

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



**FARKLI METOTLAR VE ÇÖZÜCÜLERDEN ELDE EDİLEN *Heracleum humile* BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTI-BAKTERİYEL VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

**MUSTAFA ÖÇAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU**

**HAZİRAN - 2020**

**KASTAMONU**

## TEZ ONAYI

**Mustafa ÖÇAL** tarafından hazırlanan “**Farklı Metotlar ve Çözücülerden Elde Edilen *Heracleum humile* Bitki Ekstraktlarının Anti-Bakteriyel ve Sitotoksik Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **02.06.2020** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

<b>Danışman</b>	Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	Doç. Dr. Gökhan ZENGİN Selçuk Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU BAYARSLAN Kastamonu Üniversitesi	.....

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

## 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.*



**Mustafa ÖÇAL**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI METOTLAR VE ÇÖZÜCÜLERDEN ELDE EDİLEN *Heracleum humile* BİTKİ EKSTRAKTLARININ ANTİ-BAKTERİYEL VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

MUSTAFA ÖÇAL  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
DANIŞMAN:DOÇ. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

Bitkiler gibi doğal kaynaklardan ilaç geliştirme çalışmaları oldukça hız kazanmış durumdadır. Bu anlamda bitkiler ilaç hammadde kaynağı olarak görülmektedir. Bitkilerin çeşitli analizler ile etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda bu durum araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında, *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon, infüzyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının etkisi yapılan biyolojik aktivite testleri ile değerlendirilmiştir. Yapılan biyolojik aktivite testleri kapsamında DNA koruma ve antibakteriyel etkiler ile meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan DNA koruma analizi sonucunda, maserasyon yöntemi ile elde edilen etil asetat ve metanol ekstraktları ile infüzyon yöntemi ile elde edilen su ekstraktının 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda zayıf DNA koruma aktivitesi gözlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi etil asetat, metanol ve su ekstraktlarında DNA koruma aktivitesi görülmemiştir. Antimikrobiyal aktivite 4 Gram (+) ve 6 Gram (-) bakteri üzerinde mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri ile Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlar (MBK) belirlenmiştir. En etkili sonuç, maserasyon yöntemi ile elde edilen etil asetat ekstraktında *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) suşları üzerinde gözlenmiştir. Diğer ekstraktların negatif kontrol ile aynı etkiyi gösterdiği ya da negatif kontrolden daha yüksek konsantrasyonda etki gösterdiği belirlenmiştir. Sitotoksik aktivite analizi MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. En etkili sonuçlar; MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. saatte ultrasonikasyon yöntemi ile etil asetat ekstraktında (IC<sub>50</sub>:97,94 µg/mL), ardından MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. saatte ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktında (IC<sub>50</sub>:103,9 µg/mL) ve son olarak MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. saatte maserasyon yöntemi ile etil asetat ekstraktında (IC<sub>50</sub>:116,7 µg/mL) belirlenmiştir. Bulgular, düşük konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösteren ekstraktlar sayesinde kanser araştırmalarına ışık tutabilir. Bu ekstraktlar için yapılacak *in vivo* analizler ile canlı sistemdeki etkileri araştırılabilir.

**ANAHTAR KELİMELEER:***Heracleum humile*, DNA koruma, sitotoksisite, antibakteriyel

Haziran 2020, 107 Sayfa  
Bilim Dalı:923

## ABSTRACT

### MSC THESIS

#### A COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE ANTI-BACTERIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Heracleum humile* PLANT EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT METHODS AND SOLVENTS

MUSTAFA ÖÇAL

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING

SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. YASEMİN ÇELİK ALTUNOĞLU

Drug studies from natural sources such as plants have speed up. In this sense, plants are thought as a source of pharmaceutical raw materials. In studies where the effectiveness of plants is evaluated with various analyzes, this situation is investigated. In this thesis, the effects of ethyl acetate, methanol and water extracts obtained from the aerial parts of the *Heracleum humile* plant by maceration, infusion and ultrasonication methods were evaluated with biological activity tests. Within the scope of biological activity tests, DNA protection analysis, antibacterial testing and cytotoxic activity analysis in breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 were studied. As a result of DNA protection analysis, weak DNA protection activity was observed in concentrations of 5 and 10 mg/mL of water extract obtained by infusion method with ethyl acetate and methanol extracts obtained by maceration method. DNA protection activity was not observed in ethyl acetate, methanol and water extracts by ultrasonication method. Antimicrobial activity was performed by microdilution method on 4 Gram (+) and 6 Gram (-) bacteria. Accordingly, minimum inhibition concentration (MIC) values and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined. The most effective result was observed on *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) strains in ethyl acetate extract by maceration method. Other extracts showed their effects at same concentration with negative control or in a higher concentration than negative control. Cytotoxic activity analysis was performed by MTT test. The most effective results were determined on the MDA-MB-231 cell line at 48th hour by ultrasonication ethyl acetate extract (IC<sub>50</sub>:97.94 µg/mL), followed by the MCF-7 cell line at the 24th hour by ultrasonication ethyl acetate extract (IC<sub>50</sub>:103.9 µg/mL) and finally on the MDA-MB-231 cell line at 48th hour by maceration ethyl acetate extract (IC<sub>50</sub>:116.7 µg/mL). Findings may shed light on cancer researches because of extracts that exhibit cytotoxic activity in low doses. The effects of these extracts can be investigated on the living systems by *in vivo* analysis.

**KEYWORDS:** *Heracleum humile*, DNA protection, cytotoxicity, antibacterial

June 2020, 107 Page

Science Code:923

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen, deneyimlerini aktaran danışman hocam Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na; akademik bilgilerini benimle paylaşan ve bu anlamda destek olan Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU hocama teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında önerileri, bilgileri ve rehberliği ile yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU ve Dr. Şerife YERLİKAYA'ya, ekstraktların temin edilmesinde Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e ve beraber çalıştığımız bütün laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması, Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından KÜ-BAP01/2019-20 No'lu "Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen *Heracleum humile* bitki özütlerinin karşılaştırmalı olarak anti-bakteriyel, DNA koruma ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi" adlı proje ile desteklenmiştir. Çalışmayı destekleyen Kastamonu Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa ÖÇAL

Kastamonu, 2020

# 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
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>14</b>
1.1 <i>Heracleum humile</i> Türünün Botanik Bilgileri.....	16
1.1.1 Apiaceae Familyası.....	16
1.1.2 <i>Heracleum</i> L. Cinsi.....	17
1.1.3 <i>Heracleum humile</i> Türü Genel Bilgiler .....	18
1.2 Kanser Tanımı, Oluşumu ve Kanser Genleri .....	19
1.2.1 Meme Kanseri.....	20
1.2.1.1 Meme kanserinin moleküler düzeyde sınıflandırılması .....	21
1.2.1.2 Meme kanserinin tedavisi .....	23
1.3 DNA Koruma Aktivitesi .....	24
1.4 Antibakteriyel Aktivite.....	26
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>27</b>
2.1 <i>Heracleum</i> L. Cinsine ait Kanser Çalışmaları.....	27
2.2 <i>Heracleum</i> L. Cinsine ait Antimikrobiyal Çalışmaları.....	29
2.3 <i>Heracleum</i> L. Cinsine ait Antioksidan Çalışmaları.....	33
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>36</b>
3.1 Malzemeler.....	36
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri.....	36
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları.....	36
3.1.3 Bakteri Besiyerleri, Çözücüler ve Antibiyotikler .....	37
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları.....	37
3.1.5 Hücre Kültürü Kimyasalları.....	38
3.1.6 Kullanılan Cihazlar, Materyaller ve Sarf Malzemeler.....	38
3.2 Yöntemler.....	43
3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Elde Ediliş Yöntemleri.....	43
3.2.2 DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi .....	43
3.2.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	45
3.2.3.1 Bakteri besiyerlerinin hazırlanması .....	45
3.2.3.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması.....	45
3.2.3.3 Mikrodilüsyon analizi .....	45
3.2.4 Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi.....	46
3.2.4.1 Bitki ekstraktlarının hazırlanması .....	46
3.2.4.2 Hücre kültürünün devamlılığı .....	47
3.2.4.3 Hücre canlılık testi .....	47

<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>50</b>
4.1 Bitki Ekstraklarının DNA Koruma Aktivite Bulguları .....	50
4.2 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları .....	51
4.3 Bitki Ekstraklarının Sitotoksik Aktivite Bulguları .....	57
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>89</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>96</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>98</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>107</b>





## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1 <i>Heracleum humile</i> bitkisi .....	18
Şekil 4.1 DNA koruma analizi jel görüntüsü ve DNA koruma oranları.....	50
Şekil 4.2 DNA koruma analizi jel görüntüsü.....	51
Şekil 4.3 Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli .....	58
Şekil 4.4 Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli..	59
Şekil 4.5 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli .....	60
Şekil 4.6 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli .....	61
Şekil 4.7 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli..	63
Şekil 4.8 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli .....	64
Şekil 4.9 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli .	65
Şekil 4.10 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 görseli.	66
Şekil 4.11 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli .	68
Şekil 4.12 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 görseli.....	69
Şekil 4.13 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 görseli.	71
Şekil 4.14 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli .	72
Şekil 4.15 Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli.....	74
Şekil 4.16 Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli .....	75
Şekil 4.17 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli .....	76
Şekil 4.18 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli.....	77
Şekil 4.19 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli .....	78
Şekil 4.20 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli .....	79
Şekil 4.21 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli.....	81
Şekil 4.22 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli .....	82
Şekil 4.23 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli.....	83
Şekil 4.24 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli.....	85
Şekil 4.25 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli .....	86
Şekil 4.26 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli.....	88

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1</b> Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması.....	21
<b>Tablo 1.2</b> Radikal ve radikal olmayan oksijen ve azot türleri.....	25
<b>Tablo 3.1</b> Test edilen mikroorganizmalar .....	36
<b>Tablo 3.2</b> Deneylerde kullanılan cihazlar ve materyaller.....	38
<b>Tablo 3.3</b> Deneylerde kullanılan kimyasallar.....	41
<b>Tablo 4.1</b> Maserasyon EA ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	52
<b>Tablo 4.2</b> Maserasyon MetOH ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	53
<b>Tablo 4.3</b> Ultrasonikasyon EA ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	54
<b>Tablo 4.4</b> Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları.....	55

## GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Grafik 4.1</b> Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı .....	59
<b>Grafik 4.2</b> Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı .....	60
<b>Grafik 4.3</b> İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 .....	61
<b>Grafik 4.4</b> Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	62
<b>Grafik 4.5</b> Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	64
<b>Grafik 4.6</b> İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	65
<b>Grafik 4.7</b> Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı .....	66
<b>Grafik 4.8</b> Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı .....	68
<b>Grafik 4.9</b> Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı .....	69
<b>Grafik 4.10</b> Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	70
<b>Grafik 4.11</b> Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	72
<b>Grafik 4.12</b> Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı .....	73
<b>Grafik 4.13</b> Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	75
<b>Grafik 4.14</b> Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	76
<b>Grafik 4.15</b> İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	77
<b>Grafik 4.16</b> Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı .....	78
<b>Grafik 4.17</b> Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı .....	80
<b>Grafik 4.18</b> İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı canlılık .....	81
<b>Grafik 4.19</b> Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	82
<b>Grafik 4.20</b> Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	83
<b>Grafik 4.21</b> Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı .....	85
<b>Grafik 4.22</b> Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı .....	86
<b>Grafik 4.23</b> Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı .....	87
<b>Grafik 4.24</b> Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı .....	89

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

cm	: Santimetre
kHz	: Kilohertz
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrad Derece
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak

### Kısaltmalar

ABTS	: 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikril hidrazil
EA	: Etil asetat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetic asit
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine (Sığır) Serum
FeCl <sub>3</sub>	: Demir (III) Klorür
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidrojen Klorür
MetOH	: Metanol
M.Ö	: Milattan Önce
NEAA	: Esansiyal Olmayan Amino Asit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PR	: Progesteron Reseptörü
PTEN	: Fosfataz ve Tensin homolog
p53	: Tümör protein 53

<b>RAS</b>	: Sıçan Sarkomu
<b>RAT</b>	: Reaktif Azot Türleri
<b>Rb</b>	: Retina Blastoma
<b>RKT</b>	: Reaktif Kükürt Türleri
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat



## 1. GİRİŞ

Çok eski çağlardan bu yana insanlar çeşitli hastalıkların tedavisi ve beslenme gibi temel ihtiyaçlarını karşılamak için doğadan faydalanmaktadır. İnsanlar yüzyıllardır geleneksel olarak tıbbi amaçlar için bitkileri kullanmaktadır. M.Ö. 2600 yılındaki kayıtlara göre Mezopotamya bölgesinde yaklaşık olarak 1000 kadar bitkisel ürünün kullanıldığı kaydedilmiştir. Mısır tıbbına ait kayıtlar ise M.Ö. 2900 yıllarına dayanmaktadır ancak tıbbi bitkiler ile ilgili bilinen en eski kayıt M.Ö. 1500'li yıllara ait olan Ebers tıp papirüsü'dür. Bu papirüste kaydedilen bilgilere göre o dönem için bitkisel kaynaklı 700'den fazla ilacın kullanıldığı bilinmektedir (Cragg ve Newman, 2013).

18. yüzyıla kadar şifalı bitkilerin farmakolojik aktiviteleri ve aktif bileşenleri hakkında klinik veriler yoktu. Ancak deneme yanılma yolu ile bitkilerin şifa kaynağı olup olmadığı anlaşılmaktaydı. Aconitum ve colchicum gibi zehirli bitkileri araştıran Anton von Störck ve ödem tedavisi için yüksük otu (Digitalis) bitkisi üzerinde çalışan William Withering, klinik araştırmaların temelini atmıştır. Bitkilerden klinik yöntemler ile ilaç keşfi 19. yüzyıl başlarında afyon bitkisinden morfinin izole edilmesi ile başlamıştır. Bu keşif, diğer birçok tıbbi bitkinin de araştırılmasını tetikleyerek, biyolojik olarak aktif kodein, atropin, kinin gibi çeşitli alkaloid yapıların izole edilmesini sağlamıştır (Atanasov vd. 2015).

Günümüzde ise doğal ürünler modern ilaç geliştirme çalışmalarında özellikle antibakteriyal ve antitümör ajanlar olarak gittikçe daha önemli bir rol almaktadır. Sentetik ürünler, düşük üretim maliyeti, kolay kalite kontrolü ve hızlı etki göstermesi sebepleri ile cazip ürünler olarak düşünülse de güvenlik ve sağladığı yarar açısından her zaman şüpheli kalmaktadır. Bu durum gelişen dünyada toplam nüfusun % 80'inden fazlasının, güvenliği ve etkinliği sebebiyle doğal ürünlere ihtiyacının olduğunu göstermiştir. Açıkça bellidir ki gelecek yıllarda da doğal ürünler ilaç geliştirme çalışmalarında ve araştırmalarında son derece önemli kaynaklar olarak kullanılacaktır. Doğal ürünler tıbbi uygulamalarda doğrudan ilaç olarak kullanılabilirdiği gibi yeni ilaçların tasarımı ve sentezi için kimyasal bir model de oluşturmaktadır. İlaç

araştırmalarında bilgisayar tabanlı moleküler modelleme ve kombinatoryal (bütünleştirici) kimya gibi yeni yöntemler uygulanmasına rağmen sentetik ilaçların temel yapısının ve kimyasal modelinin oluşturulmasında tıbbi bitkiler kaynak alınır (Veeresham, 2012).

Dünya çapında geleneksel ve modern tıpta tedavi amaçlı kullanılan 50 000 ile 75 000 kadar bitki türünün varlığı bilinmektedir. Ülkemiz, bitki çeşitliliği ile dünyada en zengin floraya sahip ölkelerden biridir. Ülkemiz florası on bin kadar damarlı bitki türü içermektedir. Bu floranın da yaklaşık olarak üçte biri Türkiye'ye özđü endemik türlerden oluşmaktadır. Türkiye'de 1000 kadar bitki türünün tıbbi amaçlar için kullanıldığı tahmin edilmektedir. Hem tıbbi hem aromatik olarak 200 kadar bitki türünün varlığı bilinmekte olup aynı zamanda bu bitkilerin iyi bir ilaç potansiyeli olduğu düşünölmektedir (Demirci ve Özhatay, 2012; Akbulut ve Bayramoğlu, 2013).

Bu tez çalışmasında, ölkemiz florasında bulunan *Heracleum humile* bitkisinin biyolojik aktivite etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna göre *Heracleum humile* bitkisinden maserasyon, infüzyon ve ultrasonikasyon gibi farklı yöntemler ile elde edilmiş metanol, etilasetat ve su ekstraktlarının pUC19 plazmiti kullanılarak DNA koruma etkisi, hücre canlılık testi (MTT) ile sitotoksik aktivitesi ve mikrodilüzyon testi ile de antibakteriyel etkisi tez kapsamında çalışılmıştır.

## 1.1 *Heracleum humile* Türünün Botanik Bilgileri

### 1.1.1 Apiaceae Familyası

Apiaceae, yaklaşık olarak 300-450 arası cins ve 3000-3700 arasındaki tür sayısı ile dünya genelinde yayılış gösteren en büyük familyalardan biridir. Daha yaygın olarak ılıman bölgelerde bulunmakla birlikte tropik iklimlerde nadir olarak olarak yetişmektedir. Bu familyaya ait 109 cins ve 450 tür Türkiye'de de bulunmaktadır. Apiaceae çiçekli bitkilerin en bilinen ailelerinden biri olup, meyve ve yapraklarındaki uçucu bileşikler sebebiyle kendine özgü tatları olan aromatik bitkilerdir. Apiaceae familyası basit veya bileşik umbel şeklinde karakteristik bir çiçeklenme gösterir. Bu özelliği en belirgin ve en ayırt edici olanıdır. Dışa doğru iki taraflı simetrik açan çiçekler ile tek bir bütün çiçekmiş görünümü verirler (Yılmaz vd. 2009; Ebadollahi, 2013).

Apiaceae familyası bir ya da çok yıllık otsu ve nadiren çalimsı bitkilerden oluşur. Yaprakları genel olarak alternant bazen karşılıklı veya halka şeklinde dizilmiş, palmat ya da pinnat parçalı veya basit stipulasızdır. Brakte ve brakteollerin her ikisi de bulunabildiği gibi ikisi de eksik olabilir. Çiçekleri epigin, hermafrodit veya tek eşeyli olabileceği gibi bitki bazen dioik olabilir. Sepaller küçük veya bazen eksiktir. Petaller 5 adet genellikle uç kısımları geriye doğru kıvrılmış olup beyaz, sarı, sarımsı yeşil, açık mavi veya pembe renklerde olabilir. Stamenler 5 tane, ovaryum 2 lokuslu ve karpelli, her lokusta birer ovül bulunur. Meyve olgunlukta merikarpa ayrılan şizokarptır. Merikarplar korporfor olarak adlandırılan bir sapla birbirine bağlanır. Her bir merikarpın sırtında 5 adet kosta adı verilen çıkıntı bulunur. Reçine gibi salgı kanalları çoğunlukla mevcuttur (İşcan, 2002).

Bu familyaya ait bitkiler gıda, kozmetik ve sağlık gibi alanlar olmak üzere birçok amaç için kullanılabilir. Terpenoidler, triterpenoid saponinler, flavonoidler, kumarinler, poliasetlenler ve steroidler gibi fitokimyasallar bu familyaya ait bitkilerin içeriğinde oldukça bol bulunmaktadır. Bu sebeple bu aile üyeleri potansiyel ilaç kaynağı olarak görülmektedir. Ayrıca, bu ailenin bazı türlerinin mükemmel bir uçucu yağ kaynağı olduğu belirtilmiştir. Bu familyadaki uçucu yağlarda, farmasötik olarak öneme sahip



farklı kimyasal sınıflardan 760'dan fazla bileşenin bulunduğu söylenilmiştir (Sayed-Ahmad vd. 2017).

### 1.1.2 *Heracleum* L. Cinsi

*Heracleum* cinsinin bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Çil, 2010):

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Üstbölüm: Spermatophyta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Rosidae

Takım: Apiales

Aile: Apiaceae (Umbelliferae)

Altaile: Apioideae

Cins: *Heracleum* L.

*Heracleum* L. cinsi apiaceae familyasının en büyük cinslerinden biridir. 120'den fazla tür içeren bu cins yaygın olarak Kuzey yarımkürede çoğunlukla da Avrasya bölgesinde yayılım göstermektedir. İran'da 10, Çin'de 29 ve Kafkas dağlarında 26 tür *Heracleum* L. cinsine ait bitki bulunmaktadır. Ülkemizde ise bu cinsin 17 türü yetişmektedir. *H. mantegazzianum*, *H. sosnowskyi* ve *H. persicum* gibi türler Avrupa kıtasının genelinde yayılım göstermiştir. Bu yüzden bu türler istilacı türler olarak da adlandırılır (Bahadori vd. 2016).

*Heracleum* L. cinsi bitkileri genel özellikleri itibariyle boyları uzun ya da kısa olabilen çok yıllık veya monokarpik aromatik bitkilerdir. Yapraklar basit ve loblu veya pinnat parçalı olabilir. Sepaller küçük olup, petaller beyaz veya soluk yeşil renklerde olabilir. Meyveler dikenli veya küçük tüysüz olabilir (Davis, 1972).

### 1.1.3 *Heracleum humile* Türü Genel Bilgiler

*Heracleum humile* bitkisinin bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Çil, 2010):

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Üstbölüm: Spermatophyta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Rosidae

Takım: Apiales

Aile: Apiaceae (Umbelliferae)

Cins: *Heracleum* L.

Tür: *Heracleum humile* Sm.



Şekil 1.1 *Heracleum humile* bitkisi (Çil, 2010)

*Heracleum humile* çok yıllık otsu bir bitki olup 20-60 cm'ye kadar büyüyebilir. Kayalık yamaçlar ve kalkerli platolar doğal habitatlarıdır. Temmuz ve Ağustos ayları çiçeklenme zamanlarıdır. *H. humile* bitkisi, 1600 metreden 3000 metre yüksekliğe kadar yetişebilmekte olup, endemik bir tür değildir. Dünya'da Lübnan ve çevresi Suriye, İsrail gibi ülkeler ile Türkiye'de de yayılım göstermiştir. Ülkemizde güney, kuzey ve orta bölgelerde bulunmaktadır. Geleneksel tıpta, bu türün topraklanmış kökü yılan ısırıklarının tedavisinde, bağırsak solucanlarının sebep olduğu karın ağrılarında ve ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca geleneksel olarak sinir hastalıkları tedavisinde de kullanımı bulunmaktadır. *H. humile* bitkisi süt verimini arttırdığı için keçiler için iyi bir besin kaynağı olarak düşünülmektedir (Davis, 1972; Arnold vd. 2015).

## **1.2 Kanserin Tanımı, Oluşumu ve Kanseri Genleri**

Hücreler bölünme mekanizmalarının kontrolünü çeşitli etmenler sonucu kaybedebilir. Hücrelerin aşırı ve düzensiz çoğalması ile vücudumuzda iyi ya da kötü huylu tümörler oluşur. İyi huylu tümörler olduğu bölgede kalıp, vücuda yayılmayan ve cerrahi müdahale ile alınıp, uzaklaştırılabilen tümörlerdir. Kötü huylu tümörler ise olduğu yerden başka dokulara yayılan, kansere sebep olan, agresif yapılı hücrelerin oluşturduğu tümörlerdir. İyi ve kötü huylu tümörler oluştukları yerdeki hücre tipine göre karsinomlar, sarkomlar ve lenfomalar olarak 3 ana grupta sınıflandırılır. Karsinomlar, epitel doku hücrelerinin sebep olduğu kanser türleridir. Sarkomlar kas, kemik, kırık ve lifli yapılarda oluşan kanser tipleridir. Lenfomalar ise kırmızı kan hücreleri ile bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklı oluşan kanserlerdir (Cooper, 2000).

Tümörleşme, tek bir hücredeki genetik değişikliğin kontrolsüz çoğalmaya sebep olması ile başlar ve yeni mutasyonların oluşması ile de büyümeye devam eder. Bu mutasyonların bir kısmı hücreye hızlı büyüyüp, çoğalma ve başka dokulara yayılabilme (metastaz) gibi üstün özellikler kazandırır. Bu hücreler tümörde baskın hale gelir ve bu olay klonal seleksiyon olarak adlandırılır. Klonal seleksiyon, tümörün hızlı büyüyüp, çoğalmasına ve daha da agresif olmasına sebep olarak tümörün oluşumu, gelişimi boyunca devam eder (da Costa, 2001) .

Kansere sebep olan maddeler kanserojen olarak adlandırılır. Radyasyon, kimyasallar, virüsler hepsi DNA hasarına ve mutasyona sebebiyet vererek kanser oluşumunu tetikleyen etmenlerdir. Kanserleşme, bu maddelerin iki gen grubunda genetik değişikliklere sebep olması ile oluşur. Bu gen grupları proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Normalde hücre büyümesini, çoğalmasını teşvik eden proto-onkogenler mutasyonlar ile onkogenlere dönüşür ve bu onkogenler kontrolsüz şekilde hücrelerin çoğalmasına sebep olur. Tümör baskılayıcı genler ise onkogenlerin tersi olarak normalde hücre büyümesini ve çoğalmasını kontrol altında tutan gen grubudur. Onkogenler, nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu ve kromozom translokasyonu gibi aktivasyon mekanizmaları ile oluşabilir. Ras, c-myc ve erbB-2 genleri onkogenlere örnek olarak verilebilir. Tümör baskılayıcı genlere örnek ise p53, PTEN, ve Rb genleri gösterilebilir (Cooper, 2000).

### **1.2.1 Meme Kanseri**

Meme kanseri küresel çapta, akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser tipi olmakla birlikte, kadınlarda en yaygın görülen kanser çeşididir. Çoğunlukla 50 yaş üstü kadınlarda ortaya çıkan meme kanseri, günümüzde gittikçe daha erken yaşlarda görülmeye başlamıştır (Kozan ve Tokgöz, 2016; Aydın ve Ercan, 2017).

Meme kanseri, çeşitli risk faktörleri ve klinik özellikleri ile heterojen bir hastalık olarak değerlendirilir. Menarş yaşı, menopoz yaşı, yapılan ilk doğum yaşı ve ailesel geçmiş görülen meme kanseri vakalarının yarısında bilinen risk faktörleridir. Erken menarş ve geç menopoz vücudun uzun süre östrojen hormonuna maruz kalmasına sebep verdiği için hastalık riskini arttırmaktadır. İlk canlı doğum yaşı da risk faktörlerinden olup, 30 yaşından sonra doğum yapan kadınlarda 20'li yaşlarda doğum yapan kadınlara göre meme kanseri riskinin iki kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Görülen meme kanseri vakalarının %5'i ile %10'u kalıtsaldır. BRCA genleri DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü ve transkripsiyon gibi bir hücre için hayati öneme sahip işlevleri gerçekleştiren proteinleri kodlamaktadır. Üreme hücrelerindeki BRCA genlerinin mutasyonları, meme kanserinin kalıtsal aktarımı ile ilişkilidir. İlerleyen yaş, alkol kullanımı ve radyasyona maruz kalma diğer meme kanseri risk faktörleridir (McPherson vd. 2000; İşlen, 2018).

### 1.2.1.1 Meme kanserinin moleküler düzeyde sınıflandırılması

Klinik ve epidemiyolojik kanser araştırmalarının temel amaçları, erken tanı, tedavi yönteminin seçimi ve kanserden korunma yollarının belirlenmesinde yeni biyolojik belirteçler keşfetmektir. Bu amaçlarla, gelişen yeni nesil dizileme teknikleri ve moleküler analizler sayesinde meme kanseri 5 farklı biyolojik alt tipe ayrılmıştır. Bu alt tipler, luminal A, luminal B, HER2, bazal benzeri meme kanseri ve normal benzeri meme kanseri olmak üzere 5 moleküler gruptur (Barnard vd. 2015). Bu alt tiplerin özelliklerini incelediğimizde,

Tablo 1.1 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması (Feng vd., 2018)

<b>Sınıflandırma</b>	<b>Moleküler Profil</b>	<b>Özellikler</b>	<b>Tedavi Yöntemleri</b>
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, düşük Ki67	İyi prognoz, görülme sıklığı %70	Endokrin tedavi ve hedef odaklı tedavi
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, Yüksek Ki67	Prognoz luminal A kadar iyi değil, Görülme sıklığı %10-%20	Endokrin tedavi ve hedef odaklı tedavi
HER2	ER-, PR-, HER2+	5%–15%, genellikle kötü prognoz	Hedef odaklı tedavi
Bazal Benzeri	ER-, PR-, HER2-	Görülme sıklığı 15%–20% Kötü prognoz	Sınırlı hedef odaklı tedavi
Normal Benzeri	ER+, PR±, HER2-, Düşük Ki67	Nadir görülür	Endokrin tedavi ve hedef odaklı tedavi

**Luminal A tipi meme kanseri:** Luminal A tipi tümörlerde östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü pozitif (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) negatiftir. Ki67 seviyesi ise düşüktür. Luminal A tipi meme tümörleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %40 ile %70'ini kapsar. Luminal A tipi tümörler yavaş büyümesi sebebi ile en iyi prognoza sahip olma eğilimindedirler. MCF-7 meme kanseri hücre hattı, luminal A tipi meme kanseri hücre hatlarından birine örnek verilebilir. Günümüzde dünyada meme kanseri çalışılan laboratuvarlarda kullanılan, standart bir modeldir (İşlen 2018).

**Luminal B tipi meme kanseri:** Luminal B tipi tümörler, bütün meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Luminal B tümörleri ER-pozitif olma eğiliminde olup, PR pozitif ve negatif olabilir. HER2-negatif veya pozitif, Ki67 seviyeleri yüksek indekse sahiptir. Luminal B kanserleri, Luminal A kanserlerinden birazcık daha hızlı gelişir ve prognozları biraz daha kötü olma eğilimindedir (Feng vd. 2018).

**HER 2 tip meme kanseri:** HER2 tipi tümörler, ER ve PR negatiftir. Meme kanserlerinin yaklaşık yüzde %10-15'i HER2 tipi tümörlerdir. HER2 tipi kanserler, luminal tipi kanserlerden daha hızlı büyür ve genel olarak daha kötü bir prognoza sahiptir. HER2 tipi tümörlerin çoğu HER2-pozitif olup, bu yüzden HER2 pozitif alt tipi olarak adlandırılır ancak tümörlerin yaklaşık %30'u HER2 negatiftir (Eliyatkin vd. 2015; İşlen, 2018) .

**Bazal benzeri meme kanseri:** Meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturan bu alt tipte ER, PR ve HER2 negatiftir. BRCA1 geninde mutasyon olan kadınlarda daha yaygın görülmektedir. Tümörün hızlı büyüme eğilimi, bu alt tipin diğer alt tiplere göre daha agresif özellik ve kötü prognoz göstermesine sebep olmaktadır (Eliyatkin vd. 2015).

**Normal benzeri meme kanseri:** Bu alt tipte ER pozitif, PR negatif ya da pozitif, HER2 ise negatiftir. Ki67 proliferasyon indeksi düşüktür. Luminal A tipiyle benzerlik göstermesine rağmen luminal A tipinden biraz daha kötü prognoz sergilemektedir (Feng vd. 2018).

### 1.2.1.2 Meme kanserinin tedavisi

Meme kanseri tümörleri, hormon reseptör seviyelerindeki farklılık, çeşitli onkogen aktivasyonları ve tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyonların kombinasyonu sonucunda heterojen özellik gösteren tümörlerdir. Bu özellikler meme kanserinin tedavisini zor hale getirir de, tanı ve tedavide geliştirilen yeni yöntemler ile ölüm oranlarında belirgin bir azalış gözlenmiştir. Radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi ve son dönemlerde çalışılan, hedefe yönelik tedavi yöntemleri ile meme kanserinin önlenmesi, tekrarlamaması amaçlanmaktadır. Tedavi yöntemlerinin seçilmesinde, geliştirilmesinde, tümör çapı, hasta yaşı, hormon reseptörlerinin düzeyi belirleyici rol oynamaktadır (Güneş vd. 2012; Keskin, 2019).

Meme kanseri tedavisinde, hormon sentez inhibitörleri, hormon reseptör antagonistleri kullanılarak hormonal terapiler geliştirilmekte ve bu tedaviler meme kanserinin alt tiplerine göre etkili olabilmektedir. Hormonal tedaviler kapsamında östrojen seviyesini düşüren, hormonların reseptörlerine bağlanmasını engelleyen moleküller ve ilaçlar geliştirilmektedir. Hedefe yönelik tedavilerin büyük bir çoğunluğu da meme kanseri alt tiplerinin gösterdiği fenotipe göre hücre içi ya da hücre yüzey reseptörlerine yönelik geliştirilen tedavilerdir (Cleator vd. 2007; Baykara, 2016).

Tedavide kemoterapi de klasik ve etkili bir yöntem olmakla birlikte, hormonal tedavilere göre yan etkileri daha fazladır. Hastaların bu yan etkilerden korunabilmesi için gıda maddesi olarak bazı doğal bileşikler tüketmesi, kullanması alternatif bir seçenek olabilir. Öte yandan kemoterapi kadar klasik ve etkili bir yöntem olan radyoterapinin de erken evredeki meme kanserinden ölümleri ve tekrarlama oranlarını azalttığı söylenebilir ancak radyoterapi sonrasında hastalarda iskemik kalp hastalığı riskinin artabildiği gözlenmiştir (Yallapu vd. 2012; Darby vd. 2013).

İmmünoterapi ise yine meme kanseri ve diğer kanser türlerinin de tedavisinde kullanılan, bağışıklık sistemini harekete geçirerek kanser hücrelerinin yok edilmesini amaçlayan diğer bir tedavi yöntemidir. Bu yöntemde antikorlar, spesifik olmayan kanser immünoterapileri ve kanser aşılı kullanılarak 3 farklı yolla tedavi sağlanmaktadır. Monoklonal antikorlar, hücrenin iç ve dış sinyallerini bozarak, immün

sistemi harekete geçirirler veya üretilen ilaçları hücelere taşıyarak etki gösterirler. Monoklonal antikorların aksine spesifik olmayan kanser immunoterapileri ise immün sistemi uyarır ancak belli bir türdeki hücreyi hedeflemez böylece destek tedavi olarak bağışıklık sistemini hızlandırır. Kanser aşuları ise geleneksel aşular gibi zayıflatılmış molekülleri kullanarak bağışıklık sistemini harekete geçirir. Geleneksel aşılardan farklı olarak burada hedef olan kanser hücreleridir (Baykara, 2016).

### **1.3 DNA Koruma Aktivitesi**

En dış yörüngesinde eşleşmemiş bir veya birden fazla elektron bulunduran moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. Serbest radikaller eşleşmemiş elektronları sebebiyle kararsız bir yapıya sahip olup oldukça reaktif moleküllerdir. Bu yüzden kolayca tepkimeye girerek, oluşturdukları toksik etki sebebiyle etrafındaki DNA, protein ve lipit yapılarına zarar verirler. Böylece hücre ölümü, doku hasarı ve organ yetersizliği gibi durumlar oluşarak hızlı yaşlanma, kanser, diyabet, kalp-damar hastalıkları, Alzheimer gibi çeşitli kronik hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Lobo vd. 2010). Serbest radikallerin hücre içinde aşırı birikmesi oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres DNA üzerinde yeni bazların eklenmesine ve bazların tekrar düzenlenmesine sebep olarak karsinojen etkilere neden olmaktadır (Valko vd. 2006). Serbest radikaller hücre içinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda oluşabildiği gibi hava kirliliği, toksik kimyasallar, ağır metaller, çeşitli ilaçlar, radyasyon ve sigara gibi dış faktörlere bağlı olarak da oluşabilir (Pham-Huy vd. 2008). Serbest radikaller oksijen kaynaklı reaktif oksijen türleri (ROT), azot kaynaklı reaktif azot türleri (RAT), kükürt kaynaklı reaktif kükürt türleri (RKT) ve klor kaynaklı reaktif klor türleri (RKT) olmak üzere dört grupta incelenmektedir. ROT ve RAT'ın bir kısmı serbest radikallerden oluşmaktayken bir kısmı ise kolayca serbest radikallere dönüşebilen radikal olmayan bileşiklerden oluşur (Altuntaş, 2012; Badem, 2019).



Tablo 1.2 Radikal ve radikal olmayan oksijen ve azot türleri (Altuntaş, 2012; Badem, 2019)

Radikal Türler		Radikal Olmayan Türler	
Reaktif oksijen türleri (ROT)	Azot kaynaklı reaktif azot türleri (RAT)	Oksijen türleri	Azot kaynaklı türler
• Hidroksil ( $\text{OH}\cdot$ )	• Nitrik oksit ( $\text{NO}\cdot$ )	• Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	• Nitroz asit ( $\text{HNO}_2$ )
• Süperoksit ( $\text{O}_2\cdot^-$ )	• Azot dioksit ( $\text{NO}_2\cdot$ )	• Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )	• Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ )
• Peroksit ( $\text{RO}_2\cdot$ )		• Ozon ( $\text{O}_3$ )	• Nitrozil katyonu ( $\text{NO}^+$ )
• Alkoksi ( $\text{RO}\cdot$ )		• Hipoklorik asit ( $\text{HOCl}$ )	• Nitroksi anyonu ( $\text{NO}^-$ )
• Tiyol ( $\text{RS}\cdot$ )		• Lipit peroksit ( $\text{LOOH}$ )	• Dinitrojen trioksit ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )
• Tiyil peroksit ( $\text{RSO}_2$ )			• Peroksinitroz asit ( $\text{ONOOH}$ )

Serbest radikal türleri canlılarda normal olarak hücrel metabolizma sonucunda oluşan bileşiklerdir. Düşük konsantrasyonlarda oluştuğunda, hücrel cevapların oluşmasını tetikleyerek yarar sağlarlar ancak canlılarda serbest radikallerin oluşumu ve yıkımı arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres veya nitrosatif stres dediğimiz biyolojik zarar ortaya çıkar. Sonuç olarak da bu durum birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep verir (Altan, 2014). Serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu vücutta bulunan antioksidanlar devreye girer. Antioksidanlar etkilerini serbest radikalleri doğrudan temizleyerek, oluşumunu baskılayarak, metal iyonlarını bağlayarak ya da bu radikallerin zarar verdiği organik molekülleri temizleyip, tamir ederek gösterirler (Deniz, 2016). Günümüzde antioksidanlar, doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik etkileri ve insan sağlığına zararları sebebi ile doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır (Lobo vd. 2010).

#### 1.4 Antibakteriyel Aktivite

Bilim ve teknolojide gerçekleşen önemli ilerlemeler sayesinde geçmişten günümüze birçok doğal ve sentetik ilaç keşfi yapılmıştır. Antibiyotikler de bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilmiş, 20. Yüzyılın en önemli ilaç keşiflerindedir. Ancak günümüzde, bilinen enfeksiyon hastalıklarının yalnızca 3'te 1'i sentetik olarak üretilen bu antibiyotikler ile tedavi edilebilmektedir. Bunun nedeni ise insanların antibiyotikleri düzensiz ve yanlış kullanması sonucunda patojen bakterilerin üretilen ilaçlara karşı direnç kazanmasıdır (Sen ve Batra, 2012).

Günümüzde de patojenlerin ilaçlara karşı geliştirdiği direnç artmakta olup, buna karşın yeni antimikrobiyal ajanlar araştırılmaktadır. Bu araştırmalara bağlı olarak daha hızlı sonuç veren, etkisi daha iyi anlaşılabilen ve daha az maliyetli antimikrobiyal aktivite testleri de kullanılmakta ve geliştirilmektedir. Disk difüzyon testleri, dilüsyon testleri, sitoflorometrik ve biyoluminesans yöntemleri antibakteriyel aktiviteyi belirlemek için kullanılan metotlardır. Disk difüzyon testleri, dilüsyon testleri yaygın olarak kullanılan testler olup, sitoflorometrik ve biyoluminesans yöntemleri ise standardizasyon ve tekrarlanabilirlik için özgün materyaller gerektirmektedir. Bunun için yaygın bir kullanıma sahip değildir (Balouiri vd. 2016).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatür araştırmaları kapsamında bu cinse ait türlerin birçok etnobotanik kullanım alanı olduğu görülmüştür. Yapılan birçok çalışma, *Heracleum* cinsinin antimikrobiyal, anikanser, antioksidan ve antienflamatuvar gibi dikkat çekici biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir.

### 2.1 *Heracleum* L. Cinsine ait Kanser Çalışmaları

Doğal ürünlerin kanser çalışmalarındaki öneminin artması ile *Heracleum* üyelerinin kanser hücrelerine karşı etkisini değerlendirmek için de birçok sitotoksik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Firuzi ve arkadaşları (2010), *Heracleum* cinsinden *H. pastinacifolium*, *H. persicum*, *H. rechingeri* ve *H. transcaucasicum* türlerinin, HeLa (serviks adenokarsinom), LS180 (insan kolon adenokarsinom) ve Raji (Burkitt lenfoma B lenfosit) hücre hatları üzerindeki etkisini araştırmıştır. Miristisin, (E) - anethol, heksil bütanoat ve elemisin bileşikleri sırası ile bu türlerde en fazla bulunan temel bileşikleridir. *H. pastinacifolium* ve *H. transcaucasicum* türleri miristisin bileşiğinin etkisi ile 3 hücre hattında da güçlü sitotoksik aktiviteler gösterirken, *H. rechingeri* türü sadece LS180 hücre hattında aktivite göstermiştir. *H. persicum* türü ise sitotoksik aktivite göstermemiştir.

Başka bir çalışmada, *Heracleum sphondylium* L. türünün bir alt türü olan *Heracleum ternatum* (Velen.) bitkisinin uçucu yağları ile bu yağların içeriğinde bulunan oktil asetat ve oktil bütirat bileşiklerinin MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinom hücre hattı), T98G (insan glioblastoma multiform hücre hattı), A375 (insan malign melanom hücre hattı) ve HCT116 (insan kolon karsinom hücre hattı) hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Uçucu yağlar ile oktil bütirat bileşiğinin A375 ve HCT116 hücre hatlarında önemli bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Maggi, 2014).

Sathak ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada ise *Heracleum sprengelianum* bitkisinin yapraklarının karaciğer kanser hücre hatları üzerinde (HepG2) güçlü toksik bir etki oluşturduğu ancak sağlıklı hücrelerde (periferik kan mononükleer hücre) daha

az toksik bir etki oluşturduğu gözlenmiştir. Yine *Heracleum* cinsine ait *Heracleum moellendorffii* bitkisinin metanol ekstraktlarının içeriğinde bulunan falkarindiol ve panaxynol bileşiklerinin insan mide adenokarsinom, serviks, fare melanom gibi 3 farklı tümör hücre hattında (MK-1, HeLa, ve B16F10) hücre çoğalmasını azalttığı belirtilmiştir (Nakano, 1998). Gao ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada ise *Heracleum dissectum* türünden elde edilen bazı bileşiklerin serviks (HeLa), bağırsak adenokarsinom (HCT-8) ve insan hepatokarsinom (HepG2) hücre hatlarında sitotoksik etkisi değerlendirilmiş olup, IC<sub>50</sub> değeri 5,8 ile 18,6 µM aralığında değişen ortalama bir sitotoksik aktivite etkisi bulunmuştur.

*Heracleum verticillatum* ve *Heracleum ternatum* türlerinin kök, yaprak ve meyve kısımlarının uçucu yağlarının sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise serviks (HeLa), insan kolon karsinom (LS174) ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinom (A549) hücre hatları üzerinde değerlendirme yapılmıştır. Buna göre *H. verticillatum* türünün kök ve meyve kısımlarının incelenen uçucu yağları, 3 hücre hattı üzerinde de önemli bir aktivite göstermiştir. *H. ternatum* bitkisinin ise kök kısmının yağı LS174 hücre hattı üzerinde en aktif sitotoksik etkiyi göstermiştir (Uşjak, 2016). Skalicka ve arkadaşları (2017) *Heracleum mantegazzianum* bitkisinin meyve kısımlarından elde ettiği uçucu yağların bazı biyolojik aktivite testlerini yapmışlardır. Sitotoksikite çalışmaları kapsamında Vero (hayvan) ve HEK-293 (insan embriyonik) iki sağlıklı böbrek fibroblast hücre hattı ile FaDu (skuamöz hücreli yutak karsinomu) ve SCC25 (skuamöz hücreli dil karsinomu) olmak üzere iki farklı kanserli hücre hattı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, test edilen sağlıklı hücre hatlarının bitkinin uçucu yağlarına karşı kanserli hücre hatlarına göre daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Kanserli hücre hatlarında %50'sini inhibe eden konsantrasyon değerleri orta dereceli bir sitotoksik aktivite gösterildiğini ortaya koymuştur. Yine yapılan literatür taramalarında, *Heracleum platytaenium* bitkisinin metanol ekstraktlarının T47D ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde antikanser özelliğinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre, ekstraktların T47D meme kanseri östrojen reseptör pozitif hücre hattında zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik bir etki oluşturduğu gözlenmiştir (Akıllılar, 2018).

Çalışmamızda etkinliğini değerlendirdiğimiz *H. humile* bitkisi ile yapılan başka bir tez çalışmasında ise *H. humile* bitkisinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından elde edilen n-hekzan, metanol ve H<sub>2</sub>O ekstraktlarının etkisine bakılmıştır. Ekstratların Sulforodamin B Testi ile MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiş olup, test edilen dozlarda büyüme engelleyici bir sonuç bulunamamıştır (Sarımahmut, 2016).

## 2.2 *Heracleum L.* Cinsine ait Antimikrobiyal Çalışmaları

Patojen bakterilerin antibiyotik gibi sentetik ilaçlara karşı direnç kazanmaları bilinen bir problemdir. Bunun için araştırmacılar doğada yetişen bitkilerin güçlü ve etkili antimikrobiyal ajanlar olabileceğini düşünerek çeşitli çalışmalar yapmaktadır. *Heracleum* türlerinden elde edilen esansiyel yağlar, ekstraktlar ve izole edilen bileşikler ile de yapılmış birçok antimikrobiyal aktivite çalışması bulunmaktadır.

Walasek ve arkadaşları (2015) *H. mantegazzianum* türünden izole edilen bazı kumarinlerin, Gram pozitif bakteriler ve mayalar üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine Kousha ve Ringø (2015) *H. persicum* ve *H. mantegazzianum* türlerinin sulu ekstraktlarının antibakteriyal etkisini çalışmıştır ve Gram pozitif bakteriler üzerinde benzer sonuçlara ulaşmıştır. Maggi ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada *H. sphondylium* L. türünün bir alt türü olan *Heracleum ternatum* (Velen.) bitkisinin uçucu yağının 2 Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve 2 Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) bakteri üzerinde etkisine bakılmış olup, yağların bu bakterilere karşı etki göstermediği anlaşılmıştır.

*H. persicum* bitkisinin hidroalkolik ekstraktlarının 46 farklı patojen kandida türüne karşı yapılan analizlerinde, etanol ekstraktlarının *Candida albicans* türünde en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği görülmüştür (Nejad vd. 2014). *H. platytaenium* türünden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal ve kimyasal içerik analizinin yapıldığı bir çalışmada ise, test edilen bakterilere karşı bu yağların herhangi bir etkisinin görülmediği belirtilmiştir. Ancak bu yağların içeriğindeki oktanol bileşiği

sayesinde *Candida glabrata* türünde kuvvetli bir antikandidal etkinin görüldüğü rapor edilmiştir (Akcin vd. 2013).

Kousha ve Bayat (2012) *H. persicum* bitkisinin metanol ekstraktlarının bakteri ve mantarlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliğine bakmıştır. Buna göre 4 Gram-negatif, 4 Gram-pozitif ve 2 mantar türü üzerinde *H. persicum* bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarının ekstraktlarının göze çarpan bir etki oluşturduğu gözlenmiş olup, organizmaların büyümesini inhibe edebildiği belirtilmiştir. Özçakmak (2012) tarafından yapılan bir araştırmada ise *H. platytaenium* bitkisinin uçucu yağının *P. verrucosum* mantarının misel oluşumunu engellediği gösterilmiştir.

Shokri ve arkadaşları (2012) *H. persicum* bitkisinin uçucu yağının *Candida zeylanoides* türü üzerinde etkisini incelemiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar bu yağın *Candida zeylanoides* türü için güçlü bir antikandidal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. *H. pubescens* bitkisinin uçucu yağı ile yapılan bir araştırmada, bu bitkinin yağının *Aspergillus parasiticus* türü için inhibitör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, *Heracleum pubescens* bitkisinin gıda ürünlerinde insan sağlığı için toksik etki yaratan mantardan koruyucu bir etmen olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir (Alinezhad vd. 2011). *Heracleum lasiopetalum* bitkisinin çalışıldığı bir araştırmada bu bitkinin etanol ekstraktlarının balıklarda hastalığa sebep olan *Lactococcus garvieae* bakterisi üzerinde orta derecede bir etki gösterdiği anlaşılmıştır (Goudarzi vd. 2011).

Kuljanabgavad ve arkadaşları (2011), *Heracleum siamicum* bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini gösterdiği ve kimyasal içerik analizini yaptığı bir çalışmada, bu yağın 5 bakteri ve 2 mantar türü üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Balıklarda hastalığı sebep olan *Streptococcus iniae* bakterisi üzerinde *H. lasiopetalum* bitkisinin yağının antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada yağın bakteriye karşı önemli bir etki gösterdiği anlaşılmış olup, uçucu yağın balık hastalıkları için doğal bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (Pirbalouti vd. 2011).

Firuzi ve arkadaşları (2010) *H. pastinacifolium*, *H. persicum*, *H. rechingeri* ve *H. transcaucasicum* bitkilerinden uçucu yağların etkisini *Bacillus subtilis* (PTCC 1023), *Escherichia coli* (PTCC 1338), *Klebsiella pneumonia* (PTCC 1031), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074), *Salmonella typhi* (PTCC 1693), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) bakterileri ile iki mantar türünde *Aspergillus niger* (PTCC 5010) ve *Candida albicans* (PTCC 5027) araştırmışlardır. Bu türler üzerinde önemli bir antimikrobiyal aktivite görülmediğini yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Yine *H. persicum* bitkisi uçucu yağı ile Naeini ve arkadaşlarının (2010) yaptığı incelemede fusaryum izolatlarına karşı bir aktivite gözlenmemiştir.

Najafabadi ve arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada *H. rechingeri* bitkisinin uçucu yağlarının 6 farklı bakteri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterilerde en kuvvetli etkinin görüldüğü ortaya konulmuştur. Benli ve arkadaşlarının (2007) rapor ettiği bir araştırmada ise *Heracleum paphlagicum* bitkisinin tohum ve yaprak ekstraktlarının etkisi incelenmiştir. 10 farklı bakteri ve 4 farklı maya üzerinde yapılan bu çalışmada *H. paphlagicum* tohumlarının metanol ekstraktlarının *Bacillus subtilis* bakterisine karşı etkin olduğu gözlenirken, *H. paphlagicum* yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bose ve arkadaşlarının (2007) *H. nepalense* bitkisinin köklerinden elde ettiği metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkisini değerlendirdiği bir araştırmada, ekstraktların hazırlanan düşük konsantrasyonlarında, diyareye sebep olan *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholera* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerine karşı oldukça etkin olduğu belirtilmiştir.

*Helicobacter pylori* bakterisinin neden olduğu enfeksiyonlara karşı doğal bir antibiyotik kaynağı olabileceği düşünülen *H. persicum* bitkisinin metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu ekstraktın önemli bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Atapour vd. 2009). Yirmiki endemik bitkinin ham ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir araştırmada, *H. playtaenium* bitki ekstraktının *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Branhamella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* ve *Trichophyton rubrum* mikroorganizmalarına karşı en aktif etki gösteren ekstraktlardan biri olduğu belirtilmiştir (Buruk vd. 2006).

Ergene ve arkadaşları (2006), *H. sphondylium* L. türünün bir alt türü olan *Heracleum artvinense* (Manden.) bitkisinin, etanol ve su ekstraktlarının 8 farklı bakteri ve 2 farklı mayaya karşı olan etkinliğini incelemiş olup, bu ekstraktların kullanılan organizmalarda ortalama bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Sardari ve arkadaşlarının (1998) yaptığı bir çalışmada, İran ve Kanada’da yetişen bitkilerden seçilen 40 tanesinin ham ekstraktlarının parazit mantar türlerine karşı olan etkisine bakılmıştır. *H. persicum* bitkisi sonuçlara göre en aktif etki gösteren bitkilerden biri olmuştur.

*Heracleum maximum* bitkisi Kuzey Amerika’da solunum rahatsızlıklarında kullanılan bir bitki olup, bu bitkinin köklerinin antimikobakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir. *H. maximum* bitkisinin kök kısmının içeriğinde bulunan pimpinellin, izopimpinellin ve bergapten gibi bileşiklerin antimikobakteriyel aktiviteye sebep olduğu rapor edilmiştir (O’Neill vd. 2013). Yine *H. maximum* bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada ise *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium avium* bakterilerinin 20 mg/disk konsantrasyonda büyümesinin engellendiği görülmüştür (McCutcheon vd. 1997).

Dash ve arkadaşlarının (2007) *Heracleum nepalense* bitkisinin kök kısmından elde edilen ekstraktların, 257 farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakteri üzerindeki etkisini incelediği bir çalışmada, test edilen bütün bakterilerin 1000 µg/mL ekstrakt konsantrasyonuna karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Lingaraju ve arkadaşları (2014), *H. rigens* bitkisinin köklerinin antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. Bulunan sonuçlar test edilen 3 farklı bakteri ve 1 küf mantarı üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal aktivite olduğunu göstermiştir.

*H. rigens* bitkisinin 9 farklı patojen bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise *Klebsiella pneumonia* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı en iyi etki görülmüştür (Jagannath vd. 2012) . Miladinović ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, *Heracleum sibiricum* bitkisinin uçucu yağının, 9 patojen bakteri üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda Gram-pozitif bakterilerin, Gram negatif bakterilere göre bu bitkinin uçucu yağına karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür.



Torbati ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada, *Heracleum transcaucasicum* ve *Heracleum anisactis* bitkilerinin uçucu yağlarının, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermis* bakteri türleri üzerinde bir etkisinin görülmediği belirtilmiştir. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerinde de bir etkinin olmadığı gözlenmiştir. Aynı bitki türleri ile Torbati ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir başka çalışmada, disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antibakteriyel aktivite analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *H. anisactis* bitkisinin uçucu yağının az ve orta denebilecek ölçülerde Gram pozitif bakteriler ile *Escherichia coli* bakterisi üzerinde etki gösterdiğini ortaya koymuştur. *H. transcaucasicum* bitkisinin uçucu yağları ise herhangi bir antibakteriyel etki göstermemiştir.

### 2.3 *Heracleum L.* Cinsine ait Antioksidan Çalışmaları

Antioksidanlar hücrelere zarar veren serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen yapılardır. Antioksidanlar enzim yapısında olabileceği gibi bazı organik moleküller de antioksidan olarak bilinir. Vitamin E ve  $\beta$ -carotene bunun örneğidir (Gupta, 2015). Antioksidan testler de bitkilerin, bitki kaynaklı doğal ürünlerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için yapılır. ABTS, DPPH, FRAP gibi kolorimetrik testler antioksidan kapasiteyi belirlemek için kullanılan testlerden bazılarıdır (Pisoschi ve Negulescu, 2011).

Bitkiler doğal antioksidanların temel kaynağıdır. Bitkiler içerdikleri fenolik asitler, flavonoidler, terpenler, vitaminler ve azotlu bileşikler ile güçlü antioksidan potansiyeline sahiptir. Bu antioksidan bileşenlerin etkilerinin değerlendirilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup, DNA koruma aktiviteleri ortaya çıkarılmaya başlanmıştır (Deniz, 2016). *Heracleum* cinsine ait türlerin de antioksidan kapasitesinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır.

Firuzi ve arkadaşları (2010) *H. pastinacifolium*, *H. persicum*, *H. rechingeri* ve *H. transcaucasicum* bitkilerinin DPPH testi ile antioksidan özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, en yüksek antioksidan etkinin *H. pastinacifolium* ve *H. persicum* bitkilerinde çıktığını belirtmiştir. Bu sonucun iki bitkinin içeriğinde bulunan miristisin ve anetol gibi bileşikler sebebiyle olabileceği açıklanmıştır. Maggi ve arkadaşları

(2014) yaptıkları çalışmada, *H. sphondylium* L. türünün bir alt türü olan *Heracleum ternatum* (Velen.) bitkisinin antioksidan özelliklerini DPPH, FRAP ve ABTS testleri ile değerlendirmişlerdir. Bulunan sonuçlar, uçucu yağların antioksidan kapasitesinin troloks ve bütil hidroksi tolüen gibi standartlar ile kıyaslandığında az olduğunu göstermiştir.

Karuppusamy ve Muthuraja (2010) yaptıkları bir çalışmada *Heracleum aquilegifolium* bitkisinin antioksidan kapasitesini DPPH gibi çeşitli testler ile değerlendirmiştir. Uçucu yağlar standart antioksidanlara göre daha güçlü antioksidan aktivite göstermiş olup, bunun sebebi uçucu yağların içinde bulunan  $\beta$ -pinen, 1,8-sineol gibi bileşiklere bağlanmıştır. Karuppusamy ve Muthuraja (2011) yaptıkları bir diğer çalışma ile *Heracleum sprengelianum* bitkisinin yaprak, tohum ve rizomlarından elde ettiği uçucu yağların antioksidan özelliklerini değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama seviyede antioksidan aktivite görüldüğünü ortaya koymuştur.

Nickavar ve Abolhasani (2009) DPPH analizi ile *H. persicum* bitkisinin meyvelerinin antioksidan kapasitesini değerlendirmişlerdir ancak zayıf antioksidan aktivitesi gözlenmiştir. *H. transcaucasicum* ve *H. anisactis* bitkilerinin uçucu yağlarının antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise *H. anisactis* bitki köklerinden elde edilen uçucu yağların, *H. transcaucasicum* bitkisine göre daha fazla aktif antioksidan içerdiği belirtilmiştir (Torbati vd. 2014). Benedec ve arkadaşlarının (2017) yaptığı bir çalışmada *H. sphondylium* bitkisinin kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyve kısımlarından ekstraktların DPPH ve FRAP analizi ile antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Yaprak ve çiçek ekstraktlarının güçlü bir antioksidan kapasitesi gösterdiği ifade edilirken kök, gövde ve meyve kısımlarının ekstraktlarının zayıf bir antioksidan kapasitesi gösterdiği belirtilmiştir.

Dincel ve arkadaşları (2013) *Heracleum platytaenium* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstraktları ile içeriğindeki furanokumarin türevi bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmiştir. Petrol eteri ve metanol ekstraktları zayıf antioksidan özellik göstermiştir. Furanokumarin türevi bileşikler ise pimpinellin hariç antioksidan aktivite göstermemiştir. Başka bir çalışmada *Heracleum gorganicum* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve meyve kısımlarının total fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan

özelliği arasındaki iliŖki araŖtırılmıŖtır. alıŖmanın sonucunda *H. gorganicum* bitkisinin yaprak kısımlarının içerdiği total fenolik ve flavonoid miktarı yüksek ıkmıŖ olup antioksidan aktivite de gzlenmiŖtir (Mazandarani vd. 2012).

*Heracleum orphanidis* bitkisinin araŖtırıldıđı bir alıŖmada bitkinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarının metanol, etanol ve su ekstraktlarının antioksidan özellikleri incelenmiŖtir. Toprak st kısımlardan elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik ve flavonoid içeriği yüksek oranlarda bulunmuŖtur. Buna bağlı olarak da yapılan antioksidan testler sonucunda toprak üstü kısımların ekstraktları güçlü antioksidan aktivite gstermiŖtir. Yapılan araŖtırmada toprakaltı kısımların su ekstraktının en az miktarda total fenolik içerik bulundurduğu ve en zayıf antioksidan etkiyi gösterdiği belirtilmiŖtir (Mileski vd. 2016).

*H. platytaenium* bitkisi ile yapılan bir baŖka alıŖmada ise bitkinin toprak üstü kısmının metanol, etilasetat ve hekzan ekstraktları ile uçucu yağların antioksidan potansiyelinin değerlendirilmesi yapılmıŖtır. Antioksidan kapasitesi BHA, BHT ve troloks gibi sentetik antioksidan standartları kullanılarak DPPH, FRAP ve ABTS testleri ile deđerlendirilmiŖtir. En iyi serbest radikal giderici etki etil asetat ekstraktında gzlenmiŖtir ancak metanol ve hekzan ekstraktı ile uçucu yağlarda önemli bir antioksidan etki bulunmamıŖtır (Karan ve Genc, 2018).

Daha önce yapılan bir tez alıŖmasında *H. humile* bitkisi toprak altı ve toprak üstü kısımlarından elde edilen n-hekzan, metanol ve su ekstraktlarının antioksidan kapasitesi DPPH ve CUPRAC testleri ile deđerlendirilmiŖtir. alıŖma sonuçlarına göre ekstraktların zayıf antioksidan etki gösterdiği belirtilmiŖtir (Sarımahmut, 2016).

Literatürde var olan bütün bu alıŖmalar, *Heracleum* cinsine ait türler için birbirinden farklı antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik sonuçlar ortaya koymuŖtur. Umut veren olumlu sonuçlar ıŖıđında daha da geniŖletilebilecek olan *in vivo* ve *in vitro* testler ile *Heracleum* cinsi türlerin ilaç hammadde olma potansiyeli incelenebilir. Bu tez alıŖması kapsamında da farklı metodlar ve çözücüler kullanılarak elde edilen *Heracleum humile* bitki ekstraktlarının antibakteriyel, DNA koruma ve sitotoksik aktivitesinin incelenmesi ve karŖılaŖtırılması amalanmıŖtır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 Malzemeler

##### 3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalleri

Çalışmada kullanılan *Heracleum humile* bitkisi Tunceli ilinin, Ovacık ilçesi Harami deresi bölgesinden yüksekliği 1400 m olan yamaçlardan toplanmıştır. *Heracleum humile* bitkisini Munzur Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği bölümünden Doç. Dr. Mehmet Yavuz Paksoy teşhis etmiştir. Bitki Paksoy 3039 toplayıcı numarası ile 01.08.2018 tarihinde toplanmıştır.

##### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları

Çalışmada 4 Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*) ve 6 Gram negatif (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463) olmak üzere toplam 10 bakteri kullanılmıştır. Test edilen bu mikroorganizmalar, Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden temin edilmiştir.

Tablo 3.1 Test edilen mikroorganizmalar

Numara	Mikroorganizma Adı	Suş Numarası	Gram Özelliği
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Pozitif
2	<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	Pozitif
3	<i>Enterococcus faecium</i>	-	Pozitif
4	<i>Enterococcus durans</i>	-	Pozitif

Tablo 3.1'in devamı

5	<i>Proteus vulgaris</i>	-	Negatif
6	<i>Escherichia coli</i>	-	Negatif
7	<i>Serratia marrescens</i>	-	Negatif
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Negatif
9	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	Negatif
10	<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRLE 4463	Negatif

### 3.1.3 Bakteri Besiyerleri, Çözücüler ve Antibiyotikler

Antibakteriyel analiz testlerinde bakterilerin büyütülmesi için uygun olan katı ve sıvı genel besiyeri Nutrient agar (NA) ile Nutrient broth (NB) kullanılmıştır. Bitki ekstraktları metanol ve saf su ile çözülmüştür. Mikrodilüsyon analizi için pozitif kontrol olarak levofloksasin antibiyotiği kullanılmıştır. DNA koruma analizinde ise plazmit izolasyonundan önce bakteri besiyerine ampisilin antibiyotiği eklenmiştir.

### 3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

*Heracleum humile* bitki ekstraktlarının kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 2 farklı meme kanseri hücre hattı kullanılarak test edilmiştir. Araştırmada meme kanseri hücre hatlarından östrojen reseptörü pozitif MCF-7 hücre hattı ile agresif bir seyir gösteren oldukça invazif MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatlarından MCF-7 hücre hattı, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden, MDA-MB-231 hücre hattı ise Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden tedarik edilmiştir.

### 3.1.5 Hücre Kültürü Kimyasalları

Yapılan hücre kültürü deneylerinde; Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM besiyeri, Gibco™ high glucose, Thermo fisher scientific, USA), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco™ qualified, heat inactivated, Thermo Fisher, USA), Penisilin/Streptomisin (10,000 U/mL, Thermo Fisher, USA), %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco, Thermo fisher scientific, USA), nonessential amino acid (NEAA, Pan biotech MEM 100X, Almanya), phosphate buffer saline (PBS, Gibco lifesciences, 10X, USA), insülin (Pan biotech, Almanya), MTT (Thermo Fisher, USA), dimetilsülfoksit (DMSO, Riedel-de Haen, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır.

### 3.1.6 Kullanılan Cihazlar, Materyaller ve Sarf Malzemeler

Bu çalışma Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı ile Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde bulunan Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma laboratuvarının altyapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan cihazlar marka ve modelleri ile birlikte Tablo 3.2 de sunulmuştur.

Tablo 3.2 Deneylede kullanılan cihazlar ve materyaller

Numara	Cihaz Adı	Marka	Model
1	-20 Derin Dondurucu	Arçelik	4252
2	-80 Derin Dondurucu	Nuaire	Glacier-Nu 9668E
3	Buz Makinası	Hoshizaki	Scotsman
4	Çekerocak	Tezsan	-
5	Hassas terazi	Precise	XP220A

Tablo 3.2'nin devamı

<b>6</b>	UV-Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber-Lourmat	Quantum-ST5
<b>7</b>	Manyetik karıştırıcı	Wise Stir	MSH-20A
<b>8</b>	Soğutmalı Mikrosantrüfuj	Hettich	MICRO 220R
<b>9</b>	Spektrofotometre	Thermo Scientific	MultiskanGO UV/Vis
<b>10</b>	pH Metre	Isolab	Mettler Toledo
<b>11</b>	Ultra saf su cihazı	Mpmnpure	Dest-up
<b>12</b>	Vortex	Wise-Mix	VM-10
<b>13</b>	Kuru Blok Isıtıcı	Biosan	TSH-100
<b>14</b>	Mikrosantrüfuj	Starlab	-
<b>15</b>	Biyogüvenlik Kabini	Tezsan	Class II
<b>16</b>	UV Transillüminatör	Vilber-Lourmat	ECX-F20.M
<b>17</b>	Mikrodalga Fırın	Samsung	ME711K
<b>18</b>	CO <sub>2</sub> inkübatörü	Nüve	EC160
<b>19</b>	Otoklav	Nüve	Steam Art
<b>20</b>	Faz kontrast görüntüleme sistemli kameralı ters mikroskop	Leica	DMi1

Tablo 3.2'nin devamı

<b>21</b>	Masaüstü Santrifüj	Nüve	NF 800
<b>22</b>	Mikropipetler (tek ve çok kanallı)	Eppendorf, Thermo, CAPP, Topscien	-
<b>23</b>	Test Kabini	Nüve	TK-252
<b>24</b>	Yatay Elektroforez	Thermo Scientific	Easy Cast B1 ve B2
<b>25</b>	Güç kaynağı	Thermo Scientific	EC-300XL
<b>26</b>	Kimyasal Saklama Dolabı	Tezsan	-
<b>27</b>	Mcfarland cihazı	Biosan	DEN-1B
<b>28</b>	Thoma lamı	Marienfeld- Neubauer- improved	-
<b>29</b>	Hücre sıyırıcı	Techno Plastic Products	-
<b>30</b>	Hücre petri kapları	Techno Plastic Products	-
<b>31</b>	Steril besiyeri kapları	Isolab	-
<b>32</b>	50 mL ve 15 mL falkon tüpler	Isolab, Kirgen, CAPP	-



Tablo 3.2'nin devamı

<b>33</b>	Eppendorf tüpler	Isolab	-
<b>34</b>	Serolojik pipetler	Biologix	-
<b>35</b>	96 kuyucuklu plakalar	Techno Plastic Products	-

Deneyleerde kullanılan kimyasallar Tablo 3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 3.3 Deneyleerde kullanılan kimyasallar

<b>Numara</b>	<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>
<b>1</b>	MTT	Thermo Fisher Scientific
<b>2</b>	Jel boyası (Redsafe)	Intron biotechnology
<b>3</b>	Ampisilin	Nyztech
<b>4</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Isolab
<b>5</b>	Agaroz	Applichem
<b>6</b>	GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
<b>7</b>	İzopropanol	Sigma-Aldrich
<b>8</b>	SDS	Thermo Fisher Scientific
<b>9</b>	HCL	Tekkim Kimya

Tablo 3.3'ün devamı

<b>10</b>	EDTA	Appllichem
<b>11</b>	DMSO	Riedel-de Haen
<b>12</b>	FeCl <sub>3</sub>	-
<b>13</b>	Metanol	Isolab
<b>14</b>	PBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific
<b>15</b>	DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific
<b>16</b>	NEAA	Pan Biotech
<b>17</b>	Tripsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific
<b>18</b>	İnsülin	Pan Biotech
<b>19</b>	FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific
<b>20</b>	Nutrient broth	Merck
<b>21</b>	Nutrient agar	Merck
<b>22</b>	Levoflaksasin	Tokyo Chemical Industry
<b>23</b>	6X DNA jel yükleme boyası	Thermo Fisher Scienific

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Elde Ediliş Yöntemleri

*Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından çıkarılan etil asetat (EA), metanol (MetOH) ve su (dH<sub>2</sub>O) ekstraktları maserasyon, infüzyon ve ultrasonikasyon gibi 3 farklı yöntem ile elde edilmiştir. Ekstraktların eldesini Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gökhan Zengin sağlamıştır. Toz haline getirilen bitkisel materyalin ekstraksiyonu farklı metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maserasyon metodunda bitkisel materyalden etil asetat ve metanol çözücüleri kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Bu amaçla bitkisel materyal ilgili çözücüler ile 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen karışım filtre edilmiş ve çözücüler döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonda ise bitkisel materyal etil asetat, metanol ve su ile 30 dakika boyunca ekstraksiyon işlemine bırakılmıştır. Karışımlar süzölmüş ve çözücüler uzaklaştırılmıştır. İnfüzyon yönteminde ise bitkisel materyal 15 dakika süresince kaynar suda bekletilmiştir. Daha sonra karışım süzölmüş ve hem ultrasonikasyon hem de infüzyon tekniğinde elde edilen sulu karışımlar liyofilize edilmiştir. Tüm ekstraktlar analize kadar +4 °C'de saklanmıştır. DNA koruma ve antibakteriyel aktivite analizleri için maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen EA ve MetOH ekstraktları, metanolde çözülmüştür. İnfüzyon ve ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen su ekstraktları ise saf su (dH<sub>2</sub>O) kullanılarak çözülmüştür.

### 3.2.2 DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi

Maserasyon, ultrasonikasyon ve infüzyon yöntemleri ile elde edilen etilasetat, metanol ve su bitki ekstraktlarının DNA koruma aktivitesi pUC19 plazmidi kullanılarak test edilmiştir. İlk olarak pUC19 plazmidi taşıyan *E.coli* bakterisi genel sıvı besiyeri olan nutrient broth içerisinde 37 °C'de bir gece boyunca büyütölmüştür. pUC19 plazmiti, ampisilin antibiyotiğine karşı direnç geni taşıdığı için besiyerine 1:1000 oranında ampisilin antibiyotiği eklenmiştir. *E.coli* bakterisinden pUC19 plazmid izolasyonu (Thermo Scientific Genejet Miniprep Kit) gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda bakteri

pelletleri üzerine sırasıyla 250 µL resüspanسیون solüsyonu, 250 µL lizis solüsyonu, 350 µL nötralizasyon solüsyonu ilave edilip, 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazda oluşan sıvı GeneJET filtrelili toplama tüplerine aktarılıp tekrar 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Plazmit filtride kaldığı için toplama tüpünde biriken sıvı atılarak, 500 µL etanol ile yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama işlemi 2 kere yapılmış olup her seferinde 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra filtrelili tüp 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alınıp, önceden 70°C'de ısıtılan elüsyon buffer eklenerek plazmitin eppendorf tüpte toplanması sağlanmıştır. İzole edilen plazmitin miktarı ve saflığı spektrofotometrede (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya) 260/280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Örnekler analizler için -20°C'de saklanmıştır. Bitki ekstraktlarının test edilecek konsantrasyonları, 10 mg/mL ve 5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Maserasyon, ultrasonikasyon ve infüzyon yöntemleri ile elde edilen bitki ekstraktlarından 0,01 g tartılıp, 1 mL çözücüde (MetOH, dH<sub>2</sub>O) (10mg/mL) çözünme işlemi yapılmıştır. 5 mg/mL konsantrasyona seyreltme için 10 mg/mL stok çözeltiden 500 µL alınıp, etil asetat ve metanol ekstraktları için çözücü olarak 500 µL metanol, su ekstraktları için 500 µL saf su eklenmiştir.

DNA'ya hasar vermesi için Fenton reaksiyonu hazırlanmıştır. Fenton reaksiyon karışımı sırasıyla 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 µM EDTA ve 80 mM FeCl<sub>3</sub> ile hazırlanmış olup, 25 mM fosfat tamponundan da 2,5 mL eklenmiştir. Sonrasında son hacim dH<sub>2</sub>O ile 10 mL olacak şekilde tamamlanmıştır. Fenton reaksiyonu 15 mL'lik falkon tüpte hazırlanmış olup, ışık görmeyecek şekilde etrafı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Deney, son hacim 20 µL olacak şekilde eppendorf tüplerde sırasıyla 1 µL plazmid (~ 300 ng/µL), 3 µL fenton, ekstrakt ve su eklenerek hazırlanmıştır. Ekstraktlardan 6 µL eklenmiştir. Kalan hacimler ise 10 µL dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak 1 µL plazmid (~ 300 ng/µL) DNA ve 19 µL dH<sub>2</sub>O hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak ise 1 µL plazmid (~ 300 ng/µL) DNA, 3 µL fenton karışımı ve 16 µL dH<sub>2</sub>O hazırlanmıştır. Tüpler hazırlandıktan sonra 45 dk 37°C'de inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon işlemi sonucunda örneklerin tamamı hazırlanan %0,8'lik agaroz jele yüklenerek 100 dk 50 voltta yürütülmüştür. Jel görüntüsü UV ışık altında incelenmiş olup, bant yoğunluğu jel görüntüleme analiz programı (Quantum, Vision-Capt., Vilber Lourmat SAS, France) ile belirlenmiştir. Deney 3 bağımsız

biyolojik tekrar yapılarak tamamlanmıştır. Hesaplama için Minitab 13 programı tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır.  $P < 0,05$  olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

### **3.2.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi**

Bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği mikrodilüsyon yöntemi ve minimum bakterisidal konsantrasyon testi ile değerlendirilmiştir. Levoflaksasin antibiyotiği pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Üç farklı yöntemle elde edilmiş bitki ekstraktları metanol ve dH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür. Bitki ekstraktları 10 mg/mL stok konsantrasyonda hazırlanmıştır. Test edilen konsantrasyon aralığı ise 15–500 µg/mL olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak ise çözücüler (metanol ve dH<sub>2</sub>O) test edilmiştir.

#### **3.2.3.1 Bakteri besiyerlerinin hazırlanması**

Nutrient broth (NB) ve Nutrient agar (NA) bakteriler için kullanılan sıvı ve katı genel besiyeridir. Nutrient Broth (NB) için 8 g/L, Nutrient agar (NA) için ise 20 g/L olacak şekilde besiyerleri dH<sub>2</sub>O ile hazırlanmıştır. Toz halindeki besiyerleri iyice çözüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanıp, sterilizasyon yapılmıştır. Soğutulan besiyerleri 12 mL olacak şekilde petri kaplarına dökülmüştür. NA ve NB bakterilerin büyütülmesinde, mikrodilüsyon testinde ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) belirleme testlerinde kullanılmıştır.

#### **3.2.3.2 Bakteri kültürlerinin hazırlanması**

Test edilecek bakterilerin canlandırılıp, çoğaltılması için stok sıvı besi yerinde (NB) bulunan bakterilerden katı besiyerine (NA) steril öze yardımı ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında mikrodilüsyon işlemine geçilmiştir.

#### **3.2.3.3 Mikrodilüsyon analizi**

Canlandırılıp, çoğaltılan bakteriler 0,5 Mc Farland standart değerine eşit olacak şekilde otoklav yapılmış, dH<sub>2</sub>O içeren cam test tüpleri içinde hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon analizi 96 kuyucuklu plakalarda yapılmış olup, ilk olarak kuyucuklara

100 µL sıvı besiyeri (NB) eklenmiştir. Sonrasında elimizdeki stok ekstrakt çözeltilerinden (10 mg/mL) 1 mg/mL konsantrasyona seyreltme yapılmıştır. Hazırlanan 1 mg/mL ekstrakt konsantrasyonlarından 100 µL alınarak seri iki katlı seyreltmeler şeklinde 15–500 µg/mL (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL) konsantrasyon aralığında kuyucuklara ekleme yapılmıştır. Yapılan iki katlı seri dilüsyondan sonra kuyucuklara 10 µL 0,5 Mc Farland standart değerine ayarlanmış bakterilerden eklenmiştir. Ayrıca paralel olarak boş kuyucuklara NB ile bakteri ve sadece NB eklenmiştir. Böylece üreme ve sterilizasyon kontrolü de yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda üremenin olup olmadığı çıplak gözle belirlenmiş olup, plakalar spektrofotometre cihazında (Thermo scientific, Multiscan go, Finlandiya) 600 nm dalga boyunda da okutulmuştur. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri test edilen maddeler için mikroorganizmaların büyümesini engelleyen en küçük konsantrasyon değeri olarak bilinir. Belirlenen MİK değerleri ile minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi yapılmıştır. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi ise test edilen suşlar için üremeyi engelleyen en düşük konsantrasyon değerinin belirlenmesine dayanan bir yöntemdir. Belirlediğimiz MİK değerlerindeki kuyucuklardan öze yardımı ile Nutrient Agara ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler gece boyunca 37°C’de inkübatörde bırakılmıştır. Sonrasında üremenin olmadığı konsantrasyonlar MBK değeri olarak belirlenmiştir (Karaman vd. 2003).

### **3.2.4 Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi**

Çalışmada farklı yöntemlerle elde edilmiş EA, MetOH ve su bitki ekstraktlarının *in vitro* antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Bitki ekstraktlarının etkisi MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Sitotoksik aktivitenin belirlenebilmesi için Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yöntemi kullanılmıştır.

#### **3.2.4.1 Bitki ekstraktlarının hazırlanması**

Hücre kültürü çalışmalarında kullanabilmek için bitki ekstraktları 1X PBS, DMSO ve saf su gibi çözücülerde çözülmüştür. Maserasyon yöntemi ile elde edilen EA ekstraktı

DMSO'da, MetOH ekstraktı saf suda çözülmüştür. İnfüzyon yöntemi ile elde edilen su ekstraktı ise 1X PBS'te çözülmüştür. Ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen EA ve MetOH ekstraktları DMSO'da, su ekstraktı ise 1X PBS'te çözülmüştür. Bitki ekstraktları bu çözücülerde hazırlanarak farklı oranlarda stok konsantrasyonlar elde edilmiştir. Stok konsantrasyonlardan seyreltme yapılarak 31,25–500 µg/mL (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL) aralığı test edilmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi MetOH ekstraktının hazırlanmasında %0,1'lik DMSO kullanılmıştır. Maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemleri EA ekstraktları ise stok konsantrasyon için saf DMSO'da çözülmüş olup, kullanılmadan önce DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde seyreltme yapılmıştır.

#### **3.2.4.2 Hücre kültürünün devamlılığı**

Çalışmada MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücreleri için yüksek glikoz içeren DMEM kullanılmıştır. Hücrelerin kültüre edilebilmesi için DMEM içerisine %10 FBS , %0,1 penisilin/streptomisin, %1 NEAA ve 0,01 mg/mL insülin eklenmiştir. MCF-7 hücreleri için ise yine yüksek glikoz içeren DMEM kullanılmış olup, DMEM içerisine %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiştir. Hazırlanan hücre besiyerleri +4°C'de muhafaza edilmiştir. Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 60,1 cm<sup>2</sup>'lik steril petrielerde büyütülmüştür. 3-4 günde bir yaklaşık olarak %70-80 oranında yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmıştır. Deneylere 2 ila 3 pasaj sonrası başlanmış olup, hücrelerin %70-80 oranında yoğunluğa ulaşması beklenmiştir.

#### **3.2.4.3 Hücre canlılık testi**

Sitotoksik aktivite analizi MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] testi ile gerçekleştirilmiştir. MTT testi hücre canlılığı ve çoğalmasını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. MTT yöntemi hücre canlılığını, yaşayan hücrelerdeki mitokondri organelinin dehidrogenaz enzim aktivitesi ile belirler. Buna göre dehidrogenaz enzimi tetrazolyum halkalarını suda çözünmeyen mor formazan kristallerine çevirerek işlev görür (Mosmann, 1983; Tonder vd. 2015).

Çalışmamızda ilk olarak petrilere %70-80 oranında yoğunluğa ulaşan hücrelerden 96 kuyucuklu plakalara ekim işlemine başlanmıştır. Ekim işlemi için öncelikle hücre besiyeri (DMEM) aspire edilmiş ve 2 mL 1X PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Hücreleri petriden ayırmak için ise 1X Tripsin-EDTA kimyasalından 1 mL petrilere eklenmiştir. Tripsin eklenen petrilere hücrelerin daha hızlı ayrılması için inkübatörde 2-3 dk bekletilmiştir. Hücreler ayrıldıktan sonra tripsini inaktive etmek için eklenen tripsin miktarının iki katı kadar hücre besiyeri (DMEM) ilave edilmiştir. Bu işlem sonrasında 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına  $10^3$  hücre ekilecek şekilde thoma lamında (Marienfeld) sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kuyucukları dolduracak yoğunluğa kadar büyütülmüştür. Sonraki aşamada 96 kuyucuklu plakalarda büyütülen hücreler hazırlanan bitki ekstraktları ile muamele edilmiştir. Bu işlem 500 µg/mL konsantrasyondan başlanarak 31,25 µg/mL konsantrasyona kadar iki katlı seyreltmeler şeklinde yapılmıştır. Negatif kontrol olarak hücreler çözücüler ile de muamele edilmiştir. Muamele işlemi 96 kuyucuklu plakalarda 3 teknik tekrarlı olarak yapılmış olup, ekstraktların 24. ve 48. saatlerdeki etkisi incelenmiştir. 24. ve 48. saatler sonunda kuyucuklara MTT solüsyonu konulmadan önce her bir konsantrasyonda bitki ekstraktlarının etkisini görmek için fotoğraf çekilmiştir. Fotoğraflama işlemi ters mikroskop (Leica, DMi1) ile 10X objektif kullanılarak yapılmıştır. Fotoğraflama işlemi bittikten sonra kuyucuklardaki hücre besiyeri (DMEM) aspire edilip, yerine 50 mL'de %0,5 FBS + 0,025 gr MTT içeren besiyerinden 100 µl eklenmiştir. MTT eklendikten sonra kültür koşullarında 4 saatlik bir inkübasyon süreci olmuştur. Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki MTT içeren besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara %3'lük SDS'den 20 µl eklenip, çalkalamalı kuru blok ısıtıcı (Biosan) kullanılarak 5 dk 500 rpm'de karıştırma işlemi yapılmıştır. Sonrasında 40 mM HCL/İzopropanol (49.835 ml izopropanol üzerine 165.5 µL HCl) karışımından 50 µl eklenip, 15 dk 500 rpm'de çalkalama yapılmıştır. Formazon kristallerinin homojen bir şekilde iyice çözünmesi sağlanmıştır. Kuyucuklarda toplamda 200 µl olacak şekilde geri kalan hacim %3 SDS+40 mM HCL/İzopropanol seyreltme solüsyonundan 130 µl eklenerek tamamlanmıştır. Seyreltme solüsyonu 4,4 mL %3'lük SDS üzerine 22 mL 40 mM HCL/İzopropanol eklenerek hazırlanmıştır. Boş kuyucuklara blank olarak 200 µl seyreltme solüsyonu eklenmiştir. İşlemin tamamlanmasının ardından örneklerimizin spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerleri ölçülmüştür.



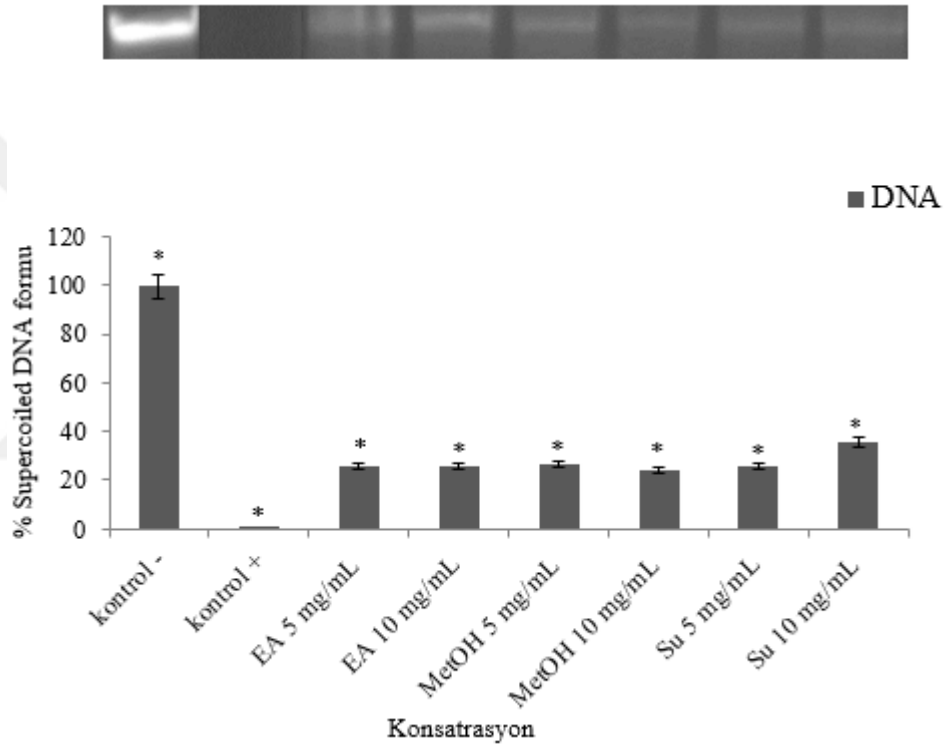
Sonuçlar kontrol ile karşılaştırılıp % olarak hücrelerin canlılığı, örnek absorbans değerinin kontrol absorbans değerine bölünüp 100 ile çarpılması sonucu hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı % cinsinden hesaplandıktan sonra IC<sub>50</sub> (Hücrelerin %50'sinin öldüren µg/mL cinsinden ekstrakt konsantrasyonu) değerleri GraphPad Prism 8 programı ile belirlenmiştir. GraphPad Prism 8 programında hesaplama yaparken konsantrasyon değerleri ve karşılığındaki hücre canlılığı değerleri girilerek analiz yapılmıştır. Lineer olmayan regresyon uygulanarak logaritmik tabanda IC<sub>50</sub> grafikleri ve değerleri elde edilmiştir. Deneyler birbirinden bağımsız 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Yüzesel hücre canlılığı hesaplamaları Microsoft Office Excel 2016 programı ile yapılmıştır. P < 0,05 olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Bitki Ekstraktlarının DNA Koruma Aktivite Bulguları

*Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon yöntemi ile elde edilen etil asetat ve metanol ekstraktları ile infüzyon yöntemi ile elde edilmiş su ekstraktının DNA koruma analizi sonucu Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 DNA koruma analizi jel görüntüsü ve DNA koruma oranları

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere maserasyon yöntemi EA ve MeOH ekstraktları ile infüzyon yöntemi su ekstraktları yaklaşık olarak %25-%30 oranında zayıf koruma aktivitesi göstermiştir. En yüksek koruma aktivitesini yaklaşık %35 oranında infüzyon yöntemi su ekstraktı göstermiştir. Analiz sonuçları minitab 13 programı kullanılarak değerlendirilmiş olup,  $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir. *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının DNA koruma analizi sonucuna göre ise ekstraktların DNA

koruma aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.2). Ultrasonikasyon yöntemi ekstraktlarının DNA koruma analizi jel görüntüsü Şekil 4.2’ de A: kontrol (-); B: kontrol (+); C: EA 5 mg/mL; D: EA 10 mg/mL; E: MetOH 5 mg/mL; F: MetOH 10 mg/mL; G: Su 5 mg/mL; H: Su 10 mg/mL; kontrol (-): plazmid ve su; kontrol (+): plazmid, fenton karışımı, su olacak belirtilmiştir.



Şekil 4.2 DNA koruma analizi jel görüntüsü

DNA koruma bulgularımızı topladığımızda maserasyon yöntemi etil asetat ve metanol ile infüzyon yöntemi su ekstraktlarında 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda zayıf DNA koruma aktivitesi görülmüştür. Ultrasonikasyon yöntemi ekstraktlarında ise 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda DNA koruma aktivitesi gözlenmemiştir.

#### 4.2 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Bölüm 3.2.1 ve 3.2.3.’te anlatıldığı üzere hazırlanan 6 farklı ekstrakt ile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463 suşlarına karşı mikrodilüsyon testi ile antibakteriyel aktivite analizi yapılmıştır. Çıplak gözle, üreminin olmadığı görülen en düşük ekstrakt konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edilmiştir. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değeri ise ekstraktın test edilen suş için %99,9’unu öldüren en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir. Ekstraktların test edilen bakteri suşlarına karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite sonuçları Tablo 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 ‘te verilmiştir.

Tablo 4.1 Maserasyon EA ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları

<b>Bakteri Suşları</b>	<b>Ekstrakt MİK/MBK (µg/mL)</b>	<b>Negatif Kontrol MİK/MBK (µg/mL)</b>	<b>Pozitif Kontrol MİK/MBK (µg/mL)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500/500	250/>500	11,28/5,64
<i>Staphylococcus epidermis</i>	500/500	250/500	22,56/5,64
<i>Enterococcus faecium</i>	500/500	250/500	5,64/5,64
<i>Enterococcus durans</i>	500/500	250/500	5,64/5,64
<i>Proteus vulgaris</i>	125/500	250/500	5,64/5,64
<i>Escherichia coli</i>	125/500	250/500	5,64/5,64
<i>Serratia marrescens</i>	125/500	250/500	11,28/5,64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125/500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	125/500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4463	500/500	250/500	22,56/5,64
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/mL); MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon(µg/mL); Negatif Kontrol: Çözücü (MetOH); Pozitif Kontrol: Antibiyotik (Levoflaksasin)			

Maserasyon yöntemi EtOH ekstraktının en iyi etkiyi *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşları üzerinde MİK değeri olarak 125 µg/mL konsantrasyonda gösterdiği gözlenmiştir. MBK değerleri ise 500 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.2 Maserasyon MetOH ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları

<b>Bakteri Suşları</b>	<b>Ekstrakt MİK/MBK (µg/mL)</b>	<b>Negatif Kontrol MİK/MBK (µg/mL)</b>	<b>Pozitif Kontrol MİK/MBK (µg/mL)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500/>500	250/>500	11,28/5,64
<i>Staphylococcus epidermis</i>	500/>500	250/500	22,56/5,64
<i>Enterococcus faecium</i>	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Enterococcus durans</i>	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Proteus vulgaris</i>	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Escherichia coli</i>	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Serratia marrescens</i>	500/>500	250/500	11,28/5,64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	500/>500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4463	500/>500	250/500	22,56/5,64

Tablo 4.2'nin devamı

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ ); MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon( $\mu\text{g/mL}$ ); Negatif Kontrol: Çözücü (MetOH); Pozitif Kontrol: Antibiyotik (Levoflaksasin)

Maserasyon yöntemi MetOH ekstraktı kullanılan bakteriler üzerinde test edilen konsantrasyonlardan en yüksek konsantrasyonda (500  $\mu\text{g/mL}$ ) MİK değeri göstermiştir. MBK değerleri ise 500  $\mu\text{g/mL}$  üzerindedir (Tablo 4.2.). İnfüzyon yöntemi su ekstraktı ise test edilen bakteriler üzerinde uygulanan konsantrasyonlarda etki göstermemiştir. Bu konsantrasyonlarda MİK ve MBK değeri elde edilememiştir.

Tablo 4.3 Ultrasonikasyon EA ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları

Bakteri Suşları	Ekstrakt MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )	Negatif Kontrol MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pozitif Kontrol MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500/500	250/>500	11,28/5,64
<i>Staphylococcus epidermis</i>	250/250	250/500	22,56/5,64
<i>Enterococcus faecium</i>	250/250	250/500	5,64/5,64
<i>Enterococcus durans</i>	250/500	250/500	5,64/5,64
<i>Proteus vulgaris</i>	250/250	250/500	5,64/5,64
<i>Escherichia coli</i>	250/250	250/500	5,64/5,64
<i>Serratia marrescens</i>	250/250	250/500	11,28/5,64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250/250	250/500	5,64/5,64

Tablo 4.3'ün devamı

<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	250/250	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4463	500/500	250/500	22,56/5,64
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ ); MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon( $\mu\text{g/mL}$ ); Negatif Kontrol: Çözücü (MetOH); Pozitif Kontrol: Antibiyotik (Levoflaksasin)			

Ultrasonikasyon yöntemi EtOH ekstraktının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463 türleri dışında diğer kullanılan bakteriler üzerinde MİK ve MBK değerleri 250  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.4 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı antibakteriyel etki sonuçları

Bakteri Suşları	Ekstrakt MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )	Negatif Kontrol MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pozitif Kontrol MİK/MBK ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500/500	250/>500	11,28/5,64
<i>Staphylococcus epidermis</i>	250/500	250/500	22,56/5,64
<i>Enterococcus faecium</i>	250/500	250/500	5,64/5,64
<i>Enterococcus durans</i>	250/500	250/500	5,64/5,64
<i>Proteus vulgaris</i>	250/250	250/500	5,64/5,64
<i>Escherichia coli</i>	250/250	250/500	5,64/5,64

Tablo 4.4'ün devamı

<i>Serratia marrescens</i>	500/500	250/500	11,28/5,64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500/500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	250/500	250/500	5,64/5,64
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4463	500/500	250/500	22,56/5,64
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ ); MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon( $\mu\text{g/mL}$ ); Negatif Kontrol: Çözücü (MetOH); Pozitif Kontrol: Antibiyotik (Levoflaksasin)			

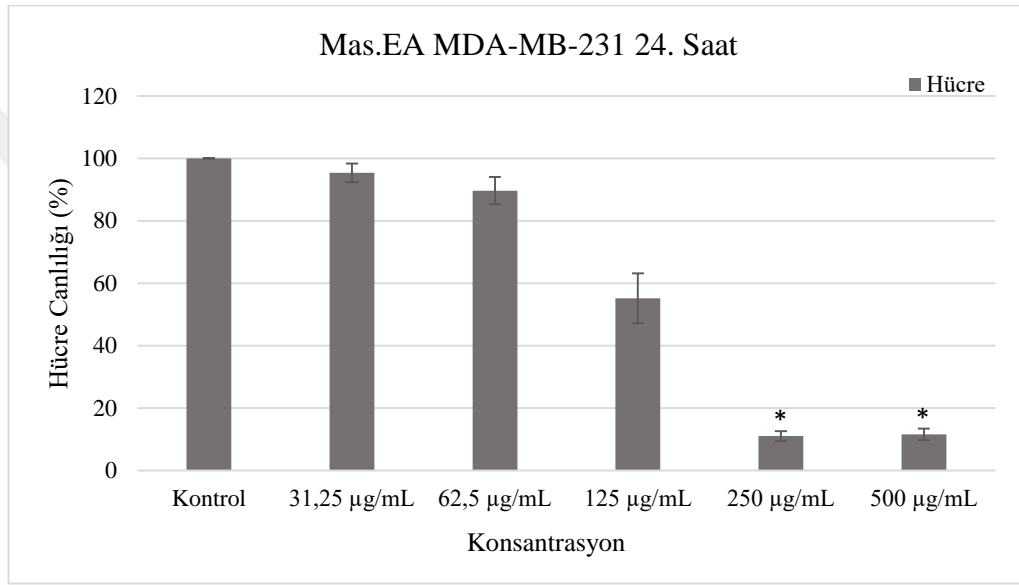
Ultrasonikasyon yöntemi MetOH ekstraktının *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşları üzerinde MİK değeri 250  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir. MBK değerleri ise *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 için 500  $\mu\text{g/mL}$ , *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* için ise 250  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir (Tablo 4.4.). Ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktı ise test edilen bakteriler üzerinde uygulanan konsantrasyonlarda etki göstermemiştir. Bu konsantrasyonlarda MİK ve MBK değeri elde edilememiştir.

Antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, maserasyon yöntemi MetOH ekstraktının en iyi etkiyi *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşları üzerinde MİK değeri olarak 125  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda gösterdiği gözlenmiştir. MBK değerleri ise 500  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.). Diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlarda ise negatif kontrol ile aynı konsantrasyonda ya da daha yüksek konsantrasyonlarda etki gözlenmiştir.



### 4.3 Bitki Ekstraktlarının Sitotoksik Aktivite Bulguları

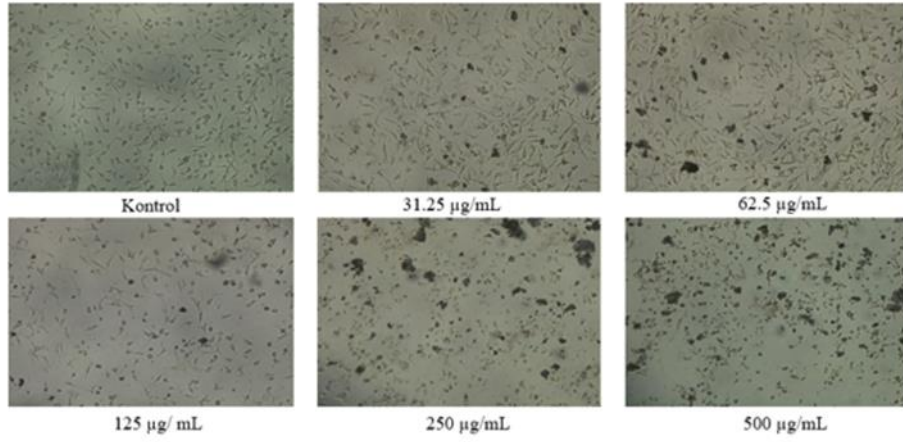
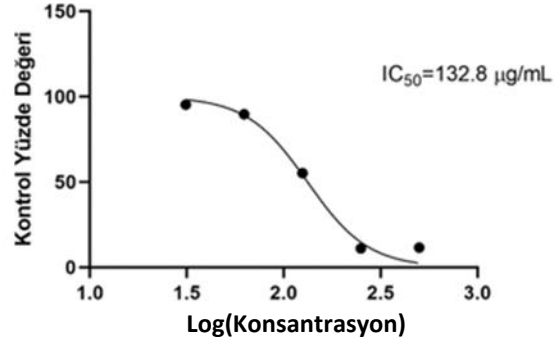
*Heracleum humile* bitki ekstraktlarının hücre canlılığına etkisini belirlemek için MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hatları ekstraktlar ile belirli konsantrasyonlarda (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL) muamele edilmiştir. Buna göre 24. ve 48. saatlerdeki etkileri değerlendirilerek hücre canlılık testi yapılmıştır. Ekstraktların muamelesinden sonra ters mikroskop altında 24. ve 48. saatlerde hücre görselleri elde edilmiştir.



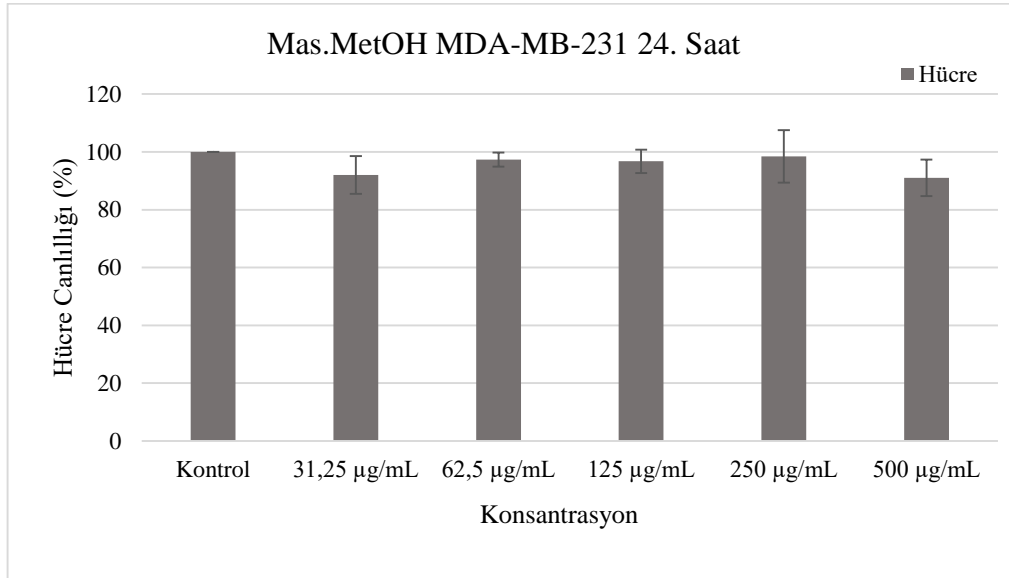
Grafik 4.1 Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL'da %11,54'sinin, 250 µg/mL'da ise %11,02'sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 24. saat için 132,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.1'de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.3.'te verilmiştir.

Mas. EA MDA-MB-231 24.saat

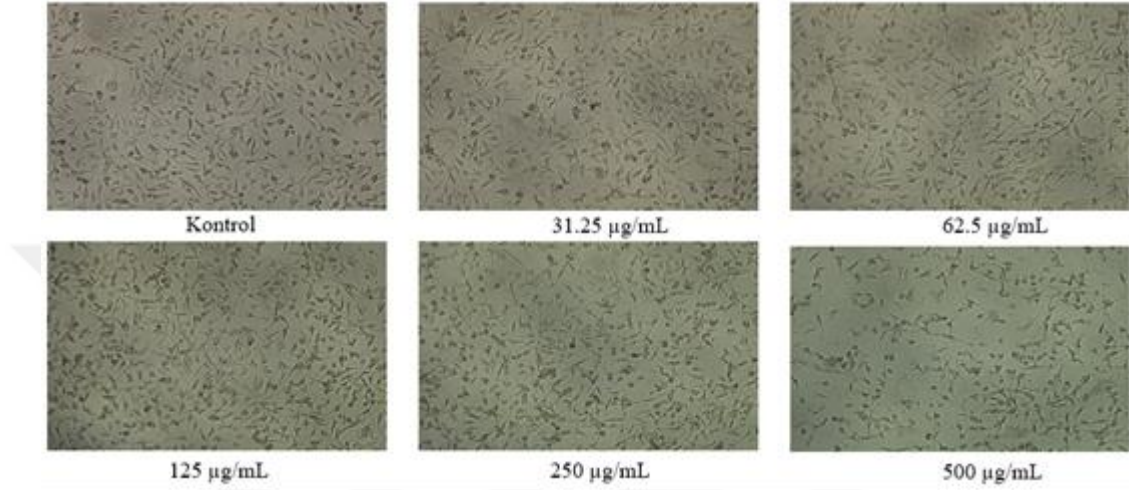


Şekil 4.3 Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli

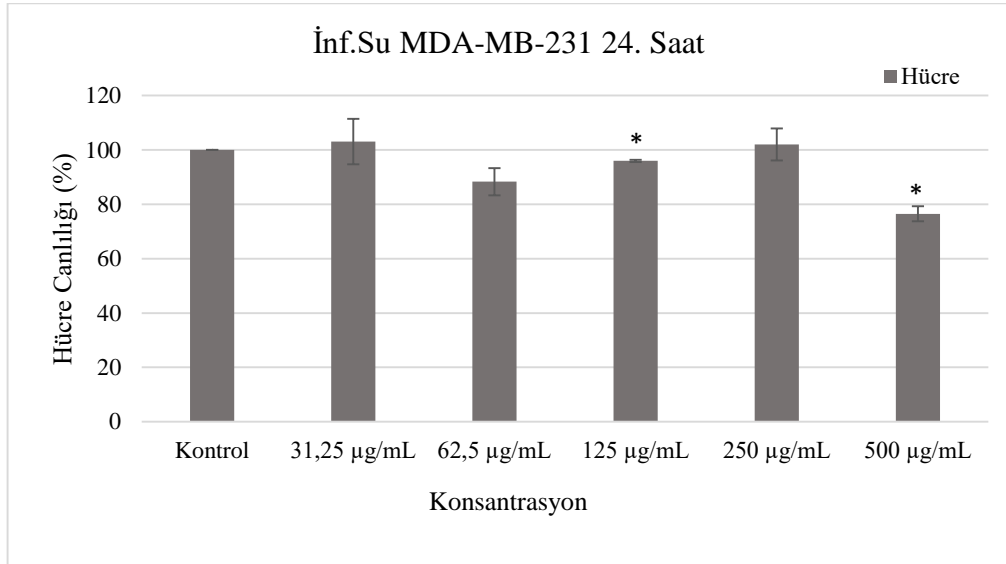


Grafik 4.2 Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi MetOH ekstraktının MDA-MB 231 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. Hücrelerin 500 µg/mL konsantrasyonda %91,03'ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.2.' de, hücre görselleri Şekil 4.4.'te verilmiştir.

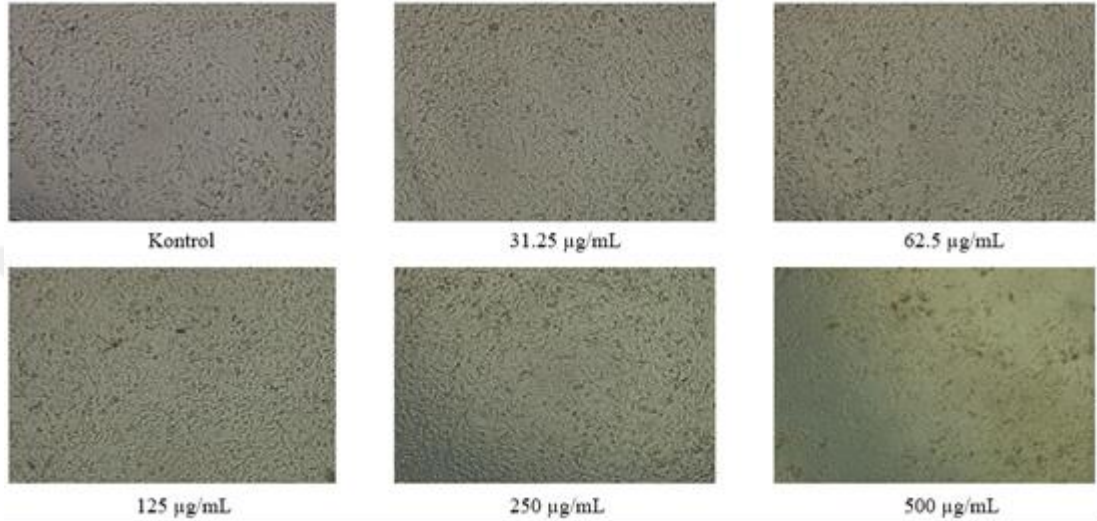


Şekil 4.4 Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli

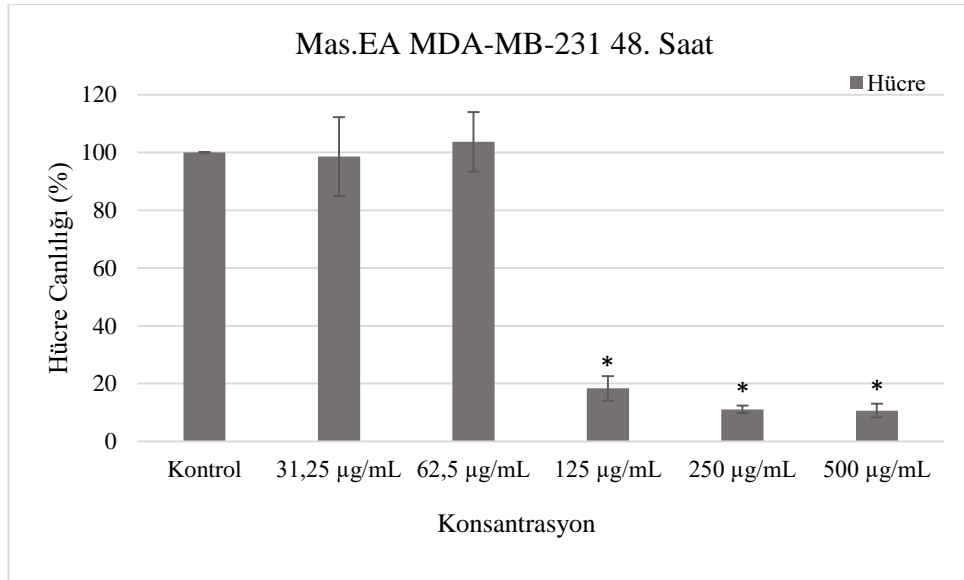


Grafik 4.3 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin infüzyon yöntemi ile elde edilen su ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, önemli bir sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. Hücrelerin 500 µg/mL konsantrasyonda %76,48'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.3.'te, hücre görselleri Şekil 4.5.'te verilmiştir.

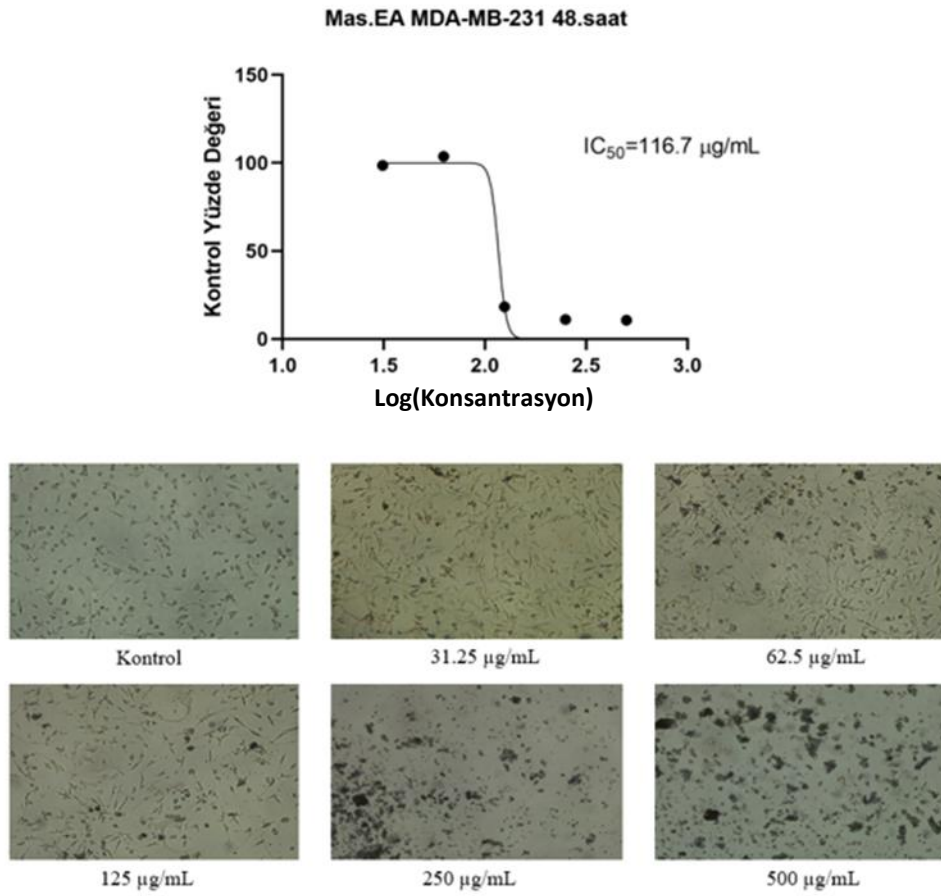


Şekil 4.5 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli

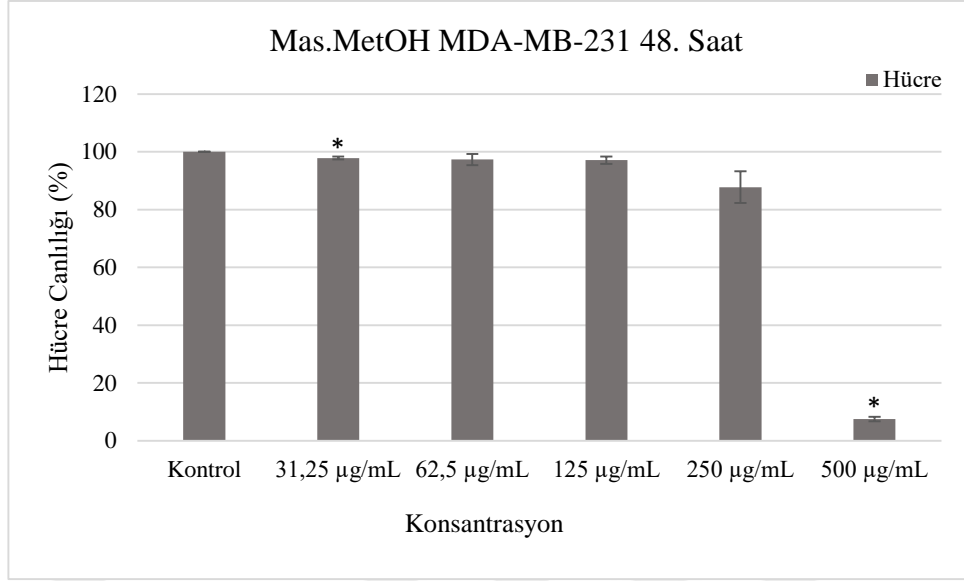


Grafik 4.4 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL'da %10,67'sinin, 250 µg/mL'da %11,11'inin, 125 µg/mL'da ise %18,33'ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. Maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 116,7 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.4.'te, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.6.'da verilmiştir.

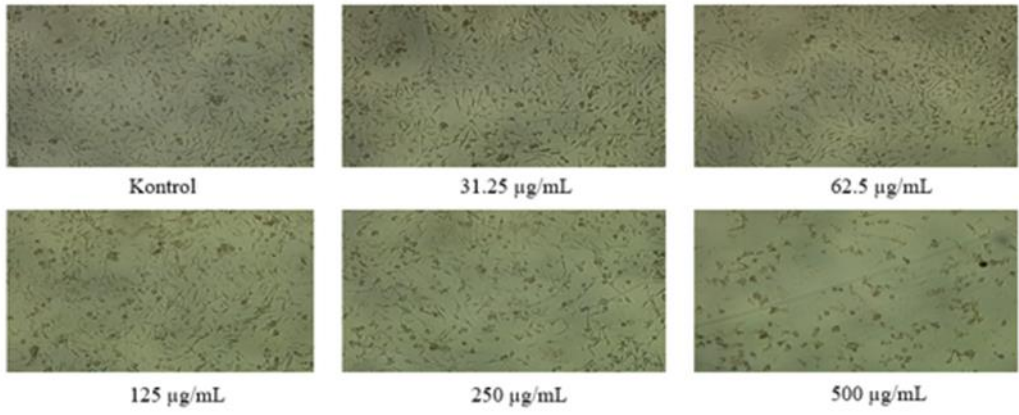
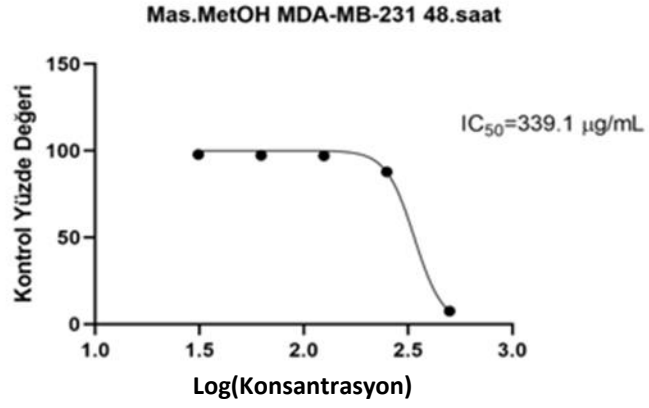


Şekil 4.6 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli

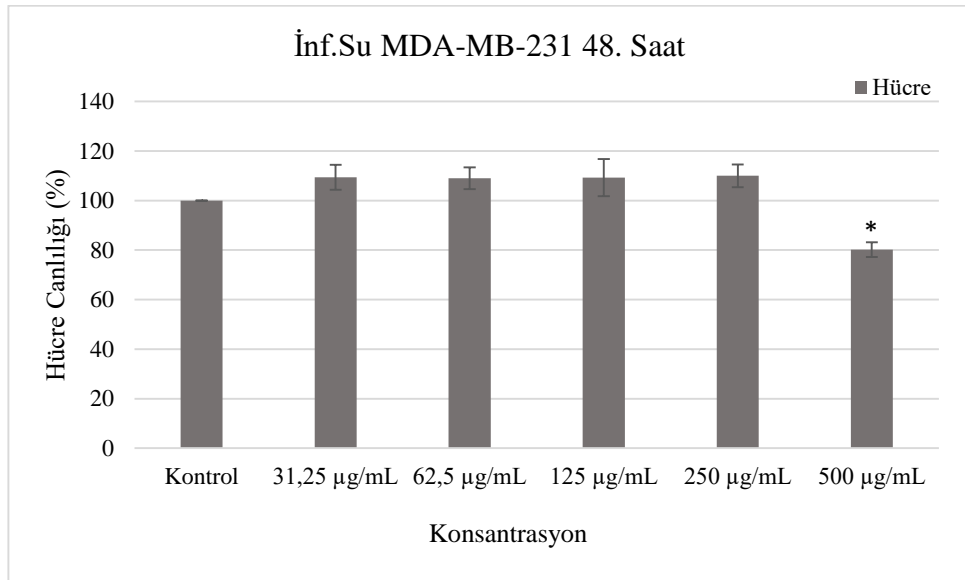


Grafik 4.5 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi MetOH ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL konsantrasyonda %7,50'sinin, canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri 339,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.5.'te, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.7.'de verilmiştir.

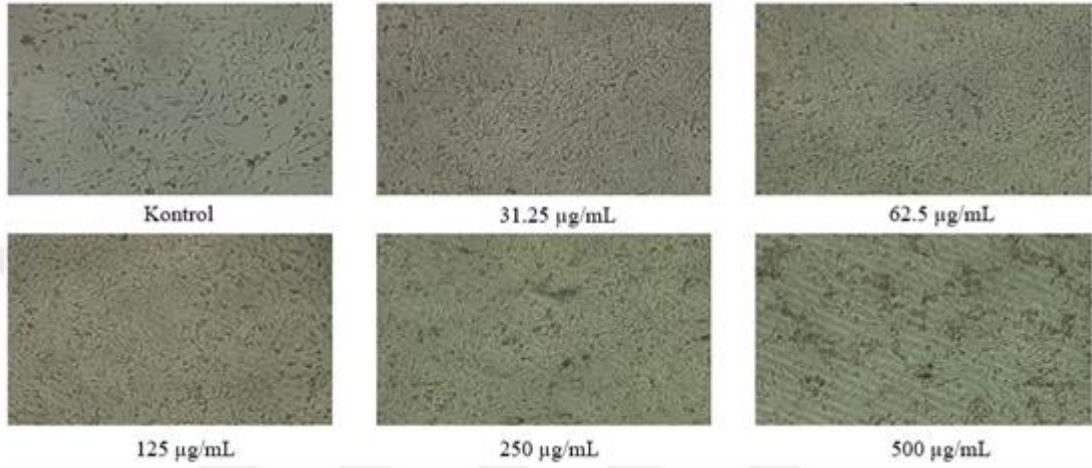


Şekil 4.7 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli

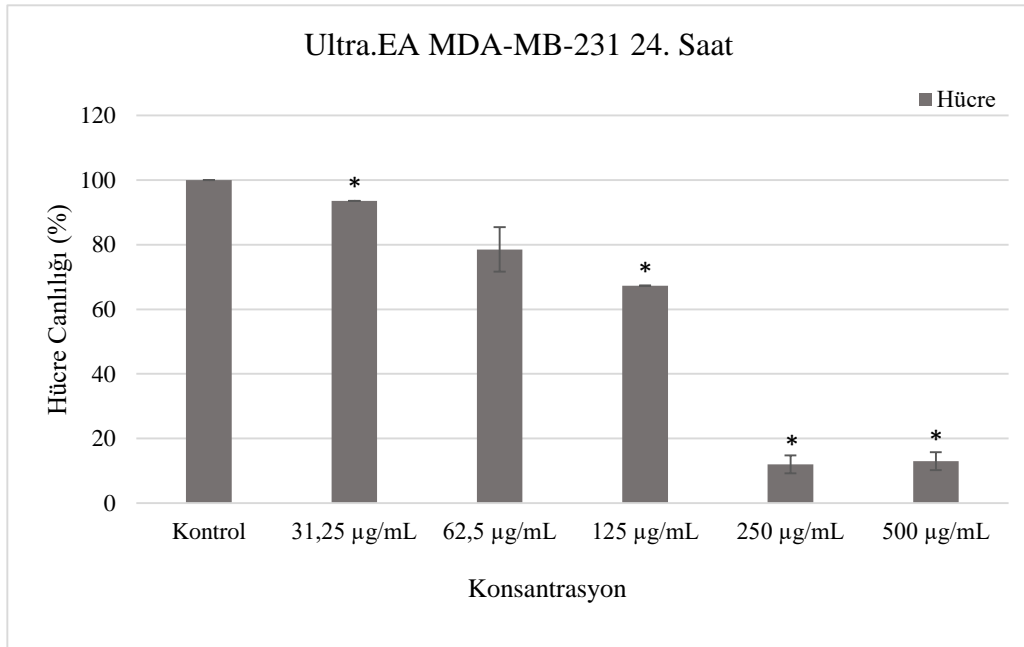


Grafik 4.6 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin infüzyon yöntemi su ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında önemli bir azalış gözlenmemiştir. Hücrelerin 500 µg/mL konsantrasyonda %80,12'sinin, canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.6.'da, hücre görselleri Şekil 4.8'de verilmiştir.



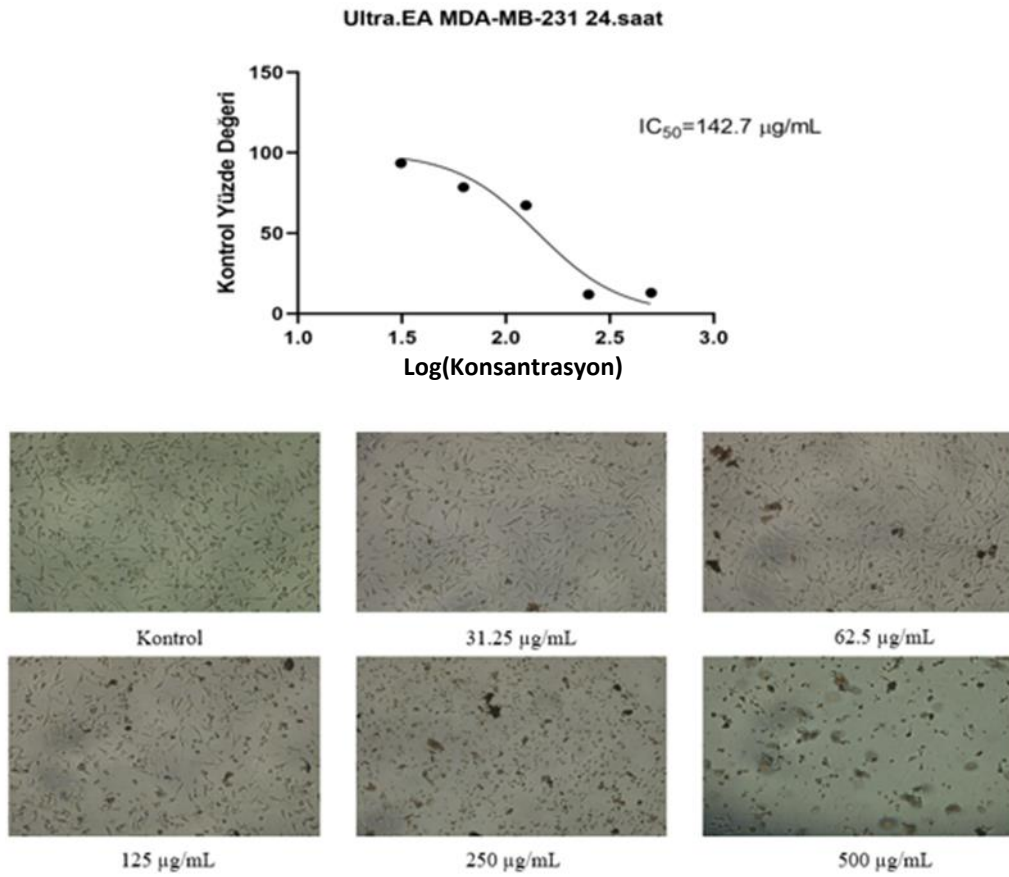
Şekil 4.8 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli



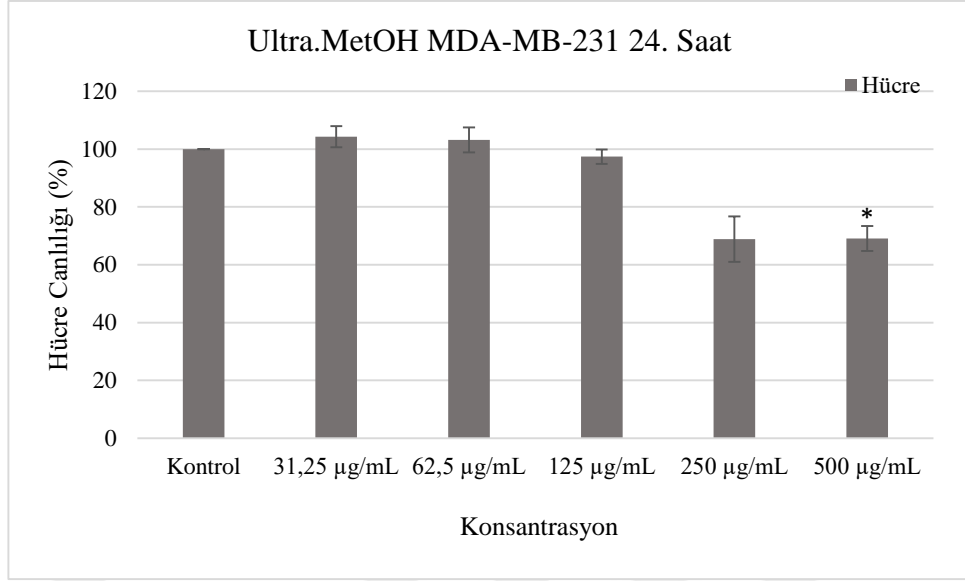
Grafik 4.7 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı



*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL’de %12,99’unun, 250 µg/mL’da ise %11,96’sının canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 24. saat için 142,7 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.7.’de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.9.’da verilmiştir.

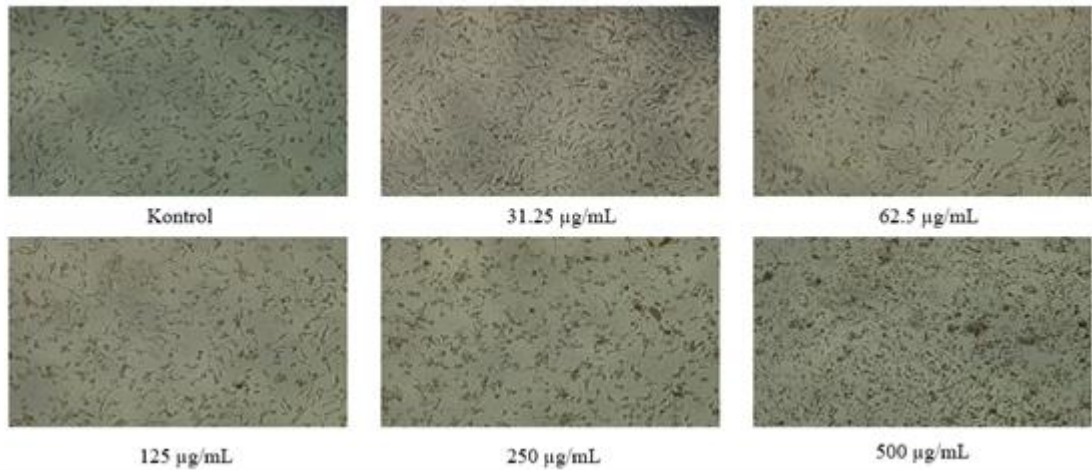


Şekil 4.9 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli

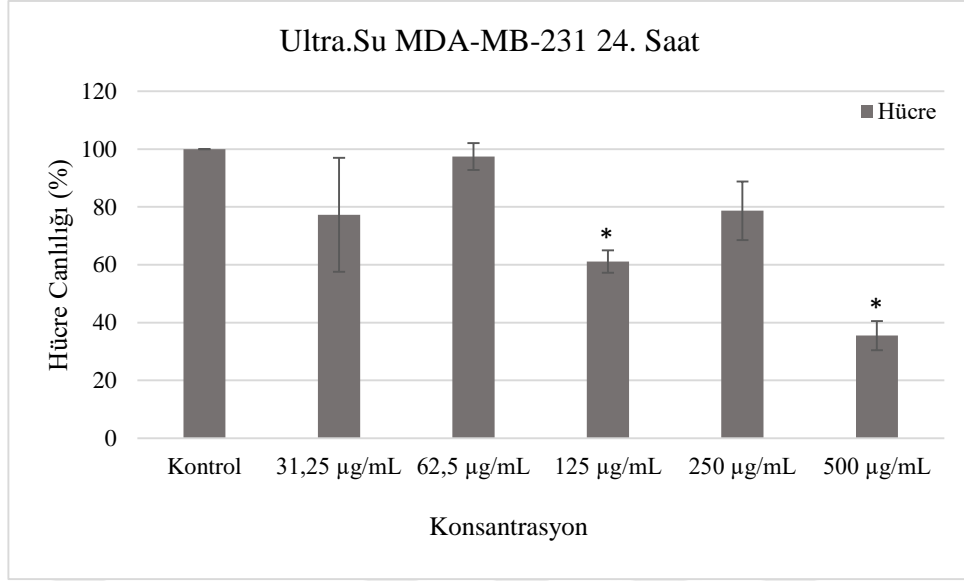


Grafik 4.8 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında çok önemli bir azalış gözlenmemiştir. Hücrelerin 500 µg/mL konsantrasyonda %69,07'sinin, canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.8.'de, hücre görselleri Şekil 4.10.'da verilmiştir.

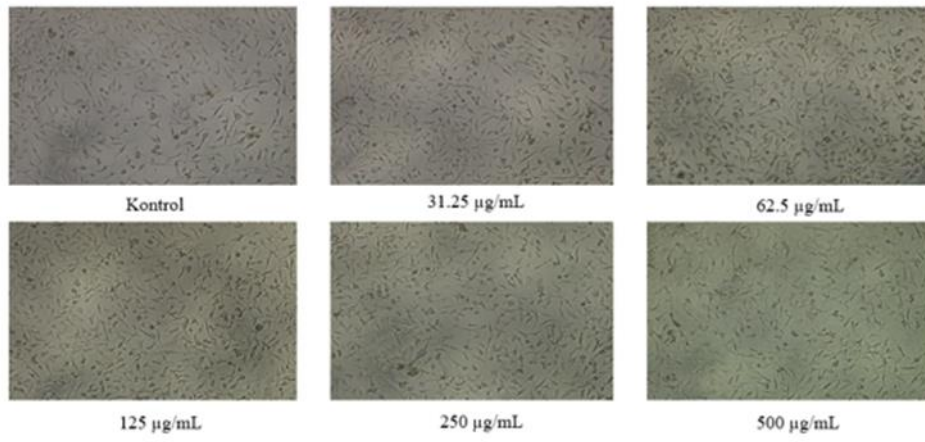
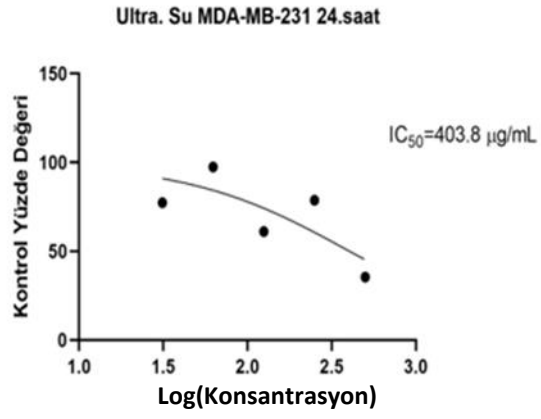


Şekil 4.10 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 görseli

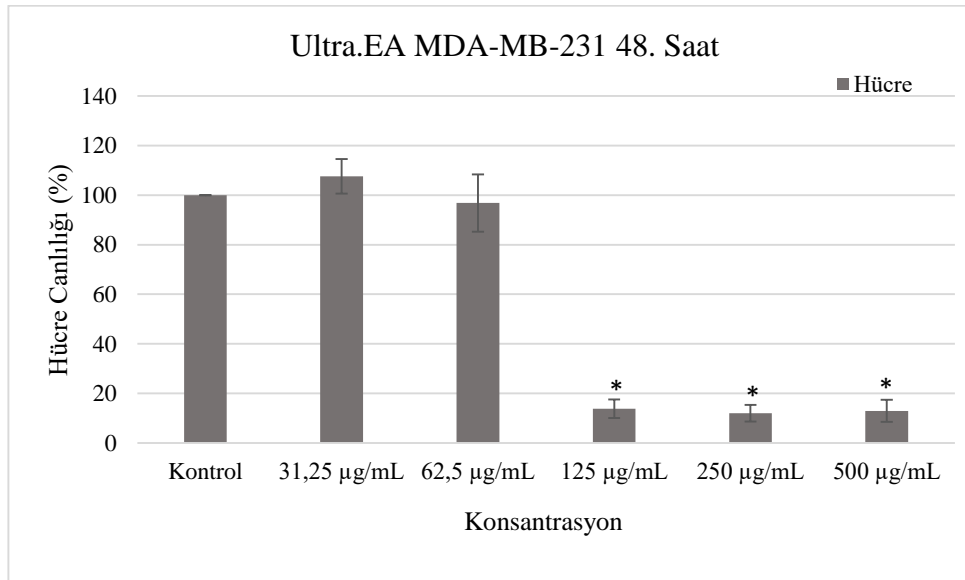


Grafik 4.9 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında en etkin düşüş 500 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş, hücrelerin %35,47'sinin, canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 403,8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı grafik 4.9'da, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.11.'de verilmiştir.

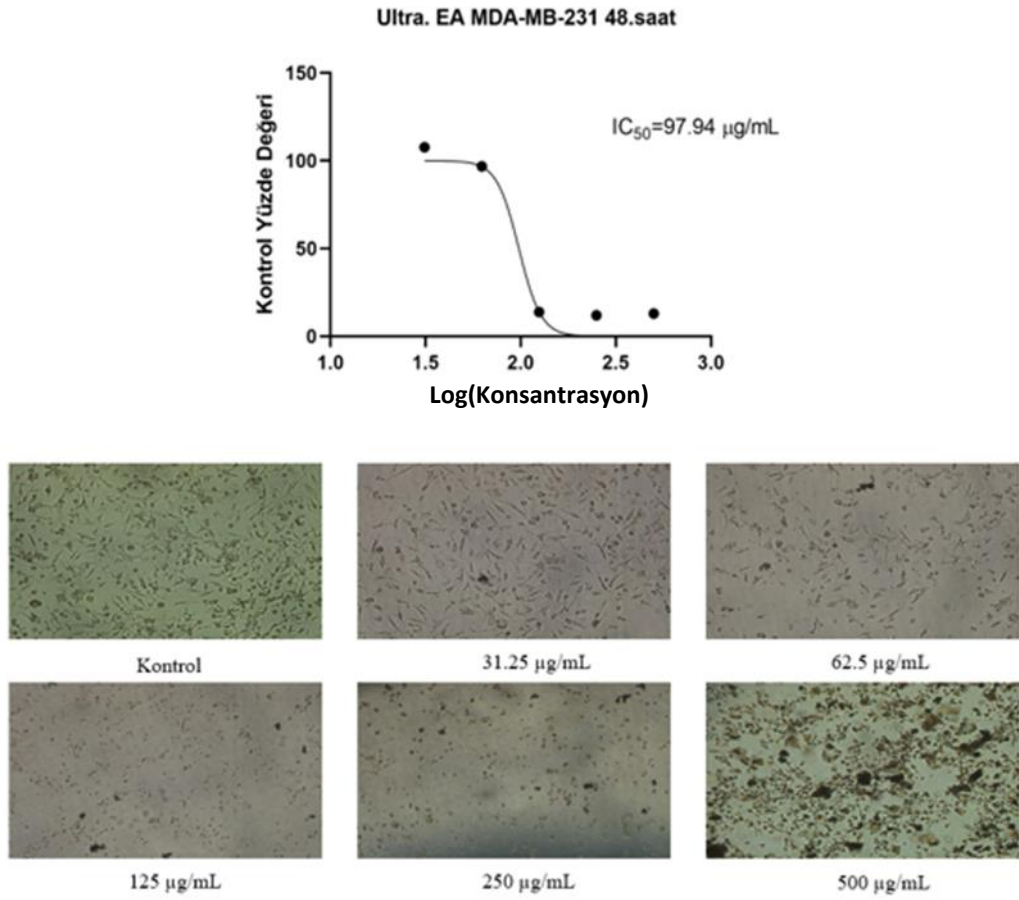


Şekil 4.11 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MDA-MB-231 hattı görseli

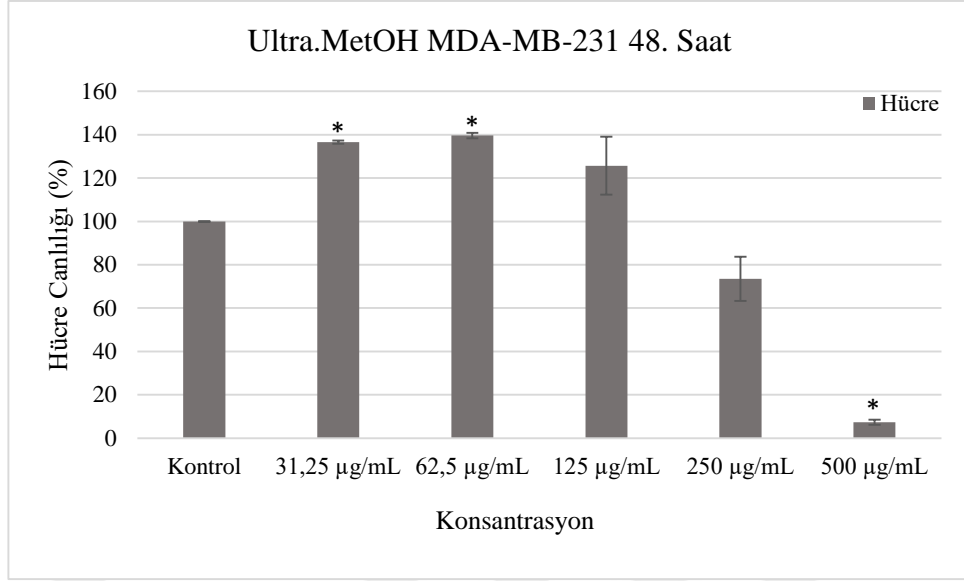


Grafik 4.10 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL'da %12,91'inin, 250 µg/mL'da %11,97'sinin, 125 µg/mL'de ise %13,83'ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 48. saat için 97,94 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.10.'da, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.12.'de verilmiştir.

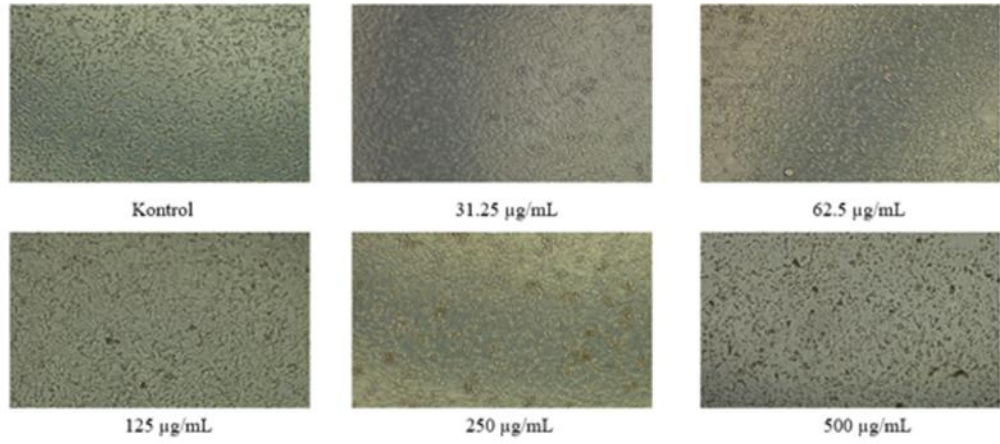
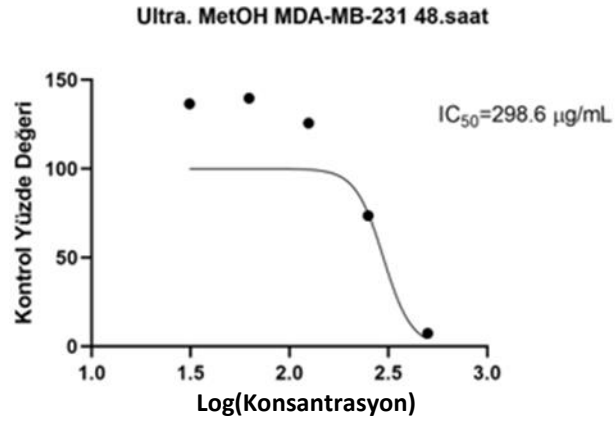


Şekil 4.12 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 görseli

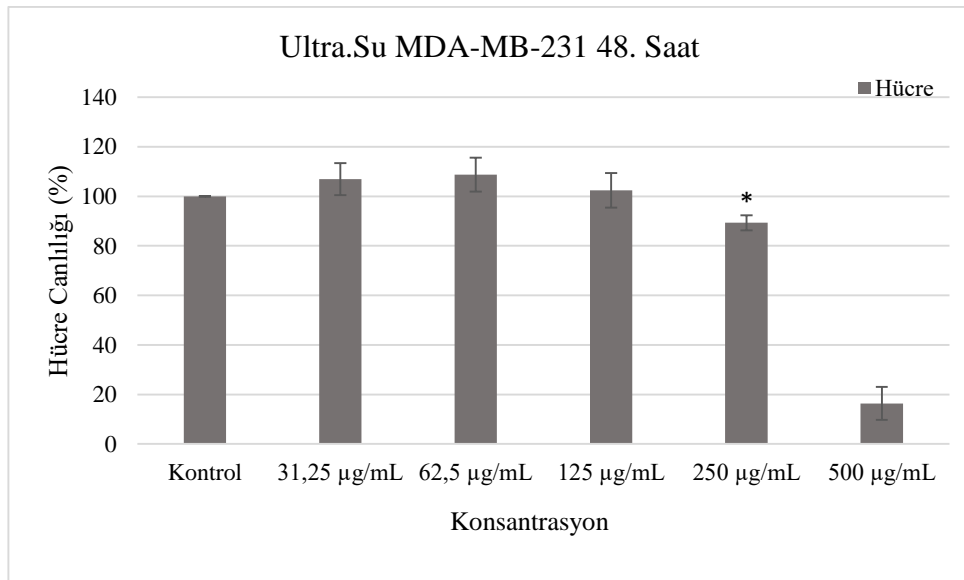


Grafik 4.11 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında 500 µg/mL konsantrasyonda önemli azalış gözlenmiş olup, hücrelerin %7,35'inin, canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 298,6 µg/mL olarak belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.11.'de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.13.'te verilmiştir.

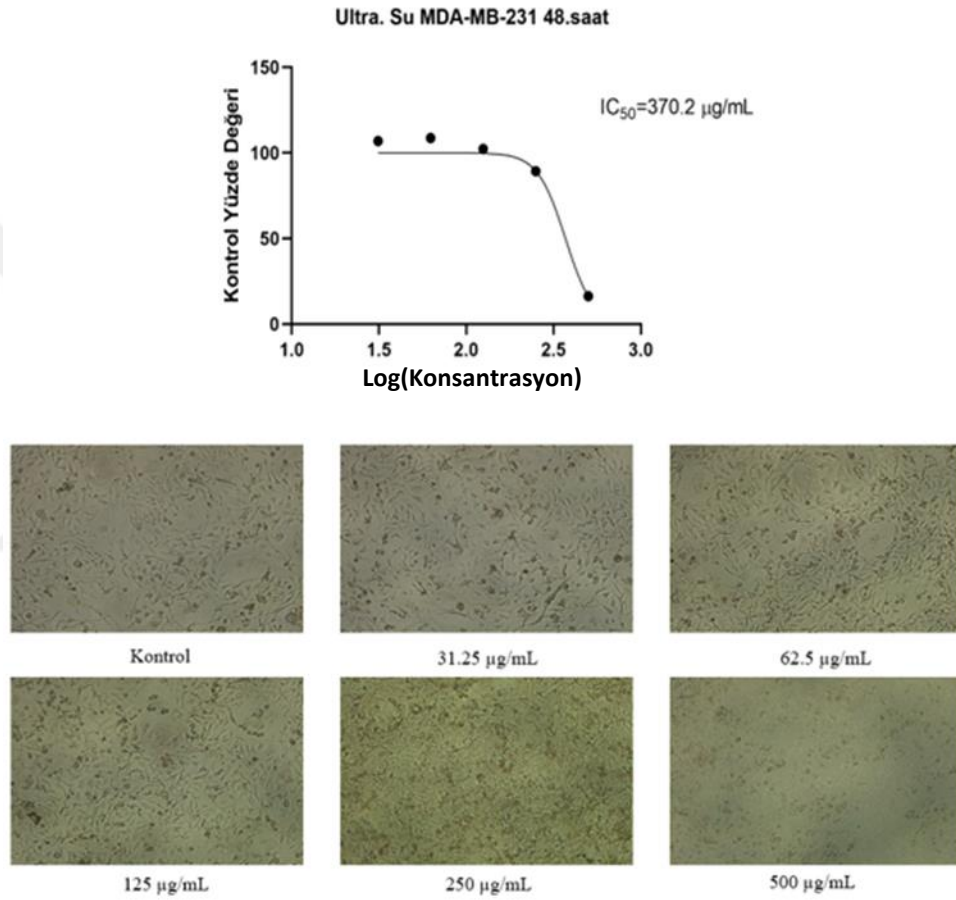


Şekil 4.13 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 görseli



Grafik 4.12 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı

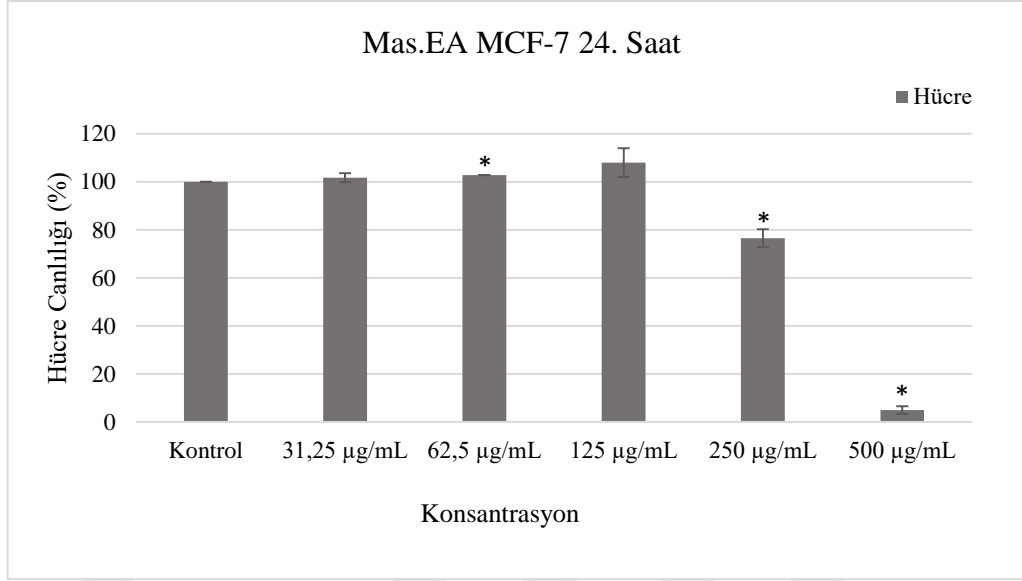
*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktının MDA-MB-231 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında belirgin düşüş 500 µg/mL konsantrasyonda gerçekleşmiş olup, hücrelerin %16,34'ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> değeri ise 370,02 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.12.'de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.14.'te verilmiştir.



Şekil 4.14 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MDA-MB-231 hattı görseli

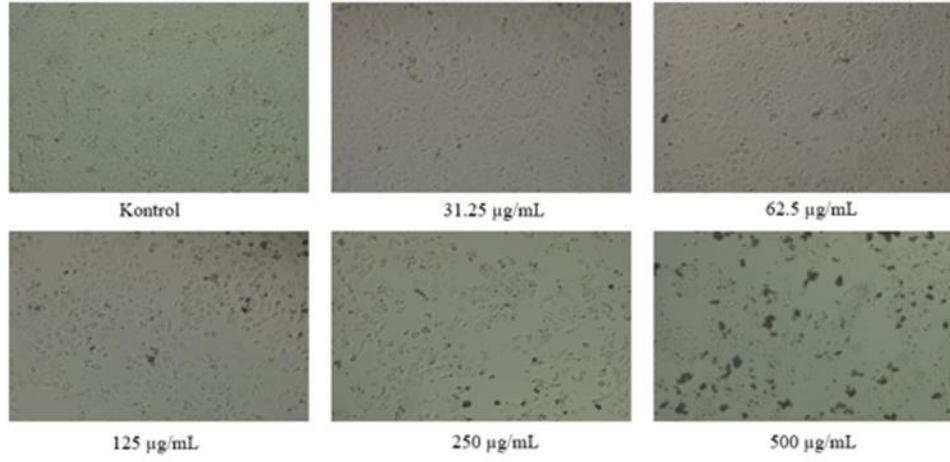
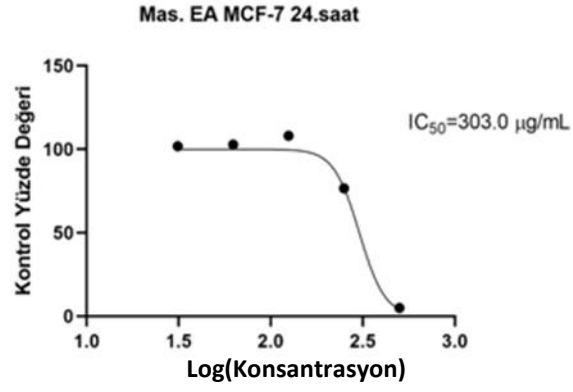
Bitki ekstraktlarının hücre canlılığına etkisini belirlemek için MCF-7 hattı üzerinde yapılan çalışmanın sonuçları ise Grafik 4.13-4.24 ve Şekil 4.15-4.26 verilmiştir.



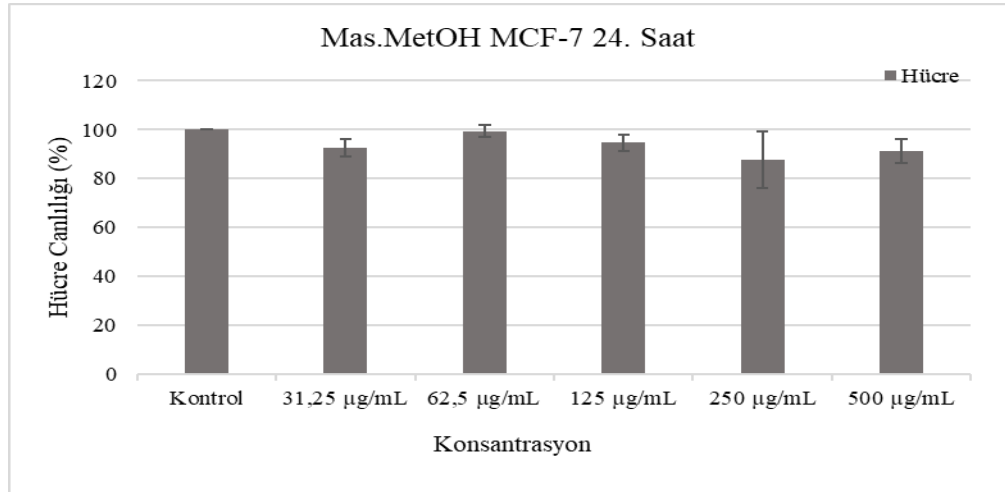


Grafik 4.13 Maserasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücrelerin 500 µg/mL'da %4,96'sının, canlı kaldığı belirlenmiştir. Maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının 24. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 303 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.13.'te, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.15.'te verilmiştir.

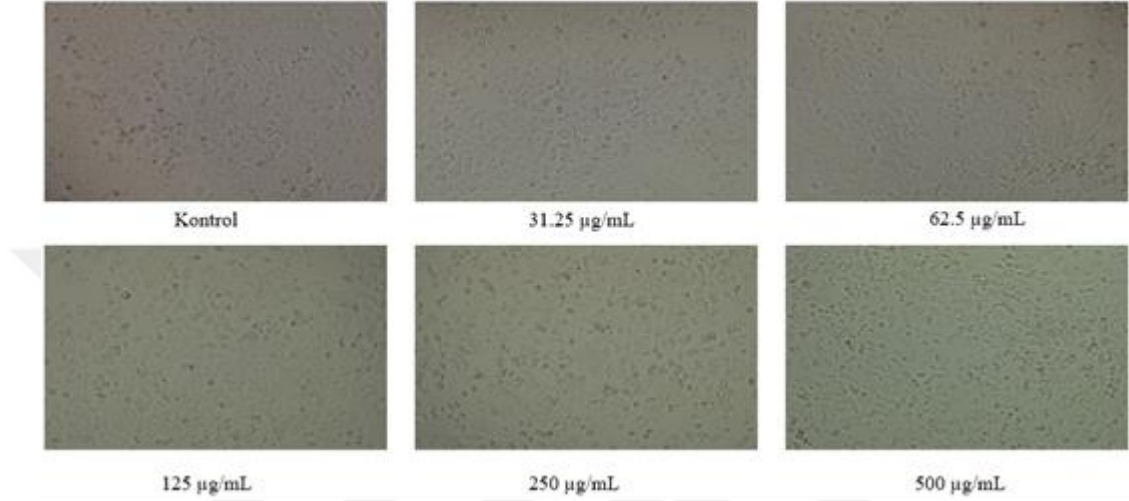


Şekil 4.15 Maserasyon EA ekstrektı 24. saat MCF-7 hattı görseli

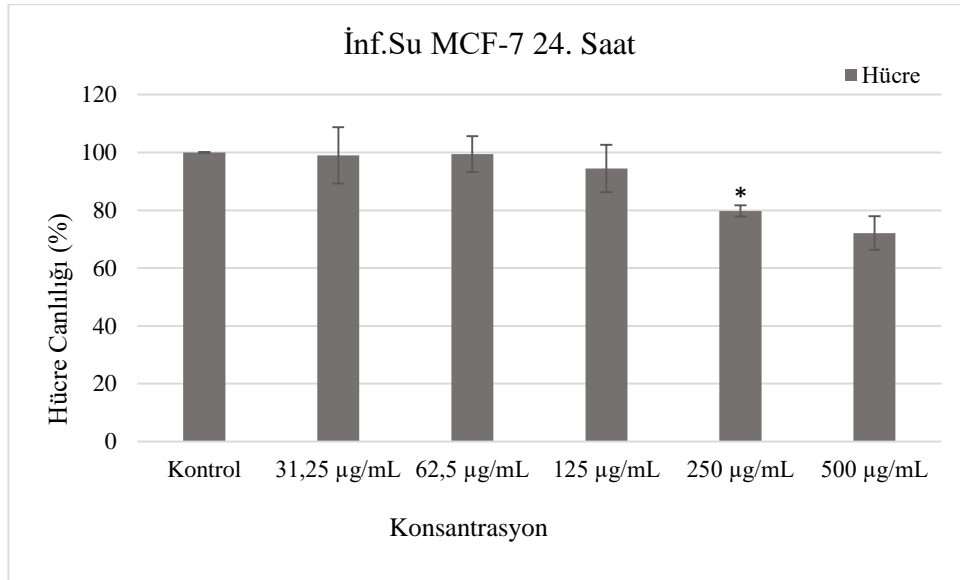


Grafik 4.14 Maserasyon MetOH ekstrektı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi metanol ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.14.'te, hücre görselleri Şekil 4.16.'da verilmiştir.

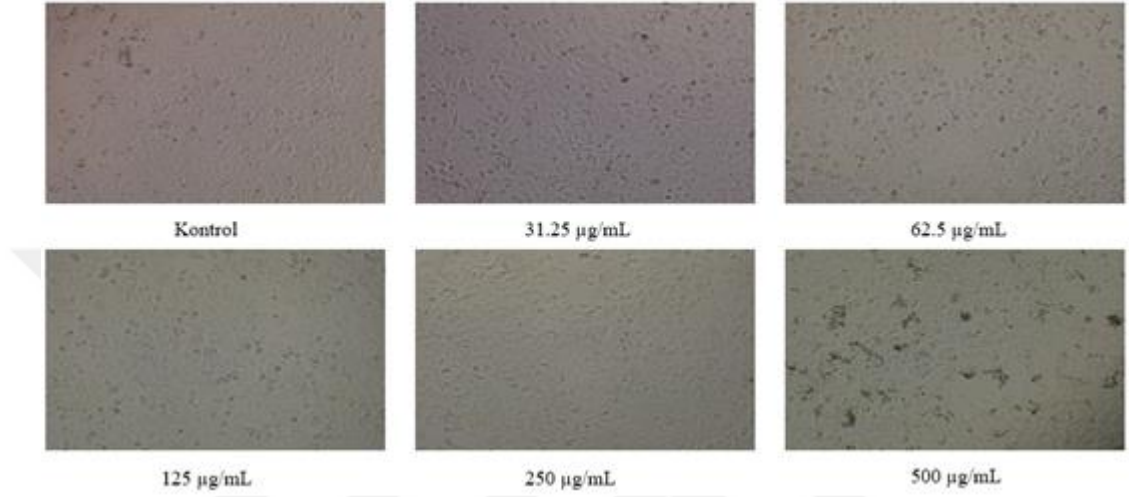


Şekil 4.16 Maserasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli

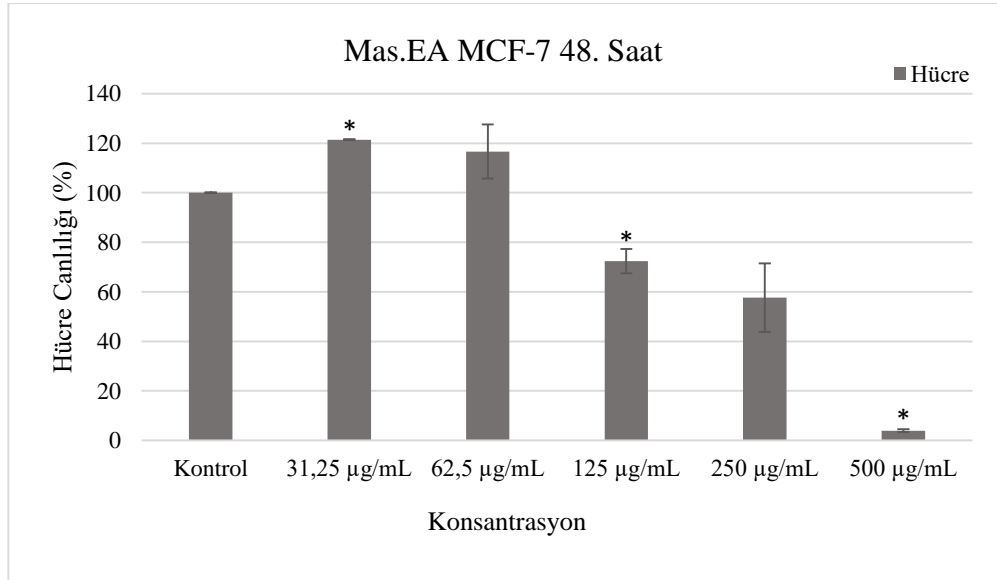


Grafik 4.15 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin infüzyon yöntemi su ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, önemli bir sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılık Grafiği 4.15.'te, hücre görselleri Şekil 4.17'de verilmiştir.

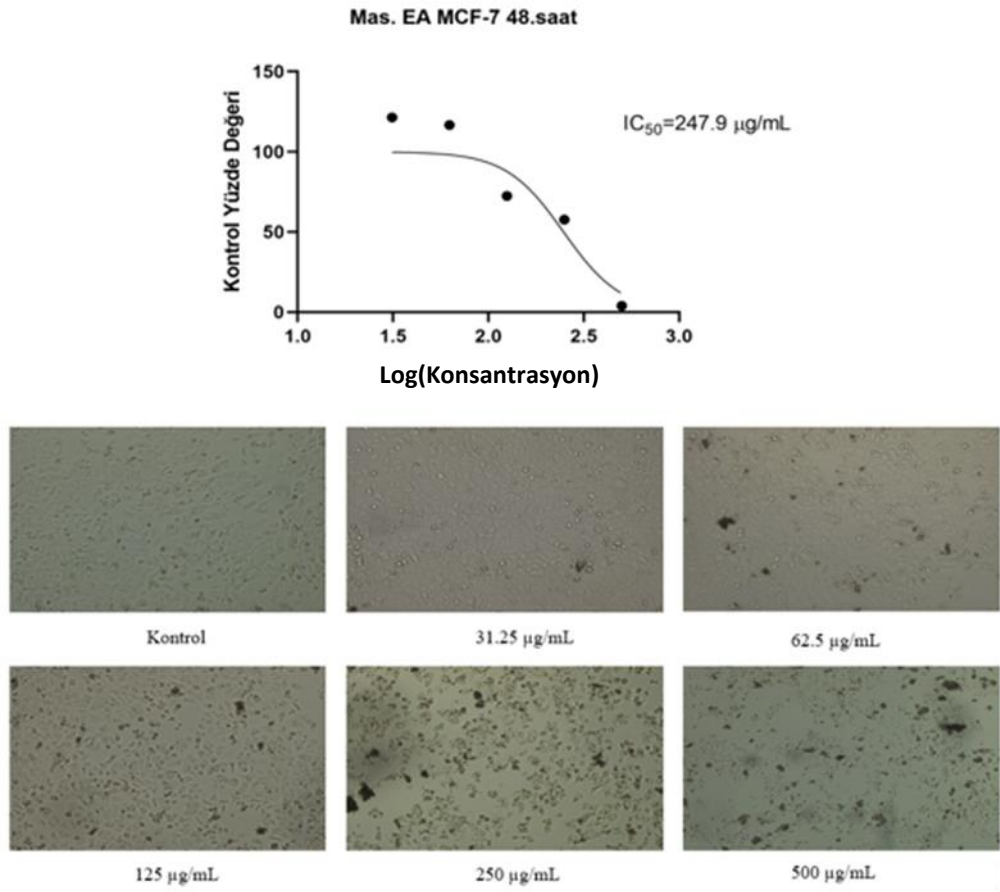


Şekil 4.17 İnfüzyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli

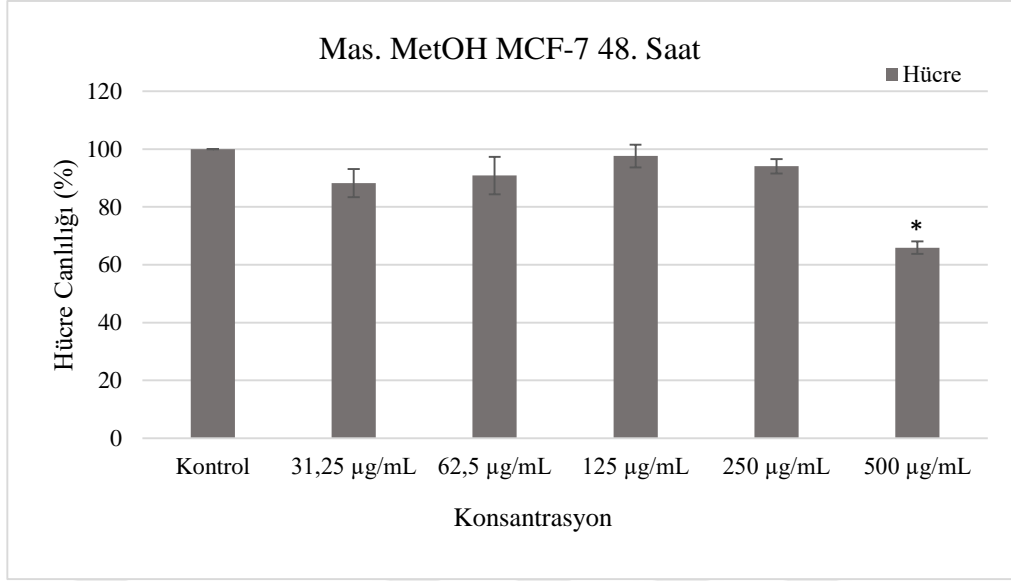


Grafik 4.16 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, doza bağımlı bir azalma gözlenmiş ancak en yüksek sitotoksik aktivite 500 µg/mL’da gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL’da %3,94’ünün, canlı kaldığı belirlenmiştir. Maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 247,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.16’da, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.18. verilmiştir.

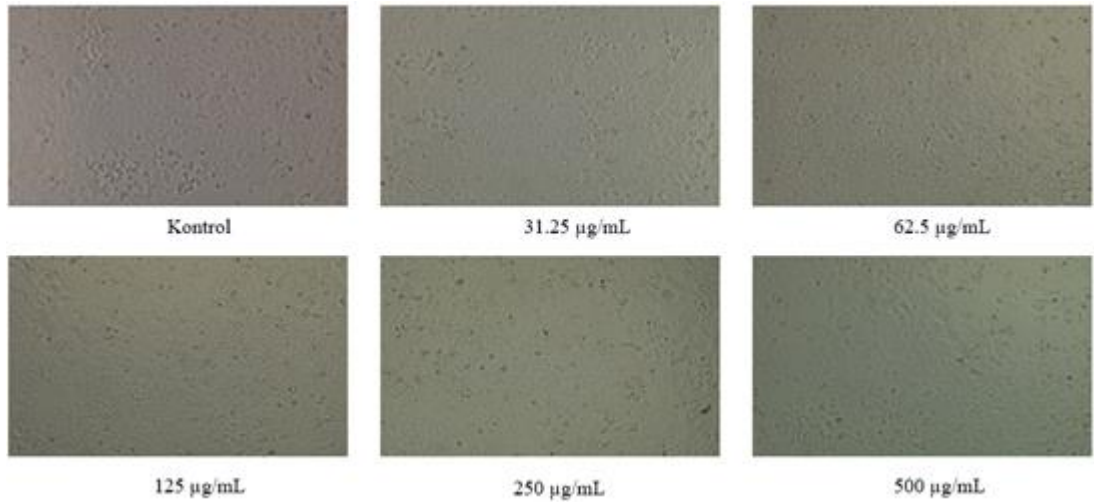


Şekil 4.18 Maserasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli

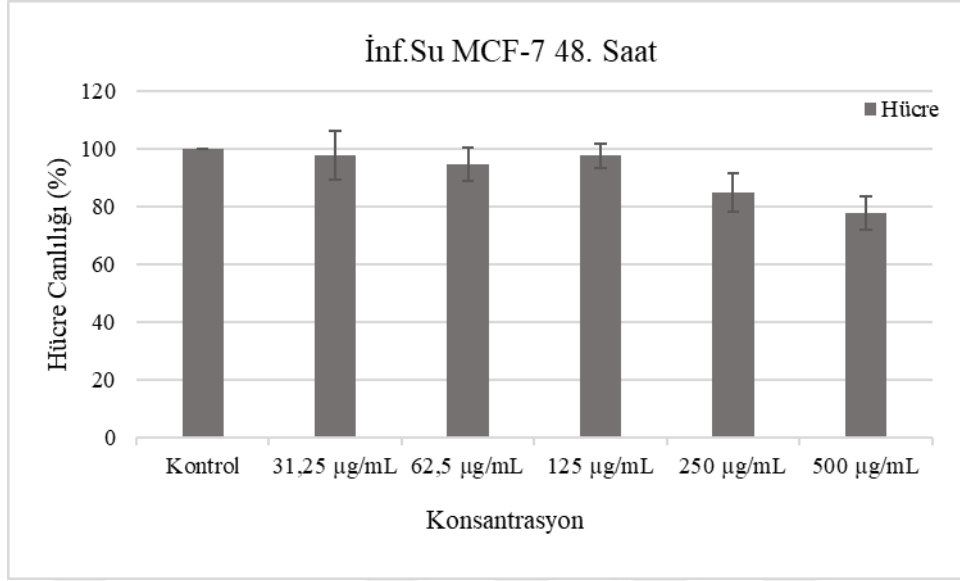


Grafik 4.17 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin maserasyon yöntemi metanol ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığındaki en fazla düşüş 500 µg/mL'da gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL'da %65,90'ının canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.17.'de, hücre görselleri Şekil 4.19.'da verilmiştir.

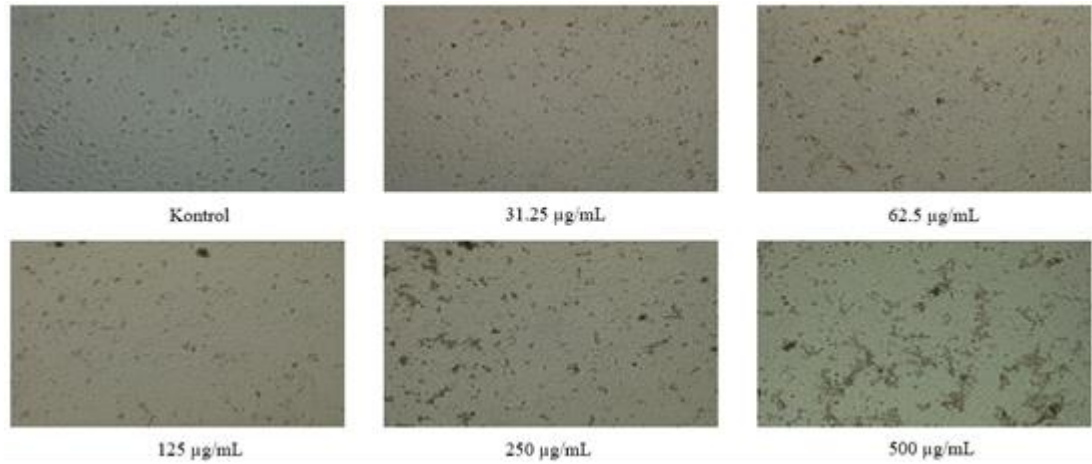


Şekil 4.19 Maserasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli

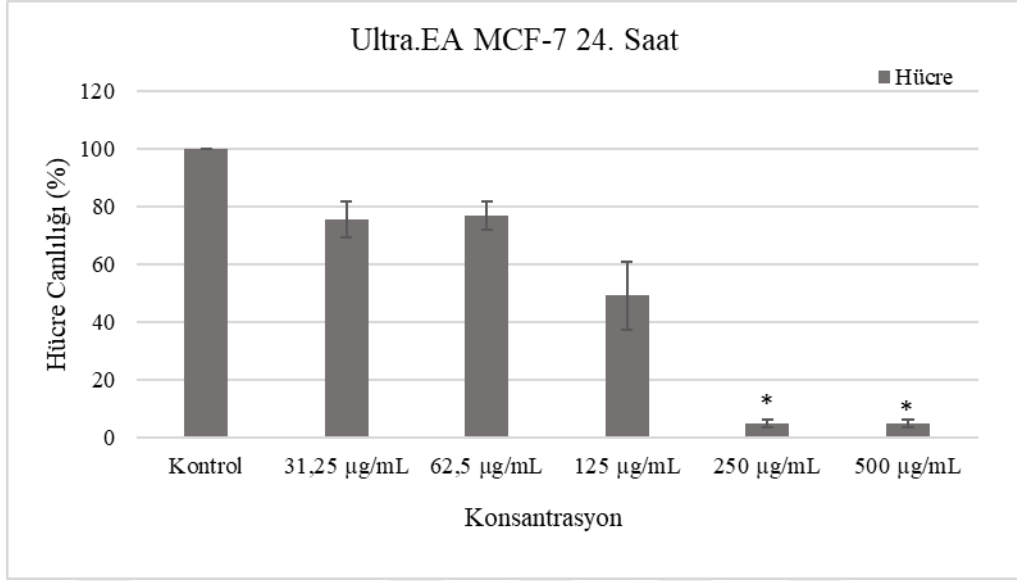


Grafik 4.18 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin infüzyon yöntemi su ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, test edilen konsantrasyonlarda hücre canlılığında önemli bir azalış gözlenmemiştir. Hücrelerin 500 µg/mL'da %77,98'inin canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.18.'de, hücre görselleri Şekil 4.20.'de verilmiştir.



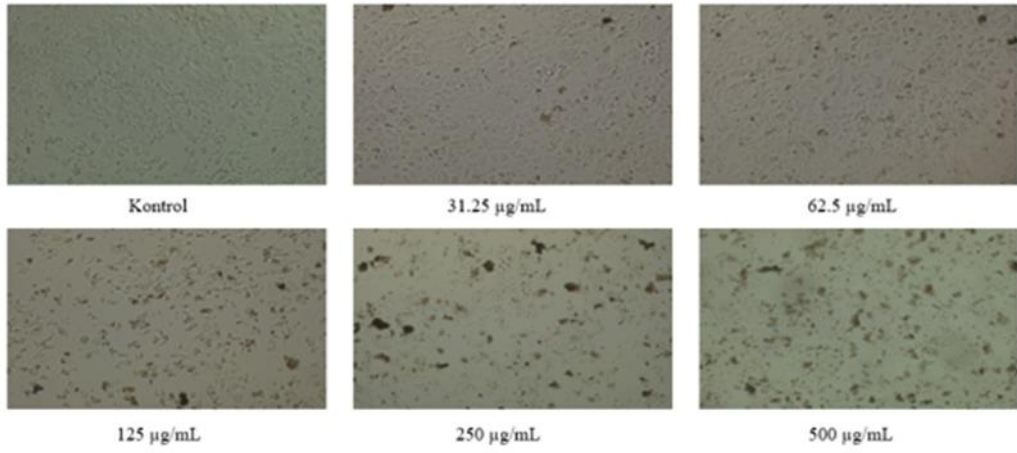
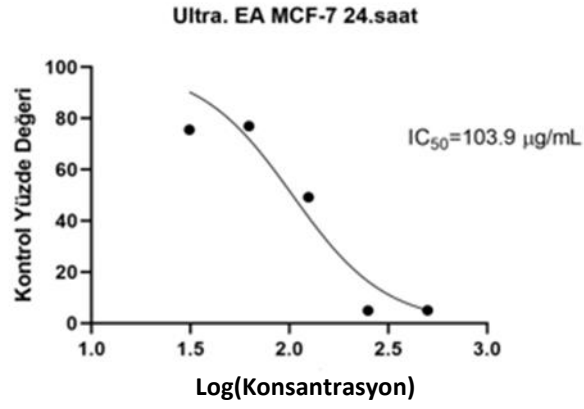
Şekil 4.20 İnfüzyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli



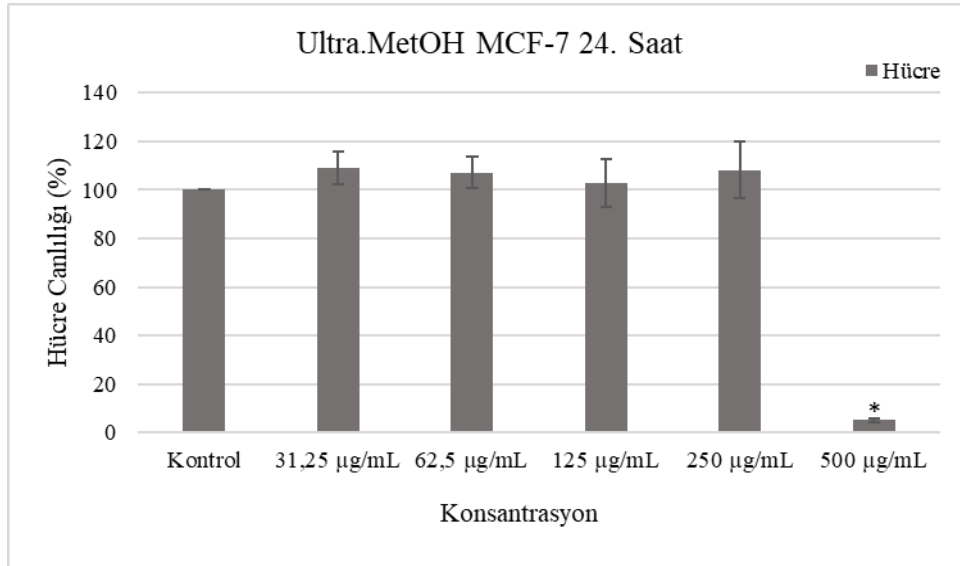
Grafik 4.19 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, test edilen konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gözlenmiş olup, hücrelerin 500 µg/mL’da %5,03’ünün 250 µg/mL’da ise %4,92’sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının 24. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 103,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.19.’da, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.21 verilmiştir.



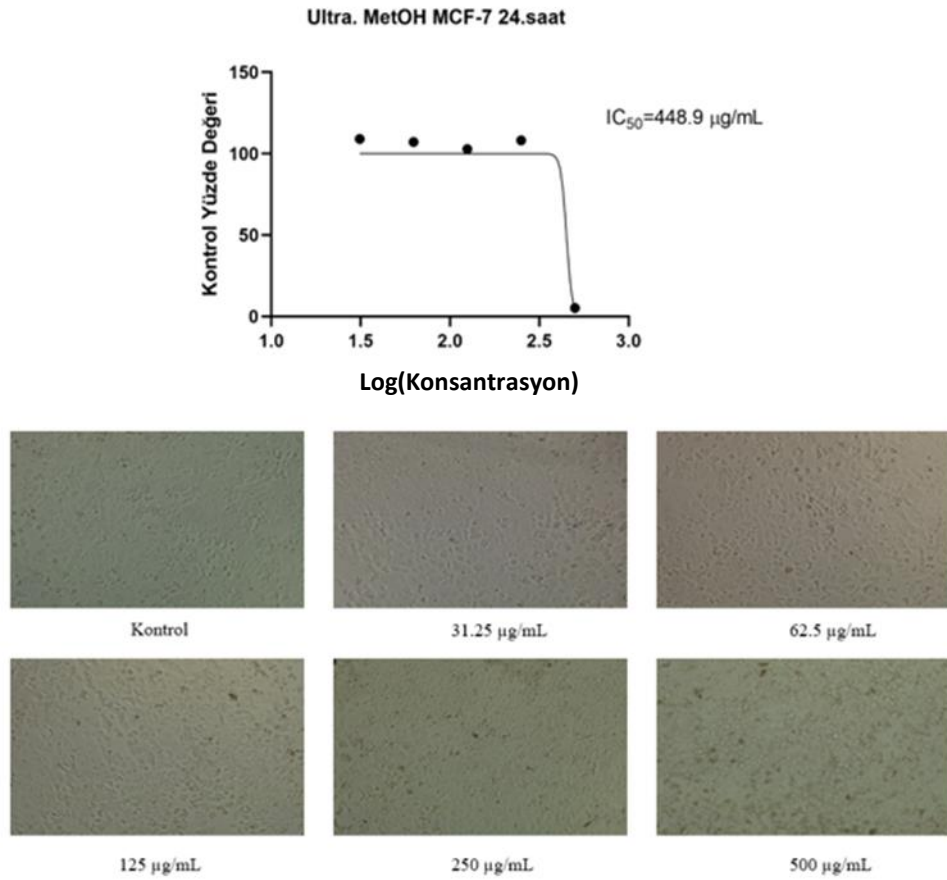


Şekil 4.21 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli

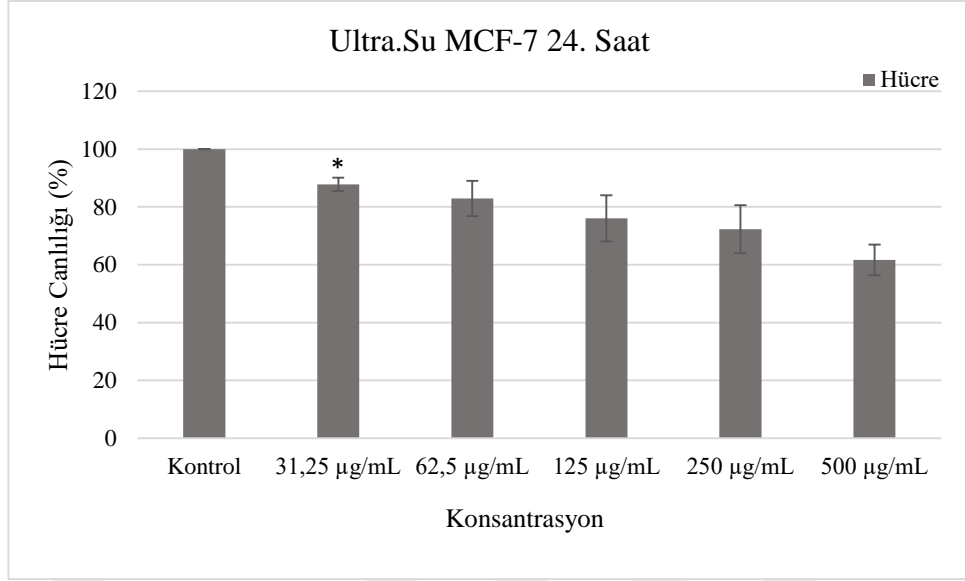


Grafik 4.20 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, 500 µg/mL’da konsantrasyonda sitotoksik aktivite gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL’da %5,13’ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının 24. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 448,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.20.’de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.22.’de verilmiştir.

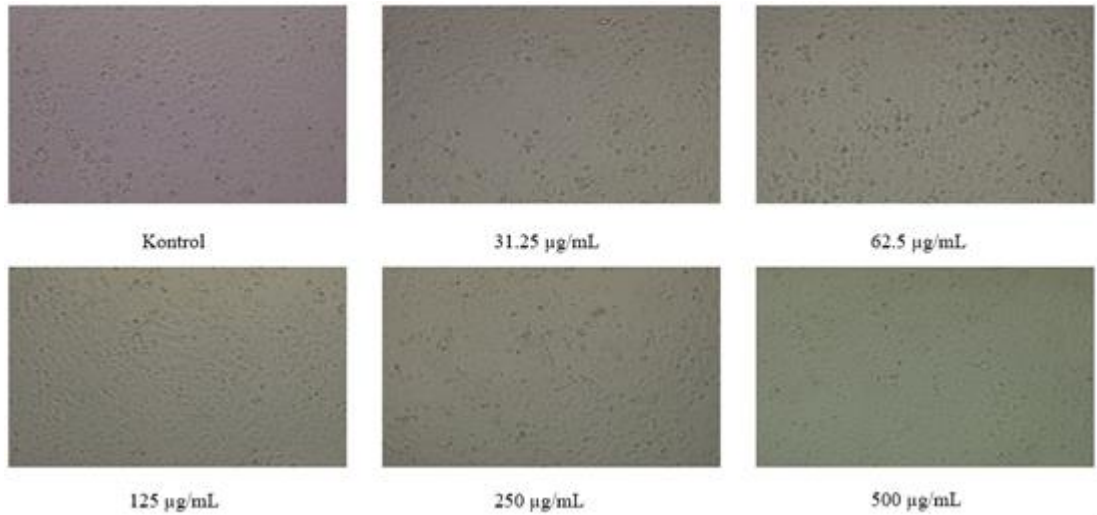


Şekil 4.22 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli

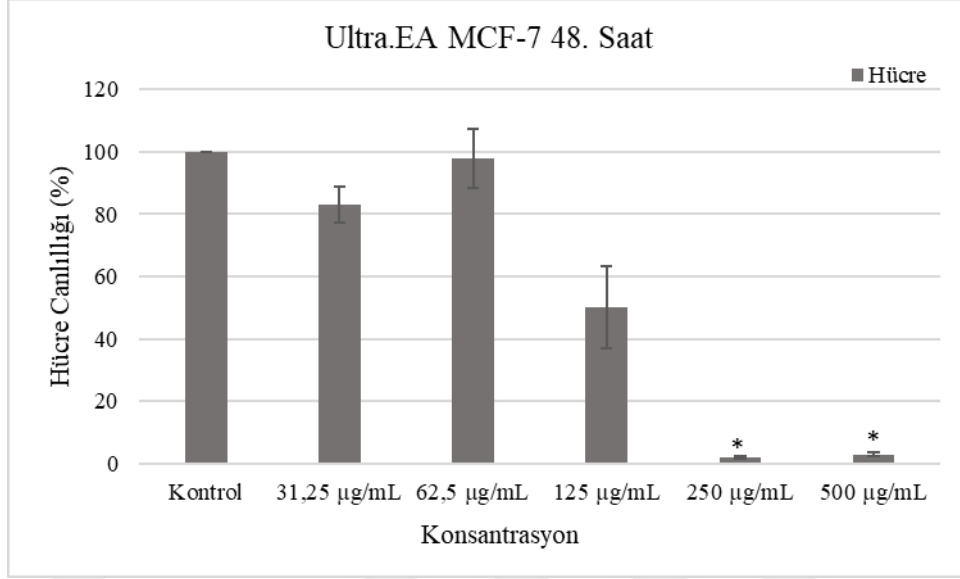


Grafik 4.21 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktının MCF-7 hattı için 24. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında doza bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL’da %61,67’sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda 24. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.21.’de, hücre görselleri Şekil 4.23.’te verilmiştir.



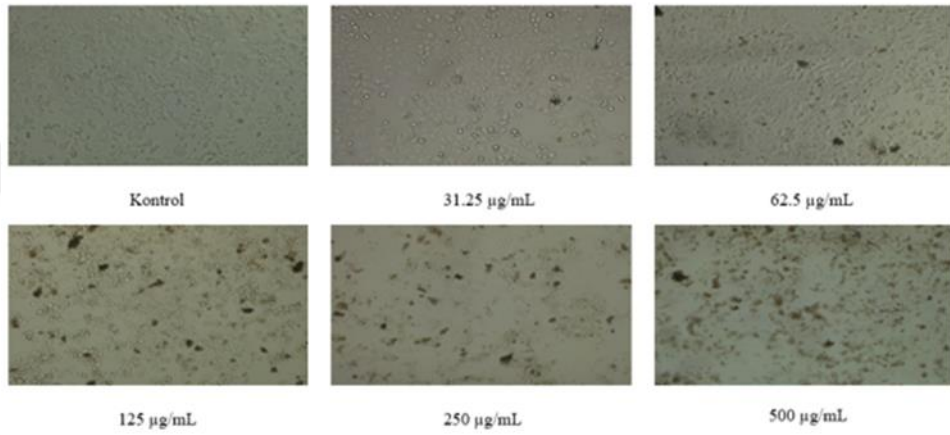
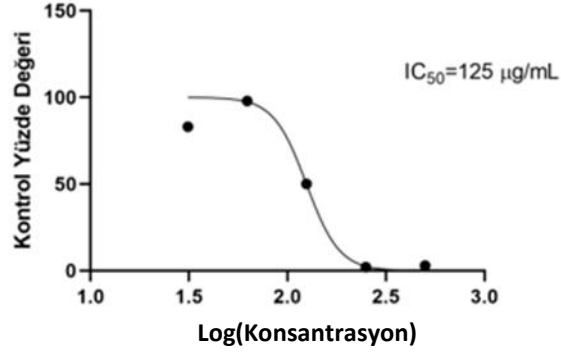
Şekil 4.23 Ultrasonikasyon su ekstraktı 24. saat MCF-7 hattı görseli



Grafik 4.22 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

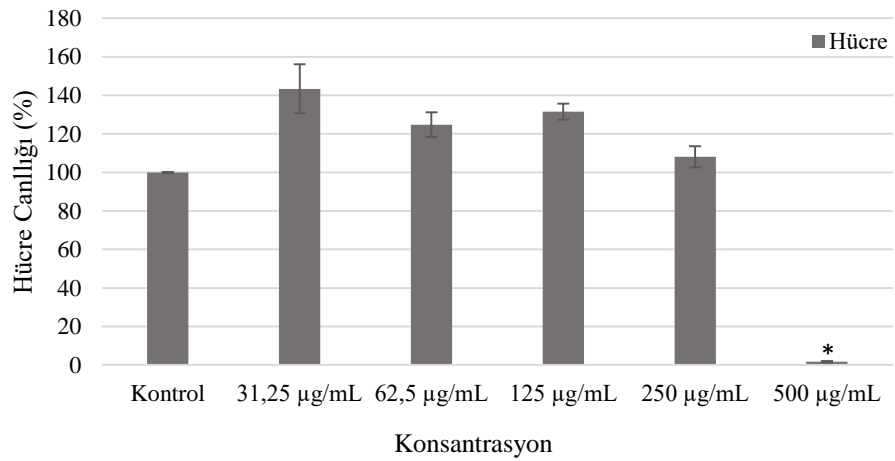
*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, en yüksek sitotoksik aktivite 500 ve 250 µg/mL’da gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL’da %2,87’sinin 250 µg/mL’da ise %2’sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ekstraktının 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 125 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.22’de, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.24.’te verilmiştir.

Ultra. EA MCF-7 48.saat



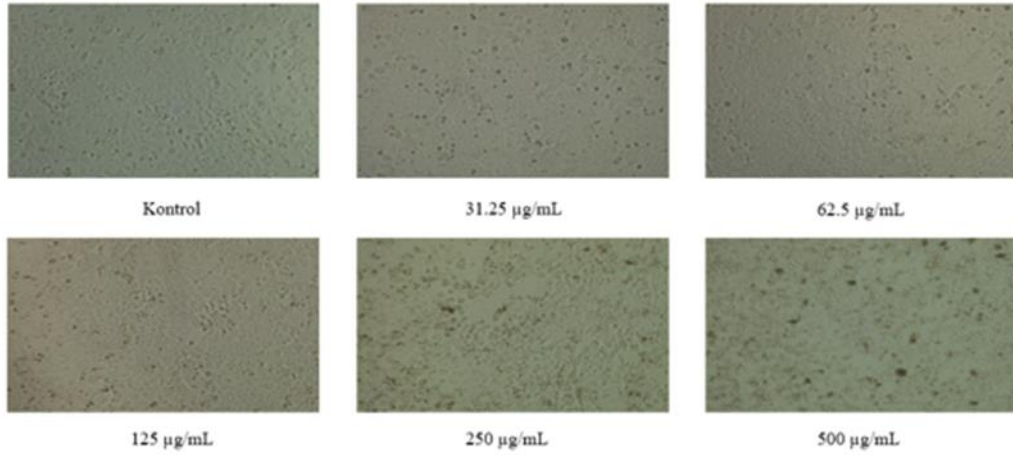
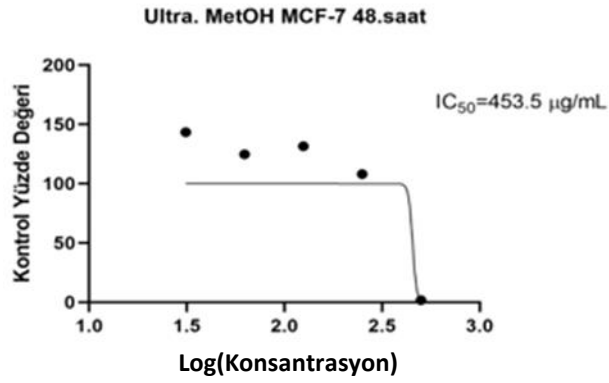
Şekil 4.24 Ultrasonikasyon EA ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli

Ultra.MetOH MCF-7 48. Saat

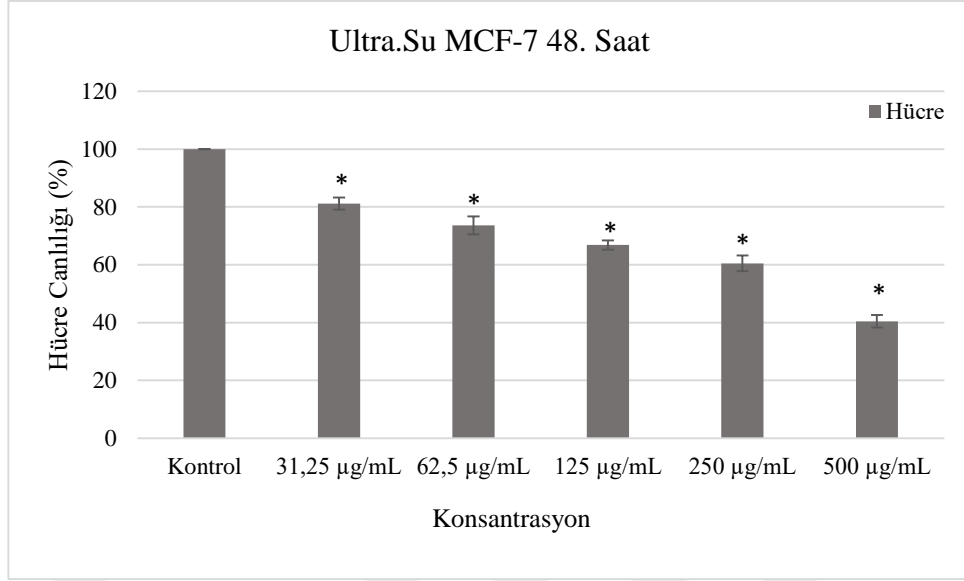


Grafik 4.23 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, 500 µg/mL konsantrasyonda sitotoksik aktivite gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL'da %1,67'sinin canlı kaldığı belirlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktının 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 453,5 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.23.'te, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.25. verilmiştir.

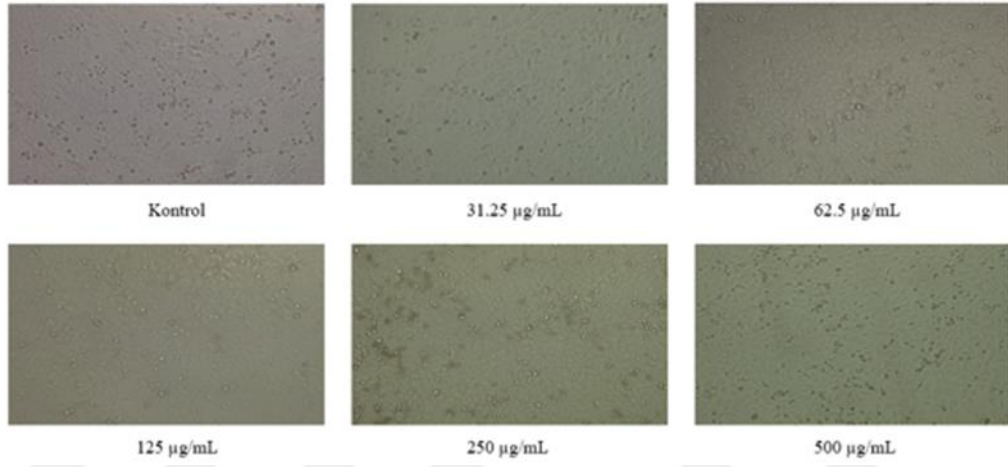
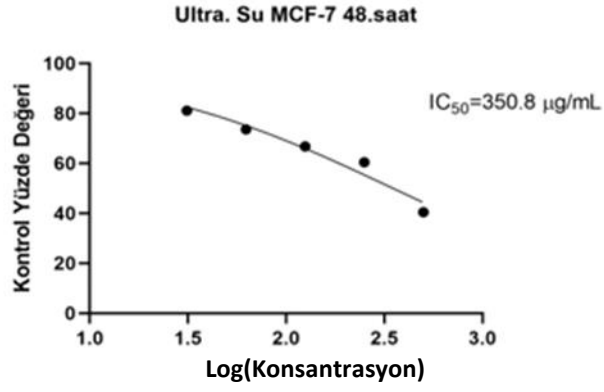


Şekil 4.25 Ultrasonikasyon MetOH ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli



Grafik 4.24 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı

*Heracleum humile* bitkisinin ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktının MCF-7 hattı için 48. saatteki etkisi incelendiğinde, hücre canlılığında doza bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Hücrelerin 500 µg/mL’da %40,43’ünün canlı kaldığı belirlenmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktının 48. saatteki IC<sub>50</sub> değeri ise 350,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonlarda 48. saatteki hücre canlılığı Grafik 4.24.’te, hücre görselleri ve IC<sub>50</sub> değeri Şekil 4.26.’da verilmiştir.



Şekil 4.26 Ultrasonikasyon su ekstraktı 48. saat MCF-7 hattı görseli

Sitotoksik aktivite bulgularına göre hücre canlılığını en çok azaltan ve en düşük IC<sub>50</sub> değerlerinin elde edildiği ekstraktlar; her iki hücre hattında da sırasıyla ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemleri EA ekstraktları olmuştur. EA ekstraktları ile karşılaştırıldığında metanol ekstraktlarının hücre canlılığını daha az etkilediği ve son olarak su ekstraktlarının en az sitotoksik etkiyi gösterdiği belirlenmiştir.



## 5. TARTIŞMA

Canlıların yaşamlarını ve nesillerini devam ettirebilmesi için genetik bilginin hatasız olarak yeni hücelere aktarılması gereklidir. Bu aktarımda gerçekleşen bir hata yalnızca DNA replikasyonu ve kromozomların dağılımı esnasında oluşmayabilir. İçerden veya dışarıdan gelen etmenlerin mutasyona sebep vererek DNA hasarı oluşturması ile de gerçekleşebilir. DNA hasarı hücrenin yaşam süreci boyunca herhangi bir dönemde oluşabilir. Hücrede oluşan DNA hasarının giderilmesindeki başarısızlık, mutasyon, tümör oluşumuna bağlı kanserleşme, hücrenin veya organizmanın ölümüyle sonuçlanabilir (Zhou ve Elledge, 2000; Sancar vd. 2004). DNA hasarının oluşmasına reaktif oksijen türleri (ROT) sebep olabilir. Reaktif oksijen türleri hücre içi ve hücreler arası gerçekleşen metabolik olaylar sonucunda üretilir. Hücredeki antioksidan mekanizmaları, reaktif oksijen türlerinin miktarını hücreye zarar vermeyecek seviyede tutmaya çalışır ancak bu dengenin bozulması sonucunda DNA hasarı oluşabilir (Mittler, 2017). Çalışmamızda *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon, infüzyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının biyolojik aktivitesi değerlendirilmiştir. Biyolojik aktivite testleri kapsamında DNA koruma analizi yapılmıştır. Bu bağlamda ekstraktların DNA koruma aktivitesi sonuçlarını değerlendirirsek; maserasyon ve infüzyon yöntemi ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktları zayıf DNA koruma aktivitesi gözlenmiştir. Maserasyon yöntemi EA ve MetOH ekstraktları yaklaşık olarak %25-%30 oranında zayıf koruma aktivitesi göstermiştir. İnfüzyon yöntemi su ekstraktı ise yaklaşık %35 oranında zayıf koruma aktivitesi göstermiştir. Bitki kısımlarından ekstraksiyon işlemlerinde temel amaç, içerikte bulunan bileşiklerin en yüksek verimde elde edilmesini sağlamaktır. Ayrıca istenmeyen atık bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlayarak diğer bileşikler üzerindeki olumsuz etkiyi minimuma indirmek, ekstraksiyon işlemlerinde önemli bir amaçtır. Maserasyon, infüzyon, perkolasyon ve dekoksasyon gibi yöntemler geleneksel, klasik ekstraksiyon yöntemleridir. Bunlar gibi geleneksel yöntemler ekstraksiyon işleminin süresini uzatması, çok fazla miktarda çözücü kullanılmasını gerektirmesi ve bu çözücülerin toksik etkileri gibi sebepler yüzünden dezavantaja sahiptir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonikasyon gibi yöntemler günümüzde kullanılan daha yeni

ekstraksiyon teknikleridir. Ekstraktların kalitesini ve işlemin verimini arttırmaları. Bu yeni yöntemler toksik kimyasal çözücülerin kullanımını azaltarak önemli bir potansiyel ortaya koyarlar (Tiwari, 2015). Maserasyon ve infüzyon yöntemi ile elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstraktlarının zayıf da olsa gösterdiği DNA koruma aktivitesinin bitki toprak üstü kısımlarının içeriğinde bulunan bileşikler yardımıyla açıklanabileceği düşünülmektedir.

*Heracleum persicum* bitkisinin tıbbi etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada uçucu yağlarının içeriğinde oktil asetat, hekzil butirat, hekzil-2-metil butirat, hekzil izobutirat bileşiklerinin temel olarak bulunduğu belirtilmiştir. Çalışmada bu bileşiklerin antioksidan etki oluşturabileceği söylenmiştir (Atefeh vd. 2010). Ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen ekstraktlarda ise DNA koruma aktivitesi gözlenmemiştir. Bitki ekstraktlarının elde edilmesinde kullanılan yöntemlerin çeşitliliği farklı sonuçlar elde etmeyi sağlayarak yöntemleri karşılaştırma imkânı vermektedir.

Maserasyon ve infüzyon yöntemleri ile ekstraktların eldesi toz haline getirilmiş bitki kısımlarının uygun çözücülerde ıslatılıp, bekletilmesi sonucunda gerçekleştirilir. İnfüzyon yönteminde bitki kısımları soğuk ya da kaynamış suda bekletilerek ekstrakt eldesi yapılır. Maserasyon yöntemi ile ekstrakt elde etme işlemlerinde sıcaklık değişimlerinin ve kullanılan çözücü seçiminin önemli olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Centella asiatica* bitkisinden ekstrakt eldesi 90°C'de gerçekleştirildiğinde, fenolik içeriklerde ve antioksidan kapasitede artış gözlenmiştir. Ultrasonikasyon yönteminde ise ses dalgaları yolu ile ekstrakt eldesi sağlanmaktadır. Ses dalgalarının frekans aralığı ise 20 kHz ile 2000 kHz arasındadır. Ultrasonikasyon yönteminde ses dalgalarının frekansı 20 kHz'den fazla olduğu zaman serbest radikallerin oluşumunu arttırabileceği söylenmiştir. Bu durumunun bitki içeriğinde bulunan aktif fitokimyasallar üzerinde bir etkiye sebep olabileceği belirtilmiştir (Azwanida, 2015).

Çalışma kapsamında *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından maserasyon, infüzyon ve ultrasonikasyon yöntemleri ile elde edilen EA, MetOH ve su ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hatları üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivite yani hücre canlılığı, MTT testi ile

değerlendirilmiş olup, 24. ve 48. saatlerde 5 farklı dozdaki (31,25, 62,5, 125, 250, 500 µg/mL) etkiye bakılmıştır. Aynı hücre hattı üzerinde farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların etkisi karşılaştırılmıştır. Buna göre MCF-7 hücre hattı üzerinde maserasyon yöntemi EA ekstraktının 24. ve 48. saatteki etkisi değerlendirildiğinde en iyi etki 500 µg/mL konsantrasyonda gözlenmiştir. Hücre canlılığı 24. saat için % 4,96 iken 48. saatte %3,94 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktları da MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. ve 48. saatlerde 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda en iyi etkiyi göstermiştir. Hücre canlılığı 24. saat için 250 µg/mL konsantrasyonda %4,92, 500 µg/mL konsantrasyonda %5,03 hesaplanmış iken, 48. saatte 250 µg/mL konsantrasyonda %2, 500 µg/mL konsantrasyonda ise %2,87 olarak hesaplanmıştır. Maserasyon yöntemi MetOH ekstraktı MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. ve 48. saatler için test edilen konsantrasyonlarda önemli bir sitotoksik aktivite göstermemiştir. Hücre canlılığı %50'nin üzerinde kalmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi MetOH ekstraktları da MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. ve 48. saatlerde 500 µg/mL konsantrasyonda en iyi etkiyi göstermiştir. Hücre canlılığı 24. saat için 500 µg/mL konsantrasyonda %5,13, 48. saatte 500 µg/mL konsantrasyonda %1,67 olarak belirlenmiştir. İnfüzyon yöntemi su ekstraktı MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. ve 48. saatler için test edilen konsantrasyonlarda önemli bir sitotoksik aktivite göstermemiştir. Hücre canlılığı tüm konsantrasyonlarda %50'nin üzerinde kalmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktı MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. saatte doza bağlı olarak sitotoksik aktivite göstermiştir ancak hücre canlılığı %50'nin altına düşmemiştir. 48. saatte ise yine doza bağlı bir azalma görülmüş ve 500 µg/mL konsantrasyonda en iyi sitotoksik aktivite belirlenmiştir. Hücre canlılığı %40,43 olarak hesaplanmıştır.

Farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların etkisi MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde de karşılaştırılmıştır. Buna göre maserasyon yöntemi EA ekstraktı 24. ve 48. saatte de etki göstermiştir. 24. saatte en iyi etki 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Hücre canlılığı 250 µg/mL konsantrasyonda %11,02, 500 µg/mL konsantrasyonda %11,54 olarak hesaplanmıştır. 48. saatte ise en iyi etki 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda belirlenmiştir.

Hücre canlılığı 125 µg/mL konsantrasyonda %18,33, 250 µg/mL konsantrasyonda %11,11, 500 µg/mL konsantrasyonda %10,67 olarak bulunmuştur. Ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktı da en iyi etkiyi 24. saatte 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda, 48. saatte ise 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda göstermiştir. Hücre canlılığı 24. saatte 250 µg/mL konsantrasyonda %11,96, 500 µg/mL konsantrasyonda %12,99 olarak hesaplanmış, 48. saatte 125 µg/mL konsantrasyonda %13,83, 250 µg/mL konsantrasyonda %11,97, 500 µg/mL konsantrasyonda %12,91 olarak belirlenmiştir. Maserasyon yöntemi metanol ekstraktı 24. saatte sitotoksik etki göstermemiştir ancak 48. saatte 500 µg/mL konsantrasyonda en iyi etkiyi göstermiştir. Hücre canlılığı 48. saat için 500 µg/mL konsantrasyonda %7,50 olarak hesaplanmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi metanol ekstraktı da 24. saatte güçlü bir sitotoksik etki göstermemiştir. Hücre canlılığı tüm konsantrasyonlarda %50'nin üzerinde kalmıştır. 48. saatte ise 500 µg/mL konsantrasyonda en iyi etkiyi göstermiştir. Hücre canlılığı 500 µg/mL konsantrasyonda %7,35 olarak belirlenmiştir. İnfüzyon yöntemi su ekstraktında 24. ve 48. saatlerde etkili bir sitotoksik aktivite gözlenmemiştir. Hücre canlılığı tüm konsantrasyonlarda %50'nin oldukça üzerinde kalmıştır. Ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktında ise 24. ve 48. saatlerde 500 µg/mL konsantrasyonda en iyi etki gözlenmiştir. Hücre canlılığı 24. saatte 500 µg/mL konsantrasyonda %35,47, 48. saatte 500 µg/mL konsantrasyonda %16,36 olarak hesaplanmıştır.

IC<sub>50</sub> değeri olarak bilinen hücrelerin yarısını inhibe eden, öldüren konsantrasyon değeri GraphPad Prism 8.0 versiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Test edilen tüm saat ve hücre hatları için maserasyon ve ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktlarında en düşük IC<sub>50</sub> değerleri yakalanmıştır. Hücrelerin yarısını öldüren IC<sub>50</sub> değerinin test edilen saat için düşük olması ekstraktın etkinliğini göstermektedir. Yöntemler arasındaki etki kıyaslandığında; MDA-MB 231 hücre hattı üzerinde en düşük IC<sub>50</sub> değeri ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktında 48. saatte elde edilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri 97,94 µg/mL olarak bulunmuştur. MCF-7 hücre hattı içinse en düşük IC<sub>50</sub> değeri yine ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktında 24. saatte elde edilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri 103,9 µg/mL olarak bulunmuştur. İnfüzyon yöntemi su ekstraktlarının etkisi değerlendirildiğinde her iki hücre hattında da test edilen saatlerde hücre canlılığı %50'nin üzerinde kaldığı için IC<sub>50</sub> hesaplanamamıştır. Maserasyon yöntemi metanol ekstraktında MCF-7 hücre hattı için test edilen saatlerde de IC<sub>50</sub> hesaplanamamıştır.

Ekstraktlar hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini içeriklerinde bulunan bileşikler sayesinde göstermiş olabilir. Demirci ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada, *Heracleum humile* bitkisinin yaprak ve meyve kısımlarından elde edilen uçucu yağların içerik analizi yapılmıştır. İçerik analizinde apiol, oktil asetat, hekzil butirat, hekzil-2-metil butirat, hekzil izobutirat, oktil izobutirat ve oktil-2-metil butirat bileşikleri bulunmuştur. Bizim de çalışmamızda *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından farklı yöntemlerle elde edilen EA, metanol ve su ekstraktları kullanılmış olup, sitotoksik aktivite gösteren ekstraktların içeriğinde yukarıda yazılan bileşiklerin ihtimal olarak olabileceği düşünülmektedir. Çünkü, literatür çalışmaları incelendiğinde, yapılmış bir çalışmada apiol bileşiğinin K-562 (insan kronik miyelojenöz lösemi hücre hattı), NCI-H460 (insan akciğer tümörü hücre hattı) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinomu) hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Di Stefano vd. 2011). Çalışmamızda da farklı doz ve zamanlarda hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite görülmüştür. Literatürde bulunan başka bir çalışmada ise *Heracleum verticillatum* ve *H. ternatum* bitkilerinin meyve kısımlarından elde edilen uçucu yağların içeriğinde alifatik esterlerin büyük bir oranda olduğu belirtilmiştir. Bu alifatik esterlerden oktil asetat, oktil-2-metil butirat, oktil izobutirat, oktil heksanoat bileşikleri çoğunluk olarak bulunmaktadır. Oktil asetat bileşiği her iki bitkinin meyve kısmından elde edilen uçucu yağ içeriğinde de bulunmuştur. Bu bitkilerin meyve kısmından elde edilen uçucu yağların sitotoksik analizinde ise HeLa (serviks), LS174 (insan kolon karsinom) ve A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre hatları üzerinde önemli bir aktivite gözlenmiştir. IC<sub>50</sub> değerlerinin oldukça düşük çıktığı belirtilmiştir (Uşjak vd. 2016). Mevcut çalışmada elde edilen sitotoksik aktivite bulgularına göre etki gösteren ekstraktların genel olarak doza ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığında bir azalış gerçekleştirdiği görülmüştür. Sitotoksik etki gösteren ekstraktların en güçlü etkiyi 500 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda gösterdiği belirlenmiştir. En düşük IC<sub>50</sub> değeri ultrasonikasyon yöntemi EA ekstraktında 48. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde elde edilmiş olup, IC<sub>50</sub> değeri 97,94 µg/mL olarak bulunmuştur. Farklı hücre hatları üzerinde *Heracleum* cinsine ait türler ile yapılmış sitotoksik aktivite çalışmaları literatürde mevcuttur. *Heracleum* cinsine ait türlerin etki gösterdiği mevcut çalışmalar göz önüne alındığında, sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, antibakteriyel analiz, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463 suşları ile yapılmış olup, sonuçlarını değerlendirdiğimizde en iyi sonuç maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktında görülmüştür. Ekstraktın en iyi etkisi *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) suşları üzerinde gözlenmiştir. Negatif kontrol ile kıyaslandığında maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktı MİK değeri 125 µg/mL, MBK değeri ise 500 µg/mL olarak belirlenmiştir. Negatif kontrolün yani çözücünün *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) suşları için MİK değeri 250 µg/mL, MBK değeri 500 µg/mL olarak bulunmuştur. Maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktının diğer test edilen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463 suşlarında MİK ve MBK değeri negatif kontrole göre daha yüksek değerde bulunmuştur. Maserasyon yöntemi metanol ekstraktı ile ultrasonikasyon yöntemi etil asetat ve metanol ekstraktlarının etkisi negatif kontrolleri ile karşılaştırıldığında ya aynı MİK ve MBK konsantrasyonunda ya da daha yüksek konsantrasyonda görülmüştür. İnfüzyon yöntemi ve ultrasonikasyon yöntemi su ekstraktlarında test edilen bakterilerde belirlediğimiz konsantrasyonlarda antibakteriyel etki görülmemiştir. MİK ve MBK değerleri bu konsantrasyonlarda bulunamamıştır. Negatif kontrol çözücünün etkisini gösterdiği için negatif kontrol ile aynı etkiyi gösteren ekstraktların test edilen bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Negatif kontrolden daha yüksek bir konsantrasyonda etki gösteren ekstraktların ise içeriğindeki bileşikler ve çözücünün karşıt etkisinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Negatif kontrole göre daha düşük konsantrasyonda etki gördüğümüz bakteriler ise *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) suşlarıdır. Bir çalışmada *Proteus vulgaris*, *Serratia marrescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının hastane enfeksiyonlarına en çok sebep olan suşlar olduğu belirtilmiştir (Chong vd. 1993). *Proteus vulgaris* suşunun fırsatçı bir patojen olup akciğer ve idrar yolu enfeksiyonlarına sebebiyet verdiği bilinmektedir (Chenal vd. 2015). *Salmonella*

cinsi bakterilerin insanlarda tifo hastalığına ve besin zehirlenmelerine, *E. coli* bakterisinin ise idrar yolu enfeksiyonlarına sebebiyet verdiği de bilinmektedir (Al-Bayati ve Al-Mola, 2008; Gowri ve Vasantha, 2010). Literatürde *Heracleum* cinsine ait bitkilerin farklı kısımlarından çeşitli çözücüler ile elde edilmiş ekstraktların etkisinin bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar üzerinde değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Miladinović ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada *H. sibiricum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisi mikrodilüsyon yöntemi ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi ile değerlendirilmiştir. MİK ve MBK değerlerinin 2431,2- 9724,8 µg/mL aralığında bulunduğu görülmüştür. Bu çalışmada da *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 suşları test edilmiş ve zayıf antimikrobiyal aktivite görüldüğü rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada *H. siamicum* bitkisinin uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi, agar disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. Test edilen bakterilerden *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının diğer test edilen mikroorganizma türlerine göre *H. siamicum* bitkisinin uçucu yağlarına karşı daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile yapılan test sonucuna göre bu iki suş için zon oluşumunun gözlenmediği bildirilmiştir (Kuljanabhagavad vd. 2011). Ergene ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada *Heracleum sphondylium* L. türünün bir alt türü olan *H. artvinense* (Manden.) bitkisinin etanol ve su ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre çalışmada kullanılan Gram (-) bakteriler *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının Gram (+) bakterilere göre daha az inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. *Heracleum* cinsine ait farklı türler ile yapılan bu çalışmalarda Gram (-) *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* suşlarında zayıf ile orta düzeyde söylenebilecek antibakteriyel etki görülmüştür. Mevcut çalışmada ise, negatif kontrole göre etki görülen bakteriler ve etkili konsantrasyonlar dikkate alındığında zayıf ile orta düzeyde söylenebilecek literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür çalışmaları incelendiğinde, *H. humile* bitkisinin biyolojik aktivitesinin değerlendirildiği araştırmalar oldukça kısıtlı sayıda bulunmaktadır. Bizim de çalışmamızda *Heracleum humile* bitkisinin toprak üstü kısımlarından farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktların bir takım biyolojik aktivite testleri yapılmıştır. Buna göre sonuçlar toparlandığında, *H. humile* bitkisinin maserasyon yöntemi etil asetat ve metanol ekstraktları ile infüzyon yöntemi su ekstraktının zayıf da olsa DNA koruma aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ultrasonikasyon yöntemi ekstraktlarında DNA koruma aktivitesi görülmemiştir. Özellikle sitotoksik aktivite bulguları incelendiğinde, ultrasonikasyon ve maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24. ve 48. saatlerde en etkin sitotoksisiteyi gösterdiği belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite sonuçlarında ise maserasyon yöntemi etil asetat ekstraktı, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Serratia marrescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 Gram (-) suşlarında en iyi etkiyi vermiştir. Yöntem ve farklı ekstraktların karşılaştırılması konunun özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Bitkilerin doğal kaynaklar olarak ilaç, gıda, kozmetik gibi birçok sektörde ham madde olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir. Bu anlamda özellikle ilaç sektöründe kimyasal yollarla üretilen sentetik ilaçlar yerine bitkisel kaynaklı ilaçlar konusunda araştırma geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Çeşitli bitki türlerinin farklı ekstraktlarının antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antidiyabetik etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.

*Heracleum* cinsi bitkilerin etkinliğinin araştırıldığı, değerlendirildiği farklı birçok araştırma mevcuttur. Elde ettiğimiz bulgulara göre, çalıştığımız *H. humile* bitkisinin de daha kapsamlı biyolojik aktivite analizlerinin yapılması önerilmektedir. Kanser çalışmaları için farklı hücre hatları üzerinde de *in vitro* çalışmaların yapılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ekstraktların kanser hücreleri üzerinde apoptotik ve otofajik etkilerini incelemek için moleküler analizler yapılabilir. *H. humile* bitkisinin ilaç olma potansiyelinin daha da iyi anlaşılabilmesi için sitotoksik aktivite görülen ekstraktlar



ile *in vivo* testler gerçekleştirilebilir. Antimikrobiyal analiz için daha geniş bir tarama ile patojen etki oluşturan farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkinlikleri incelenebilir.



## KAYNAKLAR

- Akbulut, S., & Bayramoglu, M. M. (2013). The trade and use of some medical and aromatic herbs in Turkey. *Studies on Ethno-Medicine*, 7(2), 67-77.
- Akcin, A., Seyis, F., Akcin, T. A., Cayci, Y. T., & Coban, A. Y. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic *Heracleum platytaenium* Boiss. from Turkey. *J Essent Oil Bear Plant*, 16, 166–171.
- Akillilar-Telkoparan, P., Tuglu, Y. B., & Shomali-Moghaddam, N. (2018). Anticancer, antioxidant properties and phenolic, flavonoid composition of *Heracleum platytaenium* plant methanolic extracts. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(3), 396-404.
- Al-Bayati, F. A., & Al-Mola, H. F. (2008). Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(2), 154-159.
- Alinezhad, S., Kamalzadeh, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M. B., Jaimand, K., Kawachi, M., ... & Razzaghi-Abyaneh, M. (2011). Search for novel antifungals from 49 indigenous medicinal plants: *Foeniculum vulgare* and *Platycladus orientalis* as strong inhibitors of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Annals of Microbiology*, 61(3), 673-681..
- Altan-Bardakcı, Hilal. (2014). Phytochemical And Biological Investigations On *Scutellaria Hastifolia* L. Doktora, *Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi*. İstanbul.
- Altuntaş-Öke, Feyza. (2012). Türkiye’de Endemik Olarak Bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) Türlerinin Moleküler Sistematığı Ve Biyolojik Aktiviteleri. Doktora, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Ankara.
- Arnold, N., Baydoun, S., Chalak, L., & Raus, T. (2015). A contribution to the flora and ethnobotanical knowledge of Mount Hermon, Lebanon. *Fl Medit*, 25, 13-55.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Rollinger, J. M. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Atapour, M., Zahedi, M. J., Mehrabani, M., Safavi, M., Keyvanfard, V., Foroughi, A., Siavoshi, F., & Foroumadi, A. (2009). In vitro susceptibility of the Gram-negative bacterium *Helicobacter pylori* to extracts of Iranian medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 77-80.

- Atefeh, H., Azamia, M., & Angaji, S. A. (2010). Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5(3), 174-176.
- Aydın, O. U., & Ercan, A. (2018). Fırsatçı Tarama Yapılan 40 yaş altı Populasyonda Meme Kanseri Tespiti. *Acta Oncologica Turcica*, 51(1), 1-5.
- 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.
- Badem, Merve. (2019). *Barbarea Auriculata* Var. *Paludosa*, *B. Integrifolia* ve *B. Plantaginea* (Brassicaceae)'nın Biyokimyasal, Fitokimyasal Ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması. Doktora, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. Trabzon.
- Bahadori, M. B., Dinparast, L., & Zengin, G. (2016). The genus *Heracleum*: a comprehensive review on its phytochemistry, pharmacology, and ethnobotanical values as a useful herb. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1018-1039.
- 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.
- 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.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Benedec, D., Hanganu, D., Filip, L., Oniga, I., Tipericiuc, B., Olah, N. K., ... & Vlase, L. (2017). Chemical, antioxidant and antibacterial studies of Romanian *Heracleum sphondylium*. *Farmacia (Bucharest, Rom)*, 65, 252-256.
- Benli, M., Güney, K., Bingöl, Ü., & Geven, F. (2007). Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *Afr J Biotechnol*, 6, 1774–1778.
- Bose, S. K., Dewanjee, S., & Mandal, S. C. (2007). Antibacterial activity of methanol extract of roots of *Heracleum nepalense* D Don. on bacteria causing diarrhoea. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(3), 286-289.
- Buruk, K., Sokmen, A., Aydın, F., & Erturk, M. (2006). Antimicrobial activity of some endemic plants growing in the eastern Black Sea region, Turkey. *Fitoterapia*, 77, 388–391.
- Chenal, A., Sotomayor-Perez, A. C., Ladant, D. (2015). Structure and function of RTX toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 4th Edition, Elsevier.

- Chong, Y., Lee, K., & Kwon, O. H. (1993). In-vitro activities of cefepime against *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and other aerobic Gram-negative bacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32(suppl\_B), 21-29.
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *The lancet oncology*, 8(3), 235-244.
- Cooper, G. M. (2000). Cancer. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- 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.
- Çil, B. (2010). *Heracleum* L.(Apiaceae) Cinsine Ait Bazı Türlerin Anatomik Özelliklerinin Sistemik Açısından Karşılaştırılması. Yüksek lisans, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Afyon.
- Da Costa, L. F. T. (2001). Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease. *Current opinion in oncology*, 13(1), 58-62.
- Darby, S. C., Ewertz, M., McGale, P., Bennet, A. M., Blom-Goldman, U., Brønnum, D., ... & Jensen, M. B. (2013). Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(11), 987-998.
- Dash, S., Nath, L. K., & Bhise, S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Heracleum nepalense* D Don root. *Trop J Pharm Res*, 4, 341–347.
- Davis, P. (1972). Umbelliferae. *Flora of Turkey and the east Aegean islands*. 4, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Demirci, F., Özek, G., Özek, T., Duran, A., Başer, K. H. C. (2006). *Heracleum humile* SM.Yaprak ve Meyve Uçucu Yağlarının Bileşim ve Antimikrobiyal Etkileri. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (XVI. BİHAT)*, P77, Erzurum.
- Demirci, S., & Özhatay, N. (2012). An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey); wild plants used for medicinal purpose in Andirin, Kahramanmaraş. *Turk J Pharm Sci*, 9(1), 75-92.
- Deniz, N. (2016). *Crocus cancellatus* Herbert subsp. *Mazziaricus* (Herbert) Mathew ve *Crocus pallasii* Goldb. subsp. *pallasii* Goldb. Taksonları Ekstraktlarının Aktif Bileşenleri Ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Denizli.
- Di Stefano, V., Pitonzo, R., & Schillaci, D. (2011). Antimicrobial and antiproliferative activity of *Athamanta sicula* L.(Apiaceae). *Pharmacognosy magazine*, 7(25), 31.

- Dincel, D., Hatipoğlu, S. D., Gören, A. C., & Topçu, G. (2013). Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. *Turkish Journal of Chemistry*, 37(4), 675-683.
- Ebadollahi, A. (2013). Plant Essential Oils from Apiaceae Family as Alternatives to Conventional Insecticides. *Ecologia Balkanica*, 5(1).
- Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk. *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 11(2), 59-66.
- Ergene, A., Guler, P., Tan, S., Hamzaoglu, E., & Duran, A. (2006). Antibacterial and antifungal activity of *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*. *Afr J Biotechnol*, 5, 1087-1089.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Liu, B. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
- Firuzi, O., Asadollahi, M., Gholami, M., & Javidnia, K. (2010). Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chem*, 122, 117-122.
- Gao, Y., Liu, Y., Wang, Z. G., & Zhang, H. L. (2014). Chemical constituents of *Heracleum dissectum* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry letters*, 10, 276-280.
- Goudarzi, M. A., Hamed, B., Malekpoor, F., Abdizadeh, R., Ghasemi Pirbalouti, A., & Raiesi, M. (2011). Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14), 3067-3073.
- Gowri, S. S., & Vasanth, K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *Int J Pharm Tech Res*, 2(2), 1569-1573.
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.
- Güneş, M. E., Çelik, G., Trabulus, F. D., Aksoy, Ş., Özorun, E., Aren, A., ... & Bahadır, F. (2012). Üçlü (ER, PGR, HER2) Negatif 47 Meme Kanserli Hastanın Değerlendirilmesi. *Istanbul Medical Journal*, 13(4).
- İşcan, G. (2002). Umbelliferae familyasına ait bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Yüksek lisans, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Eskişehir.

- İşlen, N. (2018). EGFR inhibitörünün (ag 1478) triple negatif ve luminal A meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif ve antimetastatik etkileri. Yüksek lisans, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.
- Jagannath, N., Ramakrishnaiah, H., Krishna, V., & Gowda, P. J. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Heracleum rigens*. *Nat Prod Commun*, 7, 943–946.
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 85(2-3), 231-235.
- Karan, T., & Genc, N. (2018). Antioxidant Activities of *Heracleum platytaenium* extracts and Essential Oil. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(9), 1274-1278.
- Karuppusamy, S., & Muthuraja, G. (2010). Radical scavenging activities of *Heracleum aquilegifolium* Wight (Apiaceae) fruit oils in vitro. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65, 653–659.
- Karuppusamy, S., & Muthuraja, G. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Heracleum sprengelianum* (Wight and Arnott) essential oils growing wild in peninsular India. *Iran J Pharm Res*, 10, 769–775.
- Keskin, B. H. (2019). *Echinophora tenuifolia* ve *Chenopodium botrys*'un esansiyel yağlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Tokat.
- Kousha, A., & Bayat, M. (2012). Bactericidal and fungicidal activity of methanolic extracts of *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer against some aquatic and terrestrial animal pathogens. *Intl J Pharm*, 8, 652–656.
- Kousha, A., & Ringø, E. (2015). Antibacterial effect of aquatic extract of *Heracleum* Spp. hogweed plants from Europe on thirteen different bacteria. *Pharm Chem J*, 48, 675–678.
- Kozan, R., & Tokgöz, V. Y. (2016). Türkiye'de Meme Kanseri Farkındalığı ve Tarama Programı. *ACU Sağlık Bil Derg*, 4, 185-188.
- Kuljanabagavad, T., Sriubolmas, N., & Ruangrunsi, N. (2011). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Heracleum siamicum* Craib. *Pharm Chem J*, 45, 178–182.
- Lingaraju, D. P., & Sudarshana, A. M. S. (2014). Antimicrobial activity and phytochemical screening of roots of *Heracleum rigenswall* Ex DC. *Intl J Pharma Bio Sci*, 5, 288–294.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

- Maggi, F., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L. A., ... & Vittori, S. (2014). Composition and biological activities of hogweed [*Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt] essential oil and its main components octyl acetate and octyl butyrate. *Natural product research*, 28(17), 1354-1363.
- Mazandarani, M., Makari, S., Bajian, G. R., Zarghami, M. P., & Abrodi, M. (2012). Evaluation Of Phytochemical And Antioxidant Activity In Different Parts Of *Heracleum Gorganicum* Rech. F. In Golestan Province Of Iran. *Iranian Journal of Plant Physiology* 2(2), 381-386.
- McCutcheon, A., Stokes, R., Thorson, L., Ellis, S., Hancock, R., & Towers, G. (1997). Anti-mycobacterial screening of British Columbian medicinal plants. *Intl J Pharm*, 35, 77–83.
- McPherson, K., Steel, C., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases: breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ: British Medical Journal*, 321(7261), 624-628.
- Miladinović, D. L., Ilić, B. S., Mihajilov-Krstev, T. M., Nikolić, D. M., Cvetković, O. G., Marković, M. S., & Miladinović, L. C. (2013). Antibacterial activity of the essential oil of *Heracleum sibiricum*. *Natural product communications*, 8(9), 1309–1311.
- Mileski, K. S., Ćirić, A. D., Trifunović, S. S., Ristić, M. S., Soković, M. D., Matevski, V. S., ... & Džamić, A. M. (2016). *Heracleum orphanidis*: chemical characterisation, and comparative evaluation of antioxidant and antimicrobial activities with specific interest in the influence on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Food & function*, 7(9), 4061-4074.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., & Khosravi, A. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *J Med Mycol*, 20, 174–178.
- Najafabadi, R. E., Mohammadi, M., Yousefi, M., & Habibi, Z. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from flowers, seeds and stems of *Heracleum rechingeri* (Manden) from Iran. *J Essent Oil Bear Plant*, 14, 746–750.
- Nakano, Y., Matsunaga, H., Saita, T., Mori, M., Katano, M., & Okabe, H. (1998). Antiproliferative Constituents in Umbelliferae Plants II.: Screening for Polyacetylenes in Some Umbelliferae Plants, and Isolation of Panaxynol and

Falcarindiol from the Root of *Heracleum moellendorffii*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(3), 257-261.

- Nejad, B. S., Rajabi, M., Mamoudabadi, A. Z., & Zarrin, M. (2014). In vitro anti-candida activity of the hydroalcoholic extracts of *Heracleum persicum* fruit against pathogenic candida species. *Jundishapur J Microbiol*, 7(1), 8703–8706.
- Nickavar, B., & Abolhasani, F. A. S. (2009). Screening of antioxidant properties of seven Umbelliferae fruits from Iran. *Pak J Pharm Sci*, 22(1), 30–35.
- O'Neill, T., Johnson, J. A., Webster, D., & Gray, C. A. (2013). The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. *J Ethnopharmacol*, 147(1), 232–237.
- Özçakmak, S. (2012). The effects of *Heracleum platytaenium* boiss essential oil on the growth of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* (D-99756) isolated from Kashar cheese. *J Appl Bot Food Qual*, 85, 97–99.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Pirbalouti, G. A., Broujeni, N. V., Momeni, M., Poor, M. F., & Hamedi, B. (2011). Antibacterial activity of Iranian medicinal plants against *Streptococcus iniae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Biol Sci*, 63, 59–66.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 39-85.
- Sardari, S., Armin, G., & Micetich, R. (1998). Phytopharmaceuticals part 1. Antifungal activity of selected Iranian and Canadian plants. *Pharm Biol*, 36, 180–188.
- Sarımahmut, M. (2016). Bazı bitki türlerinin antioksidatif, genotoksik, sitotoksik ve apoptotik özelliklerinin araştırılması. Doktora tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Bursa.
- Sathak, S., Manigandan, P., Sekar Babu, H., Sivaraj, C., Sindhu, S., & Arumugam, P. (2014). Antioxidant, antiproliferative activities and GC-MS analysis of methanol extract of leaves of *Heracleum sprengeianum* Linn. *Intl J Pharma Bio Sci*, 5(4), 346-356.
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109, 661-671.



- 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.
- Shokri, H., Sharifzadeh, A., & Tamai, I. A. (2012). Anti-Candida zeylanoides activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *J Med Mycol*, 22, 211–216.
- Skalicka-Woźniak, K., Grzegorzczak, A., Świątek, Ł., Walasek, M., Widelski, J., Rajtar, B., ... & Elansary, H. O. (2017). Biological activity and safety profile of the essential oil from fruits of *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 109, 820-826.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Torbati, M., Nazemiyeh, H., Lotfipour, F., Asnaashari, S., Nemati, M., & Fathiazad, F. (2013). Composition and antibacterial activity of *Heracleum transcaucasicum* and *Heracleum anisactis* aerial parts essential oil. *Adv Pharm Bull*, 3, 415–418.
- Torbati, M., Nazemiyeh, H., Lotfipour, F., Nemati, M., Asnaashari, S., & Fathiazad, F. (2014). Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Heracleum transcaucasicum* and *Heracleum anisactis* roots essential oil. *BioImpacts*, 4, 69–74.
- Ušjak, L. J., Petrović, S. D., Drobac, M. M., Soković, M. D., Stanojković, T. P., Ćirić, A. D., ... & Niketić, M. S. (2016). Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activity of *Heracleum verticillatum* Pančić and *H. ternatum* Velen.(Apiaceae) essential oils. *Chemistry & Biodiversity*, 13(4), 466-476.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(4), 200-201.
- Walasek, M., Grzegorzczak, A., Malm, A., & Skalicka-Woźniak, K. (2015). Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography. *Food chemistry*, 186, 133-138.
- Van-Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8(1), 47.
- Yallapu, M. M., Othman, S. F., Curtis, E. T., Bauer, N. A., Chauhan, N., Kumar, D., ... & Chauhan, S. C. (2012). Curcumin-loaded magnetic nanoparticles for

breast cancer therapeutics and imaging applications. *International journal of nanomedicine*, 7, 1761-1779.

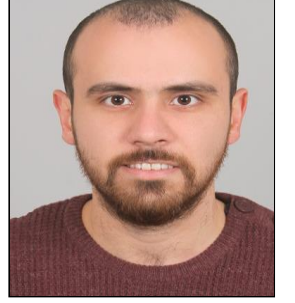
Yılmaz, G., Pınar, M., & Koyuncu, M. (2009). Pollen And Seed Morphology Of Species Of Heptaptera Marg. & Reuter (Umbelliferae) Growing In Turkey. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38(2), 103-116.

Zhou, B. B. S., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa ÖÇAL  
Doğum Yeri ve Yılı : Çanakkale 1994  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : mocal@kastamonu.edu.tr



### Eğitim Durumu

Lise : İstanbulluoğlu Anadolu Öğretmen Lisesi, 2012  
Lisans : İnönü Üniversitesi, 2017

### Mesleki Deneyim

İş Yeri : Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi,  
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Araştırma Görevlisi,  
2018- Devam Ediyor

### Yayın Listesi :

Baloglu, M. C., Llorent-Martínez, E. J., Aumeeruddy, M. Z., Mahomoodally, M. F., Altunoglu, Y. C., Ustaoglu, B., ... & Zengin, G. (2019). Multidirectional insights on *Chrysophyllum perpulchrum* leaves and stem bark extracts: HPLC-ESI-MSn profiles, antioxidant, enzyme inhibitory, antimicrobial and cytotoxic properties. *Industrial Crops and Products*, 134, 33-42.

Öçal, M., Altunoğlu-Çelik, Y., Tüfekçi, E. F., Zengin, G., & Baloglu, M. C. (2019). Farklı metotlar ile elde edilen *Heracleum humile* bitki ekstraktlarının antimikrobiyal ve DNA koruma aktivitesinin incelenmesi. *20. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi*, 111, Ankara.