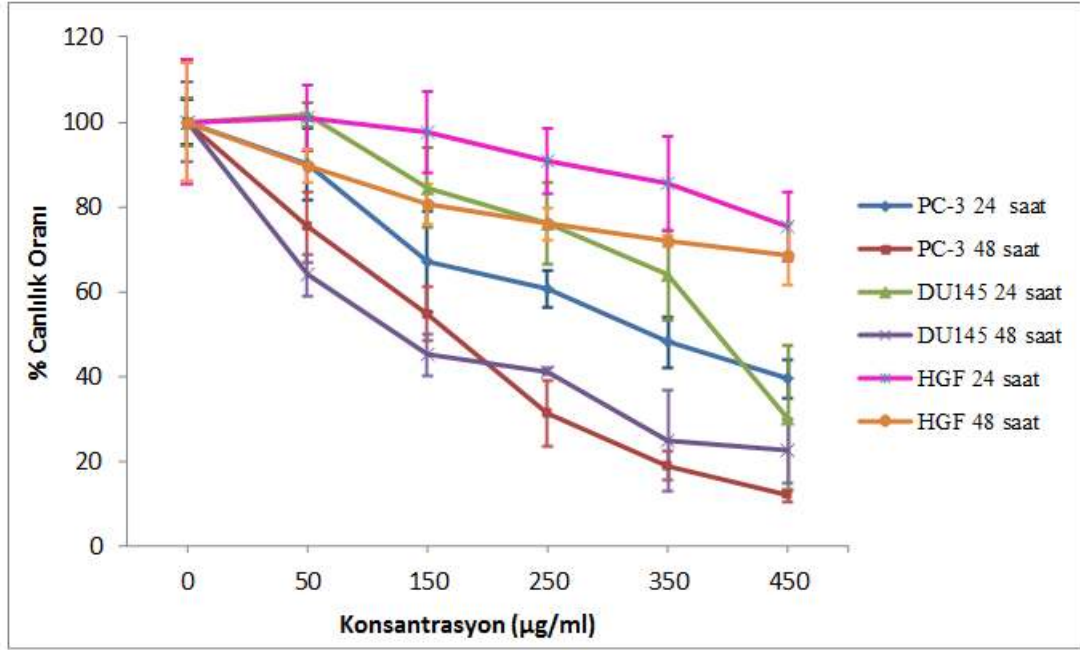
Şekil 4.12 ve 4.13'te ise 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF ve kanserli hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı görülmektedir. Özütün 24 saatte 50-450 µg/ml konsantrasyon aralığında DU145, PC-3 ve HGF hücre canlılığına etkisi sırasıyla $101,78 \pm 2,93$ - $30,03 \pm 17,15$, $90,11 \pm 8,45$ - $39,37 \pm 4,38$ ve $101,01 \pm 7,64$ - $75,38 \pm 8,13$ aralığında tespit edilmiştir. Özütün kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine sitotoksik etkisi malign olmayan HGF hücrelerine göre her konsantrasyonda ve iki farklı sürede kendi içinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.13'te 50 µg/ml özüt ile 24 saat süre muamele edilen DU145 hücre dizisi hariç diğer kanser hücre dizileri ile HGF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Diğer tüm konsantrasyonlarda HGF grubuna göre kanser hücre dizilerinin sitotoksik etkisinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



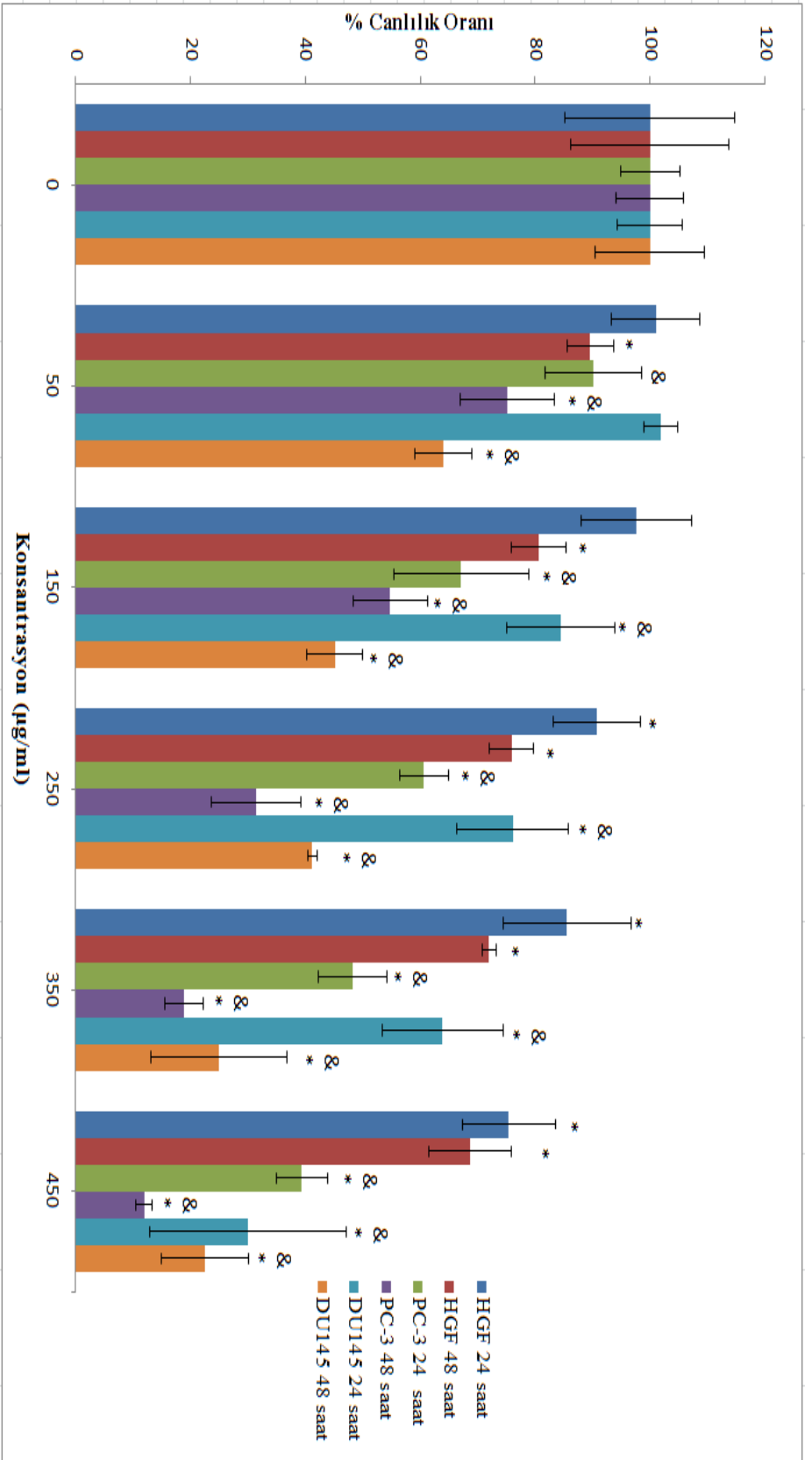
Şekil 4.10. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF hücrelerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. (n = 6), *: $P < 0,05$ kontrole karşı istatistiksel fark).



Şekil 4.11 . 0,1-1,4 mg/ml konsantrasyonları arasında su özütüne maruz kalan HGF hücrelerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. (n = 6), *: $P < 0,05$ kontrole karşı istatistiksel fark).



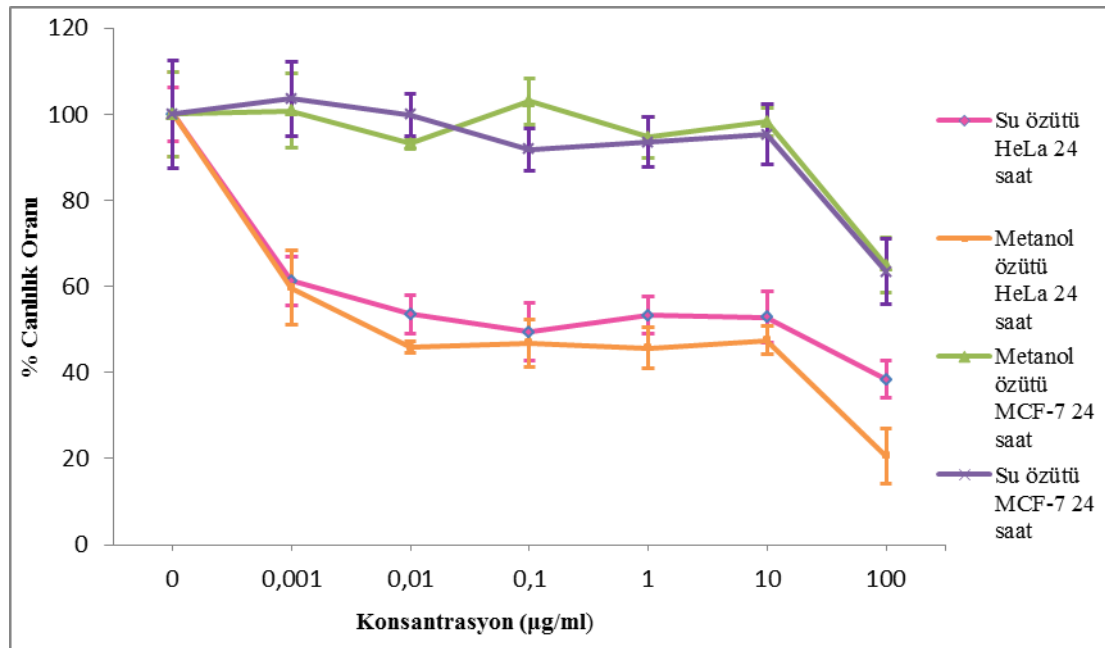
Şekil 4.12. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF, DU145 ve PC-3 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi±SD olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.13. 50-450 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol özütüne maruz kalan HGF, DU145 ve PC-3 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. (n = 6, *: P<0,05 kontrole karşı istatistiksel fark, &: P<0,05 HGF'ye karşı istatistiksel fark).

4.4.3. Özütlerin HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi

Su ve metanol özütünün HeLa ve MCF-7 hücre dizilerine olan etkisi 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında 24 saat sürede çalışılmıştır. Şekil 4.14. ve 4.15'te 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol ve su özütlerine maruz kalan HGF ve kanserli hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı gösterilmektedir.

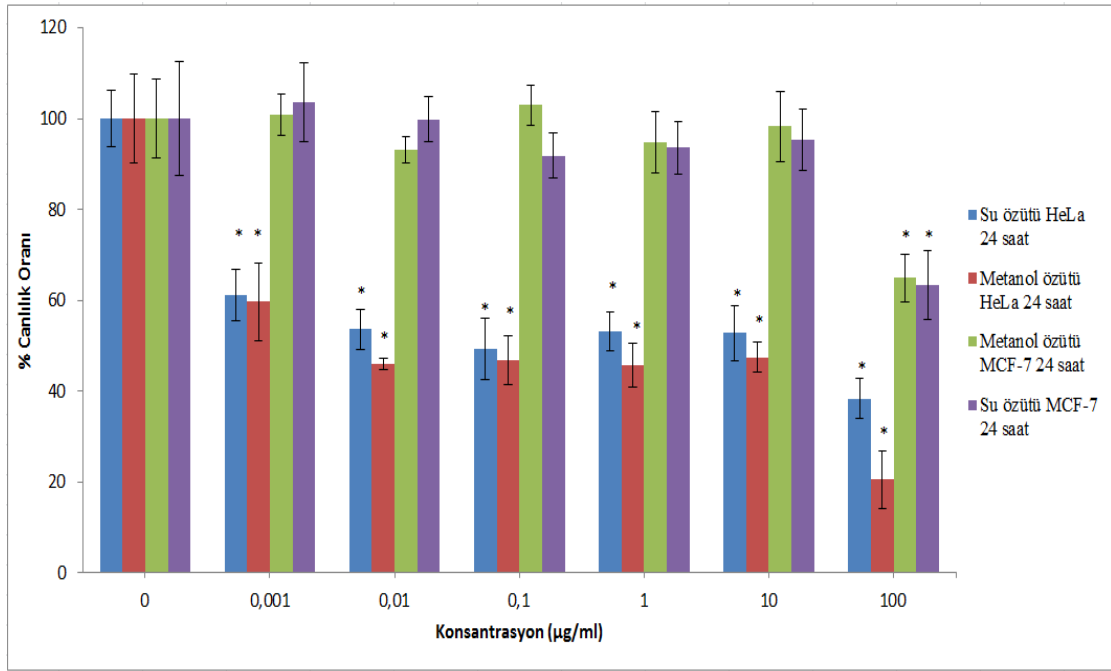


Şekil 4.14. 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol ve su özütlerine maruz kalan HGF, HeLa ve MCF-7 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi ± SD olarak ifade edilmiştir.

Şekil 4.14 ve 4.15'e göre HeLa hücre dizisi su ve metanol özütleri ile 24 saat muamele edildiğinde 0,001 µg/ml'de sırasıyla %61,26±5,63 ve %59,67±8,63, 0,01 µg/ml'de sırasıyla %53,60±4,45, %45,89±1,21, 0,1 µg/ml'de sırasıyla %49,38±6,73 ve %46,84±5,44, 1 µg/ml'de sırasıyla %53,26±4,27 ve %45,68±4,82, 10 µg/ml'de sırasıyla %52,79±6,00 ve %47,5±3,34, 100 µg/ml'de ise sırasıyla %38,41±4,38 ve %20,59±6,35 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

MCF-7 hücre dizisi ise su ve metanol özütü ile 24 saat muamele edildiğinde 0,001 µg/ml'de sırasıyla %103,63±8,69 ve %100,81±4,63, 0,01 µg/ml'de sırasıyla

%99,86± 4,92 ve %93,19±2,93, 0,1 µg/ml'de sırasıyla %91,84±4,94 ve %102,97±4,42, 1 µg/ml'de sırasıyla %93,56±5,76 ve %94,68±6,75, 10 µg/ml'de sırasıyla %95,36±6,86 ve %98,25±7,60, 100 µg/ml'de ise sırasıyla %63,46±7,55 ve %64,90±5,15 hücre canlılık oranı tespit edilmiştir.

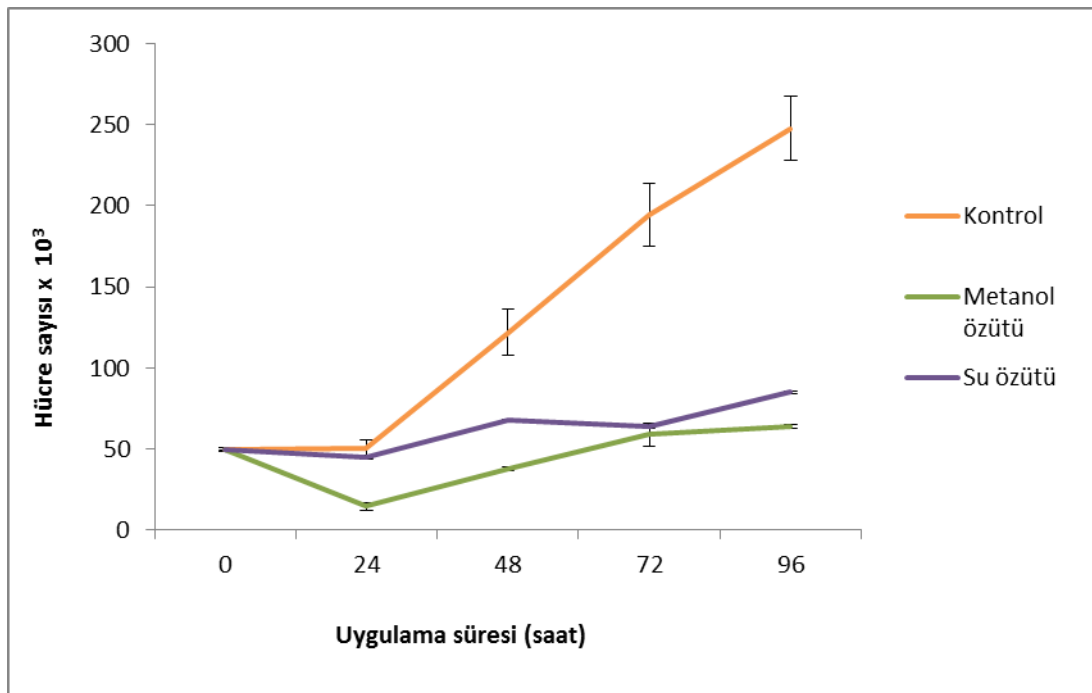


Şekil 4.15. 0,001-100 µg/ml konsantrasyonları arasında metanol ve su özütlerine maruz kalan HGF, HeLa ve MCF-7 hücre dizilerinin nispi hücre canlılığı. Sonuçlar kontrolün yüzdesi ± SD olarak ifade edilmiştir (n = 6, *: P<0,05, kontrole karşı istatistiksel fark).

Çalışmada metanol ve su özütünün konsantrasyona bağlı olarak HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkili oldukları belirlenmiştir. Özütlerin HeLa hücre dizisi üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Her iki özütün MCF-7 hücre dizisine karşı IC₅₀ değerleri >100 µg/ml olarak saptanmıştır. HeLa hücre dizisine karşı ise su ve metanol özütlerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,10±0,05 µg/ml ve 0,0055±0,0040 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak HeLa hücre dizisinde metanol özütünün su özütüne göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14-4.15). Çalışılan kanser hücre dizileri içinde özütlere en duyarlı olan hücre dizisi HeLa'dır.

4.5. Özütlerle Muamele Edilen HeLa ve MCF-7 Hücre Dizilerinin Sağ Kalım Eğrilerinin Belirlenmesi

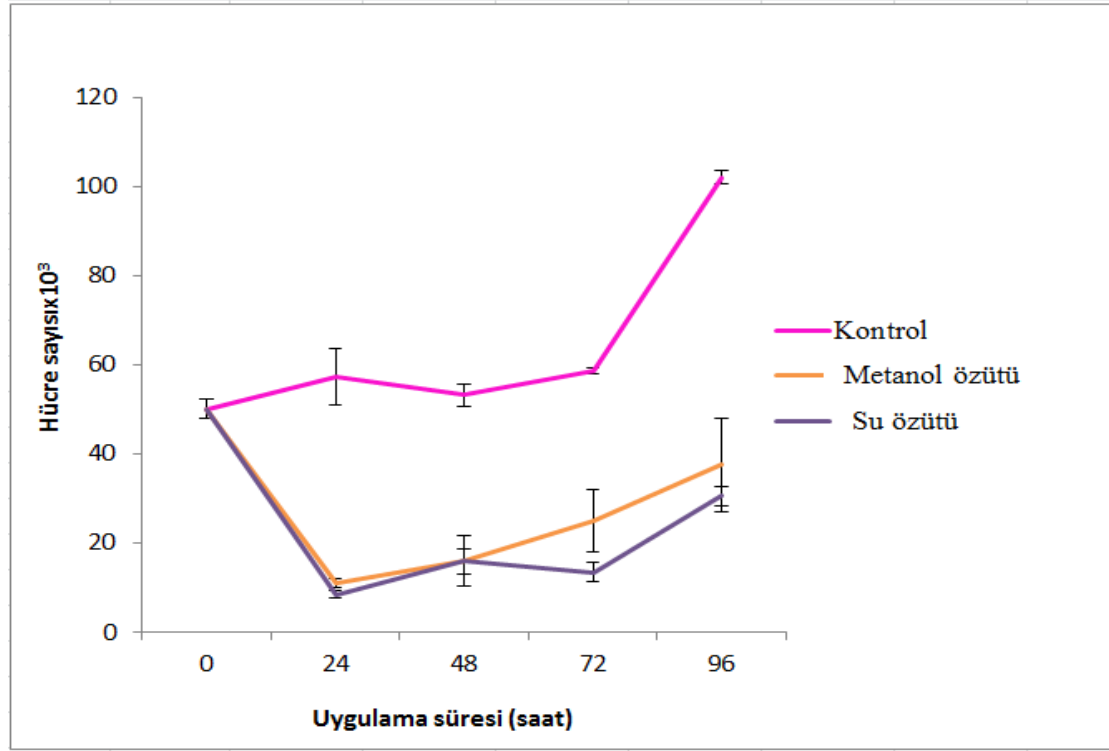
Çalışmada MCF-7 ve HeLa hücre dizilerinin hücre canlılığını %50 oranında azaltan su ve metanol özütleri 0, 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile hücrelerle muamele edilerek hücrelerin sağ kalımları belirlenmiştir. Şekil 4.16. ve 4.17.'de özütlerin varlığında MCF-7 ve HeLa hücre dizilerinin zamana bağlı sağ kalım grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.16. Özütlerin varlığında tripan mavisi uygulanan HeLa hücrelerinin sağ kalım grafiği. Süre: 24-96 saat. Her nokta iki tekrarın sonucudur.

Şekil 4.16'ya göre özütlerle muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre sayısının 24 saatten sonra düzenli olarak artış gösterdiği görülmektedir. Metanol ve su özütlerine bakıldığında ise 24 saatten sonra hücre sayılarında artış olduğu dolayısıyla özütlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin azaldığı görülmektedir. 24 saat özüt uygulaması diğer sürelerle göre etkilidir. Her iki özütün de 24 saatten sonra hücre sağ kalımı artmaktadır. Grafikte metanol özütünün suya göre 24 saatte HeLa hücre sayısını daha fazla azalttığı görülmektedir. Sonuç olarak HeLa hücre

dizilerinin sağ kalımı üzerinde 24 saat sürede metanol özütünün suya göre daha etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.17. Özütlerin varlığında tripan mavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin sağ kalım grafiği. Süre: 24-96 saat. Her nokta iki tekrarın sonucudur.

Şekil 4.17'ye göre özütlerle muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre sayısının 24 saatten sonra artış gösterdiği görülmektedir. Metanol ve su özütü ile muamele edilen hücrelerde ise 24 saatte hücre sayılarının azaldığı bu süreden sonra zamana bağlı olarak hücre sayılarında artış olduğu görülmektedir. Dolayısıyla metanol ve su özütlerinin HeLa hücrelerinin sağ kalımını azaltmada 24 saatte daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Grafikte su ve metanol özütlerinin 24 saatteki hücre sayısına etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak iki özütte 24 saatte kontrole göre hücre sağ kalımını azaltmaktadır.

4.6. Özütlerle Muamele Edilen HeLa Hücre Dizisinin Floresan Boyamaları

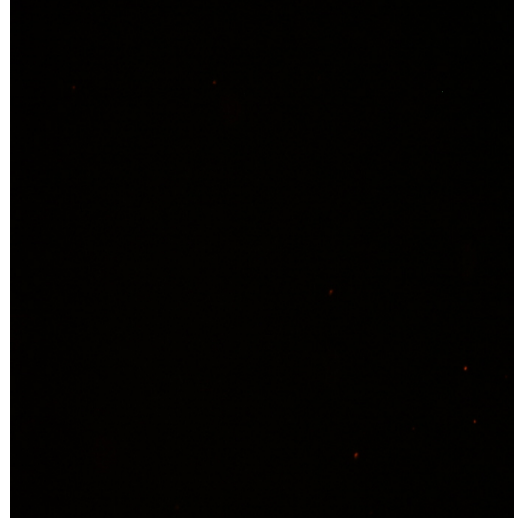
Çalışmada HeLa hücre dizileri 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol ve su özütleri ile 24 saat muamele edilmiştir. Ardından özütlerin HeLa üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla propidium iyodür (PI), 3',3'- 6,4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC₆) floresan boyamaları yapılmıştır. Görüntülerin 4x ve 10x büyütmede hem ışık mikroskobunda hem de floresan mikroskobunda fotoğrafları çekilmiştir.

4.6.1. Propidium iyodür (PI) boyama

PI boyası membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyamaktadır. 10 µg/ml konsantrasyondaki su ve metanol özütü ile muamele edilmemiş ve edilmiş HeLa hücre dizisindeki ölü hücreler PI boyama ile belirlenmiştir. Resim 4.7.-4.18'de PI ile boyanmış 10 µg/ml konsantrasyondaki özütle muamele edilen ve edilmeyen HeLa hücrelerinin 4x ve 10x ışık ve floresan mikroskop görüntüleri görülmektedir. PI ile boyanan hücreler ölü ve kırmızı renkte boyanan hücrelerdir. Resim 4.8. ve 4.10'a bakıldığında özütle muamele edilmeyen HeLa hücrelerinin 4x ve 10x floresan mikroskop görüntülerinde ölü hücre bulunmadığından fotoğraf karesi siyah olarak gözlenmiştir. Buna karşın Resim 4.12 -4.18'de metanol ve su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinde ölü hücrelerin PI boyama ile kırmızı renk verdiği görülmektedir. Resim 4.14'teki floresan mikroskobunda 10x büyütmede metanol özütünde görülen ölü hücre sayısının, Resim 4.18'deki su özütü ile muamele edilene göre daha fazla olduğu görülmektedir. Buna göre 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol özütünün su özütüne göre HeLa hücre canlılığını daha fazla etkilediği söylenebilir.



Resim 4.7. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.8. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



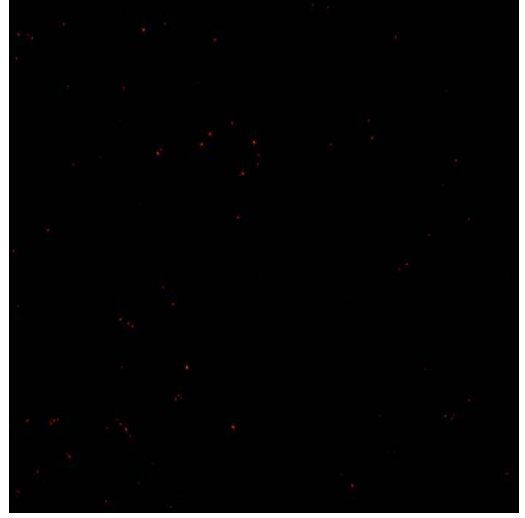
Resim 4.9. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.10. PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



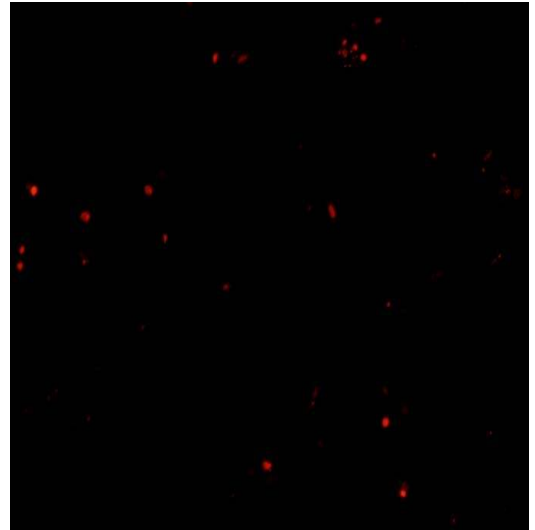
Resim 4.11. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



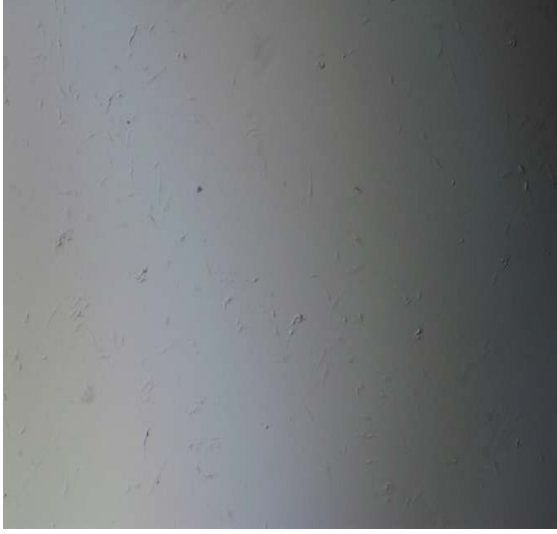
Resim 4.12. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



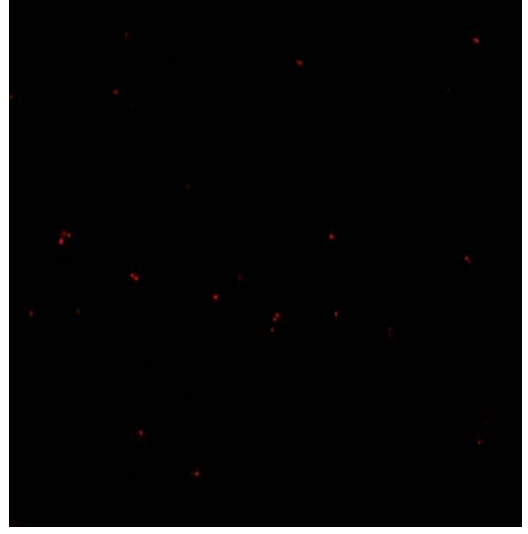
Resim 4.13. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.14. Metanol özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



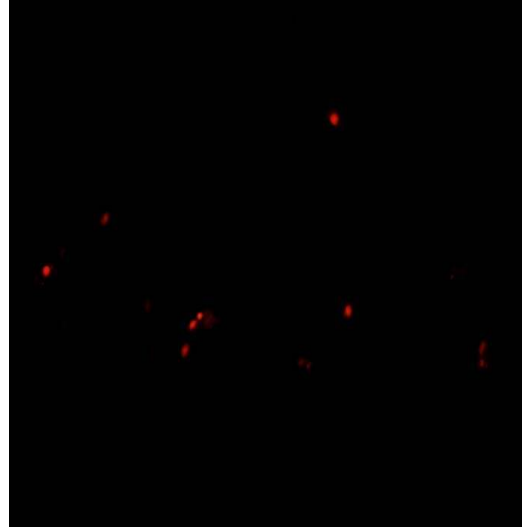
Resim 4.15. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.16. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.



Resim 4.17. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.18. Su özütü ile muamele edilen PI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. PI ile boyanan ölü hücreler floresan mikroskopta kırmızı renkte görülür.

4.6.2. DAPI boyama

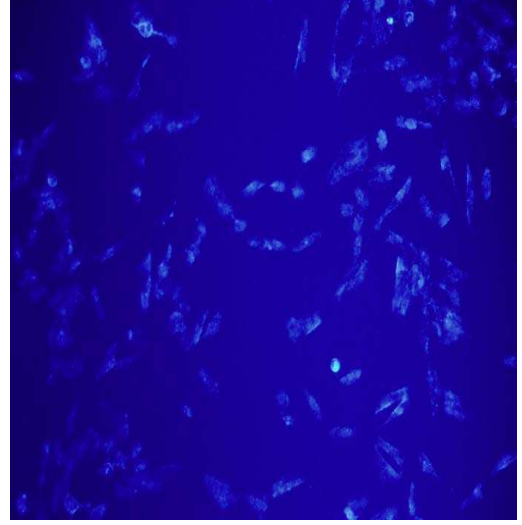
Çalışmada 10 µg/ml konsantrasyondaki su ve metanol özütü ile 24 saat muamele edilmiş ve edilmemiş HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkiyi belirlemek için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiş ve apoptotik nükleuslu hücreler floresan mikroskop alanında parlak mavi lekeli olarak görülmüştür. Resim 4.19-4.26'da DAPI ile boyanmış su ve metanol özütü ile muamele edilen ve edilmeyen HeLa'nın 10x ve 40x büyütmede ışık ve floresan mikroskop görüntüleri görülmektedir.

Resim 4.20. ve 4.26.'da DAPI ile boyanan mavi çekirdekli HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. Resim 4.20 ve 4.22'deki HeLa hücrelerinde parlak mavi lekeli olmayan hücreler normal nükleuslu olup kontrol grubunda fazla miktarda bulunmaktadır. Resim 4.23. ve 4.24'e bakıldığında metanol özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinde parlak boyanmış hücreler apoptotik nükleuslu hücrelerdir. Özüt uygulanmayan HeLa'ya göre özüt uygulanan hücrelerde mikroskop alanında görülen apoptotik nükleusların fazlalığı dikkat çekmektedir. Resim 4.25. ve 4.26.'da ise su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinde parlak mavi renkli hücreler apoptotik nükleuslu olup alanda metanol özütü uygulanan HeLa'ya göre sayıca çok daha az görülmektedir.

Sonuç olarak HeLa hücre dizisinde DAPI boyamada özüt uygulanmayan kontrol grubunda apoptotik nükleuslu hücreler hemen hemen mevcut değilken, metanol ve su özütü ile muamele edilen HeLa'da apoptotik hücreler görülmüştür. Bu yüzden metanol ve su özütü HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahiptir. Metanol özütü grubundaki etkinin su özütüne göre çok daha fazla olduğu fotoğraflarda görülmektedir.



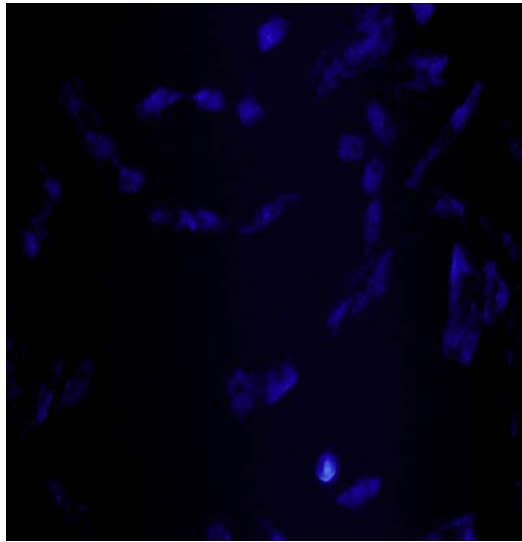
Resim 4.19. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



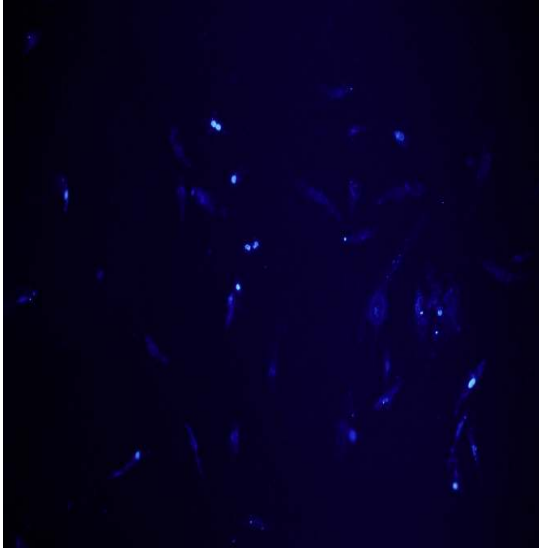
Resim 4.20. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



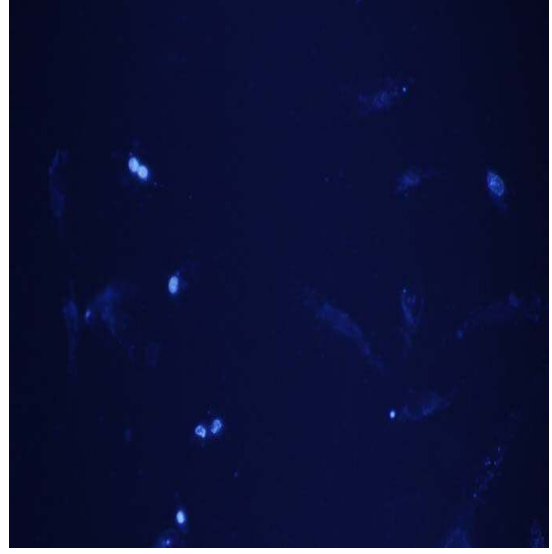
Resim 4.21. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x ışık mikroskop analizi.



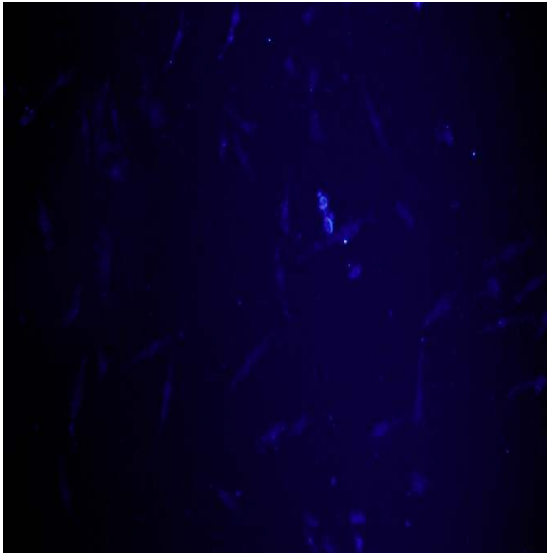
Resim 4.22. DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



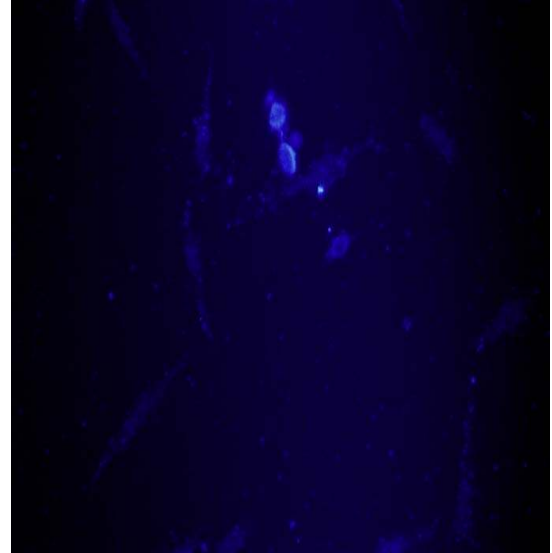
Resim 4.23. Metanol özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



Resim 4.24. Metanol özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



Resim 4.25. Su özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.



Resim 4.26. Su özütü ile muamele edilen DAPI ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40x floresan mikroskop analizi. DAPI apoptotik hücrelerin nükleik asitlerini parlak mavi renge boyar.

4.6.3. DiOC₆ boyama

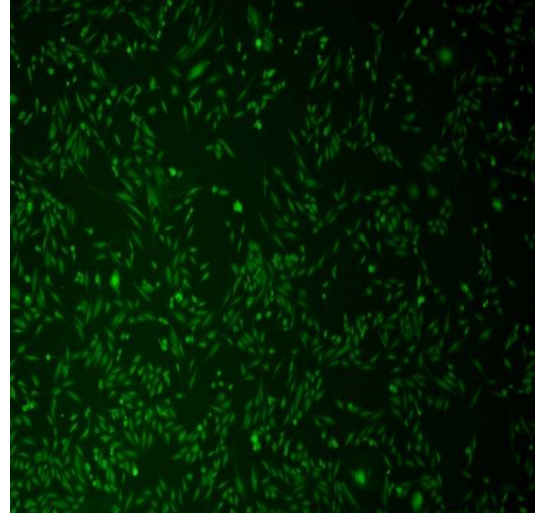
Çalışmada 10 µg/ml konsantrasyondaki su ve metanol özütü ile 24 saat muamele edilmiş ve edilmemiş HeLa hücre dizilerindeki mitokondriyal membran potansiteli (MMP) ni belirlemek için DiOC₆ boyama yöntemi kullanılmıştır. DiOC₆ canlı hücreleri boyayan yeşil floresan veren mitokondriye özel voltaj bağımlı bir boya olduğundan erken apoptotik hücrelerdeki mitokondriyal değişimleri göstermek amacıyla çalışmada kullanılmıştır. Erken apoptotik hücrelerde MMP azaldığından dolayı hücrelerin DiOC₆ boya alımı da azalmaktadır. Resim 4.27.- 4.38.'de DiOC₆ ile boyanmış su ve metanol özütü ile muamele edilen ve edilmeyen HeLa hücrelerinin 4x ve 10x büyütmede ışık ve floresan mikroskop görüntüleri gösterilmiştir.

Resim 4.28.-4.30'a bakıldığında özütle muamele edilmemiş HeLa hücrelerinin yeşil floresan verdiği ve görüntünün 4x ve 10x floresan mikroskopta alanı kapladığı görülmektedir. Alandaki çoğu hücre apoptoza gitmediğinden dolayı hücrelerin MMP'sinde azalma mevcut değildir. O yüzden alandaki hücreler yeşile boyanmıştır. Resim 4.32.- 4.34'teki 4x ve 10x floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa hücrelerinin özütle muamele edilmeyene göre DiOC₆ ile boyanan hücre sayısının daha az olduğu görülmektedir. Özütle muamele edilen hücrelerin DiOC₆ ile daha az boyandığı dolayısıyla MMP'sinde azalma olduğu için apoptoza gittiği düşünülmektedir.

Resim 4.36- 4.38'deki 4x ve 10x floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinin muamele edilmeyene göre DiOC₆ ile boyanan hücre sayısının daha az olduğu görülmektedir. Resim 4.32. ve 4.36.'ya bakıldığında ise su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinin DiOC₆ ile boyanan hücre sayısının metanol özütü ile muamele edilene göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum da metanol özütünün HeLa hücreleri üzerinde su özütüne göre daha fazla apoptotik etkili olmasından dolayıdır.



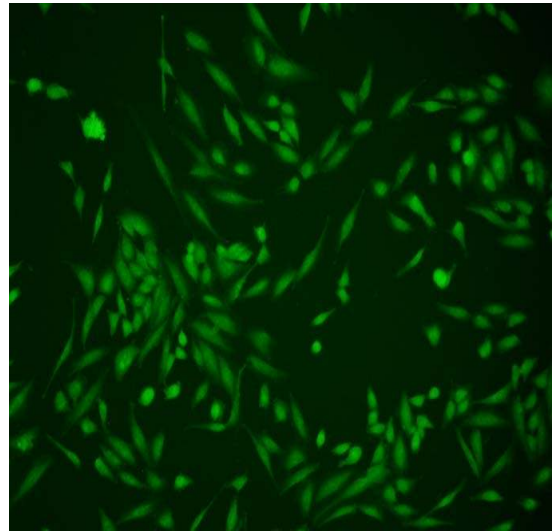
Resim 4.27. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.28. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



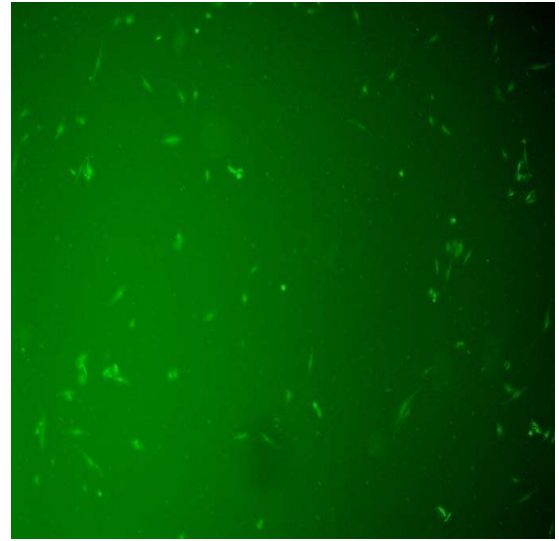
Resim 4.29. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.30. DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



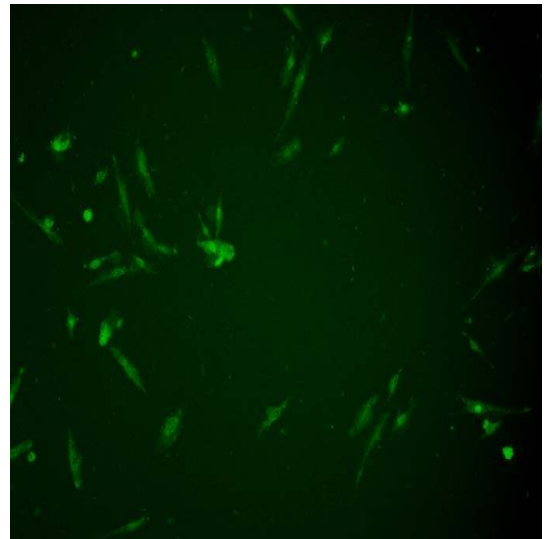
Resim 4.31. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.32. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



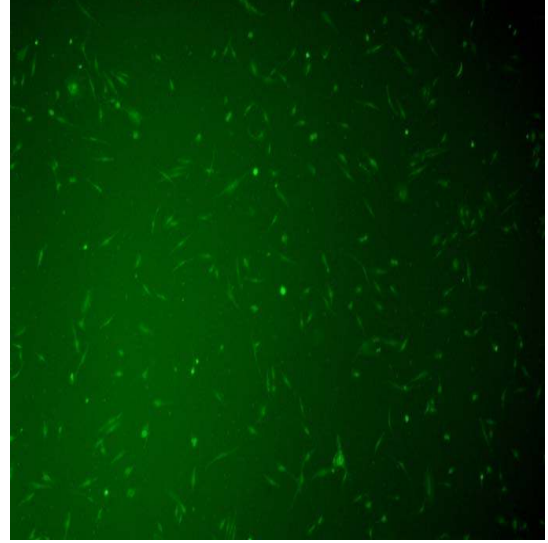
Resim 4.33. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.34. Metanol özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



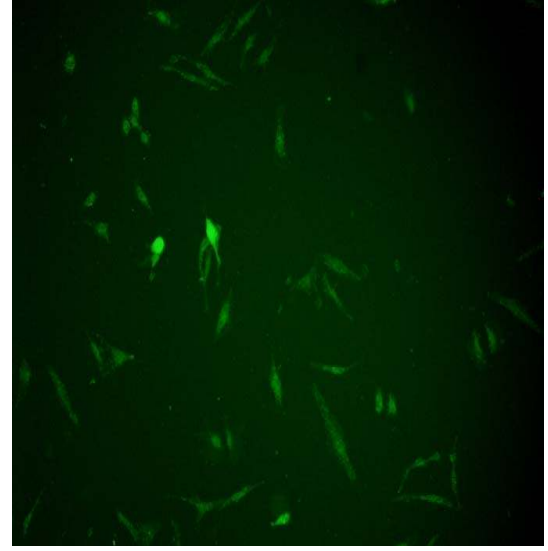
Resim 4.35. Su özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.36. Su özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 4x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.



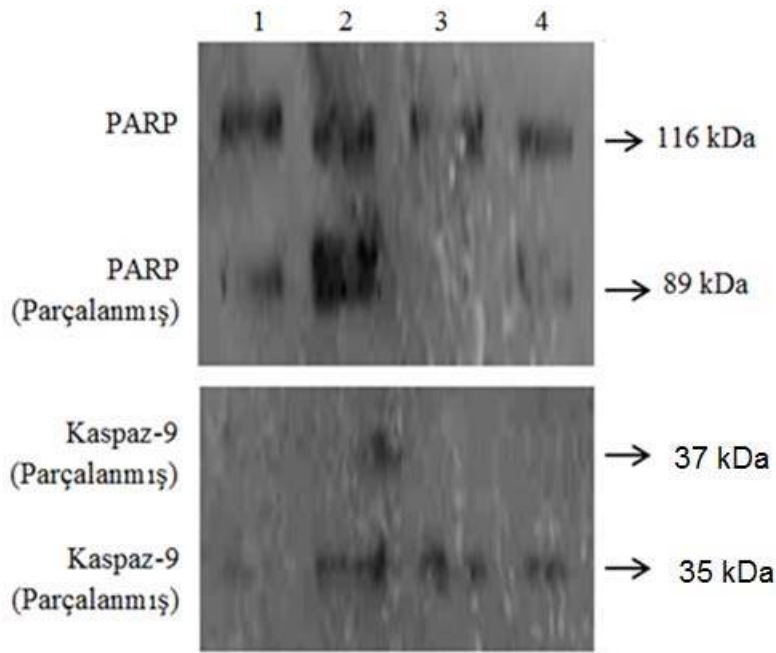
Resim 4.37. Su özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış hücrelerinin 10x ışık mikroskop analizi.



Resim 4.38. Su özütü ile muamele edilen DiOC₆ ile boyanmış HeLa hücrelerinin 10x floresan mikroskop analizi. DiOC₆ canlı hücreleri yeşile boyar.

4.7. Western Blotlama

Çalışmada floresan boyamalarda metanol özütünün su'ya göre apoptotik etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Metanol özütünün HeLa ve MCF-7 hücre dizileri üzerindeki apoptotik etkisi Western Blotlama yöntemiyle de araştırılmıştır. 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol özütü ile muamele edilen ve edilmeyen (kontrol) HeLa ve MCF-7 hücrelerinin proteinleri izole edilmiş ve Western blotlamaları yapılmıştır. Resim 4.39'da Western blotlama yönteminde özüt uygulanan ve uygulanmayan grupların Poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) ve kaspaz-9 protein bantları görülmektedir.



Resim 4. 39. PARP ve Kaspaz-9 protein bantlarının Western Blotlama yöntemi ile gösterimi. 1: Kontrol HeLa, 2: Metanol özütü ile muamele edilmiş HeLa, 3: Kontrol MCF-7, 4: Metanol özütü ile muamele edilmiş MCF-7

Bilindiği üzere kaspazların ve PARP'ın aktivasyonu apoptoz uyarılmasında önemli bir biyomarkırdır. Resim 4.39.'a göre 116 kDa büyüklüğündeki PARP proteini hem kontrol hem de özüt uygulanan grupta görülmektedir. 10 µg/ml konsantrasyonlu metanol özütü uygulanan HeLa hücrelerinde K1 kontrol grubuna göre 89kDa

büyüklięindeki paręalanmış PARP proteini çok daha belirgin görölmektedir. Dolayısıyla özüť uygulanan grupta hücreler apoptoza gitmektedir. K2 kontrol grubunda ise hücreler apoptoza gitmedięinden paręalanmış PARP oluşumu çok azdır. Metanol özüťü uygulanan grupta ise 89kDa büyüklüğünde az miktarda protein görölmektedir. Özüť uygulanan HeLa ve MCF-7 grubundaki paręalanmış PARP proteinine bakıldığında özüťün HeLa hücrelerinde MCF-7'ye göre apoptotik aktivitesinin çok daha fazla olduęu görölmektedir.

Resim 4.39.'da 35 ve 37 kDa'luk aktif kaspazların oluşumu görölmektedir. Resme göre K1 HeLa kontrol grubunda aktif kaspaz oluşumu yoktur. Buna rağmen metanol özüťü grubunda 35 kDa ve 37 kDa'luk proteinlerin oluşumu görölmektedir. Dolayısıyla metanol özüťü grubu uygulanan HeLa hücreleri apoptoza gitmektedir. MCF-7 kontrol grubu (K2) ve metanol özüťü grubuna bakıldığında ise 37 kDa'luk proteinler görölmektedir. İki grup arasında kaspaz aktivasyonu açısından bir farklılık görölmediğinden özüťün MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Sonuç olarak Western blotlama yönteminde HeLa üzerinde 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol özüťünün apoptotik etkili olduęu tespit edilmiştir. Metanol özüťü kanser hücre dizilerinden HeLa'da en etkili bulunmuştur. Bu sonuç yapılan dięer deneysel çalışmaları da desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *Achillea teretifolia* Willd. bitkisinin su ve metanol özütünün farklı konsantrasyonlardaki antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ile ilgili olarak Sokmen ve ark. (1999), Türkiye florasında içlerinde *A. teretifolia* Willd türünün de bulunduğu 35 bitkiden elde edilen 76 özütün *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans* klinik izolatları üzerine *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri çalışmışlardır. Özütler %50 DMSO'da çözülüp 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlamışlardır. Sekiz bitki türünden elde edilen 16 saf özütün en az bir veya daha fazla mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. *A. teretifolia* bitkisinin metanol özütünün suda çözünen ve çözünmeyen kısımlarında denenen mikroorganizmalara karşı 5 mg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal bir aktivite tespit etmemişlerdir.

Sokmen ve ark. (2003), *Achillea sintenisii* Hub. Mor. bitkisinin uçucu yağının yanı sıra metanol özütlerinin suda çözünen ve suda çözünmeyen kısımlarının 12 bakteri ve iki mayaya karşı antimikrobiyal aktivitelerini çalışmış ve özütlerin 10 mg/ml konsantrasyonda suda çözünen metanol altfraksiyonlarının antimikrobiyal aktivite göstermezken suda çözünmeyen altfraksiyonlarının *S. aureus* ATCC 25923 (10 mm zon çapı), *Acinetobacter lwoffii* ATCC 19002 (13mm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (11mm) , *E.coli* ATCC 25922 (11mm), bakterileri üzerinde orta derecede *C. albicans* ATCC 10239 (16mm) mayası üzerinde ise güçlü bir etkisi olduğunu bulmuşlardır.

Karaalp ve ark. (2009), 13 *Achillea* türünün [*A. multifida* (DC.) Boiss., *A. teretifolia* Willd., *A. schischkinii* Sosn., *A. setacea* Waldst.&Kitt., *A. crithmifolia* Waldst.&Kitt., *A. falcata* L., *A. biebersteinii* Afan, *A. coarctata* Poir., *A. millefolium* L. subsp. *pannonica* (Scheele) Hayek., *A. clypeolata* Sm., *A. kotschyi* Boiss. subsp. *kotschyi*, *A. phrygia* Boiss.&Bal., ve *A. nobilis* L. subsp. *neilreichii* (Kerner) Formanek] çiçek başlarından elde edilen n-hekzan, metanol ve kloroform özütlerinin

antimikrobiyal aktiviteleri *E. coli* ATCC 29908, hemorajik *E. coli* (O157:H7) RSSK 232, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 (methisilin/oksasilin-dirençli), *S. aureus* ATCC 6538/P, *Streptococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *B. cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, ve *C. albicans* ATCC 90028 mikroorganizmalarına karşı MİK yöntemiyle araştırmışlardır. 25- 250µg/ml konsantrasyonlar arasında denenen organizmalara karşı tüm özütlerin MİK değerleri araştırılmıştır. Sonuçta *A. teretifolia*'nın kloroform özütü *S. aureus* (MORSA), *S. epidermidis* ve *S. typhimurium* bakterilerine karşı 50 µg/ml, hemorajik *E. coli* bakterisine karşı ise 250 µg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Metanol özütü ise sadece *S. aureus* (125µg/ml) ve *B. cereus* (187,5µg/ml) türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Hekzan özütlerinde antimikrobiyal aktivite belirlenememiştir. Tüm özütler *C. albicans* mayasına karşı denenen konsantrasyonlarda etkisiz bulunmuştur. Çalışmada *A. coerctata*, *A. setacea*, *A. multifida*, *A. teretifolia* gibi aktif türlerin biyoaktivite çalışmaları için patojen bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılabilen saf metabolitleri elde etmek için iyi adaylar olduğu tespit edilmiştir.

Doğan ve ark. (2010), Türkiye'den dördü endemik olan 10 bitki taksasinin 10 mg/ml konsantrasyondaki kloroform özütlerinin antimikrobiyal etkilerini disk difüzyon yöntemiyle *E. coli* ATCC 25213, *E. coli* ATCC 35218, *K. Pneumoniae* ATCC 27736, *Proteus vulgaris* RSKK 96026, *Yersinia enterocolitica* RSKK 1501, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *P. aeruginosa* NRLL B-23, *Proteus vulgaris* RSKK 96026, *L. monocytogenes* Li6, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* Cowan I, *B. cereus* RSKK 863, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 10231 ve *Candida tropicalis* (klinik izolat) mikroorganizmalarına karşı araştırmışlardır. Çalışmada *Achillea* cinsinden *A. biebersteinii* Afan., *A. setacea* Waldst.&Kit, *A. teretifolia* Willd. (endemik/İran-Turan), *A. phrygia* Boiss.&Ball (endemik/İran-Turan) türlerini kullanmışlardır. Bu türlerden *A. teretifolia* bitkisinin kloroform özütünün $4,5\pm0,5$ – $25\pm0,0$ mm arasında değişen zon çaplarıyla tüm bakterilere karşı antibakteriyel etkili, en yüksek inhibisyon zon değerinin *L. monocytogenes* Li6 bakterisine ($25\pm0,0$ mm) en düşük inhibisyon zonunun *E. coli* ATCC 25213 ($4,5\pm0,5$ mm) bakterisine karşı

olduğunu tespit etmişlerdir. Gram negatif bakterilerin pozitiflere göre daha dirençli olduğunu ve en dirençli olan bakterinin *P. aeruginosa* olduğunu belirlenmiştir. *A. teretifolia* bitkisi ve diğer *Achillea* türleri için antifungal bir aktivite tespit etmemişlerdir.

Amjad ve ark. (2011), *Achillea wilhelmsii* C. Koch bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağın ve metanol özütünün bakterilerin büyümeleri üzerine etkilerini çalışmışlardır. Bitkinin yapraklarının uçucu yağlarını hidrodistilasyon yöntemiyle ve metanol özütlerini ise Sokselet aparatında elde edilmişlerdir. Özütleri antimikrobiyal aktivite için 20 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml ve 400 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlamışlardır. Metanol özütlerinin antimikrobiyal etkilerine agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle ve MİK testiyle çalışmışlardır. Çalışmada, yaprak metanol özütü *B. cereus* ATCC 1274 (400 mg/ml’de zon çapı $21,75 \pm 0,5$ mm) ve *S. aureus* ATCC 25923 (400 mg/ml’de $18 \pm 0,816$ mm) bakterilerine karşı daha yüksek etki, *E. coli* ATCC 25922 (400 mg/ml’de $9 \pm 0,816$ mm) bakterisine karşı zayıf etki, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (tüm konsantrasyonlarda 6 mm) bakterisine karşı ise herhangi bir büyüme inhibisyon etkisi göstermemiştir. *S. aureus*, *B. cereus* ve *E. coli* bakterilerinin MİK değerleri sırasıyla 12,5, 6,25 ve 100 mg/ml bulunmuştur. Sonuç olarak *A. wilhelmsii* bitkisinin yaprak metanol özütü ve uçucu yağının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bu yüzden enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için etkili bileşiklerinin araştırılabileceği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, endemik *A. teretifolia* Willd türünün 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyondaki su ve metanol özütlerinin antimikrobiyal etkisine agar kuyucuk ve MİK yöntemiyle araştırılmıştır. Bitkinin metanol özütünün mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, agar kuyucuk yöntemine göre 25 mg/ml’de bakterilerin zon çaplarının $10,6 \pm 0,5$ - $15,6 \pm 0,4$ mm, 50 mg/ml’de $11,3 \pm 0,5$ - $16,6 \pm 0,5$ mm, 100 mg/ml $13,0 \pm 0,5$ - $18,3 \pm 0,5$ mm arasında değiştiği belirlenmiştir. Bakterilerin MİK değerlerinin 6,25-50 mg/ml konsantrasyonda değiştiği tespit edilmiştir. MİK yöntemine göre metanol özütüne en duyarlı bakterinin *S. aureus* (6,25 mg/ml) daha sonra sırası ile *B. cereus* (12,5 mg/ml), *B. subtilis* (25 mg/ml) ve

P. vulgaris (50 mg/ml) olduğu belirlenmiştir. *E.coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* bakterilerine karşı özütün antimikrobiyal aktivitesi tespit edilememiştir. Metanol özütünün *S. aureus* ve *B.cereus* bakterilerine karşı yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olması ve *P aeruginosa* bakterisine karşı antimikrobiyal etki göstermemesi literatürdeki *A. teretifolia* türünün metanol (Karaalp ve ark. 2009) ve klorofom (Doğan ve ark. 2010) özütü, *A. wilhelmsii* ve *A. millefolium* L. türleriyle (Tajik ve ark., 2008; Amjad ve ark., 2011) uyumlu bulunmuştur. Çalışmada 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlardaki su özütlerinde antimikrobiyal etki tespit edilememiştir. Sulu özütün antimikrobiyal etki göstermemesi Sökmen ve arkadaşlarının 1999 ve 2003 yılında yayınladıkları çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Su ve metanol özütlerinin mayalar üzerine antifungal bir etkisi olmadığı ve bu sonuçların yine literatürdeki bilgilerle (Sökmen ve ark., 1999; Karaalp ve ark., 2009; Doğan ve ark., 2010) uyumlu olduğu saptanmıştır.

Antioksidan aktivite ile ilgili olarak Konyalıoğlu ve ark. (2004), Türkiye’de yayılış gösteren 15 *Achillea* L. (*Asteraceae*) türünden [*A.clypeolata* Sm., *A. schischkinii* Sosn., *A. teretifolia* Willd., *A. coarctata* Poir., *A. phyrigia* Boiss.&Bal., *A. crithmifolia* Waldst. &Kit., *A. nobilis* L. ssp. *Neilreichii* (Kerner) Formanek, *A.millefolium* L. ssp. *Millefolium*, *A. biebersteinii* Afan., *A. kotschy* Boiss. ssp. *Kotschy*, *A. nobilis* L. ssp. *Sipylea* (O. Schwarz) Bassler, *A. setacea* Waldst. &Kit., *A. falcata* L., *A. grandifolia* Friv. Ve *A. multifida* (DC.) Boiss.] hazırlanan infüzyonların antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Bu türlerin antioksidan kapasitelerini farklı yöntemler (total antioksidan kapasite, DPPH ve OH radikal süpürücü aktivite, H₂O₂ azaltma gücü) kullanılarak incelenmişlerdir. Total fenol içeriği Folin-Ciocalteu belirteci kullanılan modifiye kolorimetrik bir yöntemle saptanmışlardır. 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan bitki infüzyonlarının DPPH süpürücü aktivitesinin % 23,88±1,30 -41,57±1,71 arasında değiştiğini, *A. teretifolia* Willd. türünün infüzyonunun 1 mg/ml’deki inhibisyonunun %28,70±0,55 olduğunu tespit etmişlerdir. Antioksidan aktivitenin total fenolik ve flavonoid içerikle uyumlu

olduğunu bulmuşlardır. Sonuçta *Achillea* türlerinin yüksek aktiviteli antioksidan maddelere sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Kundakovic' ve ark. (2005), *Achillea alexandri-regis* Bornm.& Rudski türünün metanol özütünün DPPH yöntemiyle antioksidan etkisine bakmışlardır. Metanol özütünün ($IC_{50} = 36,14 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) DPPH radikal süpürücü aktivitesinin konsantrasyona bağlı etkili olduğunu tespit etmişlerdir. 0,1 mg/ml konsantrasyonda en yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite (%90) gözlemlemişlerdir. Referans bileşikler olan askorbik asit ($IC_{50} = 4,09 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) ve rutin ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) ile kıyaslandığında, metanol özütünün daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Ardestani ve ark. (2007), *Achillea santolina* hidroalkolik özütü (ASÖ)'nün antioksidan aktivitelerini linoleik asit emülsiyon sistemi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), süperoksit ve hidroksil radikallerini süpürücü etkisi, indirgeme gücü gibi çeşitli *in vitro* sistemler kullanılarak araştırmışlardır. ASÖ'nün toplam fenolik ve flavonoid içeriğini kolorimetrik yöntemle belirlemişlerdir. Sonuçlar ASÖ'nün linoleik asit emülsiyon sisteminde süperoksit radikalleri ve DPPH'nin doza bağlı oluşumunun engellenmesi ile peroksitler üzerinde dikkat çekici bir inhibitör etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar açık bir şekilde ASÖ'nün doza bağlı olarak süperoksit radikallerini süpürücü bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Özütün DPPH süpürücü aktivitesine 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/ml}$ 'de bakmışlar ve ASÖ'nün etkili konsantrasyonunun (EC_{50} : %50 maksimum inhibisyon için ihtiyaç duyulan test bileşiğinin konsantrasyonu) 55 $\mu\text{g/ml}$ olduğunu tespit etmişlerdir. Özütün fenolik içeriği $104,66 \pm 4,39 \text{ mg/g}$, toplam flavonoid içeriğinin ise $49,04 \pm 1,98 \text{ mg/g}$ olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar açık bir şekilde ASÖ'nün belirgin bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Giorgi ve ark. (2009), *Achillea collina* Becker ex Rechb. türünün yapraklarından elde edilen infüzyonlarını ve antioksidan kapasitesini ve oksidatif strese karşı sitoprotektif aktivitesini kimyasal (DPPH ile serbest radikal süpürücü aktivite ve Folin Ciocalteu

yöntemi) ve biyolojik ölçümlerle (sitotoksisitenin *in vitro* modeli ve PC12 hücre dizisinde lipit peroksidasyonu) araştırmışlardır. Yaprak infüzyonlarının en yüksek antioksidan ve sitoprotektif etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Antioksidan kapasitenin sitoprotektif etkiyle korelasyon göstermediği fakat toplam fenolik içerik ile arasında önemli bir şekilde korelasyon olduğu belirlemişlerdir. Bu türün iyi bir antioksidan ve sitoprotektif profile sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Asgarirad ve ark. (2010), *Achillea tenuifolia* (AT) bitkisinin farklı özütlerinin antioksidan aktivitesi ve özütlerdeki toplam flavonoid ve fenol seviyelerini araştırmışlardır. Bitki özütleri etil asetat, metanol ve metanol-su (1:1) kullanılarak maserasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. Özütlerin toplam fenolik içeriğini galik asit eş değeri olarak Folin Ciocalteu reaktifi ile belirlemişlerdir. Bitki özütlerinin flavonoid içeriğini Kuersetin eşdeğerine göre tespit etmişlerdir. Buna göre, etil asetat, metanol ve metanol-su özütlerinin fenolik içeriklerini sırasıyla $43,97 \pm 0,034$, $74,16 \pm 0,55$ ve $106 \pm 0,693$ mg/g olarak flavonoid miktarlarını ise sırasıyla $10,6 \pm 1,85$, $23,1 \pm 0,5$ ve $190 \pm 1,3$ mg/g tespit edilmişlerdir. Metanol-su özütünü DPPH radikalini süpürme aktivitesi açısından 1 mg/ml konsantrasyonda % 92 inhibisyonla en aktif özüt olarak bulmuşlardır. Metanol-su özütünün ve standart antioksidan olan BHT'nin IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0,015 ve 0,053 mg/ml olarak tespit etmişlerdir. Özütlerin fenol ve flavonoid içerikleri bitkide daha fazla polar hidroksil kimyasal yapısı olduğunu doğrulamıştır. Metanol-su özütünün radikal süpürücü etki potansiyelini sentetik antioksidan BHT'den 3,5 kat daha fazla bulmuşlardır. Sonuç olarak çalışmada bitki özütlerinin fenol ve flavonoid içeriği ve antioksidan aktiviteleri arasında bir ilişki tespit etmişlerdir. Bu yüzden çalışmadaki *A. tenuifolia* polar özütündeki gibi daha fazla fenolik bileşik daha yüksek potansiyelli radikal süpürücü aktiviteye neden olmaktadır.

Turkoğlu ve ark. (2010), *Achillea schischkinii* Sosn. ve *Achillea teretifolia* Willd. türlerinin *in vitro* antioksidan ve radikal süpürücü etkilerini incelemişlerdir. Bitkilerin metanol, su ve kloroform özütlerini rotary evaporator aparatı kullanılarak hazırlamışlardır. Özütlerin DPPH radikal süpürücü etkilerini, süperoksit anyonu ve

hidrojen peroksit süpürücü ve metal şelatlayıcı aktivitelerini standart olarak kullanılan α -tokoferol antioksidanı ile kıyaslamışlardır. *A. schischkinii*, *A. teretifolia* bitkilerinin metanol, su ve kloroform özütlerinin ve standardın DPPH süpürücü aktivite sonuçlarını şu şekilde bulmuşlardır : α -tokoferol > *A. teretifolia* metanol özütü > *A. teretifolia* su özütü > *A. schischkinii* su özütü > *A. schischkinii* metanol özütü > *A. teretifolia* kloroform özütü > *A. schischkinii* kloroform özütü. *A. schischkinii* ve *A. teretifolia* bitkilerinin 100 μ g/ml konsantrasyondaki metanol, su ve kloroform özütlerinin DPPH süpürücü aktivitelerini sırasıyla % 68, 69,2, 59,2, 75,9, 69,6 ve 60,1 olarak tespit etmişlerdir. Aynı dozdaki α -tokoferol %95 DPPH süpürücü kapasite göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, bu türlerin özütlerinin önemli oranda serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Barış ve ark. (2011), aynı cins bitkinin farklı türleri ve *Achillea aleppica* D.C. subsp. *aleppica* (AA), *Achillea aleppica* D.C. subsp. *Zederbaueri* (Hayek) Hub.-Mor (AZ) ve *Achillea biebersteinii* Afan. (AB) türlerinin etanol özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin yanısıra antioksidan etkilerine serbest radikal süpürücü aktivite, indirgeme gücü, metal şelatlama aktivitesi ve toplam fenolik bileşik miktarı gibi farklı antioksidan yöntemleri kullanılarak bakmışlardır. Çalışmada kullanılan tüm türlerin yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bitki özütlerinin koruyucu etkilerini iyi bilinen antioksidan BHT ve α -tokoferol ile kıyaslanmışlardır. Bitkilerdeki toplam fenolik içerik miktarları gallik asit eşdeğeri belirlenerek araştırmışlardır. AA, AZ ve AB türlerinin fenolik miktarları sırasıyla 118, 126 ve 134 μ g gallik asit/mg özüt olarak belirlemişlerdir. 250 μ g/ml konsantrasyondaki BHT'nin %93 oranında yüksek radikal süpürücü aktivite gösterdiğini ve IC₅₀ değerinin 43 μ g/ml olarak bulmuşlardır. 250 μ g/ml konsantrasyondaki AB, AA ve AZ bitkilerinin etanol özütlerinin radikal süpürücü aktivitelerini ise sırasıyla %85, 81 ve 73 olarak tespit etmişlerdir. DPPH radikal süpürücü aktivitedeki IC₅₀ değerlerini ise sırasıyla 33, 33 ve 32 μ g/ml olarak bulmuşlardır. Tüm bitkiler konsantrasyona bağlı bir etki sergilemiştir. Çalışılan bitkilerin çoğunluğu iyi antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdikleri için bunların antioksidan ve baharat olarak doğal gıda takviyesi amaçlı kullanılabileceği saptanmıştır.

Çalışmamızda *A. teretifolia* Willd.'ın metanol ve su özütünün antioksidan etkisine yukarıda çalışmalarda kullanılmış olan yöntemlerden DPPH radikal süpürücü aktivite ve fenolik içerik tayini ile bakılmıştır. Çalışmada DPPH süpürücü aktivite deneyinde standart antioksidan olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), askorbik asit (AA) ve α -tokoferol kullanılmıştır. Radikal süpürücü aktivite sonuçlarında AA (IC_{50} : $4,3 \pm 0,3$ μ g/ml), α -tokoferol (IC_{50} : $10,2 \pm 0,8$ μ g/ml) ve BHT (IC_{50} : $27,5 \pm 0,2$ μ g/ml) standartlarının özütleri göre daha etkili olduğu, metanol özütünün (IC_{50} : $42,3 \pm 0,8$ μ g/ml) ise su özütünden (IC_{50} : $62,5 \pm 0,5$ μ g/ml) daha iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Kundakovic' ve ark. (2005) ve Türkoğlu ve ark. (2010) ile uyum göstermektedir. Özütlerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri literatürde elde edilen sonuçlardaki gibi (Kundakovic' ve ark. 2005; Ardestani ve ark. 2007; Barış ve ark. 2011) konsantrasyona bağlı olarak etkili bulunmuştur. Konyalıoğlu ve ark. (2004)'ın çalışmasında *A. teretifolia* Willd. türünün 1 mg/ml konsantrasyondaki infüzyonunun (su ile kaynatılarak elde edilen özüt) DPPH radikalinin oluşumunu inhibe edici etkisi $\%28,70 \pm 0,55$ iken bizim çalışmamızda su özütünün 250 μ g/ml konsantrasyondaki inhibe edici etkisinin $\% 91,10 \pm 0,48$ olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre bitkinin sıcaklık uygulamadan elde edilen su özütünün çok daha yüksek serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda metanol özütünün su özütüne göre DPPH süpürücü aktivitesi ve fenolik içeriği ($55,60 \pm 1,25$ μ g galik asit/mg özüt) daha yüksek bulunmuştur. DPPH aktivitesi ve fenolik içerik arasında literatürde elde edilen sonuçlardaki (Konyalıoğlu ve ark., 2004, Giorgi ve ark. 2009, Asgarirad ve ark. 2010) gibi pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.

Achillea türleri farklı kanserlerin, tümörlerin ve siğillerin tedavisi için halk ilacı olarak geniş çapta uygulanmaktadır [Hartwell, 1968]. Kundakovic' ve ark.(2005), *A. alexandri-regis* Bornm. & Rudski bitkisinin sitotoksik aktivitesini insan serviks adenokarsinoma hücreleri (HeLa), lösemi K562 hücreleri ve kötü huylu olmayan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) üzerinde MTT-mikrokültür tetrazolium ölçümü ile çalışmışlardır. Kombine halde olan kloroform ve etilasetat özütleri HeLa hücre dizisi üzerinde belirgin bir sitotoksik etki (IC_{50} : $25,92 \pm 4,96$ μ g/ml) gösterirken,

K562 lösemi hücreleri üzerinde ise daha düşük sitotoksik etki (IC_{50} : 48.59 ± 18.31 $\mu\text{g/ml}$) göstermiştir. Metanol özütlerini HeLa (IC_{50} : $158,50 \pm 15,50$ $\mu\text{g/ml}$) ve K562 ($IC_{50} > 122,2$ $\mu\text{g/ml}$) hücreleri üzerine orta seviyede etkili bulmuşlardır. PBMC hücreleri üzerinde özütlerin baskılayıcı bir aktivitesini belirlememişlerdir. Çalışmada kötü huylu ve sağlıklı hücelere karşı toksisitede belirgin bir seçicilik gözlemlenmiştir.

Abu-Dahab ve ark. (2007), Ürdün florasından 67 tür ve 34 familyaya ait 76 etanolik tıbbi bitki özütünün meme kanseri hücre dizisi MCF-7 üzerine antiproliferatif aktivitesini değerlendirmişlerdir. Başlangıçta hücreleri 50 $\mu\text{g/ml}$ özüt konsantrasyonuyla 72 saat süre ile muamele etmişlerdir. MCF-7 hücre dizisinin %50'sinde sitotoksik etkili olan özütleri 0,1, 0,5, 1,5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulamışlardır. Her bir özütü DMSO'da çözmüşler ve en yüksek konsantrasyondaki DMSO miktarı %1'i geçmeyecek şekilde hücreler üzerine uygulamışlardır. Denenen özütlerden bazı türlerle birlikte *A. santolina* (IC_{50} : $24,12 \pm 1.927$ $\mu\text{g/ml}$) bitkisinin etanol özütünün potansiyel antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

Csupor-Löffler ve ark. (2009), *Achillea millefolium* agregatının çeşitli kısımlarının n-hekzan, kloroform, su-metanol ve sulu özütlerinin antiproliferatif aktivitelerini üç adet insan tümör hücre dizisinde MTT testi ile araştırmışlardır. Kloroformda çözünen özütünün HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerinde yüksek oranda tümör hücre proliferasyonunu inhibe edici aktivitesi olduğunu ve A431 hücreleri üzerinde orta seviyede etkili olduğunu görmüşlerdir. Bu özütün biyolojik olarak aktif fraksiyonlarını detaylı incelemişlerdir. Çok basamaklı kromatografik pürifikasyonların (VLC, CPC, PLC, jel filtrasyonu) sonucunda, beş flavonoid (apigenin, luteolin, centaureidin, casticin ve artemetin) ve beş seskiterpenoid (paulitin, isopaulitin, psilostachyin C, desacetylmaticarin ve sintenin) izole ederek spektrofotometrik yöntemlerle tanımlanmışlardır. Antiproliferatif ölçümde centaureidinin bitkinin çeşitli kısımlarının en etkili içeriği olduğunu ve özellikle HeLa (IC_{50} : $0,0819$ μM) ve MCF-7 (IC_{50} : $0,1250$ μM) hücreleri üzerinde yüksek

oranda büyümeyi inhibe edici aktivitesi olduğunu gözlemlemişlerdir. Apigenin, luteolin ve isopaulitin orta seviyede aktif (IC_{50} : 6,95–32,88 μ M) iken, casticin ve paulitin üç tümör hücresine karşı yüksek oranda (IC_{50} : 1,286–4,76 μ M) etkilidir. Artemetin, psilostachyin C, desacetylmaticarin ve sintenin bu hücre dizilerine karşı antiproliferatif bir etki göstermemiştir.

Maggi ve ark. (2009), *A. ligustica* All. bitkisinin çiçek (FL) ve vejetatif (VP) kısımlarından elde edilen uçucu yağının MTT ölçümü ile sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Üç adet insan hücre dizisi (glioblastoma multiform (T98G), skuamöz karsinoma (A431), prostatik adenokarsinoma (PC-3) hücre dizileri) ve bir adet melanoma hücre dizisi (B16-F1) FL ve VP uçucu yağlarının farklı konsantrasyonu (0,1 mg/ml'den 2 mg/ml'ye kadar) ile muamele etmişler ve uçucu yağların 24, 48 ve 72 saat sonraki etkilerini belirlemişlerdir. Buna göre, FL ve VP uçucu yağlarının tüm tümör hücre dizilerine karşı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğunu tespit etmişlerdir ($P<0,01$). Daha yüksek antioksidan etkili FL ve VP uçucu yağlarının bu sonuçlarla iyi bir korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. En yüksek aktivitenin B16-F1 hücre dizisi üzerine (FL ve VP uçucu yağları için sırasıyla IC_{50} : 0,220 $\pm$ 0,022 mg/ml ve 0,459 $\pm$ 0,067 mg/ml), en düşük aktivitenin ise A431 hücre dizisine karşı (FL ve VP uçucu yağları için sırasıyla IC_{50} : 0,446 $\pm$ 0,039 μ m/ml ve 0,847 $\pm$ 0,037 mg/ml) tespit etmişlerdir. PC-3 (FL ve VP uçucu yağları için sırasıyla IC_{50} : 0,294 $\pm$ 0,015 mg/ml ve IC_{50} : 0,593 $\pm$ 0,018 mg/ml) ve T98G (FL ve VP uçucu yağları için sırasıyla IC_{50} : 0,376 $\pm$ 0,021 mg/ml ve 0,663 $\pm$ 0,048 mg/ml) hücre dizilerine karşı da sitotoksikite belirlemişlerdir. Sonuç olarak *A. ligustica* uçucu yağlarının tümör hücre dizilerine karşı orta seviyede sitotoksik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Turan ve ark. (2010), Sivas yöresine özgü ve halk arasında da antineoplastik özellikleri olduğuna inanılan içinde endemik *A. teretifolia* Willd. türünün de olduğu metanol ile özütlenmiş ve daha sonra suda çözünen (polar) ve suda çözünmeyen (polar olmayan) fraksiyonlarının antineoplastik özellikleri araştırmışlardır. *In vitro* sitotoksikite çalışmalarını MDA-MB-231, MDA-MB-468 hazır kanser hücre

serilerine karşı tripan mavisi ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapmışlardır. Çalışma sonucunda bazı bitki türleriyle birlikte *A. teretifolia* türünün MDA-MB-231 (IC₅₀: 10±3 µg/ml) ve MDA-MB-468 (IC₅₀: 9±4 µg/ml) hücre dizilerine karşı sitotoksik etkili olduklarını tespit etmişlerdir. Sonuçta ileri düzeydeki çalışmalardan sonra elde edilecek ajanların, kanser hastalarının tedavilerinde ve/veya kansere karşı koruyucu olabileceğini saptamışlardır.

Ghavami ve ark. (2010), Doğu Azerbaycan'dan toplanan *Achillea millefolium* ve *Achillea biebersteinii*'in etanol özütlerinin normal fibroblast hücre dizisi HFFF ve altı adet kanserli hücre dizisi (AGS: Kafkas İnsan gastrik adenokarsinoma, MCF-7, SW742: İnsan kolorektal adenokarsinoma, SKLC6, İnsan akciğer karsinoma, A375: İnsan melanoma kanser hücresi ve PLC/PRF/5: İnsan karaciğer hepatoma) üzerine sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Özütlerin stok konsantrasyonlarını DMSO'da ve %50 etanolde çözerek hazırlamış ve iki farklı çözücüdeki sitotoksik etkilerine bakmışlardır. Çalışmada özüt konsantrasyonlarındaki çözücü oranlarını (DMSO oranı %1'den %0,12'ye, %50 etanol oranı ise %1'den %0,007'ye kadar) kanser hücreleri ve kontrol grubu olarak HFFF'ye uygulamışlardır. Doksorubisin kanser ilacını ise özütlerin kanser hücrelerine karşı etkinliğini kıyaslamak için kullanmışlardır. DMSO'da çözülen iki özütün tüm kanser hücre dizileri ve HFFF'ye karşı sitotoksik etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Özütlerin kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik etkisinin DMSO'nun sitotoksik etkisinden bağımsız olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada iki farklı çözücünün AGS ve HFFF hücre dizilerine karşı gösterdiği sitotoksik etki incelendiğinde AGS'ye karşı çözücüler arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamazken, HFFF'ye karşı %50 etanol ve DMSO arasında anlamlı bir fark tespit etmişlerdir. DMSO'nun HFFF'ye karşı çok daha sitotoksik olduğunu belirlemişlerdir. İki özütün kanser hücre dizilerine etkisini DMSO'dan bağımsızken HFFF'ye etkisini DMSO'ya bağımlı bulmuşlardır. Sonuçlar iki basamaklı sitotoksik deneylerin özütlerin kanser hücre dizilerinde sitotoksikiteyi uyarmada seçici etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda metanol ve su özütünün 24 saat sürede DU145, PC-3, MCF-7 ve HeLa hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi MTT testiyle çalışılmıştır. Özütlerin DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerindeki daha yüksek konsantrasyon ve zamana bağlı (24 ve 48 saat) sitotoksik etkilerine de bakılmıştır. DU145, PC-3 hücre dizilerinin 24 saat metanol ve su özütü ile muamelesi sonucu özütlerin hücreler üzerine sitotoksik bir etkisi bulunmamıştır. Özütler MCF-7 hücre dizilerine karşı 24 saatte HeLa hücre dizilerine göre daha düşük sitotoksik aktivite (IC_{50} : $>100\mu g/ml$) göstermiştir. Çalışmada özütlere en duyarlı hücre dizisinin HeLa (metanol özütü IC_{50} : $0,0055\mu g/ml$, su özütü IC_{50} : $0,1\mu g/ml$) olduğu tespit edilmiştir. Kundakovic' ve ark., 2005; Abu-Dahab ve ark. 2007; Csupor-Löffler ve ark. 2009'da yayınladıkları diğer *Achillea* türlerinin farklı özütleriyle yapılan sitotoksik etki çalışmalarında da özütlerin HeLa ve MCF-7 hücre dizilerine karşı sitotoksik etkili oldukları bulunmuştur. Turan ve ark. 2010'da yayınladıkları çalışmada da *A. teretifolia* Willd. türünün meme kanseri hücre dizileri (MDA-MB-231, MDA-MB-468) üzerinde antineoplastik etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada özütlere en duyarlı hücre dizisi olan HeLa'nın özüt uygulanan ve uygulanmayan hücre grubuna karşı zamana bağlı (0, 24, 48, 72, 96 saat) sağ kalım eğrisi elde edilmiştir. Metanol ve su özütünün kanser hücrelerinin canlılıklarını 24 saatte azalttığı tespit edilmiş ve MTT sonucundaki gibi metanol özütünün suya göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

Özütlerin DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkilerine metanol ($50-450\mu g/ml$) ve su ($0,6-1,4\text{ mg/ml}$) özütü için daha yüksek dozlarda ve zamana bağlı olarak (24 ve 48 saat) da bakılmıştır. Metanol özütü konsantrasyonları Abu-Dahab ve ark. (2007) ve Ghavami ve ark. (2010) çalışmalarındaki gibi en yüksek özüt konsantrasyonundaki DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde hazırlanmıştır. Hücre dizileri üzerine uygulanan konsantrasyonların insan gingival fibroblast (HGF) hücreleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Çalışmada su (0,6-1,4 mg/ml) ve metanol (50-450 µg/ml) özütlerinin DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerine zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Metanol özütünün sitotoksik etkisinde hücre dizileri arasında 24 ve 48 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, su özütünün 48 saatte DU145 hücre dizisine karşı 24 saatten daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Maggi ve ark., 2009'da PC-3 hücre dizisi ile yaptığı çalışmadaki gibi metanol özütünün kanser hücre dizileri üzerinde orta seviyede etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan HGF hücreleri üzerine de metanol özütünün yüksek konsantrasyon (450 µg/ml) ve 48 saat sürede sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. HGF hücreleri üzerindeki mevcut etkinin özütlerdeki DMSO konsantrasyonunun artışından da kaynaklandığı ve süre arttıkça da DMSO'nun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin de arttığı düşünülmektedir. Ghavami ve ark. (2010)'ın çalışmasında %0,12- %1 DMSO'nun etkisine HFFF (Normal fibroblast hücre dizisi)'de ve AGS kanser hücre dizisinde bakmışlardır. Buldukları sonuçlarda HFFF hücrelerinde kanser hücrelerine göre DMSO'nun IC₅₀ değerlerinin daha düşük olduğunu görmüşlerdir. Dolayısıyla HFFF'nin DMSO'nun etkisine kanser hücrelerinden daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmadaki sonuca göre bizim yaptığımız çalışmada da metanol özütünü çözerken kullanılan DMSO konsantrasyonu HGF hücreleri üzerine kanser hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki göstermiş olabilir. Çünkü metanol özütünün prostat kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkisi HGF hücreleri üzerindeki etkiden istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,05$) göstermiş ve kanser hücre dizileri üzerinde çok daha etkili bulunmuştur.

Su özütünde (0,6-1,4 mg/ml) ise 24 ve 48 saat sürede HGF hücreleri üzerine sitotoksik bir etki belirlenmemiştir. Su özütünün DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerinde metanol özütüne göre daha düşük oranda sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden özütlerin DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerindeki mevcut sitotoksik etkisinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması daha ileride planlanmaktadır. Literatürde *A. teretifolia* türünün kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisiyle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu sebepten çalışmada elde edilen sonuçlar

önem taşımaktadır. Özütlerin sitotoksik etkisinin apoptotik yönde olup olmadığı, sadece özütlere en duyarlı hücre dizisi olan HeLa'da araştırılmıştır.

Belirli konsantrasyonda metanol ve su özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinin sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin anlaşılması amacıyla PI, DAPI ve DiOC₆ boyamaları yapılmıştır. PI boyamada metanol özütünün su özütüne göre kanser hücrelerinin ölümünde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. DAPI boyamada da metanol özütü ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik nükleus görüntüsünün su özütüyle muamele edilen hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. DiOC₆ boyamada ise metanol özütü ile muamele edilen hücrelerin su özütüne göre mitokondriyal membran potansiyelinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak tüm floresan boyamalarda metanol özütünün suya göre etkili olduğu tespit edilmiştir.

Son olarak, Western blotlama yöntemiyle sitotoksik ve apoptotik etkisi daha yüksek olan metanol özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerindeki apoptotik yolağı uyaran aktif kaspaz-9 ve aktif PARP proteinlerinin varlığı araştırılmıştır. Araştırmanın bu kısmında HeLa hücrelerine ilaveten MCF-7 hücreleri de çalışılmıştır. 10 µg/ml konsantrasyondaki metanol özütü ile muamele edilen HeLa hücrelerinde bu proteinlerin varlığı saptanmıştır. Dolayısıyla özütün hücreleri apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir. Metanol özütü ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin Western blotlama sonucunda ise aktif kaspaz-9 ve aktif PARP proteinleri tespit edilememiştir. Literatürde *A. teretifolia* Willd. ve diğer *Achillea* türlerinin HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik mekanizması ile ilgili bir çalışma mevcut olmadığından bulunan sonuç bu türle ilgili yeni bir veri olarak önem taşımaktadır.

Metanol ve su özütü ile yapılan antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmaları sonucunda metanol özütünün bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkili olduğu ve özütün mevcut antimikrobiyal etkisinin daha yüksek fenolik içeriğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Metanol özütünün suya göre DPPH süpürücü aktivitesinin ve fenolik içeriğinin daha yüksek olması,

bazı kanser hücre dizilerine (PC-3, DU145, HeLa ve MCF-7) karşı su özütünden daha etkili olması ve HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkili olmasından dolayı metanol özütü biyolojik bir önem taşımaktadır. Metanol özütünün HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin incelenmesinde PI, DAPI ve DiOC₆ floresan boyama sonuçları birbirini desteklemektedir. Western blotlama deney sonuçları da metanol özütünün HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada sonuç olarak *A. teretifolia* bitkisinin metanolde çözünen özütünün antimikrobiyal, antioksidan, sitotoksik ve HeLa hücrelerinde belirli konsantrasyonda apoptotik etkili olduğu bulunmuştur. Bu bitkiyle yapılacak olan daha sonraki çalışmalarda bu özütün içeriğindeki maddeler araştırılarak, etken maddenin tespit edilmesi ve biyolojik etkilerinin araştırılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca *Achillea* türüyle ilgili prostat kanserli hücre dizileriyle yapılmış olan çalışmalar literatürde çok sınırlıdır. Bu yüzden bu türün ve başka *Achillea* türlerinin farklı özütlerinin ve bu tez de çalışılmış olan metanol ve su özütünün DU145 ve PC-3 hücre dizileri üzerinde apoptotik etkili olup olmadığı ve etkili ise bu etkinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

Abascal, K., Herbalist, J.D., Yarnell, E.,. “Herbs and drug resistance, part: 1-Herbs and microbial resistants to antibiotics, potential of botanical in drug-resistant microbes”, *Alternative & Complementary Therapies*, 1: 237-241 (2002).

Abu-Dahab, R., Afifi, F.,. “Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF-7)”, *Sci. Pharm.*, 75: 121-136 (2007).

Agarwal, C., Singh, R.P., Agarwal, R.,. “Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome *c* release”, *Carcinogenesis*, 23:1869-1876 (2002).

Akkol, E.K., Koca, U., Pesin, I., Yılmaz, D.,. “Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) by *in vivo* excision and incision models”, *eCAM*, 22:1-7 (2009).

Ali, N., Shah, S.W.A., Shah, I., Ahmed, G., Ghias, M., Khan, I.,. “Cytotoxic and anthelmintic potential of crude saponins isolated from *Achillea wilhelmsii* C. Koch and *Teucrium stocksianum* Boiss”, *BMC Complem. Altern. M.*, 11 :1-7 (2011).

Amjad, L., Mohammadi-Sichani, M., Mohammadi-Kamalabadi, M.,. “Potential activity of the *Achillea wilhelmsii* leaves on bacteria”, *IJBBB*, 1: 216-218 (2011).

Applequist, W.L., Moerman, D.E., Yarrow (*Achillea millefolium* L.) : A neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research, *Econ. Bot.*, 65 (2): 209–225 (2011).

Arabacı, T., Budak, Ü.,. “*Achillea hamzaoglu* (Asteraceae), a new species from Turkey”, *Ann. Bot. Fennici*, 46: 459-463 (2009).

Arabacı, T.,. “Türkiye’de yetişen *Achillea* L. (Asteraceae) cinsinin revizyonu”, (Doktora Tezi), *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya, 153 (2006).

Arabacı, T., Yıldız, B.,. “Rediscovery of *Achillea boissieri* Hausskn. ex Boiss. later 140 years”, *Feddes Repertorium*, 117: 7–8: 459–465 (2006).

Ardestani, A., Yazdanparast, R.,. “Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts”, *Food Chem.*, 104: 21–29 (2007).

Asgarirad, H., Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S. J., Saeidnia, S., Ebrahimzadeh, M. A., Lotfi, F.,. “*In vitro* antioxidant analysis of *Achillea tenuifolia*”, *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 3536-3541 (2010).

Bagchi, K., Puri, S., “Free radicals and antioxidants in health and disease”, *Eastern Med. Health J.*, 4 (2): 350-360 (1998).

Banerjee, S.K., Bonde, C.G., “Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa Spreng* Bark: Impact of dielectric constant and geographical location”, *J. Med. Plants Res.*, 5: 817-822 (2011).

Barbour, E.K., Sharif, M.A., Sagherian, V.K., Harbe, A.N., Talhouk, S.N., “Screening of selected indigeneous plants of Lebanon for antimicrobial activity”, *J. Etnopharmacol.*, 93 (1) :1-7 (2004).

Barış, D., Kızıl, M., Aytekin, Ç., Kızıl, G., Yavuz, M., Çeken, B., Ertekin, A. S., “*In Vitro* antimicrobial and antioxidant activity of ethanol extract of three *Hypericum* and three *Achillea* species from Turkey”, *Int. J. Food Prop.*, 14: 339–355 (2011).

Barış, Ö., Güllüce, M., Şahin, F., Özer, H., Kılıç, H., Özkan, H., Sökmen, M., Özbek, T., “Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae)”, *Turk J. Biol.*, 30: 65-73 (2006).

Başgel, S., Erdemoğlu, S.B., “Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey”, *Sci. Total Environ.*, 359: 82-89 (2006).

Baytop, A., “Farmasötik Botanik”, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, 359 (1998).

Baytop, T., “Bitkileri ile Tedavi İlaveli 2. Baskı”, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 81-177 (1999).

Benli, M., Güney, K., Bingöl, Ü., Geven, F., Yiğit, N., “Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey”, *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (15): 1774-1778 (2007).

Blois, M. S., “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, 181: 1199–1200 (1958).

Bozdoğan, A., Özçınar, B., Gürdal, S.Ö., Müslümanoğlu, M., İğci, A., Keçer, M., Özmen, V., “Evre 1 Meme kanserli hastalarda mortaliteyi etkileyen faktörler”, *Meme Sağlığı Dergisi*, 6: 107-112 (2010).

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Bogavac, M., Suvajdzic, L., Simin, N., Samojlik, I., Couladis, M., “Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils”, *Molecules*, 13: 2058-2068 (2008).

Burnette, W.N., “Western Blotting; Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein”, *A. Analytical Bioch.*, 112: 195-203 (1981).

Candan, F., Ünlü, M., Tepe, B., Deferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H. A., “Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)”, *J. Ethnopharmacol.*, 87: 215-220 (2003).

Cannistra, S.A., Niloff, J.M., “Cancer of the uterine cervix”, *N. Engl. J. Med.*, 34 : 1030-1038 (1996).

Cha, Y-Y., Lee, E-O., Lee, H-J., Park, Y-D., Ko, S-G., Kim, D-H., Kim, H-M., Kang, I-C., Kim, S-H., “Methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway”, *Clin. Chim. Acta*, 348: 41– 48 (2004).

Chang, S-H., Bae, J-H., Hong, D-P., Choi, K-D., Kim, S-C., Her, E., Kim, S-H., Kang, C-D., “*Dryopteris crassirhizoma* has anti-cancer effects through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and G0/G1 phase arrest in human prostate cancer cells”, *J. Ethnopharmacol.*, 130: 248–254 (2010).

Chu, T.M., Kawinski, E., Hibi, N., et al., “Prostate specific antigen domain of human prostate specific antigen identified with monoclonal antibodies”, *J. Urol.*, 141:152-156 (1989).

Conforti, F., Loizzo, M. R., Statti, G. A., Menichini, F., “Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* ALL.”, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (9): 1791-1794 (2005).

Cosge, B., Turker, A., Ipek, A., Gurbuz, B., Arslan, N., “Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, an endemic species to Turkey”, *Molecules*, 14:1702-1712 (2009).

Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.-J., Kitsis, R.N., “The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis”, *Circ. Res.*, 95: 957-970 (2004).

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J., “Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines”, *Phytother. Res.*, 23: 672–676 (2009).

Çelik, N., Akpulat, H.A., “*Achillea sivasica* (Asteraceae: sect. Babounya (DC.) O. Hoffm.), a new species from Inner Anatolia”, Turkey, *Kew Bulletin*, 63: 485–489 (2008).

Çetin, H., Cinbilgel, I., Yanikoglu, A., Gokceoglu, M.,. “Larvicidal activity of some Labiatae (Lamiaceae) plant extracts from Turkey”, *Phytother. Res.*, 20: 1088–1090 (2006).

Dağcı, E.K., İzmirli, M., Dığrak, M.,. “Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması”, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (1): 38-46 (2002).

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K.,. “Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (supplement 1)”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh (1988).

Davis, P.H.,. “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh, 224-252 (1975).

Demirci, F., Demirci, B., Gürbüz, İ., Yeşilada, Başer, K.H.C.,. “Characterization and biological activity of *Achillea teretifolia* Willd. and *A. nobilis* L. subsp. neilreichii (Kerner) Formanek essential oils”, *Turk J. Biol.*, 33: 129-136 (2009).

Devita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A.,. “Cancer, practice and principles of oncology”, *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia (1977).

Diplock, A.T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stah, W., Viiia-Ribes, J.,. “Functional food science and defence against reactive oxidative species”, *Brit. J. Nutr.*, 80: 77-112 (1998).

Dogan, B., Duran, A., Hakkı, E.,. “Numerical analyses of Wild *Jurinea* spp. (Asteraceae) in Turkey”, *Bangladesh J. Bot.*, 38(1): 47-53 (2009).

Doğan, N.M., Cansaran, A., Acar, G., Öztekin, M., “Antimicrobial activity of extracts of some plants from Amasya (Turkey)”, *Adv Bio. Res.*, 1: 86 – 90 (2010).

Drewnowski A., Gomez-Carneros, C.,. “Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review”, *Am J. Clin. Nutr.*, 72:1424–35 (2000).

Dulger, B., Gonuz, A.,. “Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia*, and *Stachys* Species”, *Pharm. Biol.*, 42: 301–304 (2004).

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M.,. “Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. Flower”, *Pak. J. Biol. Sci.*, 12: 447-450 (2009).

Edinger, A.L., Thompson, C. B., “Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16: 663–669 (2004).

Eloff, J.N.,. “Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?”, *J. Ethnopharmacol.*, 60 : 1–8 (1998).

Ertekin S., “Karacadağ Bitki Çeşitliliği”, ***Sürdürülebilir Kırsal ve Kentsel Kalkınma Derneği Raporu, Diyarbakır***, 58 (2002).

Esmaceli, M.A., Sonboli, A.,. “Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury”, ***Food Chem. Toxicol.***, 48: 846–853 (2010).

Ferrari, M, Fornasiero, M.C., Isetta, A.M.,. “MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*”, ***J. Immunol. Methods***, 131: 165-172 (1990).

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq W., Vandenabeele, P.,. “More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage”, ***Oncogene***, 18: 7719 -7730 (1999).

Foster, C.S., Bostwick, D.G., Bonkhoff, H., Damber, J.-E, Kwast, T.V.D., Montironi, R., Sakr, W.,. “A Cellular and molecular pathology of prostate cancer precursors”, ***Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.***, 205:19-43 (2000).

Fowler, S.J.,. “Use of monoclonal antibodies for Western blotting with enhanced chemi luminescent detection”, Monoclonal Antibody Protocols, Davis WC. (ed), ***Humana Press***, New Jersey, 115-127 (1995).

Franco, E.L., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A.,. “Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection”, ***CMAJ***, 164: 1017-1025 (2001).

Fu, Y., Li, J., Lee, A.S.,. “GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation–induced apoptosis”, ***Cancer Res.***, 67 (8) : 3734–3740 (2007).

Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M.A., “Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines”, ***J. Med. Plants Res.***, 4 (22) : 2411-2417 (2010).

Giorgi, A., Bombelli, R., Luini, A., Speranza, G., Cosentino, M., Lecchini, S., Cocucci, M., “Antioxidant and cytoprotective properties of infusions from leaves and inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rechb.”, ***Phytother. Res.***, 23: 540–545 (2009).

Gleason, D.F.,. “Histologic gradeing of prostate cancer. A perspective”, ***Hum Pathol.***, 23: 273-279 (1992).

Gordaliza, M.,. “Natural products as leads to anticancer drugs”, ***Clin. Transl. Oncol.***, 9: 767-776 (2007).

Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E., Ekmekçi, A.,. “İnsan servikal kanser Hela hücrelerinde vinorelbin’in apoptotik etkisi”, ***Deü Tıp Fakültesi Dergisi***, 25: 5-14 (2011).

Gözüm, S., Ünsal, A., “Use of herbal therapies by older, community-dwelling women”, *J. Adv. Nurs.*, 46: 171–178 (2004).

Green, J.A., Kirwan, J.M., Tierney, J.F., Symonds, P., Fresco, L., Collingwood, M., Williams, C.J., “Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis”, *Lancet*, 358: 781–786 (2001).

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands. (supplement 2)”, *Edinb. Un. Press*, Edinburgh, 158-159 (2000).

Hannum, S.M., “Potential impact of strawberries on human health: A Review of the science”, *Crit. Rev. Food Sci.*, 44:1–17 (2004).

Harlow, E., Lane, D., “Antibodies”, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York 471-656 (1988).

Harman, M., “Prostat kanserinde görüntüleme yöntemlerinin bu günü ve geleceği”, *Üro-Radyoloji*, 2: 93-97 (2011).

Harper, D., Coles, B.F., “Western (immuno) blotting and radioimmunoprecipitation, Virology” methods manual., Mahy, B.W.J., Kangro, H.O., (eds). *Academic Press*, San Diego, 261-266 (1996).

Hartwell, J., “Plants used against cancer”, *J. Nat. Prod.*, 31: 71–170 (1968).

Hatfield, R., Vermerris, W., “Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity”, *Plant Physiol.*, 126: 1351–1357 (2001).

Hengartner, M.O., “The biochemistry of apoptosis”, *Nature*, 407: 770-776 (2000).

Hodinka, R.L., “The clinical utility of viral quantitation using molecular methods”, *Clin. Diagn. Virol.*, 10: 25-47 (1998).

Hostanska, K., Nisslein, T., Freudenstein, J., Reichling, J., Saller, R., “*Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis”, *Breast Cancer Res. Tr.*, 84: 151–160 (2004).

Hsu, H-F., Huang, K-H., Lu, K-J., Chiou, S-J., Yen, J-H., Chang, C-C., Houng, J-Y., “Typhonium blumei extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis”, *J. Ethnopharmacol.*, 135: 492–500 (2011).

Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.H., “Screening and detection of apoptosis”, *J. Surg. Res.*, 139: 143–156 (2006).

Jansen, R.K., Palmer, J.D., “A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae)”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 5818-5822 (1987).

Jin, Z., El-Deiry, W.S., “Overview of cell death signaling pathways”, *Cancer Biol. Ther.*, 4:139-163 (2005).

Jo, E-H., Kim, S-H., Ra, J-C., Kim, S-R., Cho, S-D., Jung, J-W., Yang, S-R., Park, J-S., Hwang, J-W., Aruoma, O.I., Kim, T-Y., Lee, Y-S., Kang, K-S., “Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells”, *Cancer Lett.*, 230: 239–247 (2005).

Junior, H.M.S., Oliveira, D.F., Carvalho, D.A., Pinto, J.M.A., Campos, V.A.C., Mourao, A.R.B., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.-V., “Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity”, *Nat. Med.*, 64: 231–238 (2010).

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds”, *J. Agric. Food Chem.*, 47:3954-3962 (1999).

Karaalp, C., Yurtman, A.N., Yavasoglu, N.U.K., “Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts”, *Pharm. Biol.*, 47(1): 86–91 (2009).

Kemp, D.C., Brouwer, K.L.R., “Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure”, *Toxicol in Vitro*, 18: 869-877 (2004).

Kiess, W., Gallaher, B., “Hormonal control of programmed cell death/apoptosis”, *Eur. J. Endocrinol*, 138: 482–491 (1998).

Kim, E.J., Lim, S.S., Park, S.Y., Shin, H-K., Kim, J-S, Park, J.H.Y., “Apoptosis of DU145 human prostate cancer cells induced by dehydrocostus lactone isolated from the root of *Saussurea lappa*”, *Food Chem. Toxicol.*, 46: 3651–3658 (2008).

Konyalioglu, S., Karamenderes, C., “Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of some *Achillea* L. species growing in Turkey”, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 46: 163-170 (2004).

Kosova, F., Ari, Z., “The relationship between prostate cancer and apoptosis”, *J Clin. Exp. Invest.*, 2: 124-131 (2011).

Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A., “Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds, Comparison of two extraction systems”, *ABP*, 57: 229–234 (2010).

Kricka, L.J., “Nucleic acid detection technologies-labels, strategies and formats”, *Clin Chem.*, 45: 453-458 (1999).

Kumar, S., Suresh, P.K., Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Arunakaran J., “Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3)”, *J. Ethnopharmacol.*, 105: 246–250 (2006).

Kundakovic, T., Stanojkovic, T., Juranic, Z., Kovacevic, N., “Cytotoxic and antioxidant activity of *Achillea alexandri-regis*”, *Pharmazie*, 60: 319–320 (2005).

Kuo, P-L., Chen, C-Y., Hsu, Y-L., “Isoobtusilactone A induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells”, *Cancer Res.*, 67: 7406–7420 (2007).

Kültür, Ş., “Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey)”, *J. Ethnopharmacol.*, 111: 341–364 (2007).

Küpeli, E., Orhan, İ., Küsmenoğlu, Ş., Yeşilada, E., “Evaluation of Anti-inflammatory and antinociceptive activity of five anatolian *Achillea* species”, *Turkish J. Pharm. Sci.*, 4 (2): 89-99 (2007).

Ladas, E. J., Jacobson, J.S., Kennedy, D.D., Teel, K., Fleischauer, A., Kelly, K.M., “Antioxidants and cancer therapy: A systematic review”, *Oncology*, 22: 517-528 (2004).

Langseth, L., “Oxidants, antioxidants and disease prevention”, *ILSI Press*, Brussels, 24 (1995).

Lewis, N.G., Davin, L.B., Sarkanen, S., “Lignin and lignan biosynthesis: Distinctions and reconciliations”, *J. Am. Chem. Soc.*, doi: 10.1021/bk-1998-0697.ch001, 1-27 (1998).

Li, L., Adams, L.S., Chen, S., Killian, C., Ahmed, A., Seeram, N.P., “*Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells”, *J. Agric. Food Chem.*, 57: 826–831 (2009).

Li, Y., Zhang, M.-L., Cong, B., Wang, S.-M., Dong, M., Sauriol, F., Huo, C.-H., Shi, Q.-W., Gu, Y.-C., Kiyota, H., “Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of yarrow, *Achillea millefolium*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75: 1554–1556 (2011).

Lincz, L.F., “Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death”, *Immunol. Cell Biol.*, 76: 1-19 (1998).

Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P.,. “Advances in spinal cord injury: Role of apoptosis”, **Spine**, 25: 1859-1866 (2000).

Maggi, F., Bramucci, M., Cecchini, C., Coman, M., Cresci, A., Cristalli, G., Lupidi, G., Papa, F., Quassinti, L., Sagratini, G., Vittori, S.,. “Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations”, **Fitoterapia**, 80: 313–319 (2009).

Mavi, A., Terzi, Z., Ozgen, U., Yıldırım, A., Coskun, M.,. “Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae)”, **Biol. Pharm. Bull.**, 27 (5): 702—705 (2004).

McCune, L.M., Johns, T.,. “Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest”, **J. Ethnopharmacol.**, 82: 197-205 (2002).

Mesquita, M.L., Paula, J.E., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espindola, L.S.,. “Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines”, **J. Ethnopharmacol.**, 123 (3): 439–445 (2009).

Mi, Q., Lantvit, D., Reyes-Lim, E., Chai, H., Phifer, S.S., Wani, M.C., Wall, M.E., Tan, G.T., Cordell, G.A., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M.,. “Apoptotic anticancer effect of Alvaradoin E isolated from *Alvaradoa haitiensis*”, **Anticancer Res.**, 25: 779-788 (2005).

Moongkarndi, P., Kosema, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., Neungton, N.,. “Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line”, **J. Ethnopharmacol.**, 90: 161–166 (2004).

Morselli, E., Maiuri, M.C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K., Criollo, A., Galluzzi, L., Malik, S.A., Vitale, I., Michaud, M., Madeo, F., Tavernarakis, N., Kroemer, G.,. “Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy”, **Cell Death Dis.**, e10; doi:10.1038 (2010).

Mothana, R.A.A., Abdo, S.A.A., Hasson, S., Althawab, F.M.N., Alaghbari, S.A.Z., Lindequist, U.,. “Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants”, **eCAM**, 7 (3): 323–330 (2010).

Neuhouser, M.L.,. “Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies”, *Nutr. Cancer*, 50: 1–7 (2004).

Nickavar, B., Kamalinejad, M., Haj-Yahya, M., Shafaghi, B.,. “Comparison of the free radical scavenging activity of six Iranian *Achillea* species”, *Pharm. Biol.*, 44 (3): 208-212 (2006).

Niemeyer, H.B., Metzler, M.,. “Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans”, *J. Food Eng.*, 56: 255–256 (2003).

Norberg, E., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.,. “Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396:95-100 (2010).

Novara, G., Galfano, A., Berto, R.B., Ficarra, V., Navarrete, R.V., Artibani, W.,. “Inflammation, apoptosis, and BPH: What is the evidence?”, *Eur. Urol. Suppl.*, 5: 401–409 (2006).

Nunez, G., Benedict, M.A., Hu Y., Inohara, N.,. “Caspases: the proteases of the apoptotic pathway”, *Oncogene*, 17: 3237-3245 (1998).

Okcu, Z., Keleş, F.,. “Kalp-damar hastalıkları ve antioksidanlar”, *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40 (1), 153-160 (2009).

Özgen, Ü., Savaşan, S., Buck, S., Ravindranath, Y.,. “Comparison of DiOC₆(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in Leukemia cells and non-malignant T Lymphocytes from children”, *Cytometry*, 42: 74–78 (2000).

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C.,. “Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants”, *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 6882-6890 (2002).

Parton, M., Dowsett, M., Smith, I.,. “Studies of apoptosis in breast cancer”, *BMJ*, 322:1528–1532 (2001).

Perez, C., Pauli, M., Bazerque, P.,. “An antibiotic assay by the agar-well diffusion method”, *Acta Biologiae et Medicine Experimentalis* , 15: 113-115 (1990).

Pienta, K. J.,. “Etiology epidemiology, and prevention of carcinoma of the prostate”, Campbell’s Urology, (7th edn.), Walsh, P.C., Retik, A.B., Darracott Vaughan, E., Wein, A.J (eds), *WB Saunders Company*, Philadelphia, 2489–2496 (1998).

Podsedek, A.,. “Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review”, *LWT*, 40 1–11 (2007).

Polat, K., Tüzel, E., Aktepe, F., Akdoğan, B., Güler, C., Uzun, İ., “Türkiye’de otopsi serisinde latent prostat kanseri ve yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi sıklığının araştırılması”, *Türk Üroloji Dergisi*, 35 (2): 96-100 (2009).

Popovic, M., Jakovlyevic, V., Bursac, M., Mitic, R., Raskovic, A., Kaaronovic, R., “Biochemical investigation of yarrow extracts (*Achilles millefolium* L.)”, *Oxydation communications*, 25: 469-475 (2002).

Porter, A.T., F.a.c.r.o., M.D., Ben-Josef, E., “Humoral mechanisms in prostate cancer: A role for FSH”, *Urol. Oncol-Semin Ori.*, 6: 131–138 (2001).

Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Averous, L., Boquillon, N., “Antioxidant properties of lignin in polypropylene”, *Polym. Degrad. Stabil.*, 81:9–18 (2003).

Ratnam, K., Low, J. A., “Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-Ribose) polymerase in oncology”, *Clin Cancer Res.*, 13(5): 1383-1388 (2007).

Ray, R.B., Raychoudhuri, A., Steele, R., Nerurkar, P., “Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis”, *Cancer Res.*, 70 (5): 1925–1931 (2010).

Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D., “Natural products for cancer prevention: a global perspective”, *Pharmacol. Therapeut.*, 99: 1– 13 (2003).

Ricci, J.E., Gottlieb, R.A., Gren, D., “Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis”, *J. Cell Biology*, 160: 65-75 (2003).

Rocha, A.B., Lopes, R.M., Schwartzmann, G., “Natural products in anticancer therapy”, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1: 364–369 (2001).

Rosenthal, D.S., Simbulan-Rosenthal, C.M., Smith, W., Ray, R., Smulson, M.E., “PARP determines the mode of cell death in skin fibroblasts, but not keratinocytes, exposed to sulfur mustard”, *J. Invest. Dermatol.*, 117 (6): 1566-1573 (2001).

Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., Garbarino, J.A., “Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of *Geum quellyon* Sweet roots in human tumor cell lines”, *J. Ethnopharmacol.*, 100: 323–332 (2005).

Saeidnia, S., Gohari, A.R., Mokhber-Dezfuli, N., Kiuchi, F., “A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*”, *DARU*, 19 (3): 173-186 (2011).

Saeidnia, S., Moradi-Afrapoli, F., Gohari, A.R., Malmir, M., “Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss.”, *J. Med. Plants Res.*, 8(5): 52-56 (2009).

Sanmartín, C., Plano, D., Palop, J.A., “Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy”, *Mini Rev. Med. Chem.*, 8:1020-1031 (2008).

Sardari, S., Shokrgozar, M.A., Ghavami, G., “Cheminformatics based selection and cytotoxic effects of herbal extracts”, *Toxicol in Vitro*, 23: 1412–1421 (2009).

Sathiyamoorthy, P., Lugasi-Evgi, H., Schlesinger, P., Kedar, I., Gopas, J., Pollack Y., Golan-Goldhirsh, A., “Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouinmarket plant products”, *Pharm. Biol.*, 37 (3): 188–195 (1999).

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E., “Tohumlu bitkiler sistematigi 6. baskı”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, İzmir, 296 (2000).

Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S., Heber, D., “Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*”, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 9329-9339 (2006).

Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Özcan, M. M., Arslan, D., “Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey”, *Grasas Aceites*, 60 (2) : 147-154 (2009).

Sharma, G., Tyagi, A.K., Singh, R.P., Chan, D.C.F., Agarwal, R., “Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells”, *Breast Cancer Res. Tr.*, 85: 1–12 (2004).

Shen, M.M., Abate-Shen, C., “Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges”, *Genes Dev.*, 24: 1967-2000 (2010).

Singleton, V.L., Rossi, J.A “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, *Am. J. Enol. Viticult.*, 16: 144–158 (1965).

Smith, J.S., Green, J., Gonzalez, A.B.D., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S., Beral, V., “Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review”, *Lancet*, 361: 1159–1167 (2003).

Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M., “The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants”, *J. Ethnopharmacol.*, 67: 79–86 (1999).

Sokmen, A., Vardar-Ünlü, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sökmen, M., Dönmez, E., “Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae)”, *Phytother. Res.*, 17: 1005–1010 (2003).

Son, Y-O, Jang, Y-S., Heo, J.-S, Chung, W-T, Choi, K-C, Lee, J-C, “Apoptosis-inducing factor plays a critical role in caspase independent, pyknotic cell death in hydrogen peroxide-exposed cells”, *Apoptosis*, 14:796–808 (2009).

Souri, E., Amin, G., Dehmobed-Sharifabadi, A., Nazifi, A., Farsam, H., “Antioxidative activity of sixty plants from Iran”, *Iran J. Pharm. Res.*, 3: 55-59 (2004).

Spiridon, I., Bodirlau, R., Teaca, C.-A., “Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine”, *Cent. Eur. J. Biol.*, 6 (3): 388-396 (2011).

Stanner, S.A., Hughes, J., Kelly, C.N.M, Buttriss, J., “A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis”, *Public Health Nutr.*, 7(3) 407–422 (2003).

Sun, Y-L., Zhao, Y., Hong, X., Zhai, Z-H., “Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants”, *Febs Lett.*, 462: 317-321 (1999).

Szajdek, A., Borowska, E.J., “Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review”, *Plant Food Hum. Nutr.*, 63:147–156 (2008).

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman A.M., Samali, A., “Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis”, *EMBO*, 7: 880–885 (2006).

Tajik, H., Jalali, F.S.S., Sobhani, A., Shahbazi, Y., Zadeh, M.S., “*In vitro* assessment of antimicrobial efficacy of alcoholic extract of *Achillea Millefolium* in comparison with penicillin derivatives”, *J. Anim. Vet. Adv.*, 7 (4): 508-511 (2008).

Talib, W.H., Mahasneh, A.M., “Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine”, *Molecules*, 15: 1811-1824 (2010).

Tan, M.L., Sulaiman, S.F., Najimuddin, N., Samian, M.R., Muhammad, T.S.T., “Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line”, *J. Ethnopharmacol.*, 96: 287-294 (2005).

Tapia-Vieyra, J.V., Mas-Oliva, J., “Apoptosis and cell death channels in prostate cancer”, *Arch. Med. Res.*, 32:175–185 (2001).

Tarawneh, K.A., Irshaid, F., Jaran, A.S., Ezealarab, M., Khleifat, K.M., “Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of methanolic extracts of some medicinal plants in northern part of Jordan”, *J. Biol. Sci.*, 10: 325-332 (2010).

Tekişoğulları, R.K., “Nanoteknolojik bir ilaç olan sutent’in kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi”, (Yüksek Lisans Tezi), **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 1-48 (2010).

Tessitore, A., Pirozzi M., Auricchio, A.,. “Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis”, **Pathogenetics**, 2:4 1-12 (2009).

Toroğlu, S., Çenet, M.,. “Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar”, **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi**, 9 (2):12-20 (2006).

Trifunovic, S., Vajs, V., Juranic, Z., Zizak, Z., Tesevic, V., Macura, S., Milosavljevic, S., “Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro”, **Phytochemistry**, 67: 887–893 (2006).

Turan, M., Sökmen, A., Karadayı, K., Polat, Z. A., Şen, M., “Antineoplastic properties of some plant extracts which are endemic in Sivas”, **Cumhuriyet Med. J.**, 32: 9-18 (2010).

Turkoglu, I., Turkoglu, S., Celik, S., Kahyaoglu, M., “Antioxidant and antimicrobial activities of Turkish endemic *Achillea* species”, **Afr. J. Microbiol. Res.**, 4: 2034-2042 (2010).

Ulukanlı, Z., Ulukanlı, S., Ozbay, H., Ilcim, A., Tuzcu, M.,. “Antimicrobial activities of some plants from the eastern Anatolia region of Turkey”, **Pharm. Biol.**, 43 (4): 334–339 (2005).

Unal, E. L., Mavi, A., Kara, A. A., Cakir, A., Şengül, M., Yildirim, A.,. “Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine”, **Pharm. Biol.**, 46 (3) : 207–224 (2008).

Ural, A.U., Avcu, F., Candir, M., Guden, M., Ozcan, M.A., “*In vitro* synergistic cytoreductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells”, **Breast Cancer Res.**, 8: R52 (2006).

Uysal, İ., Onar, S., Karabacak, E., Çelik, S.,. “Ethnobotanical aspects of Kapıdağ Peninsula (Turkey)”, **BioDiCon.**, 3 (3): 15-22 (2010).

Ünlü, M., Daferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe, B., Sökmen, A.,. “Compositions and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae)”, **J. Ethnopharmacol.**, 83: 117- 121 (2002).

Ünsal, A., Taskın, F., Meteoglu, I., Uz, B., Karaman, C. Z., Prostat kanseri tanısında transrektal ultrasonografi bulgularının gözden geçirilmesi: Radyolojik ve patolojik bulguların karşılaştırılması”, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 7(2) : 31 – 35 (2006).

Waggoner, S. E., “Cervical cancer”, *Lancet*, 361: 2217–2225 (2003).

Wei, Q., Kazimierz, S., Kadiiska, M., “Mechanism of arsenicinduced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicit and apoptosis in rat liver epithelial cells”, *Toxicol. Sci.*, 63:189-195 (2001).

Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., “Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs”, *Food Chem.*, 105: 940–949 (2007).

Yang, H-L., Chen, C-S., Chang, W-H., Lu, F-J., Lai, Y-C., Chen, C-C., Hseu T-H., Kuo, C-T., Hseu, Y-C., “Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorata”, *Cancer Lett.*, 231:215–227 (2006).

Yazıcı, S., Koşan, M., Kaygısız, O., Tül , M., Adsan, Ö., “İleri evre prostat kanserli hastalarda androjen deprivasyon tedavisinin kemik mineral dansitesine etkisi”, *Turk. J. Geriatr.*, 6 (4): 124-127 (2003).

Yua, C-H., Kan, S-F., Shu, C-H., Lu, T-J., Sun-Hwang, L., Wang, P.S., “Inhibitory mechanisms of Agaricus blazei Murill on the growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*”, *J. Nutr. Biochem.*, 20: 753–764 (2009).

Zgoda, J.R., Porter, J.R., “A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi”, *Pharm. Biol.*, 39, 221–222 (2001).

İnternet: İstanbul Genetik Grubu “İnsan Papilloma Virüsü”
<http://www.istanbulgenetik.com/hpv-dna-testi/> (2012).

İnternet: Leinco Technologies “ General Western Blot Protocol”
http://www.leinco.com/general_wb (2012).

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Belgesi

 GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
DEĞERLENDİRME FORMU						
DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu					
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara					
TELEFON	0312 202 69 58					
FAKS	0312 202 46 73					
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr					
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Bazı Bitkilerin Su ve Metabol Ekstrelerinin Antimikrobiyal, Antikoksidan Etkilerinin ve Bazı Kanser Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelendiği İn-vitro Bir Çalışma				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADUSOYADI	Prof.Dr.Leyla AÇIK				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐				
	Diğer	☐ Doktora Tezi ☐ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN S.Hare ve dokü kütüphaneye yapılacak in-vitro çalışmalar				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
		Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili	
		ARAŞTIRMA BÜTÇESİ			Açıklama	
		SİGORTA				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 140 Toplantı tarihi: 11.04.2012 Üniversitemiz Fen Fakültesinde Prof.Dr.Leyla Açıık'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, <i>Doktora Tezi</i> olan klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amacı, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin eylebirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin 2003 versiyonu, İy Klinik Uygulamaları (Uluslararası U-İ-GCP) kılavuzu ve bunca ile ilgili 2001/2000C ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıpın Uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan Başvurularının Korunması Sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasında uygun bulunduğu diğer kararlar (9.12.2005 tarihli 25511 sayılı Resmî Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (05.11.1981 tarihli (7506 sayılı Resmî Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADUSOYADI: Prof.Dr.Canan U.İ. BOĞAL						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Kabul **	İmza

Ek-1. (Devam) Etik Kurul Belgesi

Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Arzu SAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allergi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gökçe AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Foşun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F. Anest. ve Rea. A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Emir TURKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.T.F. Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Seyran ERSAN ÜYE	İntrinsik Kinye	G.Ü.E.F. (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kinye A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Selma AYDAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Topal Bıyıklı Kinye	G.Ü.T.F. Topal Bıyıklı Kinye A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cemal LEOYUNAGA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F. Radyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gülçin GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erkek Nefroloji	G.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Ayhan POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Patoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mehmet YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Böğüz Hast.	Kulak-Burun-Böğüz Hast. A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tip Eğitimi ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F. Tıp Eğitimi ve Tıp Tarihi A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Biraj DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F. Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Huk.Müş.Adem GELİK ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Resmîlik Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Tenzilat	Sivil Tenzilat	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı

* : Araştırma ile İlgili
** : Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Elif Burcu BALİ
 Doğum Tarihi : 28.06.1983
 Doğum Yeri : Ankara
 Meslek : Biyolog
 Ünvanı : Bilim Uzmanı
 e.mail : e.burcubali@gmail.com
 Adres : Kuzgun sokak, Sim Apt. 80/14, Aşağı Ayrancı/ ANKARA

EĞİTİM

2001- 2005	Lisans	G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Ankara
2005- 2008	Yüksek lisans	G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, Ankara
2008- 2012	Doktora	G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, Ankara

Yüksek lisans Tezi: *Escherichia coli, Klebsiella ve Acinetobacter* Suşlarında
 Plazmit veya Kromozomal Kaynaklı Genişlemiş Spektrumlu
 Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması ve Moleküler Yönden
 İncelenmesi

Yabancı Dil : İngilizce (Üds Fen Bilimleri: 83,75)

AKADEMİK ve MESLEKİ DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	Görev Yeri	BÖLÜM
2004 (Haziran-Ağustos)	Stajer	G.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi	Mikrobiyoloji Mikrobiyoloji Mikrobiyoloji
2006- 2007	Sözleşmeli Araştırma Görevlisi	G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi	Biyoloji
2008-2009 (Temmuz-Ocak)	Yardımcı Araştırmacı	G.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi	DPT Projesi 1998K Araştırma Merkezi Kurulması Projesi
2009-2012	Uzman Biyolog	Bali Diyaliz Merkezi	
2012-...	Uzman Biyolog	Gazi Üniversitesi Teknopark Binası Farmasens	Farmakoloji

PROJE DENEYİMİ

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	ÜNİVERSİTE	Proje Adı
2005 - 2007	Yardımcı araştırmacı	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi	BAP Projesi
2008-2009 (Temmuz-Ocak)	Yardımcı araştırmacı	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi	DPT Projesi 1998K Araştırma Merkezi Kurulması Projesi
2012-....	Yardımcı araştırmacı	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi	BAP Projesi
2012-.....	Yardımcı araştırmacı	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi	BAP Projesi

SEMPOZYUM VE KONGRELER

- 1) 1. Ulusal Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu, ODTÜ (2008).
- 2) **Bali, E.B.**, Açık, L., Sultan, N., *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Acinetobacter* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Moleküler Karakterizasyonu, 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kapodokya-Nevşehir (2008).
- 3) **Bali, B.**, Açık, L., Sultan, N., Investigation of Plasmid or Chromosomal Mediated Extended Spectrum Beta-Lactamases Existence in *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Acinetobacter* Strains, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, İstanbul (2008).
- 4) **Bali, E.B.**, Aık, L., Vural, M., Endemik *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural&Küüködük (Piyan) Bitkisinin *in vitro* Antioksidan Aktivitesi, 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul (2009).
- 5) Işıklan, M., Özalp, E. E., Asmafiliz, N., İlter, E. E., Kılıç, Z., **Bali, E. B.**, Çelebi, A., Aık, L., FIGIPAS 2009-Meeting in Inorganic Chemistry, 1-4 Temmuz, Palermo, İtalya, Synthesis and Biological Activities of N/O Spirocyclic-Phosphazene Derivatives (2009).
- 6) **Bali, E.B.**, Aık, L., Sarper, M., Avcu, F., Vural, M., Tugay, O., Cytotoxic effects of endemic *Thermopsis turcica* extracts on human prostate and myeloid leukemia cell lines, 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC), Antalya (2010).
- 7) Akyüz, E., **Bali, E.B.**, Çimen, C., Demir, G., Ergin, E., Bulut, D., Aık, L., Vural, M., Antimicrobial activity of *Centaurea tchihatcheffii* and *Cynanchum acutum* L., 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (CMAPSEEC), Antalya (2010).

- 8) **Bali, E.B.**, Yavuz, M., Aık, L., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Bazı Fosfazen Bileşiklerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli (2010).
- 9) **Bali, E.B.**, Açık, L., Dirmenci, T., Kazdağı'na Endemik *Tyhmus cherlerioides* Vis. *Var. cherlerioides* Bitkisinin Antioksidan Aktivitesi, XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana (2011).
- 10) 9. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Mikrobiyal Biyoteknoloji Konferansı, Ankara Üniversitesi, Tandoğan Kamps, Ekim 2011.
- 11) Ergin, V., Raková L., Cumaoğlu A., **Bali, E. B.**, Karasu, ., Substituted Pyridoindoles as A Novel Strategy Against Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes, 3rd European Congress on Preventive Regenerative and Anti-Aging Medicine (ECOPRAM), İstanbul (2012).
- 12) Raková, L., Ergin, V., **Bali, E. B.**, Meneve A., Karasu ., Immuno- modulation and Cytoprotection of Brain Microglia by Pomegranate Seed Oil, 3rd European Congress on Preventive Regenerative and Anti-Aging Medicine (ECOPRAM), İstanbul (2012).
- 13) **Bali, E. B.**, Ergin, V., Raková, L., Cumaoğlu, A., Karasu, ., Preventive Effects of Pyridoindole Derivatives Against Cytokine-Induced β -cell Damage, 3rd European Congress on Preventive Regenerative and Anti-Aging Medicine (ECOPRAM), İstanbul (2012).
- 14) **Bali, E. B.**, Aık, L., Vural, M., *Achillea teretifolia* Willd.'ın Su ve Metanol Ekstresinin Antioksidan Aktivitesi, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya (2012).

YAYINLAR

Bali, E. B., Aık L., Sultan, N., Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum-lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital, African Journal of Microbiology Research, 4 (8): 145-154 (2010) (Yüksek Lisans Tez Makalesi).

İlter, E.E., Asmafiliz, N., Kılıç, Z., Aık, L., Yavuz, M., **Bali, E.B.**, Solak, A.O., Büyükkaya, F., Dal, H., Hökelek T., Phosphorus-Nitrogen Compounds: Part 19. Syntheses, Structural and Electrochemical Investigations, Biological Activities and DNA Interactions of New Spirocyclic Monoferrocenylphosphazenes. Polyhedron, 29 (15): 2933-2944 (2010).

Demir, H., Aık, L., **Bali, E.B.**, Ko L.Y., Kaynak, G., Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts, African Journal of Biotechnology, 8(2): 274-279 (2009).