T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SATUREJA CILICICA P.H. DAVIS EKSTRAKTLARININ SİTOTOKSİK ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ULKIR ABDULBAQI ABBAS ABBAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SATUREJA CILICICA P.H. DAVIS EKSTRAKTLARININ SİTOTOKSİK ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ULKIR ABDULBAQI ABBAS ABBAS

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tuna UYSAL

2019, 44 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Tuna UYSAL
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. G. Özmen GÜLER

Satureja cinsine mensup türler geleneksel olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *Satureja* cinsi Batı Asya ve Doğu Akdeniz bölgesinde yetişmekte olup, Anadolu, Türkmenistan, Kafkasya, Irak ve İran gibi coğrafyalarda da yayılış göstermektedir. Endemik bir bitki olan *Satureja cilicica* ülkemizde kekik ya da kınalı kekik olarak isimlendirilmekle birlikte, Konya, Niğde, Adana ve Hatay illerimizde yetişmektedir. Hoş kokusu ve lezzetinden dolayı baharat olarak kullanılmakta ve aynı zamanda antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir. Bu çalışmada *S. cilicica*'dan elde edilen metanolik ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal potansiyelinin yanı sıra kolon kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkileri ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışmada ekstraktların antioksidan potansiyelini değerlendirmek için DPPH testi, antimikrobiyal etki için MIK testi, sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. Apoptotik etkiyi belirlemek için ise Real Time PCR ile iki proaoptotik gen bölgesinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak elde edilen metanolik ekstraktın antioksidan ve antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu, kolorektal kanser hücre hattı üzerine sitotoksik etki gösterdiği ve çalışılan proaoptotik gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: DPPH, Kınalı kekik, MTT, MİK.

ABSTRACT

MS THESIS

THE INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND APOPTOTIC EFFECTS OF *SATUREJA CILICICA* P.H. DAVIS EXTRACTS

ULKIR ABDULBAQI ABBAS ABBAS

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Advisor: Prof. Dr. Tuna UYSAL

2019, 44 Pages

Jury
Prof. Dr. Tuna UYSAL
Prof. Dr. Yusuf DURAK
Prof. Dr. G. Özmen GÜLER

Species belonging to the genus *Satureja* have been used traditionally in the treatment of many diseases. The genus *Satureja* grows in West Asia and the Eastern Mediterranean region and is distributed in geographies such as Anatolia, Turkmenistan, the Caucasus, Iraq and Iran. *Satureja cilicica*, which is an endemic plant, is known as thyme or henna in our country, and it grows in Konya, Niğde, Adana and Hatay. Also, the plant has antimicrobial and antifungal effects. In this study, the antioxidant and antimicrobial potential of methanolic extracts obtained from *S.cilicica*, as well as the cytotoxic and apoptotic effects on colon cancer cell line were investigated. DPPH test was used to evaluate the antioxidant potential of extracts, MIC test for antimicrobial effect and MTT test was used to determine cytotoxic effects. In order to determine the apoptotic effect, expression levels of two proapoptotic gene regions were evaluated by Real Time PCR. As a result, it was found that methanolic extract had antioxidant and antimicrobial potential, showed a cytotoxic effect on colorectal cancer cell line and increased expression levels of proapoptotic gene regions studied.

Keywords: DPPH, Kınalı kekik, MTT, MIC.

,

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca, tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve sürekli desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tuna UYSAL'a,

Tez çalışmamı yapabilmem için bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve çalışmam boyunca yanımda olan, her istediğimde yardımıma koşan hocam Dr. Ela Nur ŞİMŞEK SEZER'e

Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nın her türlü imkânlarını kullanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK' a,

Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında antimikrobiyal çalışmasında benden desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Erdoğan GÜNEŞ'e,

Her zaman yanımda olan ve her türlü desteklerini esirgemeyen sevgili kardeşlerim Mohammed ve Yıldırım ÇAKMAKÇI'ya,

Hayatımın her anında yanımda olan sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme ve beni destekleyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

ULKIR ABDULBAQI ABBAS ABBAS
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Sindirim Sistemi 3
2.2. Kanser 4
2.3. Bitkiler ve Kanser Tedavisinde Kullanımı 5
2.4. Apopitoz 5
2.5. Çalışmada Kullanılan Teknikler ile İlgili Bilgiler 7
2.5.1. MTT (3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi 7
2.5.2. Real time PCR (Gerçek Zamanlı PCR) 8
2.5.2.1. DAPK1 10
2.5.2.2. DAPK2 11
2.5.3. Antioksidan Potansiyelin Tayini ve DPPH testi 11
2.5.4. Antimikrobiyal Potansiyelin Tespiti ve Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Testi 13
2.6. Çalışmada Kullanılan Bitki ile İlgili Bilgiler 14

3. MATERYAL VE YÖNTEM **19**

3.1. Materyal eldesi 19
3.2. Kullanılan kimyasal maddeler 19
3.3. Ekstraktın hazırlanması 19
3.4. Hücre kültürünün hazırlanması 19
3.5. Hücre sayımı 20
3.6. MTT testi 20
3.7. RNA izolasyonu ve RT-PCR 20
3.8. DPPH Yöntemi 21
3.9. Antimikrobiyal Analiz 22
3.10. Analizler 24

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **25**

4.1. MTT Testi Sonuçları 25

4.2. DPPH Testi Sonuçları 27
4.3. Real Time PCR Sonuçları 28
4.4. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları 30
4.5. Tartışma 33

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 38

6. KAYNAKLAR 39

ÖZGEÇMİŞ 44

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : yüzde

^{o} C : santigrat derece

µg : mikrogram

mg : miligram

µl : mikrolitre

ml : mililitre

Kısaltmalar

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür

cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

DLD-1 : İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı

IC_{50} : Hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

DAPK1:Ölümle İlişkili proten kinaz 1

DAPK2: Ölümle ilişkili protein kinaz 2

DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

MIC: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

1. GİRİŞ

Bitkiler, doğal tedaviler (alternatif tıp) ve insan sağlığını korumak için, özellikle son yıllarda yapılan yoğun araştırmalarla daha değerli bir doğal kaynak haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütüne göre şifalı bitkiler, çeşitli ilaçlar elde etmek için en iyi kaynak niteliğindedir. Gelişmiş ülkelerdeki bireylerin yaklaşık % 80'i şifalı bitkilerden elde edilen geleneksel ilaçları kullanmaktadır. Bu nedenle, bu tür tedavilerin özelliklerini, güvenliğini ve verimliliğini daha iyi anlamak için bitkiler ve bitkilerden elde edilen ekstraktların çok iyi araştırılması gerekmektedir. *Satureja* (Kayakekiği) bitkisi, Nepetoideae alt ailesi olan Lamiaceae'nin bir üyesidir ve esas olarak Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. *Satureja* bitkisinin birçok türünün aromatik ve tıbbi özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan kanser hastalığında görülen yüksek ölüm oranı, kemoterapi ve radyasyon tedavisinin ciddi yan etkileri nedeniyle, birçok kanser hastası alternatif ve / veya tamamlayıcı tedavi yöntemlerine yönelmektedir (Desai ve ark., 2008). Bitkisel ekstraktlar ve /veya etken maddelerin kullanılarak yapılan çalışmaların modern tıbbi çalışmalara olan katkısı her geçen gün artmakta olup ve bu sayede gerek kanser hastalığının önlenmesi gerekse tedavisi için değerli bilgiler elde edilmektedir. Aynı zamanda son yıllarda mikrobiyal direnç sorunu artış göstermekte olup gelecekte antimikrobiyal ilaçların kullanımı konusu halen belirsiz vaziyettedir. Bu nedenle, bu problemi azaltmak için, örneğin antibiyotik kullanımını kontrol etmek, genetik direnç mekanizmalarını daha iyi anlamak için araştırmalar yapmak ve sentetik veya doğal yeni ilaçlar geliştirme çalışmalarına devam etmek için önlemler alınmalıdır. Nihai hedef hastaya uygun ve etkili antimikrobiyal ilaçlar sunmaktır. Farmakolojik endüstriler son üç yılda bir dizi yeni antibiyotik üretmiş olsalar bile, bu ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnci artmıştır (Nascimento ve ark., 2000). Genel olarak bakteriler, terapötik ajanlar olarak kullanılan ilaçlara direnç yeteneğine sahiptir. Böyle bir gerçek, hastanelerde bağışıklık sistemi baskılanan hasta sayısı ve çok dirençli yeni bakteri suşları nedeniyle endişe kaynağı olmaktadır. Sonuç olarak, hastanelerde yüksek mortalite ile sonuçlanan yeni enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bitkiler ve bitki kaynaklı tedavi yöntemlerinin antibakteriyel potansiyellerinin ortaya konması ve etken maddelerin elde edilerek kullanılması da oldukça önem arz eden bir diğer konudur.

Bu çalışmanın amacı halk arasında baharat olarak kullanılan *Satureja cilicica (kınalı kekik)* türünden elde edilecek ekstraktların, kanser hücreleri üzerine sitotoksik ve apopitoz indükleyici etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan potansiyellerinin ortaya çıkartılmasıdır. Çalışma sonucunda alınacak veriler neticesinde elde edilen ekstraktın biyolojik potansiyeli hakkında bilgi sahibi olunacaktır. Belirtmek gerekir ki bu çalışmada kullanılacak olan bitkinin halk arasında bilinmesi ve tüketiliyor olması sayesinde eğer olumlu bir etki tespit edilirse kullanımının yaygınlaşması daha kolay olacaktır. Dahası çalışma sonucunda elde edilecek verilerin kanser ve bakteriyal enfeksiyonların tedavisinde bitkilerden faydalanılmasına katkısı olacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Sindirim Sistemi

Bağırsak kelimesi, “iç” anlamına gelen Latince kökenli bir kelimeden türetilmiştir. Gerçekten de ince ve kalın bağırsak veya halk arasında “bağırsaklar” olarak adlandırılan iki organ birlikte karın boşluğunu neredeyse bütünüyle doldurmaktadır. Beslenme kanalının en büyük kütlesini ve uzunluğunu oluşturmakta olup yutma işlevi dışında tüm sindirim sistemi işlevlerini yerine getirirler. Kalın bağırsak, ileocaecalis kapaktan anüse doğru uzanır. İnce bağırsağı üç taraftan çevreler. İnce bağırsağın yaklaşık yarısı kadar olmasına rağmen, kalın olarak adlandırılır, çünkü ince bağırsağın çapının iki katı olup yaklaşık 3 inç'tir (College, 2013). Sindirim sistemi, bağırsak kanalı veya gastrointestinal sistemi içerir, bir tübüler, kas-çizgili geçitten anüs uzanır. Geçit yolu duvarlarındaki kaslar peristalsisten sorumludur. Sindirim sisteminin çeşitli faaliyetler için uzmanlaşmış bu tüp boyunca bölgeler görülmektedir (Belk ve Borden, 2009). Kolon olarak da bilinen kalın bağırsak, sindirim sisteminin bir parçasıdır. Sindirim sistemi; ağız, özofagus (yemek borusu), mide, ince bağırsak, kalın bağırsak ve rektumu içerir. Kalın bağırsak yaklaşık 5 fit (1 ila 1.5 metre) uzunluğunda olup, gastrointestinal (GI) sisteminin uzunluğunun beşte birini oluşturmaktadır. Kalın bağırsak, çoğu besinlerin ince bağırsakta absorbe edildikten sonra sindirilemez gıda maddelerinin (Chyme) işlenmesinden sorumludur. Kalın bağırsak 4 bölümden oluşur. Bu çekum ve çıkan kolon, enine kolon, inen kolon ve sigmoid kolonu içerir. Kalın bağırsak suyu, vitaminleri ve elektrolitleri atık maddelerden emerek önemli bir rol oynar.Kalın bağırsağın 3 temel işlevi vardır; Su ve elektrolitlerin emilmesi, vitaminlerin üretilmesi ve emilmesi ile rektuma doğru dışkı oluşturulması ve itilmesidir (Azzouz ve Sharma, 2018). Rektum, anüste sonlanan kalın bağırsağın son kısmını oluşturur. İnsan rektumunun ortalama uzunluğu 10 ila 15 cm arasında değişebilir. Çapı, başlangıcında sigmoid kolonun (rektuma en yakın kalın bağırsağın bir kısmı) ile karşılaştırılabilir. Ancak, rektal ampulla'yı oluşturduğu anüsün yakınında büyür (Steely, 2017). Kolon gastrointestinal sistemin ileoçekal valv ile rektosigmoid köşe arasında kalan yaklaşık 150 cm’lik bölümüdür (Ebneshahidi, 2019).

2.2. Kanser

Kanser, vücudumuzda meydana gelen ve ölümle sonuçlanabilecek anormal hücre büyümesidir. Kanser hücreleri genellikle normal hücreleri istila eder ve yok ederler. Bu hücreler vücuttaki dengesizlik nedeniyle doğar ve ancak bu dengesizliğin düzeltilmesi ile kanser tedavi edilebilir. Kanser araştırmalarına çok fazla kaynak harcanmış olmasına karşın henüz kanserin tam olarak neyin neden olduğu anlaşılamamaktadır. Her yıl milyonlarca insan kansere yakalanmakta ve bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Amerikan Kanser Topluluğuna göre, kanserden kaynaklanan ölümler dünya çapında kaydedilen yıllık ölümlerin % 2-3'ünü oluşturmaktadır. Kanser dünyada her yıl yaklaşık 3,5 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Kanser tedavisinde çeşitli kemopreventif ajanlar kullanılmaktadır. Ancak bunların kullanımını engelleyen toksisiteler bulunmaktadır (Madhuri ve Pandey, 2009). Kanser oluşumu, vücuttaki hücrelerin değiştiği ve kontrol dışına çıktığı zamanı ifade eder. Kanser hastalığına yakalanıldığında neler olduğunu anlamaya yardımcı olmak için vücudun normal şekilde nasıl çalıştığını bilmek önemlidir. Vücut, hücreler olarak adlandırılan küçük yapı bloklarından oluşur. Vücut onlara ihtiyaç duyduğunda normal hücreler büyür ve vücut artık onlara ihtiyaç duymadığında ise ölür. Kanser, vücudun ihtiyacı olmamasına rağmen büyüyen anormal hücrelerden oluşur. Çoğu kanserde, anormal hücreler tümör denilen kitle veya kitle oluşturacak şekilde büyür. Kanser hücreleri vücutta yakın bölgelere yayılabilirler (invazyon). Vücudun diğer bölgelerine yayılış gösterebilirler (metastaz) (Healthcare, 2019)

Kanser, tüm dünyada vücudun birçok farklı bölümünü etkileyebilecek bir halk sağlığı sorunudur (Esmaeili ve ark., 2014). Kanser, tüm dünyada ölümlerin ana nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2005-2015 yılları arasında 84 milyon insanın kanserden öleceğini tahmin etmiştir. Buna göre, kanserin neden olduğu tehdidi azaltmak için çeşitli yaklaşımlar geliştirmek için çok çaba gösterilmiştir. Kemoterapi modern kanser tedavisinde önemli bir seçenektir ve şu anda bazı lösemi, lenfoma ve solid tümörlerin tedavisinde klinik olarak mevcut antikanser ilaçları kullanılmaktadır (Behzad ve ark., 2014). Ancak kemoterapinin yanı sıra bitkiler kullanılarak tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerine de gerek görülmektedir.

2.3. Bitkiler ve Kanser Tedavisinde Kullanımı

Uzun yıllardan beri bitkisel ilaçlar kullanılmakta olup halen gelişmekte olan ülkelerde tıbbi tedavinin birincil kaynağını teşkil etmektedir. Bitkiler tıpta doğal antiseptik özellikleri nedeniyle kullanılmıştır. Böyle bitki ekstraktlarının, kanser dâhil hastalıklar için potansiyel nano malzeme bazlı ilaçların hazırlanmasına yönelik potansiyel özelliklerini ve kullanımlarını araştırmaya yönelik çalışmalar geliştirilmiştir. Birçok bitki türü, kanser gelişimini tedavi etmek veya önlemek için hali hazırda kullanılmaktadır (Greenwell ve Rahman, 2015).

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı oldukça eskiye dayanmaktadır. Çeşitli tıbbi özelliklere sahip olan doğal bitkiler mevcuttur. Şifalı bitkiler, etnoveteriner tıp için üretilen ilaçlar dâhil olmak üzere yeni ilaç ve sağlık ürünlerinin ana kaynağını oluşturmaktadır. Bitki türevi diyet takviyeleri, fitokimyasallar ve pro-vitaminler sağlıklı yaşam ve hastalıkla mücadele bakımından yardımcı özelliktedir. Bitki kaynaklı ürünler giderek kabul görmekte olup birçok sektörde kullanılmakta, hatta yabancı ülkelerde bazı şifalı bitkiler kanseri önleme ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Hajhashemi ve ark., 2002).

2.4. Apopitoz

Apopitoz veya programlanmış hücre ölümü süreci, belirgin morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilir. Doku homeostazisini koruyarak ve normal fonksiyonlara müdahale edebilecek hasarlı veya enfekte olmuş hücrelerden kurtulmak suretiyle organizmayı koruyan ve doğru gelişim sağlayan içsel bir hücre intihar programıdır (Gewies, 2003). Programlanmış hücre ölümü de denilen apopitoz'un hücre çoğalması sürecini kontrol etmek için kendi yıkımına neden olan veya DNA hasarına cevaben gerçekleşen karmaşık bir mekanizma olduğunu bilinir (Kumar, 2010). Apopitozis terimi, hücrenin kendi kendini imha etmeye yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için kullanılan ve ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie (1972) tarafından yayınlanan bir yayında tanıtılmasıyla açığa çıkmış bir süreçtir. Apopitozis, ağaçlardan düşen yaprak tanelerine veya aynı şekilde çiçeklerden düşen yapraklara benzeyen "düşme" anlamına gelen Yunan kökenli bir terimdir (Kerr ve ark.,

1972). Bu terimin verilmesindeki amaç, ölümün canlı yaşamının ayrılmaz bir döngüsü olduğunu vurgulamaktadır. Apoptotik hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişiminde ve dokulardaki hücrelerin fizyolojik ve patolojik koşullar altında yaşamlarını ve korunmasında önemli rol oynayan aktif ve tanımlanmış bir süreçtir. Apopitozisin iyi tanımlanmış ve muhtemelen en sık görülen hücre ölüm şekli olduğu, ancak diğer apoptotik olmayan hücre ölümü türlerinin de biyolojik olarak önemli olabileceği belirtilmektedir. Apoptotik hücreler stereotipik morfolojik değişikliklerle tanınabilir. Bunlar; hücrenin küçülmesi, deformasyonu ve komşu hücrelerine teması kaybetmesi olarak tanımlanır. Kromatin nükleer membranda yoğunlaşır ve kendine özgü bir hal alır, plazma zarı taşar veya tomurcuklanır ve son olarak hücrenin sitozolunde, yoğunlaştırılmış kromatin ve organelleri içeren 'apoptotik cisimler' adı verilen kompakt membranla kaplı yapılar halinde parçalanmalar gerçekleşir. Apoptotik cisimler, makrofajlar tarafından yutulur ve böylece enflamatuar bir tepkimeye neden olmadan dokudan çıkarılır. Bu morfolojik değişiklikler, apoptotik bir hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların bir sonucudur, en önemlisi ise DNA'nın oligonükleozomal fragmanlara bölünmesinin yanı sıra genellikle çok sayıda spesifik protein substratının bölünmesine aracılık eden proteolitik enzimlerin aktivasyonudur. Apopitoz, hücrenin dışından veya içindeki çeşitli uyaranlarla tetiklenebilir. Örnek olarak, hücre yüzeyi reseptörlerinin ligasyonu, DNA onarım mekanizmalarındaki kusurların bir nedeni olarak DNA hasarı, sitotoksik ilaçlarla tedavi veya ışıma gibi örnekler verilebilir. Ancak, bu farklı yönlere sahip ölüm sinyallerinin hepsi sonuçta apoptotik hücre ölümünün karakteristik özelliklerine yol açan ortak bir hücre ölüm makinesini harekete geçirdiği görülmektedir (Gewies, 2003). Normal şartlar altında hücre bölünmesi yoluyla yeni hücrelerin oluşumu ve hücre ölümü yoluyla hücrelerin kaybı arasında bir denge vardır. Örnek olarak, deri hücrelerinin dökülmesi veya sindirim kanalını kaplayan hücrelerin değiştirilmesini içerebilmektedir. Hücre bölünmesi gibi, hücre ölümü de aynı şekilde belirli aşamalar ve kontroller vasıtasıyla olur. Hücreler sıklıkla programlanmış hücre ölümü veya apopitozıs denilen bir işlemle ölürler. Apopitozis, hücre genomunun parçalandığı, hücrenin daha küçük parçalara bölündüğü ve enkazın hücre parçalarını temizleyen hücreler (fagositler) tarafından tüketildiği çok düzenli bir işlemdir. Bu işler zarar görmüş potansiyel olarak tehlikeli hücrelerden kurtulmanın yanı sıra, embriyonik gelişim ve nörolojik hasarlardan kurtulmak içinde kullanılır. Apopitoz, iki evreden oluşur, bunlar başlama evresi ve uygulama evresidir. Başlama aşaması çok karmaşık olmakla birlikte farklı proteinleri

içerir. Bu aşamaların başlaması hücre içi ve hücre dışındaki çeşitli uyarılar vasıtasıyla gerçekleşir. Bu hücre dışı sinyallerin bazıları büyüme faktöründeki kayıp, düşük oksijen seviyeleri ve radyasyon kaynaklıdır. Hücre içi sinyaller ise, DNA hasarı, kemoterapi ilaçlarının sebebiyet verdiği hasarlar, telomer yapısındaki bozunma ve virüs kaynaklıdır. Bu başlatma aşaması yürütme aşamasını tetiklemektedir. Uygulama aşaması, doğrudan hücre ölümüyle sonuçlanan özel enzimlerin (kaspazlar ve diğerleri) aktivasyonunu içerir (Hengartner, 2000).

2.5. Çalışmada Kullanılan Teknikler ile İlgili Bilgiler

2.5.1. MTT (3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyi

MTT deneyi, hücresel metabolik aktivitenin hassas ve güvenilir bir göstergesi olup diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Deney aşaması, ilk olarak mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından sarı renkte çözünür bir tetrazolium boyası olan MTT'nin mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanır. Formazan ürünü, sitotoksisite derecesinin bir tahminini veren, nanopartikül ile işlenmiş ve işlenmemiş hücrelerin spektrumları olan izopropanol veya DMSO'da çözündükten sonra spektrofotometrik olarak (540-570 nm) analiz edilir (Greenwell ve Rahman, 2015). Bir ara elektron alıcısı tarafından stabilize edilen yeni jenerasyon tetrazolyum analoglarının, bazı araştırmacılar tarafından suda çözünür formazan ürünleri oluşturma kabiliyetleri nedeniyle daha iyi bir seçenek olarak bildirildiği ve böylece geleneksel ölçümlerin çözünme basamağını önlediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu analogların net negatif yükü, verimli hücre içi alımlarını önler ve hücre dışı redüksiyon nedeniyle test sonuçlarını engelleyebilir. Ek olarak, hücre zarı ile etkileşime giren nanoparçacıklar, membran ile ilişkili elektron taşınmasıyla bunların azalmasını etkileyebilir. Bu gibi durumlarda, hücresel alım ve bunun sonucunda pozitif yüklü MTT'nin mitokondriyal azalması nanopartikül toksisitesine daha iyi bir bakış sağlamaktadır. Bununla birlikte, anti-oksidanlar veya ilaç akışı inhibitörleri, MTT testine müdahil olabilir ve bu nedenle bunlarla yüklenen partiküller, sonuçları doğrulamak için alternatif yöntemlerle test edilmelidir (Chacon ve ark., 1997). MTT hücrelere girer ve çözünmez, renkli (koyu mor) formazan ürününe indirgendiğinden mitokondriye geçer. Hücreler daha sonra bir organik çözücü (örneğin, izopropanol) ile çözündürülür ve salınan çözündürülmüş formazan reaktif maddesi, spektrofotometrik olarak ölçülür.

2.5.2. Real time PCR (Gerçek Zamanlı PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın belirli bölümlerini çoğaltmak için kullanılan enzimatik bir yöntem olup ve in vitro olarak çalışılmaktadır. PCR tekniği 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir ve günümüze kadar gelişimini sürdürmüştür. PCR, hemen hemen her canlı organizmadan spesifik DNA veya RNA fragmanlarının karakterizasyonu, analizi ve sentezi için çok kolay, ucuz bir tekniktir. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) olarak da bilinen gerçek zamanlı bir polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR), polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı bir laboratuvar moleküler biyoloji tekniğidir (Joshi ve Deshpande, 2010).

Real time PCR, bir PCR reaksiyonunun ilerlemesini gerçek zamanlı olarak izlemek için kullanılan bir tekniktir. Aynı zamanda, nispeten az miktarda PCR ürünü ile (DNA, cDNA veya RNA) çalışılabilmektedir. Real time PCR, reaksiyon ilerledikçe artan, bir raportör molekül tarafından üretilen floresansın saptanmasına dayanır. Geleneksel PCR, DNA dizilerinin yüksek amplifikasyonunu sağlayan güçlü bir tekniktir. Bir PCR reaksiyonu, ilgilenilen diziye tamamlayıcı olan bir çift primer gereklidir. Primerler, DNA polimeraz ile uzatılır. Çoğaltma işleminden sonra, amplikonlar olarak adlandırılan kopyalar, aynı primerlerle çoğaltılarak, DNA moleküllerinin katlanarak çoğalmasına neden olur. Ancak amplifikasyondan sonra, amplifiye edilmiş PCR ürünlerini analiz etmek için jel elektroforezi kullanılmalıdır ve bu durumdan dolayı geleneksel PCR biraz zaman alıcıdır. Ancak Gerçek Zamanlı PCR da böyle bir duruma gereklilik yoktur ve kısa sürede işlem tamamlanmaktadır. “Real time” terimi, işlemin sadece işlem tamamlandıktan sonra analiz edilebildiği geleneksel PCR yönteminin aksine, işlem devam ederken amplifikasyonun ilerlemesinin izlenebilmesini ifade etmektedir (Pestana ve ark., 2009).

PCR veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu, dünyadaki modern moleküler biyolojinin temel taşı haline gelmiştir. Gerçek zamanlı PCR, geleneksel PCR’in potansiyelini maksimuma çıkaran gelişmiş bir Polimeraz Zincir Reaksiyonu şeklidir.

Gerçek zamanlı PCR'ı anlamak için basit bir PCR prensibiyle başlamak daha kolayolur: PCR, DNA'nın çoğaltılması için kullanılan bir tekniktir. DNA'nın çoğaltılmasını gerektiren birçok neden mevcuttur. Termostabil polimeraz enzimi PCR'yi çalıştırmak için gereklidir Bu polimeraz, çift sarmallı bir başlangıç noktasına sahip olması koşuluyla, herhangi bir tek DNA sarmalına tamamlayıcı bir baz dizisi sentezleyecektir. Bu oldukça kullanışlı bir yöntemdir, çünkü çalıştığınız genin küçük

DNA parçalarını ekleyerek karışık DNA örneğinde polimerazın hangi geni çoğaltması gerektiği belirlenebilmektedir. Bu küçük DNA parçaları, primer olarak bilinmektedir. Bir PCR sırasında, sıcaklıktaki değişiklikler polimeraz aktivitesini ve primerlerin bağlanmasını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Reaksiyona başlamak için sıcaklık 95 ° C'ye yükseltilir. Bu sıcaklıkta, tüm çift sarmallı DNA, tek sarmal hale getirilir. Sıcaklık daha sonra ~ 60 ° C'ye düşürülür. Bu, primerlerin ilgili gene bağlanmasına izin verir. Böylece polimerazın bağlanacak bir yeri oluşur ve DNA zincirini kopyalamaya başlayabilir. Polimerazın çalışması için en uygun sıcaklık 72 ° C'dir (Mane ve ark., 2008). Bu sıcaklık değişimi yaklaşık 35-40 'döngü' boyunca tekrarlanabilir. Böylece milyarlarca kopya oluşana kadar devam eder. Gerçek Zamanlı PCR bu aynı amplifikasyon prensibini gerçek zamanlı PCR'da kullanır. Ancak reaksiyonun sonunda bir jeldeki bantlara bakmak yerine, süreç "gerçek zamanlı" olarak izlenir. Kelimenin tam anlamıyla, reaksiyon bir kamera veya detektörle meydana gelen reaksiyonu izleyen gerçek zamanlı bir PCR makinesine yerleştirilir. DNA'nın amplifikasyonu, her PCR döngüsü sırasında bir kamera ile kolayca tespit edilebilecek floresans oluşumuna bağlıdır. Bu nedenle, reaksiyon sırasında gen kopyalarının sayısı arttıkça, floresans da artar. Gerçek zamanlı PCR'nin eski moda yaklaşıma göre birçok faydası vardır:

• Öncelikle reaksiyona anlık göz atmanızı sağlar. Hangi örneklerin iyi çalıştığını ve hangilerinin başarısız olduğunu kelimenin tam anlamıyla görebilirsiniz.

• Reaksiyonun etkinliği tam olarak hesaplanabilir.

• Erime eğrisi analizini sizin için etkili bir şekilde yaptığından, reaksiyondan sonra PCR ürününü bir jelin üzerinde çalıştırmaya gerek yoktur (Mane ve ark., 2008).

Bununla birlikte, en büyük avantajı, gerçek zamanlı PCR verilerinin, gen ifadesinin gerçekten kantitatif analizini yapmak için kullanılabiliyor olmasıdır (Arya ve ark., 2005).

2.5.2.1. DAPK1

Ölümle ilişkili protein kinazlar (DAPK), hücresel işlemlerin düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan ve ekstrinsik ve içsel ölüm düzenleyici sinyal yolları yoluyla apopitozun pozitif aracıları olarak tanımlanan proapoptotik protein ailesidir. DAPK1 ve DAPK2'nin tümör baskılayıcı aktiviteleri bilinmektedir ve Hodgkin'in (HL) ve B hücre lenfomasında (CLL) bunların ekspresyon seviyelerinin oldukça azaldığı bilinmektedir (Tur ve ark., 2017).

Ölümle İlişkili Protein Kinaz 1 (DAPK1), tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olan ve ayrıca apopitoz ve otofaji dâhil olmak üzere çok çeşitli hücresel işlemlere aracılık eden beş serin / treonin (Ser / Thr) kinaz ailesine aittir. DAPK1'in kaybı ve işlev kazancı sırasıyla çeşitli kanser ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilidir.

DAPK1, ER stresine bağlı hücre ölümü yolunda kritik bir bileşen olarak işlev gören hücre ölümü ve otofajinin önemli bir düzenleyicisidir. ER stres sinyallemesinde kritik bir entegrasyon noktası oluşturan, bu sinyalleri iki farklı yöne ileten, kaspaz aktivasyonu ve otofajiye yol açan strese duyarlı bir serin / treonin (Ser / Thr) kinazdır. Hücre ölümü DAPK1, çeşitli iç ve dış apoptotik uyarıcılar tarafından indüklenen çoklu hücre ölüm süreçlerinde yer alan proapoptotik yolun bir aracısıdır. Bu pro-apoptotik Ser / Thr kinazı hem tip I apoptotik (kaspaza bağımlı) hem de tip II otofajik (kaspazdan bağımsız) hücre ölüm sinyalini düzenler. Öte yandan, DAPK1, otofaji ve apopitozu teşvik ederek tümör büyümesini ve metastazı baskıladığı bilinen bir tümör baskılayıcı gendir (Singh ve ark., 2016).

Ölümle ilişkili protein kinazı 1 (DAPK1), düzensiz olduğu zaman kansere neden olabilen apopitoz için önemli bir düzenleyicidir. İlginç şekilde, DAPK1, hücresel içeriğe ve dış uyaranlara bağlı olarak onkojen veya tümör baskılayıcı gen olarak görev yapabilir. DAPK1 ekspresyonunun promotor metilasyonu ile aşağı regülasyonunun, çeşitli kanser türlerinde prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir. DAPK1, işlevlerini apopitoz, otofaji ve hatta metastaz dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik işlemlerle uygulamaktadır (Li ve ark., 2017).

2.5.2.2. DAPK2

Ölümle ilişkili protein kinaz 2 (DAPK2 / DRP-1), membran kanaması, apopitoz ve otofaji dâhil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlere aracılık eden ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip beş ilişkili serin / treonin kinaz ailesine aittir. En çok korunan üç aile üyesi DAPK1 / DAPK, DAPK2 ve DAPK3 / ZIPK, katalitik etki alanlarında yüksek derecede homoloji paylaşır, ancak katalitik yapıları ve doku ifade profillerinde önemli ölçüde farklılık gösterir. Bu nedenle, her bir ortolog çeşitli benzersiz etkileşim ortaklarına bağlanır, farklı alt hücre bölgelerine yerleşir ve bazı farklı hücre fonksiyonlarını kontrol eder (Geering, 2015).

DAPK2 (aynı zamanda DRP-1 olarak da bilinir), ölüme neden olan yolaklarda yer alan kalsiyum / kalmodulin tarafından düzenlenen bir dizi serin / treonin kinaz içeren DAPK ailesine aittir. Üç ana üye (DAPK1–3), kinaz alanında yüksek derecede bir homoloji derecesine sahiptir, ancak bu kilit bölgenin dışında oldukça değişkendir. En çok çalışılan protein, interferon-γ, FAS ligand, TNF-a ve seramit kaynaklı hücre ölümüne neden olan kurucu molekül DAPK1'dir. Gen, tümör hücrelerinde genellikle metillenir ve bir tümör baskılayıcıdır. DAPK2, DAPK1'den çok daha küçük bir proteindir (Schlegel ve ark., 2014).

2.5.3. Antioksidan Potansiyelin Tayini ve DPPH testi

Antioksidanlar, vücudu serbest radikal denilen moleküllerin neden olduğu zararlardan koruyan ve doğal olarak oluşan fitokimyasallardır. Antioksidanlar, hücrelere zarar verebilecek ve yaşlanmaya katkıda bulunabilecek oksidasyonun önlenmesine yardımcı olurlar. Bağışıklık fonksiyonunu iyileştirebilir ve belki de enfeksiyon, kalp-damar hastalıkları ve kanser riskini düşürebilirler (American Dietetic Association, 2010). Halliwell ve Gutteridge (1995), antioksidanı; “oksitlenebilir bir sübstrat ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda, o substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde” şeklinde tanımlamışlardır. bir antioksidanın “hedef moleküle oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde” olduğunu belirten daha spesifik bir tanım yapmıştır (Halliwell ve Gutteridge, 1995). Oksidasyon reaksiyonları, sonunda hücreye

zarar veren veya ölüme neden olan çoklu zincir reaksiyonlarını başlatabilen serbest radikalleri üretir. Antioksidanlar, bu serbest radikal ara maddeleri kendileri okside ederek uzaklaştırırlar ve diğer oksidasyon reaksiyonlarını önlerler. Böylece zararlı zincir reaksiyonlarını durdururlar (Halliwell, 2007)

Canlı hücrelerde iki ana antioksidan grubu vardır: Bunlar; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlardır. Bu gruplar birkaç alt gruba ayrılır (Shebis ve ark., 2013). Antioksidanlar, bazı hücre hasarlarını önleyebilen veya geciktirebilen insan yapımı veya doğal maddelerdir. Antioksidanlar meyve ve sebzeler dâhil birçok gıdada bulunurlar. Oksidasyon reaksiyonları yaşam için çok önemli olmasına rağmen, aynı zamanda zararlı olabilir; bitkiler ve hayvanlar karmaşık sistemleri korur. Glutatyon, C vitamini, A vitamini ve E vitamini gibi çeşitli antioksidanların yanı sıra katalaz, süperoksit dismutaz gibi enzimler ve çeşitli peroksitler bulunmaktadır (Yadav ve ark., 2016).

2,2-difenil-l-pikrilhidrazil (DPPH) deneyi, bitki ekstraktları için en yaygın olarak kullanılan antioksidan deneyidir. Bu deneyde zayıf A-H bağına sahip bir molekül veya antioksidan, molekülün renginin bozulmasına neden olan stabil bir serbest radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ile reaksiyona girecektir (Garcia ve ark., 2012).

DPPH, organik bir kimyasal bileşik olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil için ortak bir kısaltmadır. Kararlı serbest radikal moleküllerden oluşan koyu renkli kristal bir tozdur. DPPH'nin her ikisi de laboratuvar araştırmasında iki ana uygulaması vardır: Bunlardan biri radikalleri içeren kimyasal reaksiyonların izleyicisi, diğeri ise elektron paramanyetik rezonans sinyallerinin konumu ve yoğunluğunun standardıdır. DPPH, iyi bilinen bir radikal ve diğer radikaller için bir tuzaktır (çöpçü). Bu nedenle, DPPH'nin eklenmesi üzerine kimyasal bir reaksiyonun oranının düşürülmesi, bu reaksiyonun radikal yapısının bir göstergesi olarak kullanılır. Yaklaşık 520 nm'de merkezlenmiş güçlü bir emme bandı nedeniyle, DPPH radikal çözeltide koyu mor bir renge sahiptir ve nötrleştirildiğinde renksiz veya soluk sarı hale gelir. Bu özellik reaksiyonun görsel olarak izlenmesini sağlar. DPPH etkin radikal tuzağı olduğu için, aynı zamanda radikal aracılı polimerleşmenin güçlü bir inhibitörüdür (Mathangiand ve Prabhakaran, 2013).

2.5.4. Antimikrobiyal Potansiyelin Tespiti ve Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Testi

Mikroorganizmlarda direnç artışına neden olan ve önemli sağlık problemlerini ortaya çıkaran antibiyotiklerin bu etkilerini azaltmak için antimikrobiyal etkiye sahip doğal ürünler araştırılmaktadır. Aromatik bitkiler çok uzun zamandır bilinmektedir Fitoterapide ve gıda korunmasında kullanılırlar. Dahası, bu bitkilerin çoğunun aktif sekonder metabolitleri sentezlediği bilinmektedir (Sahraei ve ark., 2014).

Bulaşıcı hastalıklar, her gün dünyada yaklaşık 50.000 kişinin ölümüne yol açan, önemli sebeplerden biridir. Birçok gelişmekte olan ülkede ishalden kaynaklanan mortalite, özellikle çocuklar arasında önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Diğer taraftan patojenik *Escherichia coli, Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* gibi çeşitli etiyolojik ajanların neden olduğu enfeksiyonlar oldukça yaygındır. Son yıllarda, insanlarda hastalık kaynağı olan patojenik bakterilerde antibiyotik direncinin geliştiği ve kullanılan ilaçların eskisi gibi etkili sonuç vermediği pek çok çalışmada ifade edilmektedir. Antibiyotiğin hastalar tarafından bilinçsizce kullanımı sonucunda mikroorganizmalarda antibiyotiğe karşı direnç gelişmektedir.

Diğer taraftan antibiyotiğin bazı hastalarda aşırı duyarlılığa yol açması, bağışıklık sistemini baskılaması ve alerjik reaksiyonlara yol açması, antibiyotiğin bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanımını klinik açıdan sorunlu hale getirmektedir. Bu nedenle, bulaşıcı hastalıkların tedavisi için antibiyotiğe alternatif oluşturacak antimikrobiyal karakterde ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de yeni nesil ilaçların üretimi için tıbbi ve aromatik bitkiler üzerinde çok sayıda araştırma yürütülmektedir. Diğer taraftan, bu bitkilerden elde edilen özüt ve aktif bileşenler ekstrakte edilerek hazırlanan geleneksel ilaçlar da yaygın şekilde kullanılmaya devam etmektedir.

Nitekim Dünya Sağlık Örgütü (1993) tarafından bildirildiğine göre, dünya nüfusunun % 80 geleneksel ilaca bağımlı bir şekilde yaşamaya devam etmekte ve geleneksel tedavilerin büyük bir kısmı, bu bitki özleri ve aktif bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Buna karşın, tıbbi ve aromatik bitki kökenli antimikrobiyal aktif bileşiklerin tespitine yönelik bilimsel çalışmalar henüz daha yeni gelişim evresinde sayılabilecek niteliktedir. Geleneksel şifalı bitkiler kullanılarak uygulanan tedavi yöntemleri, gelişmekte olan ülkelerdeki temel sağlık ihtiyaçlarının karşılanmasında hayati bir rol oynamaktadır (Alavijeh ve ark., 2012).

Broth mikrodilüsyon metodunun, çok sayıda test örneğinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)'unun belirlenmesinde potansiyel olarak faydalı bir yöntem olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Mikrobiyolojide MİK, bir gecelik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların gözle görülebilir üremesini inhibe edecek olan antimikrobiyal maddelerin en düşük konsantrasyonudur. Antibiyotikler ve bakterileri öldüren (bakterisidal aktivite) veya bakterilerin büyümesini (bakteriyostatik aktivite) engelleyen diğer maddeler dahil olmak üzere, antimikrobiyal maddelerin minimum inhibe edici konsantrasyonu (MIK) olarak kullanılan yöntemdir. Antimikrobiyal çalışmada farklı antibiyotik konsantrasyonları içeren, doğrudan bakteri üzerine dökülen sayısız bakteriyel hücreli karışım içeren çözeltiler mevcuttur. İnkübasyondan sonra, plakalar üzerinde bakteriyel kolonilerin varlığı,üremeyi trombositizmi gösterir. çoğalma, belli sayıda bakteri hücresi ile aşılanan, antimikrobiyal ajanın geometrik olarak artan konsantrasyonlarını (tipik olarak iki katlı bir seyreltme serisi) içeren sıvı ortamını gösterir. Testin son hacmi, yöntemin makrodilüsyon olarak adlandırıldığını, toplam 2 ml'lik bir hacim kullanıldığında mı yoksa mikrodilüsyonun oyuk başına ≤ 500 ml kullanılarak mikrotitre pleytlerda yapıldığı durumlarda tanımlanır. İnkübasyon sonrasında, bulanıklık veya sedimentin varlığı organizmanın üremesini gösterir. Hem agar hem de broth seyreltme yontemlerinde, MIK, analizlerin sonucunda antimikrobiyal aktiviteyi önleyen maddenin en düşük konsantrasyonu belirlenmiş olmaktadır (Wiegand ve ark., 2008).

2.6. Çalışmada Kullanılan Bitki ile İlgili Bilgiler

Satureja L. cinsi, alt aile *Lamiaceae (Labiatae*) familyasına mensuptur. Bu cins yaklaşık 200 aromatik bitki türü içerir. Akdeniz bölgesinden uzanan bölgelere yayılan bitki ve çalılar Avrupa'ya, Batı Asya'ya, Kuzey Afrika'ya, Kanarya Adaları'na ve Güney Amerika'ya kadar uzanır. *Satureja spp*. koyu yeşil veya gri ile yıllık veya çok yıllık aromatik otsu kurak, güneşli, taşlı ve kayalık ortamlarda yetişen yeşilimsi yapraklardır. Tamamen kurutulmuş kısımlar ve tipik olarak, yer üstü kısımları tıbbi değerler içermektedir. Türler, ılıman bölgelerde 45-60 cm yüksekliğe kadar uzamaktadır. Bu cinsin 30'dan fazla türü, Akdeniz bölgesinin doğusundaki bölgelere dağılmıştır. Nepetoideae ailesinin bilinen özelliği, temsilcilerinin % 0.5'ten fazla esansiyel yağı içermesidir (Momtaz ve Abdollahi, 2008). *Satureja, Lamiaceae* familyası için önemli

bir biyolojik çeşitliliğe sahip olup Türkiye'de 15 türle temsil edilmektedir ve 5 türü endemiktir. (Davis ve ark., 1982) Bu cinsin İran'da yaygın olarak İran'ın dağlık bölgelerinde 14 tür ile temsil edilmektedir ve 8 türü endemiktir. *Satureja* cinsinin pek çok üyesi aromatik ve tıbbi özelliklere sahiptir. Bazı *Satureja* türlerinin esansiyel yağ bileşimleri ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmalar, *Satureja* türlerinin timol ve karvakrol gibi fenolik bileşenlerin varlığı nedeniyle insan, gıda ve bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Sadeghi ve ark., 2013).

Satureja türleri genellikle antibakteriyel, antifungal, antioksidan, sitotoksisite, antidiyabet, anti-HIV, anti-hiperlipidemik, üreme uyarıcı, balgam söktürücü ve vazodilatuar aktivite çalışmalarına tabi tutulmaktadır. Bitkisel metabolitler uzun süre tıbbi amaçla kullanılmış ve istenmeyen oksidasyon ürünlerini önlemek için gıdaya eklenmiştir. Buna ek olarak, araştırmalar son yıllarda bitki özlü yağların antioksidan ve sitotoksik ajanlarının imkânı üzerinde yürütülmektedir. Bu nedenle, günümüzde, biyolojik potansiyelleri ile ilgili olarak çok sayıda araştırma, bitki metabolitleri ve çeşitli doğal ürünler araştırılmaya devam etmektedir. Ayrıca *Satureja cilicica* esansiyel yağının antioksidan aktivitesi ve göğüs kanseri üzerine sitotoksik aktivitesi daha önce yapılan bir çalışmada rapor edilmiştir (Rates, 2001).

Türkiye coğrafyasındaki endemik bir bitki familyası olan *Lamiaceae'*ye üye *Satureja cilicica* P.H. Davis türü üzerine Arabacı ve ark. (2017) tarafından yürütülen araştırmada, *S. cilicica* ,nin toprak üstü kısımları kullanılarak su distilasyonu (hidrodistillasyon) yöntemi ile bitkinin uçucu yağı ekstrakte edilmiştir. Distilasyon yoluyla elde edilen uçucu yağ bileşimi, GC / MS ile analiz edilmiş ve distilatı oluşturan ana bileşenler tespit edilmiştir. *S. cilicica* dan elde edilen uçucu yağın radikal süpürme kapasitesi, DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağın ferrik indirgeme gücü de test edilmiştir. Uçucu yağın sitotoksik aktivitesi, 24 saatlik MCF-7 işleminden sonra MTT(3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlenmiştir. Uçucu yağın ana bileşenleri; p-Simen (% 17.68), karvakrol (% 14.02), ɣ-terpinen (% 11.23) ve timol (% 8.76) olarak saptanmıştır. DPPH ve ABTS sonuçları dikkate alındığında uçucu yağın radikal süpürme kapasitesi, sırasıyla 3.28±0.02 ve 238.15±3.59 mg eşdeğer trolox/ml uçucu yağ olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağın ferrik indirgeme gücü ise 39.76±3.66 mg eşdeğer trolox/ml uçucu yağ olarak bulunmuştur. Uçucu yağın MCF-7 kanser hücresine karşı

büyüme inhibisyon etkisi araştırılmış; sonuç olarak ise *S. cilicica* dan elde edilen uçucu yağın IC_{50} değeri 268 µg/mL olarak bulunmuştur. Araştırma sonucu elde edilen veriler karşılaştırılmıştır (Arabacı ve ark., 2017).

Lampronti ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, *S. hortensis* uçucu yağından elde edilen 15 farklı bileşenin K562 eritrolösemik hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisini araştırmışlardır. Bitkiden izole edilen bileşiklerden α-pinen, α-terpinol ve karyofillen'nin söz konusu hücre hattı üzerinde yüksek oranda antiproliferatif etkisi olduğu rapor edilmiştir (Lampronti ve ark., 2006).

Satureja sahendica uçucu yağıyla yapılan diğer bir çalışmada, 15.5-250 µg/mL konsantrasyon aralığında insan kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi rapor edilmiştir (Yousefzadi ve ark., 2012).

Gohari ve ark. (2012) tarafından *Satureja spicigera* özütünün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki etkisi in vitro olarak çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçları, 98.7 µg/mL IC_{50} değerinde *S. spicigera* özütünün T47D hücre hattı üzerinde meme ve duktal kanserlere karşı sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir. Ozkan ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada *Satureja cilicica* esansiyel yağının tereyağı içerisinde ve in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yağların farklı konsantrasyonlardaki antioksidan aktiviteleri, DPPH radikal süpürücü ve fosfomolibden yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda antiradikal aktivite IC_{50} = 32.02 ± 0.58 µg / ml olarak bulunmuş ve in vitro antioksidan kapasite fosfomolibden yöntemleri ile 101,16 ± 3.32 µg / ml olarak hesaplanmıştır. *S. cilicica*'nın esansiyel yağının güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Avrupa'ya özgü olup, günümüzde tüm dünyaya yayılmış yıllık otsu bir bitki olan Sater (*Satureja hortensis* L.) üzerine gerçekleştirilen derleme çalışmasında, söz konusu bitkinin baharat ve şifalı bitki olarak kullanımı her ne kadar eski zamanlardan beri bilinse de, bu bitkiyle alakalı bilimsel verilerin yer aldığı çalışma sayısının oldukça az olduğu ifade edilmiştir (Fierascu ve ark., 2018) . Sater (*Satureja hortensis* L.)'den elde edilen doğal ürünlere (özler ve uçucu yağ), antioksidan, antimikrobiyal, antiparazitik, antienflamatuar, analjezik, hepatoprotektif ve antikanser özelliklerinden sorumlu polifenoller ve flavonoidlerin hâkim olduğunun belirtildiği çalışmada, son on yılda *Satureja hortensis* L. üzerindeki potansiyel uygulamalara ilişkin kaydedilen bilimsel ilerleme ile bu bitki türü ile ilgili geleceğe yönelik potansiyel araştırma fırsatları ortaya konmuştur. Sater bitkisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda elde

edilen veriler, bu bitkinin, “temiz etiket”li gıda üretimi için endüstriyel kullanımına yönelik önemli bilimsel destek sunmaktadır.

Mihajilov-Krstev ve ark. (2009) tarafından yürütülen çalışmada; sater (*Satureja hortensis L.*) bitkisinden elde edilen uçucu yağın GC ve GC / MS ile analizi yapılmış, ardından bu yağın, 10 farklı cinse (*Klebsiella, Escherichia, Proteus , Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas , Enterococcus, Enterobacter, Citrobacter ve Acinetobacter*) üye patojenik bakterinin çoklu dirence sahip klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla sıvı mikro- kuyu dilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Analiz sonrası elde edilen veriler dikkate alındığında, uçucu yağda bulunan ana bileşiklerin karvakrol (% 67), γ-terpinen (% 15.3) ve p-cymene (% 6.73) olduğu tespit edilmiş, antimikrobiyal aktivite testinde ise uçucu yağın test edilen tüm hedef mikroorganizmalara karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analiz sonucu elde edilen MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) / MBC (minimum bakterisidal konsantrasyon) değerleri, *P. aeruginosa* suşu hariç 0.78-25 ul / ml aralığında olmuştur. Bu suş için gerekli olan mikrobisidal konsantrasyon (50 ul / ml), test edilen en yüksek konsantrasyondur. Sater bitkisinden elde edilen uçucu yağa karşı test edilen üç suş hariç, tümü için aynı konsantrasyonda (MİK = MBC) hem inhibitör hem de bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Sadeghi ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *S. intermedia (Lamiaceae*) bitkisinden elde edilen uçucu yağın, iki farklı kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi ve bu yağın 11 farklı patojenik bakteri ile mantara karşı in vitro inhibe edici etkisi incelenmiştir. Ana bileşenlerini thymol (% 34.5), γ-terpinen (% 18.2) ve ρ-simen’nin (% 10.5) oluşturduğu uçucu yağın 5637 ve KYSE hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerlerinin 156 µg / ml olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyolojik incelemede ise uçucu yağın, test edilen bakteri ve mantar suşları üzerinde kayda değer antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir .

Serrano ve ark. (2011) *Satureja montana* bitkisinden elde edilen ekstraktların (sulu, etanolik ve esansiyel yağ) antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmada, uçucu yağın kimyasal bileşimi de karakterize edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara gore uçucu yağın yedi farklı bakteri türüne karşı nispeten yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği, buna karşın su ekstraktının antibakteriyel aktivite göstermediği, etanol ekstraktının ise *Salmonella typhimurium*’a karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmada test edilen uçucu yağın ana bileşenlerinin karvakrol (306 g L^{-1}), timol (141 g L^{-1}) ve karvakrol metil eter (63

gL^{-1}) olduğu belirlenmiştir. *S. montana* bitkisinden elde edilen sıcak su ekstraktlarının en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu, en yüksek fenolik içeriğe ise uçucu yağın sahip olduğu görülmüştür.

Miladi ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *Satureja montana* L'den elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi ile sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir. Araştırmada, güney Fransa dağından toplanmış *Satureja montana* L. bitkisinden uçucu yağı ekstrakte etmek için hidrodistilasyon metodu kullanılmış, elde edilen uçucu yağ ise gaz kromatografisi / kütle spektrometresi (GC / MS) cihazları kullanılarak analiz edilmiştir. %99.85'ini otuz iki farklı bileşiğin oluşturduğu uçucu yağın %59.11'lik ana kimyasal kısmını ise oksijenlenmiş monoterpenler oluşturmuştur. Bu yağın genel bileşimi, karvakrol (% 53.35) - terpinen (% 13.54) ve monoterpenik hidrokarbonlardan p-cymene (% 13.03) tarafından domine edilmiştir. Ayrıca, *S. montana* L.'den ekstrakte edilen uçucu yağın *Salmonella enteridis* dahil gıdalardan izole edilen çeşitli patojenik *Salmonella* spp.'ye karşı 21'den 51 mm arasında değişen inhibisyon zonu ve MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) ve MBC (minimum bakterisidal konsantrasyon) değerleri için sırasıyla 0.39–1.56 mg/mL ila 0.39–3.12 mg/mL arasında değişen güçlü antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, *S. montana* L., sitotoksik ve antioksidan aktivite bakımından da incelenmiştir. İnceleme sonucu *S. montana* L.'den elde edilen uçucu yağın A549 hücre hattına karşı önemli bir sitotoksik etkisinin olduğu ve önemli bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular, *S. montana* L.'den elde edilen uçucu yağın gıda muhafazasında, terapötik veya nutrasötik endüstrilerinde güçlü ajanlar olarak kullanılan ilginç bir bileşen kaynağı olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal eldesi

Çalışmada kullanılan *Satureja cilicica* türü doğal habitatından toplanarak laboratuvarımıza getirilmiştir. Bitki örneğinin toplanması ve teşhisi Prof. Dr. Tuna UYSAL tarafından yapılmıştır.

3.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Fetal Bovine Serum (Sigma), DMSO (Merck), RPMI -1640 Besiyeri (Sigma), İzopropanol (Merck), Dulbecco's Phosphate Buffer (PBS) (Gibco), Penicilin-Streptomycin (Sigma),Trypsin-EDTA Solution (10X) (Sigma), Trypan Blue (Merck), MTT (Sigma), DPPH (Sigma).

3.3. Ekstraktın hazırlanması

Satureja cilicica bitkisinin toprak üstü kısımları uygun ortamda güneş görmeden kurutulduktan sonra toz haline getirilerek ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir. Bu işlemden sonra bitki tozları tartılarak kartuşa yerleştirilmiş ve soxhlet cihazı ile metanol kullanılarak ekstraksiyona tabii tutulmuştur (Redfern ve ark., 2014). Ekstraksiyon sonucu ele geçen ekstrakt çözücüsünden uzaklaştırmak amacıyla rotari evoporatörde 40 º C'de buharlaştırılmıştır. Ele geçen ham ekstrakt -20 º C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Hücre kültürünün hazırlanması

Hücreler 25 cm^2'lik flasklarda % 95 nem ve % 5 CO_2'li gaz ortamında ve 37 °C'de CO_2 inkübatöründe kültüre edilmiştir. Flask içindeki DLD-1 hücrelerinin yoğunluğu invert mikroskopla zaman zaman kontrol edilmiş ve yoğun görünen flasklardan hücreler pasajlanarak çoğaltılması sağlanmıştır.

3.5. Hücre sayımı

Yeterli yoğunluğa ulaşan flasklardan hücre sayımı yapılmıştır. Önce Tripsin-EDTA kullanılarak hücrelerin yüzeyden kaldırılmıştır. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra flasktaki tüm içerik bir falkon tüpüne alınmış daha sonra santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan kısım atılmış ve falkon tüpüne 1 ml besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan, hücre sayısı ve canlılık oranını tespit etmek için, ışık mikroskobunda boya almayan hücreler sayılarak 1ml'de bulunan canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

3.6. MTT testi

Hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu pleytlere hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler dağıtıldıktan sonra 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin üzerine ekstraktların istenen final konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri (0,09-0,75 mg/ml) ilave edilip 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Ekstrakt konsantrasyonları seri dilüsyon ile hazırlanmıştır.

Ekstraktlar ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücreler üzerine inkübasyon süresi sonunda $5mg/ml^{-1}$ MTT solüsyonu eklenerek inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucukların içeriği boşaltılarak oluşan formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 100 µl izopropanol ilave edilmiştir. 2-4 saat beklendikten sonra pleytler ELISA reader cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur (Mosmann, 1983). Ekstrakt uygulanan kuyucuklar kontrol grubuna oranlanarak % canlılık tayini yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı yapılıp ortalama değerler dikkate alınmıştır.

3.7. RNA izolasyonu ve RT-PCR

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 12 kuyucuklu pleytlere aynı sayıda hücre ekimi yapılmış ve üzerine ekstraktın IC_{50} konsantrasyonu ve kontrol grubuna ise sadece ekstraktların hazırlanmasında kullanılan miktar kadar DMSO eklenerek 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüm flask içeriği atılmış ve sonra flasktaki hücreler kaldırılarak santrifüjle dibe çöktürülmüştür. Axygen RNA isolation Kiti aracılığıyla total RNA

izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar -86 °C'de saklanmıştır. Total RNA'ların, konsantrasyonları ve saflık dereceleri Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Eşit konsantrasyonda (0,5-1 mikrogram) total RNA, Fermentas First Strand cDNA kit aracılığıyla cDNA'ya çevrilmiştir. Sonrasında Real Time PCR ile DAPK1,DAPK2 ve B-Aktin gen bölgelerinin amplifikasyonu yapılmıştır. Her örnek için hazırlanan karışım miktarları tabloda verilmiştir (Tablo 3.7.1).

Tablo 3.7.1. Real Time PCR'da kullanılan bileşenler ve miktarları

Komponent	**Miktar**
cDNA	1µl
Primer	1µl
dH_2O	3µl
Cybergreen master mix	5µl

3.8. DPPH Yöntemi

Elde edilen ekstraktların radikal süpürme aktivitesi, DPPH testi kullanılarak belirlenmiştir. DPPH süpürüldüğünde sarıya dönüşen kararlı (toz formunda) serbest bir radikaldir. Antioksidanlar DPPH ile reaksiyona girerek onu DPPH-H'ye indirger ve sonuç olarak absorbans azalır. Renk değişim derecesi, antioksidan bileşiklerin veya ekstraktların hidrojen verme kabiliyeti açısından temizleme potansiyelini gösterir.

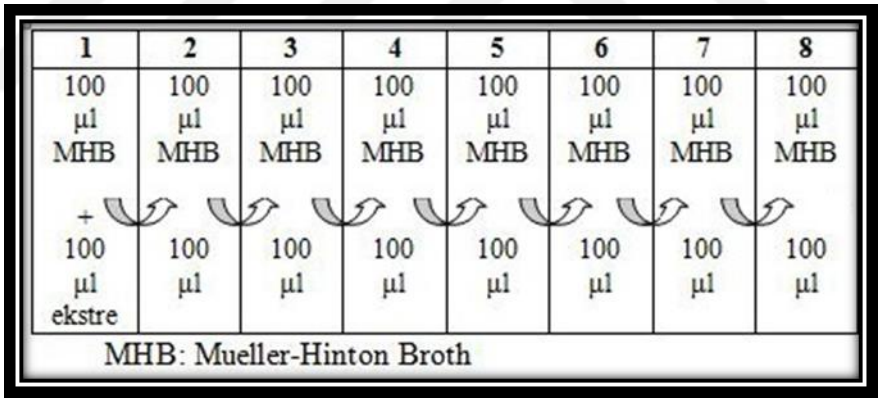
DPPH serbest radikal süpürme deneyi, 96 kuyucuklu bir mikroplaka içerisinde gerçekleştirilmiştir (Boly ve ark., 2016).

Metanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardan 100 µl (5 ila 25 µg / mL) alınarak 100 µL % 0.01 metanolik DPPH çözeltisine ilave edilmiş ve pleyt karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki absorbans değeri Elisa okuyucu ile 517 nm'de okutulmuştur. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda askorbik asit (5-25 µg / mL) kullanılmıştır.

3.9. Antimikrobiyal Analiz

Broth mikrodilüsyon metodunun, çok sayıda test örneğinin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)'unun belirlenmesinde potansiyel olarak faydalı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Mikrobiyolojide MİK, bir gecelik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların gözle görülebilir üremesini inhibe edecek olan antimikrobiyal maddelerin en düşük konsantrasyonudur.

Antimikrobiyal testler için 96'lık U tipi kuyucuklu steril mikrotitrasyon pleytleri kullanılmıştır. Hazırlanan Muleller Hinton Broth (MHB) besiyerinden, pleytlerin her bir gözüne 100'er µl eklendikten sonra, 25 mg/ml konsantrasyonlarda sulandırılan ekstraklardan 100'er µl kuyuculara eklendi. Sekiz kanallı otomatik pipet vasıtasıyla 100'er µl seviyesinde alınarak bir sonraki kuyucuklara taşınmak suretyle, ekstrakların Log2 tabanına göre sulandırılmaları gerçekleştirildi (12,5 mg/ml- 6,1 µg/ml).



Şekil 3.9.1. Ekstraktın seri dilüsyonu

McFarland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan steril serum fizyolojik ile 10^{-2} sulandırma yapılarak mililitresinde 10^{6} bakteri olan süspansiyonlar hazırlandı ve bu süspansiyonlardan her kuyucuğa 100'er µl aktarılarak ekstraktların 6.25 mg/ml ile 48,8 µg/ml konsantrasyonları arası sulandırma oranları elde edildi.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri	100 µl MHB +E + 100 µl bakteri

MHB : Mueller Hinton Broth
E : Ekstrakt

Şekil 3.9.2. Bakteri süspansiyonunun ilavesi

Bu çalışmaya paralel doğrultuda farklı pleytlerde, kontrol antibiyotiği gentamisin ve bakterilerin pozitif üremeleri test edilmiştir. Gentamisinin 0.01 mg/ml konsantrasyonundaki çözeltisinden, üst tarafta yaptığımız ekstrakt ilavesinde olduğu gibi ilk kuyucuklara 100 µl eklenerek devam edilmiş ve 1-8. kuyucuklar arasında 0.0025mg/ml 0.01µg/ml konsantrasyonlarda sulandırmaları yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra pleytlerin kapakları kapatılarak 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda renklenme için kuyucuklara 20 µl aköz (sulu) 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorid (% 0.5) eklenerek 37 °C'de 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda pleytlerdeki üreme kontrol edilerek gözle görülebilen bir üremenin olmadığı (renklenmeyen alanlar), dolayısıyla üremenin inhibe olduğu en düşük ekstrakt konsantrasyonu MİK olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.9.1.Çalışmada kullanılan standart mikroorganizma suşları

Bakteriler		**Mantar**
1	*Esherichia coli ATCC 25922*	*Candida parasilopsis*
2	*Pseudomonas aeroginosa ATCC 27853*	*Candida albicans ATCC 26555*
3	*Klebsiella pneumonia ATCC 70603*	
4	*Metislin direncili S.aureus (MRSA)ATCC43300*	
5	*Salmonella enteritidis ATCC 13076*	
6	*Sarcina lutea ATCC 9341*	
7	*Proteus mirabilis ATCC 25933*	
8	*Bacillus cereus ATCC 11778*	
9	*Listeria monocytogenes NRRL-B-33314*	

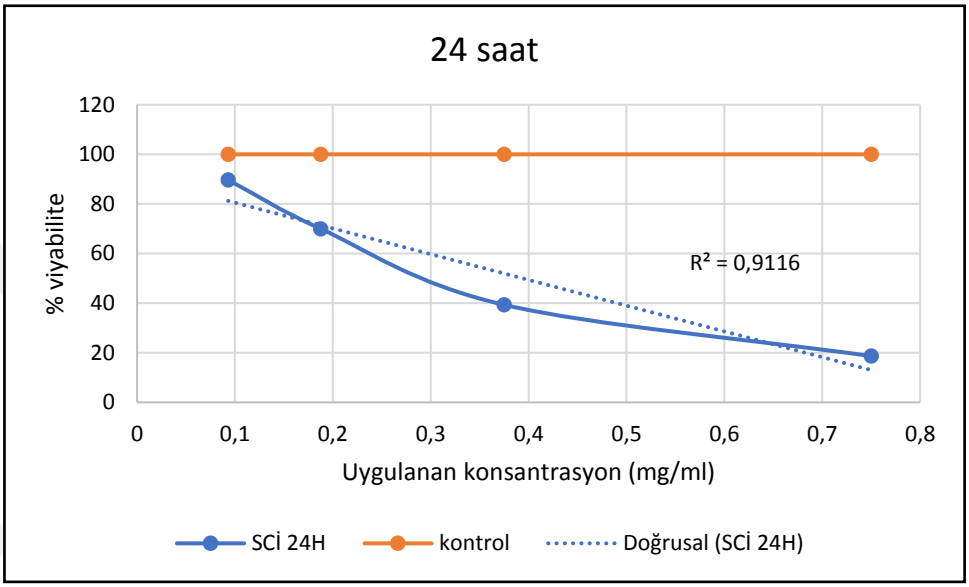
3.10. Analizler

MTT ve DPPH testinde absorbans ölçümlerine ait değerler her grubun kendi kontrolünün absorbans değerine oranlanarak % değerler şeklinde ifade edilmiştir. Ayrıca, ham verilerin bilgisayarda toplanması ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmış verilerden grafiklerin hazırlanmasında Microsoft Excel (Office 2010) programından yararlanılmıştır.

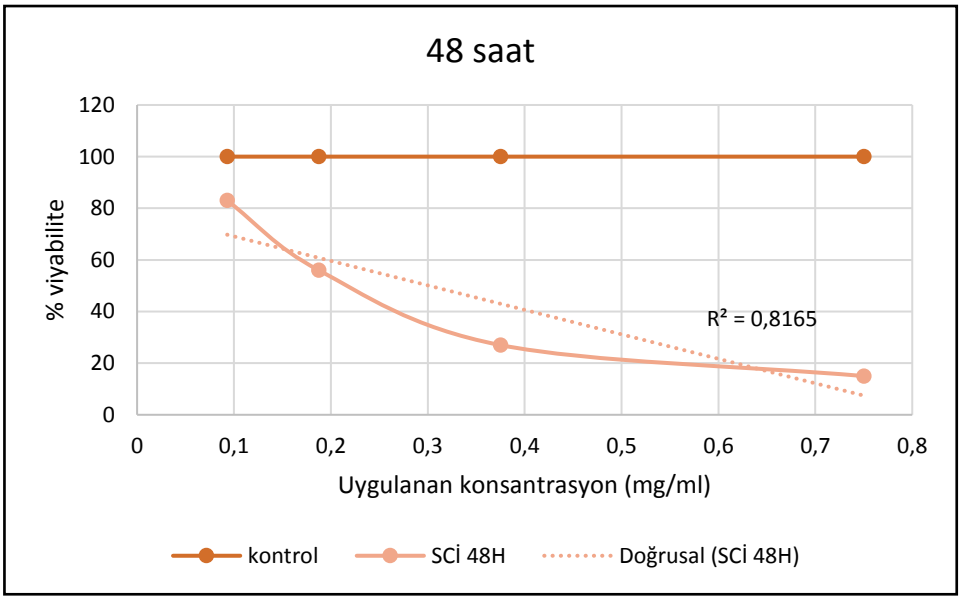
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. MTT Testi Sonuçları

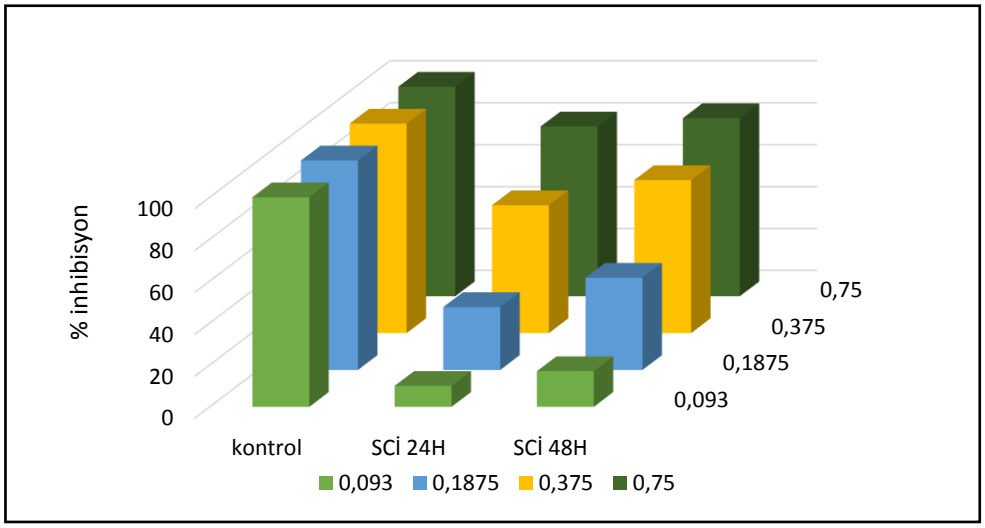
Satureja cilicica'dan elde edilen metanolik ekstrakt DLD-1 hücre hattı üzerine uygulandıktan sonra, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ölçülen MTT testi absorbans değerleri doğrultusunda elde edilen % viyabilite grafikleri şöyledir;



Grafik 4.1.1. Elde edilen ekstraktın DLD-1 hücre hattına 24 saatlik etkileri



Grafik 4.1.2. Elde edilen ekstraktın DLD-1 hücre hattına 48 saatlik etkileri



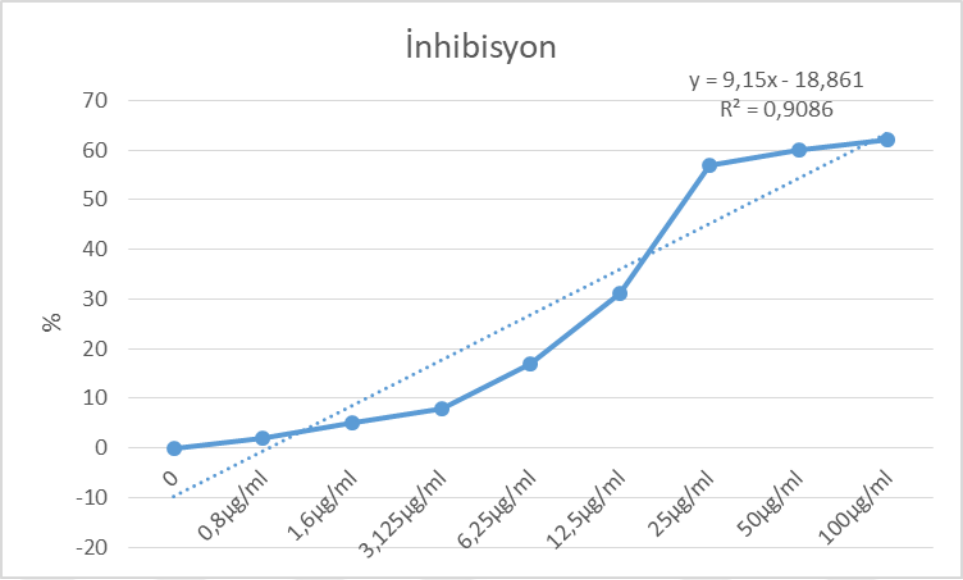
Grafik 4.1.3. Elde edilen ekstraktın DLD-1 hücre hattına 24-48 saatlik inhibisyon etkileri

24 saatlik uygulama sonunda eşit hücre sayısıyla başlanan pleytlerdeki aktivite % viyabilite olarak değerlendirildiğinde uygulanan ekstraktın, 93 µg/ml dozda % 10, 187.5 µg/ml dozda % 30. 375 µg/ml dozda % 61. 750 µg/ml dozda % 81 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. 48 saatlik ekstrakt uygulama sonuçlarını değerlendirdiğimizde zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin artış gösterdiği söylenebilir. 48 saat sonunda yapılan ölçümlere göre uygulanan ekstrakt 93 µg/ml dozda % 17, 187.5 µg/ml dozda % 44. 375 µg/ml dozda % 73. 750 µg/ml dozda % 85 oranında hücre ölümüne neden olmuştur.

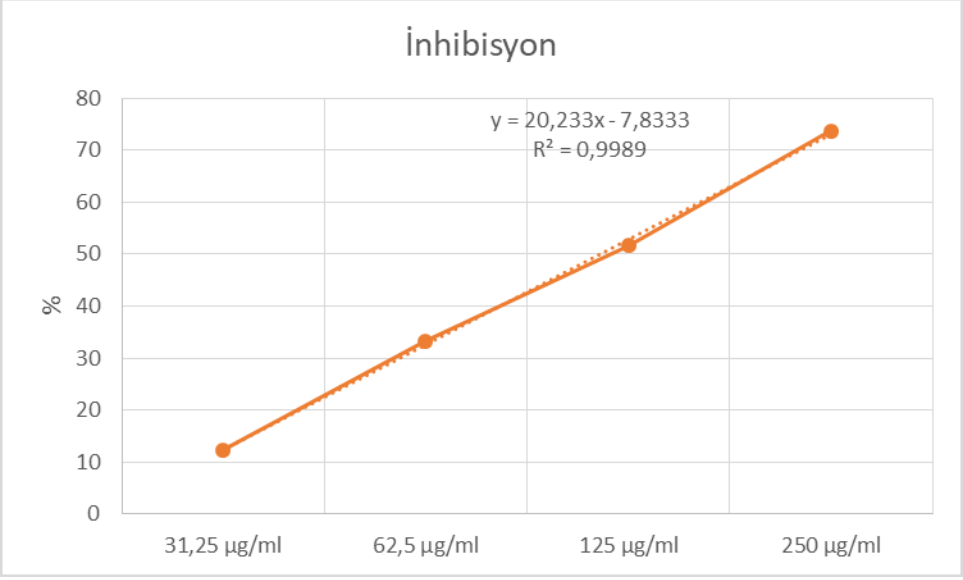
Elde edilen grafikler değerlendirildiğinde uygulanan doz ve zaman aralığında ekstraktın doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraktın 24 saat için IC_{50} dozu 0.307 mg/ml olarak hesaplanırken 48 saat için IC_{50} dozu 0.225 mg /ml olarak hesaplanmıştır.

4.2. DPPH Testi Sonuçları

DPPH testi sonrasında alınan absorbans değerleri kontrole oranlanarak askorbik asit ve *S.cilicica* ekstraktının % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Oluşturulan grafikler ve grafiklere ait eğim denklemleri aşağıda verilmiştir.



Grafik 4.2.1. Askorbik asite ait DPPH eğrisi



Grafik 4.2.2. *S.cilicica* metanol ekstraktına ait DPPH eğrisi

Elde edilen değerler doğrultusunda ekstraktın askorbik asite göre daha düşük antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Askorbik asitin IC_{50} dozu 21,6 µg/ml iken, ekstrakta ait IC_{50} dozu 145,03 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

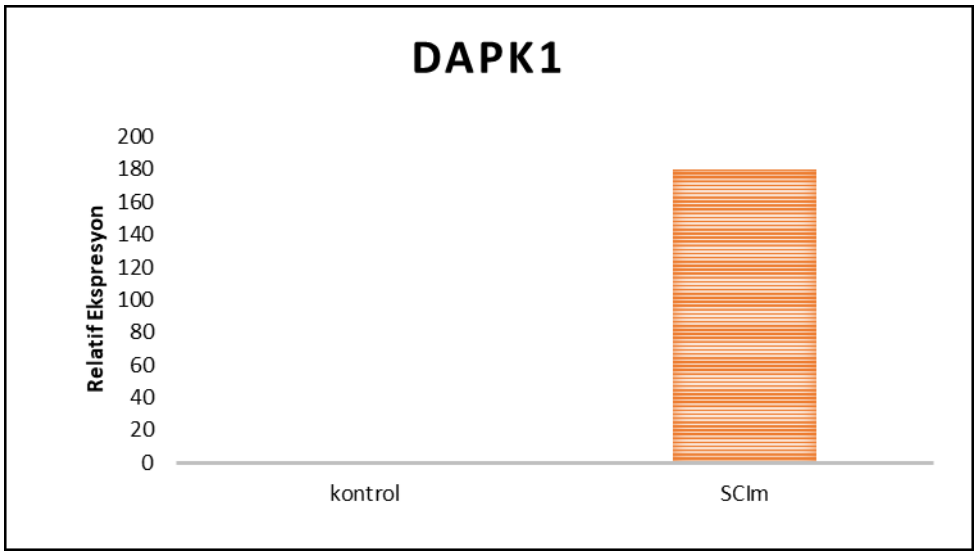
4.3. Real Time PCR Sonuçları

Satureja cilicica'dan elde edilen ekstraktın IC_{50} dozu kolorektal kanser hücre hattı üzerine uygulandıktan sonra gerçekleştirilen ve kontrol grubundan yapılan RNA izolasyonu sonuçları Tablo 4.3.1'de verilmiştir.

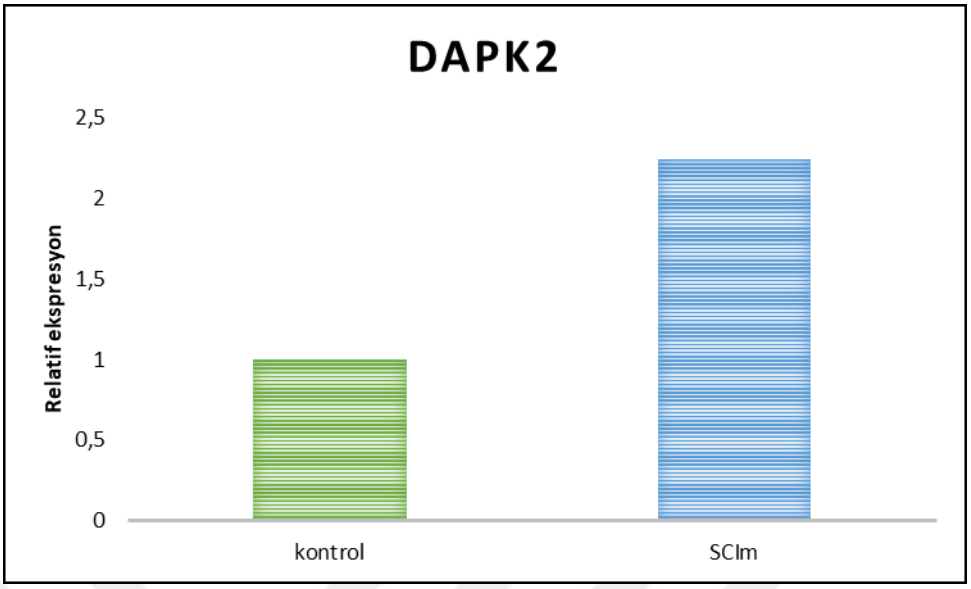
Tablo 4.3.1. İzole edilen RNA'ların nanodrop sonuçları

	RNA konsantrasyonu	**A260**	**A280**	**260/280**
DLD-1 kontrol	252 ng/µl	6.301	3.055	2.06
DLD-1 SCI_m	394.3 ng/µl	9.857	4.815	2.05

Elde edilen RNA'lardan revers transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA'ya sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra uygun primerler kullanılarak Real Time PCR ile pro-apoptotik gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmamızda proapoptotik etki gösterdikleri bilinen iki gen bölgesinin (DAPK1 ve DAPK2) ve housekeeping olarak B-Actin geninin amplifikasyonları yapılmıştır. Amplifikasyon sonrası elde edilen değerler B-actin ile oranlanarak relatif ekspresyon seviyeleri bulunmuştur. Elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir.



Şekil. 4.3.1. DLD-1 hücre hatlarına ekstrakt uygulanması sonrasında DAPK1 gen ekspresyon seviyeleri



Şekil. 4.3.2. DLD-1 hücre hatlarına ekstrakt uygulanması sonrasında DAPK2 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda DLD-1 hücre hattına ekstrakt uygulamasından sonra hem DAPK1 hem de DAPK2 gen ekspresyonlarında belirgin bir artış saptanmıştır. DAPK1 gen ekspresyonu kontrol grubuna oranla yaklaşık 180 katlık bir artış gösterirken, DAPK2 gen ekspresyonunda yaklaşık 2.5 katlık bir artış gözlenmiştir. Uygulanan ekstraktlar kanser hücrelerinde genellikle inaktif durumda olan ve /veya işlevini kaybetmiş olan apoptotik hücre ölümü yolağındaki DAPK1 ve DAPK2 genlerinin ekspresyon düzeylerini arttırmıştır. Ekstrakt uygulamasından sonra pro-apoptotik gen bölgelerinin ekspresyonlarında gözlenen bu artış hücre ölümünün apopitoz yolu ile gerçekleştiğinin bir göstergesidir.

4.4. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK), bir antimikrobiyal bileşenin veya bakteriyostatik olan maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. MİK'ler, belirli bir süre boyunca azalan antibiyotik / antiseptik konsantrasyonlarının, mikrobiyal popülasyon büyümesinin inhibisyonu açısından etkisini değerlendirmek için kullanılır.

Bileşiklerin çeşitli konsantrasyonları kültür bakterileri ile aşılanması sonucunda, MIK noktasının hangi seviyede tepkime verdiği, agar dilüsyon veya broth dilüsyon (makro veya mikro) kullanılarak ölçülür. Duyarlılık testi tipik olarak antimikrobiyal kemoterapiyi garanti eden bulaşıcı bir sürece katkıda bulunan organizmalar kullanılarak yapılır. Yaygın olarak kullanılan bakterilere ESKAPE patojenleri (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa ve Enterobacter*) olarak bilinir.

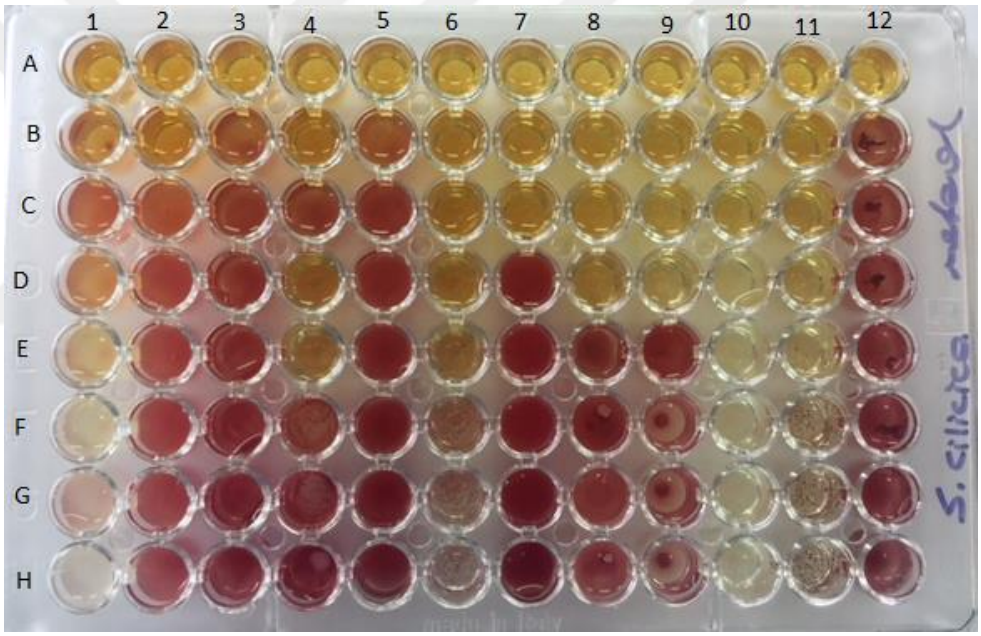
Tablo. 4.4.1. Çalışılan bitki ekstraktlarının kullanılan standart suşlara karşı belirlenen mik değerleri

Mikroorganizmalar		***Satureja cilicica* (mg/ml)**	**Gentamisin (mg/ml)**
1	*Esherichia coli*-ATCC-25922	-	0.0001
2	*Pseudomonas aeroginosa*-ATCC-27853	3.125	0.0001
3	*Klebsiella pneumonia*-ATCC-70603	-	0.0012
4	*Metisilin direncili S.aureus-(MRSA)*ATCC-43300	3.125	0.0001
5	*Salmonella enteritidis*-ATCC 13076	-	0.0001
6	*Sarcina lutea*-ATCC 9341	0.781	0.00003
7	*Proteus Mirabilis*-ATCC 25933	1.562	0.0003
8	*Bacillus cereus*-ATCC 11778	0.781	0.00003
9	*Listeria monocytogenes*-NRRL-B-33314	0.781	0.0003
11	*Candida parasilopsis*	0.781	0.0001
12	*Candida albicans*-ATCC 26555	-	0.0003

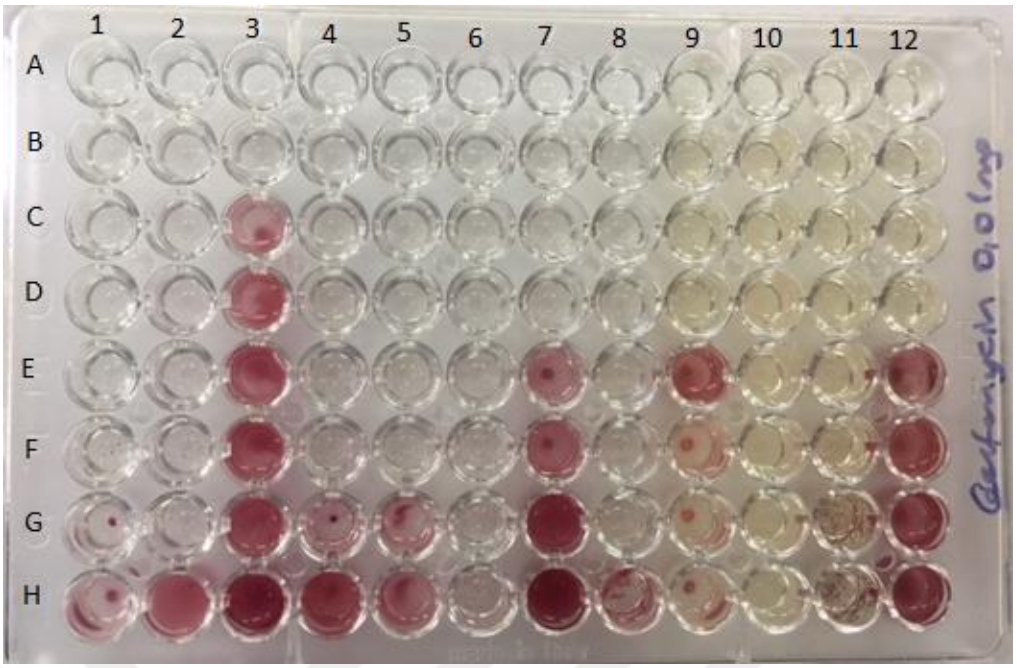
Çalışmamızda antimikrobiyal aktivite incelemesinde kullandığımız metot olan mikrodilüsyon metodunda, test maddelerinde belirli oranlarda dilüsyonlar yaparak düzenli bir şekilde azalan dozlar doğrultusunda elde ettiğimiz minimal inhibe edici

konsantrasyon belirlenmiştir. Bu yöntemin diğer metotlara göre avantajı ise düşük miktarda test edilecek madde ile MİK değerinin tespit edilmesidir.

Yaptığımız çalışma ve tetkikler sonucunda, elde ettiğimiz verilerde *Esherichia coli, Klebsilla pneumonia, Salmonella enteritidis, Candida albicans* mikroorganizmalarında bütün test dozlarında herhangi bir antimikrobiyal etkiye rastlanmamıştır. Bunların dışında *Sarcina lutea, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Candida parasilopsis* türü mikroorganizmalarda ise pleytte 4 kuyucukta antimikrobiyal (0.781 mg/ml) etkiye rastlanmıştır. *Pseudomonas aeroginosa* ve Metisilin direncili *S. aureus*'da ise 2 kuyucukta (3.125 mg/ml) antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. *Proteus mirabilis*'e karşı antimikrobiyal aktivite inhibisyonu 3 kuyucukta (1.562 mg/ml) görülmektedir.



Şekil 4.4.1. *Satureja cilicica* metanol ekstraktı uygulanan pleyt görünümü.1) *Esherichia coli,* 2) *Pseudomonas aeroginosa* 3) *Klebsiella pneumonia,* 4) Metisilin dirençli *S.aureus, 5) Salmonella enteritidis* 6) *Sarcina lotea* 7) *Proteus mirabilis* 8) *Bacillus cereus* 9) *Listeria monocytogenes,* 11) *Candida parasilopsis 1*2) *Candida albicans*



Şekil 4.4.2. Gentamisin uygulanan pleyt görünümü. 1) *Esherichia coli*, **2)** *Pseudomonas aeroginosa* **3)** *Klebsiella pneumonia*, 4) Metisilin dirençli *S.aureus, 5) Salmonella enteritidis* 6) *Sarcina lotea* 7) *Proteus mirabilis* 8) *Bacillus cereus* 9) *Listeria monocytogenes*, 11) *Candida parasilopsis 1*2) *Candida albicans*

4.5. Tartışma

Günümüzde modern yöntemlerin getirdiği maliyet ve yan etkiler gibi sınırlamalar nedeniyle bitkiler kullanılarak yapılan tedaviler her toplumda ve yaş grubunda, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Sucaklı ve ark., 2014; Pınar ve ark., 2017). Bu doğrultuda bitkisel ilaçlara olan ilginin giderek artmasının nedenleri; kolay ulaşılabilir olmaları, ucuz olmaları ve zararsız kabul edilmeleri olarak sayılabilir (Koçtürk ve ark., 2009). *Satureja* cinsine mensup türler geleneksel tıpta oldukça ilgi gören bitkilerdir. Literatürde *Satureja* cinsinin antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin yer aldığı çok sayıda makale bulunmaktadır. *Satureja* spp.'nin antimikrobiyal aktiviteleri ilk olarak 1950'lerde rapor edilmiş ve inhibe edici etkinin, timol ve karvakrol içeriğinden kaynaklandığı kanıtlanmıştır (Oroian ve Escriche, 2015). *S. cilicica*'dan elde edilen metanolik ekstraktın antibakteriyel etkisinin rapor edildiği çalışmada, ekstraktın özellikle *P. vulgaris* and *S. aureus* (MİK değeri: 1.6 mg/ml) üzerine güçlü antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir (Askun ve ark., 2012). Çalışmamızda ise en yüksek antibakteriyel etki *Sarcina lutea, Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde görülmüştür (MİK değeri: 0.781 mg/ml). Çalışmamızda *S. aureus* için MIK değeri 3.125 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Bahsi geçen çalışmada ekstraktın hazırlanma yöntemi kullandığımız yöntemden farklı olmakla birlikte antibakteriyel etki açısından sonuçlarımız uyum göstermektedir.

Satureja montana L. ile yapılan bir çalışmada incelenen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite ve etki gücü, inhibisyon zon çapı ile nitelenmiş ve MİK değerleri ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre, S. *montana* L.'elde edilen esansiyel yağın dokuz bakteri üzerinde ve etanolik ekstraktın ise sekiz bakteri üzerinde antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Kullanılan bitki türü farklılık gösterse de alınan sonuçlar antibakteriyel etki açısından benzerlik göstermektedir ve çalışmamızda da ekstraktın dokuz farklı bakteri üzerine inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Serrano ve ark., 2011).

Yapılan bir diğer çalışmaya göre, *Satureja hortensis* (hekzan ve metanol) ekstraktlarının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri, inhibisyon bölgeleri, MİK değerlerinin varlığı veya yokluğu ile nitel ve nicel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, *Satureja hortensis*'in hekzan özütünün, üç *Bacillus* türüne

(*Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus megaterium ve Bacillus sphaericus*) ait dört suş dışında antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Ancak, metanol özü, altı *Candida albicans* izolatı ve *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus atrophaeus, Bacillus macerans, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus mersi, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus* dahil olmak üzere 11 farklı tür üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. *Satureja hortensis*'in metanol ekstresine duyarlı olan bakteriyel suşlar ve *Candida albicans* izolatları için maksimum inhibisyon bölgeleri ve MİK değerlerinin 6-13 mm ve 15.60-250 µl / ml ve sırasıyla 7-9 mm ve 125-250 µl / ml olduğu bildirilmiştir. Hekzan ekstraktına duyarlı bakteri suşlarının maksimum inhibisyon bölgeleri ve MİK değerlerinin sırasıyla 7-9 mm ve 31.25-125 µl / ml olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, metanol ekstraktı, hekzan ekstraktı ile karşılaştırıldığında daha güçlü ve daha geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip olduğu sonucuna vardıkları bildirilmiş (Şahin ve ark., 2003) ve bu çalışma ile de doğrulanmıştır.

Diğer *Satureja* türlerinin de çok sayıda bakteri, mantar veya diğer mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi daha önce rapor edilmiştir.

Breakpoints (2011) tarafından, *S. laxiflora*'nın uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin, uçucu yağın ana bileşeni timolinden kaynaklandığı bildirilmiştir. *S. montana* ve *S. subspicata* yağlarının etkisi de rapor edilmiş ve *S. spicigera, S. biflora, S. masukensis* ve *S. pseudosimensis*'ten elde edilen esansiyel yağlar, çok çeşitli mikro organizmalara karşı yüksek inhibisyon göstermiştir (Kovàts, 1958; Güllüce ve ark., 2003; Gutierrez ve ark., 2009). Genel bir bakış açısı ile antibakteriyel sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde *S. cilicica* ile yapılan sınırlı çalışma bulunmakla birlikte sonuçlarımız antibakteriyal ve antimikrobiyal etki açısından literatürle uyumludur.

Literatürde *Satureja* türlerinin antioksidan potansiyellerinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *Satureja cilicica*'nın uçucu yağının radikal süpürücü etkisinin araştırıldığı bir çalışmada uçucu yağın radikal süpürme kapasiteleri sırasıyla DPPH ve ABTS radikal süpürme yöntemi ile 3,28±0,02 ve 238,15±3,59 mg eşdeğer trolox/mL uçucu yağ olarak ölçülmüştür (Arabacı ve ark., 2017). Bitkinin antioksidan potansiyeli çalışmamızla uyumludur, çalışmamızda eşdeğer hesaplama yerine standart eğri kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada *Satureja montana* esansiyel yağının ve TBHQ'nun antioksidan aktivitesi DPPH yöntemiyle araştırılmış ve *Satureja montana* esansiyel yağı ve TBHQ için IC_{50} miktarının sırasıyla 32.42 ± 0.459 ve 23.83 ± 2.44 µg/ mL olduğunu bildirilmiştir. Sentetik bir antioksidan olan TBHQ ile

karşılaştırıldığında, *Satureja montana* esansiyel yağı için IC_{50} miktarının çok yakın olduğu tespit edilmiştir (Serrano ve ark., 2011).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, *S.briquetti, S.atlantica ve S.alpina* bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların ve sentetik antioksidanların DPPH süpürme testinin sonuçlarında, *S.briquetti* ve *S.atlantica* için 60 mg, *S.alpina* için 56 mg eşdeğer arasında değiştiği bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda, *S. briquetti* ve *S. atlantica*'nın uçucu yağlarının benzer antiradikal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. 250 mg'lik bir konsantrasyonla, *S. alpina*'nın antioksidan aktivitesinin diğer ikisine kıyasla daha fazla rapor edilmiştir (Dorman ve Hiltunen, 2004; Giweli ve ark., 2012; Öztürk, 2012). Çalışmamızda antioksidan potansiyel açısından değerlendirilen *S. cilicica* ekstraktının IC_{50} değeri askorbik asitle kıyaslandığında askorbik asitten daha düşük radikal süpürücü etkiye sahip olduğu ancak antioksidan potansiyel barındırdığı tespit edilmiş olup, bu sonuç rapor edilen *Satureja* türlerinin antioksidan etki sonuçları ile uyumludur.

Fitokimyasalların kanser ilacı direnciyle mücadelede potansiyel olarak değerli kombinasyonları mevcuttur. Düşük IC_{50} değeri, anti-kanser ajanının hücre hattına karşı daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Arabacı ve ark., (2017) tarafından yapılan çalışmada *S. cilicica* esansiyel yağının sitotoksik etkinliği, MCF-7 hücre hattında 24 saatlik uygulamadan sonra MTT testi ile belirlenmiştir. Artan doza bağlı olarak inhibisyon oranının arttığı bildirilmiş ve IC_{50} değeri belirlenmiştir (268 µg/ml) (Arabacı ve ark., 2017). Çalışmamızda kolorektal kanser hücre hattı kullanılmıştır. Doğal olarak kullanılan hücre hatlarının farklı olmasına bağlı olarak sitotoksik açıdan alınan sonuçlar da farklılık gösterebilir. Çalışmamızda 48 saatlik optimal IC_{50} dozunun yaklaşık 0,225mg/ml olduğu saptanmıştır.

Satureja cilica'nın sitotoksik etkisi ile ilgili başka rapor bulunmamakla birlikte çeşitli bitkilerin ve bitkisel ekstraktların kolon kanseri hücre hatlarına kullanımı üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

Reissantia indica bitkisinin etanolik ekstraktı ile yapılmış bir çalışmada, bitki ekstrelerinin HT-29 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT testi ile araştırılmıştır. *Reissantia indica*'nin MTT deneyi sonuçlarına göre, bu ekstrenin HT-29 hücre hattına karşı en yüksek sitotoksisitesinin % 78.079, hücre büyümesi inhibisyonu ile 1000 µg / ml konsantrasyonda bulunduğunu bildirilmiştir. Çalışmada uygulanan ekstrakt dozunun artışıyla birlikte HT-29 hücrelerinin büyümesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Sangeetha ve ark., 2019). Çalışmamızda elde edilen ekstraktların kolorektal

kanser hücre hattı DLD-1 üzerine doza ve zamana bağlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir, IC_{50} dozları farklı olsa da sitotoksik etki açısından sonuçlarımız benzerdir.

Mogana ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada *Canarium patentinervium* Miq'un yaprak ve kök kısımlarından elde edilen üç farklı ekstraktın (kloroform,etanol ve hekzan) iki meme kanseri hücre hattı MCF7 ve MDA468 ile kolon kanseri hücre hattı HCT 116'ya karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda meme kanseri hücre hatlarının ekstrakta daha duyarlı olduğu ve özellikle MDA 468 hücre hattında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Simsek ve Uysal (2013) tarafından yapılan çalışmada *Cynara* ekstraktlarının kolorektal kanser hücre hattı DLD-1 üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan üç farklı ekstrakttan en etkili olan ekstraktın yabani türden elde edilen ekstrakt olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada yabani türden elde edilen ekstraktın 48 saat için IC_{50} dozu 167 µg/ml olarak verilmiştir.

Ayim ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada on bitki türünden elde edilen metanolik ekstraktların DLD-1, MCF-7 ve M14 hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile araştırılmış ve *Croton membranaceus* kök ekstraktının DLD-1 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği ve *Zanthoxylum xanthoxyloides* kök ekstraktının DLD-1 hücre hattı üzerinde 2-3 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Soltanzadeh ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *Satureja khuzestanica* bitkisinin antibakteriyel, antioksidan aktivitesi ve çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada MCF-7, DLD-1, osteosarkom ve fibroblast hücre hatları kullanılmıştır ve sonuç olarak elde edilen ekstraktların sitotoksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiş ve DLD-1 hücre hattı için IC_{50} dozları sırasıyla metanol 26,92 µg/ml, etanol 36,03 µg/ml ve su için 61,75 µg/ml olarak verilmiştir.

Behzad ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Primula auriculata* 'nın ham metanolik ekstraktı (CM) ve fraksiyonlarının neden olduğu hücre canlılığı inhibisyonu MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *P. auriculata*'nın ekstraktı ve fraksiyonlarının sitotoksik etkisinin karşılaştırılması için HT-29 hücreleri, 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda ekstraktla muamele edilmiştir. Sonuçlar ekstraktların doza bağlı bir şekilde HT-29 hücre canlılığını azalttığını göstermiştir. Hücreler mikroskobik olarak incelendiğinde ekstraktların ilavesinden 24 saat sonra hücre morfolojisinde ve yoğunluğunda gözle görülür değişiklikler olduğu bildirilmiştir.

P.auriculata fraksiyonları sitotoksik etki açısından değerlendirildiğinde, diklorometan fraksiyonunun (CF) en güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Pourali ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Tribulus terrestris* bitkisinden elde edilen ekstraktların sitotoksisitesinin değerlendirilmesi için, üç hücre hattı üzerine 24 ve 48 saat boyunca ekstraktın yedi farklı konsantrasyonu uygulanmış ve MTT testi uygulanarak sitotoksik aktivite belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Tribulus terrestris*'in prostat kanser hücre hattı üzerinde kolon ve fibroblast hücrelerinden daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Çeşitli çalışmalarda elde edilen sitotoksitite sonuçları ve IC_{50} değerleri farklılık gösterse de çalışmamızda gözlenen doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki *Satureja* türleri ile yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

Kanser tedavisinde kullanılacak bitki veya bitkisel preparatın hücre ölümünü gerçekleştirmesinden daha çok hücre ölümünün hangi yolla gerçekleştiğinin bilinmesi gereklidir. Gösterdiği sitotoksik etkinin yanında ekstraktın, apopitoz indükleyici kapasiteye sahip olması oldukça önemlidir. Hücre ölüm şeklinin apopitoz aracılığıyla gerçekleşmesi immün yanıt oluşturmayacağından tercih edilen bir durumdur. Kanser hücrelerinde kontrolü kaybedilen apopitoz mekanizmasının yeniden aktif hale getirilebilmesi iki yolla meydana gelebilir; bunlar proapoptotik genlerin aktivasyonu ve antiapoptotik genlerin inaktivasyonudur. Apoptotik hücre ölümünün meydana gelmesinde rol alan proapoptotik genlerden bir tanesi de DAPK1 gen bölgesidir.

Çalışmamızda aldığımız sonuçlar uygulanan ekstraktın proapoptotik DAPK1 ekspresyonunda artışa neden olduğunu ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Choi ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada resveratrolün DAPK1 gen ekspresyon seviyesini kontrole göre arttırdığı rapor edilmiştir. DAPK1 ve DAPK2'nin aktive edilmiş olması kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmiş olduğuna işaret etmesi açısından oldukça önemlidir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlerleyen teknolojinin beraberinde getirdiği sağlık sorunlarından kaçınmak için doğaya ve doğala dönüş eğilimi gittikçe artmaktadır. Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç maddeleri, hasta iyileştirme yöntemlerinde kullanılan ilaçların büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların ve terapötik maddelerin yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması doğal ürünlerin kullanılma zorunluluğunu artırmıştır. Uzun yıllardan beri bitkisel ilaçlar kullanılmakta olup halen gelişmekte olan ülkelerde tıbbi tedavinin birincil kaynağını teşkil etmektedir. Bitkiler tıpta doğal antiseptik özellikleri nedeniyle kullanılmış ve günümüzde hala kullanılmaktadır. Bitkisel ekstraktların ve bitkilerden elde edilen aktif fitokimyasalların kanser dâhil birçok hastalık için ilaç geliştirme potansiyellerini ve kullanımlarını araştırmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Hali hazırda birçok bitki türü, kanseri tedavi etmek veya önlemek için kullanılmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kullanılan *Satureja cilica* (kınalı kekik) bitkisinin ve /veya bitkiden elde edilecek aktif fitokimyasalların antikanser ve antimikrobiyal ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir kaynak olacağını düşünmekteyiz. Kullandığımız ektraktın kolorektal kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite göstermesi ve özellikle hücre ölümünün programlı hücre ölümü aracılığıyla gerçekleşmesi gelecekte yapılacak anti kanser ilaç geliştirme çalışmaları ve benzer çalışmalar için bir katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

Gerek yaptığımız çalışmalar gerekse *Satureja* türleri ile ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalar, bu türlerin ciddi bir potansiyele sahip olduğunu ve bitkilerden elde edilen ekstraktların sitotoksik ve antimikrobiyal başta olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak bu etkiye neden olan etken madde veya maddelerin ne olduğu konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Bu bağlamda, total ekstrakt içindeki etken madde veya maddelerin araştırılması oldukça önemlidir. Dolayısıyla gelecekte yapılacak çalışmalarda özellikle etken maddenin ne olduğu konusuna yoğunlaşmak gereklidir. Diğer taraftan sitotoksik aktiviteye neden olan ekstraktın normal hücreler üzerinde nasıl bir etkiyle sahip olduğu konusunda bir bilgi bulunmamaktadır ve bu bilginin elde edilmesi de oldukça önemlidir. Bu nedenle ekstraktların sağlıklı hücreler üzerinde olan etkilerinin araştırılması da önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Alavijeh, P. K., Alavijeh, P. K. ve Sharma, D., 2012, A study of antimicrobial activity of few medicinal herbs, *Asian J Plant Sci Res*, 2 (4), 496-502.

American Dietetic Association, 2010, Antioxidants, http://eatright.org:

Arabacı, T., Uzay, G. ve Keleştemur, U., 2017, Cytotoxicity, radical scavenging, antioxidant properties and chemical composition of the essential oil of satureja cilicica ph Davis from Turkey.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. ve Patel, H. R., 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert review of molecular diagnostics*, 5 (2), 209-219.

Askun, T., Tumen, G., Satıl, F. ve Karaarslan, D., 2012, Active constituents of some Satureja L. species and their biological activities, *African Journal of Microbiology Research*, 6 (22), 4623-4633.

Ayim, J., Bayor, M., Phillips, R., Shnyder, S. ve Wright, C., 2007, The evaluation of selected Ghanaian medicinal plants for cytotoxic activites, *Journal of Science and Technology (Ghana)*, 27 (3), 16-22.

Azzouz, L. L. ve Sharma, S., 2018, Physiology, Large Intestine, In: StatPearls [Internet], Eds: StatPearls Publishing, p.

Behzad, S., Pirani, A. ve Mosaddegh, M., 2014, Cytotoxic activity of some medicinal plants from Hamedan district of Iran, *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13 (Suppl), 199.

Behzad, S., Ebrahim, K., Mosaddegh, M. ve Haeri, A., 2016, *Primula auriculata* extracts exert cytotoxic and apoptotic effects against HT-29 human colon adenocarcinoma cells, *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 15 (1), 311.

Belk, C. M. ve Borden, V., 2009, Human biology, Benjamin Cummings, p.

Boly, R., Lamkami, T., Lompo, M., Dubois, J. ve Guissou, I., 2016, DPPH free radical scavenging activity of two extracts from Agelanthus dodoneifolius (Loranthaceae) leaves, *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 8 (1), 29-34.

Breakpoints, C., 2011, CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, *Nineteenth informational supplement CLSI document M100-S21 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Chacon, E., Acosta, D. ve Lemasters, J. J., 1997, Primary cultures of cardiac myocytes as in vitro models for pharmacological and toxicological assessments, In: In Vitro Methods in Pharmaceutical Research, Eds: Elsevier, p. 209-223.

Choi, M. S., Kim, Y., Jung, J. Y., Yang, S. H., Lee, T. R. ve Shin, D. W., 2013, Resveratrol induces autophagy through death-associated protein kinase 1 (DAPK 1) in human dermal fibroblasts under normal culture conditions, *Experimental dermatology*, 22 (7), 491-494.

College, O., 2013, Anatomy and physiology, Rice University, p.

Davis, P., Mill, R. ve Tan, K., 1982, Flora of Turkey and the east Aegean ıslands, *Edinburg Univsersty Press*, 7, 394-395.

Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C. ve Bhat, H. K., 2008, Medicinal plants and cancer chemoprevention, *Current drug metabolism*, 9 (7), 581-591.

Dorman, H. ve Hiltunen, R., 2004, Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions, *Food Chemistry*, 88 (2), 193-199.

Ebneshahidi, A., 2019, Digestive system, http://www.lamission.edu/lifesciences/lecturenote/aliphysio1/digestion.pdf:

Esmaeili, S., Hamzeloo-Moghadam, M., Ghaffari, S. ve Mosaddegh, M., 2014, Cytotoxic activity screening of some medicinal plants from south of Iran, *Research Journal of Pharmacognosy*, 1 (4), 19-25.

Fierascu, I., Dinu-Pirvu, C., Fierascu, R., Velescu, B., Anuta, V., Ortan, A. ve Jinga, V., 2018, Phytochemical Profile and Biological Activities of *Satureja hortensis* L.: A Review of the Last Decade, *Molecules*, 23 (10), 2458.

Garcia, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. d., Reis, A., Loguercio, A. D. ve Grande, R. H. M., 2012, Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth, *Brazilian dental journal*, 23 (1), 22-27.

Geering, B., 2015, Death-associated protein kinase 2: Regulator of apoptosis, autophagy and inflammation, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 151-154.

Gewies, A., 2003, Introduction to Apoptosis, http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm:

Giweli, A., Džamić, A. M., Soković, M., Ristić, M. S. ve Marin, P. D., 2012, Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya, *Molecules*, 17 (5), 4836-4850.

Gohari, A. R., Ostad, S. N., Moradi-Afrapoli, F., Malmir, M., Tavajohi, S., Akbari, H. ve Saeidnia, S., 2012, Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and its main compounds, *The Scientific World Journal*, 2012.

Greenwell, M. ve Rahman, P., 2015, Medicinal plants: their use in anticancer treatment, *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 6 (10), 4103.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. ve Bourke, P., 2009, Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food microbiology*, 26 (2), 142-150.

Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Ağar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sökmen, A. ve Şahin, F., 2003, In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L., *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (14), 3958-3965.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A. ve Pezeshkian, S. K., 2002, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil, *Journal of ethnopharmacology*, 82 (2-3), 83-87.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J., 1995, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free radical biology & medicine*, 18 (1), 125-126.

Halliwell, B., 2007, Biochemistry of oxidative stress, Portland Press Limited.

Healthcare, 2019, Colorectal Cancer: Introduction, https://healthcare.ascension.org/Specialty-Care/Cancer/Colorectal-Cancer/Colorectal-Cancer-Introduction:

Hengartner, M. O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407 (6805), 770.

Joshi, M. ve Deshpande, J., 2010, Polymerase chain reaction: methods, principles and application, *International Journal of Biomedical Research*, 2 (1), 81-97.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26 (4), 239.

Koçtürk, O. M., Kalafatçılar, Ö. A., Özbilgin, N. ve Atabay, H., 2009, Türkiye'de Bitkisel İlaçlara Bakış, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 46 (3), 209-214.

Kovàts, E., 1958, Characterization of organic compounds by gas chromatography. Part 1. Retention indices of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones, *Helv. Chim. Acta*, 41 (7), 1915-1932.

Kumar, R., 2010, Apoptosis and Cancer: A Review, https://www.biotecharticles.com/Biotech-Research-Article/Apoptosis:

Lampronti, I., Saab, A. M. ve Gambari, R., 2006, Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division, *International Journal of Oncology*, 29 (4), 989-995.

Li, L., Guo, L., Wang, Q., Liu, X., Zeng, Y., Wen, Q., Zhang, S., Kwok, H. F., Lin, Y. ve Liu, J., 2017, DAPK1 as an independent prognostic marker in liver cancer, *PeerJ*, 5, e3568.

Madhuri, S. ve Pandey, G., 2009, Some anticancer medicinal plants of foreign origin, *Current science*, 779-783.

Mane, V. P., Heuer, M. A., Hillyer, P., Navarro, M. B. ve Rabin, R. L., 2008, Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis, *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 19 (5), 342.

Mathangiand, T. ve Prabhakaran, P., 2013, DPPH free radical scavenging activity of the extracts of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* Linn, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2 (10), 534-536.

Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Zlatković, B., Ristić, M. ve Branković, S., 2009, Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis L. essential oil, *Open Life Sciences*, 4 (3), 411-416.

Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A. ve Ammar, E., 2013, Chemical composition and cytotoxic and antioxidant activities of *Satureja montana* L. essential oil and its antibacterial potential against *Salmonella* spp. strains, *Journal of Chemistry*, 2013.

Mogana, R., Bradshaw, T., Jin, K. ve Wiart, C., 2011, In vitro antitumor potential of Canarium patentinervium Miq, *Academic Journal of Cancer Research*, 4 (1), 1-4.

Momtaz, S. ve Abdollahi, M., 2008, A systematic review of the biological activities of *Satureja* L. species, *Pharmacologyonline*, 2, 34-54.

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.

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C. ve Silva, G. L., 2000, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Brazilian journal of microbiology*, 31 (4), 247-256.

Oroian, M. ve Escriche, I., 2015, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*, 74, 10-36.

Ozkan, G., Simsek, B. ve Kuleasan, H., 2007, Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro, *Journal of food engineering*, 79 (4), 1391-1396.

Öztürk, M., 2012, Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil, *Food Chemistry*, 134 (1), 48-54.

Pestana, E. A., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R. ve Viljoen, G. J., 2009, Real-time PCR–the basic principles, In: Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications, Eds: Springer, p. 27-46.

Pınar, N., Topaloğlu, M., Özer, C. ve Alp, H., 2017, Kardiyoloji hastalarında bitkisel ürün kullanımı, *Turk Kardiyol Dern Ars*, 45 (7), 614-622.

Pourali, M., Yaghoobi, M. M. ve Sormaghi, M. H. S., 2017, Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of *Tribulus terrestris* L. Fruit Extract on Human Prostate Cancer Lncap and Colon Cancer HT-29 Cell Lines, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12 (2).

Rates, S. M. K., 2001, Plants as source of drugs, *Toxicon*, 39 (5), 603-613.

Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D. ve Verran, J., 2014, Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties, *Journal of microbiology & biology education*, 15 (1), 45.

Sadeghi, I., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Sharifi, M. ve Moradi, A., 2013, In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15 (1), 70.

Sahraei, S., Mohkami, Z., Golshani, F., Javadian, F., Saeidi, S. ve Baigi, G. S., 2014, Antibacterial activity of five medicinal plant extracts against some human bacteria, *European Journal of Experimental Biology*, 4 (3), 194-196.

Sangeetha, M., Sudhakar K, Sathish S , Gayathri P ve D, C., 2019, In vitro Cytotoxic Activity of Ethanolic Extract of *Reissantia indica* on the Human Colon Cancer Cell Line (HT-29) *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 11 (1), 1-4.

Schlegel, C., Fonseca, A., Stöcker, S., Georgiou, M., Misterek, M., Munro, C., Carmo, C., Seckl, M. ve Costa-Pereira, A., 2014, DAPK2 is a novel modulator of TRAIL-induced apoptosis, *Cell death and differentiation*, 21 (11), 1780.

Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. L. ve Marques, A., 2011, Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (9), 1554-1560.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z. ve Yehoshua, Y., 2013, Natural antioxidants: function and sources, *Food and Nutrition Sciences*, 4 (06), 643.

Simsek, E. N. ve Uysal, T., 2013, In vitro investigation of cytotoxic and apoptotic effects of Cynara L. species in colorectal cancer cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14 (11), 6791-6795.

Singh, P., Ravanan, P. ve Talwar, P., 2016, Death associated protein kinase 1 (DAPK1): a regulator of apoptosis and autophagy, *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 46.

Soltanzadeh, H., Acik, L., Türk, M., Houshmand, M. ve Shahsavari, G., 2018, Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of Satureja khuzestanica, *Gazi Medical Journal*, 29 (3).

Steely, N., 2017, What Is the Function of the Rectum?, https://healthfully.com/what-function-rectum-4572120.html:

Sucaklı, M. H., Ölmez, S., Keten, H. S., Yenicesu, C., Sarı, N. ve Çelik, M., 2014, Üniversite öğrencilerinin bitkisel ürünleri kullanım özelliklerinin değerlendirilmesi, *Medicine Science*, 3 (3), 1352-1360.

Şahin, F., Karaman, I., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., Adıgüzel, A., Öztürk, S. ve Kotan, R., 2003, Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L, *Journal of ethnopharmacology*, 87 (1), 61-65.

Tur, M., Daramola, A., Gattenlöhner, S., Herling, M., Chetty, S. ve Barth, S., 2017, Restoration of DAP kinase tumor suppressor function: a therapeutic strategy to selectively induce apoptosis in cancer cells using immunokinase fusion proteins, *Biomedicines*, 5 (4), 59.

Wiegand, I., Hilpert, K. ve Hancock, R. E., 2008, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature protocols*, 3 (2), 163.

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J., Srivatva, S. ve Prabha, S., 2016, Antioxidants and its functions in human body-A Review, *Research in Environment and Life Sciences*, 9 (11), 1328-1331.

Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F. ve Rafiee, R., 2012, In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja sahendica*, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94 (9), 1735-1745.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : ULKIR ABDULBAQI ABBAS ABBAS
Uyruğu : IRAQ
Doğum Yeri ve Tarihi : KERKUK 1/1/1978
Telefon : 05345511650
Faks : -
e-mail : ulkerbiology@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Iraq Kerkuk lisesi/Kerkuk/Iraq	1995
Üniversite	:	Iraq Mosul üniversitesi/Mosul/Iraq	1999
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi/Konya	Devam ediyor

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2000-	Kerkük Teknik Üniversitesi	Laborant

UZMANLIK ALANI: Moleküler Biyoloji

YABANCI DİLLER: Arapça ve İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

1. **Ulkir Abdulbaqi Abbas,** Arjan Aydin Zeynal, Tuna Uysal, Study of antibacterial properties of *Coriandrum sativum* seeds extracted through maceration and digestion methods against five pathogenic bacteria in vitro, The Fourth International Symposium on Medicinal and Aromatic plants (MESMAP-4), April 18th - 22th, 2018 / Antalya – Turkey.