

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



***Eupatorium cannabinum* BİTKİ EKSTRAKTLARININ**
BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI

KÜBRA SEYHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

HAZİRAN - 2024
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Kübra SEYHAN tarafından hazırlanan “*Eupatorium cannabinum* Bitki Ekstraktlarının Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **05.06.2024** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

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

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

Enstitü Müdürü	Doç. Dr. Selçuk MEMİŞ	
----------------	-----------------------	-------

TAAHHÜTNAME

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

Kübra SEYHAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eupatorium cannabinum BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

KÜBRA SEYHAN

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

Geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılan bitkilerin, biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi modern tıpta ilaç hammadde kaynağı olarak değerlendirilmesi için önemlidir. Çalışmada, *Eupatorium cannabinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal, anti-quorum sensing (anti-QS) ve anti-biyofilm aktiviteleri test edilmiştir. Ekstraktların antikanser aktivitesi, PC-3 prostat kanseri ve HeLa rahim ağzı kanseri hücre hatları üzerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid yöntemi (MTT) ile araştırılmıştır. Araştırma sonucu hücre canlılığında PC-3 ve HeLa hücre hatlarında en etkili düşüş ultrasonikasyon etil asetat ekstraktında tespit edilmiş, 48. saat sonunda sırasıyla IC₅₀ değerleri 22,03 µg/mL ve 114,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktların referans mikroorganizma suşları üzerine antimikrobiyal etkinlikleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraktların test edilen konsantrasyonlarda mikroorganizma suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi tespit edilmemiştir. Anti-QS aktivitenin belirlenmesi için ekstraktların *Chromobacterium violaceum* CV026 mutant suşu kullanılarak viyolasin pigment üretimi üzerine inhibitör etkinliği araştırılmıştır. Anti-biyofilm aktivitenin belirlenmesi için ekstraktların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu üzerine biyofilm oluşumunu inhibe etme ve oluşmuş biyofilm tabakasını eradike etme etkinliği araştırılmıştır. Araştırma sonucunda maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan su ekstraktlarının anti-biyofilm aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Söz konusu ekstraktların biyofilm oluşumunu sırasıyla %53,7 ve %26,8 oranında inhibe ederken; biyofilm eradikasyonunu ise sırasıyla %55,2 ve %53,7 oranında gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Bitkinin ultrasonikasyon etil asetat ekstraktının düşük konsantrasyonda PC-3 hücre hattı üzerine antikanser aktiviteye sahip olması sebebiyle yeni antikanser ajan olma potansiyeli taşıdığı gözlemlenmiştir. Maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanan su ekstraktlarının ise anti-biyofilm ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir. Bitkinin antikanser ve anti-biyofilm ajan olma potansiyeli taşıması sebebiyle çalışma, gelecekte etkili tedavilerin geliştirilmesine yönelik umut verici bir adım olarak kabul edilebilir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Eupatorium cannabinum*, antikanser, antimikrobiyal, ekstrakt, anti-quorum sensing, anti-biyofilm

Haziran 2024, 81 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Eupatorium cannabinum* PLANT EXTRACTS

KÜBRA SEYHAN

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

It is important to determine the biological activities of plants used in traditional medicine for the treatment of various diseases in order to be used as a source of raw material for drugs in modern medicine. In this study, the anticancer, antimicrobial, anti-quorum sensing (QS), and anti-biofilm activities of ethyl acetate, methanol, and water extracts prepared by maceration and ultrasonication methods from the aerial parts of *Eupatorium cannabinum* were tested. The anticancer activity of the extracts was investigated by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide method (MTT) on PC-3 prostate cancer and HeLa cervical cancer cell lines. As a result of the research, the most effective decrease in cell viability in PC-3 and HeLa cell lines was detected in ultrasonication ethyl acetate extract, and IC₅₀ values were calculated as 22.03 µg/mL and 114.2 µg/mL at the end of 48 hours, respectively. The antimicrobial activity of the extracts against reference strains of microorganisms was determined by the disc diffusion method. No antimicrobial effect of the extracts against microorganism strains was detected at the tested concentrations. For the determination of anti-QS activity, the inhibitory activity of the extracts on violacein pigment production was investigated using the *Chromobacterium violaceum* CV026 mutant strain. To determine the anti-biofilm activity, the inhibitory activity of the extracts on biofilm formation and eradication of the formed biofilm layer on the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain was investigated. As a result of the study, water extracts prepared by maceration and ultrasonication methods were found to have anti-biofilm activity (p<0.05). It was found that these extracts inhibited biofilm formation by 53.7% and 26.8%, respectively, and biofilm eradication by 55.2% and 53.7%, respectively. It was observed that the ultrasonication ethyl acetate extract of the plant has the potential to be a new anticancer agent since it has anticancer activity on the PC-3 cell line at low concentrations. It is evaluated that water extracts prepared by maceration and ultrasonication methods can contribute to the development of anti-biofilm agents. Since the plant has the potential to be an anticancer and anti-biofilm agent, it can be considered that the study is a promising step toward the development of effective treatments in the future.

KEYWORDS: *Eupatorium cannabinum*, anticancer, antimicrobial, extract, anti-quorum sensing, anti-biofilm

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen, her zaman ilgisini ve güvenini hissettiren danışman hocam Prof. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na; çalışmam süresince bana yol gösteren ve destek veren hocam Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deneysel çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tüm ilgi ve güveniyle bana destek olan hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye ve Dr. Anfal Izaaldeen Mutar ALKATEEB'e, ekstraktların temin edilmesini sağlayan Prof. Dr. Gökhan ZENGİN'e ve Plant Omics Reseach Lab. ekibinde bulunan değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma katkıları için teşekkür ederim.

Kübra SEYHAN

Kastamonu, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Asteraceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler	2
1.2 <i>Eupatorium</i> Cinsi	4
1.3 <i>Eupatorium cannabinum</i> Türü	5
1.4 Kanser	7
1.4.1 Prostat Kanseri	9
1.4.1.1 PC-3 hücre hattı.....	11
1.4.2 Rahim Ağzı Kanseri.....	11
1.4.2.1 HeLa hücre hattı	13
1.5 Antimikrobiyal Aktivite.....	13
1.6 Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama) Mekanizması.....	14
1.6.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	15
1.7 Biyofilm Oluşum Mekanizması	16
1.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18
1.8 Çalışmanın Amacı.....	18
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	20
2.1 <i>Eupatorium</i> Cinsi Antikanser Çalışmaları	20
2.2 <i>Eupatorium</i> Cinsi ile Antimikrobiyal Çalışmalar	22
2.3 <i>Eupatorium</i> Cinsi Anti-Quorum Sensing Çalışmaları	25
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1 Materyal	26
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri	26
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	26
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları.....	27
3.1.4 Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler	28
3.2 Metot	31
3.2.1 Ekstraktların Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması	31
3.2.2 Antikanser Aktivitenin Belirlenmesi	31
3.2.2.1 Hücre kültürü devamlılığı	31
3.2.2.2 Hücre canlılık testi	32
3.2.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	33
3.2.4 Anti-QS Aktivitenin Belirlenmesi	33
3.2.5 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyi	34
3.2.5.1 Sıvı mikrodilüsyon deneyi	34
3.2.5.2 Biyofilm inhibisyon deneyi.....	34

3.2.5.3	Biyofilm eradikasyon deneyi	35
3.2.6	İstatistiksel Analizler	36
4.	BULGULAR	37
4.1	Ekstrakt Verimliliği Bulguları	37
4.2	Antikanser Aktivite Deneyi Bulguları	37
4.2.1	Bitki Ekstraktlarının PC-3 Hücre Hattındaki Hücre Canlılığı Deneyi Bulguları	37
4.2.2	Bitki Ekstraktlarının HeLa Hücre Hattındaki Hücre Canlılığı Deney Bulguları	44
4.3	Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Bulguları	52
4.4	Anti-Quorum Sensing Aktivite Bulguları	53
4.4.1	Viyolasin İnhibisyon Deneyi	53
4.5	Anti-Biyofilm Aktivite Deneyleri Bulguları	53
4.5.1	Biyofilm İnhibisyonu Deneyi Bulguları	53
4.5.2	Biyofilm Eradikasyon Deneyi Bulguları	55
5.	TARTIŞMA	58
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	71
	KAYNAKLAR	73
	ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1 <i>Eupatorium cannabinum</i> toprak üstü kısmı.....	6
Şekil 1. 2 Her iki cinsiyet için 2022'de vaka ve ölüm dağılımı	9
Şekil 1. 3 Erkeklerde 2022'de vaka ve ölüm dağılımı	11
Şekil 1. 4 Kadınlarda 2022'de vaka ve ölüm dağılımı	12
Şekil 1. 5 <i>Chromobacterium violaceum</i> 'un QS mekanizması	16
Şekil 1. 6 Biyofilm oluşum aşamaları.....	18
Şekil 4. 1 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	39
Şekil 4. 2 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	40
Şekil 4. 3 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	41
Şekil 4. 4 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	42
Şekil 4. 5 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri	43
Şekil 4. 6 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	44
Şekil 4. 7 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	46
Şekil 4. 8 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	47
Şekil 4. 9 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	48
Şekil 4. 10 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	49
Şekil 4. 11 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	50
Şekil 4. 12 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının HeLa hücre hattındaki IC ₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri.....	51
Şekil 4. 13 Antimikrobiyal aktivite testi mikroorganizmalar temsili görseli, a; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, b; <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, c; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883.....	52
Şekil 4. 14 <i>C. violaceum</i> CV026 suşuna karşı <i>E. cannabinum</i> toprak üstü ekstraktlarının quorum sensing inhibisyon aktivitesi, 1; Mas. EA, 2; Mas. MeOH, 3; Mas. Su, 4; Ultra. EA, 5; Ultra. MeOH, 6; Ultra. Su, PK; <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 O/N kültürü, NK; %50 DMSO	53

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşları	27
Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan kimyasallar	28
Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	29
Tablo 4. 1 Ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri (*p<0,05).....	38
Tablo 4. 2 Ekstraktların HeLa hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri (*p<0,05).....	45
Tablo 4. 3 PC-3 ve HeLa hücre hattı IC ₅₀ değerleri	52
Tablo 4. 4 Ekstraktların <i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşunda biyofilm oluşum inhibisyonu üzerine etkisi.....	54
Tablo 4. 5 Ekstraktların <i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşunda biyofilm eradikasyonu üzerine etkisi	56

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4. 1 Toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat sonra PC-3 hücre hattı üzerine antikanser aktivitesi.....	38
Grafik 4. 2 Toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat sonra HeLa hücre hattı üzerine antikanser aktivitesi.....	45
Grafik 4. 3 Biyofilm inhibisyon deneyinde ölçülen absorbans değerleri. Su ekstraktları biyofilm oluşumunu kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (* $p<0,05$). Ekstraktların <i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşunda kontrole göre biyofilm oluşumu (* $p<0,05$).....	55
Grafik 4. 4 Biyofilm eradikasyon deneyinde ölçülen absorbans değerleri. Su ekstraktları biyofilm eradikasyonunu kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (* $p<0,05$).	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad Derece
~	: Yaklaşık olarak
%	: Yüzde

Kısaltmalar

AHL	: N-açıl homoserin lakton
AI-2	: Otoindüktör-2
AIP	: Otoindükleyici peptit
CO_2	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DOX	: Doksorubisin
EA	: Etil asetat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ER β	: Östrojen reseptörü β
FBS	: Fetal Bovine Serum
GCO	: Global Kanser Gözlemevi
HPV	: İnsan papilloma virüsü
Kob	: Koloni oluşturan birim
LB	: Luria-Bertani
MeOH	: Metanol
MHB	: Muller Hinton Broth
NEAA	: Non-Esansiyel Aminoasit
p53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
pen/str	: Penisilin/streptomisin
QS	: Quorum Sensing
VEGFR	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü

1. GİRİŞ

İnsanlar, hastalıkların etkilerini hafifletmek ve tedavi etmek için tarih öncesi çağlardan itibaren bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi doğal ürünleri ilaçlarda kullanmışlardır. Geleneksel tıp, hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde tercih edilen en eski sağlık hizmetidir. Toplamlar hastalıklarla mücadele edebilmek için çeşitli tedavi yöntemleri geliştirmişlerdir. Zamanla bu doğal ürünlerin geleneksel tıpta kullanımı artmıştır. Günümüzde modern tıpta geliştirilen ilaçlara bakıldığında birçok ilacın ortaya çıkmasında geleneksel tıptan ilham alınmıştır (Yuan vd., 2016). Tıbbi ve aromatik bitkilerin tarih boyunca kullanımı önemini giderek artırmıştır. Bu bitkiler günümüzde modern ve alternatif tıpta yaygın kullanıma sahiptir. Bitkilerin özellikle kök, çiçek, yaprak ve meyve gibi kısımlarından ekstraktlar elde edilmektedir. Bu ekstraktlar günümüzdeki birçok tıbbi ilacın ana maddesidir (Cardoso vd., 2019; Çelik ve Gül, 2016).

Tıbbi ve aromatik bitkiler; ilaç, gıda, kozmetik gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan bitkilerin bir kısmı doğadan toplama yoluyla elde edilirken, bir kısmı da kültüre alınarak üretilmektedir. Bitkiler bilinen en eski ilaç türü olup ilk kayıtlarına milattan önce 5000'lerde Mezopotamya'da rastlanmıştır. Tıbbi bitkiler genellikle dini kültler ve inançlarla, bunların yanı sıra bulaşıcı hastalıklarla mücadele edebilmek için birçok bitkinin kullanıldığı dönemin popüler geleneğiyle de ilişkilidir. Tedavi amacıyla kullanılacak olan bitkilerin büyük bir kısmı ise doğadan toplanarak kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler de daha çok tedavi amacı ile kullanımıyla çalışmalara konu olmuştur. Bitkilerle gerçekleştirilen tedaviler; geleneksel, tamamlayıcı ve doğal tedavi gibi farklı şekillerde adlandırılmaktadır (Acıbuca ve Bostan Budak, 2018).

Geleneksel tıpta bitkiler, birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu sebeple kullanılan bitki temelli ilaçlar genellikle normal ilaçlara göre daha ucuzdur. Ulaşılabilirliği kolaydır ve diğer sentetik alternatiflerine göre yan etkisi daha azdır (Rolnik ve Olas, 2021). Tıbbi bitkiler hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek doğal ajanlara sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, gelişmekte olan

ülkelerdeki insanların çoğunluğu sağlık sorunları için genel olarak tıbbi bitkiler yardımıyla yaşamını devam ettirmektedir. Tıbbi bitkiler fitokimyasal içerik zenginliği sebebiyle ilaç keşfinde önemli role sahiptir. Saponinler, fenolikler, lignanlar, glikozitler, flavonoidler, terpenler ve alkaloidler gibi çeşitli biyoaktif bileşik sınıfları, güçlü terapötik özelliklerinden dolayı modern ilaç sisteminde kullanılmaktadır (Lakhdar, 2018).

Bitkiler kimyasal içeriğinde bulunan primer metabolitleri ve bu primer metabolitlerden üretilen sekonder metabolitleri içerir. Protein, karbonhidrat, yağ ve vitamini içerisine alan primer metabolitlerdir. Bunlar canlılar için büyüme, fotosentez, metabolizma faaliyetleri ve üreme gibi yaşamsal faaliyetlerde rol almaktadır. Sekonder metabolitlerin ise fenolik bileşikler, terpenler-streroidler, alkaloidler, kükürtlü bileşikler gibi 100.000'den fazla çeşidinin olduğu bilinmektedir. Bunlar bitkideki doku, organ ve gelişme kısımlarında biyosentetik enzimler tarafından primer metabolitlerden spesifik yollarla üretilmektedir. Ayrıca canlının temel yaşamsal işlevleriyle doğrudan ilişkisi olmayan biyolojik süreçlerde rol almaktadırlar. Sekonder metabolitlerin canlının yaşamsal fonksiyonlarında doğrudan rolü yoktur. Fakat sağlığın korunmasında önemli rolleri mevcuttur. Günümüzde ilaç yapımında kullanılan sekonder bileşiklerin bazı türlerinin antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir (Alaca ve Arslan, 2012; Ülger ve Ayhan, 2020).

1.1 Asteraceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Asteraceae familyası, yaklaşık 1.690 cins ve 32.000 tür ile en büyük çiçekli bitki familyalarından biridir. Papatya, marul, hindiba, enginar, karahindiba en bilinen taksonlarından biridir. Asteraceae familyasının üyeleri geçmişten günümüze hem yiyecek olarak hem de sağlık alanında kullanılmaktadır. Tüm türler geniş çeşitliliğe sahip olmasına rağmen benzer kimyasal içeriğe sahip olduklarından güçlü prebiyotik özellikler gösteren doğal polisakkaritler için iyi kaynaklardır. Ayrıca antioksidan antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra idrar söktürücü ve yara iyileştirici özellikler de göstermektedirler. Bitkiler, önemli biyolojik aktivite potansiyellerine sahip ikincil metabolitleri sentezleme yetenekleri sebebiyle, tıp

alanında kendine önemli yer bulmuştur. Geleneksel tıpta bitkiler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır (Mohanta vd., 2023; Rolnik ve Olas, 2021).

Bu familya, Antarktika hariç, diğer tüm kıtalarda yayılım göstermektedir (Valarezo, 2021). Ilıman, soğuk ılıman ve subtropikal gibi farklı alanlarda dağılmış olup orman, yüksek dağlar, bozkırlar ve çöller gibi değişik habitatlarda yer alırlar. Buna karşın tropikal bölgelerde diğer alanlara kıyasla daha az bulunmaktadırlar. Familyaya ait bitkilerin morfolojisi bitkinin bulunduğu ortamın koşullarına göre çeşitlilik göstermektedir. Bitkiler 1 cm yüksekliğinde olabildikleri gibi 30 m yüksekliğinde ağaç olarak da görülebilmektedirler. Bitkiler yaprakları bakımından da birbirinden farklıdır. Çoğu bitkinin yaprakları büyükken, diğerlerinin küçük ve dikenlidir ve bazılarının yaprağı olmadığından işlevlerini yeşil bir gövde üstlenmektedir. Yaprakların çoğu bir kabuk ve her uzunlukta ve renkte tüylerle kaplıdır. Birçoğu ise çeşitli renklerde düz bir küçük çiçek kümesine sahiptir (Ashirova, 2021; Michel vd., 2020; Rolnik vd., 2021; Rolnik ve Olas, 2021). Çiçeklerinin en belirgin özelliği, tek bir çiçek gibi görünen çok sayıda çiçeğin kümelenip çiçek salkımları oluşturmalarıdır (Darqui vd., 2021). Her bir salkımın alt kısmında değiştirilmiş küçük yapraklar yer almaktadır. Aynı zamanda aile üyelerinin çoğunluğunda salkımın en dış kısmındaki çiçekler tipik olarak hem düz ve uzun olan hem de diğer çiçeklerin çoğunun taç yapraklarına benzeyen taç yaprak görünümüne sahiptir (Rustaiyan ve Faridchehr, 2021).

Familyanın biyolojik aktiviteleriyle ilişkili 5000'den fazla fitokimyasal bileşik tanımlanmıştır. Bunlar; seskiterpen laktonlar, diterpenler, triterpenler, poliasetilenler, pentasiklik triterpen alkoller, benzofuranlar, flavonlar, flavonoidler ve doymamış yağ asitleridir (Cilia-López vd., 2021). Sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum ile A, B, C ve D vitaminlerinin iyi birer kaynaklarıdır. Bitkilerin çoğu düşük yağ içeriğine sahiptir (Rolnik ve Olas, 2021). Seskiterpen laktonlar, otçullara ve parazitlere karşı savunmada yer alan en az 3000 bilinen yapıyla familyadaki başlıca kimyasal bileşikler olup sitotoksik özellikleri sebebiyle antikanser dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivite özelliğine sahiptir. Bu özelliği sebebiyle antikanser ilaç geliştirme için önemli bir kaynaktır (Bader vd., 2019; Cilia-López vd., 2021). Yüksek flavonoid ve fenolik asit içerdiklerinden güçlü antioksidan aktivite gösteren bu bileşikler, geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine neden olmaktadır. Bitkilerin ve onları tüketen

organizmaların stres koşullarına karşı direncini arttırırlar. Asteraceae familyası üyeleri iyi bir protein, uçucu yağ, vitamin, flavonoid ve fenolik bileşik kaynağıdır (Güneş vd., 2019; Rolnik vd., 2022).

1.2 *Eupatorium* Cinsi

Eupatorium cinsinin taksonomik sınıflandırılması aşağıda belirtilmiştir (Al-Snafi, 2017):

Alem: Plantae

Alt Alem: Viridiplantae

Infra Alem: Streptophyta

Üst Bölüm: Embryophyta

Bölüm: Tracheophyta

Alt Bölüm: Spermatophytina

Sınıf: Magnoliopsida

Alt Sınıf: Asteranae

Takım: Asterales

Aile: Asteraceae

Cins: *Eupatorium*

Asteraceae familyasının en büyük türlerinden biri olan *Eupatorium* cinsinin türleri beş kıtada yayılım göstermesine rağmen en fazla tür tropik, subtropikal ve ılıman Amerika kıtalarında bulunmaktadır (Garcia Sanchez vd., 2011).

Bu cinse ait bitkiler yaklaşık 60 tür içermektedir. Bu bitkilerin çoğu tedavi veya süs için kullanılmaktadır (Putri vd., 2022). Çeşitli türleri yüksek biyolojik potansiyele sahip olduğundan geleneksel tıpta insan, hayvan ve bitkilerdeki çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Garcia Sanchez vd., 2011; Sobrinho, 2017). *Eupatorium* türlerinde flavonoidler, terpenoidler, pirolizidin alkaloidleri, fenilpropanoidler, kinonoidler, uçucu yağlar ve diğer çeşitli bileşenlerin 300'den fazla

olduğu rapor edilmiştir (Liu vd., 2015). Bu sebeple çoğu antifungal, sitotoksik, antibakteriyel, ağrı kesici, hastalığı hafifletici gibi birçok farmakolojik etkiye sahiptir (Putri vd., 2022).

1.3 *Eupatorium cannabinum* Türü

Eupatorium cannabinum türü Linnaeus tarafından 1753 yılında Species Plantarum (Bitki Türleri)'a dahil edilmiştir. O zamandan bu yana bitkinin tarihi, mevcut botanik isimlendirme kurallarına göre belirlenmiştir. Antik Yunan'da hekimler, bitkinin tohum ve yapraklarından elde edilen ekstraktları karaciğer hastalıklarına, ishale ve yılan zehirlenmesine karşı kullanıyorlardı. Linnaeus dışında başka yazarlar da eserlerinde bu bitkiye yer vermişlerdir. Dodonaeus Cruydt-Boeck ise bitkinin karaciğer ve dalak hastalıklarına karşı, ülser, yara iyileşmesi, idrar söktürücü, ateş düşürücü ve zehirli hayvanlara karşı kovucu olduğunu belirtmiştir (Woerdenbag, 1986).

Bitki Yunanlıların yanı sıra Orta Çağ İran hekimi olarak bilinen ve daha sonra 1563 yılında Portekizli tropik tıbbın öncüsü olan Garcia de Orta tarafından tıbbi amaçlar için uzun süre kullanılmıştır. Günümüzde hem Çin ve Hint geleneksel tıbbında hem de batı ülkelerindeki doğal tıpta enfeksiyon hastalıkları, hipertansiyon gibi çeşitli terapötik endikasyonlarda ve anti-tümör ajanı olarak da kullanılmaktadır (Ribeiro-Varandas vd., 2014). Hindistan'da ölümler için ritüel arınma işlevleri gibi farklı dini ve sosyo-kültürel faaliyetlerde kullanılmaktadır. Tayvan halk tıbbında hepatit, baş ağrısı, ishal, hipertansiyon ve şeker hastalığı tedavisinde kullanılmıştır. Bunun yanı sıra bölgede bitkinin çeşitli uygulamaları mevcuttur. Yapraklarından hazırlanan bir infüzyon sayesinde kadınlarda menstural dönemdeki aşırı kanamalar için tercih edilir. Yaprak ve sapları kanamayı durdurmak için kesiklere ve çürüklere uygulanmaktadır. Ayrıca ateş, soğuk algınlığı, grip ve diğer viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Al-Snafi, 2017; Dutta ve Mahanta, 2016). Litvanya halk tıbbında ise karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve ishale karşı tedavi ajanı olarak kullanılmıştır (Judzentiene vd., 2016).

E. cannabinum türü sitotoksik, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antifungal, immünolojik vb. özelliklere sahiptir (Abuali vd., 2021; Judzentiene vd., 2016). *E.*

cannabinum uçucu yağı, monoterpen türevleri ve seskiterpen laktonlar içerir. Başlıcaları eupatoriopocrin, polifenoller, flavonoidler (eupatorin), pirolizidin alkaloidler (supinin, likopsamin), tanenler, terpenoidler (çeşitli mono- ve seskiterpenoidler, diterpenler ve triterpenler dahil), klorojenik asit, heteroksilanlar, saponinler ve immünoaktif polisakkaritler, benzofuranlar ve dihidrobenzofuranlardır (Al-Snafi, 2017; Ionita vd., 2013; Jarco vd., 2021; Judzentiene vd., 2016).



Şekil 1. 1 *Eupatorium cannabinum* toprak üstü kısmı (Purcaru vd., 2015)

E. cannabinum, Avrupa, Kuzey Amerika, Orta Amerika, Asya, Kuzeybatı Afrika'da yaygın olan otsu bir bitkidir (Al-Snafi, 2017; Garcia-Oliveira vd., 2021). Türkiye'nin Trakya, Karadeniz ve Akdeniz bölgesinde bulunmaktadır (Temizer ve Türkmen, 2015). Yaygın olarak koyun pıtrağı, St. John's otu, kenevir agrimonya, baldıran maydanozu, kutsal halat veya Hint ague kökü olarak bilinmektedir. Bitki çok yıllık olmasının yanı sıra 30-175 cm yüksekliğindedir (Judzentiene vd., 2016; Piwowarski vd., 2018). Kırmızımsı gövdeli, dar yaprakçıklara bölünmüş yaprakları olan ve minik açık pembe veya kubbeli kümeler oluşturan mor çiçekli bir bitkidir (Judzentiene vd., 2016). Çiçek sapları çok tüylü, orta ve alt kısımları ise tüysüzdür. Yapraklar karşılıklı dizilmiş, ~ 5 mm kısa saplı; orta ve alt yapraklar düzensiz loblu; merkezi lob eliptik veya dar büyük bir mızrak şeklinde, 6-11 × 2-3 cm boyutunda, taban kama şeklinde

veya genişçe kama şeklinde, tepe sivri uçlu veya uzun sivri uçlu; yan loblar merkezi lobla aynı şekle sahip olup daha küçüktür. Üst gövde yaprakları giderek daha küçük, düzensiz loblu veya basit; antezle dökülen alt gövde yaprakları, gövde yapraklarının tamamı yıpranmış, oldukça kalın, seyrek tüylü, salgılı ve damarlarda daha yoğun tüylü, yan damarlar beş veya altı çiftli, kenarlar tırtıklı ve dalgalıdır (Al-Snafi, 2017). Şekil 1.1’de *Eupatorium cannabinum* toprak üstü kısmı görülmektedir.

E. cannabinum bitkisinin taksonomik sınıflandırılması aşağıda belirtilmiştir (Al-Snafi, 2017):

Alem: Plantae

Alt Alem: Viridiplantae

Infra Alem: Streptophyta

Üst Bölüm: Embryophyta

Bölüm: Tracheophyta

Alt Bölüm: Spermatophytina

Sınıf: Magnoliopsida

Alt Sınıf: Asteranae

Takım: Asterales

Aile: Asteraceae

Cins: *Eupatorium*

Tür: *Eupatorium cannabinum* L.

1.4 Kanser

Büyüme ve gelişmeden sorumlu olan kontrol mekanizmalarının bozulması hücrenin kontrolsüz bölünmesine sebep olmaktadır. Bu kontrolsüz bölünme sonucu doku ve organlarda görülen bir hastalık olan kanser oluşmaktadır (Saniye vd., 2021). Kanser, hiperproliferatif bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Bu hastalık, geri dönüşü olmayan hücre değişikliği, apoptoz düzensizliği, çoğalma, istila, anjiyogenez ve metastaz içerir (Ashtiani vd, 2017). Hem genetik hem de çevresel koşulların etkisiyle oluşması sebebiyle kompleks bir durumdur. Tek bir organı veya yayılarak uzaktaki organları da etkileyebilmektedir (Baile vd., 2021; Baykara, 2016).

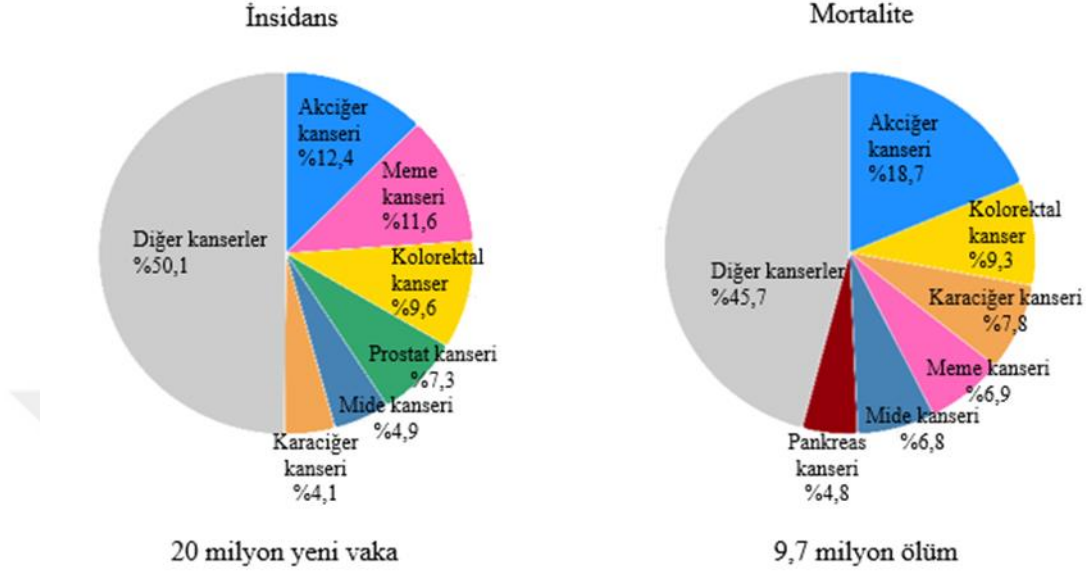
Normal hücrelerden tümör hücrelerine geçiş sırasında, kanserin ayırt edici özelliklerinden bazıları değişiklik olarak tanımlanmıştır. Bu değişiklikler arasında, hücre döngüsü ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunda veya aktivitesindeki değişiklikler, önemli bir rol oynar. Çoklu sinyal iletim yollarının sürekli olarak uyarılması aynı zamanda hücre gelişimini de destekler. Hücre metabolizmasında meydana gelen değişiklikler kanser kök hücrelerinin hayatta kalma stratejisinin bir parçası olabilir. Kanser hücrelerinin ölümsüzleşmesi, apoptozun inhibisyonu ve hücrelerin sonsuz bölünme yeteneği gibi özellikler, kanser gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu süreçlerin bir sonucu olarak, kanser hücreleri normal hücrelerden farklılaşır ve agresif bir şekilde çoğalır. Bu sebeple kanser oluşumunda birçok moleküler ve genetik değişiklik rol oynar (Baile vd., 2021).

Kanser tedavi yöntemleri tipik olarak zorlu ve maliyetlidir. Genellikle yalnızca maddi olarak belirli bir refah seviyesine ulaşmış ülkelerde yaşayan bireyler tarafından kullanılabilir (Hausman, 2019). Tedavi için bazı standartlar belirlenmiştir. Fakat her kanser türüne özgü farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır (Baykara, 2016).

Dünyada ölüm sebepleri arasında ikinci sırada olan kanser, altı ölümden birinin sebebidir (Saniye vd., 2021). Kanser prevalansı giderek arttığı için tüm insan toplumlarının sağlığını etkileyen ciddi bir sorun haline gelmiştir (Feng vd., 2019; Siegel vd., 2023). Kanserın sebep olduğu ölümler genellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir (Saniye vd., 2021).

Şekil 1.2’de gösterildiği gibi 2022 yılında 20 milyona yakın yeni kanser vakası ve 9,7 milyon kanserden ölüm meydana gelmiştir. Global Kanser Gözlemevi [The Global Cancer Observatory (GCO)] verilerine göre tahmini yeni vakalarda insidans akciğer kanseri için %12,4; meme kanseri için %11,5; kolorektal kanser için %9,6; prostat kanseri için %7,3; mide kanseri için %4,8; karaciğer kanseri için %4,3 olarak bildirilmiştir. Ölüm oranı ise akciğer kanserinde %18,7; kolorektal kanserde %9,3; karaciğer kanserinde %7,8; meme kanserinde %6,9; mide kanserinde %6,8; pankreas kanserinde %4,8’dir. Türkiye için ise bu durumun benzer olduğu söylenebilir. Akciğer

kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve tiroid kanseri ilk beşte yer almaktadır (GCO, 2024).



Şekil 1. 2 Her iki cinsiyet için 2022'de vaka ve ölüm dağılımı (GCO, 2024)

1.4.1 Prostat Kanseri

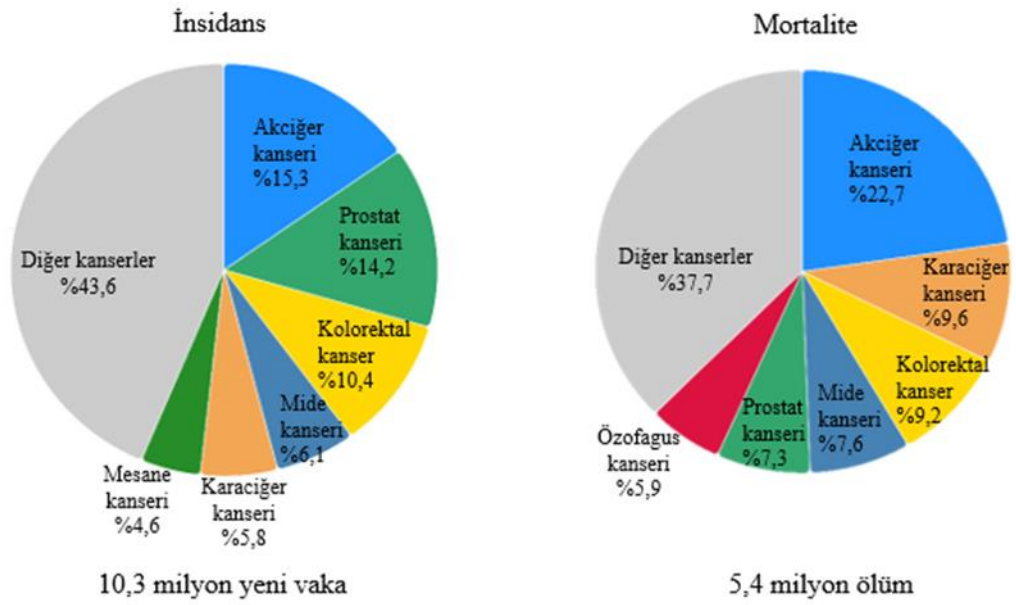
Prostat, erkek üreme sistemindeki en büyük yardımcı bezdir. Prostat hastalığı, genellikle prostatit, prostat hiperplazisi ve prostat kanserini içeren yetişkin erkeklerde yaygın bir hastalıktır. Prostatit daha çok orta yaşlı ve genç erkeklerde, prostat hiperplazisi daha çok orta yaşlı ve yaşlı erkeklerde görülür ve bu durumlar tedavi edilebilirdir. Ancak prostat kanseri erkeklerde en sık rastlanan kanserdir ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en sık nedenleri arasındadır (Gu vd., 2021).

İlerleyen yaş, aile öyküsü ve belirli genetik mutasyonlar ve koşullar, belirlenmiş tek risk faktörleridir; ancak sigara içmenin, aşırı vücut ağırlığının ve bazı beslenme faktörlerinin riski modüle etmede spekülatif rolleri vardır (Bray vd., 2024). Prostat kanserinin gelişimi, genomun yapısı ve işlevi üzerindeki genetik ve epigenetik değişiklikler tarafından yönlendirilir. Bu değişiklikler kanser hücresi ve doku tipine göre farklılık gösterebilir. Bu nedenle, her kanser hücresi tipinin ilerlemesi, davranışlarına ve tedaviye yanıtlarına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir (Batır vd., 2019). Mevcut tedavi seçenekleri; cerrahi tedavi, hormon tedavisi, radyasyon tedavisi

ve kemoterapidir. Bu tedaviler kanseri iyileştirebilse de genellikle olumsuz ve toksik yan etkilere sebep olmaktadır (Ghagane vd., 2017). Prostat kanseri oldukça heterojen bir klinik seyir gösterir. Bazı hastalar ilerlemeden yıllarca yaşayabilirken, diğerleri daha agresif bir şekilde hızla metastaz yapıp tedavi edilemez hale gelebilmektedir (Chen vd., 2021).

Prostat kanseri, 50 yaşın üzerindeki erkeklerde gözlenen, hormona bağımlı, gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık görülen malignite türüdür (Ghagane vd., 2017). Kanserinin ilk evrelerinde androjene bağımlı büyüme görülürken, zamanla bu durum androjenden bağımsız büyümeye geçiş yapabilir. Nikotinik asetilkolin reseptörü sinyal yolu, kanserle ilişkili çeşitli yolları etkileyerek tümör hücresi proliferasyonunu, metastazı ve anjiyogenezi teşvik eder (Qi vd., 2020). Androjenik hormonların baskılanması, prostat kanserinin ileri evresindeki tek etkili sistemik tedavidir (Aras ve Yerlikaya, 2016). Prostat kanseri hücrelerinde bulunan östrojen reseptörü β (ER β), östrojen sinyalinin düzenlenmesinde rol oynadığından bu reseptörün antiproliferatif etkileri ve tümör baskılayıcı rolü, prostat kanseri tedavisinde potansiyel bir hedef olabilir (Chaurasiyaa vd., 2020; Xiao vd., 2019). Ayrıca, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) anjiyogenezi ve kanserin ilerlemesi üzerinde etkilidir. Bu sinyal yolları, prostat kanserinin patogeneziinde önemli bir rol oynar ve tedavi stratejileri için hedef alınabilir (Yamamura vd., 2021).

2022 yılında 10,3 milyona yakın erkek bireyde yeni kanser vakası ve 5,4 milyon kanserden ölüm meydana gelmiştir. GCO verilerine göre erkek bireylerde tahmini yeni vakalarda insidans akciğer kanseri için %15,3; prostat kanseri için %14,2; kolorektal kanser için %10,4; mide kanseri için %6,1; karaciğer kanseri için %5,8; mesane kanseri için %4,6 olarak bildirilmiştir. Ölüm oranı ise akciğer kanserinde %22,7; karaciğer kanserinde %9,6; kolorektal kanserde %9,2; mide kanserinde %7,6; prostat kanserinde %7,3; özofagus kanserinde %5,9'dur (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3 Erkeklerde 2022'de vaka ve ölüm dağılımı (GCO, 2024)

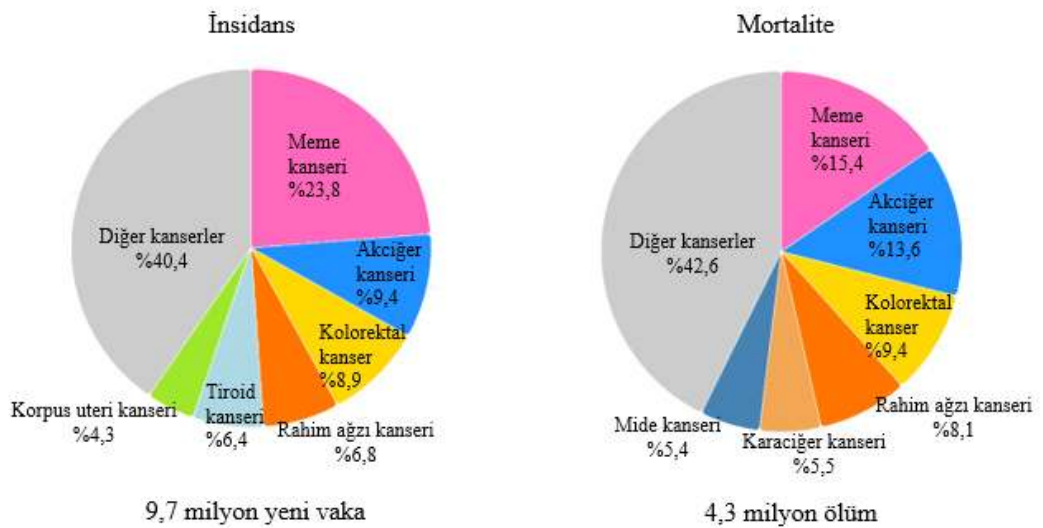
1.4.1.1 PC-3 hücre hattı

Kemiğe metastaz yapan insan prostat adenokarsinomundan bir epitel hücre hattı olan PC-3 hücre hattı, 1979 yılında IV. klinik evrede olan 62 yaşındaki beyaz erkek hastadan izole edilmiştir. PC-hücrelerinin büyüme için seruma bağımlılığı normal prostatik epitel hücreleriyle karşılaştırıldığında büyük ölçüde azalmıştır ve androjenlere, glukokortikoidlere, epidermal veya fibroblast büyüme faktörlerine yanıt vermez. Genel olarak PC-3'ün fonksiyonel ve morfolojik özellikleri, az farklılaşmış adenokarsinom ile aynıdır (Kaighn vd., 1979). Adenokarsinomlar genellikle yavaş büyür ve hormon tedavisi ile iyileştirilebilir. Ancak, nadir olarak PC-3 hücre hattı gibi daha agresif olanlar hormonal tedaviye dirençlidirler. Bu sebeple bu hücre hattı tıbbi çalışmalarda prostat kanseri üzerine en çok araştırılan hücre hatlarından biridir (Tai vd., 2011).

1.4.2 Rahim Ağzı Kanseri

Kadın vücudundaki üreme sistemi uterus, serviks, fallop tüpü ve overden oluşur. Rahim kalçalar ile fallop tüpü arasında yer alırken, yumurtalık sağ ve sol

pozisyonlarda bulunur. Serviks, rahim girişini veya rahmin vajinaya bağlanan en alt kısmını ifade eder. Bu kanser türü rahim ağzına saldıran kötü huylu bir tümör olarak bilinir. Aslında, rahim ağzı kanserinin neredeyse %90'ı rahim ağzındaki skuamöz hücrelerden başlarken, geri kalanı rahim ağzı çizgisi içindeki bez hücrelerinden rahme doğru meydana gelir. Rahim ağzı kanserine yol açan faktörler arasında insan papilloma virüsü (HPV), sigara kullanımı, genç yaşta cinsel ilişki, tekrarlanan cinsel partner değişiklikleri ve herpes genitalis enfeksiyonu yer almaktadır (Putri, 2015). Rahim ağzı kanseri çoğunlukla 35 ila 44 yaşlarındaki kadınlarda teşhis edilir. Düşük ve orta gelirli ülkelerin karşılaştığı serviks kanseri yükü, yüksek gelirli ülkelere göre önemli ölçüde daha fazladır. İlginç bir şekilde, rahim ağzı kanserine genellikle enfeksiyöz ajanlar, yani HPV neden olur. *Chlamydia trachomatis*'in neden olduğu ko-enfeksiyonlar, transformasyon bölgesindeki endoservikal hücrelerde kronik enfeksiyonu başlatabilir, bu da hücreleri onkogenik HPV enfeksiyonlarına maruz bırakır (Small Jr vd., 2017). Rahim ağzı kanseri önlenabilir ve tedavi edilebilir olmasına rağmen en sık rastlanılan ve ölüm oranı yüksek kanserlerdendir (Stelzle vd., 2021). Şu anda, rahim ağzı kanseri ölümlerinin >%85'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Bedell vd., 2020).



Şekil 1. 4 Kadınlarda 2022'de vaka ve ölüm dağılımı (GCO, 2024)

2022 yılında 9,7 milyona yakın kadın bireyde yeni kanser vakası ve 4,3 milyon kanserden ölüm meydana gelmiştir. GCO verilerine göre kadın bireylerde tahmini yeni vakalarda insidans meme kanserinde %23,8; akciğer kanserinde %9,4; kolorektal kanserde %8,9; rahim ağzı kanserinde %6,8; tiroid kanserinde %6,4; korpus uteri kanserinde %4,3 olarak bildirilmiştir. Ölüm oranı ise meme kanseri için %15,4; akciğer kanseri için %13,6; kolorektal kanser için %9,4; rahim ağzı kanseri için %8,1; karaciğer kanseri için %5,5; mide kanseri için %5,4'tür (Şeki 1.4) (GCO, 2024).

1.4.2.1 HeLa hücre hattı

1951 yılında HeLa hücre hattı, rahim ağzı kanseri olan Henrietta Lacks isimli bir hastadan elde edilen ölümsüzleştirilmiş ilk insan hücre hattıdır. Diğer kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında anormal şekilde bir hızla çoğalırlar. Östrojen reseptörü geninin HeLa hücrelerine enfeksiyon yoluyla dahil edilmesi (Maminta vd., 1991) ve androjen reseptörü mutasyonlarının çeşitli X'e bağlı hastalıklarla ilişkilendirilmesi sebebiyle (De Vos vd., 1994), HeLa hücrelerinin transferrin bağlama yeteneği üzerinde östrojen ve androjenin varlığında değişiklik gösterebileceğinden önemlidir (Ward vd., 1982). HeLa hücreleri diğer birçok kanser hücreleri gibi telomeraz enziminin aktif formuna sahiptir. Sürekli olarak kopyalanan telomerler, yaşlanmaya ve hücre ölümüne neden olup kısaltmalarını önler. Böylece sonsuz hücre bölünmesi ve ölümsüz hücre hattı oluşur (Stump, 2014; Güzelel, 2021). HeLa hücre hattı, insan hücrel ve moleküler biyolojisini incelemek için en yaygın kullanılan model hücre hattıdır (Kahya, 2022).

1.5 Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyaller; insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde bulaşıcı hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılan ilaçlar olup antibiyotikler, antiviraller, antifungaller ve antiparaziterleri kapsamaktadır. Antimikrobiyal direnç, bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara karşı yanıt alamadığında oluşturduğu bir durumdur. Direnç oluşması sonucu antimikrobiyal ilaçlar etkisiz hale gelerek tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu da hastalığın ciddiyetini arttırarak ilerlemesine, sakatlık meydana gelmesine veya ölüme sebep olabilmektedir.

Bu direnç sorunu bir süre sonra patojenlerdeki genetik değişikliklerle oluşan doğal bir süreçten ibarettir. Bu sürecin ortaya çıkması ve yayılımı göstermesi antimikrobiyallerin aşırı ve yanlış kullanımı sebebiyle hız kazanmaktadır (WHO, 2023).

20. yüzyılda antibiyotiklerin altın çağı olarak adlandırılan dönemde keşfedilen antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması antibiyotik direncinin meydana gelmesine sebep olmuştur (Dokumacı, 2024). Antibiyotikler günümüzde halen bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bazı bakterilerin ilaçlara karşı geliştirmiş oldukları direnç sorun oluşturabilmektedir. İlaçların hücreye girişinin engellenmesi, antibiyotiklerdeki enzimlerin inaktivasyonu, antibiyotik hedeflerinin değişmesi vb. gibi çeşitli mekanizmalar bakterilerde ilaç direncine sebep olabilmektedir (Junejo vd., 2023).

Mantarlarda direnç yavaş gelişmekte olup mantar ilaçlarının hastalığı önleme ve tedavi amacıyla gelişigüzel ve zamansız kullanımı direnç gelişimine sebep olabilmektedir (Yeğenoğlu, 2012). Mantarlardaki ilaç direncinin mekanizması primer veya sekonderdir. Bu oluşan direnç bireysel faktörlerle ilişkili olabilmekle birlikte mantarların ilaç ve/veya ilaç sınıfına karşı etki mekanizmasını engellemesi ya da düşük miktarda ilaç olması sebebiyle de kazanılmış olabilmektedir (Seyedmousavi vd., 2015).

1.6 Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama) Mekanizması

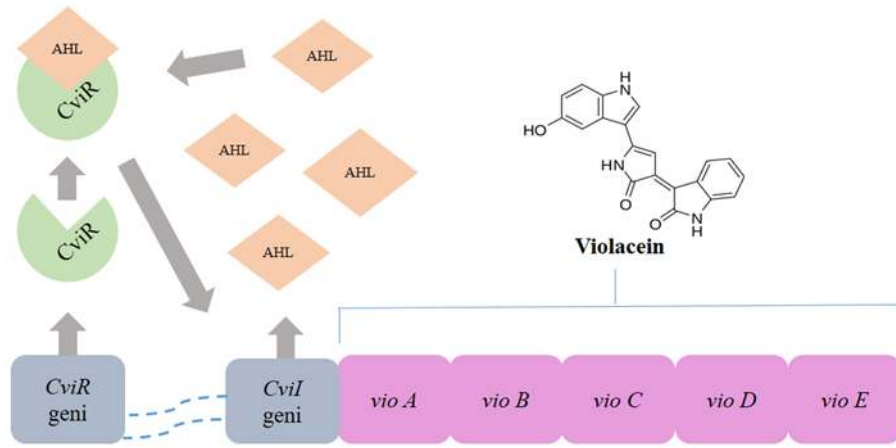
Antibiyotiğin keşfi insanlık tarihinin en önemli olayları arasında yer almaktadır. Fakat bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirmiş olduğu direnç sebebiyle alternatif yolların keşfedilmesi gerekmektedir. Quorum Sensing (QS) antibiyotikler için alternatif bir tedavi yöntemi olarak öngörülmektedir. QS, bakterilerin virülans faktörlerinin sentezini küçük sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarak fizyolojik ve biyokimyasal aktiviteleri düzenlediği bir sistemdir. Bakterilerde QS sinyal molekülleri olarak bazı otoindüktörler tanımlanmıştır. Bunlar Gram-pozitif bakteriler tarafından kullanılan otoindükleyleici peptitler (AIP), Gram-negatif bakteriler tarafından kullanılan N-açıl homoserin lakton (AHL) ve hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler tarafından kullanılan otoindüktör-2'dir (AI-2). Bu sinyal

molekülleri, biyofilm oluşumu, swarming hareketi, toksin, ekzopolisakkarit ve pigment üretimi gibi çeşitli virülans faktörlerinin sentezini regüle etmektedir. Bundan dolayı anti-QS ajanlarının, enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede kullanılabileceği düşünülmektedir (Al Kateeb vd., 2022).

1.6.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum, doğada serbest yaşayan, Gram negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, viyolasin adı verilen mavi-mor renkli pigment üreten Betaproteobacteria sınıfından bir bakteri türüdür. Subtropikal ve tropikal bölgelerdeki çeşitli ekosistemlerde hakimdir. Agresif fırsatçı bir patojen haline gelebilen, çoğu zaman ölümcül hayvan ve insan enfeksiyonlarına ve yüksek ölüm oranlarına sebep olabilen tipik bir saprofittir (Dimitrova vd., 2023).

Daha önce ifade edildiği gibi QS, hücre yoğunluğuyla ilgili bir olgudur. Hücre yoğunluğu arttığında AHL üretimi de artmakta ve ortamda birikmektedir. Ortamda biriken sinyaller, bakteri hücrelerine pasif diffüzyonla girer ve sitoplazmada bulunan *CviR* (*Chromobacterium violaceum* quorum sensing reseptörü) ile bağlanarak stabil bir protein-ligand kompleksioşturur. Sonuç olarak oluşan AHL-*CviR* kompleksi, *vio* operonunun promotor bölgesine bağlanarak onun transkripsiyonunu aktive eder ve viyolasin pigmentinin üretimi gerçekleşir. Öte yandan hücre yoğunluğu düşük olduğunda AHL konsantrasyonu eşğin altında kalır ve sinyal-reseptör kompleksi, pigment üretimini etkin kılamaz (Kothari vd., 2017). Şekil 1.5'te *Chromobacterium violaceum*'un viyolasin pigment üretiminde kullandığı QS mekanizması görölmektedir.



Şekil 1. 5 *Chromobacterium violaceum*'un QS mekanizması (Durán vd., 2016)

C. violaceum CV026, QS çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir biyosensör suşudur. Bu suş, *C. violaceum* ATCC 31532 suşunun mini-T5 mutantıdır. Diğer bir ifadeyle *cviI* tarafından kodlanan AHL sentetazı defektifdir. Bundan dolayı sadece eksojen sinyal moleküllerini algılayarak viyolasin pigmentini üretebilir (Dimitrova vd., 2023; Kothari vd., 2017).

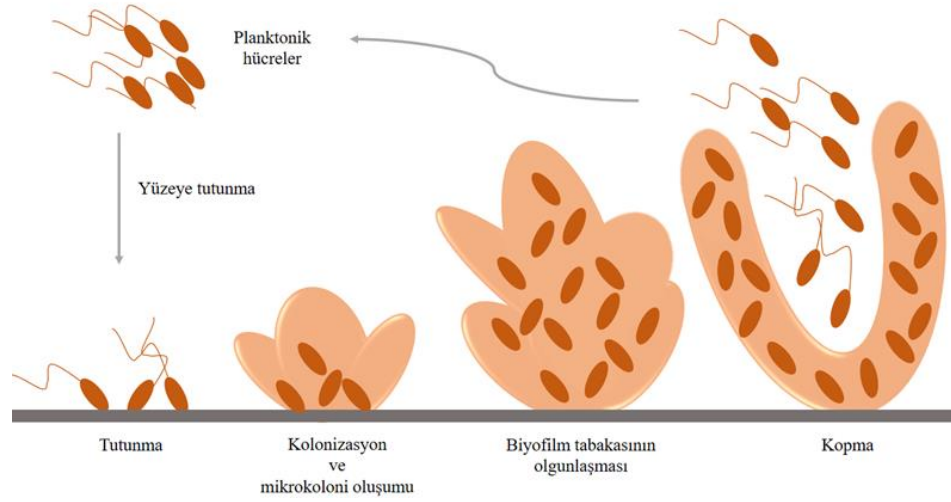
C. violaceum suşlarının farklı uzunluklarda AHL'ler kullandığı bilinmektedir. Örneğin *C. violaceum* ATCC 12472 suşu, QS sinyal molekülü olarak uzun karbon zincirine sahip AHL moleküllerini kullanırken, CV026 suşu kısa zincirli AHL moleküllerini kullanır. *C. violaceum* ATCC 12472 ve *C. violaceum* CV026 suşları QS araştırmalarında yaygın kullanılan bakteri suşlarıdır. Viyolasin pigment üretimi kolaylıkla tespit edilip ölçülebilir ve dolayısıyla potansiyel quorum sensing inhibitör moleküllerinin taranması için kullanılır. QS inhibisyonu, bakterileri öldürmeden veya büyümelerini engellemeden virülans faktörlerinin salgılanmasını azaltmalıdır. Bu olgu, patojen üzerinde seçici baskı oluşturmada virülansının inhibe edilmesini hedefler (Dimitrova vd., 2023).

1.7 Biyofilm Oluşum Mekanizması

Mikroskobun bulunması ve geliştirilmesiyle mikroorganizmaların keşfi gerçekleşmiştir. Bu keşfi gerçekleştiren mikroorganizmaları mikroskop altında ilk tanımlayan ve inceleme yapan 17. yüzyılda yaşayan Antony Van Leeuwenhoek'tur

(Kartal vd., 2021). Biyofilmlerin karmaşık bakteriyel yapılar olduğu da yine 1670'lerde ilk kez Anton Van Leeuwenhoek tarafından kendi dışındaki plaktan aldığı sürüntüyü mikroskop altında incelemesi ve mikroorganizmaların yalnız değil kümeler halinde olduğunu gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır (Kartal vd., 2021; Kauser vd., 2023). Fakat bunun biyofilm olduğunu tanımlayamamıştır. Costerton 1970'li yıllarda akarsularda bulunan bakterileri incelediğinde yüzeye tutunarak balçık gibi bir yapı oluştuğunu bildirmiştir. 1973 yılında Caracklis, endüstriyel su tesislerindeki mikroorganizmaları incelemiştir. Bu mikroorganizma topluluklarının yüzeye sıkı bir şekilde tutunduklarını ve klor benzeri dezenfektanlara karşı çok dirençli olduğunu gözlemlemiştir. 1978 yılında Costerton yaptığı çalışmalardaki bilgilerle bu oluşan dirençli yapıyı tanımlamak için “biyofilm” terimini ilk defa kullanmıştır (Kartal vd., 2021).

Mikroorganizmalar zorlu çevre şartlarında yaşamını devam ettirebilmek için fenotiplerini değiştirerek bu koşullara uyum sağlamak zorundadırlar. Bunu biyofilm olarak adlandırılan, canlı ve cansız yüzeylere yapışıp çok hücreli topluluklar oluşturarak gerçekleştirmektedirler. Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 1.6'da gösterilmiştir. İlk olarak mikroorganizmalar yüzeye tutunur. Tutunan mikroorganizmalar kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumunu gerçekleştirir. Burada bakteriler yüzeye tutunduktan sonra hücreler bölünür ve çoğalır. Bu sebeple birkaç hücreden oluşan bir koloni oluşturulur. Biyofilm tabakası olgunlaşarak hücreler arası etkileşimler artar ve dirençli bir hal alır. Son olarak, bağlanmayan hücreler biyofilm yüzeyinden kopar ve daha sonra bu hücreler yeni yüzeylere veya ortamlara yayılabilir.



Şekil 1. 6 Biyofilm oluşum aşamaları (Temel ve Eraç, 2018)

1.7.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Önemli bir insan patojeni olan *S. aureus*, biyofilm inhibisyon deneylerinde yaygın olarak kullanılan Gram-pozitif hücre duvarına sahip kok morfolojisinde bir bakteri türüdür. *S. aureus* ATCC 25923 suşu, standart laboratuvar test kontrol suşu olarak kullanılan, Seattle 1945 isimli bir klinik izolattır. Metisilin de dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlıdır (Ma vd., 2012; Treangen vd., 2014).

1.8 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, *Eupatorium cannabinum* türünün toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal, anti-quorum sensing ve anti-biyofilm aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ekstraktların antikanser aktivitesi PC-3 prostat kanseri ve HeLa rahim ağzı kanseri hücre hatlarına karşı test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi insan patojenlerini temsilen altı Gram-negatif (*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028) ve üç Gram-pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bakteri ile bir maya (*Candida albicans* ATCC 10231) olmak üzere toplam 9 bakteri ve

1 maya suşuna karşı test edilmiştir. Anti-quorum sensing aktivite *Chromobacterium violaceum* CV026 mutant suşuna karşı test edilmiştir. Anti-biyofilm aktivite deneyleri ise *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşuna karşı test edilmiştir. Anti-quorum sensing ve anti-biyofilm çalışmaları *Eupatorium cannabinum* türü için literatürde ilk olma niteliği taşımaktadır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Eupatorium* Cinsi Antikanser Çalışmaları

Tıbbi bitkilerin hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki önemi kansere yönelik tedavi için bir umut olmuştur. *Eupatorium* üyelerinin antikanser etkinliğinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. *Eupatorium cannabinum* kloroform ve su ekstraktlarının BT-20 (insan meme kanseri hücre hattı), HepG2 (insan karaciğer kanseri hücre hattı), Caco-2 (insan kolon kanseri hücre hattı) ve Jurkat (lösemi hücre hattı) hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Jurkat hücreleri her iki ekstratta da duyarlıyken diğer hücre hatları sadece kloroform ekstraktına karşı duyarlılık göstermiştir. İçeriğindeki metoksillenmiş flavonlar bakımından zengin olan kloroform ekstraktı, test edilen hücre hatlarının çoğu üzerinde 24 saatlik maruziyetin ardından orta derecede sitotoksik etkiye sahipken yüksek miktarda kafeik asit ve rutin içeren su ekstraktı 48 saatlik maruziyetin ardından belirli bir sitotoksik etki göstermiştir (Grigore vd., 2018). *E. cannabinum* etanol ekstraktının HT29 (kolon kanseri hücre hattı) hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Ekstrakt hücre hattı üzerinde mitotik bozulmaya ve apoptotik olmayan hücre ölümüne yol açan sitotoksik aktiviteye sahiptir. Etanol ekstraktı ve bisfenol A'ya birlikte maruz kalma, özellikle en düşük ekstrakt konsantrasyonu için mitotik anomalileri artırmış, ancak canlılık üzerinde önemli bir etki tespit edilmemiştir. Aksine, etanol ekstraktının doksorubisin (DOX) ile birlikte maruziyeti, DOX ile indüklenen hücre döngüsü durmasını etkilemeden, tüm etanol ekstraktı konsantrasyonları için DOX ile ilişkili olarak hücre canlılığını azaltmıştır (Ribeiro-Varandas vd., 2014). Başka bir çalışmada, *E. cannabinum* bitkisinin toprak üstü kısımları kullanılarak maserasyon yöntemi ile hazırlanan kloroform ekstraktının MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Kloroform ekstraktının alt fraksiyonları ve eucannabinolide üzerine araştırma yapıldığından eucannabinolide daha etkili olmuştur (Abuali vd., 2021).

Eupatorium macrocephalum, *Eupatorium pedunculatum* ve *Eupatorium laevigatum* maserasyon su ve etanol ekstraktları HT29 (insan kolon adenokarsinom hücre hattı)

ve NCI-H460 (insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı) ve U373 (insan glioblastoma hücre hattı) hücrelerine karşı test edilmiştir. Test edilen *Eupatorium* türlerinin sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Monks vd., 2002).

E. japonicum bitkisinden izole edilen ana biyoaktif bileşik olan eupatoriopocrinin, nitrik oksit üretimini inhibe ederek güçlü anti-inflamatuar ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, eupatoriopocrin'in, MCF-7, HepG2 ve NTERA-2 insan kanser hücre hatlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve NTERA-2 hücre hattında apoptoz indüksiyonuna yol açtığı bulunmuştur. Bu çalışma, eupatoriopocrin'in enflamasyon ve kanser hastalıklarını hedef alan bir öncü bileşik olabileceğini ortaya koymaktadır (Phan vd., 2021). Chang ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışmada *E. fortunei* 'nin toprak üstü kısmından beş yeni ve on bir bilinen bileşik izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Belirlenen eupatodibenzofuran A bileşiğinin, mitokondriyal ve kaspaz-3'e bağımlı yollar yoluyla A549 ve MCF-7 hücrelerinin apoptozunu belirgin şekilde indüklediği tespit edilmiştir.

E. adenophorum'un hepatoselüler karsinom (HCC) üzerindeki farmakolojik etkileri incelenmiştir. Esansiyel yağın, HCC hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu teşvik ettiği saptanmıştır (Chen vd., 2018). *E. odoratum* bitkisinin aseton ve etil asetat ekstraktlarının MCF-7 kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Harun vd., 2021). *E. littorale* bitkisinden elde edilen eupafolin ve hispidulin flavonlarının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. HeLa hücrelerinde canlılığı azalttığı gözlemlenmiştir (Herrerias vd., 2010).

E. lindleyanum bitkisinin içerik analizinde tespit edilen seskiterpenoidlerin, TNBC (triple negatif meme kanseri) hücre hatlarına karşı antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Özellikle, Eupalinolide J ve Eupalinolide O bileşikleri anti-TNBC aktivite göstermiştir (Yang vd., 2019). *E. lindleyanum* DC'den elde edilen yeni bir seskiterpen lakton F1012-2'nin kanser hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. F1012-2'nin on insan meme kanseri hattı üzerindeki antikanser aktiviteleri araştırılmış ve TNBC için TNBC olmayan hücre hatlarına göre önemli ölçüde daha düşük IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde p53'ü yıkmak için kullanılmıştır. F1012-2'nin önemli bir antikanser etki sergilediği ve MDA-MB-231'in p53 ekspresyonunu azalttığı

belirlenmiştir (Wang vd., 2022). *E. lindleyanum* DC'den izole edilen yeni bir bileşik olan Eupalinolide O'nun, insan MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri üzerinde etkili antikanser aktivite sergilediği ve Eupalinolide O'nun MDA-MB-468 hücrelerindeki sitotoksik etkisi zaman ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Yang vd., 2016).

2.2 *Eupatorium* Cinsi ile Antimikrobiyal Çalışmalar

Patojen mikroorganizmaların sentetik ilaçlara karşı direnç kazanmaları sebebiyle bitkilerin potansiyel yeni antimikrobiyal ajanlar olabileceği düşünülerek çalışmalar yapılmaktadır. *Eupatorium* üyelerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Asteraceae familyasına ait çeşitli bitkilerin etanol ekstraktları, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından incelenmiştir. *Eupatorium* cinsine ait test edilen türler; *Eupatorium fortunei* Turcz. bitkisinin toprak üstü kısımları ve *Eupatorium purpureum* L. bitkisinin kök kısımlarıdır. Test edilen bitkilerde antimikrobiyal etki gözlenmemiştir (Wat vd., 1980).

E. serotinum ve sekiz diğer bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların antifungal aktivitesi incelenmiştir. Özellikle, *E. serotinum*'un esansiyel yağı, *Cryptococcus neoformans*'a karşı önemli bir antifungal etki göstermiştir (Lawson vd., 2020). 26 farklı bitkinin uçucu yağları *Botrytis cinerea* mantarına karşı taranmıştır. Bunların içinden, *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. sanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* ve *Z. officinale*'nin esansiyel yağları antifungal aktivite sergilemiştir (Tripathi vd., 2008).

E. adenophorum, *Artemisia houstonianum* ve *Lantana camara* bitkilerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. *E. adenophorum* esansiyel yağının *Arthrobacter protophormiae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür. *A. houstonianum* esansiyel yağı, *M. luteus* ve *R. rhodochrous*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterirken, diğer organizmalara etkili olmamıştır. *L.*

camara esansiyel yağı ise *A. protophormiae*, *M. luteus*, *R. rhodochrous* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ancak, *E. coli*'ye karşı etkili olmamıştır (Kurade vd., 2010). *E. adenophorum* yaprak ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi rapor edilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin, hem Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) hem de Gram-negatif (*Escherichia coli*) bakterilere karşı bakteriyel inhibitör etkileri olduğu belirlenmiştir (Dua vd., 2023).

E. glutinosum Lam. bitkisinin metanol ve etanol ekstraktları, *E. coli* DH5- α 'ya karşı etkili olmuştur. Ancak *E. coli* TG1 ve E410A5 suşlarına karşı aktivite göstermemiştir. Ekstraktlar, *E. coli* DH5- α 'ya karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Zamora-Mendoza vd., 2023). *E. triplinerve* bitkisinin yapraklarının metanol ekstraktı, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etki sergilemiştir. Ayrıca, ekstraktın polar olmayan fraksiyonları, özellikle Gram-negatif bakterilere karşı iyi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, hidroalkolik yaprak ekstraktı, özellikle Gram-negatif bakterilere karşı daha iyi antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Matos Lopes vd., 2015).

E. triplinerve'nin yaprak ekstraktlarını kullanarak gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen AgNP'lerin antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiş ve yaygın patojenlere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesi, *E. coli*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus* ve *Pseudomonas* gibi bakterilere karşı test edilmiştir. Yaprak ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin, *Salmonella*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* üzerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, *Klebsiella* ve *Staphylococcus*'a karşı da hafif bir direnç göstermiştir (Dev vd., 2018).

Eupatorium odoratum, *Vernonia cinerea*, *Mikania micrantha*, *Tridax procumbens*, *Pilea microphylla* ve *Cuscuta reflexa* bitkilerinin farklı biyoaktif bileşiklerini içeren ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi yaygın bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. *E. coli* bakterisine karşı, *E. odoratum* ve *M. micrantha* en yüksek inhibisyon göstermiştir. *Proteus vulgaris*'e karşı ise *C. reflexa*, *M. micrantha* ve *T. procumbens* etkili olmuştur. *P. aeruginosa* bakterisine karşı ise *C. reflexa*, *M. micrantha* ve *E. odoratum* etkili

olmuştur. Aseton bitki ekstraktları, *E. coli*'ye karşı en etkili olanın *E. odoratum* olduğunu göstermiştir. *P. vulgaris*'e karşı ise *M. micrantha* en yüksek inhibisyonu sağlamıştır. Alkol içeren ekstraktlar, *E. odoratum*'un çeşitli bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir (James vd., 2018).

E. triplinerve bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal etkisinin incelenmesi sonucu çeşitli bakteri suşlarına karşı orta düzeyde antibakteriyel ve güçlü antifungal aktivite görülmüştür. En güçlü antibakteriyel aktivite *Salamella typhae* ve *Shigella sonnei*'ye karşı kaydedilirken, en zayıf antifungal aktiviteler *Macrophomina phaseoline* ve *Botryodiplodia theobromae*'ye karşı gözlemlenmiştir (Sugumar vd., 2015). *Eupatorium adenophorum* yapraklarından elde edilen yağların antifungal özellikleri değerlendirilmiş ve *Phythium myriotylum*'u etkili bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Liu vd., 2017).

Eupatorium cannabinum L. subsp. *cannabinum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ, hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalara karşı önemli aktivite göstermiştir. Gram-pozitif bakteriler arasında *Streptococcus fecalis* en hassasıdır. Gram-negatif bakteriler arasında ise *Pseudomonas aeruginosa* yağa karşı en düşük hassasiyeti göstermiştir (Senatore vd., 2001).

Eupatorium odoratum bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağ ve gümüş nitratın antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Test edilen mikroorganizmalar arasında *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* bulunmaktadır. Uçucu yağ, tüm mikroorganizmalara karşı önemli bir aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi, bitki ekstraktı ve gümüş nitrat ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Nanopartiküller, bakteri türlerine karşı mantardan daha aktiftir ve özellikle Gram-negatif bakterilere karşı daha yüksek bir antibakteriyel etkinlik göstermektedir (Elemike vd., 2017).

E. odoratum yapraklarından elde edilen esansiyel yağın antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Yapılan deneylerde, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi insan patojeni bakteriler kullanılmıştır. Esansiyel yağın *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *S. pyogenes*'e karşı da belirgin bir antimikrobiyal etki sergilemiştir (Choudhary vd., 2023).

2.3 *Eupatorium* Cinsi Anti-Quorum Sensing Çalışmaları

Antimikrobiyal direnç geliştiren mikroorganizmalara yönelik tedavinin zorluğu araştırmacıları anti-QS gibi alternatif tedavi yöntemlerine sevk etmiştir. Doğal bitkilerin hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesindeki etkisi bu çalışmalara anti-QS ajanı olabilmesi için yön vermektedir. İçerisinde *E. adonorpum*'un da bulunduğu 25 türün antibiyofilm etkisi *Escherichia coli*'ye karşı araştırılmıştır. Bu bitkilerin ekstraktlarının, *E. coli* biyofilmlerinin oluşumunu önleme veya var olan biyofilm tabakalarını yıkımlama yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Bhandari vd.,2021). *Eupatorium odoratum* bitkisinden elde edilen etanol ekstraktları kullanılarak çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin klinik olarak önemli bakteri suşları olan *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* MTCC 119 ve *Staphylococcus aureus* MTCC 7443 üzerindeki etkilerinin incelenmesi sonucunda belirgin bir inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca, merkezi venöz kateterleri yeşil sentezlenmiş ZnO NP'ler ile kaplayarak ve optimize edilmiş sürekli akış modelini kullanarak bu kaplamaların *in vitro* antibiyofilm etkinliği değerlendirilmiştir. Kateterlerin hidrofilik işlevselleştirilmiş arayüzünün *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* biyofilm oluşumunu önlemede etkili olduğu gözlenmiştir (Malhotra vd., 2023).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri

Çalışmada kullanılan *Eupatorium cannabinum* bitkisi Kastamonu ilinin Hanönü ilçesinden MARE 22437 toplayıcı numarası ile 18.08.2020 tarihinde toplanmıştır. Bitkiyi Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri bölümünden Dr. İsmail Şenkardeş tanımlamıştır.

Eupatorium cannabinum bitkisi toprak üstü bölümlerinden etil asetat (EA), metanol (MeOH) ve su ekstraktları maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Ekstraktlar Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Gökhan Zengin tarafından sağlanmıştır. Maserasyon işleminde bitki örneklerinin toprak üstü bölümleri ayrılarak gölge koşullarında kurutulmuş ardından örnekler değirmen aracılığıyla toz haline getirilmiştir. Her bir bölümün ekstraktları farklı teknikler kullanılarak çıkarılmıştır. Maserasyon tekniğinde bitkisel materyalden etil asetat, metanol ve su çözücüler ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitki materyalleri (5 g), oda sıcaklığında (~25°C) 24 saat 100 mL bu çözücüler ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra çözücüler döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Diğer ekstraksiyon yöntemi olan ultrasonikasyonda ise bitkisel materyal etil asetat, metanol ve su ile 30 dakika ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ardından karışımlar süzölmüş ve çözücüler ayrılmıştır. Elde edilen sulu karışımlar liyofilize edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar analizler yapılncaya kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Elde edilen ekstraktların verim yüzdeleri, [(elde edilen ekstrakt / ekstre edilmek için kullanılan bitki) x 100] formülüne göre hesaplanmıştır (Abbas vd., 2021).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Eupatorium cannabinum bitki ekstraktlarının kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi prostat ve rahim ağzı kanseri hücre hatları kullanılarak test edilmiştir.

Araştırmada prostat kanseri PC3 hücre hattı ve rahim ağzı kanseri HeLa hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PC-3 hücre hattı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünden ve HeLa hücre hattı Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden sağlanmıştır.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Ekstraktların antimikrobiyal etkilerini incelemek için insan patojenlerini temsilen altı Gram-negatif (*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028) ve üç Gram-pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bakteri ile bir maya (*Candida albicans* ATCC 10231) olmak üzere toplam 9 bakteri ve 1 maya suşu kullanılmıştır. Anti-QS aktivite deneyleri için ise *Chromobacterium violaceum* CV026 suşu kullanılmıştır. Suşlar, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) referans suşlarıdır ve Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan suşlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşları

Numara	Suş	Morfoloji
1	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19002	Gram-negatif kokobasil
2	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Gram-negatif basil
3	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram-negatif basil
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Gram-negatif basil
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram-negatif basil
6	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Gram-negatif basil
7	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Gram-negatif basil
8	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Gram-pozitif basil
9	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram-pozitif kok

Tablo 3.1'in devamı

10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram-pozitif kok
11	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Maya

3.1.4 Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kapsamında analizlerde kullanılan kimyasallar, cihazlar ve sarf malzemeler Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı ve Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nın alt yapısı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.2' de, cihazlar ve sarf malzemeler Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Numara	Kimyasal Adı	Marka
1	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT)	Thermo Fisher Scientific
2	Penisilin/Streptomisin karışımı (%0,1)	Thermo Fisher
3	İnsülin (0,01 mg/ml)	Pan Biotech
4	Dimetilsülfoksit (DMSO)	Isolab, Biofroxx
5	Fosfat Tampolu Tuz Çözeltisi (PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
6	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
7	Non-Esansiyel Amino Asit (NEAA)	Pan Biotech
8	Trypsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific
9	Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
10	Levofloksasin ve Flukonazol	Bioanalyse

Tablo 3.2'nin devamı

11	Kristal viyole	Merck
12	Etanol (EtOH)	Tekkim
13	Serum Fizyolojik (Sodyum klorür)	Merck
14	Mueller Hinton agar (MHA)	Biolife
15	Mueller Hinton broth (MHB)	Biolife
16	Luria Bertani broth (LB)	Nzytech
17	Nutrient agar (NA)	Merck
18	Bakteriyolojik Agar (%0,5)	AppliChem
19	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Millipore- Germany

Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Numara	Ekipman Adı	Marka/Model
1	-20 / +4 °C Buzdolabı	Arçelik / 4552
2	-80 Derin dondurucu	Nuaire/Glacier-Nu 9668E
3	Buz Makinası	Hoshizaki / Scotsman
4	Hassas terazi	Precise / XP220A
5	Saf su cihazı	Human Corporation Zeneer Power
6	Ultra saf su cihazı	Mpminipure / Dest-up
7	Vortex	Wise-Mix / VM-10
8	Çekerocak	Tezsan
9	Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Tezsan / ClassII
10	Test kabini	Nüve / TK-252
11	CO ₂ İnkübatörü	Nüve / EC160

Tablo 3.3'ün devamı

12	Isı Kontrollü İnkübatör	Thermo
13	Masaüstü Santrifüj	Nüve/ NF 800
14	Mikrosantrifüj	Starlab
15	Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich/MICRO 220R
16	Faz Konstrast Görüntüleme Sistemli Kameralı Ters Mikroskop	Leica/DMi1
17	Spektrofotometre	Thermo Scientific/ Multiskan GO UV/Vis
18	Mcfarland Dansitometre Cihazı	Biosan / DEN-1B
19	Kimyasal Saklama Dolabı	Tez- San
20	96 Kuyucuklu Mikropleytler	Techno Plastic Products
21	Steril Besiyeri Kapları (90mm çaplı)	Isolab
22	Falkon Tüpler (50 mL ve 15 mL)	Isolab, CAPP
23	Eppendorf Tüpler (Cryotüp)	Isolab
24	Serolojik Pipetler	Biologix
25	Mikropipetler (tek ve çok kanallı)	Eppendorf, Thermo, CAPP, Topskien
26	Tek kullanımlık plastik özeler	Isolab
27	pH gösterge sribi	Isolab
28	Thoma Lamı	Marienfild-Neubauer- improved
29	Pamuklu eküvyon	Cultiplast/LP Italiana spa
30	Otoklav	Nüve/ Steam Art
31	Çalkalamalı Kuru Blok Isıtıcı	Biosan / TSH-100
32	pH gösterge sribi	Isolab

3.2 Metot

3.2.1 Ekstraktların Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması

E. cannabinum'un toprak üstü kısımlarının maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle elde edilen EA, MeOH, su ekstraktlarının *in vitro* hücre canlılığı aktivitesinin belirlenmesi amacıyla son konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde bitki ekstraktları DMSO ve/veya steril ultra saf su ile çözülerek ana stok materyali hazırlanmıştır. Ana stoklardan seri dilüsyonlar ile 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL çalışma stokları hazırlanmıştır.

3.2.2 Antikanser Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada, *Eupatorium cannabinum* bitkisinin toprak üstü bölümlerinden çeşitli yöntemlerle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının prostat ve rahim ağzı kanseri üzerindeki *in vitro* antikanser aktivitesi sırasıyla PC-3 ve HeLa hücre hatlarına karşı araştırılmıştır. Antikanser aktivite 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi (Mitokondriyal Dehidrojenaz Enzim Aktivitesi) kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.2.1 Hücre kültürü devamlılığı

Çalışmada kullanılan PC3 ve HeLa hücre hatlarının çoğaltılması amacıyla yüksek oranda glikoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) kullanılmıştır. DMEM içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 NEAA (Non-essential aminoasit), %0,1 pen/str (penisilin/streptomisin), %0,01 mg/mL insülin eklenmiştir. Hazırlanan hücre besiyeri +4°C'de muhafaza edilmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde 90 mm çapındaki steril petrilere inkübe edilmiştir. Logaritmik faza (hücrelerin ~%70-80 yoğunluğa ulaşması) ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama işleminde petri içerisinde bulunan besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 1 mL hacmindeki 1X fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanmıştır. Sonrasında enzim aktivitesinin gerçekleşmesi için 1 mL 1X tripsin-EDTA solüsyonuyla inkübatör

içerisinde 37°C’de 5 dk muamele edilmiştir. Sürenin ardından tripsin-EDTA’nın aktivitesini sonlandırmak amacıyla petri içerisine 1 mL DMEM besiyeri eklenip hücreler petri kabı içerisinden toplanmıştır. Toplanan hücreler 15 mL’lik falkon tüp içerisine alınıp 2000 rpm’de 5 dk santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant aspire edilmiştir. Pelet taze DMEM besiyeri ile süspansiyon edilmesinin ardından 7 mL DMEM besiyeri içeren yeni petrilere aktararak inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.2 Hücre canlılık testi

Logaritmik faza ulaşmış olan hücreler pasajlama aşamasındaki gibi falkon içerisinden toplanıp santrifüj yapılmıştır. Falkon içerisinden oluşan pellet süpernatanttan uzaklaştırılıp 1 mL taze 1X DMEM besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonun pellet yoğunluğuna göre 1/10 olacak şekilde seyreltilmesinin ardından hücreler bir hemositometre üzerine transfer edilip ters mikroskop altında sayılmıştır. Süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropleytte her bir kuyucuk için 100 µL’de 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Mikropleyt 24 saat 37°C ve %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ekstraktların çalışma stoklarından 10’ar µL sırasıyla tüm kuyucuklara konulmuş ve son konsantrasyonları 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL olmuştur. Kontrol olarak ise kuyucuklara 10’ar µL steril ultra saf su konulmuştur. Sonra mikropleytin 48 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve ekstraktların her birinin muamelesi kuyucuklarda üç teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki içerik dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp hücrelerin ters mikroskop yardımıyla 10X büyütmede görüntüleri alınmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL’lik falkon tüp içerisine 0,025 g MTT + 250 µL FBS + 49,75 mL 1X DMEM 100 µL şeklinde hazırlanmış olan MTT solüsyonundan konulmuş ve petri kabı 37°C’de %5 CO₂ koşullarında dört saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuk içerisine 100’er µL saf DMSO eklenmiştir. Mikropleyt, formazan kristallerinin çözülmesi için oda sıcaklığında 300 rpm’de ~10-15 dakika tutulmuştur. Ardından DMSO blank kuyucuğuna karşı elde edilen türbidite 570 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı ile okutulmuştur. Ekstraktların bulunduğu kuyucuklardaki

hücre canlılığı kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır. Deney, birbirinden bağımsız en az üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar yüzde cinsinden hesaplanıp veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Verilere göre istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Ekstraktların IC₅₀ (hücre proliferasyonunda %50 azalmaya sebep olan inhibitör konsantrasyonu) değeri GraphPad Prism 8 programında hesaplanmıştır.

3.2.3 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Toprak üstü ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (EUCAST, 2023). Bu amaçla mikroorganizmaların taze kültürlerinden steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) içerisinde, bir hücre dansitometresi kullanılarak McFarland 0,5 (bakteriler için $1-2 \times 10^8$ kob/mL, maya için $1-2 \times 10^6$ kob/mL) yoğunluğunda inokulumlar hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum bakteriler için MHA besiyerine, maya için SDA besiyeri yüzeyine pamuklu eküvyon yardımıyla üç yönlü ekilmiştir. Ardından besiyeri yüzeyine 6 mm çapında blank diskler yerleştirilmiş ve disklerin üzerine son konsantrasyonu 400 µg olacak şekilde ekstrakt eklenmiştir (ekstraktların 20 mg/mL çalışma stoklarından 20 µL damlatılmıştır). Çalışmada referans antimikrobiyal ajan olarak bakteriler için levofloksasin (5 µg), maya için flukonazol (25 µg) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak disklere ekstraktların çözücülerini damlatılmıştır. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda diskleri çevreleyen inhibisyon zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

3.2.4 Anti-QS Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların anti-QS aktivitesi, *C. violaceum* CV026 mutant suşunda viyolasin pigment üretimi üzerine yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır (McClean vd., 1997). Bu amaçla CV026 suşunun LB (Luria-Bertani) agar'daki taze kültürlerinden bir koloni alınarak 5 mL LB broth'da 37°C'de ve 150 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. Süre sonunda bir gecelik kültürden 50 µL alınarak eritilmiş 5 mL hacmindeki LB agar (%0,5 agar) içerisine inoküle edilmiştir. İlave olarak ortama son konsantrasyonu 5 µM

olacak şekilde eksojen C6-AHL sinyal molekölü eklenmiştir. Agar-sinyal-költür karışımı yüksek hızda vortekslendikten sonra daha önce hazırlanmış LB agar içeren petrilerin yüzeyine dökölmüş ve donması için yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Ardından agar yüzeyinde 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklara ekstraktların 20 mg/mL çalışma stoklarından 50'şer µL transfer edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun bir gecelik sıvı költürü (50 µL), negatif kontrol olarak ise ekstraktların çözücüsü kullanılmıştır. Költürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda kuyucukların etrafında pigment üretiminin inhibe olduğu, ancak bakteri üremesinin inhibe olmadığı, opak, buzlu cam görüntüsündeki zon varlığı araştırılmıştır.

3.2.5 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyi

Ekstraktların biyofilm oluşumunu önleme ve önceden oluşmuş biyofilm tabakasını eradike etme aktiviteleri kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır (Song vd., 2019).

3.2.5.1 Sıvı mikrodilüsyon deneyi

Anti-biyofilm aktivite deneylerinde ekstraktların bakteri üreme ve gelişmesini baskılamaması için ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri araştırılmış ve sonuç olarak bir sub-MİK değeri ile anti-biyofilm aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. MİK değeri belirlenmesi için uygulanan sıvı mikrodilüsyon yöntemi Wiegend ve arkadaşlarının (2008) tarif ettiğı şekilde 96 kuyucuklu mikropleytte gerçekleştirilmiştir. Özetle, ekstraktların 1000-62,5 µg/mL konsantrasyon aralığı test edilmiş ve tüm kuyucuklara son konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde inokulum eklenmiştir. Pleyt, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda kuyucuklarda gözle görülür üremenin olmadığı son ekstrakt konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.2 Biyofilm inhibisyon deneyi

Ekstraktların biyofilm inhibisyon aktiviteleri *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır. Özetle, *S. aureus* suşunun taze költüründen alınan bir koloni 5 mL LB broth içeren deney tüpüne inoküle edilmiş ve 37°C'de 125

rpm’de bir gece üretilmiştir. Süre sonunda kültür taze LB broth ile 100 kat sulandırılarak $\sim 1.0 \times 10^6$ kob/mL yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum, düz tabanlı ve polistren yapıdaki 96 kuyucuklu mikrotitrasyon pleytine 190’ar μ L hacminde inoküle edilmiştir. Ardından 10’ar μ L hacminde ekstraktların 5 mg/mL çalışma stoğundan eklenmiştir (final konsatrasyon bir sub-MİK değeri olan 250 μ g/mL olmuştur). Kontrol kuyucuklarına ise saf su ve ekstraktlar ile aynı konsantrasyonda olacak şekilde bazı ekstraktların çözücüsü olan DMSO eklenmiştir. Her bir uygulama üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Pleyt, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüm kuyucuklardaki içerik dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ardından planktoniklerin (bağlanmayan hücrelerin) uzaklaştırılması için kuyucuklar distile su ile üç kez yıkanmış ve kurutulmuştur. Sonrasında biyofilm tabakasını boyamak için tüm kuyucuklara 200 μ L %0,1’lik kristal viyole solüsyonundan eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre bittiğinde fazla boya dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Ardından yukarıda anlatıldığı yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Sonrasında biyofilm tabakası tarafından tutulan boya 200 μ L hacminde %96 etanol ile çözülmüştür. Tüm kuyucuklardaki absorbans değeri blank kuyucuğu olan %96 etanole karşı 550 nm dalga boyunda okutulmuştur. Ekstraktlarla muamele edilen kuyucuklardaki biyofilm tabakasının oluşumu kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmış ve biyofilm inhibisyonu (%) $[1-(OD_{\text{ekstrakt}} / OD_{\text{kontrol}})] \times \%100$ formülü ile hesaplanmıştır. Çalışma birbirinden bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.3 Biyofilm eradikasyon deneyi

Bu amaçla *S. aureus*’un yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan inokulumundan 200’er μ L mikrotitrasyon plağının kuyucuklarına dağıtılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki içerik 250 μ g/mL ekstrakt içeren 200 μ L LB broth ile değiştirilmiş ve plak 37°C’de 24 saat daha inkübe edilmiştir. Yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilen boyama işlemlerinin ardından biyofilm inhibisyon oranı (%) hesaplanmıştır.

3.2.6 İstatistiksel Analizler

Antikanser ve anti-biyofilm aktivite deneylerine ait veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Elde edilen bulguların grafiklerinin hazırlanmasında Microsoft Excel 2016 programından yararlanılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS 23. paket programındabağımsız grup t-testi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1 Ekstrakt Verimliliği Bulguları

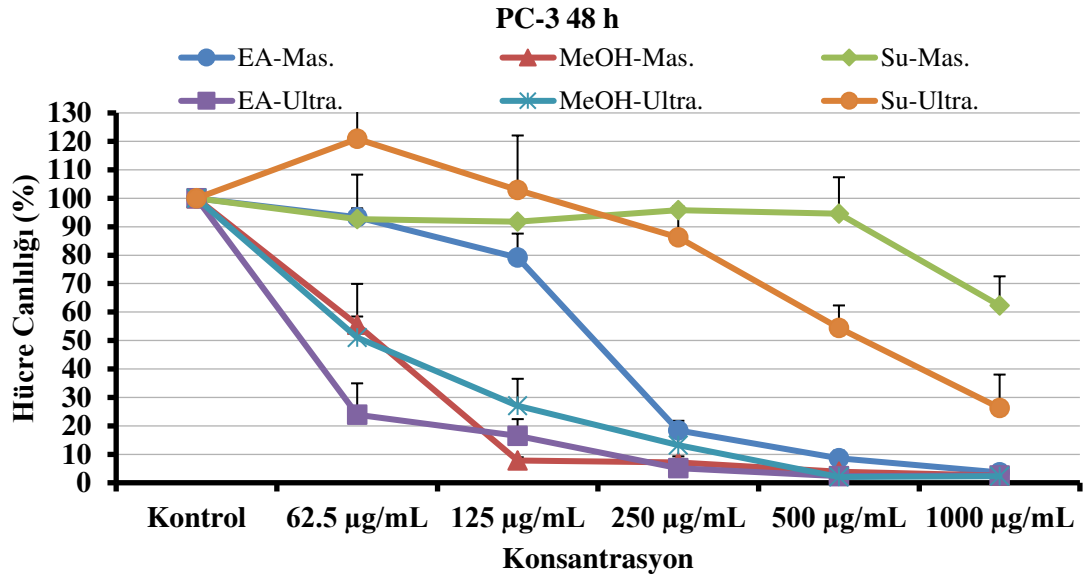
E. cannabinum bitkisinin toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan su, metanol ve etil asetatlı ekstraktların verim yüzdeleri, [(elde edilen ekstrakt / ekstre edilmek için kullanılan bitki) x 100] formülü yardımıyla hesaplanmıştır. Maserasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat ekstraktı verimi %1,8; metanol ekstraktı %3 ve su ekstraktı %3,06 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat ekstraktı verimi %1,86; metanol ekstraktı %1,82 ve su ekstraktı %2,88 olarak hesaplanmıştır. En yüksek verim maserasyon yöntemi su ekstraktında tespit edilmiştir.

4.2 Antikanser Aktivite Deneyi Bulguları

E. cannabinum bitkisinin toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan su, metanol ve etil asetatlı ekstraktlar PC-3 ve HeLa hücre hatlarına karşı belirli konsantrasyonlarda (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL) muamele edilmiştir. Belirli konsantrasyonlardaki ekstraktların 48. saatteki etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla hücre canlılığı deneyi yapılmıştır. Hücre görselleri ekstraktlar ile 48 saat muamelenin ardından ters mikroskop yardımıyla elde edilmiştir.

4.2.1 Bitki Ekstraktlarının PC-3 Hücre Hattındaki Hücre Canlılığı Deneyi Bulguları

Bitki ekstraktlarının PC-3 hücre hattı üzerindeki antikanser aktivitesi ve hücre canlılık aktivitesi değerleri Grafik 4.1 ve Tablo 4.1’de verilmiştir.



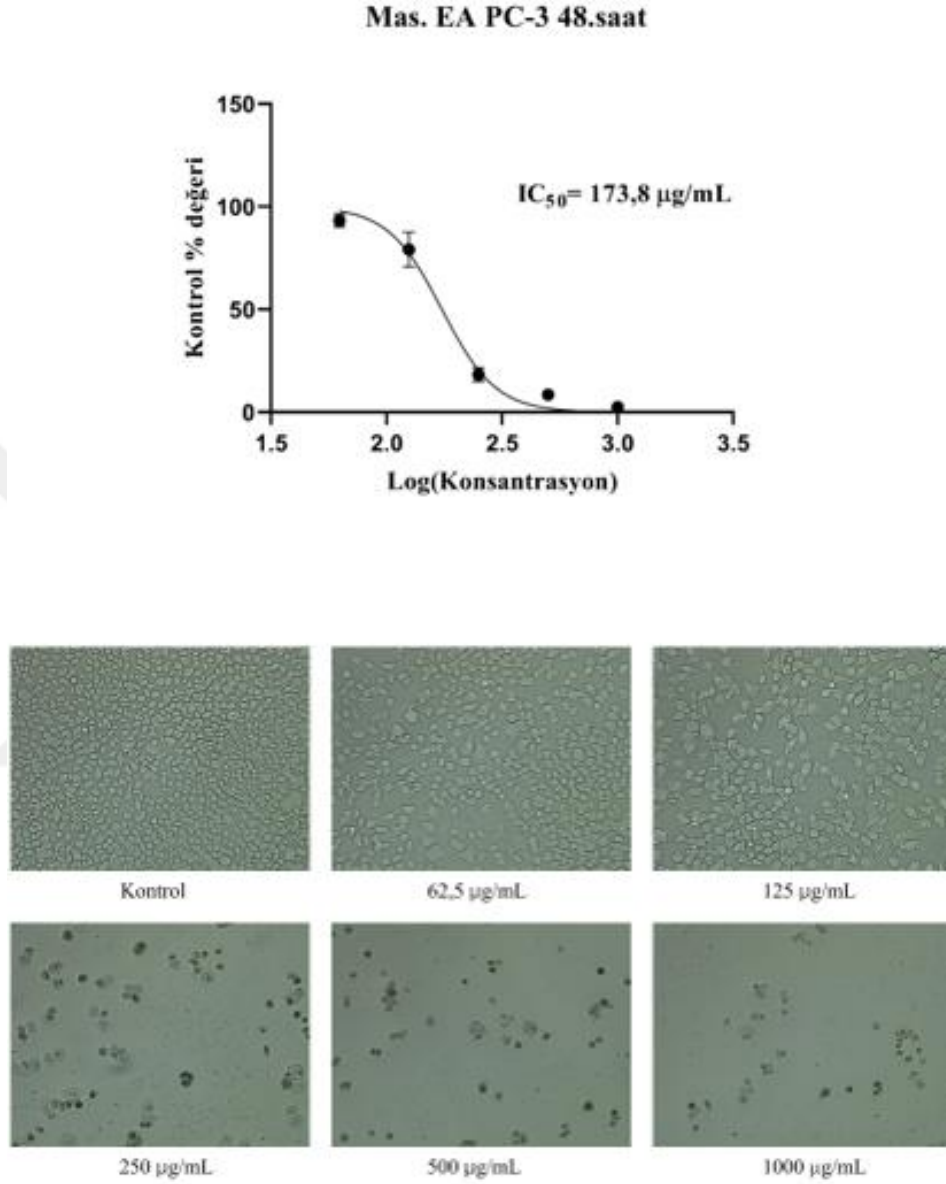
Grafik 4. 1 Toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat sonra PC-3 hücre hattı üzerine antikanser aktivitesi

Tablo 4. 1 Ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri (*p<0,05)

Hücre canlılığı (%)						
Ekstrakt	EA-Mas.	MeOH-Mas.	Su-Mas.	EA-Ultra.	MeOH-Ultra.	Su-Ultra.
Kontrol	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
62.5 µg/mL	93,3±3,2*	55,6±14,4*	92,6±15,7	23,9±11,0*	51,1±7,4*	120,9±17,8*
125 µg/mL	79,2±8,4*	7,8±1,2*	91,7±0,9*	16,5±5,9*	27,1±9,5*	103,0±19,1
250 µg/mL	18,4±3,4*	7,1±2,1*	95,8±1,1*	5,1±2,9*	13,2±6,4*	86,2±10,9*
500 µg/mL	8,6±2,6*	3,9±2,7*	94,5±12,9	2,3±1,2*	2,0±1,5*	54,4±7,9*
1000 µg/mL	3,6±2,2*	2,5±0,7*	62,3±10,3*	2,5±2,3*	2,3±1,1*	26,3±11,7*

E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %3,6'sının, 500 µg/mL'de %8,6'sının, 250 µg/mL'de %18,4'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir.

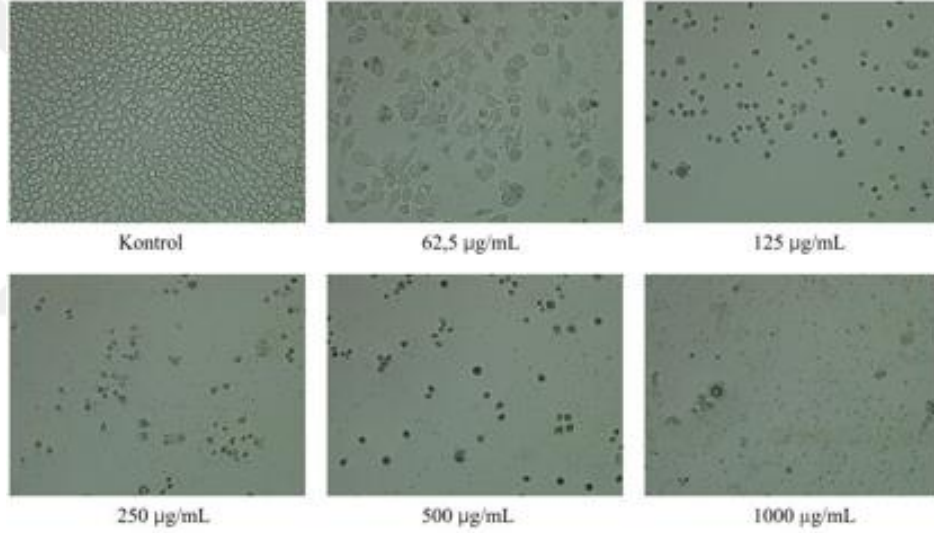
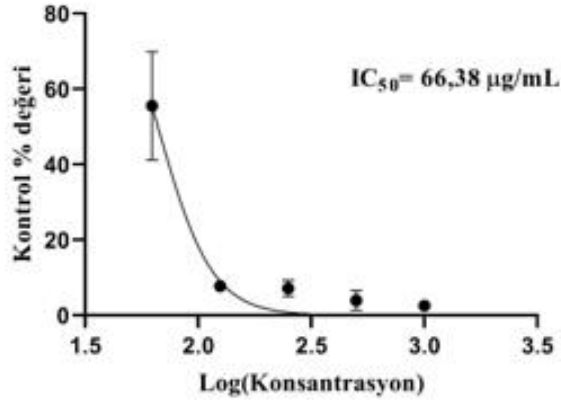
IC₅₀ değeri ise 48. saat için 173,8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4. 1 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

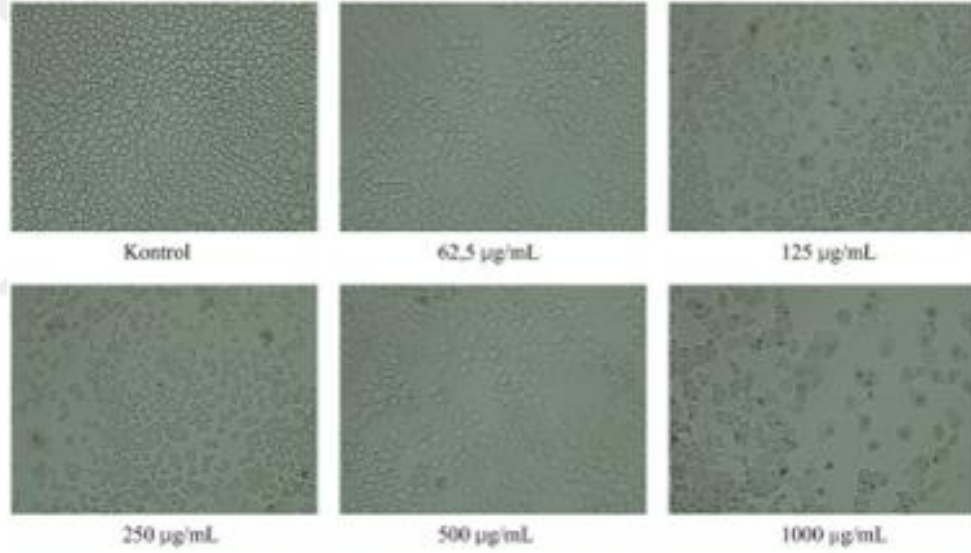
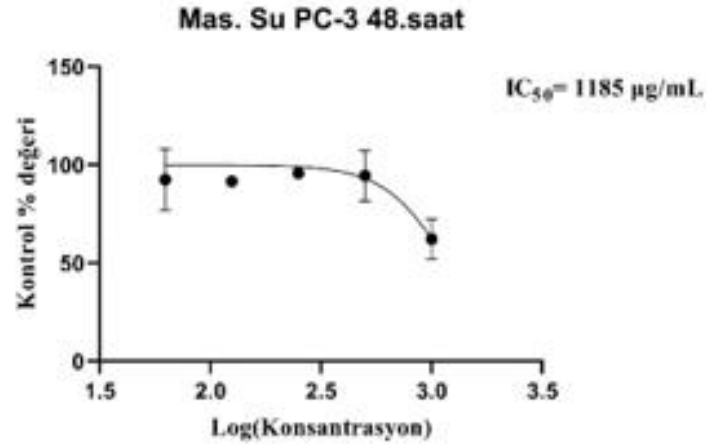
E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL’de %2,5’inin, 500 µg/mL’de %3,9’unun, 250 µg/mL’de %7,1’inin, 125 µg/mL’de %7,8’inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 48. saat için 66,38 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.2’de verilmiştir.

Mas. MeOH PC-3 48.saat



Şekil 4. 2 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

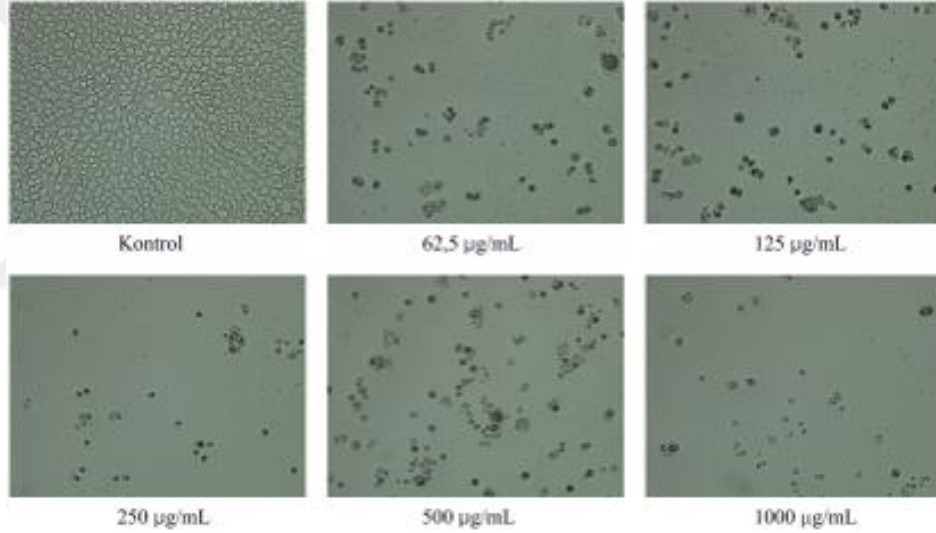
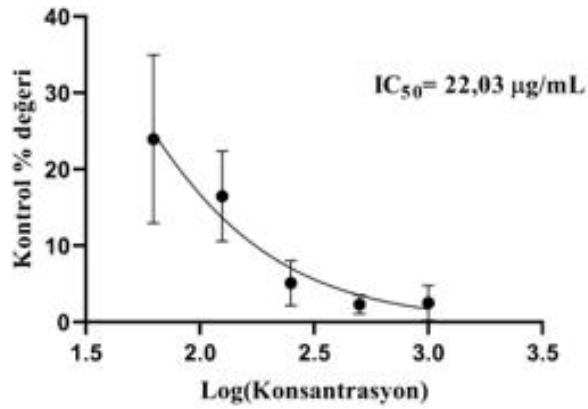
E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücre canlılığında en çok etki 1000 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %62,3'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 1176 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4. 3 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC_{50} değeri ve morfolojik görüntüleri

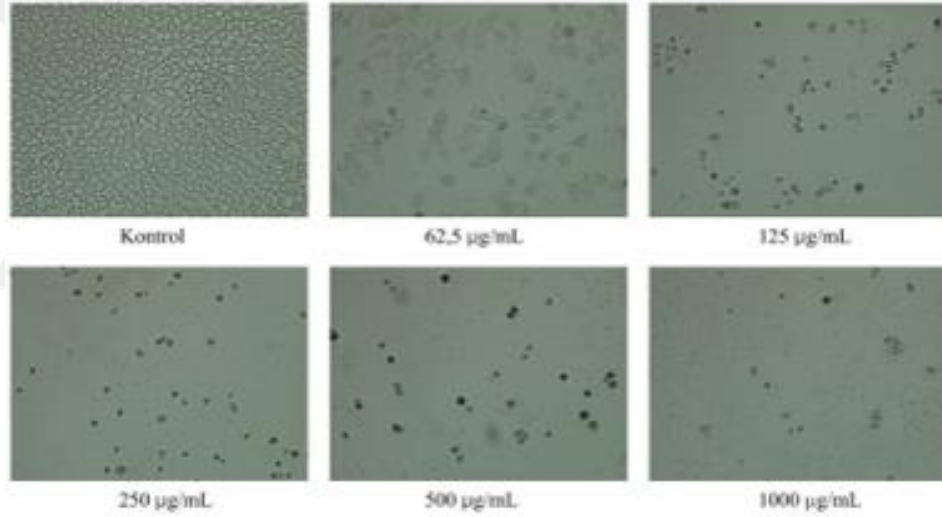
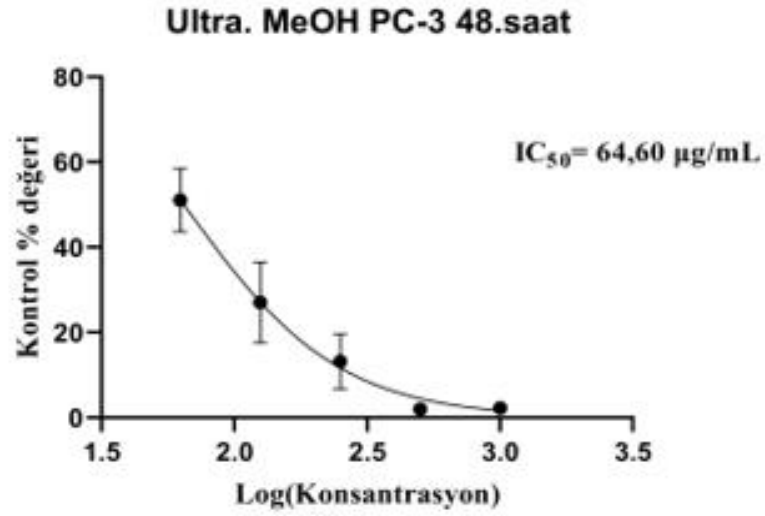
E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %2,5'inin, 500 µg/mL'de %2,3'ünün, 250 µg/mL'de %5,1'inin, 125 µg/mL'de %16,5'inin, 62,5 µg/mL'de %23,9'unun canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri 22,03 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC_{50} değeri Şekil 4.4'te verilmiştir.

Ultra. EA PC-3 48.saat



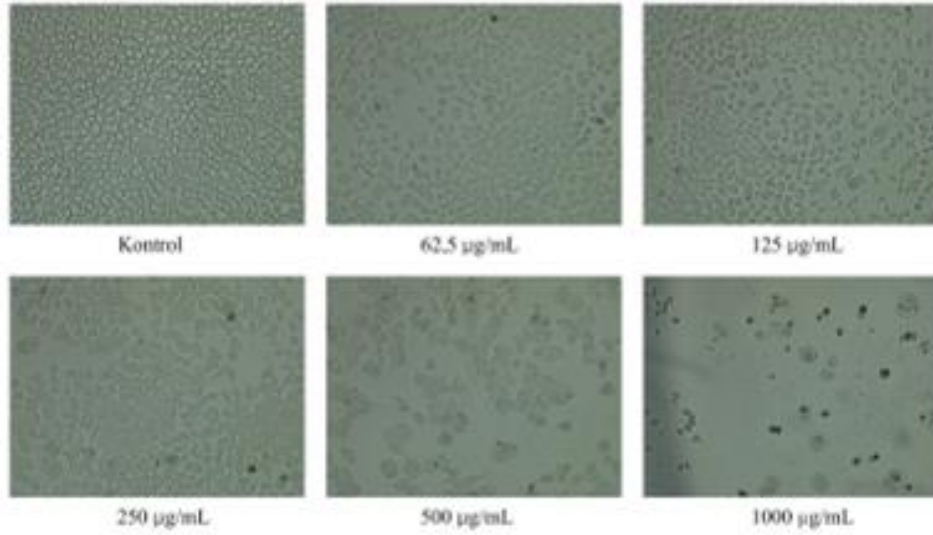
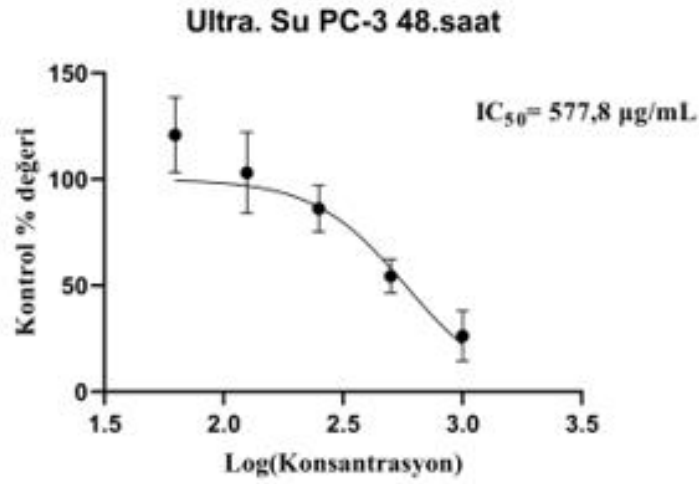
Şekil 4. 4 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %2,3'ünün, 500 µg/mL'de %2,0'ın, 250 µg/mL'de %13,2'inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 62,42 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4. 5 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC_{50} değeri ve morfolojik görüntüleri

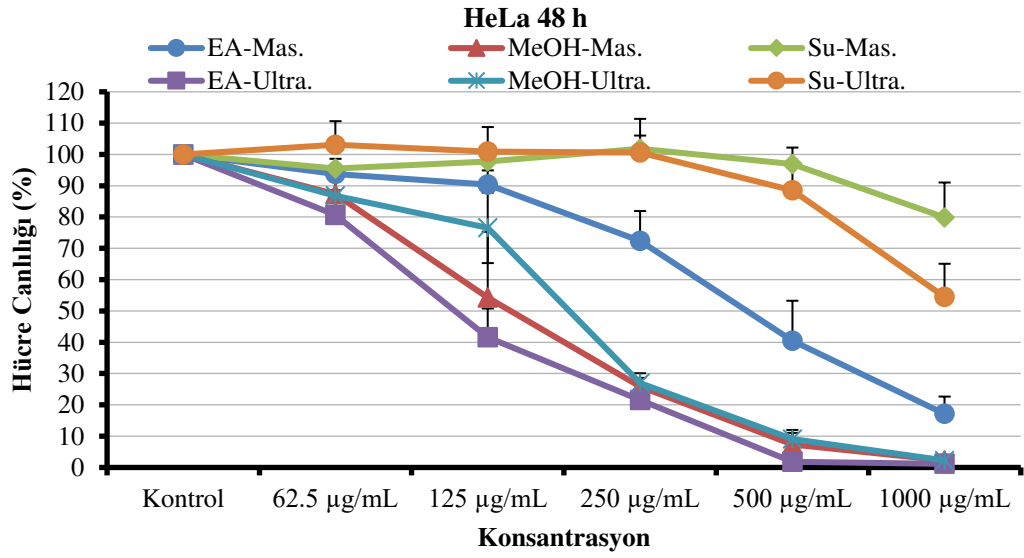
E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının PC-3 hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücre canlılığında en çok etki 1000 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %26,3'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri 580,4 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC_{50} değeri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 6 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat PC-3 hücre hattındaki IC_{50} değeri ve morfolojik görüntüleri

4.2.2 Bitki Ekstraktlarının HeLa Hücre Hattındaki Hücre Canlılığı Deney Bulguları

Bitki ekstraktlarının HeLa hücre hattı üzerindeki antikanser aktivitesi ve hücre canlılık aktivitesi değerleri Grafik 4.2 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.



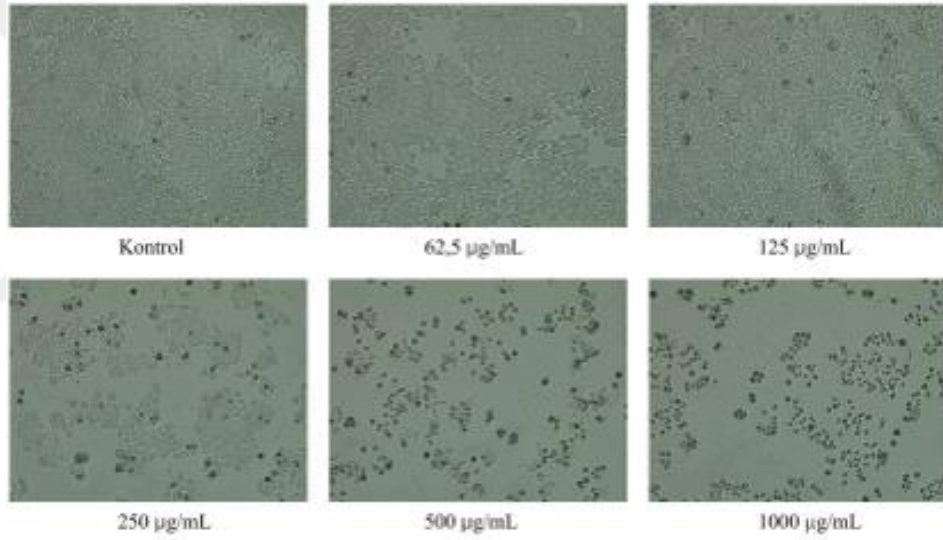
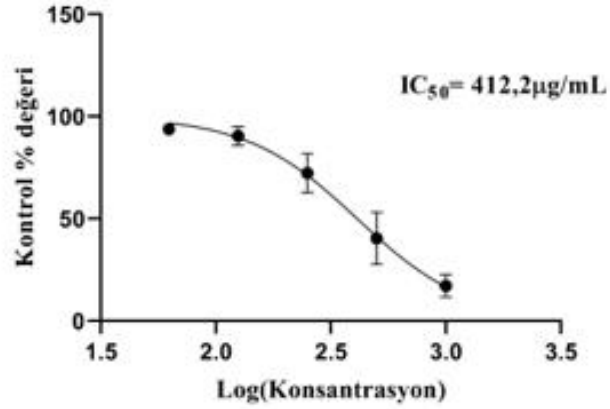
Grafik 4. 2 Toprak üstü bölümlerinden maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda 48 saat sonra HeLa hücre hattı üzerine antikanser aktivitesi

Tablo 4. 2 Ekstraktların HeLa hücre hattı üzerine hücre canlılık aktivitesi değerleri (*p<0,05).

Hücre Canlılığı (%)						
Ekstrakt	EA-Mas.	MeOH-Mas.	Su-Mas.	EA-Ultra.	MeOH-Ultra.	Su-Ultra.
Kontrol	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
62.5 µg/mL	93,7±2,9*	87,3±4,9*	95,5±3,1*	80,6±7,9*	86,7±4,7*	103,1±7,5
125 µg/mL	90,4±4,5*	54,3±21,0*	97,7±4,6	41,6±9,2*	76,5±11,2*	100,9±7,9
250 µg/mL	72,4±9,5*	25,9±2,7*	101,8±9,6	21,5±4,8*	27,0±3,1*	100,6±5,4
500 µg/mL	40,5±12,8*	7,3±4,7*	97,0±5,2	1,8±0,2*	9,1±2,0*	88,5±7,4*
1000 µg/mL	17,1±5,5*	2,3±0,5*	79,9±11,2*	1,2±0,1*	2,3±0,6*	54,5±10,6*

E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücre canlılığında en çok etki 1000 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %17,1'inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 412,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.7'de verilmiştir.

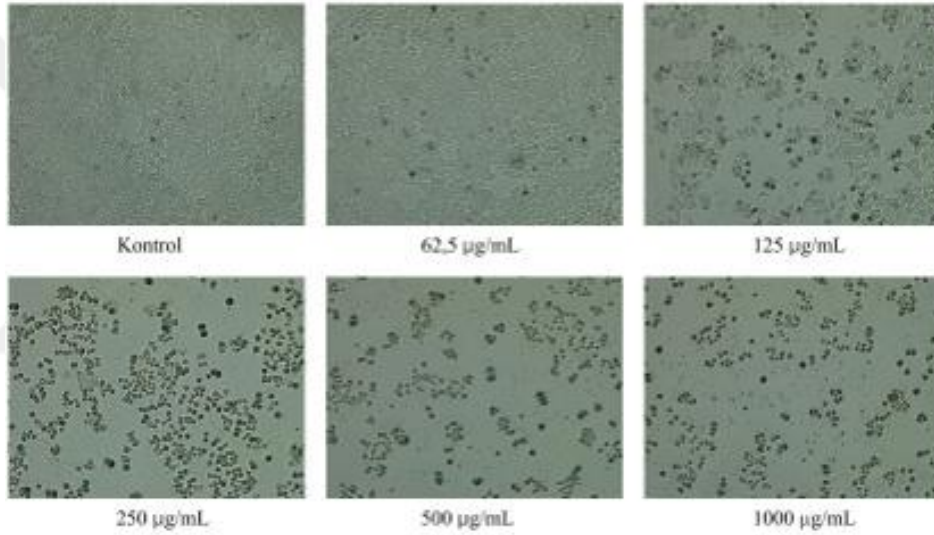
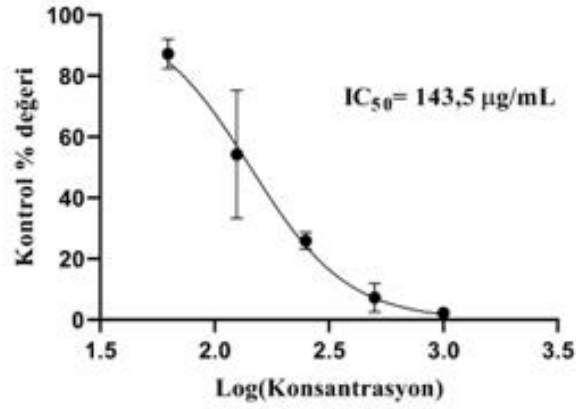
Mas. EA HeLa 48.saat



Şekil 4. 7 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %2,3'ünün, 500 µg/mL'de %7,3'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 143,5 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.8'de verilmiştir.

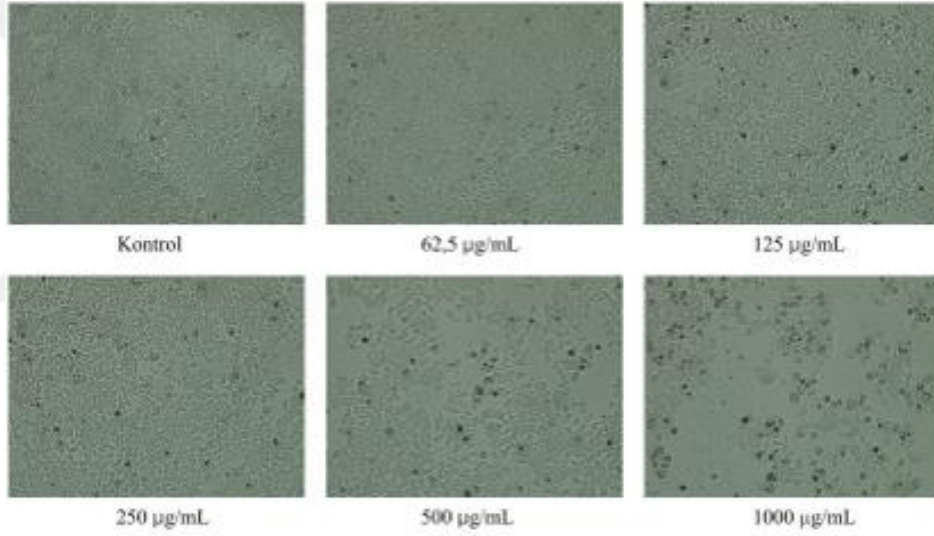
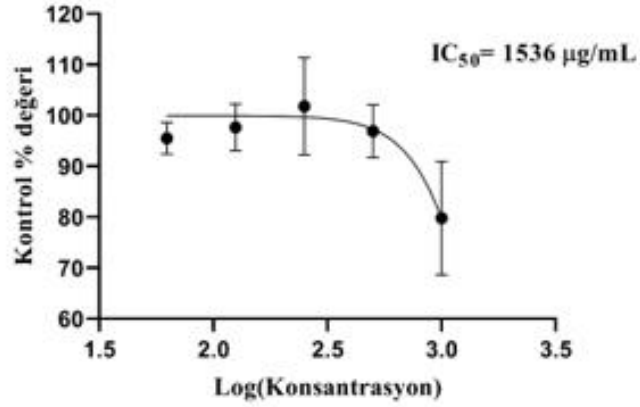
Mas. MeOH HeLa 48.saat



Şekil 4. 8 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

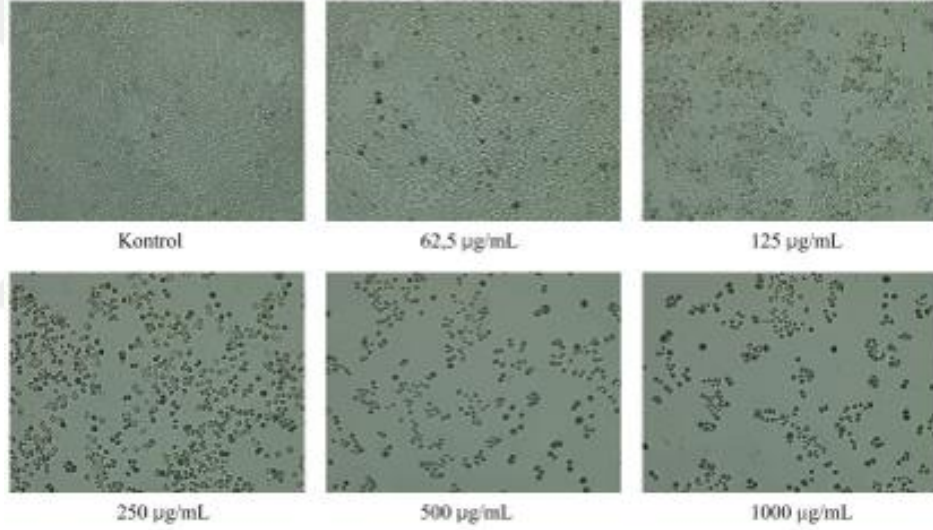
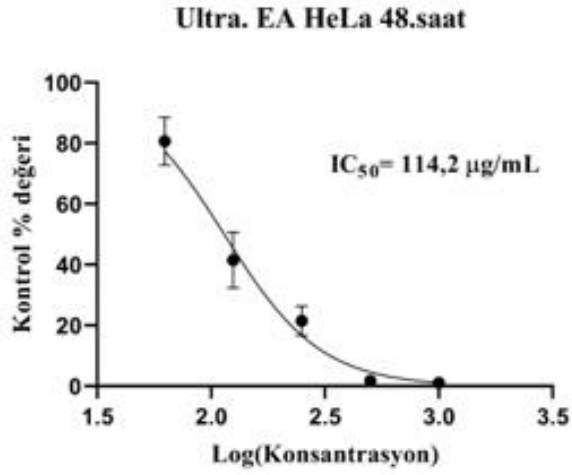
E. cannabinum bitkisinin maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücre canlılığında en çok etki 1000 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %79,9'unun canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 1536 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.9'da verilmiştir.

Mas. Su HeLa 48.saat



Şekil 4. 9 Maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

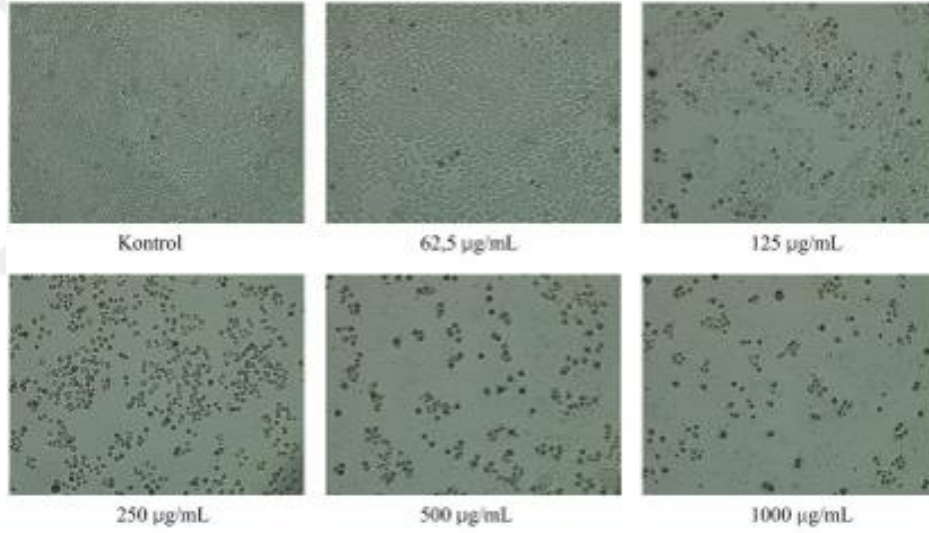
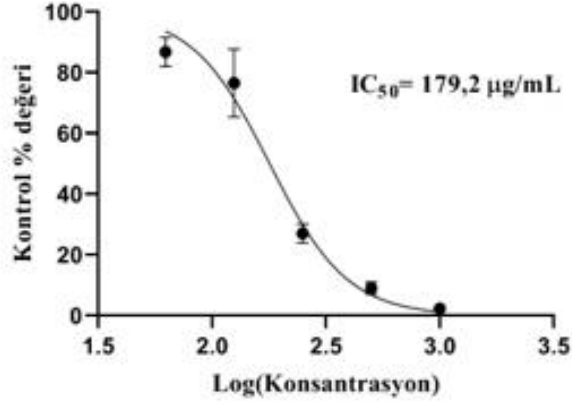
E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %1,2'nin, 500 µg/mL'de %1,8'in, 250 µg/mL'de %21,5'in canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 114,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4. 10 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan EA ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

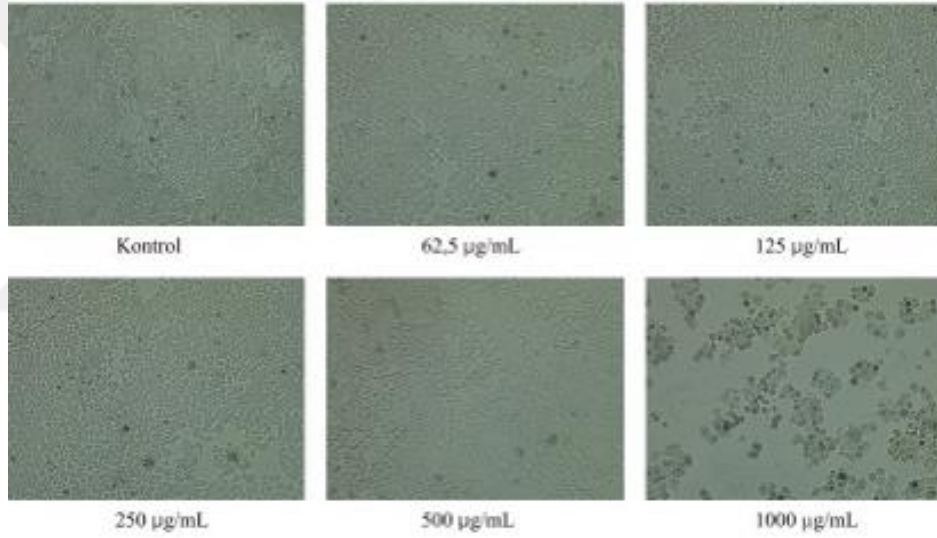
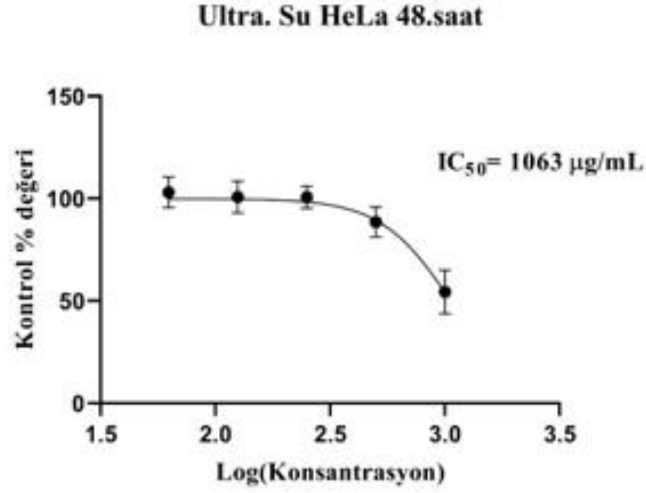
E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan metanol ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücrelerin 1000 µg/mL'de %2,3'ün, 500 µg/mL'de %9,1'in canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 179,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.11'de verilmiştir.

Ultra. MeOH HeLa 48.saat



Şekil 4. 11 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan MeOH ekstraktının 48. saat HeLa hücre hattındaki IC₅₀ değeri ve morfolojik görüntüleri

E. cannabinum bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının HeLa hücre hattı için 48. saatteki etkisine göre hücre canlılığında en çok etki 1000 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %54,5'inin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri 1063 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktın 48. saatteki hücre görselleri ve IC₅₀ değeri Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4. 12 Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktının HeLa hücre hattındaki IC_{50} değeri ve morfolojik görüntüleri

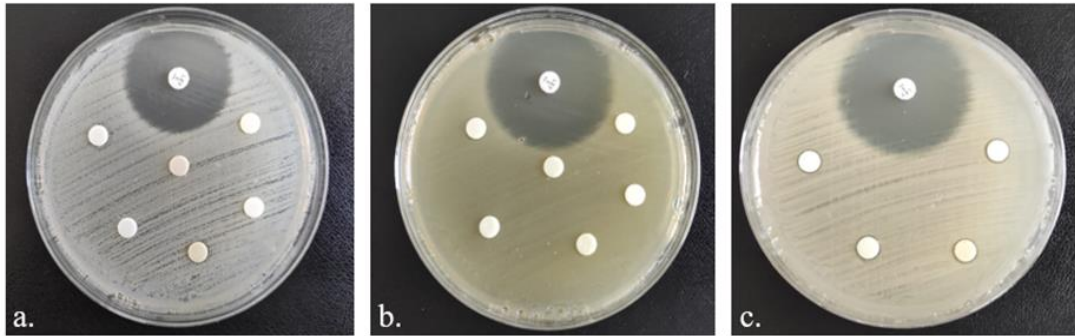
Ekstraktların PC-3 ve HeLa hücre hatlarına ait hesaplanmış olan IC_{50} değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Her iki hücre hattı için en etkili sonuçlar ultrasonikasyon etil asetat ekstraktında tespit edilmiştir. PC-3 hücre hattında en düşük IC_{50} değeri 22,03 µg/mL, HeLa hücre hattında en düşük IC_{50} değeri 114,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4. 3 PC-3 ve HeLa hücre hattı IC₅₀ değerleri

Ekstraktlar	PC-3 hücre hattı IC ₅₀ değerleri	HeLa hücre hattı IC ₅₀ değerleri
Mas. EA	173,8 µg/mL	412,2 µg/mL
Mas. MeOH	66,38 µg/mL	143,5 µg/mL
Mas. Su	1185 µg/mL	1536 µg/mL
Ultra. EA	22,03 µg/mL	114,2 µg/mL
Ultra. MeOH	64,60 µg/mL	179,2 µg/mL
Ultra. Su	577,8 µg/mL	1063 µg/mL

4.3 Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Bulguları

E. cannabinum'un toprak üstü kısımlarının maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan EA, MeOH ve su ekstraktlarının 6 gram negatif, 3 gram pozitif bakteri ve 1 maya olmak üzere toplam 10 suş üzerine antimikrobiyal aktivite etkinlikleri disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneyine yönelik temsili görseller Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Sonuç olarak test edilen konsantrasyonda (400 µg/disk) antimikrobiyal aktivite etkinliği saptanmamıştır.

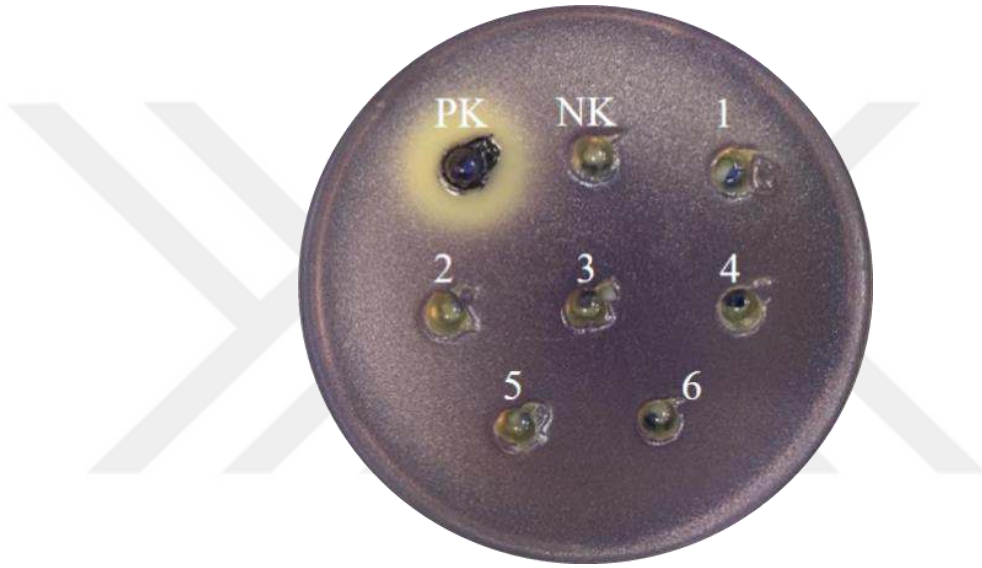


Şekil 4. 13 Antimikrobiyal aktivite testi mikroorganizmalar temsili görseli, a; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, b; *Escherichia coli* ATCC 25922, c; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

4.4 Anti-Quorum Sensing Aktivite Bulguları

4.4.1 Viyolasin İnhibisyon Deneyi

E. cannabinum bitkisinin toprak üstü ekstraktları *Chromobacterium violaceum* CV026 suşu viyolasin pigment inhibisyonu yumuşak agar yöntemiyle test edilmiştir. Sonuç olarak test edilen konsantrasyonlarda viyolasin pigment inhibisyonu tespit edilmemiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14 *C. violaceum* CV026 suşuna karşı *E. cannabinum* toprak üstü ekstraktlarının quorum sensing inhibisyon aktivitesi, 1; Mas. EA, 2; Mas. MeOH, 3; Mas. Su, 4; Ultra. EA, 5; Ultra. MeOH, 6; Ultra. Su, PK; *C. violaceum* ATCC 12472 O/N kültürü, NK; %50 DMSO

4.5 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyleri Bulguları

4.5.1 Biyofilm İnhibisyonu Deneyi Bulguları

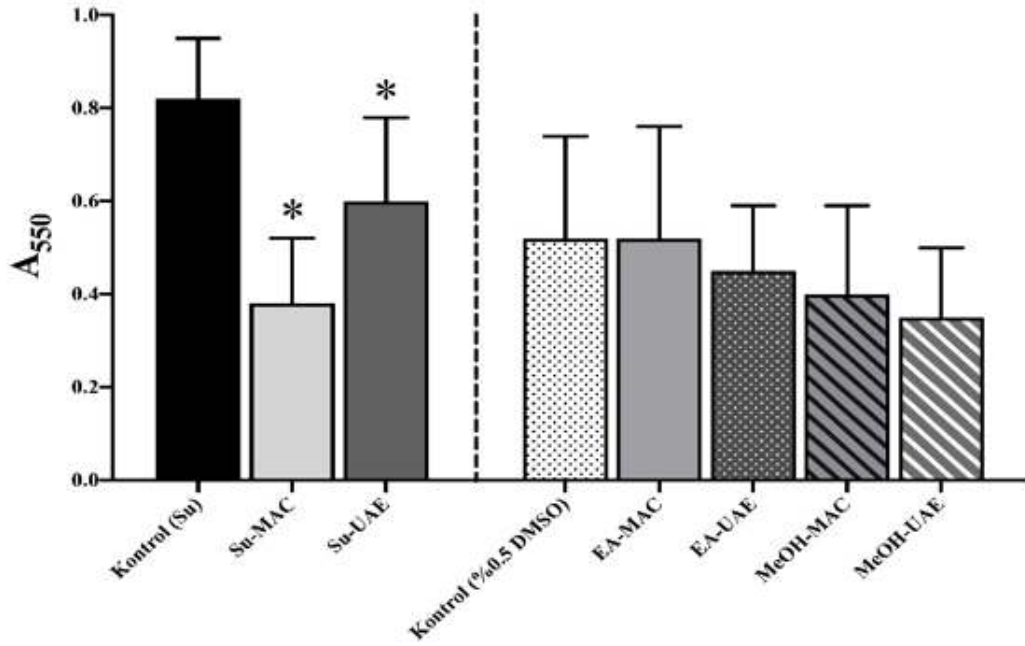
E. cannabinum bitkisinin toprak üstü ekstraktları, biyofilm oluşturan bakterilerden biri olan *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde test edilerek biyofilm oluşum inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır. Bitkinin maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle elde edilen su ekstraktlarında biyofilm oluşumunun inhibisyonu anlamlı bir şekilde

gerçekleşmiştir ($p<0,05$). Diğer ekstraktlarda anlamlı inhibisyon tespit edilmemiştir (Tablo 4.4) (Grafik 4.3).

Tablo 4. 4 Ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 suşunda biyofilm oluşum inhibisyonu üzerine etkisi.

Ekstrakt	Absorbans (550nm)	Biyofilm İnhibisyonu (%)
Kontrol (Su)	$0,82 \pm 0,13$	0,0
Su-Mas.	$0,38 \pm 0,14$	53,7
Su-Ultra.	$0,60 \pm 0,18$	26,8
DMSO (%0,5)	$0,52 \pm 0,22$	36,6
EA-Mas.	$0,52 \pm 0,24$	0,0
EA-Ultra.	$0,45 \pm 0,14$	13,5
MeOH-Mas.	$0,40 \pm 0,19$	23,1
MeOH-Ultra.	$0,35 \pm 0,15$	32,7

Su ekstraktları saf suda, diğer ekstraktlar ise DMSO'da çözüldüğü için su ekstraktlarının inhibitör etkinliği sadece su içeren kontrol kuyucukları ile; EA ve MeOH ekstraktlarının inhibitör etkinliği ise %0,5 DMSO içeren kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır.



Grafik 4. 3 Biyofilm inhibisyon deneyinde ölçülen absorbans değerleri. Su ekstraktları biyofilm oluşumunu kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (* $p < 0,05$). Ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 suşunda kontrole göre biyofilm oluşumu (* $p < 0,05$)

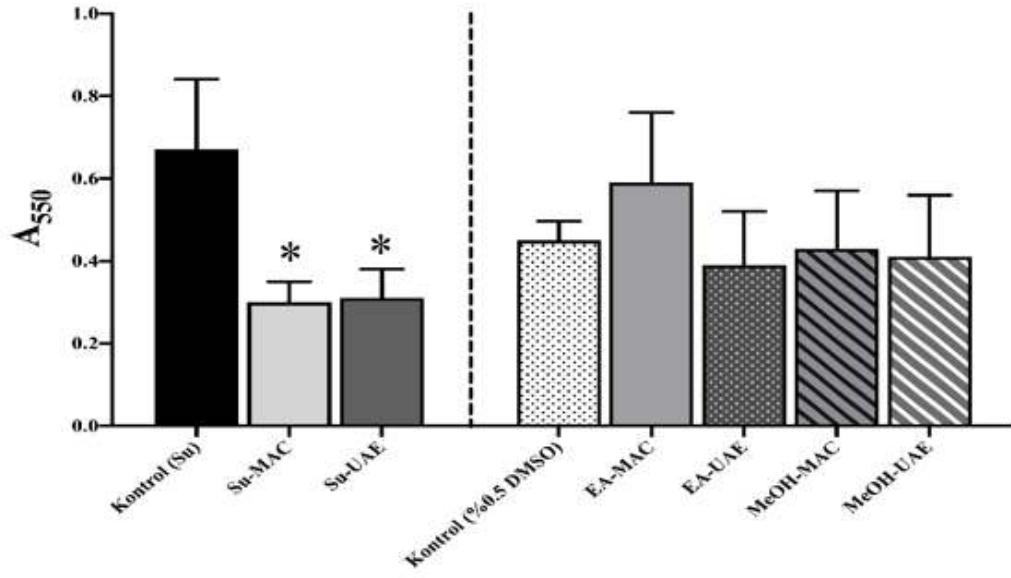
4.5.2 Biyofilm Eradikasyon Deneyi Bulguları

E. cannabinum bitkisinin toprak üstü ekstraktları biyofilm oluşturan bakterilerden biri olan *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde test edilerek biyofilm eradikasyon özelliği araştırılmıştır. Bitkinin maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle elde edilen su ekstraktlarında biyofilm eradikasyonu anlamlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Tablo 4.5) (Grafik 4.4).

Tablo 4. 5 Ekstraktların *S. aureus* ATCC 25923 suşunda biyofilm eradikasyonu üzerine etkisi

Ekstrakt	Absorbans (550nm)	Biyofilm İnhibisyonu (%)
Kontrol (Su)	0,67 ± 0,17	0,0
Su-Mas.	0,30 ± 0,05	55,2
Su-Ultra.	0,31 ± 0,07	53,7
DMSO (%0,5)	0,45 ± 0,06	32,8
EA-Mas.	0,59 ± 0,28	0,0
EA-Ultra.	0,39 ± 0,13	15,6
MeOH-Mas.	0,43 ± 0,14	4,4
MeOH-Ultra.	0,41 ± 0,15	8,9

Su ekstraktları saf suda, diğer ekstraktlar ise DMSO'da çözüldüğü için su ekstraktlarının inhibitör etkinliği sadece su içeren kontrol kuyucukları ile; EA ve MeOH ekstraktlarının inhibitör etkinliği ise %0,5 DMSO içeren kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır.



Grafik 4. 4 Biyofilm eradikasyon deneyinde ölçülen absorbans değerleri. Su ekstraktları biyofilm eradikasyonunu kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (*p<0,05).

5. TARTIŞMA

Maserasyon, iri toz haline getirilmiş ilaç malzemesinin bir kabın içerisine yerleştirildiği bir ekstraksiyon prosedürüdür. Bu yöntem yüksek miktarda solvent, zaman ve enerji tüketimi gerektirir. Maserasyon gibi klasik yöntemlere alternatif olarak çeşitli ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu alternatif yöntemler az solvent kullanımı, ekstraksiyon işlem süresinin kısaltılması ve daha yüksek verimi hedeflemektedir. Ultrasonikasyonda hücre duvarı zedelendiğinden ekstraksiyon işlemi diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Ultrasonikasyon yönteminin ucuz, kolay, verimli ve etkili olması bu yöntemi geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin iyi bir alternatifi haline getirmektedir. Demirkol ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada *Viburnum opulus* L. meyvesinden fenolik bileşiklerin elde edilmesinde ultrasonikasyon yöntemi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ultrasonikasyon ile elde edilen fenolik madde miktarlarının maserasyon yöntemine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun sonucunda, ultrasonikasyon yöntemi işlem süresinde büyük ölçüde tasarruf sağlamakta olup bununla birlikte katı: solvent oranının ekstraksiyon verimini arttırdığı görülmektedir. Ultrasonikasyon yöntemi fenolik bileşiklerin hızlı ve verimli bir şekilde eldesi için etkili bir yöntemdir (Demirkol vd., 2018; Abubakar ve Haque, 2020). Mevcut çalışmada en iyi verim %3,06 oranında maserasyon yöntemiyle hazırlanan su ekstraktında tespit edilmiştir. En düşük verim su ekstraktında görülmesine rağmen antikanser çalışmasında en etkili sonuç ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanan etil asetat ekstraktında görülmüştür. Maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstraktında yüzde cinsinden elde edilen ekstraktın ekstre edilmek için kullanılan bitki miktarının oranının sonucu olarak verilen verimin antikanser çalışmalarında en etkili sonuç olan ultrasonikasyon etil asetat ekstraktında olması, ekstraktın içerisinde aktif bileşenlerin bu durumdan bağımsız olduğunu göstermektedir. Yani bitkinin miktar bakımından verimli olması içerisindeki aktif bileşenlerden bağımsız bir durumdur.

İnsan vücudu milyonlarca canlı hücreden oluşur. Normal hücreler gelişir ve yeni hücreler yapmak için sürekli olarak bölünür ve hücreler düzenli bir şekilde ölür. Kişi büyüdükçe normal hücreler daha hızlı bölünür. Bir insanın yaşamının ilk yıllarında

normal hücreler, kişinin büyümesine izin vermek için daha hızlı bölünür. Bir kişi yetişkin olduğunda, çoğu hücre yalnızca ölmekte olan hücrelerin yerini almak için bölünür. Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle başlar (Kashyap vd., 2018). Kanser hücrelerinde artan büyüme ve çoğalma kapasiteleri, farklılaşma, ölümsüzleşme, metastaz ve genel yıkıcı etkileri nedeniyle vücut için bir tehdit oluşturmaktadır (Gielecińska vd., 2023). Bu zarar gören hücreler programlı hücre ölümü olan apoptoz, hasarlı hücrelerin gelişiminde ve ortadan kaldırılmasında önemli rol oynayan biyolojik süreçleri düzenler (Yang vd., 2016). Geçmişten günümüze birçok toplum hastalıklardan korunma ve hastalıkların tedavisi için şifalı bitkileri kullanmıştır (Kurhan ve Ekici, 2021). Bu bitkilerden elde edilen doğal ürünler, antikanser ajanlar için ilaç hammaddesi olabilmektedir (Chen vd., 2018).

Çalışmada *Eupatorium cannabinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan metanol, etil asetat ve su ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri hücre hattı ve HeLa rahim ağzı kanseri hücre hattı üzerine hücre canlılığı MTT testi ile araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL) 48. saatteki etkileri incelenmiştir. PC-3 prostat kanseri hücre hattı üzerine maserasyon EA ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %3,6 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon EA ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 250 µg/mL konsantrasyonda %5,1, 500 µg/mL konsantrasyonda %2,3, 1000 µg/mL konsantrasyonda %2,5 olarak hesaplanmıştır. Maserasyon MeOH ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 500 µg/mL konsantrasyonda %3,9 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda %2,5 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon MeOH ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 500 µg/mL konsantrasyonda %2,0 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda %2,3 olarak hesaplanmıştır. Maserasyon su ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %62,3 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon su ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %26,3 olarak hesaplanmıştır.

Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktların etkisi HeLa rahim ağzı kanseri hücre hattı üzerine maserasyon EA ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %17,1 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon EA ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 500 µg/mL konsantrasyonda %1,8, 1000 µg/mL konsantrasyonda %1,2 olarak hesaplanmıştır. Maserasyon MeOH ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 1000 µg/mL konsantrasyonda %2,3 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon MeOH ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonlarında gözlenmiş ve hücre canlılığı 1000 µg/mL konsantrasyonda %2,3 olarak hesaplanmıştır. Maserasyon su ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %79,9 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon su ekstraktının etkisi incelendiğinde en iyi etki 1000 µg/mL konsantrasyonunda gözlenmiş ve hücre canlılığı %54,5 olarak hesaplanmıştır.

IC₅₀ değeri GraphPad Prism 8.0 versiyonu yardımıyla hesaplanmıştır. Ekstraktların elde edildiği yöntemler arasında çalışılan hücre hatlarına karşı etkisi kıyaslandığında; PC-3 hücre hattında en düşük IC₅₀ değeri ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktında elde edilmiştir (IC₅₀:22,03 µg/mL). HeLa hücre hattında da en düşük IC₅₀ değeri ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktında elde edilmiştir (IC₅₀ değeri 114,2 µg/mL). Test edilen saat ve hücre hatlarında IC₅₀ değerinin düşük olması ekstraktın etkinliğini göstermektedir.

Paolini ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir çalışmada *E. cannabinum* subsp. *corsicum*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan uçucu yağların içerik tayini yapılmıştır. Toplam miktarın %93,6'sını temsil eden 147 bileşen tanımlanmış seskiterpen ve monoterpen hidrokarbonların hakim olduğu bildirilmiştir. Uçucu yağ içeriğindeki ana bileşenler germacrene, α- phellandrene ve para-cymene'dir (Paolini vd., 2005). Mevcut çalışmada da *E. cannabinum*'un toprak üstü kısımlarından farklı yöntemlerle hazırlanan metanol, su, etil asetat ekstraktları kullanılmıştır. Bu bağlamda antikanser aktivite gösteren ekstraktların içeriğinde belirtilen bileşiklerin bulunma ihtimali olabilmektedir. *E. lindleyanum* DC bitkisindeki seskiterpen laktonlardan olan

Eupalinolide O'nun insan MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde anti-TNBC (üçlü negatif meme kanseri) etki göstererek hücre döngüsünü durdurup apoptozu indükleyebildiği bildirilmiştir (Yang vd., 2019). Abuali ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları bir çalışmada *Eupatorium cannabinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlarının etkisi, MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla *E. cannabinum*'un n-hekzan, kloroform ve metanol ekstraktları ve kloroform ekstraktının alt fraksiyonlarının ve izole edilen bileşiğin (eucannabinolide) sitotoksik etkisi test edilmiştir. Sonuç olarak eucannabinolide ve kloroform ekstraktında sitotoksik etki tespit edilmiştir. Seskiterpen laktonlardan olan eucannabinolide'nin bitkinin sitotoksik özelliklerinden sorumlu bileşenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple mevcut çalışmada yüksek sitotoksik etkinlik tespit edilen ekstraktlarda bu bileşiğin etkisi olduğu düşünülebilir. *E. japonicum* Thunb. yapraklarından hazırlanan MeOH ekstraktı içeriğinde bulunan biyoaktif seskiterpen laktonu olan eupatoriopicrin biyolojik analizler için seçilmiş ve HepG2 (karaciğer kanseri hücre hattı), MCF-7 ve NTERA-2 (testis kanseri hücre hattı) hücrelerini *in vitro* olarak güçlü bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Phan vd., 2021). *E. fortunei*'nin toprak üstü kısmından izole edilen eupatodibenzofuran A bileşiğinin A549 (insan akciğer adenokarsinomu hücre hattı) ve MCF-7 hücrelerinin apoptozunu belirgin şekilde indüklediği belirtilmiştir. Eupatodibenzofuran A insan akciğer kanseri ve meme kanserinin tedavisi için antikanser ajan olmaya aday olarak gösterilebilir (Chang vd., 2021). *E. adenophorum* Spreng. (EA)'den elde edilen uçucu yağın esas olarak seskiterpenlerden oluştuğu ortaya çıkarılmış ve bitkinin uçucu yağının karaciğer kanserine karşı aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuç olarak uçucu yağ karaciğer kanseri hücre proliferasyonunu normal karaciğer hücreleri üzerinde düşük miktarda inhibe etmiştir (Chen vd., 2018). *E. littorale* Cabrera'nın, ekstrakte edilen eupafolin ve hispidulin flavonlarının biyolojik membranların özelliklerini değiştirme ve sitotoksik etkileri artırma yeteneğine sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Eupafolin ve hispidulin, HeLa hücrelerinin hücresel canlılığında 24 saat içinde %40'lık bir azalmayı teşvik etmiştir. Sonuçlar, eupafolin ve hispidulinin, sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, yapısal farklılıklara rağmen her iki flavonun da HeLa hücreleri üzerinde benzer sitotoksik etkilere sahip olduğunu işaret etmektedir (Herrerias vd.,2010).

Grigore ve arkadaşlarının (2018) yapmış olduğu çalışmada *Eupatorium cannabinum* bitkisinin maserasyon kloroform ve su ekstraktlarının BT-20 (insan meme kanseri hücre hattı), HepG2 (insan karaciğer kanseri hücre hattı), Caco-2 (insan kolon kanseri hücre hattı) ve Jurkat (lösemi hücre hattı) kanser hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Bitkinin içerik tayini yapılmış olup sonucunda kloroform ekstraktında eupatorin, eupatilin ve quercetin'in ve su ekstraktında kafeik asit ve rutin varlığını ortaya çıkarmıştır. Jurkat hücreleri her iki ekstrata da duyarlıyken diğer hücre hatları sadece kloroform ekstraktına karşı duyarlılık göstermiştir. İçeriğindeki metoksillenmiş flavonlar bakımından zengin olan kloroform ekstraktı test edilen hücre hatlarının çoğu üzerinde 24 saatlik maruziyetin ardından orta derecede sitotoksik etkiye sahipken yüksek miktarda kafeik asit ve rutin içeren su ekstraktı 48 saatlik maruziyetin ardından belirli bir sitotoksik etki göstermiştir. Her ne kadar kafeik asit ve rutin gibi fenolik bileşiklerin antiproliferatif etkisi iyi belgelenmiş olsa da, bu çalışmada adı geçen iki bileşiğin yüksek miktarlarını içeren EA ekstraktı, test edilen hücreler üzerinde belirli bir inhibitör etki göstermemiştir. *E. cannabinum* subsp. *cannabinum* 'un toprak üstü kısımlarından altı kafeik asit türevi, beş flavonol glikozit ve iki flavon aglikon içeren on üç bileşik izole edilmiş ve tanımlanmıştır. *E. cannabinum*'un flavonoid analizi, baskın bileşik olarak rutin ile esas olarak kuersetin ve kaempferol glikozitleri içerdiğini göstermiştir (Piwowarski vd.,2018). *E. cannabinum* bitkisi hidroalkol ekstraktının içerik tayini yapılmıştır. Ekstraktın kimyasal bileşenlerinin içeriğinde %56,86 mg kafeik asit, %1,26 mg eupatorin, %18,06 mg eupatilin, %97,03mg quersetin ve %762,63 mg rutin bulunmuştur. Ekstraktlar Jurkat (T hücreli lenfoma hücre hattı) hücreleri üzerinde 24 ve 48. saatlerde değişen konsantrasyonlarda test edilmiştir. Ekstraktın özellikle 48. saatte zaman ve doza bağlı olarak hücreleri önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ionita vd.,2013).

Eupatorium macrocephalum, *Eupatorium pedunculatum* ve *Eupatorium laevigatum* maserasyon yöntemi ile hazırlanan su ve etanol ekstraktları HT29 (insan kolon adenokarsinom hücre hattı) ve NCI-H460 (insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı) ve U373 (insan glioblastoma hücre hattı) hücrelerine karşı test edilmiştir. Test edilen *Eupatorium* türlerinin ekstraktlarının üç hücre hattına karşı farklı duyarlılık ürettiği belirtilmiş ve sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (Monks vd., 2002). Wang ve

arkadaşlarının (2022) yaptığı bir çalışmada *E. lindleyanum* DC.'dan izole edilen seskiterpen lakton olan F1012-2'ye karşı MDA-MB-468 (meme kanseri hücre hattı) hücrelerinin antikanser aktivitesi araştırılmıştır. TNBC (üçlü neatif meme kanseri) için TNBC olmayan hücre hatlarına göre önemli ölçüde düşük IC₅₀ tespit edilmiştir. Bu çalışmayla seskiterpen laktonların potansiyel antitümör aktivitesine sahip olduğu doğrulanmıştır. *Eupatorium odoratum* (EO) ekstraktlarının MCF-7 ve Vero hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini ve etki mekanizmasını değerlendirilmiştir. Vero hücreleri üzerinde zayıf etki göstermiştir. Bu bitkinin etil asetat ve aseton ekstraktları ise MCF-7 hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkiler göstermiştir (Harun vd., 2021).

Mevcut çalışmadaki bulgulara göre antikanser aktivite gösteren ekstraktların test edilen konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalış gerçekleştirdiği görülmüştür. Çalışılan 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda en çok etki gösterdiği saptanmıştır. Hesaplanan en düşük IC₅₀ değeri ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktında PC-3 hücre hattında elde edilmiş olup, IC₅₀ değeri 22,03 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde özellikle ultrasonikasyon tekniği ile elde edilen etil aseat ekstraktı hücre hatları üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak iyi bir etki göstermiştir. Bu sonuç ekstraktın iyi bir antikanser ajan olma potansiyeli olduğunu gösterir. *Eupatorium* cinsine ait türlerin içeriğinde bulunan bileşiklerin çeşitli hücre hatlarına karşı etki gösterdiği antikanser çalışmaları literatürde bulunmaktadır. Mevcut çalışmada *E. cannabinum* türü toprak üstü bölümlerinin maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri ve HeLa rahim ağzı kanseri hücre hatlarına karşı antikanser aktivite sonuçları göz önüne alındığında çalışılan ekstraktların etkilerinin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada da çalışılan hücre hatlarına karşı antikanser aktivitenin görülmesinin, içeriğindeki aktif bileşiklerin olması ve bu bileşiklerin antagonistik ya da sinerjistik etki göstermesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız *Eupatorium cannabinum* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi altı Gram-negatif (*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ve *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) ve üç Gram-pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bakteri suşu ile bir maya (*Candida albicans* ATCC 10231) suşuna karşı araştırılmıştır. Fakat çalışılan konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Literatürde *Eupatorium* cinsine ait bitki türleri için antimikrobiyal aktivite çalışmaları mevcuttur. *E. cannabinum* bitkisinin yapraklarından hazırlanan kloroform, su ve hidro-alkol ekstraktlarının araştırıldığı bir çalışma mevcuttur. Çalışmada üç Gram-pozitif bakteri (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*), bir Gram-negatif bakteri (*Escherichia coli*) ve iki mantar (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger*) test edilmiştir. Kloroform ve hidro-alkol ekstraktlarında inhibitör aktivite yalnızca *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarında tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Aspergillus niger* için net bir inhibisyon tespit edilmemiştir. Gram-pozitif bakteriler tarafında en çok inhibe edilen *Bacillus cereus* olmuştur. Tüm ekstraktlar düşük ya da orta derecede inhibitör aktivite göstermiş ve en verimli olanı hidroalkol ekstraktı olmuştur (Purcaru vd., 2015). *E. fortunei* Turcz. bitkisinin toprak üstü kısımlarından ve *E. purpureum* L. bitkisinin kök kısımlarından elde edilen etanol ekstraktları ile *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans* bakterilerine karşı yapılan çalışmada antibakteriyel etki gözlenmemiştir (Wat vd., 1980). Mevcut çalışmada da bu çalışmayla paralel sonuçlar gözlemlenmiş ve bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktlarda antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada *Eupatorium odoratum*'un (L.) hidro-distilasyon yöntemiyle elde edilen yaprak esansiyel yağı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. İki Gram-pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* MTCC 1144, *Streptococcus pyogenes* MTCC 442) ve üç Gram-negatif bakteri (*Klebsiella pneumoniae* MTCC 4030, *Escherichia coli* MTCC 40 ve *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2474) kullanılmıştır. Esansiyel yağın antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçta *E. odoratum* yapraklarından elde edilen esansiyel yağın, Gram-pozitif patojen bakterilerin yanı sıra çeşitli Gram-negatif patojenik bakterilere karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Choudhary vd., 2023). *Eupatorium serotinum* esansiyel yağı, *Cryptococcus neoformans*'a karşı kayda değer antifungal aktivite

göstermiştir. Ancak bu esansiyel yağın verimi farmakolojik olarak faydalı kabul edilemeyecek kadar düşüktür (Lawson vd., 2020). *E. adenophorum* bitkisinin yapraklarının esansiyel yağının *Arthrobacter protophormiae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmış olup *M. luteus* ve *R. rhodochrous*'a karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Fakat *A. protophormiae*, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı etki göstermemiştir (Kurade vd., 2010).

Eupatorium ayapana bitki yapraklarının petrol eteri ve metanolik ekstraktları antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilmiş olup petrol eteri ekstraktı metanolik ekstraktan daha fazla antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir. Yaprak ekstraktında kumarinler, steroidler, karotenoidler, esansiyel yağlar ve vitaminlerin mevcut olduğu bildirilmiştir. Petrol eteri ekstraktı, test edilen konsantrasyonda *Shigella dysenteriae* hariç tüm bakteri türlerine karşı geniş spektrumlu aktivite göstermiştir. Petrol eteri ekstraktı da antifungal aktivite sergilemiştir. Metanol ekstraktı, test edilen konsantrasyonda hem bakteri hem de mantar türlerine karşı petrol eteri ekstraktından daha az aktivite göstermiştir (Gupta vd., 2002). Mevcut çalışmada çalışılan türün antimikrobiyal etkisinin olmamasının sebebi, bitkinin farklı bölümlerinden çalışılmasından ve bitki içerisinde belirtilen bileşenleri içermemesinden kaynaklanıyor olabilir.

Eupatorium serotinum, *Eurybia macrophylla*, *Eutrochium purpureum*, *Polymnia canadensis*, *Rudbeckia laciniata*, *Silphium integrifolium*, *Smallanthus uvedilla*, *Solidago altissima* ve *Xanthium strumarium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağların *Aspergillus niger*, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı antifungal aktivitesi test edilmiştir. Yüksek siklokolorenon konsantrasyonunun *E. serotinum*'daki antifungal aktiviteden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Germacrene D'nin, *Eupatorium serotinum*, *Eurybia macrophylla*, *Polymnia canadensis* ve *Rudbeckia laciniata* esansiyel yağlarının antifungal aktivitesine katkıda bulunabileceği gözlemlenmiştir. *E. purpureum*'un antifungal aktivitesi, ana bileşenlerinden heksanal, (2E) -heksenal, metil salisilat ve öjenol ile ilişkilendirilmiştir. Metil salisilatın zayıf düzeyde antifungal olduğu ancak öjenolün bir miktar aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, *Eupatorium glutinosum*'un

etanol ve metanol ekstraktlarının *E. coli* DH5-a'ya karşı etkili olduğu ancak diğer suşlara karşı aktivite göstermediği bulunmuştur (Zamora-Mendoza vd., 2023).

E. triplinerve bitkisinin tüm kısımlarından maserasyon yöntemi ile hidroalkolik ekstraktı hazırlanmıştır. Yapraktan heksan, etil asetat ve metanol ekstraktları hazırlanmıştır. İki Gram-pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) ve beş Gram-negatif bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 ve *Proteus mirabilis* ATCC 15290) test edilmiştir. *E. triplinerve* yaprak ekstraktının fitokimyasal analizi steroidler, kumarinler, alkaloidler ve saponinler içerdiğini göstermiştir. Metanol ekstraktı, diğer ekstraktlara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemiş ve polar olmayan fraksiyonlar, özellikle Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmuştur. Hidroalkolik yaprak ekstraktı, Gram-negatif bakterilere karşı daha iyi antimikrobiyal aktivite göstermiş ve polar olmayan fraksiyonlar seçilerek ayrıştırılmıştır. Bu fraksiyonlar içerisinde metanol ekstraktı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi sergilemiştir ve içerisinde kumarinler gibi bileşikler bulunmuştur. Bu çalışma, *E. triplinerve* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmiş ve özellikle metanol ekstraktının etkili olduğunu ortaya koymuştur (Matos Lopes vd.,2015).

Eupatorium odoratum, *Vernonia cinerea*, *Mikania micrantha*, *Tridax procumbens*, *Pilea microphylla* ve *Cuscuta reflexa* bitkilerinin geniş yayılımından sorumlu alkaloidler ve terpenoidler gibi farklı biyoaktif bileşikler belirlenmiştir. Asetonik bitki ekstraktları, *E. coli*'ye karşı en yüksek inhibisyon bölgesini *E. odoratum*'un gösterdiğini, *C. reflexa* ekstraktının ise *E. coli*'ye karşı hiç inhibisyon göstermediğini ortaya koymuştur. *P. vulgaris*'e karşı asetonik ekstraktlar maksimum inhibisyonu *M. micrantha* ile göstermiş, bunu *T. procumbens*, *P. microphylla*, *V. cinerea* ve *C. reflexa* izlemiştir. Farklı bitki ekstraktlarının fitokimyasal analizi, alkaloidler, fitosteroller, diterpenler, flavonoidler, saponinler, tanenler ve fenoller gibi neredeyse tüm ana fitokonstituentleri ortaya çıkarmıştır. *E. odoratum* üzerinde yapılan çalışma alkaloidler, flavonoidler, fitosteroller ve diterpenlerin varlığını ortaya koymuştur. *E. odoratum*'un aseton özütleri *E. coli*'ye karşı aktif olmuştur. Alkol içindeki hiçbir bitki özütü *E. coli*'ye karşı etkili olmamıştır. *E. odoratum* bitki ekstraktları sadece *P.*

vulgaris ve *S. aureus* mikroorganizmalarında inhibisyon göstermiştir (James vd., 2018). *E. triplinerve*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan uçucu yağın analizi sonucunda, yağın orta düzeyde antibakteriyel ve güçlü antifungal aktivite sergilediği belirlenmiştir. Uçucu yağın altı fitopatojenik mantara karşı antifungal aktivitesi gözlemlenmiştir. *E. odoratum* ve *E. triplinerve* bitkileri, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri nedeniyle değerli terapötik potansiyele sahip olabilirler (Sugumar vd., 2015).

Eupatorium adenophorum'un yapraklarından elde edilen yağların analizi yapılmıştır. Metanol ve etil asetat kullanılarak *E. adenophorum*'dan seskiterpenlerin izole edilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemle izole edilen yağ ekstraktlarının %98,57'sini seskiterpenler oluşturmuştur. Daha önceki bir çalışmada ise, *E. coli*'nin çiçek salkımı yağı ve kök yağındaki seskiterpenlerin çıkarılması için hidrodistilasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma, *E. adenophorum*'un çiçeklenme ve kök yağlarının farklı bir bileşimini bildirmiştir. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması, seskiterpenlerdeki yağların bileşimindeki farklılıkları açıklayabilir. *E. adenophorum* yağı ekstraktlarının *Pythium myriotylum* üzerinde belirgin bir inhibitör etkisi olduğu belirlenmiştir. *E. adenophorum*'un antifungal aktivitesi ise seskiterpenlerin varlığına atfedilebilir. Çünkü 9-okso-ageroforon ve 9-okso-10,11-dehidro-ageroforon gibi güçlü antifungal bileşikler seskiterpenler arasında bilinmektedir. Ancak, yağ ekstraktlarının daha büyük antifungal aktiviteye sahip olması muhtemelen seskiterpenlerin diğer bileşiklerin varlığında sinerji oluşturma etkisine bağlıdır (Liu vd., 2017).

E. cannabinum bitkisinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yoluyla hazırlanan uçucu yağın *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus fecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (PCI 213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* (ATCC 19430) suşlarına karşı antibakteriyel etkinliği test edilmiştir. *Eupatorium cannabinum* ssp. *cannabinum* L. yağı çeşitli mikroorganizmalara karşı önemli aktivite göstermiştir. Test edilen tüm organizmalar farklı konsantrasyonlarda yağdan etkilenmiş ve en hassas olanlar başta *Streptococcus fecalis* olmak üzere Gram-pozitif bakteriler olmuştur. *Pseudomonas aeruginosa*, yağa karşı en düşük hassasiyeti göstermiştir. *E. cannabinum* yağı fenolik

bileşikler içermekte ve bunlar arasında 6-cadinene, β -caryophyllene, α -terpineol, elemol ve linalool bulunmaktadır. Bu bileşikler antiseptik ve bakteriyostatik aktivitelere sahiptir. Elde edilen sonuçlar, *E. cannabinum* ssp. *cannabinum* L.'nin biyolojik olarak aktif moleküllerin kaynağı olarak kabul edilebileceğini ve patojen mikroorganizmalara karşı ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Senatore vd., 2001). Mevcut çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite gözlenmediği için ekstraktların bahsedilen fenolik bileşikler bakımından zengin olmadığı düşünülebilir. Ayrıca gözlenen farklılık, bitkinin toplandığı yer ve zamanı, ekstraksiyon yöntemi, ekstraktlar hazırlanırken kullanılan çözücü ve test edilen suşların direnciyle ilgili olabilir. Ekstrakt hazırlanırken kullanılacak çözücü seçimi bitkinin türüne, ekstrakte edilecek bitki kısmına, biyoaktif bileşiklerin doğasına ve çözücünün mevcudiyetine bağlıdır. Genel olarak polar bileşiklerin ekstraksiyonunda su, metanol ve etanol gibi polar çözücüler kullanılırken, polar olmayan bileşiklerin ekstraksiyonunda heksan ve diklorometan gibi polar olmayan çözücüler kullanılır. Bu durum ekstraktların biyolojik aktivitesinin etkinliğinde rol oynayabilir (Abubakar ve Haque, 2020).

Mikroorganizmaların direnç oluşturmaları araştırmacıları alternatif tedavi yolları bulmaya yönlendirmiştir ve son birkaç yılda bitki ekstraktlarının QS yolaklarının inhibitörleri olarak hareket edebildiği bulunmuştur. Bu aktif metabolitler bitki dokularının farklı kısımlarından ekstrakte edilebilir. Bu bileşiklerin ana grupları, siklik bileşikler, fenolik türevler, nitrojen siklikleri, furanonlar, laktonlar, sinnamaldehitler, alkaloidler, fenolikler, saponinler, tanenler ve terpenoidler dahil olmak üzere QSI'ler olarak tanımlanabilir. Fitokimyasallar bakteriyel AHL sentezini düzenleyebilir ve dolayısıyla QS'yi baskılayabilir (Dimitrova vd., 2023). Bu sebeple anti-QS ajan arayışı çalışmaları son dönemde hız kazanmıştır. *E. cannabinum* bitkisi için literatürde anti-quorum sensing aktivite üzerine çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışma, bitkinin toprak üstü kısımlarından çeşitli yöntemlerle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının viyolasin pigment üretiminin inhibisyonu ve anti-biyofilm aktivitesi bakımından biyofilm inhibisyonu ve biyofilm eradikasyonunu araştıran ilk araştırma olma niteliğini taşımaktadır.

Mevcut çalışmada test edilen konsantrasyonda *C. violaceum* Cv026 suşunda viyolasin pigment üretimi inhibisyonu tespit edilmemiştir. Bakterilerde QS inhibisyon mekanizmaları beş şekilde görülmektedir. Bunlar; sinyal sentezinin inhibisyonu, sinyal molekülünün inaktivasyonu, sinyal molekülü alımının önlenmesi (reseptör antagonizması), sinyal yanıtını düzenleyicilerin inhibisyonu, sinyal moleküllerinin hücre dışına taşınmasının inhibisyonudur (Tüfekci, 2023). Mevcut çalışmada sinyal moleküllerinin reseptörlere bağlanması engellenerek, bakterilerin hücresel davranışlarını değiştirebilme özelliği test edilmiştir. Bu, QS'in hedef alındığı bir antibakteriyel stratejidir. Test edilen bakteri *C. violaceum* CV026 mutant suşu, normal şartlarda biyosensör bir suş olmasına rağmen pigment üretme yeteneğine sahip değildir. Eksojen sinyal molekülleri ortama eklendiğinde bakteri bu sinyal moleküllerini tanımlar ve buna göre viyolasin pigmenti üretir. Çalışmada test materyalinin pigment inhibisyonu ölçülmeye çalışılmıştır. *C. violaceum* ATCC 12472 suşu doğal olarak pigment üretmek için uzun zincirli AHL moleküllerini kullanmaktadır. Bu suş ile test edilen *C. violaceum* CV026 mutant suşun sinyal molekülleri farklı olduğundan bu sinyal farklılığı reseptör antagonistliği ile pigment üretmeyi engellediğinden mutant suşun üremesi renk pigmenti olmadan gerçekleşmektedir.

Literatürde apigenin ve luteolin bileşikleri içeren bitkilerin *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'de pigment oluşumu, biyofilm üretimi ve hareketliliği engellediği gözlenmiştir. Bu durum apigenin ve luteolin gibi bileşiklerin yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir (Liu vd.,2022). Mevcut çalışmada da çalışılan konsantrasyonlarda anti-QS aktivite gözlenmemesi sebebiyle çalışılan ekstraktlarda belirtilen bileşiklerin yeterli olmaması veya bulunmaması düşünülebilir.

Bu çalışma kapsamında ayrıca *S. aureus* ATCC 25923 suşunda biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve oluşan biyofilmin eradikasyonu üzerine yapılan deneyler sonucunda ekstraktların 250 µg/mL konsantrasyonda maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanan su ekstraktlarında anlamlı inhibisyon ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu sonuçları sırasıyla %53,7 ve %26,8 olarak belirlenmiştir. Biyofilm eradikasyon deneyi sonuçları ise sırasıyla %55,2 ve %53,7 olarak

bulunmuştur. Mevcut çalışmada farklı yöntemler ile hazırlanan su ekstraktlarında anlamlı sonuçların tespit edilmesi, bu ekstaktların içeriğindeki aktif kimyasal maddelerle ilgili olabilir. Sonuçlar göz önüne alındığında su ekstraktları anti-biyofilm ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Mevcut çalışma *E. cannabinum* bitkisinin anti-biyofilm aktivitesinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Literatürde stafilokokların yüzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturabilme yeteneklerinin olduğu belirtilmiştir. İnsan ve hayvanlar için enfeksiyonlara sebep olabilen *S. aureus* suşları patojen mikroorganizmalardır. Suşlar, bakteriyi fagositozdan koruyan, nötrofillerin etkisini önleyen ve lenfosit aktivitesini azaltan bir slaym yapısı ürettiğinde antibakteriyel tedaviye daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Efe vd., 2022). Mevcut çalışmada *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmeyip antibiyofilm aktivite gözlenmesinin sebebi, bakterinin direnç oluşturması olabilir. Biyofilm oluşumunun engellenmesi ve olgunlaşmış biyofilmin yıkımlanması ile ele alındığında, başlangıç aşamasındaki biyofilm oluşum oranı olgunlaşmış biyofilmden daha yüksektir. Bunun nedeni, bir kez oluştuktan sonra biyofilmin çıkarılmasının zorlaşması ve başlangıç aşamasında biyofilm oluşumunun engellenmesindendir (Kuyucuklu, 2019). Belirtilen bilgiye paralel olarak mevcut çalışmada da bahsedildiği şekilde biyofilm oluşumu ve eradikasyonu arasında bir bağlantı olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *E. cannabinum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing aktivitelerine yönelik bilgi sağlamaktadır. PC-3 ve HeLa hücre hatları üzerine değerlendirilen antikanser aktivite sonuçlarına göre özellikle ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanan etil asetat ekstraktının güçlü antikanser etkiye sahip olduğu ve kansere yönelik tedavilerde potansiyel antikanser ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. *Eupatorium* cinsi bitkilerin antikanser aktivitelerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Çalışmamızdaki bulgulara göre antikanser aktivite sağlayan ekstraktın apoptotik ve otofajik mekanizmasını anlamak için daha ileri çalışmalar yapılabilir. Ek olarak, ekstraktların çalışılan kanserlerin sağlıklı hücre hatları üzerine etkinliğinin araştırılması ileri çalışmalar için önemlidir. Çalışılan bitkinin antikanser ilaç olma potansiyelinin değerlendirilebilmesi için *in vivo* deneyler yapılabilir.

Ekstraktların antimikrobiyal aktivite araştırmasında kullanılan bakteri ve maya suşlarında çalışılan konsantrasyonlarda etki gözlenmemiştir. Bu sebeple farklı mikroorganizmalar ile araştırma yapılabilir. QS deneyleri kapsamında yapılan viyolasin inhibisyonu deneyinde pigment inhibisyonu tespit edilmemiştir. İlave olarak ekstraktların piyosiyanın pigment üretimi, swarming hareketi gibi QS sistemi ile regüle edilen diğer virülans faktörlerini inhibe etme yetenekleri araştırılabilir. *E. cannabinum* bitkisi için literatürde anti-quorum sensing aktivite üzerine çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışma da *E. cannabinum*'un toprak üstü kısımlarından çeşitli yöntemlerle hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının viyolasin pigment inhibisyonu ve antibiyofilm aktivitesine yönelik ilk çalışmadır. Anti-biyofilm deneyleri sonucunda su ekstraktlarında biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve eradikasyonu için anlamlı sonuçlar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında anlamlı bulguların tespit edildiği ekstraktların antibiyotiğe karşı dirençli bakteriler için anti-biyofilm ajanı olarak kullanılma potansiyelinin olması, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen bakteri için umut vericidir. Tespit edilen bu anti-

biyofilm aktivite, ekstraktların içerisindeki bileşiklerin etki mekanizmalarını anlamak için ileri çalışmaların gerekli olduğunu göstermektedir.

Ekstraktların antikanser aktivitesinin araştırılması sonucunda hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum ekstraktın kanser tedavisinde kullanılabilecek umut verici potansiyel bir ilaç adayı olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca su ekstraktlarının bakteri biyofilmlerinin oluşumunu önleyici ve mevcut biyofilmleri yıkımlayıcı etkiler göstermesi, antibiyotik direnci ile mücadelede yenilikçi çözümler sunabilmektedir. Bu bulgular, kanser ve antibiyotik direnci gibi önemli sağlık sorunlarıyla mücadelede yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak tanıdığından doğal kaynaklı bitkilerin araştırılması, sağlık alanında büyük bir yenilikçilik ve ilerleme potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A., Naqvi, S. A. R., Rasool, M. H., Noureen, A., Mubarik, M. S., & Tareen, R. B. (2021). Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial screening of seriphidium oliverianum plant extracts. *Dose-response*, 19(1), 15593258211004739.
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.
- Abuali, M., Rezadoost, H., Vazirian, M., Balaei-Kahnamoei, M., & Hamzeloo-Moghadam, M. (2021). Cytotoxic effects of Eupatorium cannabinum on MCF-7 human breast cancer cell line. *Research Journal of Pharmacognosy*, 8(2), 69-75.
- Al Kateeb, A. I., Tüfekci, E. F., Baloğlu, M. C., Zengin, G., Yıldızıtugay, E., & Altunoğlu, Y. Ç. (2022). Antibacterial Effects of Phlomoides molucelloides (Bunge) Salmaki. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(Ek Sayı 2), 402-410.
- ALACA, F., & ARSLAN, N. (2012). Sekonder metabolitlerin bitkiler açısından önemi. *Ziraat Mühendisliği*(358), 48-55.
- Al-Snafi, A. E. (2017). Chemical constituents, pharmacological and therapeutic effects of Eupatorium cannabinum-A review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 160-168.
- Ashirova, Z. B. (2021). Studying Phytochemical Features of Three Asteraceae Herbs Growing Wild in Kazakhstan. *Floresta e Ambiente*, 28.
- Ashtiani, M. N.-M. (2017). Effect of Achillea wilhelmsii extract on expression of the human telomerase reverse transcriptase mRNA in the PC3 prostate cancer cell line. *Biomedical reports*, 7(3), 251-256.
- Bader, A. A. (2019). Cytotoxicity of Some Plants of the Asteraceae Family: Antiproliferative Activity of Psiadia punctulata Root Sesquiterpenes. *Records of Natural Products*, 13(4).
- Baile, S. B. (2021). A Review on the Potential Application of Medicinal Species from Asteraceae Family in Cancer. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(38A), 75-88.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Bahkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Bhandari, S., Khadayat, K., Poudel, S., Shrestha, S., Shrestha, R., Devkota, P., ... & Marasini, B. P. (2021). Phytochemical analysis of medicinal plants of Nepal and their antibacterial and antibiofilm activities against uropathogenic Escherichia coli. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21, 1-11.

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. Advance online publication. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cardoso, J. C., Oliveira, M. E., & Cardoso, F. D. (2019). Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37, 124-132.
- Chang, C. H., Wu, S., Hsu, K. C., Huang, W. J., & Chen, J. J. (2021). Dibenzofuran, 4-chromanone, acetophenone, and dithiecin derivatives: cytotoxic constituents from *Eupatorium fortunei*. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7448.
- Chen, H., Zhou, B., Yang, J., Ma, X., Deng, S., Huang, Y., ... & Yang, X. (2018). Essential oil derived from *eupatorium adenophorum* spreng. Mediates anticancer effect by inhibiting stat3 and akt activation to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in pharmacology*, 9, 483.
- Choudhary, E., Bithel, N., Sharma, T., Saini, P., & Rajput, M. (2023). GC-MS Characterization of *Eupatorium odoratum* (L.) Leaves Essential Oil and Evaluation of In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 17(4).
- Cilia-López, V. G.-C.-S. (2021). Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 99(3), 455-486.
- Çelik, A., & Gül, A. (2016). Tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliği ve dış ticareti: Hatay ili örneği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2).
- Darqui, F. S. (2021). Peculiarities of the transformation of Asteraceae family species: the cases of sunflower and lettuce. *Frontiers in Plant Science*, 12, 767459.
- De Vos, P., Schmitt, J., Verhoeven, G., & Stunnenberg, H. G. (1994). Human androgen receptor expressed in HeLa cells activates transcription in vitro. *Nucleic acids research*, 22(7), 1161-1166.
- Demirkol, Ö. Ş., Yakan, A. İ., & Alifakı, Y. Ö. (2018). Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesinden fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *Gıda*, 43(5), 846-855.
- Dev, S. S., Vineetha, K. U., & Francis, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Ayapana triplinervis* and its antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(9), 3897-02.
- Dimitrova, P. D., Damyanova, T., & Paunova-Krasteva, T. (2023). *Chromobacterium* Violaceum: A model for evaluating the anti-quorum sensing activities of plant substances. *Scientia Pharmaceutica*, 91(3), 33.
- DOKUMACI, A. D. (2024). Antibiyotik Direncinin Aşılması İçin Yeni Stratejiler ve İlaç Geliştirme Çalışmaları: Geleneksel Derleme. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 13(1).

- Dua, T. K., Giri, S., Nandi, G., Sahu, R., Shaw, T. K., & Paul, P. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles using *Eupatorium adenophorum* leaf extract: characterizations, antioxidant, antibacterial and photocatalytic activities. *Chemical Papers*, 77(6), 2947-2956.
- Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., ... & Nakazato, G. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology advances*, 34(5), 1030-1045.
- Dutta, B., & Mahanta, B. (2016). Studies on secondary metabolites, total phenol and flavonoid contents of *Eupatorium cannabinum* L. in Assam, India. *Journal of Medicinal Plants*, 4(2), 130-133.
- Elemike, E. E., Onwudiwe, D. C., Ekennia, A. C., Sonde, C. U., & Ehiri, R. C. (2017). Green synthesis of Ag/Ag₂O nanoparticles using aqueous leaf extract of *Eupatorium odoratum* and its antimicrobial and mosquito larvicidal activities. *Molecules*, 22(5), 674.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [<https://www.eucast.org/>]. Erişim Tarihi: 23.01.23
- Feng, R. M. (2019). Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? *Cancer communications*, 39(1), 1-12.
- Feride, E. F. E., YUKSEKDAG, Z., & ACAR, B. Ç. (2022). *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen biyosüpfektanların anti-biyofilm ve anti-mikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 3(2), 102-115.
- Garcia Sanchez, E. R. (2011). Una revisión de *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) de Michoacán. *Phyton (Buenos Aires)*, 80(2), 139-146.
- Gielecińska, A., Kciuk, M., Mujwar, S., Celik, I., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., & Kontek, R. (2023). Substances of natural origin in medicine: plants vs. Cancer. *Cells*, 12(7), 986.
- Global Cancer Observatory. (2024). [<https://gco.iarc.fr/en.>] Erişim Tarihi:26.03.24
- Grigore, A., Neagu, G., Dobre, N., Albulescu, A., Ionita, L., Ionita, C., & Albulescu, R. (2018). Evaluation of antiproliferative and protective effects of *Eupatorium cannabinum* L. extracts. *Turkish Journal of Biology*, 42(4), 341-351.
- Gupta, M., Mazumder, U. K., Chaudhuri, I., Chaudhuri, R. K., Bose, P., Bhattacharya, S., ... & Patra, S. (2002). Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. *Fitoterapia*, 73(2), 168-170.
- Güneş, A. K. (2019). Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Industrial crops and products*, 137, 208-213.
- Harun, F. B., Syed Sahil Jamalullail, S. M., Yin, K. B., Othman, Z., Tilwari, A., & Balaram, P. (2012). Autophagic cell death is induced by acetone and ethyl acetate extracts from

Eupatorium odoratum in vitro: effects on MCF-7 and vero cell lines. *The Scientific World Journal*, 2012.

- Hausman, D. M. (2019). What is cancer? *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.
- Herrerias, T., Oliveira, A. A., Belem, M. L., Oliveira, B. H., Carnieri, E. G., Cadena, S., ... & Rocha, M. E. (2010). Effects of natural flavones on membrane properties and cytotoxicity of HeLa cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 403-408.
- Ionita, L., Grigore, A., Pirvu, L. U., Draghici, E. L., A., B. C., & Ionita, C. A. (2013). Pharmacological activity of an Eupatorium cannabinum L. extract. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(6), 8779-8786.
- James, J. M., Geethumol, C. U., Anilkumar, A., & Selvaraj, G. (2018). Phytochemical screening, antibacterial and allelopathic effects of few invasive plants of Kerala. *Plant Science Today*, 5(4), 175-181.
- Jarco, S. P. (2021). Free radical scavenging activity of infusions of different medicinal plants for use in obstetrics. *Plants*, 10(10), 2016.
- Judzentiene, A. G. (2016). Variability, toxicity, and antioxidant activity of Eupatorium cannabinum (hemp agrimony) essential oils. *Pharmaceutical Biology*, 54(6), 945-953.
- Junejo, B., Eryilmaz, M., Rizvanoglu, S. S., Palabiyik, I. M., Ghumro, T., Mallah, A., ... & Dragoi, E. N. (2023). Pharmacological assessment of Co3O4, CuO, NiO and ZnO nanoparticles via antibacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities. *Water Science and Technology*, 87(11), 2840-2851.
- Kahya, H. (2022). *Sık kullanılan bazı hücre hatları için kalite kontrol: Sitokrom B ve sitokrom oksidaz alt birim I genlerinin DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi* (Master's thesis, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kartal, M. O., Ekinici, M. B., & Poyraz, B. (2021). Biyofilm yapısı ve önlenmesi. *Akademik Gıda*, 19(3), 353-363.
- Kauser, A., Parisini, E., Suarato, G., & Castagna, R. (2023). Light-Based Anti-Biofilm and Antibacterial Strategies. *Pharmaceutics*, 15(8), 2106.
- Kothari, V., Sharma, S., & Padia, D. (2017). Recent research advances on Chromobacterium violaceum. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(8), 744-752.
- Kumar, L., Patel, S. K. S., Kharga, K., Kumar, R., Kumar, P., Pandohee, J., ... & Chhibber, S. (2022). Molecular mechanisms and applications of N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in bacteria. *Molecules*, 27(21), 7584.
- Kurade, N. P., Jaitak, V., Kaul, V. K., & Sharma, O. P. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of Lantana camara, Ageratum houstonianum and Eupatorium adenophorum. *Pharmaceutical Biology*, 48(5), 539-544.

- Kurhan, İ., & Ekici, H. (2021). TAMAMLAYICI-GELENEKSEL TIP KAPSAMINDA FİTOTERAPİ VE KANSER YAKLAŞIMI. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12(1), 15-20.
- Kuyucuklu, G. (2019). *Stafilokok izolatlarında, antibiyotiklerin antibiyofilm etkinliği üzerine n-asetilsisteinin etkisi* (Master's thesis, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Lakhdar, M. (2018). Traditional uses, phytochemistry and biological activities of *Cotula cinerea* Del: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(2), 365-373.
- Lawson, S. K., Sharp, L. G., Powers, C. N., McFeeters, R. L., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2020). Volatile compositions and antifungal activities of native american medicinal plants: Focus on the asteraceae. *Plants*, 9(1), 126.
- Liu, P. Y. (2015). Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium* (1904–2014). *Chemistry & biodiversity*, 12(10), 1481-1515.
- Liu, X., Yan, D., Ouyang, C., Yang, D., Wang, Q., Li, Y., ... & Cao, A. (2017). Oils extracted from *Eupatorium adenophorum* leaves show potential to control *Phytophthora myriophyllum* in commercially-grown ginger. *PLoS One*, 12(5), e0176126.
- Liu, X., Yao, H., Zhao, X., & Ge, C. (2023). Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, 28(6), 2432.
- Lou, Z. X., Wang, H. X., Tang, Y. X., & Chen, X. (2017). The effect of burdock leaf fraction on adhesion, biofilm formation, quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*, 122(3), 615-624.
- Ma, Y., Xu, Y., Yestrepky, B. D., Sorenson, R. J., Chen, M., Larsen, S. D., & Sun, H. (2012). Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation.
- Malhotra, A., Chauhan, S. R., Rahaman, M., Tripathi, R., Khanuja, M., & Chauhan, A. (2023). Phyto-assisted synthesis of zinc oxide nanoparticles for developing antibiofilm surface coatings on central venous catheters. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1138333.
- Maminta, M. L. D., Molteni, A., & Rosen, S. T. (1991). Stable expression of the human estrogen receptor in HeLa cells by infection: effect of estrogen on cell proliferation and c-myc expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 78(1-2), 61-69.
- Matos Lopes, T. R., de Oliveira, F. R., Malheiros, F. F., de Andrade, M. A., Monteiro, M. C., & Baetas Gonçalves, A. C. (2015). Antimicrobial bioassay-guided fractionation of a methanol extract of *Eupatorium triplinerve*. *Pharmaceutical Biology*, 53(6), 897-903.
- McLean, R. J., Whiteley, M., Stickler, D. J., & Fuqua, W. C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS microbiology letters*, 154(2), 259-263.
- Michel, J., Abd Rani, N. Z., & Husain, K. (2020). A review on the potential use of medicinal plants from Asteraceae and Lamiaceae plant family in cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 852.

- Mohanta, Y. K. (2023). Potential use of the Asteraceae family as a cure for diabetes: A review of ethnopharmacology to modern day drug and nutraceuticals developments. *Frontiers in Pharmacology*, 14.
- Monks, N. R., Ferraz, A., Bordignon, S., Machado, K. R., Lima, M. F., Rocha, A. B., & Schwartzmann, G. (2002). In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharmaceutical biology*, 40(7), 494-500.
- Paolini, J., Costa, J., & Bernardini, A. F. (2005). Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1076(1-2), 170-178.
- Phan, M. G., Do, T. T., Nguyen, T. N., Do, T. V. H., Dong, N. P., & Vu, M. T. (2021). Chemical constituents of *Eupatorium japonicum* and anti-Inflammatory, cytotoxic, and apoptotic activities of eupatoriopicrin on cancer stem cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1-12.
- Piwowarski, J. P., Waltenberger, B., Stuppner, H., Kiss, A. K., & Granica, S. (2018). The analysis of phenolic compounds from the aerial parts of *Eupatorium cannabinum* L. subsp. *cannabinum*. *Biochemical systematics and ecology*, 79, 37-43.
- Purcaru, T., Alecu, A., Diguta, C., & Matei, F. (2015). In vitro evaluation of *Eupatorium cannabinum* antimicrobial activity. *AgroLife Scientific Journal*, 4(2).
- Putri, A. S. (2022). A Mini Review: The Application of *Eupatorium* Plants as Potential Cosmetic Ingredients. *Cosmetics*, 9(5), 103.
- Ribeiro-Varandas, E., Ressurreição, F., Viegas, W., & Delgado, M. (2014). Cytotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. ethanolic extract against colon cancer cells and interactions with Bisphenol A and Doxorubicin. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 1-10.
- Rolnik, A. S. (2021). Antioxidant and hemostatic properties of preparations from Asteraceae family and their chemical composition—Comparative studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 111982.
- Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009.
- Rolnik, A., Stochmal, A., & Beata, O. L. A. S. (2022). The in vitro anti-platelet activities of plant extracts from the Asteraceae family. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112809.
- Rustaiyan, A., & Faridchehr, A. (2021). Constituents and biological activities of selected genera of the Iranian Asteraceae family. *Journal of Herbal Medicine*, 25, 100405.
- Saniye, A. D. (2021). KANSER HÜCRE METABOLİZMASI. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(3), 66-75.

- Senatore, F., De Fusco, R., & Napolitano, F. (2001). Eupatorium cannabinum L. ssp. cannabinum (Asteraceae) essential oil: Chemical composition and antibacterial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 13(6), 463-466.
- Seyedmousavi, S., İlkit, M., Durdu, M., Ergin, Ç., Polat, S. H., Melchers, W., & Verweij, P. (2015). Candida ve kandidoz: epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum.
- Siegel, R. L. (2023). Cancer statistics, 2023. *Ca Cancer J Clin*, 73(1), 17-48.
- Sobrinho, A. C. (2017). The genus Eupatorium L.(Asteraceae): A review of their antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(3), 43-57.
- Song, Y. J., Yu, H. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2019). Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against Staphylococcus aureus and Escherichia coli.
- Stump, J. L. (2014). Henrietta lacks and the HeLa cell: rights of patients and responsibilities of medical researchers. *The History Teacher*, 48(1), 127-180.
- Sugumar, N., Karthikeyan, S., & Gowdhami, T. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from Eupatorium triplinerve Vahl. aerial parts. *International Letters of Natural Sciences*, (04).
- Temel, A., & Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1), 1-13.
- Treangen, T. J., Maybank, R. A., Enke, S., Friss, M. B., Diviak, L. F., Karaolis, D. K., ... & Rosovitz, M. J. (2014). Complete genome sequence of the quality control strain Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 25923. *Genome announcements*, 2(6), 10-1128.
- Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by Botrytis cinerea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 39-46.
- Tuon, F. F., Suss, P. H., Telles, J. P., Dantas, L. R., Borges, N. H., & Ribeiro, V. S. T. (2023). Antimicrobial treatment of Staphylococcus aureus biofilms. *Antibiotics*, 12(1), 87.
- Tüfekci, E. F. (2023). Bakteriyel quorum sensing: Bir iletişimden daha fazlası. Şahna, E., Akgül, H., Selamoğlu, Z (Eds.). *Sağlık Bilimlerinde Uluslararası Araştırma ve Derlemeler*. Serüven Yayınevi, Ankara
- Ülger, T. G., & AYHAN, N. Y. (2020). Bitki sekonder metabolitlerinin sağlık üzerine fonksiyonel etkileri. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (3), 384-390.
- Valarezo, E. A.-S. (2021). Study of essential oils from leaves of Asteraceae family species Ageratina dendroides and Gynoxys verrucosa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(3), 400-407.

- Wang, X., Xu, J., Tao, Y., Fan, X., Shen, X., & Tian, S. (2022). Eupatorium lindleyanum DC. sesquiterpene fraction F1012-2 regulates p53/NF- κ B signaling pathways in human breast cancer. *Archives of Biological Sciences*, 74(3), 291-299.
- Ward, J. H., Kushner, J. P., & Kaplan, J. (1982). Regulation of HeLa cell transferrin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), 10317-10323.
- Wat, C. K., Johns, T., & Towers, G. N. (1980). Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2(3), 279-290.
- Woerdenbag, H. J. (1986). Eupatorium cannabinum L. A review emphasizing the sesquiterpene lactones and their biological activity. *Pharmaceutisch Weekblad*, 8, 245-251.
- World Health Organization. (2023). [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>] Erişim Tarihi:26.11.2023
- Yang, B., Shen, J. W., Zhou, D. H., Zhao, Y. P., Wang, W. Q., Zhu, Y., & Zhao, H. J. (2019). Precise discovery of a STAT3 inhibitor from Eupatorium lindleyanum and evaluation of its activity of anti-triple-negative breast cancer. *Natural product research*, 33(4), 477-485.
- Yang, B., Zhao, Y., Lou, C., & Zhao, H. (2016). Eupalinolide O, a novel sesquiterpene lactone from Eupatorium lindleyanum DC., induces cell cycle arrest and apoptosis in human MDA-MB-468 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 36(5), 2807-2813.
- Yeğenoğlu, Y. (2012). Antifungal direnci gösteren mantarlar. *ANKEM Derg*, 26(2), 254-260.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559.
- Zamora-Mendoza, L., Vispo, S. N., De Lima, L., Mora, J. R., Machado, A., & Alexis, F. (2023). Hydrogel for the controlled delivery of bioactive components from extracts of eupatorium glutinosum lam. Leaves. *Molecules*, 28(4), 1591.
- Zhang, H., Zhang, Z., Li, J., & Qin, G. (2023). New Strategies for Biocontrol of Bacterial Toxins and Virulence: Focusing on Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Toxins*, 15(9), 570.