

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



FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE ELDE EDİLEN
***Diplotaxis tenuifolia* BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER**
VE ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

SÜMEYRA BAŞYİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

HAZİRAN - 2024

KASTAMONU

TEZ ONAYI

SÜMEYRA BAŞYİĞİT tarafından hazırlanan “FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE ELDE EDİLEN *Diplotaxis tenuifolia* BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER VE ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **27.06.2024** 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	Dr. Öğr. Üyesi Ferhat ULU 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.

Sümevra BAŞYİĞİT

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE ELDE EDİLEN *Diplotaxis tenuifolia* BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER VE ANTİMİKROBİYAL POTANSİYELİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

SÜMEYRA BAŞYİĞİT

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN:PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

Bitkiler yeryüzünde ortaya çıktıktan sonra özellikle karasal ekosistemlerde besin piramidinin ilk basamağına yerleşerek heteretrof canlılar için yaşamın temelinde yer alan karbonun kaynağı olmuştur. Tarihin en eski zamanlarından bu yana insanlar değişik amaçlar için bitkileri kullanmış, incelemiş ve tanıtmak için gayret göstermişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında, *Diplotaxis tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle izolasyon sonucu elde edilen etil asetat (EA), metanol (MeOH) ve su ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal ve anti-Quorum Sensing (anti-QS) aktiviteleri araştırılmıştır. Test edilen ekstraktların antikanser aktivitesi PC-3 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları üzerine MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Antibakteriyel aktiviteleri insan patojenlerini temsil eden altı Gram-negatif, üç Gram-pozitif bakteri ile bir maya suşuna karşı disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılmıştır. Ekstraktların anti-QS aktiviteleri ise *Chromobacterium violaceum* CV026 biyosensör suşunda viyolasin pigment üretimi üzerine inhibitör etkinliği yarı-katı agar yöntemi ile, anti-biyofilm aktivitesi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşuna karşı kristal viyole yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Sonuç olarak her iki hücre hattı için 48 saat sonunda en düşük canlılık oranı (%2,0-%2,8) EA ekstraktlarının 1000'er µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır. IC₅₀ değerleri ise MDA-MB-231 ve PC-3 hücre hatlarına karşı sırasıyla 304,4 µg/mL ve 313 µg/mL şeklinde hesaplanmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda bitkinin yalnızca ultrasonikasyon metodu ile hazırlanan EA ekstraktının *Bacillus subtilis*'e karşı zon çapı oluşturduğu tespit edilmiştir. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri ise 1000'er µg/mL olarak tespit edilmiştir. Ekstraktların viyolasin pigment üretimi üzerine inhibitör etkinliği gözlenmezken biyofilm formasyonunu %81,9 oranına kadar inhibe ettikleri belirlenmiştir. Bulgular *D. tenuifolia* ekstraktlarının umut vadeden terapötik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. İleriki çalışmalarda ekstraktların fitokimyasal analizinin gerçekleşmesi ve biyolojik aktivitelere hangi bileşiğin veya bileşiklerin sorumlu olduğunun belirlenmesi önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELE: *Diplotaxis tenuifolia* (L.), antibiyofilm, antikanser, antimikrobiyal, ekstrakt

Haziran, 2024, 63 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

COMPARATIVE EVALUATION OF ANTICANCER AND ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF *Diplotaxis tenuifolia* PLANT EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

SÜMEYRA BAŞYİĞİT

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

After plants appeared on earth, they settled at the first step of the food pyramid, especially in terrestrial ecosystems, and became the source of carbon, which is the basis of life for heterotrophic creatures. Since the earliest times of history, people have used plants for various purposes, studied them, and made efforts to introduce them. In this thesis study, the anticancer, antimicrobial, and anti-Quorum Sensing (anti-QS) activities of ethyl acetate (EA), methanol (MeOH), and water extracts isolated from the aerial parts of the *Diplotaxis tenuifolia* plant by maceration and ultrasonication methods were investigated. The anticancer activity of the tested extracts was evaluated by the MTT method on PC-3 and MDA-MB-231 cancer cell lines. Their antibacterial activities were investigated by disk diffusion and broth microdilution methods against six Gram-negative, three Gram-positive bacteria and one yeast strain representing human pathogens. The anti-QS activities of the extracts were tested using the semi-solid agar method for their inhibitory activity on violacein pigment production in the *Chromobacterium violaceum* CV026 biosensor strain, and the crystal violet method for their anti-biofilm activity against the *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain. As a result, the lowest survival rate (2.0%-2.8%) for both cell lines at the end of 48 hours was determined at 1000 µg/mL concentration of EA extracts. IC₅₀ values were calculated as 304.4 µg/mL and 313 µg/mL against MDA-MB-231 and PC-3 cell lines, respectively. It was determined that only the EA extract of the plant prepared by the ultrasonication method created zone diameter against *Bacillus subtilis* at the concentrations studied. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined as 1000 µg/mL each. While no inhibitory activity was observed on violacein pigment production, it was determined that the extracts inhibited biofilm formation by up to 81.9%. In further studies, it is recommended to perform phytochemical analysis of the extracts and determine which compound or compounds are responsible for the biological activities.

KEYWORDS: *Diplotaxis tenuifolia* (L.), antibiofilm, anticancer, antimicrobial, extract

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında desteklerini ve emeğini esirgemeyen, tecrübeleriyle bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda fikirleri ve nezaketi ile desteğini eksik etmeyen Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU hocama; çalışmalarda kullandığım ekstraktların temin edilmesini sağlayan Prof. Dr. Gökhan ZENGİN hocama teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım süresi boyunca yardımını esirgemeyen, her türlü öneri, bilgi ve rehberliğiyle önder olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Ferhat ULU ve Araş. Gör. Mustafa ÖÇAL hocalarıma; her şekilde yanımda olan, mükemmel desteğiyle bana yol gösteren Dr. Anfal AL KATEEB'e ve laboratuvarında birlikte çalıştığımız tüm ekip arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım ve eğitimim boyunca her zaman yanımda olup beni bu yaşa getiren, bana her türlü desteği veren, dualarında daima yer veren, her daim yanımda olduğunu hissettiren can annem Döne YAKAR'a en içten duygularıyla sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, KÜBAP-01/2022-32 numaralı "Çeşitli ekstraksiyon teknikleri ile elde edilen *Diplotaxis tenuifolia* (yabani roka) bitki ekstraktlarının antiproliferatif ve antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi" isimli proje kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı KÜBAP'a teşekkür ederim.

SÜMEYRA BAŞYİĞİT

Kastamonu, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Brassicaceae Ailesi Hakkında Genel Bilgiler	3
1.2 <i>Diplotaxis tenuifolia</i> Türü	5
1.2.1 <i>D. tenuifolia</i> Türünün Fiziksel Özellikleri.....	6
1.2.2 <i>D. tenuifolia</i> Türünün Fitokimyasal İçeriği	6
1.3 Kanser.....	8
1.3.1 Prostat Kanseri	9
1.3.1.1 PC-3 hücre hattı.....	10
1.3.2 Meme Kanseri	10
1.3.2.1 MDA-MB-231 hücre hattı.....	11
1.4 Antimikrobiyal Aktivite	12
1.5 Viyolasin İnhibisyon Mekanizması.....	13
1.6 Biyofilm İnhibisyon Mekanizması.....	15
1.7 Çalışmanın Amacı.....	17
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1 Malzemeler	22
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali	22
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları	22
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kanser Hücre Hatları	23
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler	23
3.2 Yöntemler	25
3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Temini ve Hazırlanması	25
3.2.2 Hücre Kültürü	26
3.2.2.1 Hücre kültürünün sürdürülmesi.....	26
3.2.2.2 MTT ile hücre canlılığının belirlenmesi ve IC ₅₀ değerlerinin hesaplanması	27
3.2.3 Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri	28
3.2.3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri	28
3.2.3.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması	28
3.2.3.3 Disk difüzyon testi.....	28
3.2.3.4 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	29
3.2.4 Anti-Quorum Sensing Aktivite Deneyleri	30
3.2.4.1 Viyolasin inhibisyon deneyi.....	30

3.2.4.2	Biyofilm inhibisyon deneyi	31
3.2.5	İstatistiksel Analizler	32
4.	BULGULAR.....	33
4.1	Antikanser Aktivite Bulguları.....	33
4.1.1	Bitki Ekstraktlarının PC-3 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları	33
4.1.2	Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları	37
4.2	Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması.....	40
4.3	Anti-Quorum Sensing Aktivite Bulguları	42
4.3.1	Viyolasin İnhibisyon Deneyi	42
4.3.2	Biyofilm İnhibisyon Deneyi	43
5.	TARTIŞMA.....	45
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	52
	KAYNAKLAR.....	53
	ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. 1 Brassicaceae familyasında bulunan fenolik bileşikler .	4
Şekil 1. 2 <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC. bitkisinin görseli	6
Şekil 1. 3 Ülkemizde a) kadınlarda ve b) erkeklerde görülen kanser insidansı	9
Şekil 1. 4 Antibiyotik direnç mekanizması	13
Şekil 1. 5 Viyolasin inhibisyon mekanizması .	15
Şekil 1. 6 Biyofilm oluşum mekanizması	16
Şekil 3. 1 PC-3 ve MDA-MB-231 MTT işleminden sonra mikrolept görüntüsü....	28
Şekil 3. 2 Mikrodilüsyon yöntemi mikrolept görüntüsü.....	30
Şekil 4. 1 Ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri.....	34
Şekil 4. 2 Maserasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri.....	35
Şekil 4. 3 Ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri.....	38
Şekil 4. 4 Maserasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri.	38
Şekil 4. 5 Ekstraktların <i>B. subtilis</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi	40
Şekil 4. 6 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin <i>C. violaceum</i> CV026 biyosensör suşunda viyolasin inhibisyonu	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. 1 Yabani rokada rapor edilen glikozinolat bileşikleri	8
Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan bakteri suşları.....	23
Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan kimyasallar	24
Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	24
Tablo 4. 1 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları	35
Tablo 4. 2 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları	39
Tablo 4. 3 Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm).	41
Tablo 4. 4 Ekstraktların biyofilm inhibitör etkinliği.	43

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4. 1 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda PC-3 hücre hattının canlılığına etkisi	33
Grafik 4. 2 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda PC-3 hücre hattı üzerine sitotoksik aktivitesi.	34
Grafik 4. 3 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının PC-3 hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değeri.....	36
Grafik 4. 4 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının PC-3 hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değeri.	36
Grafik 4. 5 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattının canlılığına etkisi	37
Grafik 4. 6 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattı üzerine sitotoksik aktivitesi.	37
Grafik 4. 7 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değeri.	39
Grafik 4. 8 <i>D. tenuifolia</i> bitkisinin maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değeri.....	40
Grafik 4. 9 Ekstraktların ve kontrollerinin ölçülen absorbans değerleri.	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	: Santimetre
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
gr	: Gram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
°C	: Santigrad Derece
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
α	: Alfa
β	: Beta
&	: Ve

Kısaltmalar

AHL	: N- açıl homoserin lakton
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EACC	: Avrupa kimliği doğrulanmış hücre kültürleri koleksiyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ER-α	: Östrojen Reseptörü Alfa
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal bovin serum
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
Kob	: Koloni oluşturan birim
MBK	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
MeOH	: Metanol
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MTT	: Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NA	: Nutrient Agar
NEAA	: Esansiyal Olmayan Amino Asit
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PR	: Progesteron Reseptörü
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
QS	: Quorum Sensing
LB	: Luria Bertani Broth
TNBC	: Üçlü negatif meme kanseri

1. GİRİŞ

Bitkiler yeryüzünde ortaya çıktıktan sonra özellikle karasal ekosistemlerde besin piramidinin ilk basamağına yerleşerek heteretrof canlılar için yaşamın temelinde yer alan karbonun kaynağı olmuştur. Tarihin en eski zamanlarından bu yana insanlar değişik amaçlar için bitkileri kullanmış, incelemiş ve tanıtmak için gayret göstermişlerdir. İnsanların besinleri genel olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı olmak üzere iki çeşittir. Bitkiler insanlar tarafından gıda maddesi olarak tüketilmelerinin yanında koku verici ve tat anlamında da kullanılmışlardır (Aytaç, 2016). Bitki kullanımına ilişkin ilk belgelerin M.Ö. 2600 yıllarına dayandığı ve takriben 1000 bitki kaynaklı ürünün kullanıldığı kayıtlara geçmiştir. Böylelikle ileri geleneksel tıp sistemlerinin temeli atılmıştır (Cragg ve Newman, 2013). Klinik metotlar kullanılarak bitkilerden ilaç keşfi 19. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. Afyon bitkisinden morfinin izolasyonunun başlanmasıyla pek çok şifalı bitkinin incelenmesi tetiklenmiştir. Böylece başta alkaloidler olmak üzere kinin, kodein, nikotin, atropin, kokain gibi birçok biyoaktif doğal ürünün bulunması sağlanmıştır (Atanasov vd., 2015). Şu ana kadar bulunan doğal ürünler, insan sağlığının iyiye gitmesinde önemli bir rol oynamıştır. Hesaplamalı ve bütünleştirici kimyadan oluşturulan bileşiklerle güçlü bir rekabete maruz kalmalarına karşın, etkinlikleri ve güvenilirlikleri sebebiyle halen tercih edilen ilaçlar haline gelmiştir (Veeresham, 2012). Bununla birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), günümüzde kullanılabilen ilaçların %25'inin tıbbi bitkiler kullanılarak üretildiğini bildirmektedir. DSÖ tarafından bitkisel tedavinin önümüzdeki yıllarda tüm dünyada yaygınlaşacağı öngörülmektedir (Acıbuca ve Budak, 2018).

Ilıman iklim kuşak bölgesinde olan ülkemiz, içinde barındırdığı bitki florası bakımından büyük bir zenginlik kaynağıdır. Son zamanlardaki araştırmalara göre Türkiye'nin ortalama 12.000'e yaklaşık bitki türüne ev sahipliği yaptığı sonucuna varılmıştır. İçinde barındırdığı bu bitki türünün 3000'i ise endemiktir (Konak vd., 2017). Endemik türler açısından bakıldığında zengin bölgelerimiz Akdeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleridir (Acıbuca ve Budak, 2018).

Tıbbi bitkiler içerdikleri doğal antioksidan bileşikler nedeniyle geçmişten günümüze ilaç şeklinde kullanılmıştır. Bundan ötürü bitkiler süper antioksidanlar olarak kabul edilir. Fenolik bileşikler ise doğal antioksidanların ana grubunu teşkil etmektedir (Deveci vd., 2016). Fenolik bileşikler, bitkilerde mevcut olan sekonder metabolizmanın ürünleridir. Bitkiyi zararlı etkenlere karşı korur, bitkilerde üreme, büyüme, gelişme gibi esas işlevleri sağlamakla birlikte bitkiye kendine has tat ve renk gibi özelliklerinin belirlenmesinde etkindir (Konak vd., 2017). Ayrıca bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşenler olup bitki florasında 8.000'den fazla fenolik bileşiğin bulunduğu ortaya çıkmıştır (Alara vd., 2021). Bitkilerin bazı kısımlarında (kök, gövde, meyve, sebze, kuruyemiş, tohum vb.) farklı miktarlarda bulunan ve aynı zamanda doğal yollarla sentezi olan maddelerdir (Ceylan vd., 2017). Fenolik maddeler antienflamatuar, antipatojenik, antiviral, antialerjik, antitrombotik, antimikrobiyal gibi çeşitli özellikleri nedeniyle insan sağlığı için kullanılırlar (Jahromi, 2019).

Fenolik maddeler yapı bakımından ve içerdikleri halka şekline göre isimlendirilirler ve flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere 5 ana grupta yer alırlar (Eylem ve Uslu, 2018). Fenolik bileşiklerin sergilediği antikanser özellikler, kanserin yayılımını önlemeye yönelik çoklu mekanizmalarla çalışılmış olduğu pek çok makalede kayda geçmiştir (Huang vd., 2009; Neergheen vd., 2010). Bitkileri kullanarak doğal antibiyotik elde etmek ve geliştirmek de mümkündür. Geliştirilen bu antibiyotiklerin canlı organizmalar üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etkilere sebebiyet verdiği gözlemlenmiş ve rapor edilmiştir (Salehi vd., 2019; Oses vd., 2016).

Tıbbi bitkilerin endüstriyel açıdan ele alınması farklı metotlar kullanılarak aktif bileşenlerinin ekstrakte edilmesiyle başlar (Aytaç, 2016). Bu tez çalışması kapsamında da Brassicaceae familyasına ait *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. (yabani roka)'nın toprak üstü kısımlarına ait farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlarının antikanser ve antimikrobiyal aktivite potansiyelinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

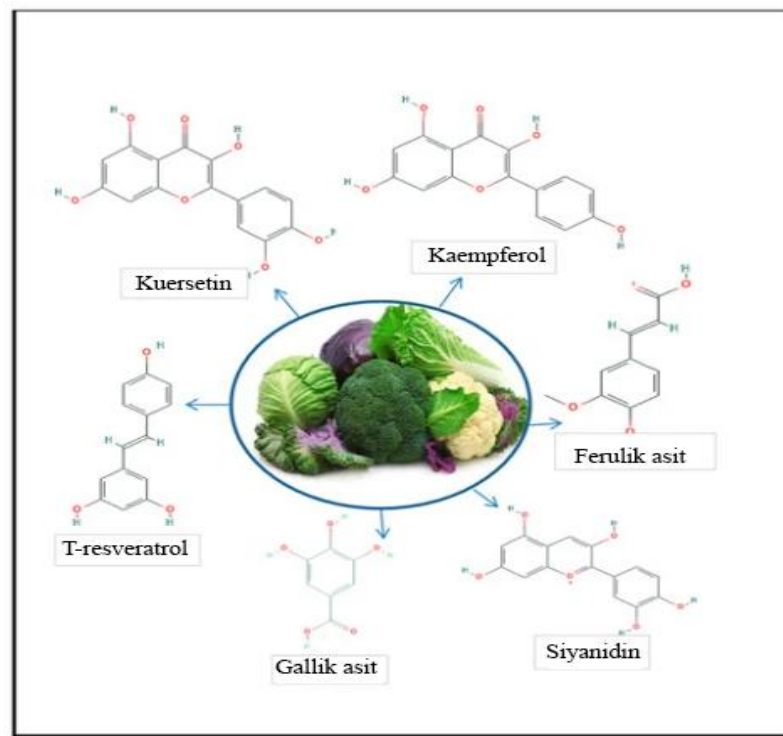
1.1 Brassicaceae Ailesi Hakkında Genel Bilgiler

Cruciferae veya hardal ailesi olarak da bilinen model bitki familyası Brassicaceae, toplamda 338 ila 360 cins ve yaklaşık 3.709 türden oluşur. 10-19 taksondan oluşan Brassicaceae, Brassicales takımına ait en büyük çiçekli (anjiospermik) kapalı tohumlu dikot familyalarından biridir (Anjum vd., 2012; Raza vd., 2020). Dünya çapında yaygın bir dağılım gösterir ve Antarktika haricindeki kıtalarda da bulunur (Ramirez vd., 2020). Türkiye’de ise Brassicaceae ailesine mensup 88 cins ve 539 tür bulunmaktadır. Bunlardan 210 tanesi endemik türdür (Erik ve Tarıkahya, 2004). Bu aile, ekonomik bakımdan önem arz eden pek çok yenilebilir ve endüstriyel yağlı tohum, sebze, baharat ve yem bitkisini içerir (Warwick, 2011). Bu mahsullerin yanı sıra su teresi, turp, yaban turpu ve roka gibi yetiştirilen birçok tür bulunmaktadır. 21. yüzyıl tarımında, özellikle biyoaktif kimyasalların kaynağı olarak kullanım açısından önemli potansiyele sahip birçok başka türler de mevcuttur (Bancroft, 2011).

Brassicaceae ailesi bir, iki ya da çok yıllık otsu bitkiler, yarı çalı, çalı veya nadiren küçük ağaçlardan oluşur. Birçoğu otsu form ve biraz çalimsı formlardan oluşan kozmopolit bir familyadır. En iyi bilinen anatomik özellikleri arasında Brassicaceae’de fazlasıyla bulunan mirosin içeren salgı hücreleri bulunur. Fakat sayıları çevre koşullarına ve beslenme ihtiyaçlarına göre farklılık gösterir. Bu salgı dokusu bitkinin her yerinde ve neredeyse her dokusunda meydana gelmektedir. Çiçeklerinin yumurtalığın üst konumda olduğu görülürü hermafrodittir. Her iki tarafı simetrik ve nadiren zigomorfiktir. Sepaller 4, kiremitli (imbrikat) ve genellikle serbesttir. Petaller çoğu zaman 4 olmakla birlikte kısmen eksik olabilir. Tohumlar neredeyse albümin içermez, kanatlı veya kanatsız olabilirler. Gövdesi dairesel bir yapıya sahiptir, epidermis tek sıralı oval ya da yuvarlak hücrelerden oluşur. Yaprakları ise orta damarı ve damarlar arası bölgelerden meydana gelmektedir. Epidermiste tüy yapısıyla karşılaşılmamıştır (URL-1, 2024).

Bu bitki ailesinin en şaşırtıcı özelliklerinden biri, sadece aileye has değil bununla birlikte türüne ve cinsine özgü ikincil metabolitlerin ve biyoaktif bileşenlerin varlığıdır (Ramirez vd., 2020; Raza vd., 2020). En kapsamlı şekilde incelenenler glukozinolatlar (GSL) ve bunların parçalanma ürünleri, izotiyosiyanat ve indollerdir. İzotiyosiyanatlar

(ITC'ler), en iyi bilinen bileşiklerdir ve keskin tatlarından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Fenolik bileşikler, karotenoidler ve burada araştırılan tokoferoller, terpenler, fitosteroidler ve fitoaleksiner gibi daha az çalışılan diğer bileşik gruplarının eşsiz profillerine sahiptir. Brassicaceae familyasına ait sebzelerde bulunan ana fenolik bileşikler; flavonoidler ve hidroksisinnamik asitlerdir. Flavonoidlerin en önemli grubu flavonollerdir. Hidroksisinnamik asit grubu ise C6-C3 yapısı ile karakterizedir ve serbest olarak veya şekerler ya da diğer asitlerle konjugedir. Bu türün en yaygın olanları p-kumarik asit, sinapik asit, ferulik asit ve kafeik asittir (Şekil 1.1). Fakat bunlar bitkinin türüne bağlı olarak önemli ölçüde değişir. Örnek olarak, rokanın içerisinde bulunan en birincil hidroksisinnamik asit, sinapik asittir. Fakat kırmızı kiraz ve daikon turpu sinapik asit içermez. Bir diğer örnek ise kırmızı lahanada bulunan ana hidroksisinnamik asidi simgeleyen ama roka ve turp yapraklarında bulunmayan ferulik asittir. Bu sebeplerden ötürü Brassica'yı fitokimyasal içeriği, gıdaların beslenme kalitesini artıran en iyi doğal ürün haline getirir ve giderek artan bir ilgi görmektedir (Ramirez vd., 2020). Çeşitli araştırmalar, Brassicaceae'da bulunan fitokimyasalların bazı hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesindeki potansiyel rolünü göstermiştir (Durazzo vd., 2013).



Şekil 1. 1 Brassicaceae familyasında bulunan fenolik bileşikler (Ramirez vd., 2020).

1.2 *Diplotaxis tenuifolia* Türü

Diplotaxis tenuifolia (L.) “yabani roket” ya da “roka” olarak bilinen Brassicaceae familyasına mensup kozmopolit bir dağılım gösteren çok yıllık otsu bir bitki türüdür (Caruso vd., 2018). Ülkemizde ise “yabani roka” ya da “türpenk” olarak adlandırılmaktadır. Tür ismini, meyvesinde bulunan her lokusta ikişer sıralı halinde bulunan tohum dizilişinden almaktadır. Ruderal bir bitki türüdür. Yerleşim yerlerinin etrafındaki boş kısımlarda ve etkili yüksek zeminlerde yabancı olarak yetişir (Sadık, 2012). Akdeniz ve Batı Asya’da yayılım gösterir (Caruso vd., 2018). Kendine has kokusu ve lezzeti ile hazır salataların vazgeçilmez bir ögesi olmuştur. Dolayısıyla gıda sanayisinde önemli bir yere sahiptir. Bundan ötürü de bitkinin son zamanlarda ağırlıklı olarak İtalya ve birçok ülkede ticari olmak üzere yetiştirildiği anlamına gelmektedir (Bell ve Wagstaff, 2019; Caruso vd., 2019). 1,8–2,2 m genişliğindeki yataklarda politünellerin altında hassas ekim makineleri ile ekilir, sprinkler ile gübrelenir ve tam yaprak gelişiminde mekanik olarak kesilir (Pane, 2021). Geleneksel olarak spontan bir bitki olarak hasat edilir (Caruso vd., 2018). Hasat edilen ürün hızla soğuk zincire girer, yıkama, silme ve torbalama ile minimum düzeyde işlenir ve çeşitli ülkelerde perakende ağlar aracılığıyla yemeye hazır olarak dağıtılır (Pane, 2021).

D. tenuifolia bitkisinin sinonimleri şu şekildedir (URL-2, 2023):

- *Arabis sylvestris* Scop.
- *Diplotaxis kovacsiae* Penzes
- *Eruca perennis* Mill.
- *Sisymbrium acre* Lam.
- *Sisymbrium tenuifolium* L



Şekil 1. 2 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. bitkisinin görseli (URL-3 ve URL-4, 2024)

1.2.1 *D. tenuifolia* Türünün Fiziksel Özellikleri

D. tenuifolia bitkisinin boyu çoğunlukla 70 cm'ye kadar büyüebilmektedir. Gövdesi diktir. Tüysüz veya birkaç tüylü, basit ya da çok dallara sahiptir. Tabanındaki yaprakları 10 cm uzunluğunda, dikdörtgensi, şeritsi veya kaşıkı formlarında bulunur, kenarları ise düz, biraz fazla loblu veya hafif teleksi yapıdadır. Saplı ve ezildiğinde keskin, güçlü bir kokuya sahiptir. Çanak yaprakları çıplak veya havlıdır. Taç yaprakları sarıdır ve ovaldir. Meyvesi genel itibarıyla dik veya nadir olarak yükselidir. Tohumlar ise pürüzsüz forma sahip soluk kahverengi renklidir (URL-4, 2024).

1.2.2 *D. tenuifolia* Türünün Fitokimyasal İçeriği

Yabani roka yaprakları, lezzetinin dışında sağlığa yararlı, değerli besin maddeleri içermesi nedeniyle de öne çıkmaktadır. Yaprakları glikozinolatlar, C vitamini ve flavonoidler gibi bazı antioksidan bileşiklerin içeriğiyle ilgili olarak kayda değer beslenme özelliklerine sahiptir. Glikozinolatlar, kimyasal yapıdaki varyasyona bağlı olarak yaklaşık 130 bileşikten oluşan, Brassicaceae familyasına özgü bir ikincil metabolit sınıfıdır. Özellikle, dimerik glukosativin ve progoitrin/epiprogoitrin gibi bileşiklerin, tüketiciler tarafından iyi kabul edilen roka salatasının özel tadının tanımlanmasında da önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çok yıllık bu bitkinin yaprakları, içeriğindeki glikozinolatlardan kaynaklanan acı ya da keskin bir tat ve uçucu izotiyosiyanatların salınımına bağlı olarak güçlü bir buruk aroma ile karakterize

edilir. Glikozinolatların içeriğindeki yüksek değişkenlik ile yabancı rokanın kuru ağırlığının 0,76-3,03 g kg⁻¹ kadarını oluşturur (Caruso vd., 2018). Kendisine has kokusu ve tadından glukosativin ve onun hidroliz ürünleri sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca rokanın ana bileşenleri glukosativin, DMP, glukorafanın ve glukoesindir. Bunlara genel olarak glukosinolat ismi verilmektedir. Bunların dışında glukolisin, progoitrin, 4-hidroksiglukobrassisin, diglukotiyobinin, glukorokolamin ve 4-metoksiglukobrassisin gibi daha az yoğun miktarlarda bulunan glikosinolatlar bulunmaktadır (Bell ve Wagstaff, 2019). Yabancı rokada tanımlanan glikozinolat bileşikler Tablo 1.1’de verilmiştir. Ayrıca yabancı rokanın glikozinolat miktarının bitkinin genetik özelliklerine ve hasat zamanına bağlı olarak değişebileceği de rapor edilmiştir. Bilhassa glukoesin ve glukorafanın bileşiklerinin tekrarlayan hasat dönemi sonrasında daha yüksek seviyelere ulaştığı kaynaklarda belirtilmiştir (Caruso vd., 2019). Ek olarak yabancı rokanın kökleri hariç tüm dokularında çekirdek ağıkonu izorhamnetin, kaempferol veya kersetin olan poliglikosillenmiş flavonoidler içerdęi de bildirilmiştir (Caruso vd., 2018).

Birçok farklı çalışmada yabancı roka bitkisinde tanımlanan bu maddelerin antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar gibi türlü biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin; glukorafanın’ın hidroliz ürünü olan sülforafanın kansere karşı kemoprevensiyon sağladığı rapor edilmiştir (Zhang vd., 1992). Bir diğer çalışmada, askorbik asit, flavonoidler, karotenoidler ve lutein gibi ksantofiller ile antioksidan özellikler verdiği bildirilmiştir (Caruso vd., 2018). Fitoaleksinin olarak adlandırılan arvelexinin kolon üzerine antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu da başka bir çalışmada ifade edilmiştir (Cho vd., 2012). Bu bağlamda, beslenme uzmanları tarafından kardiyovasküler ve kanser hastalıklarını önlemeye yardımcı olarak roka yaprakları içeren diyetler önerilmektedir (Caruso vd., 2018). Hatta Akdeniz ve Batı Asya bölgelerindeki yerli halk tarafından kocakarı ilacı olarak da kullanıldığı kayıtlara geçmiştir (Caruso vd., 2019). Antiflojistik, büzücü (astringent), depuratif (depurative), diüretik, dijestif, yumuşatıcı (emollient), tonik, stimulant, laksatif ve kızartıcı (rubefacient) olarak kullanıldığı bilinmektedir (Durazzo vd., 2013). Geleneksel tıbbın da kabul ettiği sağlığa yararlı etkilerine dayalı olarak tüketimi teşvik edilmektedir (Caruso vd., 2018).

Tablo 1. 1 Yabani rokada rapor edilen glikozinolat bileşikleri (Caruso vd., 2018).

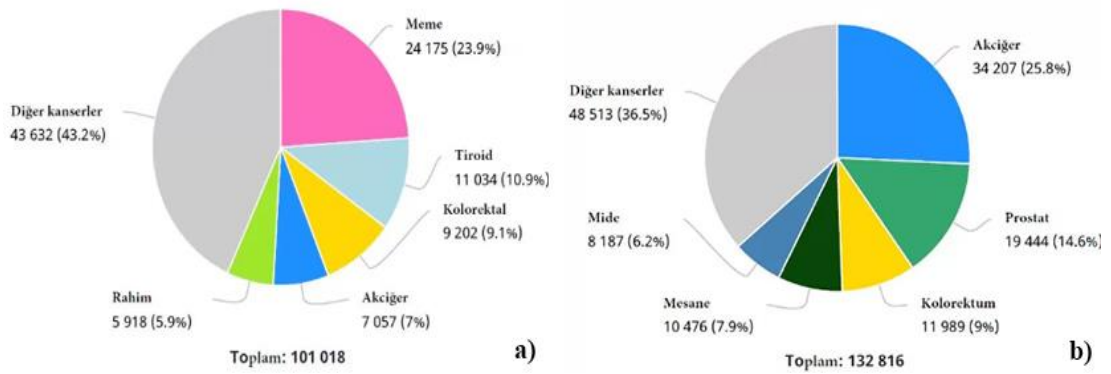
Diglukotiyobeinin	Glukoiberberin	Glukotropeolin
Glukoalisin	Glukolepidin	Glukozativin
Glukoarmoracialafolicin	Glukonapin	Neoglukobrassisin
Glukobrassikanapin	Glukonasturtin	Progoitrin/epiprogoitrin
Glukobrassisin	Glukoputranjivin	Sinalbin, glukozinalbin
Glukoerusin	Glukorafanin	Sinigrin
Glukoibarin	Glukorafenin	

1.3 Kanser

Dünya genelinde ölüm nedenlerinin başında gelen hastalıklardan biri kanserdir. 2022 yılında dünya çapında kanser teşhisi konulan kişi sayısı tahmini olarak 20 milyondur. Kanser sebebiyle hayatını kaybeden kişi sayısı ise yaklaşık olarak 9,7 milyondur ve neredeyse altı ölümden birine neden olmaktadır (GCO, 2024; WHO, 2023). Akciğer, meme, kolon, rektum ve prostat kanserleri sıklıkla gözlemlenen kanser türleridir. Türkiye'de ise sıkça rastlanılan ilk beş kanser türü 100 binde görülme sıklığıyla akciğer (30,13), prostat (24,33), deri (18,91), meme (17,96), mide (9,92) kanser çeşitleridir. Erkeklerde kanser görülme sıklığı, kadınlardaki kanser görülme sıklığındaki artış oranını geçmektedir. Bu fark temel olarak erkeklerde çok daha yüksek rastlanan akciğer kanseri vakasından kaynaklanmaktadır. Tütün kullanımı kanserli ölümlerin yaklaşık olarak üçte birini oluştururken diğer risk faktörleri alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, yüksek vücut kitle indeksi, fiziksel aktivite eksikliği ve hava kirliliği gibi etmenlerdir. Kanser, bedenin herhangi bir kısmını etkileyen çok yaygın bir grup hastalık için ifade edilen bir terimin adıdır. Kullanılan başka diğer terimler ise kötü huylu tümörler ve neoplazmlardır (WHO, 2023; Yılmaz vd., 2011). Nesiller boyunca “kansere neyin sebep olduğu” sorusu insanların akıllarında soru işareti olarak kalmıştır. Birçok kanserin kalıtsal sebeplerden ziyade çevrenin etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Blackadar, 2016).

Normal hücreler kendi döngüleri içerisinde belirli bir boyuta ulaştığında büyümeyi durdurur ve homeostaziyi korurlar. Ancak kanser hücreleri için bu durum farklıdır. Mekanizmanın çalışabilmesi için zorunlu olan büyüme faktörleri bozulur hale gelir ve

büyümeyi durdurucu unsurlar reseptörlere bağlanamaz. Bunun sonucunda hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüme gösterirler. Devamlı büyüyerek artan kanser hücreleri vücutta ilerleme kaydederek metastaz yaparlar (Dongre vd., 2021). Kanser hücreleri kötü huylu (malign) ve iyi huylu (benign) olarak iki çeşit tümöre sebebiyet verirler. Kötü huylu tümörler kansere neden olup bulunmuş olduğu dokudan farklı bir dokuya yayılım gösterir ve tedavi için kemoterapi, biyolojik terapi, hormon tedavisi, immünoterapi gibi farklı tedavi metotları uygulanmaktadır. İyi huylu timörler ise bulunduğu dokuda kalıp vücuda yayılım göstermezler. Bu sebeple cerrahi bir müdahale ile alınabilir ya da hedefe yönelik tedaviler ile vücuttan uzaklaştırılabilirler (Yalameha, 2018). Kanserler, ortaya çıktıkları hücre tipine göre karsinomlar, sarkomlar, lösemiler ve lenfomalar gibi sınıflara ayrılabilir. Epitelyal hücrelerin maligniteleri, meme, kolon, akciğer, pankreas ve prostat kanserlerini içeren tüm insan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar olarak bilinmektedir. Sarkomlar kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokulardan başlayan kanser türüdür ve insanlarda oldukça nadirdir. Kan yapıcı hücrelerden ve bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanan kanserler sırasıyla lösemi ve lenfoma olarak bilinir ve insan malignitelerinin yaklaşık %8'ini oluşturur (Roy vd., 2017). Türkiye'de kadın ve erkeklerde görülen kanser oranları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 3 Ülkemizde a) kadınlarda ve b) erkeklerde görülen kanser insidansı (URL-5, 2024)

1.3.1 Prostat Kanseri

Prostat kanserinin halihazırda görülme oranı ve mortalitesi, erkeklerde teşhis edilen kanserler arasında ikinci sıradadır. Dünya genelinde ise ölüme neden olan beşinci hastalık olması sebebiyle önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (Ergul vd.,

2021). Prostat salgı bezi, erkeklerdeki sperm menisinin bir kısmını üretir ve aynı zamanda idrar kontrolünü sağlamakla görevlidir. Rektumun önünde ve mesanenin altında yer alır. Prostat kanseri ise bu bezin deforme olan hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üremesiyle oluşur. Prostat kanserinin nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Sinsi bir şekilde ilerlediği için de herhangi bir belirti göstermez. Bilim insanları bu konuda araştırmalarına devam etmektedirler (WHO, 2023). Mortaliteyi en aza indiren cerrahi yöntem, hormon tedavisi, radyoterapi gibi tedavi yöntemleriyle prostat kanserinin tedavisindeki son gelişmelere rağmen, önde gelen kanser araştırma alanlarından biri olmaya devam etmektedir (Ergul vd., 2021).

1.3.1.1 PC-3 hücre hattı

PC3 hücre hattı, 1979 yılında 4. derece prostat adenokarsinomu olan 62 yaşındaki bir erkek hastadan elde edilmiştir. Bu hücreler, hastanın kemik metastazından izole edilmiş ve ileri evre prostat kanseri araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Costa vd., 2018; Kaighn vd., 1979). İlerlemiş prostat kanseri kötü prognozla ilişkilidir. Ayrıca PC-3 kanser hücre hatlarının ve metastazlarının daha önce bildirilmemiş olan uPA (spesifik hücre yüzeyi reseptörü) 'yı yüksek oranda eksprese eder. PC-3 kanser hücreleri metastatik bir hücre dizisidir (Liv vd., 2002). Prostat kanserinde sıkça görülen genetik mutasyonları içerir. Örneğin, PTEN geninin kaybı ve TP53 geninde mutasyonlar yaygındır. Bu değişiklikler, hücrelerin kontrolsüz büyüme ve metastaz yapma kabiliyetini artırır (van Bokhoven vd., 2001). PC-3 hücreleri fibroblast benzeri bir morfolojiye sahiptir ve genellikle yapışkan (adherent) bir büyüme modeli gösterirler. Bu hücre hattı, ileri evre prostat kanserini modellemek için uygun olup, yüksek invazyon potansiyeline sahiptir (ATCC, 2023).

1.3.2 Meme Kanseri

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda sıkça görülen ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda kanserden ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir (Trayes ve Cokenakes, 2021). Dünya çapında kadınlarda görülen yeni kanser vakalarının %25'ini oluşturur. %1 oranından azı da erkeklerde görülür. Bununla birlikte nadiren görülmesinden ötürü erkek meme kanseri rapora dahil edilmemiştir. Klinik ve

etiyojik olarak son derece heterojen bir kanser tipidir. İlk olarak hormonlarla bağlantılı olmak üzere birçok riski içinde barındıran bu meme kanseri alt tipine göre değişkenlik gösterir (Houghton ve Hankinson, 2021). Biyolojik alt tipler beş farklı sınıfa ayrılırlar. Bunlar, HER2, luminal A, luminal B, normal benzeri ve bazal benzeri meme kanseridir. Klinik araştırma laboratuvarlarında moleküler analizler sonucunda ortaya çıkmıştır (Barnard vd. 2015). Meme kanseri riskini belirlemek için risk değerlendirme araçları kullanılır ve yüksek risk altındaki hastalar risk azaltıcı ilaçlara aday olabilirler. İlaç seçimi menopoz durumuna göre değişmektedir. Meme kanseri tedavisi evreye bağlıdır (Trayes ve Cokenakes, 2021). Son yıllarda tarama mamografisinin kullanıma girmesi ve tedavilerin iyileştirilmesiyle hayatta kalma oranları artmıştır (Houghton ve Hankinson, 2021).

Meme, yapısal olarak farklılaşan ve kadınlarda süt üretiminde görevli olan bir çeşit ter bezidir. Dokusu kişiden kişiye değişir ve yaş, ırk, genetik faktörler, hamilelik ve menopoz gibi faktörlere bağlıdır (Sun vd., 2017). Memedeki meme bezlerini ve kanallarını oluşturan hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalarak meme kanserini meydana getirir. Bunun nedenleri arasında başta epigenetik ve genetik faktörler yer almaktadır (Byler vd., 2014; Sung vd., 2021). Memenin farklı kısımlarında meme kanseri gelişebilir. Çoğu meme kanseri süt kanallarında başlar ve daha sonra areolaya yayılır (Lewis vd., 2017).

1.3.2.1 MDA-MB-231 hücre hattı

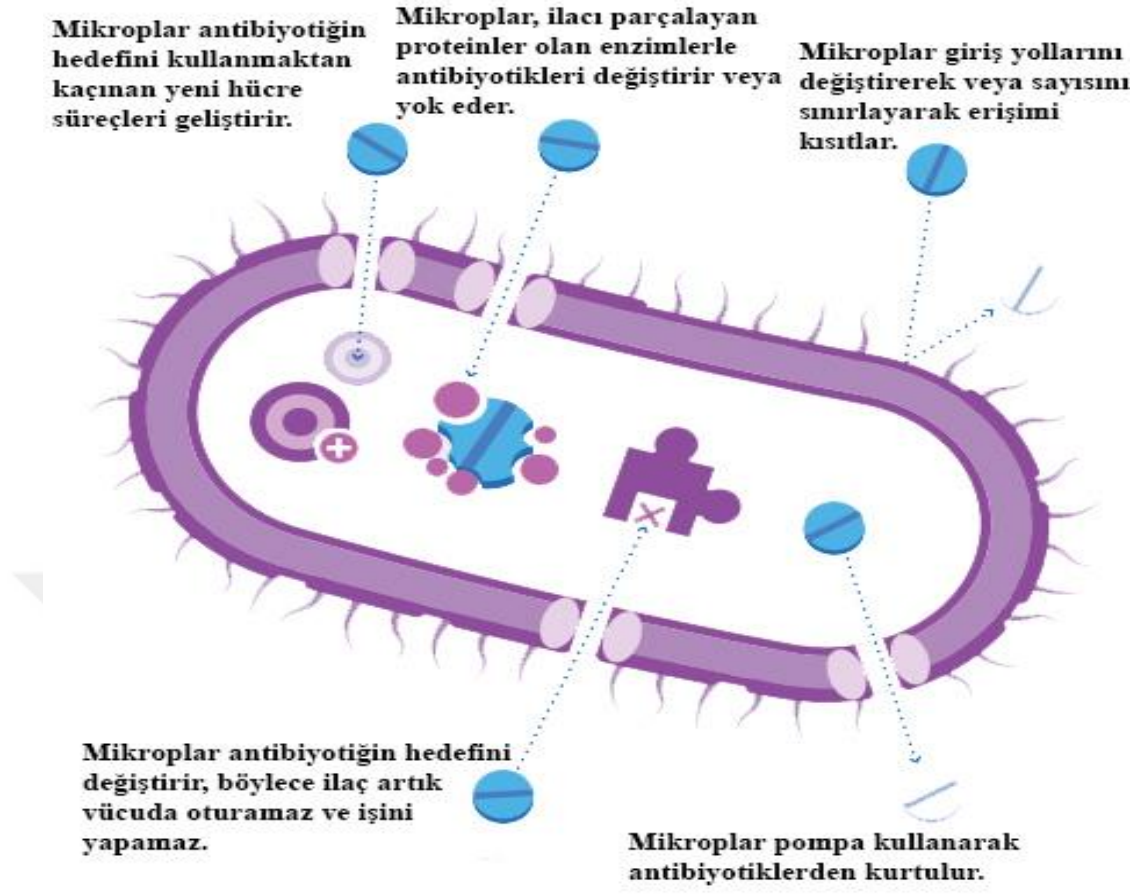
MDA-MB-231, metastatik meme kanserine sahip 51 yaşında olan bir kadın hastanın plevral sıvısından elde edilmiştir. Bazal benzeri meme kanseri hücre hatlarından bir tanesidir. Östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü (HER2) reseptöründen yoksundur. Fazlasıyla saldırgan, zayıf farklılaşmış ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre dizisidir. p53 adında bir tümör proteinini eksprese eder (EACC, 2017; Welsh, 2013). TNBC, tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. Genellikle yüksek dereceli invaziv duktal karsinomdur. Çoğunlukla uzak metastazla birlikte erken nüks oranı daha yüksektir. Diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla daha kötü prognozla bağlantılıdır (Vagia vd., 2020).

1.4 Antimikrobiyal Aktivite

Antibiyotikler, bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede kullanılan kematerapötik ilaçlardır. Etkilerini hedef bakterileri öldürerek (bakterisidal) veya üremelerini engelleyerek (bakteriyostatik) gösterirler. Ancak aşırı ve yanlış kullanılmaları dirençli bakteri soylarının yaygınlaşmasına ve mevcut antibiyotiklerin yetersiz kalmasına neden olmuştur. Antibiyotik direnci, bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını kaybetmeleri durumudur. Diğer bir ifadeyle bakterilerin kendilerini öldürmek için tasarlanan ilaçları yenme yeteneğidir. Bakteriler doğal veya kazanılmış mekanizmalar ile antibiyotiklere direnç kazanabilir. Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirme mekanizmaları Şekil 1.4'te özetlenmiştir.

Antibiyotik direnci, çağımızın önemli sağlık sorunlarından biridir. Antibiyotikler hayatı tehdit eden enfeksiyonlarla mücadelede en güçlü araçlarımızdan biridir. Ancak antibiyotiklere dirençli bakteri soylarının yaygınlaşması, günümüzde enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede tıp dünyasını zor duruma düşürmektedir. Bu tehdidin üstesinden gelmek için enfeksiyonların ortaya çıkmasını engellemek adına hijyen kurallarına riayet edilmesi, gelişigüzel antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi ve doğru antibiyotik kullanım politikalarının geliştirilip sürdürülmesi gerekmektedir (CDC, 2019).

Günümüzde, giderek artan antibiyotik direncinin yanı sıra keşfedilen antibiyotik sayısındaki azalma yeni antibiyotiklerin bulunması veya etkin antibakteriyel ajanların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bundan dolayı bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklı doğal antimikrobiyal ajanlar üzerine çalışmaların büyük bir titizlikle sürdüğü görülmektedir. *In vitro* antimikrobiyal aktivite deneylerinde disk difüzyon, agar kuyucuk difüzyon, sıvı mikro/makrodilüsyon testleri gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Balouiri vd. 2016).



Şekil 1. 4 Antibiyotik direnç mekanizması (CDC, 2019)

1.5 Viyolisin İnhibisyon Mekanizması

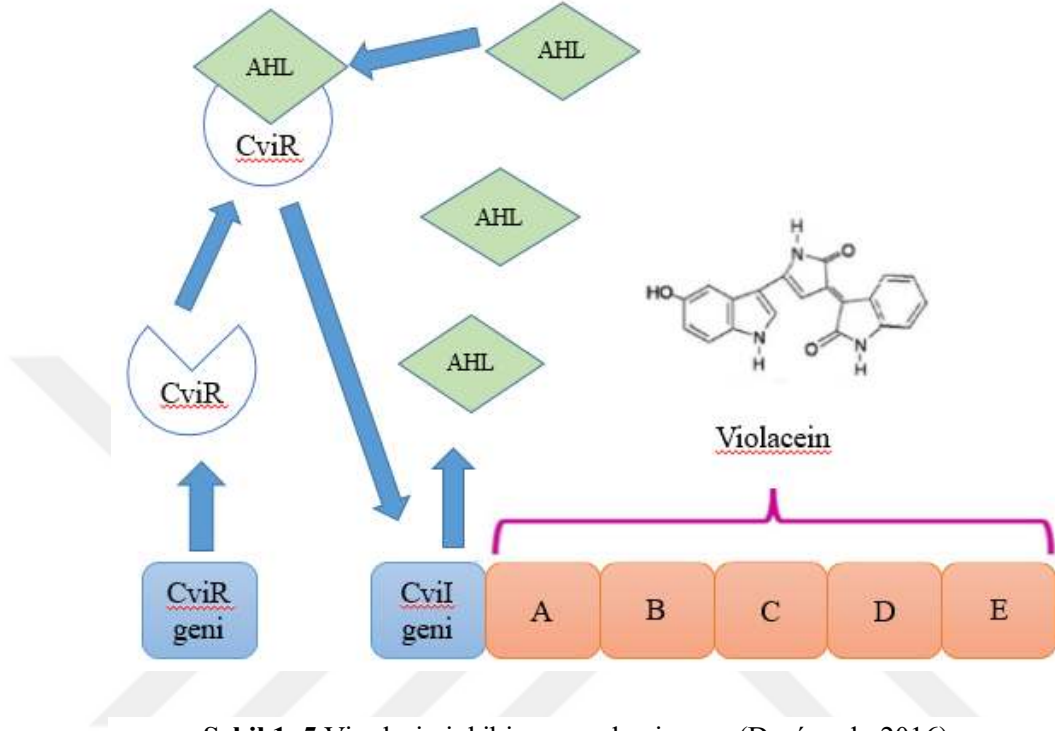
Quorum sensing (QS), bakterilerin bir dizi sinyal moleküllerini kullanarak birbirleriyle iletişim kurduğu ve popülasyondaki yoğunluğuna bağlı olarak kolektif fizyolojik ve fenotipik özellikler gösterdiği bir tür iletişim aracıdır (Zhou vd., 2020). Bakteriler, sinyal molekülleri ile popülasyonlarındaki hücre miktarını algılayabilirler. Bu algılara yönelik kendine ait gen ekspresyonunu düzenleyerek türe özgü davranışlar gösterebilirler (Henke ve Bassler, 2004). Bu sinyal moleküllerinin her bir hücre için çeşitli kimyasal bileşenleri mevcuttur. Gram pozitif bakteriler sinyal molekülü olarak çeşitli oligopeptidleri kullanır, Gram negatif bakteriler ise farklı karbon uzunluğuna sahip N-açıl-homoserin lakton (AHL veya HSL) sinyal moleküllerini kullanır (Bassler, 1999; Schauder ve Bassler, 2001). QS sistemi, Gram-negatif bakterilerde LuxI/LuxR homologu ile regüle edilmektedir. LuxI tarafından sentezlenen AHL sinyal molekülleri hücre dışına salınır. Ortamda belli yoğunluğa ulaşan sinyal molekülü çevredeki hücrelere pasif difüzyonla girer ve LuxR reseptörüne bağlanır. Reseptör-

sinyal kompleksi transkripsiyon aktivatörü olarak rol oynar ve buna bağlı olarak çeşitli genlerin (virülans genleri, pigment üretimi, biyofilm oluşumu, sporulasyon vs.) transkripsiyonunu modüle eder (McClellan vd., 1997).

Geçmişten günümüze bilim ve teknolojiye yaşanan kayda değer gelişmeler neticesinde pek çok doğal ve sentetik ilaç keşifleri yapılmıştır. Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele etmek için geliştirilen antibiyotikler, 20. yüzyılın en önemli ilaç keşifleri arasında yer almaktadır. Ancak günümüzde bilinen enfeksiyon hastalıklarının ancak üçte biri sentetik olarak üretilen antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir. Bunun nedeni antibiyotiklerin yanlış ve düzensiz kullanımı sonucu patojen bakterilerin mevcut ilaçlara karşı dirençli hale gelmesidir (Sen ve Batra, 2012). Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede antibiyotiklere tamamlayıcı veya alternatif olarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Bakterilerdeki QS mekanizmasının inhibisyonunun, bulaşıcı hastalıklarla mücadelede bilim dünyasındaki yerini güçlendireceği öngörülmektedir (Williams 2007). Literatüre bakılacak olunursa QS inhibitör özelliği taşıyan pekçok bileşiğin insan kullanımı için uygun görülmediği ifade edilmektedir. Bu nedenle etkili ve güvenilir QS inhibitörlerinin keşfedilerek literatüre kazandırılması önemlidir (Tüfekci vd., 2020).

Test edilecek maddelerin QS inhibitör aktivitesini araştırmak için yaygın bir şekilde kullanılan biyoreportör suşlar *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ve *Chromobacterium violaceum* CV026'dır. *P. aeruginosa* PAO1 suşu, 3-oxo-C12-AHL ve C4-AHL sinyali moleküllerini kullanarak enzim, toksin ve biyofilm oluşumunu regüle eder. *C. violaceum* doğada bolca mevcut olan bir Gram negatif bakteri çeşididir. *C. violaceum* ATCC 12472 suşu uzun zincirli (C10-16)-AHL bileşenlerini kullanır ve viyolasin adı verilen mavi-mor bir pigment üretir. CviI geni mutant olan *C. violaceum* CV026 suşu, sadece ekzojen olarak eklenen C4-C8 AHL'lere yanıt olarak viyolasin üretir. *C. violaceum*'da, CviR (*Chromobacterium violaceum* quorum sensing reseptörü, LuxR homologu)'in bakteri genomunda 20'den fazla promotöre bağlandığı düşünülmektedir ve bu promotörler, gen düzenlemesi, hareketlilik, koenzim sentezi, besin kullanımı ve virülans gibi çeşitli işlevleri kontrol eder. CviR'nin ligandı, CviI (LuxI homologu) tarafından üretilen bir C6-homoserin laktonudur (C6-AHL). CviR-CviI sistemi, ilk olarak *Vibrio fischeri*'de tanımlanan

LuxI-LuxR sisteminin homologudur. CviR-CviI kompleksi, *C. violaceum* tarafından sentezlenen mor bir pigment olan viyolasin pigment sentezini düzenler (Şekil 1.5) (Dimitrova vd., 2023; Kalia vd., 2015).

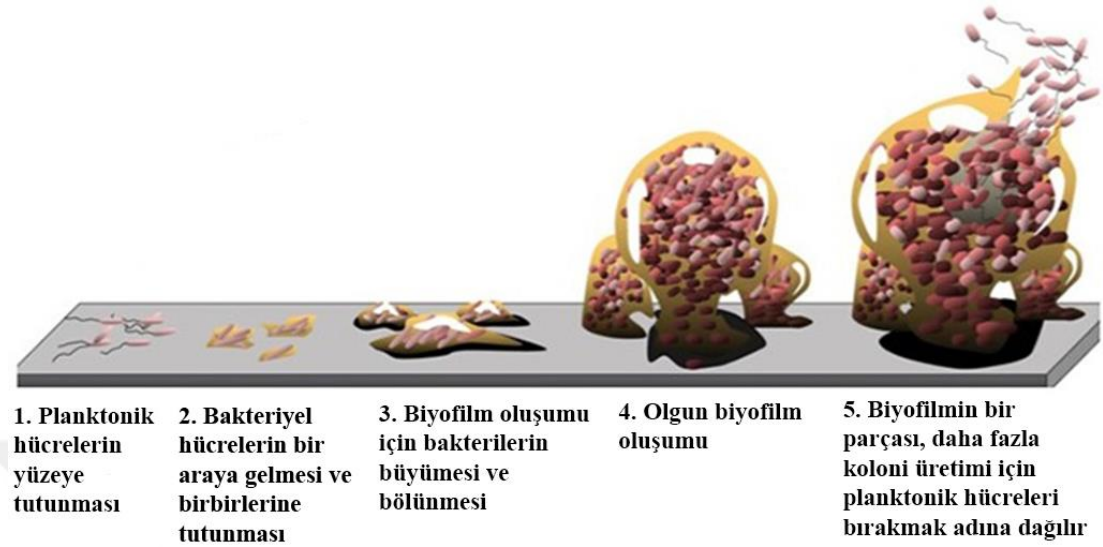


Şekil 1. 5 Viyolasin inhibisyon mekanizması (Durán vd., 2016).

1.6 Biyofilm İnhibisyon Mekanizması

Biyofilm, bakteri hücrelerinin hücre dışı polimerik madde (EPS) yapısının içine geri dönüşümsüz bir şekilde gömülerek oluşturduğu karmaşık yapılı bakteri topluluklarıdır (Abee vd., 2011; Vetrivel vd., 2021). Biyofilm yapısı ilk kez Antony van Leeuwenhoek isimli Hollandalı bilim insanı tarafından dışın yüzeyinden alınan örneklerde küçük canlıların varlığının tespit edilmesiyle keşfedilmiştir (Morrey 2013). Bu biyofilm tabakaları birçok doğal ve insan sisteminde önemli bir kolonizasyon mekanizmasını temsil eder. Bakterileri antimikrobiyal özellikli maddelerden korur ve besinlere bakterilerin ekstra erişimini sağlar (Huang vd., 2019). Biyofilm oluşumu beş aşamayı takip eder; 1) Yapıştırma aşaması, 2) Kolonizasyon aşaması, 3) Çoğalma

aşaması, 4) Olgunlaşma aşaması, 5) Dispersiyon aşaması (Yin vd., 2019). Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1. 6 Biyofilm oluşum mekanizması (Davis vd., 2010).

Biyofilm, homojen ve heterojen olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılmaktadır. Homojen biyofilm doğada nadir görülen, özdeş bakteri popülasyonlarının oluşturmuş olduğu grubu ifade eder. Heterojen biyofilm ise doğada yaygın olarak görülen, içeriğinde birden fazla bakteri türü bulunduran grubu ifade etmektedir (Flemming vd., 2016). Biyofilmlerin genel olarak %10'u bakteri hücreleri ve %90'ı matriks tabakasından oluşur (Flemming ve Wingender, 2010). EPS'ler, hücre dışı polisakkaritler, biyofilmle ilişkili proteinler (Biofilm Associated Proteins- BAP), çevresel DNA (Environmental DNA- eDNA), lipidler ve amiloid yapılar gibi çeşitli biyopolimer malzemeleri içerir. İçeriklerindeki bu yapılar nedeniyle hücre dışı şekerleri parçalayan DNase, proteaz ve enzimler biyofilm oluşumunu engeller. Beraberinde halihazırda oluşmuş biyofilm katmanlarını da dağıtır. Biyofilm oluşumu D-aminoasitler ve cis-2-dekanoik asit gibi moleküllerin ve oto-indükleyici 2 (AL-2) gibi QS sinyal molekülleri yardımı ile gerçekleştirilir (Abee vd., 2011). Biyofilm çalışmaları kapsamında sıkça kullanılan *P. aeruginosa* suşları, uygun ortamın oluşturulması durumunda canlı ve cansız yüzey kısımlarında biyofilm oluşturabilmektedir (Sauer vd., 2002; Stoodley vd., 2002).

1.7 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon (UAE) ve maserasyon (MAC) gibi farklı ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmış ekstraktlarının, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) ile prostat kanseri hücre hattı (PC-3) üzerindeki antikanser etkinliğinin araştırılması ve bazı insan patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin ve biyosensör bakteri suşlarına karşı anti-quorum sensing (anti-QS) etkilerinin incelenmesi ve böylelikle ilaç hammaddesi olma yönündeki potansiyelinin araştırılmasıdır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Literatür çalışmalarına bakıldığında *Diplotaxis tenuifolia* bitki ailesine mensup çeşitli kanser hücrelerinin sitotoksik etkisini değerlendirmek için birtakım çalışmalar yapılmıştır. Marrelli vd., (2015), *D. tenuifolia* bitkisinin yapraklarından MAC metoduyla elde edilen %70 EtOH ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonunda ve 48 saat süre içerisinde LoVo (kolorektal kanseri hücre hattı), HepG2 (karaciğer kanseri hücre hattı) ve MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesini araştırmıştır. Sonuçta ekstraktın kontrole (ekstrakt uygulanmamış) oranla hücre canlılığını inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Yalnız elde edilen IC₅₀ değerleri >100 µg/mL olduğundan dolayı sitotoksik aktivitenin pek önem arz etmediğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada bitkinin yaprak kısımlarından izole edilen polifenolik ekstraktının Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı) hücrelerinin G1 fazında kalmasını sağlayarak hücrenin çoğalmasını durdurduğu ifade edilmiştir (Durazzo vd., 2013). Radziejewska-Kubzdela ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada *D. tenuifolia* 'nın yapraklarından liyofilizasyon metoduyla elde edilen saf öz suyunun Caco-2 ve HepG2 kanser hücre hatlarının canlılık oranını %50' ye kadar azalttığı ifade edilirken, IEC-6 (normal sıçan ince bağırsak epitel hücreleri) hücrelerinin canlılık oranını %19' a kadar azalttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise bitkinin yine yaprak kısımlarından liyofilizasyon metoduyla izole edilen su-EtOH (1:1, v/v) ve kloroform-MeOH (1:1, v/v) özütlerinin sitotoksik aktivitesi CCD-18 (sağlıklı kolon fibroblast hücre hattı) ve HT-29 (kolorektal kanseri hücre hattı) hücrelerine karşı MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuç olarak kloroform-MeOH ekstraktı başta olmak üzere test edilen ekstraktların CCD-18 hücreleri üzerinde antikanser etki göstermediği, HT-29 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir. Kloroform-MeOH ekstraktının HT-29 hücrelerine karşı IC₅₀ değeri yaklaşık 200 µg/mL olarak hesaplanırken, su-EtOH ekstraktının IC₅₀ değerinin hesaplanamadığı bildirilmiştir (Ramos-Bueno vd., 2016).

Bu çalışmalardan ayrı olarak farklı *Diplotaxis* türlerinin antiproliferatif etkisini inceleyen literatür çalışmaları da mevcuttur. Mohammed vd., (2011), *D. harra* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen EtOH ekstraktının HCT116 (kolon

kanseri hücre hattı) ve HepG2, MCF-7 hücre hatlarına karşı antikanser aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Jdir vd. (2016) ve Nasri vd. (2017) çalışmalarında sırasıyla *D. simplex* ve *D. harra*'nın çiçek kısımlarından elde edilen etil asetat (EA), EtOH ve MeOH ekstraktlarının Caco-2 hücre hattına karşı sitotoksik aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada ise *D. harra* bitkisinin tüm kısımlarından izole edilen %70 MeOH, kloroform ve yağdan arındırılmış sulu MeOH ekstraktlarının LX-1, colon 38 (fare kolon kanser hücre hattı) ve P388 (fare lösemi hücre hattı) hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Kassem vd., 2013).

Literatür çalışmalarına bakıldığında *D. tenuifolia* bitkisinin antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Rodriguez vd., (2006), *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından buhar distilasyon metodu ile izole edilmiş ekstraktların antimikrobiyal etkinliğini farklı fitopatojen küflere karşı araştırmışlar ve neticesinde ekstraktların *Penicillium* türleri ile *Phytophthora infestans* türüne karşı orta düzeyde antifungal etki gösterdiğini ifade etmişlerdir. Moghaddam ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise *D. tenuifolia*'nın yapraklarından elde edilen MeOH ekstraktının antimikrobiyal etkinliği referans suşları olan *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Sonucunda *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal etki saptanmamıştır. Fakat *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal etki gözlemlenmiş ve 10-13 mm aralığında inhibisyon zon çaplarını tespit etmişlerdir. Bu suşlara karşı minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini sırasıyla 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL olarak rapor etmişlerdir.

Diplotaxis türlerinin biyokimyasal içeriklerini araştıran farklı literatür çalışmaları da bulunmaktadır. Örnek olarak bir çalışmada *D. harra* bitki türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstraktlarının isorhamnetin 3-glukosil-4'-ramnosid, isorhamnetin 3-o-β-glukosid flavonoid, isorhamnetin 3- ramnosid, isorhamnetin 3-o-rutinosid ve kuersetin bileşiklerini içerdiğini ifade etmişlerdir (Atta vd., 2011). Bir diğer çalışmada *D. harra* ve *D. simplex* bitki türlerinin çiçek kısımlarının yüksek oranda polifenolik bileşikler içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca HPLC analizi sonucunda her iki türde de temel fenolik maddenin kafeik asit olduğunu tespit

etmişlerdir. Sinapik asidin sadece *D. harra* türünde, 3,4-dimetoksibenzoik ve p-kumarik asitlerin ise sadece *D. simplex* türünde bulunduğunu ifade etmişlerdir (Falleh vd., 2013). *D. tenuisiliqua* bitkisinden ekstrakte edilen tenualeksinin adı verilen bir çeşit fitoaleksinin antifungal aktiviteye sahip olduğu farklı bir çalışmada ifade edilmiştir (Pedras ve Yaya, 2014). Benzekri ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada *D. harra* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olan sülforafan adı verilen bir izotiyosiyonat bileşiğinin olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada *D. virgata* türünden izole edilen isorhamnetin 3-O-beta-L-glukopiranozid ve *D. erucoides* türünden izole edilen rhamnetin-3,3'-di-O-β-D-glukopiranozit flavonoid bileşiklerinin antibakteriyel aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Salah vd., 2015). *D. acris* türünün çiçek kısımlarından hazırlanan ve ana maddesi 5-metil sülfanil pentan nitril olan esansiyel yağları kullanarak biyosentez yolu ile üretilen altın nanopartiküllerinin Gram-negatif bakterilere karşı yüksek bir antimikrobiyal etki gösterdiği bir diğer çalışmada bildirilmiştir (Oueslati vd., 2021). Yukarıda bahsedilen bu çalışmalarda *Diplotaxis* cinsine ait türlerden elde edilen çeşitli ekstraktların bitki ve insan patojenlerini temsil eden pek çok mikroorganizmaya karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Diplotaxis tenuifolia'nın yaprakları, yüksek miktarda fenolik bileşikler, karotenoidler ve C vitamini gibi güçlü antioksidanlar içermektedir. Çeşitli çalışmalarda, bu bileşiklerin insan sağlığına yararları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Özellikle fenolik bileşikler, kalp hastalıkları ve kanser gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu etkileri ile dikkat çekmektedir. Örneğin bir çalışmada *D. tenuifolia*'nın yapraklarından elde edilen ekstraktlar üzerinde yapılan antioksidan analiz testlerinde, DPPH, ferrik indirgeyici güç (FRP), fosfomolibdenum toplam antioksidan kapasitesi (TAC) ve cuprik indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu testlerde, bitkinin antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu ve farklı melezler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlendiği rapor edilmiştir (Kilibarda vd., 2024).

Başka bir çalışmada ise su stresi ve biyostimülan uygulamalarının *D. tenuifolia*'nın biyoaktif bileşik profili ve biyolojik aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İlgili çalışmada, su stresi ve biyostimülanların, bitkideki toplam fenoller, antioksidan

aktivite ve mineral içeriği gibi çeşitli özellikleri etkilediği bulunmuştur. Bu bulgular, su yönetimi ve biyostimlan kullanımı gibi tarımsal uygulamaların, bitkinin biyoaktif bileşiklerinin miktarını artırarak sağlık yararlarını maksimize edebileceğini göstermektedir (Romano vd., 2022). *D. tenuifolia*'nın antioksidan özellikleri üzerine yapılan bu araştırmalar, bu bitkinin zengin bir antioksidan kaynağı olduğunu ve sağlık açısından önemli faydalar sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle, bu bitkinin yetiştirme koşulları ve işleme yöntemlerinin optimize edilmesi, içeriğindeki biyoaktif bileşiklerin miktarını artırarak daha fazla sağlık yararı elde edilmesine olanak tanıyabilir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan bitki materyali İstanbul ilinin Kartal ilçesinin Soğanlık mevkiinde Mayıs 2022 tarihinde toplanmıştır. Toplanan yabani roka bitkisinin toprak üstü kısımlarından ultrasonikasyon (UAE) ve maserasyon (MAC) gibi ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmış etil asetat (EA), metanol (MeOH) ve su ekstraktları kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarından EA ve MeOH ekstraktları dimetilsülfoksit (DMSO, %25-%80), su ekstraktları steril ultra saf su içerisinde çözülmüştür. Son konsantrasyon 20 mg/mL olacak şekilde ana stok konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar, ekstraktları steril etmek için 0,22 µm por çapında gözenekli steril filtrelerden geçirilmiş ve çalışmada kullanılmaya dek -20°C 'de korumaya alınmıştır.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları

Ekstraktların antibakteriyel aktiviteleri insan patojenlerini simgeleyen 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) suşuna karşı test edilmiştir. Anti-QS aktivite deneyleri için *Chromobacterium violaceum* CV026 suşu kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar, Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri suşları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Mikroorganizmalar	Suş Numarası	Gram Reaksiyonu	Morfoloji
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Gram-pozitif	Kok
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram-pozitif	Kok
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram-pozitif	Basil
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	ATCC 19002	Gram-negatif	Kokobasil
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	Gram-negatif	Basil
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram-negatif	Basil
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Gram-negatif	Basil
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram-negatif	Basil
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	Gram-negatif	Basil
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CV026	Gram-negatif	Basil
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Maya	-

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kansere Hücre Hatları

Diplotaxis tenuifolia bitki özütlerinin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitesi iki farklı hücre hattına karşı test edilmiştir. Araştırmada kullanılan bu hücre hatları; östrojen reseptörü negatif (ER-) ve yüksek derecede invaziv özellik taşıyan insan meme kanseri modelini simgeleyen MDA-MB-231 hücre hattı ve insan prostat adenokarsinomu modelini simgeleyen PC-3 hücre hattıdır. Bu hücre hatlarından MDA-MB-231 hücre hattı, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden, PC-3 hücre hattı ise Selçuk Üniversitesi Biyokimya bölümünden temin edilmiştir.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Bu deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve sarf malzemeler için Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Kansere Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı ile Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nün Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma laboratuvarının mevcut altyapısı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve sarf malzemeler Tablo 3.2 ve Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Numara	Kimyasal Adı	Üretici Firma
1	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT)	Thermo Fisher Scientific
2	Bakteriyolojik Agar (%0,5)	-
3	Dimetilsülfoksit (DMSO)	Rjedel-de Haen
4	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
5	Etanol (EtOH)	-
6	Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
7	Flukonazol 25 µg/disk	Oxoid (T1806B)
8	Fosfat Tampolu Tuz Çözeltisi (PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
9	İnsülin (0,01 mg/ml)	Pan Biotech
10	Kristal viyole	Merck/ Germany
11	Levofloksasin 5 µg/disk	Oxoid (CT1587B)
12	Luria Bertani broth (LB)	NZYTech, Lisbon, Portugal
13	Mueller Hinton agar (MHA)	Merck
14	Mueller Hinton broth (MHB)	Merck
15	Non-Esansiyel Amino Asit (NEAA)	Pan Biotech
16	Nutrient agar (NA)	Merck
17	Penisilin/Streptomisin karışımı (%0,1)	Thermo Fisher
18	Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (%4)	Merck
19	Serum Fizyolojik Çözeltisi(Sodyum klorür)	-
20	Trypsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific

Tablo 3. 3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Numara	Cihaz Adı	Marka/Model
1	-20 / +4 °C Buzdolabı	Arçelik / 4552
2	50 mL ve 15 mL Falkon Tüpler	Isolab, Kirgen, CAPP
3	-80 Derin dondurucu	Nuaire / Glacier-Nu 9668E
4	96 Kuyucuklu Mikropleytlar	Techno Plastic Products
5	Buz Makinesi	Hoshizaki / Scotsman
6	CO ₂ İnkübatörü	Nüve / EC160
7	Çalkalamalı Kuru Blok Isıtıcı	Biosan / TSH-100
8	Çekerocak	Tezsan
9	Eppendorf Tüpler (Cryotüp)	Isolab
10	Faz Kontrast Görüntüleme Sistemli Kameralı Ters Mikroskop	Leica / DMi1
11	Hassas Terazı	Precise / XP220A
12	Hücre Sıyırıcı	Techno Plastic Products

Tablo 3.3 devamı

13	Isı Kontrollü İnkübatör	Thermo
14	Kimyasal Saklama Dolabı	Tezsan
15	Masaüstü Santrifüj	Nüve / NF 800
16	Mcfarland Densitometer Cihazı	Biosan / DEN-1B
17	Mikropipetler (tek ve çok kanallı)	Eppendorf, Thermo, CAPP, Topscien
18	Mikrosantrifüj	Starlab
19	Otoklav	Nüve / Steam Art
20	Pamuklu Eküvyon	Cultiplast/LP Italiana spa
21	pH Gösterge Stribi	Isolab
22	Saf Su Cihazı	Human Corporation Zeneer Power
23	Serolojik Pipetler	Biologix
24	Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Tezsan / ClassII
25	Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich / MICRO 220R
26	Spektrofotometre Nano Drop	Thermo Scientific / MulscanGO UV/Vis
27	Steril Besiyeri Kapları (90mm çaplı)	Isolab
28	Tek Kullanımlık Plastik Özeler	Isolab
29	Test Kabini	Nüve / TK-252
30	Thoma Lamı	Marienfeld-Neubauer-improved
31	Ultra Saf Su Cihazı	Mpminipure / Dest-up
32	Vortex	Wise-Mix / VM-10

3.2 Yöntemler

3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Temini ve Hazırlanması

D. tenuifolia bitkisinin topraküstü kısımlarına ait ekstraktlar ultrasonikasyon ve maserasyon gibi ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmıştır. Ekstraktların eldesi Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden Prof. Dr. Gökhan ZENGİN tarafından gerçekleştirilmiştir. Toz haline getirilmiş bitkisel materyalin her biri farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maserasyon yöntemiyle bitkisel materyal, etil asetat, metanol ve su çözücüleri kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bitki materyalleri uygun çözücüler ile 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ve ardından karışım filtre edilip çözücüler döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ultrasonikasyon yönteminde ise bitkisel materyal etil asetat, metanol ve su çözücüleri ile 30 dakika ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra karışımlar süzülerek çözücüler

uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sulu karışımlar liyofilize edilmiştir. Tüm ekstraktlar analiz yapılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Bitki ekstraktları DMSO ve saf su içerisinde çözülerek son konantrasyon 20 mg/mL olacak şekilde stok konantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok konantrasyonlardan seyreltme yapılarak 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL çalışma stokları hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoklar ve çalışma stokları çalışmada kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2 Hücre Kültürü

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan *D. tenuifolia* bitkisinin topraküstü kısımlarına ait MetOH, EA ve su ekstraktlarının antikanser aktiviteleri PC-3 prostat kanseri ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerinde test edilerek araştırılmıştır. Antiproliferatif etkinin saptanması MTT (Mitokondriyal Dehidrojenaz Enzim Aktivitesi) yöntemiyle sağlanmıştır.

3.2.2.1 Hücre kültürünün sürdürülmesi

Çalışmada PC-3 ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı için, 1X Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine %10 (Fetal Bovin Serum) FBS, %1 NEAA (non-esansiyel amino asitler), %0,1 penisilin/streptomisin ve 0,01 mg/mL insülin eklenmiştir. Bu hücre besiyerleri +4°C'de saklanmıştır. PC-3 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 90 mm çapındaki hücre kültürü kaplarında 37°C ve %5 CO₂ şartlarını sağlayan bir etüv cihazında inkübasyonu sağlanmıştır. Yaklaşık 3-4 günde bir logaritmik faza ulaşınca hücreler (petrinin yüzeyini %70-80 oranında kaplayınca) pasajlanarak yeni kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler gerekli yoğunluğa geldiklerinde petri kaplarındaki besiyeri dökülmüştür. Ardından yıkama işleminin gerçekleşmesi için petri kabının içine 1 mL 1X konantrasyonundaki fosfat tampon solüsyonu (PBS) aktarılmıştır. Sonrasında petri kabının içine 1 mL 1X Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 5 dk muamele edilmiştir. Böylece petrinin yüzey kısımlarına yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından Tripsin-EDTA'nın etkisini durdurmak amacıyla petri kabı içerisine 1 mL DMEM ilave edilmiştir. Hücreler, bir hücre kazıyıcı kullanılarak petri kabından

toplanıp 15 mL'lik falkon tüpün içine aktarılmıştır. Daha sonra 2000 rpm hızda 5 dk süre tutularak santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pelet kısmı taze DMEM besiyerinden 3 mL alınarak süspanse edilmiştir. Süspanse olan hücreler 7 mL DMEM içeren 90 mm çaplı üç petri kabına aktarılmış ve petriye hücre hattı adı, pasaj numarası ve tarihi yazılarak 37°C ve %5 CO₂ koşulunu sağlayan inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.2.2 MTT ile hücre canlılığının belirlenmesi ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması

Yoğunluğu %70-80 oranına ulaşan hücreler Thoma lamında sayılarak 96 kuyucuklu plakalara 100 µL hacminde $1,0 \times 10^5$ hücre/mL olması koşuluyla ekim yapılarak 37°C ve %5 CO₂'de 24 saat süre boyunca inkübasyona bırakılarak çoğalması beklenmiştir. Kuyucukların içerisinde çoğalan hücrelere, *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon gibi ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların steril ultra saf su içerisinde hazırlanan çalışma stoklarından (10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL ve 0,625 mg/mL) 10'ar µL aktararak kuyucuklardaki ekstrakt konsantrasyonu sırasıyla 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 62,5 µg/mL olarak ayarlanmıştır. Kontrol kuyucuğuna da 10 µL steril ultra saf su eklenmiştir. Her bir konsantrasyon ve kontrol aynı plaka üzerinde üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Belirlenen dozlarda muamale edilerek 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki madde dikkatli bir şekilde aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. MTT solüsyonu eklenmeden önce her konsantrasyon ve kontrol kuyucukları için hücrelerin ters mikroskopta (10x) fotoğrafı çekilerek ekstraktların hücreler üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Fotoğraf çekim işlemi bittikten sonra 50 mL hacmindeki falkon tüpe MTT çözeltisinden (son hacim 50 mL olacak şekilde %0,5 FBS + 0,025 gr MTT) 100'er µL transfer edilmiştir ve hücreler 37°C ve %5 CO₂'de dört saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda tüm kuyucukların içindeki MTT solüsyonu aspire edilmiş ve akabinde oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için kuyucuklara 100'er µL saf DMSO eklenmiştir (Şekil 3.1). Absorbans değerleri spektrofotometrede DMSO blank kuyucuğuna karşı 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Sharif vd., 2021). Hücre canlılığı yüzde (%) olarak ölçüldükten sonrasında IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren µg/mL cinsinden

ekstrakt konsantrasyonu) değerleri, GraphPad Prism bilgisayar programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1 PC-3 ve MDA-MB-231 MTT işleminden sonra mikroyet görüntüsü

3.2.3 Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri

3.2.3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Antimikrobiyal aktivite deneyinde kullanılan besiyerleri (MHA ve MHB) ve anti-QS deneylerinde kullanılan besiyerleri (LB agar ve LB broth) üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve otoklav (121°C’de, 15 dk) işlemine tabi tutulmuştur. Otoklav işleminden sonra katı besiyerleri 90 mm petri çaplarına 25 mL hacminde dökülmüş ve donması için beklenmiştir. Ardından tüm besiyerleri (katı ve sıvı) kullanılıncaya kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması

Antimikrobiyal testleri gerçekleştirmek için, -80°C’de muhafaza edilen bakteri suşlarının Mueller Hinton agar (MHA) besiyerinde maya suşunun ise Saboraud Dekstroz agar (SDA) besiyerinde canlandırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültürler 37C°’de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm deney çalışmaları taze kültürlerden hazırlanmıştır.

3.2.3.3 Disk difüzyon testi

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komiteleri (EUCAST) kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir

(EUCAST, 2023). Bu amaçla mikroorganizmaların taze kültürlerinden McFarland 0.5 (bakteriler için $\sim 1,0 \times 10^8$ kob/mL; *C. albicans* için $\sim 1,0 \times 10^6$ kob/mL) yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. Hazırlanan bu inokulumdan bakteriler için Mueller Hinton agar (MHA), *C. albicans* için Saboraud Dekstroz agar (SDA) besiyerleri yüzeyine pamuklu eküvyon ile üç yönlü ekimler yapılmıştır. Sonrasında 400 µg (20 mg/mL çalışma stoğundan 20 µL emdirilmiş) konsantrasyonunda bitki ekstraktlarını ihtiva eden 6 mm çapındaki diskler besiyeri yüzeylerine yerleştirilmiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak ekstraktların çözücülerini kullanılırken pozitif kontrol olarak ise bakteriler için levofloksasin (5 µg/disk), *C. albicans* için flukonazol (25 µg/disk) kullanılmıştır. Kültürler (bakteriler için 24 saat; *C. albicans* için 48 saat) inkübe edildikten sonra diskleri çevreleyen inhibisyon bölgeleri (ZOI) bir cetvel (mm) yardımıyla belirlenmiştir. Elde edilen zon çaplarından 6-15 mm zayıf antimikrobiyal etkiyi, 16-20 mm orta düzey antimikrobiyal etkiyi, >20 mm ise güçlü antimikrobiyal etkiyi düşündürmüştür (Al-Majidi, 2014).

3.2.3.4 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Bitki ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite gösterdiği mikroorganizmalara karşı MİK değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir (Wiegand vd., 2008). Bunun için ekstraktların 62,5-2000 µg/mL konsantrasyon aralığı test edilmiştir. Öncelikle her bir test için 96 kuyucuklu mikropleytin birinci kuyucuğuna 180 µL, diğer kuyucuklara ise 100'er µL MHB konulmuştur. Daha sonra birinci kuyucuğa ekstraktın 10 mg/mL çalışma stoğundan 20 µL eklenip 2000 µg/mL ekstrakt konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Sonra birinci kuyucuktan 100 µL alınıp 62,5 µg/mL ekstrakt konsantrasyonu elde edilmeye dek iki katlı seri seyreltme yapılmıştır. Ardından mikroorganizmaların taze kültürlerinden McFarland 0.5 standardı yoğunluğunda inokulum hazırlanarak steril serum fizyolojik içerisinde 10 kat seyreltilmiş ve 5'er µL hacmindekuyucuklara inoküle edilmiştir. Bu şekilde kuyucuklardaki bakteri konsantrasyonu 5×10^5 kob/mL olmuştur. Her deney için bir kuyucuk üreme kontrolü (ekstrakt içermeyen), bir kuyucuk ise sterilit kontrolü (mikroorganizma içermeyen) olarak kullanılmıştır. Pleyt, steril kapağı kapatılıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklarda görünür mikroorganizma üremesinin meydana gelmediği son ekstrakt konsantrasyonu

MİK değeri şeklinde belirlenmiştir (Şekil 3.2). MİK değerini belirledikten sonra ekstraktların minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri incelenmiştir. MBK değerlerini incelemek için MİK ve üzeri konsantrasyonlardan, ekstrakt içermeyen genel bir besiyerinde alt kültürler hazırlanmıştır. Bu bağlamda 50 koloninin altında mikroorganizma izolasyonunu sağlayan ilk ekstrakt konsantrasyonu MBK değeri olarak yorumlanmıştır.



Şekil 3. 2 Mikrodilüsyon yöntemi mikrolept görüntüsü

3.2.4 Anti-Quorum Sensing Aktivite Deneyleri

3.2.4.1 Viyolasin inhibisyon deneyi

Ekstraktların viyolasine karşı pigment üretimi için QS inhibitor etkinliği *Chromobacterium violaceum* CV026 suşu üzerine yarı-katı agar yöntemiyle incelenmiştir (McClellan vd., 1997). Özet olarak *C. violaceum* suşunun taze kültüründen tek koloni şeklinde alınıp 5 mL LB broth'da 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 5 mL hacminde eritilmiş ve ~50°C'ye soğutulmuş LB yarı-katı agar (%0,5 agar) içine bir gecelik kültürden 50 µL ilave edilmiştir. Ek olarak, agar kültür karışımına, 5 µM'lik nihai konsantrasyonda (C6-HSL adı verilen eksojen QS sinyal molekülü eklenmiştir. Karışım maksimum hızda vorteks yapıldıktan sonra ivedi şekilde daha önceden hazırlanan LB agarın yüzeyine dökülüp donması amacıyla oda sıcaklığında ~15 dk bekletilmiştir. Daha sonra donmuş LB agar üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve kuyucuklara 50 µL ekstraktların ana

stoklarından ilave edilmiştir (1000 µg/kuyucuk). *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun bir gecelik kültürü pozitif kontrol olarak kullanılırken, ekstraktların çözücülerini negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kùltürler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, süre sonunda kuyucukların çevresinde viyolasin pigment üretiminin inhibisyonu incelenmiştir. QS inhibisyonu, kuyucukların etrafındaki çapta renksiz, opak bir bölgenin varlığıyla belirlenmiştir.

3.2.4.2 Biyofilm inhibisyon deneyi

Ekstraktların biyofilm inhibitör etkileri *S. aureus* ATCC 25923 model organizmasına karşı polistren yapıda düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplytte kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır (O'Toole, 2011). Test edilecek konsantrasyonun bakteri üreme ve gelişmesini baskılamaması için bir sub-MİK değeri olan 250 µg/mL kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda *S. aureus*'un taze kùltüründen 5 mL LB broth'da bir gecelik (16 saatlik) taze kùltür hazırlanmıştır. Bu kùltür taze LB besiyerinde 100 kat seyreltilmiş ve 96 kuyucuklu mikroplytin kuyucuklarına 190'ar µL hacminde transfer edilmiştir. Ardından kuyucuklardaki ekstrakt konsantrasyonunun 250 µg/mL olması için ekstraktların 5 mg/mL çalışma stoklarından 10'ar µL transfer edilmiştir. Kontrol kuyucukları için aynı hacimde ekstraktların çözücülerinden eklenmiştir. Her bir uygulama üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Mikroplyt steril kapağı kapatılıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki içerik dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve planktonik hücrelerin (biyofilm tabakasına bağlanmayan hücrelerin) uzaklaştırılması için kuyucuklar distile su ile üç kez yıkanmış ve kurutulmuştur. İşlem sonrasında tüm kuyucuklara 200 µL %0,1'lik kristal viyole boyası konulmuş ve 5 dk oda sıcaklığında tutulmuştur. Ardından fazla boya yukarıda yazıldığı şekilde distile su ile yıkayıp uzaklaştırılmıştır. Son yıkama basamağından sonra mikroplyt 37°C'de 15 dk tutulmuş ve kuyucuklardan suyun tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Sonrasında kuyucuklardaki biyofilm tabakası tarafından tutulmuş kristal viyole boyası, 200 µL %96 EtOH ile çözülmüştür. Kuyucuklardaki absorban değeri blank kuyucuğına (%96 EtOH) karşı 550 nm dalga boyunda okutulmuştur. Ekstraktlarla muamele edilen kuyucuklardaki biyofilm tabakası kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmış ve biyofilm inhibisyonu (%) [1-

$(OD_{\text{ekstrakt}} / OD_{\text{kontrol}})] \times \%100$ formülü ile hesaplanmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.5 İstatistiksel Analizler

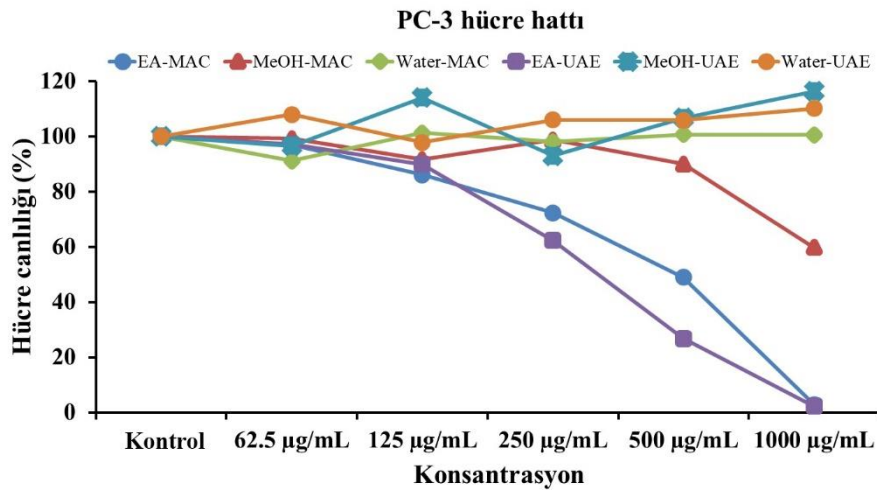
Her bir deneyin biyolojik tekrarı birbirinden bağımsız en az üç kez gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılık deneyi için veriler ve biyofilm inhibisyon analizine ait veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtilmiştir. Grafiklerin oluşturulması Microsoft Office Excel 2016 programı ile yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi için Windows tabanlı IBM-SPSS 23. sürüm (IBM, Armonk, NY, ABD) ve Excel 2016 kullanılarak gruplar arasındaki fark Student's t-test ile belirlenmiştir. Analizler ışığında elde edilen istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

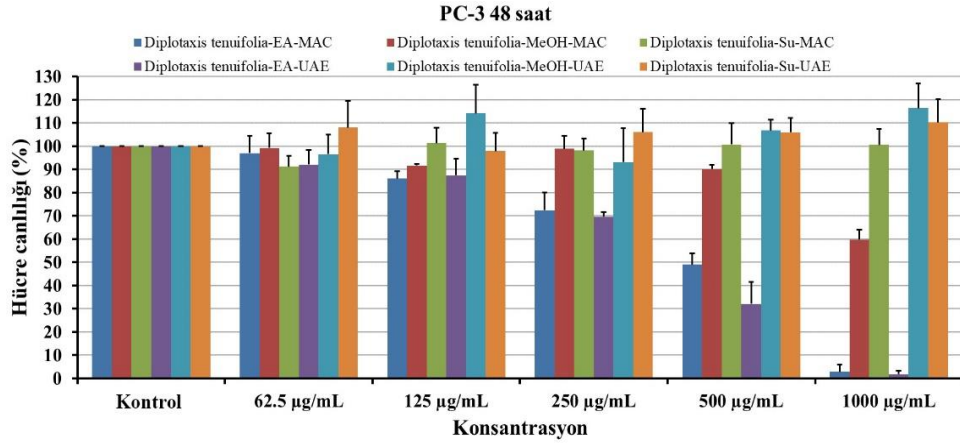
4.1 Antikanser Aktivite Bulguları

4.1.1 Bitki Ekstraktlarının PC-3 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları

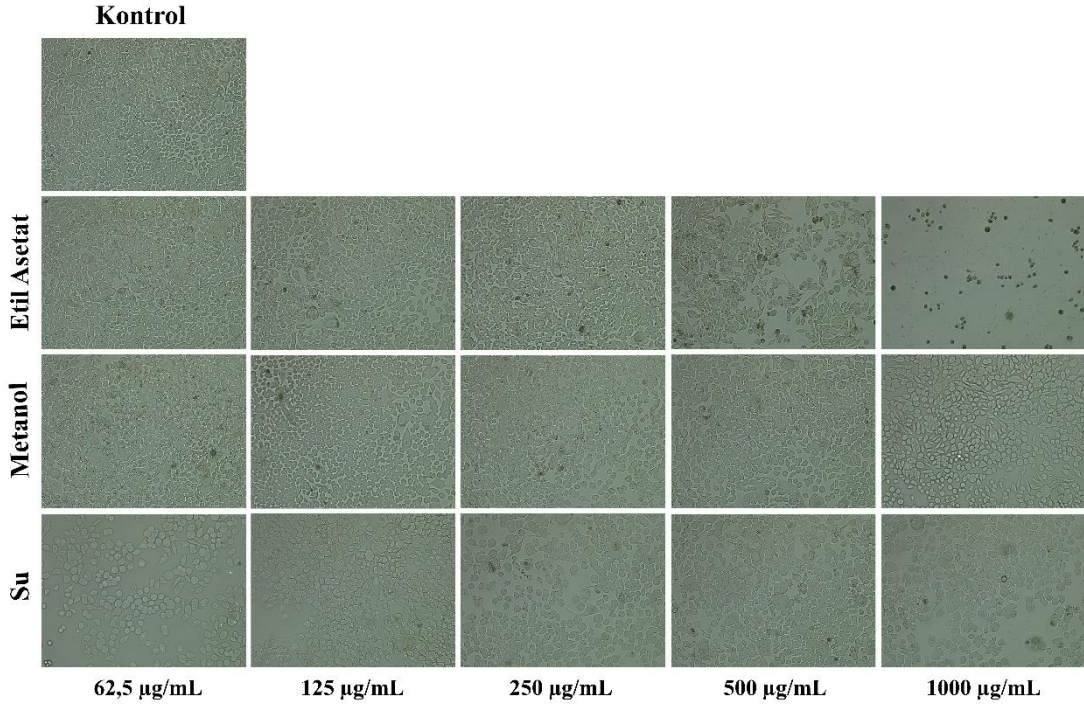
D. tenuifolia bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait EA, MeOH ve su ekstraktlarının belirli konsantrasyonları (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) 48 saat süresince muamele edilmiştir. 48 saatin sonunda en düşük canlılık oranının EA ekstraktlarının 1000 µg/mL konsantrasyonunda %2,8 ve %2,3 oranında olduğu tespit edilmiştir. Bunu takip eden ise %59,8 oranıyla MAC yöntemiyle hazırlanmış MeOH ekstraktı (1000 µg/mL) olmuştur (Grafik 4.1 ve Grafik 4.2). Hücre hattının canlılık oranlarını doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Diğer ekstraktların ise hücre canlılığı üzerine önemli bir antiproliferatif aktivitesi gözlenmemiştir. PC-3 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları Tablo 4.1’de verilmiştir. PC-3 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ise Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



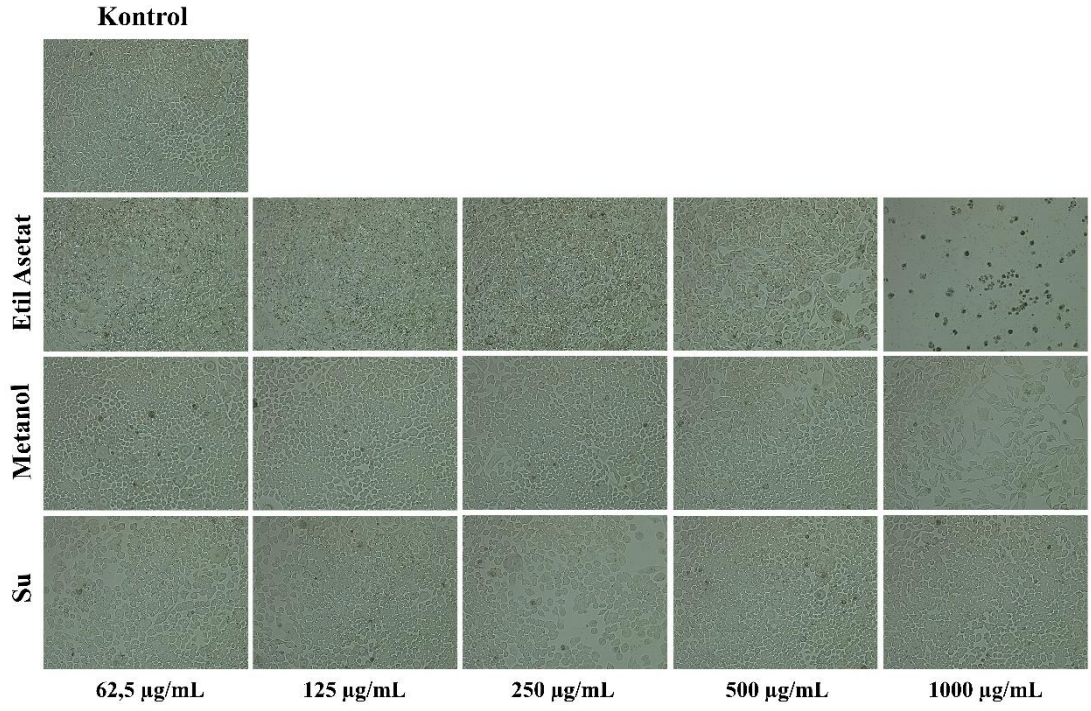
Grafik 4. 1 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda PC-3 hücre hattının canlılığına etkisi (EA, etil asetat; MeOH, metanol; MAC, maserasyon; UAE, ultrasonikasyon).



Grafik 4. 2 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda PC-3 hücre hattı üzerine sitotoksik aktivitesi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (EA, etil asetat; MeOH, metanol; MAC, maserasyon; UAE, ultrasonikasyon).



Şekil 4. 1 Ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri

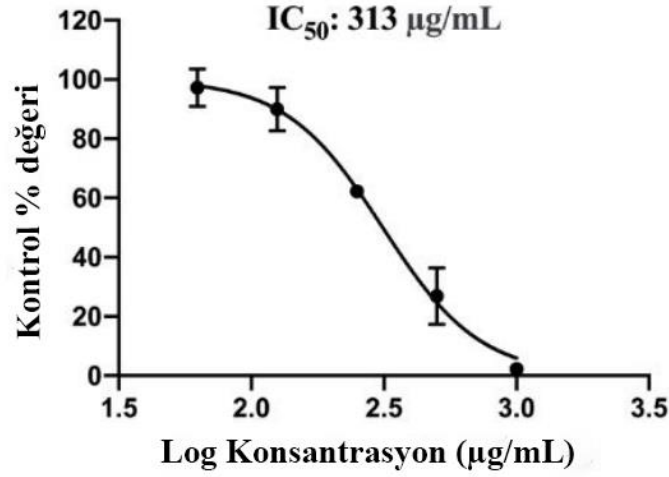


Şekil 4. 2 Maserasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki 48. saatte morfolojik görüntüleri

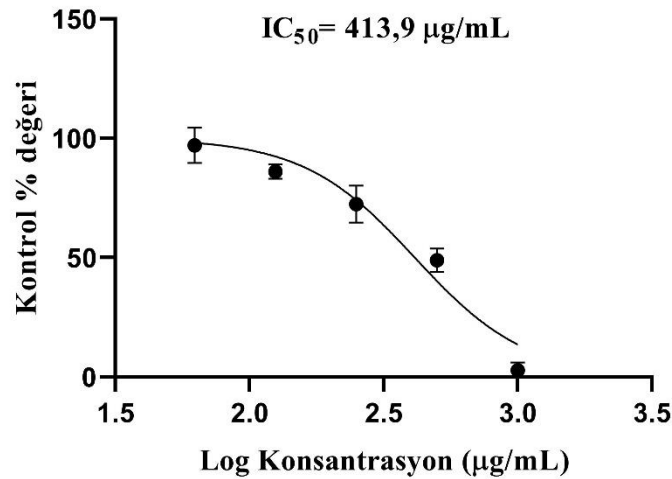
Tablo 4. 1 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstraktların PC-3 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları (%). Veriler±standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Hücre canlılığı %						
	EA-MAC	MeOH-MAC	Su-MAC	EA-UAE	MeOH-UAE	Su-UAE
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	97,0±7,4	99,2±6,4	91,2±4,7	97,2±6,3	96,5±8,5	108,0±11,5
125 µg/mL	86,1±3,0	91,6±0,9	101,3±6,7	89,9±7,3	114,1±12,4	97,8±7,9
250 µg/mL	72,4±7,8	98,8±5,7	98,1±5,2	62,3±2,0	93,0±14,5	106,0±10,2
500 µg/mL	48,9±4,9	90,1±1,9	100,8±9,1	26,8±9,6	106,7±4,6	105,9±6,2
1000 µg/mL	2,8±3,2	59,8±4,2	100,6±6,8	2,3±1,5	116,4±10,5	110,2±10,0

Bu tez çalışmasında en düşük IC_{50} değeri *D. tenuifolia*'nın ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktında $313 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.3). Bunu takip eden IC_{50} değeri $413,9 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanan maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktıdır (Grafik 4.4). Diğer ekstraktların IC_{50} değerleri $>1000 \mu\text{g/mL}$ şeklinde tespit edilmiştir.



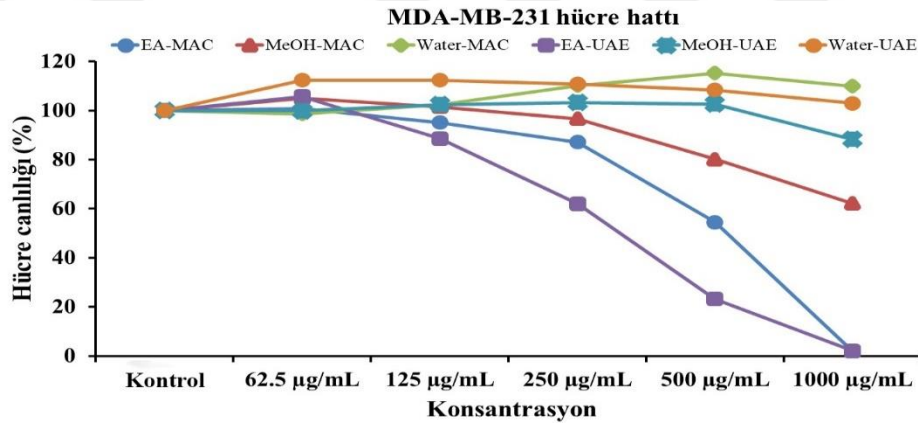
Grafik 4. 3 *D. tenuifolia* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının PC-3 hücre hattı üzerindeki IC_{50} değeri.



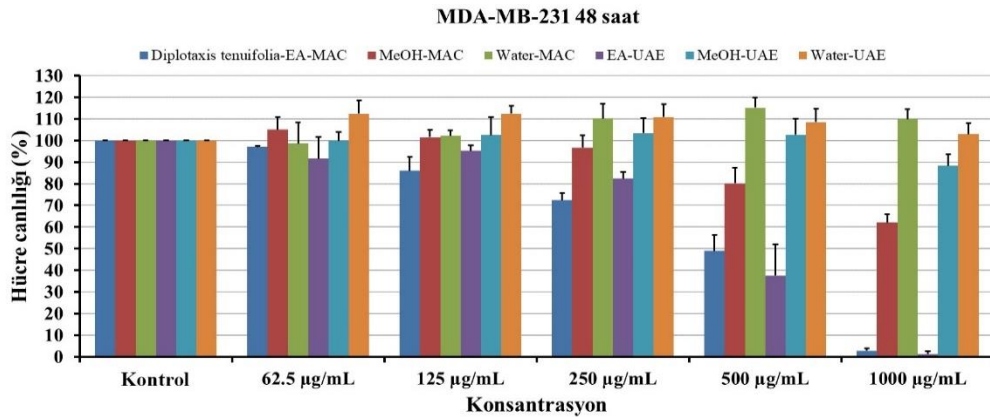
Grafik 4. 4 *D. tenuifolia* bitkisinin maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının PC-3 hücre hattı üzerindeki IC_{50} değeri.

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

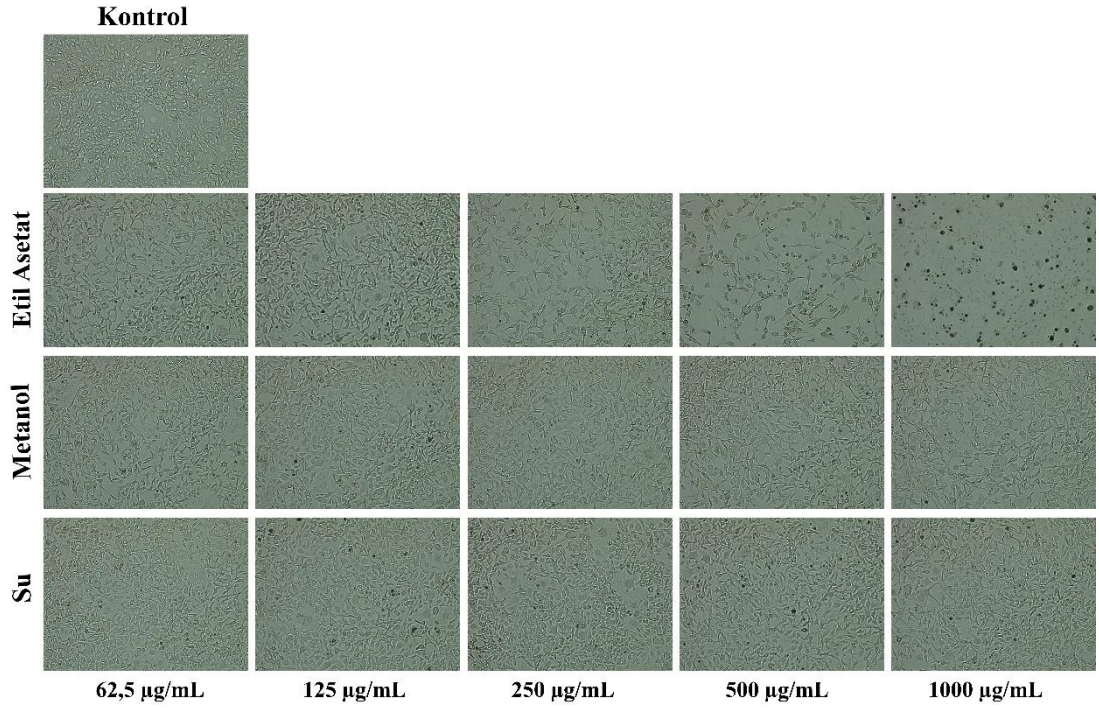
MDA-MB-231 hücre hattının canlılık oranlarını doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. 48 saatin sonunda en düşük canlılık oranının EA ekstraktlarının 1000 µg/mL konsantrasyonunda %2,0 ve %2,1 oranında olduğu görülmüştür. Bunu takip eden ise %62,1 oranıyla MAC yöntemiyle hazırlanmış MeOH ekstraktı (1000 µg/mL) olmuştur (Grafik 4.5 ve Grafik 4.6). MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları Tablo 4.2’de verilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



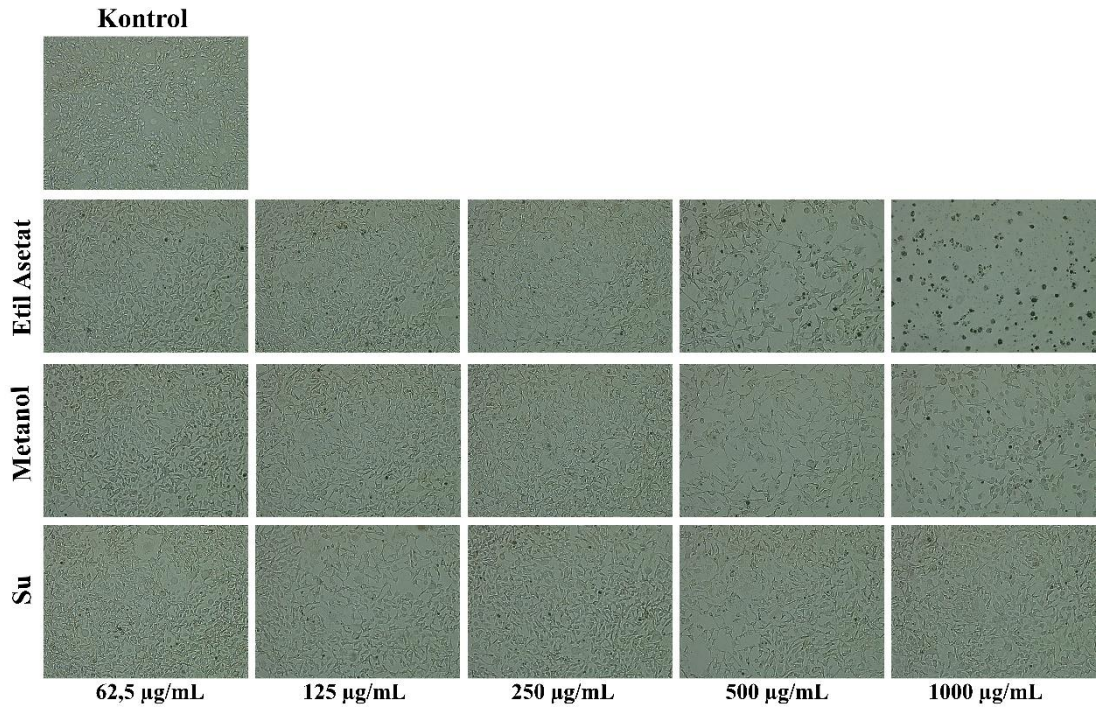
Grafik 4. 5 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattının canlılığına etkisi (EA, etil asetat; MeOH, metanol; MAC, maserasyon; UAE, ultrasonikasyon).



Grafik 4. 6 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattı üzerine sitotoksik aktivitesi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. (EA, etil asetat; MeOH, metanol; MAC, maserasyon; UAE, ultrasonikasyon).



Şekil 4. 3 Ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri

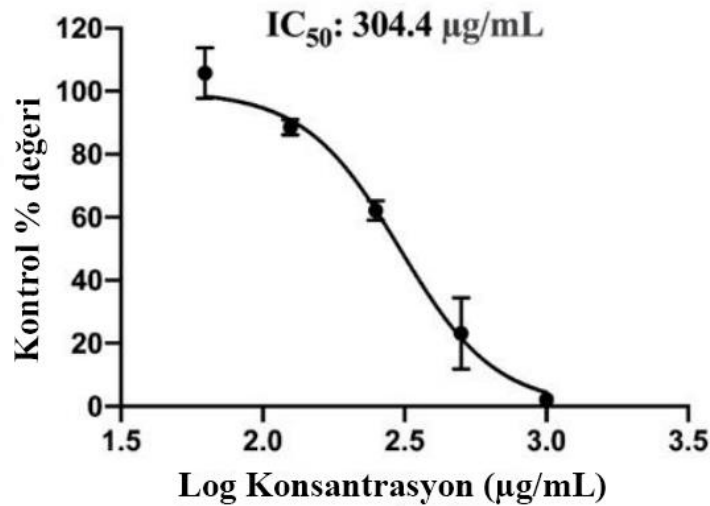


Şekil 4. 4 Maserasyon yöntemiyle hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 48.saatte morfolojik görüntüleri.

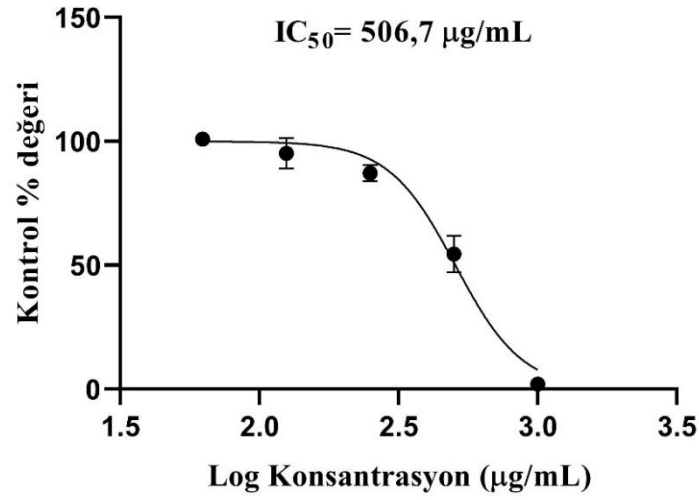
Tablo 4. 2 *D. tenuifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstraktların MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki canlılık oranları (%). Veriler±standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Hücre canlılığı %						
	EA-MAC	MeOH-MAC	Su-MAC	EA-UAE	MeOH-UAE	Su-UAE
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	100,9±0,6	105,1±5,9	98,6±9,6	105,7±10,0	99,9±4,2	112,4±6,2
125 µg/mL	95,2±6,2	101,5±3,4	102,3±2,6	88,6±2,4	102,4±8,5	112,4±3,7
250 µg/mL	87,2±3,3	96,6±5,9	110,2±6,9	62,1±3,1	103,3±7,1	110,9±5,9
500 µg/mL	54,5±7,4	80,2±7,3	115,2±4,8	23,2±14,3	102,6±7,4	108,5±6,2
1000 µg/mL	2,0±1,2	62,1±3,7	110,0±4,5	2,1±1,4	88,3±5,3	102,9±5,0

Bu çalışmada en düşük IC₅₀ değeri *D. tenuifolia* 'nın ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktında 304,4 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Grafik 4.7). Bunu takip eden ise IC₅₀ değeri 506,7 µg/mL olarak hesaplanan maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktıdır (Grafik 4.8). Diğer ekstraktların IC₅₀ değerleri >1000 µg/mL şeklinde tespit edilmiştir.



Grafik 4. 7 *D. tenuifolia* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değeri.



Grafik 4. 8 *D. tenuifolia* bitkisinin maserasyon yöntemiyle hazırlanmış EA ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değeri.

4.2 Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması

Bu tez çalışmasında *D. tenuifolia*'nın UAE ve MAC yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi insan patojenlerini temsil eden çeşitli referans mikroorganizma suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında *D. tenuifolia*'nın sadece UAE yöntemi ile hazırlanmış EA ekstraktının *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkinliği bulunmuş ve zon çapı $9,0 \pm 0,0$ mm (zayıf antimikrobiyal aktivite) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5). Diğer ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmemiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4. 5 Ekstraktların *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi (1 ve 6; Levofloksasin, 2; EA-MAC, 3; EA-UAE, 4; MeOH-MAC, 5 ve 10; DMSO, , 7; MeOH-UAE, 8; Su-MAC, 9; Su-UAE,).

Tablo 4. 3 Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. (EA: Etil asetat, MeOH: Metanol, MAC: Maserasyon, UAE: Ultrasonikasyon, -: Çalışılmadı.)

Test Edilen Materyaller	Test Edilen Mikroorganizmalar (Zon çapı, mm)									
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 19002	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -EA-MAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -MeOH-MAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -Su-MAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -EA-UAE	0	9,0 $\pm$ 0,0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -MeOH-UAE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> -Su-UAE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levofloksasin (5 μ g)	33,5 $\pm$ 0,7	33,3 $\pm$ 0,6	29,0 $\pm$ 0,0	20,5 $\pm$ 0,7	32,0 $\pm$ 1,4	35,5 $\pm$ 0,7	26,5 $\pm$ 0,7	31,5 $\pm$ 0,7	29,5 $\pm$ 0,7	–
Flukonazol (25 μ g)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	16,5 $\pm$ 0,7
DMSO (%100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D. tenuifolia'nın UAE yöntemi ile hazırlanmış EA ekstraktının *B. subtilis*'e karşı MİK ve MBK değerleri ise 1000'er µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bir maddenin test edilen mikroorganizmaya karşı MBK/MİK oranının >4 olması bakteriyostatik etkiden kaynaklanabileceğini, ≤4 olması ise antimikrobiyal aktivitenin bakterisidal etkiye bağlı olduğunu gösterir (Mogana vd., 2020). Bu tez çalışmasında ise ekstraktın *B. subtilis*'e karşı MBK/MİK oranı 1 olarak tespit edilmiş ve antibakteriyel aktivitenin bakterisidal etkiden kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.3 Anti-Quorum Sensing Aktivite Bulguları

4.3.1 Viyolasin İnhibisyon Deneyi

D. tenuifolia toprak üstü kısımlarına ait ekstraktların QS etkinliği *Chromobacterium violaceum* CV026 biyosensör suşunda viyolasin pigmenti üzerine inhibitör etkinliği yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır. Ekstraktların 1000 µg konsantrasyonunda viyolasin pigment üretimi üzerine inhibitör etkinliği saptanmamıştır (Şekil 4.6).



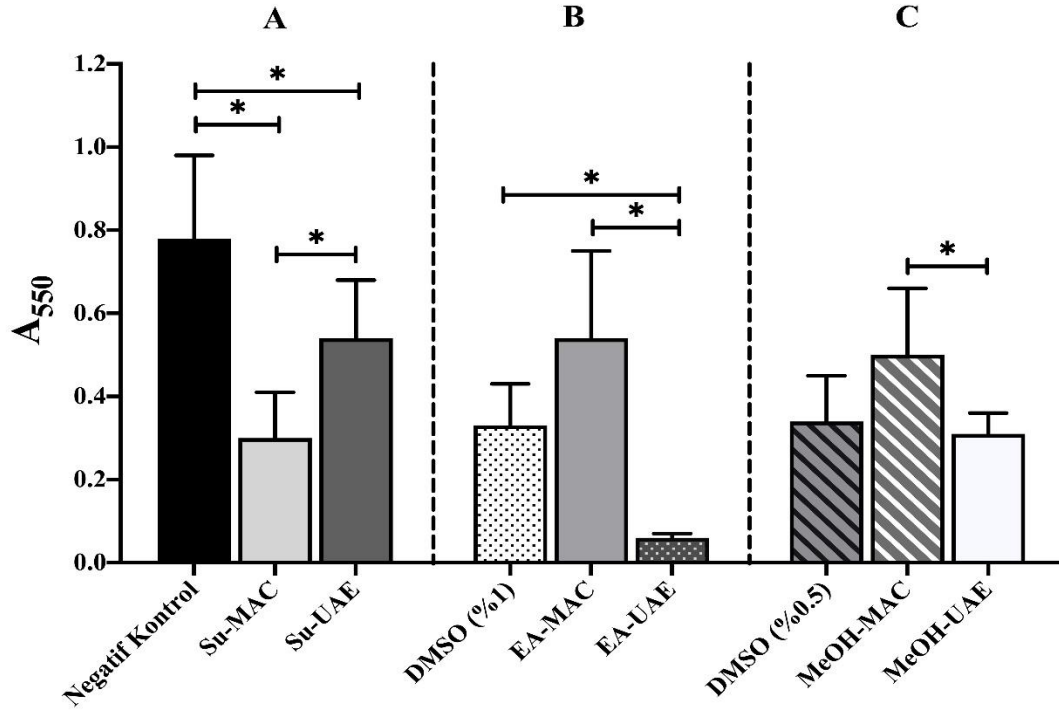
Şekil 4. 6 *D. tenuifolia* bitkisinin *C. violaceum* CV026 biyosensör suşunda viyolasin inhibisyonu (1, pozitif kontrol; 2, negatif kontrol; 3, EA-MAC; 4, MeOH-MAC; 5, su-MAC; 6, EA-UAE; 7, MeOH-UAE; 8, su-UAE).

4.3.2 Biyofilm İnhibisyon Deneyi

Ekstraktların, *S. aureus* biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkinliği Tablo 4.4 ve Grafik 4.9’da özetlenmiştir. Su ekstraktları tamamen suda çözündüğü için sadece su uygulanmış kontrol kuyucukları ile; EA ekstraktlarının test edildiği son konsantrasyonu %1 DMSO ihtiva ettiği için bu ekstraktların kontrolü sadece %1 DMSO uygulanmış kontrol kuyucukları ile; MeOH ekstraktlarının test edildiği son konsantrasyonu %0,5 DMSO ihtiva ettiği için bu ekstraktların kontrolü de %0,5 DMSO uygulanmış kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde en fazla inhibisyon %81,9 oranı ile UAE yöntemi ile hazırlanmış EA ekstraktı ile muamele sonrasında tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla %62,0; %30,6 ve %9,3 oranlarıyla Su-MAC, Su-UAE ve MeOH-UAE ekstraktları takip etmiştir. MAC yöntemi ile hazırlanmış EA ve MeOH ekstraktlarının biyofilm inhibitör etkinliği tespit edilmemiştir.

Tablo 4. 4 Ekstraktların biyofilm inhibitör etkinliği. Veriler±standat sapma şeklinde sunulmuştur.

Ekstrakt	Absorbans (550nm)	Biyofilm İnhibisyonu (%)
Kontrol (Su)	0,78 ± 0,20	0,0
Su-MAC	0,30 ± 0,11	62,0
Su-UAE	0,54 ± 0,14	30,6
DMSO (%1)	0,33± 0,10	0,0
EA-MAC	0,54 ± 0,21	0,0
EA-UAE	0,06 ± 0,01	81,9
DMSO (%0,5)	0,34 ± 0,11	0,0
MeOH-MAC	0,50 ± 0,16	0,0
MeOH-UAE	0,31 ± 0,05	9,3



Grafik 4. 9 Ekstraktların ve kontrollerinin ölçülen absorbans değerleri. (A: Su-MAC ve Su-UAE ekstraktları suda çözöldüğü için bu ekstraktların biyofilm inhibitör etkinliği sadece su ile muamele edilmiş kontrol kuyucukları ile, B: EA-MAC ve EA-UAE ekstraktlarının test edilen konsantrasyonları %1 DMSO içerdüğü için biyofilm inhibitör etkinliği sadece %1 DMSO ile muamele edilmiş kontrol kuyucukları ile, C: MeOH-MAC ve MeOH-UAE ekstraktlarının test edilen konsantrasyonları %0,5 DMSO içerdüğü için biyofilm inhibitör etkinlikleri sadece %0,5 DMSO ile muamele edilmiş kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır). Su ekstraktları ve EA-UAE ekstraktı biyofilm oluşumunu kontrollerine göre anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir (* $p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Hücreler sistematik olarak birçok düzenleyici aşamadan geçerek bölünür, hayatta kalır ve çoğalırlar. Ancak mutasyonlar ve hücredeki kontrol seviyelerindeki problemler nedeniyle zarar gördükleri zaman apoptoz ismi verilen hücre ölümü süreciyle ölürlür. Böylelikle bunların yerini sağlıklı hücreler alır (Demircan ve Mater, 2019). Kansere hücrelerinin en karakteristik özelliği, normal hücrelerden farklı olarak kontrolsüz bir şekilde büyümeleri ve hücre döngülerinin normal şekilde çalışmamasıdır. Kanserin kimyasallara maruziyet, genetik yatkınlık, UV ve X ışınlarına maruz kalma, tütün tüketimi ve çevresel etkiler gibi çeşitli nedenleri vardır (Lapa vd., 2017). Kanser tedavisindeki en büyük sorun, kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı duyarlılığını kaybetmesi ve dirençli olmasıdır (Falasca ve Linton, 2012). Antik çağlardan bu yana pek çok farklı bitkinin türlü hastalıkların tedavisi için kullanıldığı kayıtlara geçmiştir. Teknoloji ilerledikçe kanser tedavisine yönelik kemoterapi ilaçlarının geliştirilmesinde bitkiler kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısıyla bitkiler kanserle mücadelede yeni kemoterapi ilaçlarının geliştirilmesine temel oluşturabilir veya mevcut kemoterapi ilaçlarının etkinliğinin artırılmasına olanak sağlayabilir (Shoeb, 2006).

Sunulan bu tez çalışmasında *Diplotaxis tenuifolia* bitki türünün toprak üstü yerlerinden MAC ve UAE metotlarıyla izole edilmiş EA, MeOH ve su özütlerinin PC-3 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Ekstraktların farklı konsantrasyonlarda (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) 48. saat sonundaki etkilerinin incelenmesi ışığında elde edilen verilere göre; EA ekstraktlarının ve maserasyon yöntemi ile hazırlanmış MeOH ekstraktının PC-3 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının canlılık oranlarını doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. Her iki hücre hattı için en düşük canlılık oranı (%2,0- %2,8) EA ekstraktlarının 1000'er µg/mL konsantrasyonu sonucunda saptanmıştır. Bunu takip eden PC-3 için %59,8 ve MDA-MB-231 için %62,1 oranlarıyla maserasyon yöntemiyle hazırlanmış MeOH ekstraktıdır (1000 µg/mL). Diğer ekstraktların ise hücre canlılığı üzerine anlamlı bir inhibitör etkinliği saptanamamıştır. En düşük IC₅₀ değeri yabancı rokanın UAE yöntemi ile hazırlanmış EA ekstraktlarından

hesaplanmış olup değerler MDA-MB-231 ve PC-3 hücre hatlarına karşı sırasıyla 304,4 µg/mL ve 313 µg/mL şeklinde bulunmuştur.

Literatürde *D. tenuifolia* bitkisine ait bazı kanser hücre hatlarının antiproliferatif aktivitesini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmaya göre *D. tenuifolia* 'nın yapraklarından MAC yöntemiyle hazırlanmış %70 EtOH ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonunda ve 48 saat süre zarfında LoVo (kolorektal kanseri hücre hattı), HepG2 (karaciğer kanseri hücre hattı) ve MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) hücrelerine karşı antikanser aktivitesi araştırılmış ve ekstraktın kontrole (ekstrakt uygulanmamış) oranla hücre canlılığını inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fakat elde edilen IC₅₀ değerleri >100 µg/mL olduğu için söz konusu antiproliferatif etkinin önemli olmadığı bildirilmiştir (Marrelli vd., 2015).

Başka bir çalışmada bitkinin aynı şekilde yaprak kısımlarından liyofilizasyon yöntemiyle hazırlanan su-EtOH ve kloroform-MeOH ekstraktlarının antikanser aktivitesi MTT yöntemiyle CCD-18 (sağlıklı kolon fibroblast hücre hattı) ve HT-29 (kolorektal kanseri hücre hattı) hücrelerine karşı incelenmiş ve kloroform-MeOH ekstraktı başta olmak üzere test edilen ekstraktların CCD-18 hücrelerine antiproliferatif aktivite sergilemeden HT-29 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ek olarak kloroform-MeOH ekstraktının HT-29 hücresine karşı IC₅₀ değeri ~200 µg/mL olarak hesaplanmış, su-EtOH ekstraktının IC₅₀ değerinin hesaplanamadığı rapor edilmiştir (Ramos-Bueno vd., 2016). Bir diğer çalışmada bitkinin yapraklarından hazırlanan polifenolik ekstraktın Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı) hücrelerinin G1 fazında kalmasını sağlayıp, hücrenin çoğalmasını önlediği ifade edilmiştir (Durazzo vd., 2013). Radziejewska-Kubzdela vd. (2019) çalışmasında ise *D. tenuifolia* 'nın yaprak kısımlarından liyofilizasyon yöntemiyle hazırlanan saf öz suyunun Caco-2 ve HepG2 kanser hücre hatlarının canlılık oranını %50 oranında azalttığını ifade ederken, IEC-6 (normal sıçan ince bağırsak epitel hücreleri) hücrelerinin canlılık oranını %19 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Nitekim bu çalışmalarda antikanser aktivitenin bitkiye ait olduğu biyoaktif maddelerin (yağ asitleri ve steroller, karotenoid, fenolik ve glikozinolat bileşikleri) bir araya

getirilmesi ya da uyum içinde olmalarından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Durazzo vd., 2013; Ramos-Bueno vd., 2016). Ayrıca literatürde çeşitli *Diplotaxis* türlerinin sitotoksik aktivitesini araştıran çalışmalar da bulunmaktadır. Çalışmalarda *D. harra*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan EtOH ekstraktı HepG2, MCF-7 ve HCT116 (kolon kanseri hücre hattı) hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir (Mohammed vd., 2011). Aynı şekilde farklı bir çalışmada *D. harra*'nın tüm kısımlarından hazırlanan %70 MeOH, kloroform ve yağdan arındırılmış sulu MeOH ekstraktlarının LX-1, colon 38 (fare kolon kanser hücre hattı) ve P388 (fare lösemi hücre hattı) hücre hatlarına karşı (Kassem vd., 2013); Jdir vd. (2016) ve Nasri vd. (2017) çalışmalarında sırasıyla *D. simplex* ve *D. harra*'nın çiçek kısımlarından hazırlanan EA, EtOH ve MeOH ekstraktlarının Caco-2 hücre hattına karşı antikanser aktivite sergilediği rapor edilmiştir. Bu tez çalışmamızdan çıkarılan bulgular *D. tenuifolia*'nın yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Bundan ötürü kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ve etkili antikanser ajanlarının geliştirilmesi için iyi bir potansiyel gösterebileceği ortaya çıkmıştır.

Ek olarak çalışmamızda hem PC-3 hem de MDA-MB-231 hücre hattında en düşük canlılık oranı UAE yöntemi ile elde edilen etil asetat ekstraktları olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi şu olabilir; maserasyon tekniği, çiçeklerden uçucu yağ elde etme amacıyla uygulanan primitif metotlardan bir tanesidir (Cellat, 2011). Yaygın olarak şifalı bitkiler araştırmalarında kullanılır (Azwanida, 2015). Ekstre edilecek maddenin bir müddet organik çözücü içinde bekletilmesi aracılığıyla sağlanan ekstraksiyon yöntemidir (Koç, 2020). Maserasyon yöntemi, verim alınamayan ve epey zaman gereksinimi duyulan bir tekniktir (Cellat, 2011). Ultrason destekli ekstraksiyon veya ultrasonikasyon yöntemi ise oldukça düşük maliyetli olması ve karmaşık aletler gerektirmemesinden dolayı faydalı bir teknoloji olduğu için bitki endüstrisinde büyük ölçüde kullanılabilir (Eylem ve Uslu, 2018). Ultrasonikasyon metodunun avantajları; malzemenin ucuz olması, kullanım kolaylığı, çevre dostu olmasıdır (Yağcıoğlu, 2015). Aynı zamanda ekstraksiyon süresinin ve kullanılan solvent miktarının azaltılarak verimin en üst düzeye çıkarılabilmesidir (Abubakar ve Haque, 2020).

Günümüzde, antibiyotiklerin etki mekanizmalarıyla geçmişte kullanılan bitkisel karışımların etki mekanizmalarının benzer olduğu gözlemlenmektedir. Bu sebeple,

doğal kaynaklardaki bitkilerin içerdiği bileşiklerin araştırılması ve sentetik maddeler yerine yeni ve etkili antibakteriyel ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalara artan ilgi vardır (Yorulmaz Salman vd., 2014). Son zamanlarda bitki ekstraktlarından ve diğer doğal ürünlerden yeni ve etkili antimikrobiyal ajanların bulunmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır (Alkateeb vd., 2022; Tüfekci vd., 2020).

Bu çalışmada *D. tenuifolia*'nın UAE ve MAC yöntemleri ile hazırlanmış EA, MeOH ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi insan patojenlerini temsil eden 6 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 3 Gram-pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) bakteri ile bir maya (*Candida albicans* ATCC 10231) suşuna karşı disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuçlara bakıldığında *D. tenuifolia*'nın sadece ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanmış EA ekstraktının *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkinliği saptanmıştır ve zon çapı $9,0 \pm 0,0$ mm (zayıf antimikrobiyal aktivite) olarak bulunmuştur. Ekstraktın *B. subtilis*'e karşı MİK ve MBK değerleri ise 1000'er µg/mL olarak tespit edilmiştir. Ve MBK/MİK oranı 1 olarak saptanmış ve antibakteriyel aktivitenin bakterisidal etkiden kaynaklandığını ortaya koymuştur.

Literatürde *D. tenuifolia* bitkisinin antimikrobiyal etkinliğinin incelendiği az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmada *D. tenuifolia*'nın yaprak kısımlarından hazırlanan MeOH ekstraktının antimikrobiyal etkinliğini referans suşları olan *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Sonucunda çalışmamızda tespit edildiği gibi *P. aeruginosa* ve *C. albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal etki saptanamazken, *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal etki saptanmış ve 10-13 mm aralığında inhibisyon zon çaplarını tespit etmişlerdir. Ek olarak bu suşlara karşı MİK değerlerinin sırasıyla 250 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL olarak bildirmişlerdir (Moghaddam vd., 2019). Bu tez çalışmamızda da *B. subtilis*'e karşı benzer oranda antimikrobiyal etkinlik gözlenmiş fakat *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite

saptanamamıştır. Bu durum, teste tabi tutulan ekstraktların içerdiği biyoaktif bileşiklerin miktarı ve stabilitesine bağlanabilir. Ayrıca, ekstraktların içeriğindeki bileşiklerin arasındaki antagonistik etkilerden kaynaklı olabilir.

D. tenuifolia bitkisi ile yapılan farklı bir çalışmada ise bitkinin toprak üstü kısımlarından buhar distilasyon yöntemiyle elde edilmiş ekstraktların antimikrobiyal etkinliği farklı fitopatojen küflere karşı incelenmiş ve neticesinde ekstraktların *Penicillium* türleri ile *Phytophthora infestans* türüne karşı orta-düzeyde antifungal aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Rodriguez vd., 2006). Ayrıca *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss (Atta vd., 2011; Benzekri vd., 2015; Falleh vd., 2013; Hashem ve Saleh, 1999), *Diplotaxis simplex* (Viv.) Spreng. (Falleh vd., 2013), *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. (Salah vd., 2015), *Diplotaxis tenuisiliqua* Delile (Pedras ve Yaya, 2014), *Diplotaxis virgata* (Cav.) DC. (Salah vd., 2015), *Diplotaxis acris* (Forssk.) Boiss (Oueslati vd., 2021) türlerine ait farklı ekstraktların bitki ve insan patojenlerini simgeleyen birçok mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ifade edilmiştir. İfade edilen bu raporlarda antimikrobiyal etkiden bitki sekonder metabolitlerinin ve esansiyel yağ asitlerinin sorumlu olduğu belirtilmiştir. Örnek olarak çalışmada *D. harra*'nın toprak üstü kısımlarından izole edilen etanol ekstraktlarından isorhamnetin 3-glukosil-4'-ramnosid, isorhamnetin 3-o-β-glukosid flavonoid, isorhamnetin 3- ramnosid, isorhamnetin 3-o-rutinosid ve kuersetin bileşiklerinin oluştuğunu bildirmişlerdir (Atta vd., 2011). Başka bir çalışmada *D. harra* ve *D. simplex* türlerinin çiçek kısımlarının yüksek derecede polifenolik maddeler içerdiğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte HPLC analizi sonucunda her iki türde de ana fenolik bileşiğin kafeik asit olduğu tespit edilmiştir. Sinapik asidin yalnızca *D. harra* türünde, 3,4-dimetoksibenzoik ve p-kumarik asitlerin ise yalnızca *D. simplex* türünde içerildiğini rapor etmişlerdir (Falleh vd., 2013). Bir diğer çalışmada *D. tenuisiliqua*'dan ekstrakte edilen tenualeksinin adı verilen bir çeşit fitoaleksinin antifungal etkiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Pedras ve Yaya, 2014). Benzekri vd. (2015) çalışmasında, *D. harra*'nın antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu olan sülforafan adı verilen bir izotiyosiyonat bileşiğinin olduğu rapor edilmiştir. *D. virgata* türünden izole edilen isorhamnetin 3-O-beta-L-glukopiranozid ve *D. eruroides* türünden izole edilen rhamnetin-3,3'-di-O-β-D-glukopiranozit flavonoidlerinin antimikrobiyal etki gösterdiği başka bir çalışmada ifade edilmiştir (Salah vd., 2015).

D. acris türünün çiçek kısımlarından izole edilen ve temel bileşeni 5-metil sülfanil pentan nitril olan esansiyel yağları kullanıp biyosentez yolu ile üretilen altın nanopartiküllerinin Gram-negatif bakterilere karşı potansiyel bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Oueslati vd., 2021). Bu bağlamda çalışma sonucunda *D. tenuifolia* bitkisinin ultrasonikasyon metodu ile hazırlanan EA ekstraktının *B. subtilis* referans suşuna karşı zayıf da olsa antimikrobiyal etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu göstermiş olduğu antimikrobiyal etki yukarıda bahsedilen biyoaktif maddelerin varlığından kaynaklanabilir.

Patojenler arasında antibiyotik direncinin artması, bulaşıcı hastalıklarla mücadele için yeni antimikrobiyal tedavilere veya alternatif başka tedavilere olan ihtiyacı artırmıştır. Son zamanlarda bakterilerin QS mekanizmasını giderek kullanması toksin üretimi, biyofilm oluşumu, enzim sentezi ve pigment üretimi gibi birçok virülans faktörünü sentezleyebildiğini ortaya koymuştur (Avcı, 2009). Fakat günümüzde klinik kullanım için ideal bir anti-QS ajanı mevcut değildir. Bir bileşiğin anti-QS aktivitesi, farklı indikatör suşlarında üreme ve gelişmeyi baskılamadan spesifik bir QS sinyal molekülüne yanıt olarak ortaya çıkan fenotipik davranışları inhibe edip etmediği ile incelenebilir (Tüfekci, 2023).

Çalışmamızda *D. tenuifolia* toprak üstü kısımlarına ait ekstraktların QS etkinliği *C. violaceum* CV026 biyosensör suşunda viyolasin üretimi üzerine inhibitör etkinliği incelenmiştir. Çalışılan konsantrasyonlarda ekstraktların viyolasin pigment üretimini inhibe etmediği fakat biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkinliklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi test edilen konsantrasyonun yetersiz olması ya da bitkinin kimyasal içeriği olabilir.

Literatürde herhangi bir *Diplotaxis* türünün QS inhibitör aktivitesini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız viyolasin pigment üretiminin inhibisyonu ve anti-biyofilm özellikleri yönünden QS inhibitör aktivitesini araştıran ilk çalışmadır. Viyolasin inhibisyon etkinliğinde QS inhibisyonu saptanamazken, antibiyofilm etkinliği kontrole göre kısmen inhibe ettiği gözlenmiştir. Bunun sonucunda antibiyofilm ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. Bunlara ek olarak yabancı roka, Türkiye olmak üzere bazı ülkelerde hali hazırda salata ve garnitür olarak

kullanılmaktadır. Hatta Akdeniz ve Batı Asya bölgelerindeki yerli halk tarafından kocakarı ilacı olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu durum, çalışmamızda kullanılan bitki ekstraktlarının modern tıpta ilaç olma potansiyeli yönündeki avantajını kuvvetlendirmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *D. tenuifolia* bitki türünün toprak üstü kısımlarından izole edilen ekstraktlarının antikanser, antimikrobiyal ve anti-QS (viyolasin pigment inhibisyonu ve anti-biyofilm) aktiviteleri araştırılmıştır. Neticesinde *D. tenuifolia*’nın tüm EA ekstraktlarının ve maserasyon metodu ile hazırlanmış MeOH ekstraktının kanser hücrelerine karşı doza bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bağlamda *D. tenuifolia* bitkisinin yeni kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi adına önemli bir potansiyele sahip olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte *D. tenuifolia*’nın yalnızca ultrasonikasyon metodu ile hazırlanmış EA ekstraktının zayıf antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, başka ekstraktların antimikrobiyal etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Bu çalışma *Diplotaxis* türünün anti-QS aktivitelerini araştıran ilk çalışmadır. Fakat *D. tenuifolia* bitkisinden elde edilen ekstraktların çalışılan bu konsantrasyonlarda anti-QS aktivitesi tespit edilememiştir. İleriki çalışmalarda ekstraktların farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri incelenebilir, ekstraktlar sağlıklı hücre hatlarına karşı test edilebilir. Mevcut çalışmanın, bu bitki türüyle ilgili yapılacak olan yeni çalışmalara ön izleme oluşturması beklenmektedir.

Bitkiler, doğal kaynaklar olarak ilaç, gıda ve kozmetik gibi birçok sektörde ham madde kaynağı olarak kullanılabilir. İlaç sektöründe de kimyasal yöntemlerle geliştirilen sentetik ilaçlar yerine bitkisel kökenli ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli bitki türlerine ait farklı ekstraktların antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antidiyabetik etkilerini inceleyen pek çok araştırma mevcuttur.

Sonuç olarak, tıbbi bitkilerin birçok avantajına rağmen, güvenlikleri ve toksisiteleri konusunda bazı çekinceler bulunmaktadır. Tıbbi bitkilerden elde edilen ilaçların kullanımı ile ilgili toksikolojik sorunların göz ardı edilmesi, önemli sağlık problemlerine sebep olabilir. Bu nedenle güvenli kullanımları için daha ileri testlerin gerçekleştirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P., & Van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 172-179.
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
- ACIBUCA, V., & BUDAK, D. B. (2018). Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(1), 37-44.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200-214.
- Alkateeb, A. I. M., Tüfekci, E. F., Baloğlu, M. C., Zengin, G., Yıldızıtugay, E. & Çelik Altunoğlu, Y. (2022). Antibacterial effects of *Phlomis molucelloides* (Bunge) Salmaki. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25 (Ek Sayı 2), 402-410.
- Al-Majidi, S. M. (2014). Synthesis of some new 4-oxo-thiazolidines, tetrazole and triazole derived from 2-SH-benzothiazole and antimicrobial screening of some synthesized. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 893-901.
- American Type Culture Collection (2023). *PC-3 (ATCC® CRL-1435™)*.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Ahmad, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Umar, S., ... & Pereira, M. E. (2012). The plant family Brassicaceae: An introduction. *The plant family Brassicaceae: contribution towards phytoremediation*, 1-33.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Atta, E. M., Hashem, A. I., Ahmed, A. M., Elqosy, S. M., Jaspars, M., & El-Sharkaw, E. R. (2011). Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. *European Journal of Chemistry*, 2(4), 535-538.
- Avcı, M.K. 2009. Quorum sensing odaklı yenilikler ve biyoteknolojik uygulamalar, MBG 617 Biyoteknolojide yeni gelişmeler, ss 1-14
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.

- Bancroft, I. (2011). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (pp. 585-596). R. Schmidt (Ed.). New York:: Springer.
- Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(1), 73-85.
- Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 582-587.
- Bell, L., Oruna-Concha, M. J., & Wagstaff, C. (2015). Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC–MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry*, 172, 852-861.
- Ben Salah, N., Casabianca, H., Ben Jannet, H., Chenavas, S., Sanglar, C., Fildier, A., & Bouzouita, N. (2015). Phytochemical and biological investigation of two *Diplotaxis* species growing in Tunisia: *D. virgata* & *D. eruroides*. *Molecules*, 20(10), 18128-18143.
- Benzekri, R., Bouslama, L., Papetti, A., Snoussi, M., Benslimene, I., Hamami, M., & Limam, F. (2016). Isolation and identification of an antibacterial compound from *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. *Industrial Crops and Products*, 80, 228-234.
- Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World journal of clinical oncology*, 7(1), 54.
- Brownlie, D. (2007). Toward effective poster presentations: An annotated bibliography. *European Journal of Marketing*, 41(11/12), 1245-1283. doi:10.1108/03090560710821161.
- Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K., & Sarkar, S. (2014). Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer research*, 34(3), 1071-1077.
- Caruso, G., De Pascale, S., Nicoletti, R., Cozzolino, E., & Roupheal, Y. (2019). Productivity, nutritional and functional qualities of perennial wall-rocket: Effects of pre-harvest factors. *Folia horticultrae*, 31(1), 71-80.
- Caruso, G., Parrella, G., Giorgini, M., & Nicoletti, R. (2018). Crop systems, quality and protection of *Diplotaxis tenuifolia*. *Agriculture*, 8(4), 55.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- Cellat, K. (2011). Bazı endemik bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılması (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

- Ceylan, Ş., Saral, Ö., Özcan, M., & Harşit, B. (2017). Yaban mersininin (*Vaccinium myrtillus* L.) farklı çözücü ekstraktlarındaki antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 18(1), 21-27.
- Cho, E. J., Shin, J. S., Chung, K. S., Lee, Y. S., Cho, Y. W., Baek, N. I., ... & Lee, K. T. (2012). Arvelexin inhibits colonic inflammation by suppression of NF- κ B activation in dextran sulfate sodium-induced mice and TNF- α -induced colonic epithelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(30), 7398-7407.
- Costa, J., Pereira, R., Oliveira, J., Alves, Â., Marques-Magalhães, Â., Frutuoso, A., ... & Sá, R. (2018). Structural and molecular analysis of the cancer prostate cell line PC3: Oocyte zona pellucida glycoproteins. *Tissue and Cell*, 55, 91-106.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
- Davis, C. A., Pyrak-Nolte, L. J., Atekwana, E. A., Werkema Jr, D. D., & Haugen, M. E. (2010). Acoustic and electrical property changes due to microbial growth and biofilm formation in porous media. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 115(G3).
- Demircan G, Mater Y. (2019). Effects of fluorescent marked maackia amurensis-lectin-1 and wheat germ agglutinin on the cell surface glycan profiles in two different breast cancer cell lines. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 82(2), 89-95. doi:10.26650/IUITFD.429263
- DEVECİ, H. A., Gökhan, N. U. R., ali KIRPIK, M., HARMANKAYA, A., & YILDIZ, Y. (2016). Fenolik bileşik içeren bitkisel antioksidanlar. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1), 26-32.
- 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.
- Doğan Aytaç, K. *Deve çökerten (Tribulus terrestris L.) bitkisi bileşenlerinin farklı ekstraksiyon yöntemleriyle araştırılması* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü). Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Dongre, A., Rashidian, M., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Thiru, P., Zagorulya, M., ... & Weinberg, R. A. (2021). Direct and indirect regulators of epithelial–mesenchymal transition–mediated immunosuppression in breast carcinomas. *Cancer discovery*, 11(5), 1286-1305.
- 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.

- Durazzo, A., Azzini, E., Lazzè, M. C., Raguzzini, A., Pizzala, R., & Maiani, G. (2013). Italian wild rocket [*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.]: Influence of agricultural practices on antioxidant molecules and on cytotoxicity and antiproliferative effects. *Agriculture*, 3(2), 285-298.
- Ergul, M., & Bakar-Ates, F. (2021). Investigation of molecular mechanisms underlying the antiproliferative effects of colchicine against PC3 prostate cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 73, 105138.
- Erik, S. A. D. I. K., & TARIKAHYA HACIOĞLU, B. U. R. C. U. (2004). Türkiye florasi üzerine. *Kebikeç*, 9.
- European Collection of Authenticated Cell Cultures (EACC). Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424), June 2017
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023). Disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing version 11.0.
- Eylem, A. T. A. K., & Uslu, M. E. (2018). FENOLİK BİLEŞİKLER, EKSTRAKSİYON METOTLARI VE ANALİZ YÖNTEMLERİ. *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 3(27), 39-48.
- Falasca, M., & Linton, K. J. (2012). Investigational ABC transporter inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs*, 21(5), 657-666.
- Falleh, H., Msilini, N., Oueslati, S., Ksouri, R., Magne, C., Lachaâl, M., & Karray-Bouraoui, N. (2013). *Diplotaxis harra* and *Diplotaxis simplex* organs: Assessment of phenolics and biological activities before and after fractionation. *Industrial crops and products*, 45, 141-147.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Hashem, F. A., & Saleh, M. M. (1999). Antimicrobial components of some cruciferae plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(4), 329-332.
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in cell biology*, 14(11), 648-656.
- Houghton, S. C., & Hankinson, S. E. (2021). Cancer progress and priorities: breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 30(5), 822-844.
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1115-1129

- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20.
- Jahromi, S. G. (2019). Extraction techniques of phenolic compounds from plants. *Plant physiological aspects of phenolic compounds*, 1-18.
- Jdir, H., Khemakhem, B., Najjaa, H., Chakroun, M., Jridi, M., Ben Arfa, A., ... & Zouari, N. (2016). Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of the wild edible cruciferous: *Diplotaxis simplex*. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2111-2118.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1), 16-23.
- Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2015). Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one*, 10(8), e0135495.
- Kassem, M. E., Afifi, M. S., Marzouk, M. M., & Mostafa, M. A. (2013). Two new flavonol glycosides and biological activities of *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. *Natural product research*, 27(24), 2272-2280.
- Kilibarda, S., Vuković, S., Milinčić, D., Kostić, A. Ž., & Moravčević, Đ. (2024). Antioxidant Properties of Freshly Collected Leaves of *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. In *The 3rd International Electronic Conference on Plant Sciences* (pp. 95-95). MDPI.
- Koç, E. (2020). *Vicia bithynica* ve *V. cracca* subsp. *cracca*. bitkilerinin uçucu bileşenleri, uçucu yağ ve ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Konak, M., Merve, A. T. E. Ş., & ŞAHAN, Y. (2017). Yenilebilir yabani bitki *Gundelia tournefortii*'nin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(2), 101-108.
- Lambert, R. J. W. and Pearson, J. 2000. Susceptibility testing, accurate and reproducible minimum inhibitory concentration MIC. *Journal of applied microbiology*, 88(5):784-90.
- Lapa, M. R., Kırbaş, O. K., Bozkurt, B., Taşlı, P. N., Avcı, M. K., & Şahin, F. (2017). *Vaccinium myrtillus* (Yaban Mersini) kaynaklı Eksozomların İnsan Akciğer Karsinomu (A549 hücre hattı) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin MTT testi ile Araştırılması. 14. *İşgen International Molecular Biology And Genetics Winter School*.
- Lewis, T. C., Pizzitola, V. J., Giurescu, M. E., Eversman, W. G., Lorans, R., Robinson, K. A., & Patel, B. K. (2017). Contrast-enhanced Digital Mammography: A

- Single-Institution Experience of the First 208 Cases. *The breast journal*, 23(1), 67-76.
- Li, Y., Rizvi, S. M. A., Ranson, M., & Allen, B. J. (2002). 213Bi-PAI2 conjugate selectively induces apoptosis in PC3 metastatic prostate cancer cell line and shows anti-cancer activity in a xenograft animal model. *British Journal of Cancer*, 86(7), 1197-1203.
- Marrelli, M., Cristaldi, B., Menichini, F., & Conforti, F. (2015). Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 16-24.
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., ... & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703-3711.
- Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., & Wiart, C. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 55.
- Moghaddam, N. S., Eryılmaz, M., Altanlar, N., & Yıldırım, O. (2019). Antimicrobial screening of some selected Turkish medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*, 32(3), 947-951.
- Mohammed, M. M., El-Sharkawy, E. R., & Matloub, A. A. (2011). Cytotoxic flavonoids from *Diploaxis harra* (Forssk.) Boiss. growing in Sinai. *J. Med. Plants Res*, 5(20), 5099-5103.
- Morrey, C.B. 2013. The Fundamentals of Bacteriology, by Charles Bradfield Morrey — A Project Gutenberg eBook.
- Nasri, I., Chawech, R., Girardi, C., Mas, E., Ferrand, A., Vergnolle, N., ... & Racaud-Sultan, C. (2017). Anti-inflammatory and anticancer effects of flavonol glycosides from *Diploaxis harra* through GSK3 β regulation in intestinal cells. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 124-131.
- Neergheen, V. S., Baborun, T., Taylor, E. W., Jen, L. S., & Aruoma, O. I. (2010). Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 278(2), 229-241.
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M., & Sancho, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food chemistry*, 196, 1215-1223.
- O'Toole G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47), 2437.

- Oueslati, M., & Ben, T. L. (2021). Biosynthesis of gold nanoparticles by essential oil of *Diplotaxis acris* characterization and antimicrobial activities. *Orient. J. Chem*, 37, 405-412.
- Pane, C., Galieni, A., Riefolo, C., Nicastro, N., & Castrignanò, A. (2021). Hyperspectral reflectance response of wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) baby-leaf to bio-based disease resistance inducers using a linear mixed effect model. *Plants*, 10(12), 2575.
- Pedras, M. S. C., & Yaya, E. E. (2014). Tenualexin, other phytoalexins and indole glucosinolates from wild cruciferous species. *Chemistry & Biodiversity*, 11(6), 910-918.
- Radziejewska-Kubzdela, E., Olejnik, A., & Biegańska-Marecik, R. (2019). Effect of pretreatment on bioactive compounds in wild rocket juice. *Journal of food science and technology*, 56, 5234-5242.
- Ramirez, D., Abellán-Victorio, A., Beretta, V., Camargo, A., & Moreno, D. A. (2020). Functional ingredients from Brassicaceae species: Overview and perspectives. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1998.
- Ramos-Bueno, R. P., Rincón-Cervera, M. A., González-Fernández, M. J., & Guill-Guerrero, J. L. (2016). Phytochemical composition and antitumor activities of new salad greens: Rucola (*Diplotaxis tenuifolia*) and corn salad (*Valerianella locusta*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 197-203.
- Raza, A., Hafeez, M. B., Zahra, N., Shaukat, K., Umbreen, S., Tabassum, J., ... & Hasanuzzaman, M. (2020). The plant family Brassicaceae: Introduction, biology, and importance. *The Plant Family Brassicaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*, 1-43.
- Rodriguez, S. A., Vela Gurovic, M. S., Mulet, M. C., & Murray, A. P. (2006). *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., a source of a potentially antifungal essential oil containing nitrile.
- Romano, R., Pizzolongo, F., De Luca, L., Cozzolino, E., Rippa, M., Ottaiano, L., ... & Di Mola, I. (2022). Bioactive Compounds and Antioxidant Properties of Wild Rocket (*Diplotaxis tenuifolia* L.) Grown under Different Plastic Films and with Different UV-B Radiation Postharvest Treatments. *Foods*, 11(24), 4093.
- Roy, N. K., Bordoloi, D., Monisha, J., Anip, A., Padmavathi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2017). Cancer—An overview and molecular alterations in cancer. *Fusion genes and Cancer*, 1-15.
- Sadık, E. R. İ. K. (2012). Çok Yönlü Ruderal Bir Tur: *Diplotaxis tenuifolia* (L) DC. *Ankara Üniversitesi Çevrebilimleri Dergisi*, 4(1), 27-36.
- Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Beyatli, A., ... & Sharifi-Rad, J. (2019). Lamium plants—A comprehensive review on health benefits and biological activities. *Molecules*, 24(10), 1913.

- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm.
- Schauder, S., & Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes & development*, 15(12), 1468-1480.
- Sen, A., & Batra, A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *Int J Curr Pharm Res*, 4(2), 67-73.
- Sharif, K. O. M., Tufekci, E. F., Ustaoglu, B., Altunoglu, Y. C., Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., ... & Baloglu, M. C. (2021). Anticancer and biological properties of leaf and flower extracts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Food Bioscience*, 41, 101005.
- Shoeb, M. (2006). Anti-cancer agents from medicinal plants. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 1(2), 35-41.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, 56(1), 187-209.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387.
- Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. (2021). Breast cancer treatment. *American family physician*, 104(2), 171-178.
- 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.
- Tüfekci, E. F., Alkateeb, A., Akar, S., Çorum, O., Çelik Altunoğlu, Y., Baloğlu, M., Kiraz, M., & Çöplü, N. (2020). Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of giant fennel (*Ferula elaeochytris* Korovin) from the Hatay region. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 36(3), 214 - 220.
- URL-1. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Turpgiller> Erişim tarihi: 14/04/2024
- URL-2 https://species.wikimedia.org/wiki/Diplotaxis_tenuifolia Erişim tarihi: 03/10/2023
- URL-3<https://identify.plantnet.org/tr/k-world/flora/species/Diplotaxis%20tenuifolia%20%28L.%29%20DC./data> Erişim tarihi: 20/04/2024
- URL-4 <https://kocaelibitkileri.com/diplotaxis-tenuifolia/> Erişim tarihi: 20/04/2024
- URL-5 <https://www.drozdogan.com/turkiye-kanser-istatistikleri-2020/> Erişim Tarihi: 06/06/2024

- Vagia, E., Mahalingam, D., & Cristofanilli, M. (2020). The landscape of targeted therapies in TNBC. *Cancers*, 12(4), 916.
- van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Hessels, D., & Miller, G. J. (2001). Widely used prostate carcinoma cell lines share common origins. *The Prostate*, 47(1), 36-51.
- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 3(4), 200-201.
- Vetrivel, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P., Natchimuthu, S., Arunachalam, S., Kim, G.-S., & Murugesan, R. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. *Biologics*, 1(3), 312–336.
- Warwick, S. I. (2011). Brassicaceae in agriculture. *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*, 33-65.
- Welsh, J. (2013). Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In *Animal models for the study of human disease* (pp. 997-1018). Academic Press.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. (2008) Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nat Protoc* 3(2): 163–175.
- Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153(12), 3923-3938.
- World Health Organization <https://gco.iarc.fr/en/about-the-gco> Erişim Tarihi: 03/07/2024
- World Health Organization <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Erişim Tarihi: 15/10/2023
- Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Yalameha, B. (2018). Administration of herbal antioxidant to prevent and treatment of cancers. *Annals of Research in Antioxidants*, 3.
- Yılmaz, H. H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinc, A., Olcayto, E. Ö., Özgül, N., & Tuncer, M. (2011). Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. *Japanese journal of clinical oncology*, 41(1), 10-16.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423.

- Yorulmaz Salman, S., Saritas, S., Kara, N., Ay, R. (2014). Acaricidal and Ovicidal Effects of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (*Lamiaceae*) Extracts on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Tarim Bilimleri Dergisi*. 20. 358-367. doi:10.15832/tbd.63488.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(6), 2399-2403.
- Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., & Pan, J. (2020). Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 11, 589640.

