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

Onopordum tauricum BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOAKTİF POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SENA MENCÜTEKİN ÜNEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU

OCAK - 2026
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Sena MENCÜTEKİN ÜNEL tarafından hazırlanan "***Onopordum tauricum* BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOAKTİF POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **20.01.2026** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Abdulhamit BATTAL Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKCİ Kastamonu Üniversitesi	.....

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

Enstitü Müdürü Prof. Dr. Selahattin KAYMAKCI .....

TAAHHÜTNAME

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

Sena MENCÜTEKİN ÜNEL

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Onopordum tauricum BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOAKTİF POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SENA MENCÜTEKİN ÜNEL

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN:PROF. DR. MEHMET CENGİ BALOĞLU

Bu tez çalışmasında, halk hekimliğinde karaciğer ve böbrek hastalıkları ile yara iyileşmesinde kullanımı bildirilen ancak antikanser ve antimikrobiyal özellikleri bakımından yeterince araştırılmamış bir Asteraceae üyesi olan *Onopordum tauricum*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktların biyoaktif potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışmanın amacı, etil asetat (EA), etanol (EtOH), etanol-su (EtOH/H_2O) ve su ekstraktlarının meme kanseri hücre hatları (üçlü negatif MDA-MB-231 ve ER/PR pozitif MCF-7) üzerindeki antikanser etkilerini ve seçilmiş patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal/antibiyofilm aktivitelerini *in vitro* koşullarda ortaya koymaktır.

Antikanser etkinlik, 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon (MİK/MBK) yöntemleriyle, toplam sekiz referans suş (Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans*) üzerinde test edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşunda biyofilm oluşumu ve eradikasyonu kristal viyole temelli mikroplaka yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, her iki hücre hattında da en güçlü sitotoksik etkinin EA ekstraktında yoğunlaştığını göstermiştir (MDA-MB-231 için $IC_{50} \approx 99{,}4$ µg/mL; MCF-7 için $IC_{50} \approx 155{,}9$ µg/mL). EtOH ekstraktı orta düzeyde, EtOH/H_2O ekstraktı ise daha zayıf sitotoksisite sergilerken, su ekstraktı için $IC_{50} > 1000$ µg/mL bulunmuştur. Test edilen konsantrasyon aralığında ekstraktlar, test mikroorganizmaları üzerinde anlamlı inhibisyon zonu oluşturmamış ve MİK/MBK değeri saptanamamıştır. Buna karşın, EtOH (1000 µg/mL), EA (1000 µg/mL) ve EtOH/H_2O (1000 µg/mL) ve ekstraktları *S. aureus* biyofilm oluşumunu sırasıyla yaklaşık %68; %53,8 ve %37,9 oranında baskılamıştır. Su ekstraktı düşük konsantrasyonda sınırlı biyofilm eradikasyonu sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda biyofilm formasyonunu artırmıştır.

Elde edilen bulgular, *O. tauricum*'un özellikle EA ekstraktında antikanser açıdan umut verici bir doğal ürün kaynağı olabileceğini; antimikrobiyal açıdan ise klasik bakterisidal/bakteriyostatik etkiden ziyade *S. aureus* biyofilm dinamiklerini modüle eden bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır. Türün terapötik potansiyelinin aydınlatılabilmesi için, EA ekstraktındaki biyoaktif bileşiklerin ayrıntılı fitokimyasal karakterizasyonu, mekanistik çalışmalar ve uygun *in vivo* modellerde etkinlik/toksisite analizlerinin yapılması gelecek dönem çalışmalarında planlanmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER:*Onopordum tauricum,* Antikanser aktivite, Antimikrobiyal Aktivite, Antibiyofilm aktivite, Biyolojik aktivite.

Ocak 2026, 72 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

EVALUATION OF *Onopordum tauricum* PLANT EXTRACTS' BIOACTIVE POTENTIAL

SENA MENCÜTEKİN ÜNEL

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERIN
SUPERVISOR:PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU

In this thesis, the bioactive potential of aerial parts of *Onopordum tauricum*, a member of Asteraceae traditionally used for liver, kidney and wound-related ailments but poorly characterized in terms of anticancer and antimicrobial properties, was investigated. The aim of this thesis was to evaluate the anticancer effects of ethyl acetate (EA), ethanol (EtOH), ethanol–water (EtOH/H_2O) and aqueous extracts on breast cancer cell lines (triple-negative MDA-MB-231 and ER/PR-positive MCF-7), as well as their antimicrobial and antibiofilm activities against selected pathogenic microorganisms under *in vitro* conditions.

Anticancer activity was assessed by the MTT assay after 48 h of exposure. Antimicrobial effects were evaluated by agar well diffusion and broth microdilution (MIC/MBC) methods against eight referance strains including Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida albicans*. Biofilm formation and eradication of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were quantified using a crystal violet-based microplate assay.

The results demonstrated that the most pronounced cytotoxicity in both cell lines was obtained with the EA extract ($IC_{50} \approx 99.4$ µg/mL for MDA-MB-231 and 155.9 µg/mL for MCF-7). The EtOH extract showed moderate, whereas the EtOH/H_2O extract showed weaker cytotoxicity; the aqueous extract remained largely inactive ($IC_{50} > 1000$ µg/mL). Within the tested concentration range, none of the extracts produced significant inhibition zones nor measurable MIC/MBC values against test microorganisms. In contrast, EtOH (1000 µg/mL), EA (1000 µg/mL) and EtOH/H_2O (1000 µg/mL) inhibited S. aureus biofilm formation by approximately %68, %53,8 and %37,9, respectively. The aqueous extract induced modest biofilm eradication at low concentration but enhanced biofilm biomass at higher levels.

Collectively, these findings indicate that *O. tauricum*, particularly its EA fraction, represents a promising natural source of anticancer agents, while displaying a biofilm-modulating rather than a classical bactericidal/bacteriostatic profile against *S. Aureus*. In order to elucidate the therapeutic potential of the species, detailed phytochemical characterization of the bioactive compounds present in the EA fraction, mechanistic studies, and efficacy/toxicity evaluations using appropriate in vivo models are planned for subsequent research.

KEYWORDS:*Onopordum tauricum*, Anticancer activity, Antimicrobial activity, Antibiofilm activity, Biologic activity.

January 2026, 72 Page

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi birikimi, yönlendirmeleri ve yapıcı eleştirileriyle bana rehberlik eden, her aşamada desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Cengiz Baloğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecimde bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan; desteğini ve yardımlarını her zaman hissettiren Prof. Dr. Yasemin Çelik Altunoğlu, Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat Tüfekçi, Dr. Öğr. Üyesi Ferhat Ulu ve Arş. Gör. Mustafa Öçal'a teşekkür ederim. Ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, bilimsel ve manevi destekleriyle bu süreci daha verimli kılan Plantomics Lab ekibine içtenlikle minnettarım.

Her zaman ve yüksek lisans eğitimim boyunca da, özellikle bu zorlu ve yoğun süreçte yanımda olan; desteği, anlayışı ve sevgisiyle bana güç veren canım eşim Öğr. Gör. Dr. Necdet Mehmet Ünel'e sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans sürecinde hamile olduğum ve henüz bir yaşındayken bile bana ilham kaynağı olan, hayatıma anlam katan canım kızım Umay Ada Ünel, bu çalışmanın en büyük motivasyonlarından biri olmuştur.

Dostluğu ve desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili İrem Yezer'e ve bugünlere gelmemde emeği olan, her koşulda bana inanan ve destekleyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK-TAGEM 1003 TOVAG (222O313) projesi kapsamında sağlanan burs desteği ve Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (KÜBAP-01/2023-17) tarafından sağlanan araştırma bütçesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı ilgili kurumlara teşekkür ederim.

Tez çalışmasının ortaya çıkmasında emeği geçen herkese bir kez daha teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

SENA MENCÜTEKİN ÜNEL

Kastamonu, 2026

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ... **ii**
TAAHHÜTNAME ... **iii**
ÖZET ... **iv**
ABSTRACT ... **v**
TEŞEKKÜR ... **vi**
İÇİNDEKİLER ... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ... **ix**
TABLOLAR DİZİNİ ... **x**
GRAFİKLER DİZİNİ ... **xi**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ... **xii**
1. GİRİŞ ... **1**
1.1 Asteraceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler ... 2
1.1.1 *Onopordum* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler ... 4
1.1.2 *Onopordum tauricum* Türü Hakkında Genel Bilgiler ... 4
1.2 Kanser ... 7
1.2.1 Meme Kanseri ... 8
1.2.1.1 MDA-MB-231 hücre hattı ... 10
1.2.1.2 MCF-7 hücre hattı ... 11
1.3 Antimikrobiyal Aktivite ... 12
1.4 Biyofilm Oluşum Mekanizması ... 14
1.4.1 *Staphylococcus aureus* Biyofilm Oluşumu ... 15
1.5 Çalışmanın Amacı ... 16
2. LİTERATÜR ÖZETİ ... **18**
2.1 *Onopordum* Cinsine Ait Kanser Çalışmaları ... 18
2.2 *Onopordum* Cinsine Ait Antimikrobiyal Çalışmaları ... 19
3. MATERYAL VE METOT ... **22**
3.1 Materyal ... 22
3.1.1 Kullanılan Bitki Örnekleri ... 22
3.1.2 Kullanılan Hücre Hatları ... 22
3.1.3 Kullanılan Mikroorganizma Suşları ... 22
3.1.4 Analizlerde Kullanılan Kimyasal Reaktifler, Cihazlar ve Sarf Malzemeleri ... 23
3.2 Metot ... 24
3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Elde Edilişi ... 24
3.2.2 Bitki Ekstraktlarının Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması ... 25
3.2.3 Hücre Kültürü ... 25
3.2.3.1 Hücre kültürünün devamlılığı ... 25
3.2.3.1.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması ... 25
3.2.3.1.2 Hücrelerin açılması ... 26
3.2.3.1.3 Hücrelerin pasajlanması ... 26
3.2.3.1.4 Hücrelerin sayımı ... 27
3.2.3.2 Ekstraktların hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi - hücre canlılık testi (MTT) ... 27
3.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Testleri ... 29

3.2.4.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması 29
3.2.4.2 Agar kuyucuk difüzyon testi 29
3.2.4.3 Sıvı mikrodilüsyon testi (MİK tespiti) 30
3.2.5 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyi 31
3.2.5.1 Biyofilm inhibisyon deneyi 31
3.2.5.2 Biyofilm eradikasyon deneyi 32
3.2.6 İstatistiksel Analizler 33
4. BULGULAR 34
4.1 Antikanser Aktivite Bulguları 34
4.1.1 MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerinde Bitki Ekstraktlarının Antikanser Aktivitesine Ait Bulgular 34
4.1.2 MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Bitki Ekstraktlarının Antikanser Aktivitesine Ait Bulgular 39
4.2 Antimikrobiyal Aktivite Bulguları 44
4.2.1 Agar Kuyucuk Difüzyon Test 44
4.2.2 Sıvı Mikrodilüsyon Testi 45
4.3 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyleri Bulguları 46
4.3.1 Biyofilm İnhibisyon Deneyi Bulguları 46
4.3.2 Biyofilm Eradikasyon Deneyi Bulguları 47
5. TARTIŞMA 48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR 63
ÖZGEÇMİŞ 72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 *Onopordum tauricum* bitkisi 5
Şekil 1.2 Kültürdeki MDA-MB-231 hücreleri 10
Şekil 1.3 Kültürdeki MCF-7 hücreleri 11
Şekil 1.4 Biyofilm oluşum aşamaları 14
Şekil 4.1 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri 35
Şekil 4.2 Etanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri 36
Şekil 4.3 Etanol-su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri 37
Şekil 4.4 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri 38
Şekil 4.5 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri 40
Şekil 4.6 Etanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri 41
Şekil 4.7 Etanol-su ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri 42
Şekil 4.8 Su ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri 43
Şekil 4.9 Agar kuyucuk diffüzyon test sonuçları (A: *Enterococcus faecalis*, B: *Staphylococcus aureus*, C: *Salmonella Typhimurium*, D: *Pseudomonas aeruginosa*) 45

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 Çalışmada incelenen mikroorganizma suşları 23
Tablo 3.2 Analizlerde kullanılan kimyasal reaktifler..... 23
Tablo 3.3 Analizlerde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler..... 24
Tablo 4.1 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, hücre canlılık oranı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir..... 38
Tablo 4.2 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde, hücre canlılık oranı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. 44
Tablo 4.3 Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm). 45

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yüzde (%) canlılık oranları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. 39
Grafik 4.2 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde yüzde (%) canlılık oranları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. 43
Grafik 4.3 *O. tauricum* ekstaktlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon etkinliği. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir. * $p<0,05$ 46
Grafik 4.4 *O. tauricum* ekstaktlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm eredikasyon etkinliği. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir 47
Grafik 5.1 EA, EtOH, EtOH/H_2O ve H_2O ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki IC_{50} (µg/mL) değerleri. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin, kullanılan çözücü tipine ve hücre hattına bağlı olarak farklılık gösterdiği görülmektedir..... 48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

&	**:** Ve
%	**:** Yüzde
˚C	**:** Santigrad Derece
~	**:** Yaklaşık
cm	**:** Santimetre
mg	**:** Miligram
mL	**:** Mililitre
mm	**:** Milimetre
µg	**:** Mikrogram

Kısaltmalar

AHL	**:** N- açil homoserin lakton
AMR	**:** Antimikrobiyal direnç
CO_2	**:** Karbondioksit
dH2O	**:** Distile su
DMEM	**:** Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	**:** Deoksiribonükleik asit
DSÖ	**:** Dünya Sağlık Örgütü
EA	**:** Etil Asetat
ER	**:** Östrojen Reseptörü
EtOH	**:** Etanol
FBS	**:** Fetal bovin serum
HER2	**:** İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IARC	**:** Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC_{50}	**:** Yarı maksimum inhibitor konsantrasyonu
Kob	**:** Koloni oluşturan birim
MeOH	**:** Metanol
MİK	**:** Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MTT	**:** Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NEAA	**:** Esansiyal Olmayan Amino Asit
PBS	**:** Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PR	**:** Progesteron Reseptörü
TNBC	**:** Üçlü negatif meme kanseri

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı insanlık tarihinin en eski uygulamalarından biridir. Bitkiler, doğal ilaçların geliştirilmesi, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde temel bir kaynak olarak eski zamanlardan beri kullanılmıştır. Arkeolojik bulgular ve yazılı belgeler, bitkisel tedavilerin Mezopotamya, Antik Mısır, Çin ve Hint uygarlıkları gibi kadim kültürlerde binlerce yıl öncesine dayandığını göstermektedir. Örneğin, M.Ö. 3000'lerde Sümer tabletlerinde ve M.Ö. 1550 yılına ait Ebers Papirüsü'nde çeşitli bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanıldığı belgelenmiştir (Janick, 2003). Bu kadim bilgiler, halk hekimliği geleneği aracılığıyla kuşaktan kuşağa aktarılarak günümüze kadar ulaşmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin temel sağlık ihtiyaçları için geleneksel bitkisel ilaçlara başvurduğunu belirtmektedir. Nitekim gelişmiş ülkelerde alternatif tıp, etkinliği, güvenliği ve daha az yan etkisi nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir (Bhardwaj vd., 2018). Bu nedenle fitoterapötik ürünlerin standardizasyonu, toksikolojik profilleri ve ilaç etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalar, bu alandaki klinik uygulamaların güvenliği açısından kritik öneme sahiptir. Bitkisel tedavilerin bilimsel temellere oturtulması, multidisipliner bir yaklaşımla mümkün olup, modern biyoteknoloji ve moleküler biyoloji farklı yöntemleriyle bitkisel bileşiklerin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Bitkisel ürünlerin sağlıkta kullanımı yalnızca geleneksel bilgiye değil, aynı zamanda güncel bilimsel verilerle desteklenmiş kanıta dayalı yaklaşımlara dayanmalıdır.

Geleneksel tıpta bitkiler; yara iyileştirme, enfeksiyon tedavisi, ağrı kesici ve anti-enflamatuar amaçlarla yaygın bir şekilde kullanılmış, bu uygulamalar modern farmasötik bilimin gelişimine zemin hazırlamıştır (Petrovska, 2012; Rates, 2001). Günümüzde ilaç endüstrisinde kullanılan etken maddelerin yaklaşık %25'inin doğrudan bitki kökenli olduğu veya bitkisel bileşiklerin modifikasyonu ile geliştirildiği bildirilmektedir (Newman ve Cragg, 2020). Ayrıca farmakognozi ve fitoterapi alanlarında yapılan bilimsel çalışmalar, bitkilerin içerdiği biyoaktif bileşenlerin sağlık üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı şekilde ortaya koymaktadır.

Flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar; antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antiproliferatif etkileriyle dikkat çekmektedir (Atanasov vd., 2015; Pan vd., 2013).

Bitkiler; farmasötik, tarım kimyasalları, tatlar, kokular, renkler, biyopestisitler ve gıda katkı maddeleri gibi önemli bileşiklerin kaynakları olan ikincil metabolitleri üretirler. Son incelemeler, tıbbi bitkilerin merkezi sinir, kardiyovasküler, antioksidan, endokrin ve üreme, mide-bağırsak, solunum, antidiyabetik, antimikrobiyal, antiparaziter, dermatolojik, antikanser, antienflamatuar, antipiretik, antiviral, analjezik, immünolojik ve diğer birçok farmakolojik etki dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Al-Snafi, 2020).

Bitkiler, sahip oldukları sekonder metabolitler aracılığıyla çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlamaktadır. Bu metabolitler, bitkilerin temel yaşam süreçleri için doğrudan gerekli olmamakla birlikte, savunma mekanizmalarında, çevresel adaptasyonda ve simbiyotik ilişkilerin kurulmasında önemli roller üstlenir (Pichersky ve Gershenzon, 2002). Alkaloidler, flavonoidler, fenolik asitler, terpenoidler ve saponinler gibi sekonder metabolitler; antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, antikanser ve immünmodülatör aktiviteleri sayesinde hem geleneksel hem de modern farmasötik araştırmaların ilgi odağı haline gelmiştir (Wink, 2015). Bu bileşiklerin biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılması, yeni ilaç adaylarının geliştirilmesi için stratejik bir araştırma alanı oluşturmaktadır.

Bu bağlamda, geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanım geçmişine sahip, ancak bilimsel olarak henüz yeterince çalışılmamış bitki türlerinin fitokimyasal içeriklerinin ve biyoaktif potansiyellerinin araştırılması büyük önem arz etmektedir. Doğal ürünler üzerinden geliştirilecek yeni farmasötik ajanlar, mevcut tedavi yaklaşımlarına alternatif oluşturabilecek veya bu yaklaşımları destekleyebilecek niteliktedir (Atanasov vd., 2021).

1.1 Asteraceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Asteraceae, dünya çapında en büyük ve en çeşitli bitki familyalarından biri olarak kabul edilmektedir. Yaklaşık 1.700 cins ve 25.000'den fazla türü içeren bu familya,

hem tür zenginliği hem de geniş ekolojik adaptasyon kapasitesi ile dikkat çekmektedir. Asteraceae familyası kozmopolit bir dağılım sergileyerek tropikal bölgelerden kutup bölgelerine kadar geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir (Michel vd., 2020).

Ekonomik ve tıbbi açıdan Asteraceae familyası büyük öneme sahiptir. Bazı üyeleri 3000 yıldan uzun süredir diyet ve tıbbi amaçlar için yetiştirilmektedir. Örneğin, Carduus türleri geleneksel tıpta antihemorroidal ve kardiyotonik ilaçlar olarak ve *Onopordum tauricum* karaciğer hastalığı için sıklıkla kullanılmıştır. *Onopordum acanthium*' un çiçekleri ve kökleri ateş düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılmıştır ve *Centaurea solstitalis* Türkiye'de halk tıbbında mide sorunları, karın ağrısı, uçuk enfeksiyonları ve soğuk algınlığı tedavisinde kullanılmaktadır (Koc vd., 2015; Ugur vd., 2011).

En bilinen türlerinden bazıları marul, hindiba, enginar, papatya ve karahindibadır. Geniş çeşitliliklerine rağmen, çoğu aile üyesi benzer bir kimyasal bileşime sahiptir: örneğin, tüm türler güçlü prebiyotik özelliklere sahip doğal bir polisakkarit olan inülini içerir. Ayrıca güçlü antioksidan, antienflamatuar ve antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra diüretik ve yara iyileştirici özellikler de gösterirler. Farmakolojik etkileri polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, asetilenler ve triterpenler dahil olmak üzere bir dizi fitokimyasal bileşenin etkisiyle oluşur (Rolnik ve Olas, 2021).

Asteraceae türleri, uçucu yağlar, lignanlar, saponinler, polifenolik bileşikler, fenolik asitler, steroller ve polisakkaritler dahil olmak üzere fitokimyasal bileşenlerine atfedilen çeşitli farmakolojik aktiviteler göstermektedir. Şikorik asit, kaempferol ve türevleri, luteolin ve türevleri, kuersetin ve apigenin ve türevleri dahil olmak üzere çok çeşitli fenolik bileşikler bulunur. Örneğin hindiba kökü kafeik asit, klorojenik asit ve izovanilik asit gibi birçok asidin kaynağıdır. Ayrıca, ailenin önemli bir üyesi olan Taraxacum spp. bitkisinde taraxacin, taraxacin asit, fardiol, arnidiol, taraxasterol, α-amiryn ve β-amiryn gibi bir dizi triterpen tespit edilmiştir. Birçok bitki aynı zamanda malik asit, fumarik asit, sitrik asit ve askorbik asit kaynağıdır. Ayrıca, Asteraceae familyası bitkileri zengin klorejenik asit kaynaklarıdır. Klorejenik asitlerin antiviral, antioksidan, antimutajenik ve antienflamatuar aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Hu, 2018).

Asteraceae familyasındaki en önemli bileşik gruplarından biri seskiterpen laktonlardır. Bunlar, terpenoidler grubundaki tüm seskiterpenlerin yarısını temsil eden terpenoidlerdir. Seskiterpen laktonlar acı tatları nedeniyle iştahı ve sindirimi teşvik eder. Hindiba kökleri laktusin, 8-deoksilaktusin, 13-dihidro-8-deoksilaktusin, laktusopikrin, 13-dihidrolaktusopikrin, jakuinelin, krepidiasid B, laktusid A gibi zengin bir seskiterpen lakton kaynağıdır (Perović vd., 2021). *Artemisia absinthium*, genellikle pelin otu olarak bilinen çok yıllık bir bitkidir. Kokusu nedeniyle genellikle zararlılara karşı biyolojik spreylere eklenir; ancak aynı zamanda diüretik, sindirim, balzamik ve depüratif etkiler de dahil olmak üzere bir dizi sağlık özelliği gösterir. Lösemi tedavisinde takviye olarak da önerilmektedir. *Erigeron canadensis* antiplatelet ve antikoagülan aktivite gösterir. Asteraceae familyasından çeşitli bitkiler in vitro antimikrobiyal aktivite göstermektedir. *Ageratum conyzoides* ve *Tagetes erecta* 'dan elde edilen etanol ekstraktının geniş bir gram-pozitif ve gram-negatif bakteri spektrumuna karşı antimikrobiyal özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur (Trinh vd., 2020).

1.1.1 *Onopordum* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

Onopordum L. cinsi, Asteraceae familyasına ait yaklaşık 50 tür içerir. Dallı, dikenli kanatlı gövdeleri olan ve 3 metreye kadar büyüyen iki yıllık bitkilerdir. İlk sezonda yapraklar ve birkaç çiçek kapitulası oluştururlar. İkinci sezonda son boylarına ulaşırlar, yoğun bir şekilde çiçek açarlar ve sonra ölürler (Bruno vd., 2011).

Onopordum cinsinin temsilcileri Avrupa (özellikle Akdeniz bölgesi), Kuzey Afrika, Kanarya Adası, Kafkasya, Güneybatı ve Orta Asya ve Irak'a özgüdür ve buralarda boş alan ve açık, kumlu veya taşlı habitatlarda yetişir. Onopordum cinsi türlerinden izole edilen metabolitler seskiterpenoidler, flavonoidler, asetilenik bileşikler, steroidler, triterpenler, lipidler ve nitrojen içeren bileşikleri içerir (Bruno vd., 2011).

1.1.2 *Onopordum tauricum* Türü Hakkında Genel Bilgiler

Onopordum tauricum, iki metreye kadar uzayabilen yüksek dikenli gövdesi, üçgen loblu yaprakları ve pembe-mor tüp çiçeklere sahip yarım küre biçimli (çapı 4-6 cm)

çiçek salkımına sahip yabani, iki yıllık veya yıllık bir bitkidir (Foligni vd., 2022) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 *Onopordum tauricum* bitkisi

Bu tür, sinantropik habitatlarda, evcil hayvanların, özellikle de koyunların olduğu alanlarda görülür. Genellikle ahırların yakınında, meralarda, ekili ve terk edilmiş tarlalarda bulunur. Nitrofil bir türdür, bu nedenle nitrat ve organik madde bakımından zengin toprakları tercih eder (Casavecchia vd., 2024).

Onopordum tauricum'un Türkiye'de geleneksel olarak tıbbi kullanımına dair çalışmalar mevcuttur. Meyvelerinin kaynatılarak tüketiminin, karaciğerden safra akışını uyardığı, kalp hastalıkları ve sıtmada kullanıldığı; ayrıca köklerinin kaynatılarak tüketiminin böbrek taşlarını düşürmeye yardımcı olduğu ve yaraları tedavi ettiği bildirilmiştir. Ancak bu türün kimyasal ve nutrasötik özellikleri hakkında çok az veri mevcuttur (Bağcı vd., 2016; Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010; Senkardes vd., 2022).

Onopordum tauricum yapraklarının kloroform ekstraktından, biri yeni bir elamanolid ve dördü yeni eudesmanolid olmak üzere toplam on adet seskiterpen lakton izole edilmiştir. Yeni bileşiklerin yapıları, kimyasal dönüşümler ve modern spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır. Kloroform ekstraktında bulunan bilinen germakranolidler, yayımlanmış spektral ve fiziksel verilerle karşılaştırılarak onopordopikrin, arktiopikrin ve 4'-dezoksoarktiopikrin olarak tanımlanmıştır (Miski

vd., 1988). Bu çalışmada ayrıca, literatürde daha önce raporlanmamış olan arktiopikrin, onun diasetat türevi ve 4'-dezoksoarktiopikrin için ^{1}H NMR ve diğer spektral verilere yer verilmiştir. Onopordopikrin**,** antitümör etkili bir lakton olarak bilinmektedir ve şimdiye kadar incelenmiş olan *Onopordum* cinsine ait tüm türlerin (alt kabile: *Carduinae*, kabile: *Cynareae*) başlıca bileşenidir (Miski vd., 1988).

Fitokimyasal çalışmalarda, *O. tauricum* wild. çiçek başları prebiyotikler ve toplam fenolik bileşikler açısından zengin bir kaynak olarak değerlendirilmiştir. Çiçek başlarından elde edilen etanol ve su ekstraktlarında prebiyotiklerin (fruktanlar, inülin) ve yüksek antioksidan aktivitenin varlığını ortaya koymuştur (Petkova ve Mihaylova, 2016).

Bruno vd. (2011), *O. tauricum* ekstraktlarında elamanolidler, eudesmanolidler ve germakrenler dahil olmak üzere farklı seskiterpen laktonlar, flavonoidler (apigenin, asasetin, luteolin, hispidulin, nepetin, apigenin 7-O-glukozit, luteolin-7-glukozit) ve sinnamik asit türevlerinin (kafeik asit, klorojenik asit) varlığını bildirmişlerdir (Bruno vd., 2011).

Onopordum tauricum toprak üstü kısımlarının mikrodalga parçalama tekniği ile hazırlanması sonrasında indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) ile makro (Na, Mg ve Ca) ve eser elementleri (Li, Fe, Zn, Mn, Se, Al, V, Cr, Ni, Cu, Pb, As, Co, Cd ve Hg) analiz etmiştir. Son olarak, gaz kromatografisi analizi, linoleik asidin *O. tauricum* tohum yağının en bol bileşeni olduğunu göstermiştir (Targan vd., 2018).

Literatürde *O. tauricum* yaygın olarak, hayvansal kaynaklı maya yerine yerel peynir üretiminde kullanılmak üzere bitkisel maya elde etmeyi amaçlayan çalışmalara konu olmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, *O. tauricum* ekstraktlarının farklı enzimatik özelliklere, farklı substrat spesifikliklerine ve yapısal özelliklere sahip çeşitli proteazlar içerdiğini göstermiştir. Süt pıhtılaştırıcı olarak kullanılan enzimlerin çoğu, asidik pH değerlerinde daha aktif olan aspartik proteazlardır (Ben Amira vd., 2017). Bunların dışında, *O. Tauricum* ekstraktlarının antibakteriyel, antikanser ve antioksidan kapasiteleri ile ilgili çalışmalara güncel literatürde rastlanmamıştır.

1.2 Kanser

Kanser, anormal hücre grubunun hücre bölünmesinin normal kurallarını hiçe sayarak kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü bir hastalık olarak tanımlanabilir. Normal hücreler, hücrenin bölünüp bölünmemesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerektiğini belirten sinyallere sürekli olarak maruz kalır. Kanser hücreleri bu sinyallerden bir miktar özerklik geliştirir ve bu da kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya neden olur. Bu çoğalmanın devam etmesine ve yayılmasına izin verilirse ölümcül olabilir. Aslında, kanserle ilişkili ölümlerin neredeyse %90'ı tümör yayılmasından kaynaklanır ve bu sürece metastaz adı verilir. Modern kanser biyolojisinin temeli basit bir ilkeye dayanır - hemen hemen tüm memeli hücreleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü kontrol eden benzer moleküler mekanizmaları paylaşır. Kanser oluşumu ve tedavisine yönelik çalışmaların temelini oluşturan hakim teori, normal hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve hücresel düzeyde bu mekanizmadaki değişiklikler sonucunda kansere dönüştüğü ve her hücrede bu değişikliklerin meydana gelebileceği sınırlı sayıda yol olduğudur. Son 50 yılda kanser araştırmalarında kaydedilen olağanüstü gelişmeler, kanser hücrelerinin bu özerkliği nasıl geliştirdiğine dair bir iç görü kazandırmıştır. Artık kanseri, hücre genomunda değişiklikler veya mutasyonlar içeren bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler (DNA mutasyonları), hücre bölünmesi ve durağan faz arasındaki hassas hücresel dengeyi bozan proteinler üretir ve bunun sonucunda hücreler bölünmeye devam ederek kanserli dokuyu oluşturur (Hejmadi, 2014).

Kanser dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Küresel demografik özellikler önümüzdeki on yıllarda kanser insidansının artacağını ve 2025 yılına kadar yılda 20 milyondan fazla yeni kanser vakasının ortaya çıkacağını öngörmektedir (Zugazagoitia vd., 2016). Kadınlarda meme, kolorektal, prostat ve akciğer kanserleri Avrupa'da en sık teşhis edilen kanser türleridir. Akciğer kanseri, dünya genelinde kanser insidansı ve mortalitesinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Zugazagoitia vd., 2016).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (IARC) göre insan T-hücreli lenfotrofik virüs, insan immün yetmezlik virüsü, hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, insan

papilloma virüsü, Epstein-Barr virüsü ve insan herpes virüsü 8 için insanlarda kanserojen olduğuna dair yeterli kanıtlar bulunmaktadır. IARC tarafından kanserin diğer birçok nedeni olarak da güneş ışığı, tütün, ilaçlar, hormonlar, alkol, parazitler, mantarlar, bakteriler, tuzlanmış balık, odun tozu ve otlar gösterilmektedir. Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü, beta karoten, kırmızı et, işlenmiş etler, düşük lifli diyetler, emzirmeme, obezite ve hareketsiz yaşam tarzlarını içeren ek kanser nedenleri belirtilmiştir (Blackadar, 2016).

Kanser tedavisi, yalnızca tedavilerin etkisizliği ve yan etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda birçok vakada tam remisyon ve iyileşmenin gerçekleşmemesi nedeniyle de tarih boyunca inişler ve çıkışlarla karakterize edilmiştir. Kanser tedavisine yönelik tarihsel yaklaşım, lokalize tümör mikro çevresindeki tüm hücreleri hedef alan radyasyon tedavisine veya hızla büyüyen ve bölünen hücreleri hedef alan kemoterapiye dayanmaktadır. Bu geleneksel yöntemlerin her ikisi de, tedavi sırasında yok edilen çok sayıda kanserli olmayan hücre olduğu için, tedavi sırasında yalnızca kanser hücrelerini hedef alma potansiyelleri düşüktür. Son yıllarda immünoterapi önemli bir tedavi alternatifi haline gelmiştir ve artık birçok vakada ilk tercihtir. Nanoteknoloji yakın zamanda popülerliğini arttırmış ve nanoyapılar kontrollü ilaç salınımı, hücre görüntüleme hipertermi uygulaması gibi yeni terapötik alternatifler sunmaktadır. Bu tedaviler tek başına veya diğer bileşenlerle (antikorlar, peptitler, folik asit vb.) birlikte uygulanabilir. Ayrıca gen terapisi de tedavi için umut verici yeni yöntemler sunmaktadır (Arruebo vd., 2011).

1.2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinden biri olup, 2015 yılında yaklaşık 570.000 ölümden sorumlu tutulmuştur. Her yıl dünya genelinde 1,5 milyondan fazla kadına (tüm kadın kanser vakalarının %25'ine) meme kanseri tanısı konulmaktadır (Stewart ve Kleihues, 2003). Meme kanseri metastatik bir kanserdir ve genellikle kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara yayılabilir, bu da esas olarak tedavi edilemezliğini açıklar. Hastalığın erken teşhisi yüksek bir sağ kalım oranına yol açabilir (Sun vd., 2017).

Meme kanserlerinin yüzde doksan beşi karsinomdur, yani meme epitel elemanlarından kaynaklanırlar. Meme kanserleri, *in situ* karsinomlar ve invaziv (veya infiltre) karsinomlar olmak üzere 2 ana tipe ayrılır. *In situ* karsinomlar duktal veya lobüler epitelde ortaya çıkabilir, ancak epitel sınırlarının ötesine uzanacak şekilde altta yatan bazal membrana invazyon olmaksızın orada sınırlı kalırlar. Böyle lokalize ve sınırlı bir maligniteden bekleneceği gibi, ihmal edilebilir bir metastaz potansiyeli vardır. Duktal veya lobüler malignite epitel sınırını oluşturan bazal membranın ötesine uzandığında, malignite invaziv (veya infiltre) duktal veya lobüler karsinom olarak kabul edilir ve invaziv hastalıkta metastaz ve nihayetinde ölüm potansiyeli ortaya çıkar (Richie ve Swanson, 2003).

Aile öyküsünün meme kanseri için bir risk faktörü olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Hem anne hem de baba tarafından akrabalar önemlidir. Etkilenen akraba genç yaşta meme kanseri geliştirmişse, her iki memede de kanser varsa veya yakın bir akrabaysa risk en yüksektir. Birinci derece akrabalar (anne, kız kardeş, kız) riski tahmin etmede en önemli olanlardır. *BRCA1* ve *BRCA2*, kalıtsal olarak alındığında meme kanseri riskini yaşam boyu belirgin bir şekilde artıran anormal genlerdir. *BRCA1* genine sahip olan kadınlar erken yaşta meme kanserine yakalanma eğilimindedir. Bir diğer etken olan hormonal seviyedeki değişimler meme kanserini tetikleyebilir. Adetlerin başlaması ve durması, erken yaşta gebelik, hormonal replasman tedavisi, oral hap kullanımı vb. yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin de meme kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. Hareketsiz yaşam tarzı, yüksek yağ alımı, özellikle menopoz sonrası kadınlarda obezite, meme kanserine neden olabilir. Alkol kullanımı da meme kanserinin bir diğer nedenidir. Uzun süre düşük dozda radyasyonla çalışan kadınlarda (örneğin röntgen teknisyenleri) hafif bir risk artışı olduğu bilinmektedir (Biglia vd., 2004; Brekelmans, 2003; Dumitrescu ve Cotarla, 2005; Grill vd., 2017).

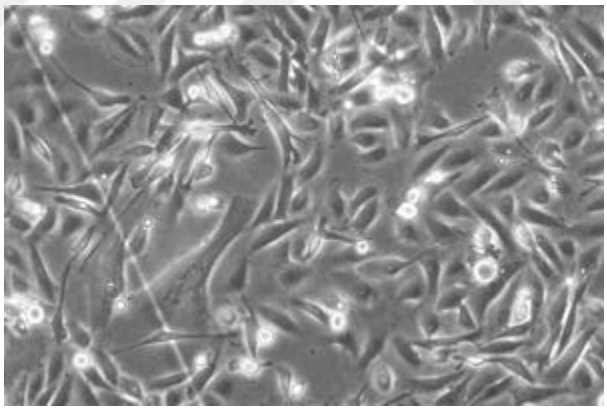
Progesteron reseptörü, östrojen reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 eksikliği ile karakterize üçlü negatif meme kanseri (TNBC), meme kanseri vakalarının yaklaşık %10-%20'sini oluşturmaktadır. Agresif progresyon, yüksek metastaz oranı ve kötü prognoz nedeniyle ciddi bir küresel sorun oluşturmaktadır (Liu vd., 2018). Günümüzde meme kanserinin tedavisi için cerrahi, radyasyon terapisi,

kemoterapi, hormonal terapi ve son zamanlarda nanoteknoloji ve gen terapisi gibi pek çok yaklaşım bulunmaktadır. Tarama, teşhis ve tedavideki ilerlemeler sayesinde meme kanserinden ölüm oranı azalmıştır. Meme kanseri teşhisi konan kadınların yaklaşık %90'ı en az beş yıl hayatta kalmaktadır. Daha etkili tarama ve tedavi programları geliştirmek için araştırmalar devam etmektedir (Sharma vd., 2010).

1.2.1.1 MDA-MB-231 hücre hattı

MDA-MB-231, metastatik meme adenokarsinomu olan 51 yaşındaki Kafkasyalı bir kadının plevral efüzyonundan elde edilen epitelyal, insan meme kanseri hücre hattıdır. İnvazivliği, oldukça agresif büyümesi ve üçlü negatif özellikleri ile karakterizedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER) amplifikasyonunun yanı sıra östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonundan yoksundur (Bentke-Imiolek vd., 2024).

MDA-MB-231 hücre hattı epitel benzeri bir yapıdadır. Hücreler iğ şeklindedir (uzun ve ince). Kültürdeki bazı hücreler genellikle yuvarlak kalır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Kültürdeki MDA-MB-231 hücreleri

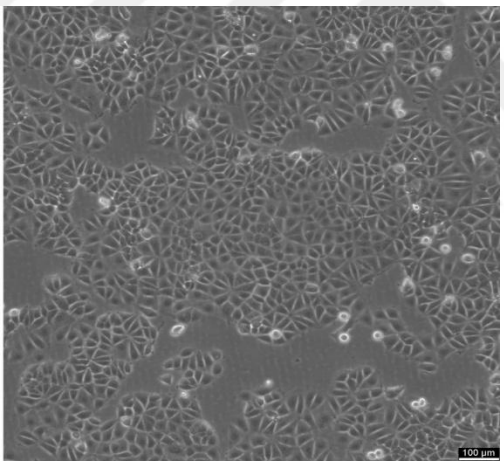
Bu hücre hattı östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve E-cadherin negatiftir ve mutasyona uğramış p53 eksprese eder. Bu hücrelerde büyüme faktörü reseptörü HER2 de bulunmadığından, üçlü negatif meme kanserinin iyi bir modelini temsil etmektedirler (Welsh, 2013). Üçlü negatif meme kanseri, sınırlı tedavi seçenekleri ve yüksek agresifliği ile öne çıkan bir meme kanseri alt tipidir. Bu nedenle, hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması, etkili yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu doğrultuda, MDA-MB-231 hücre

hattı kullanılarak, bu özel meme kanseri alt tipi için potansiyel olarak etkili ajanların araştırıldığı birçok çalışma yürütülmektedir (Chavez vd., 2011).

1.2.1.2 MCF-7 hücre hattı

1973 yılında Dr. Soule ve Michigan Kanser Vakfı'ndaki meslektaşları tarafından kurulan ve adını da buradan alan MCF-7 hücreleri, metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir (Soule vd., 1973).

Epitel benzeri görünüme sahip bu hücreler, kültür ortamında tek tabaka halinde büyürken, iyon ve sıvı taşınımı nedeniyle altlarında sıvı birikmesi sonucu kubbe şeklinde yapılar oluşturur. Bu özellik, hücrelerin epitel dokulara özgü taşıma fonksiyonlarını sürdürdüğünü gösterir (Sahana vd., 2023) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Kültürdeki MCF-7 hücreleri

MCF-7 hücre hattı, ER alfa üzerine yapılan çalışmalara önemli katkılarda bulunmuştur; çünkü bu hücre hattı, ER eksprese eden invaziv insan meme kanserlerinin çoğunu taklit eden, anlamlı düzeyde ER ekspresyonu gösteren az sayıdaki hücre hattından biridir (Lee vd., 2015).

MCF-7, birçok grup tarafından uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır. Antikanser ilaçlarla ilgili olanlar dahil olmak üzere dünya çapında meme kanseri araştırmaları için uygun bir hücre hattı modeli olduğunu kanıtlanmıştır. Zamanla MCF-7, hasta bakımı için diğer meme kanseri hücre hatlarından daha fazla pratik bilgi üretmiştir. ER-pozitif ve PR-pozitiftir ve luminal A

moleküler alt tipine aittir. MCF-7 az agresif ve noninvaziv bir hücre hattıdır, normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Comşa vd., 2015).

1.3 Antimikrobiyal Aktivite

Bir enfeksiyona tıbbi müdahale, öncelikle enfeksiyona neden olan patojeni aktif olarak inhibe eden veya öldüren maddeler kullanarak ortadan kaldırmaya yönelik girişimleri içerir. Antibiyotikler, kaynağına göre doğal, yarı sentetik (semi-sentetik) veya sentetik olarak sınıflandırılır. Doğal antibiyotikler mikroorganizmalardan elde edilip saflaştırılırken, yarı sentetik ve sentetik antibiyotikler kimyasal yöntemlerle üretilir. Bu maddelerin tümü genel olarak antimikrobiyal ajanlar olarak adlandırılır. Hedeflenen organizmaların türüne bağlı olarak, bu maddeler antibakteriyel, antifungal, antiparazitik veya antiviral ajanlar olarak da bilinir. Antimikrobiyal ajanlar bulaşıcı hastalıkların kontrolünde ve yönetiminde merkezi bir rol oynadığından, etki şekillerinin ve mikroorganizmaların antimikrobiyal aktiviteyi atlatmak için kullandıkları mekanizmaların bir miktar anlaşılması, özellikle de teşhis laboratuvarlarından bir patojenin antimikrobiyal aktiviteye tepkisini ölçen testler tasarlamaları ve uygulamaları açısından önemlidir (Abbott vd., 2012; Martinez ve Silley, 2010; Shaikh vd., 2015).

Antimikrobiyal etki, antibakteriyel ajan ile bakteri hücresi arasındaki doğrudan etkileşimlerle ilgilidir. Antibiyotik hücre yüzeyiyle temas ettiğinde, adsorpsiyon ilaç moleküllerinin hücre yüzeyiyle teması sürdürmesiyle sonuçlanır. Daha sonra, antibakteriyel ajanlar için çoğu hedef esasen hücre içi olduğundan, antibiyotiğin bakteri hücresi içine alınması gerekir. Antibiyotik yeterli hücre içi konsantrasyona ulaştığında, belirli bir hedefe bağlanma gerçekleşir. Bu bağlanma, antimikrobiyal ajan ile mikroorganizmanın hücresel metabolizmasında önemli rol oynayan bir veya daha fazla biyokimyasal bileşen arasındaki moleküler etkileşimleri içerir. Hedefin yeterli düzeyde bağlanması, bakteriyel hücre büyümesinin durmasına ve antimikrobiyal ajanın etki şekline bağlı olarak belki de hücre ölümüne yol açan belirli hücresel süreçlerin bozulmasına neden olur (Lee vd., 2014; Michl vd., 2020).

Seçici olarak en toksik antimikrobiyal ajanlar, ökaryotik hücrelerde bulunmayan mikrobiyal yapıları (örneğin hücre duvarındaki peptidoglikan yapı) ve metabolik yolları (örneğin folik asit biyosentezi) etkileyenlerdir. Aksine, DNA üzerinde etkili olan antimikrobiyal ajanların (nitrofuranlar, nitroimidazoller ve kinoksalinler) insanlarda veya hayvanlarda toksik etkilere neden olma olasılığı daha yüksektir. Bazı ajanlar hem prokaryotik hem de ökaryotik hücreler için toksiktir ve sadece cansız nesnelere (dezenfektanlar) veya canlı dokuların yüzeyine (antiseptikler) uygulanabilir (Guardabassi ve Courvalin, 2005).

Antimikrobiyal direnç (AMR), mikroorganizmalarda evrimsel süreçler sonucunda doğal olarak var olan bir özelliktir; ancak antimikrobiyal ajanların yanlış ve aşırı kullanımı, dirençli mikroorganizmaların seçilmesine ve yaygınlaşmasına neden olarak bu durumu kritik bir küresel sağlık sorunu hâline getirmiştir. AMR' nin tarihi penisilinin keşfine kadar uzanmaktadır ve çoklu ilaca dirençli patojenlerin artışı dünya çapında sağlık sistemlerine önemli zorluklar getirmektedir. AMR hem insanları hem de hayvanları etkilemekte ve dirençli patojen, enfeksiyonların tedavisinde zorluklara yol açmaktadır. Enzimatik modifikasyon ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli mekanizmalar, patojenlerin antimikrobiyal ajanların etkilerine dayanmalarını sağlar (Ahmed vd., 2024).

Küresel sağlık hizmetlerinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde etkili, erişilebilir ve uygun maliyetli yeni ilaçlara olan ihtiyaçtır. *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türlerinin yanı sıra, *Pseudomonas* cinsi ve Enterobacteriaceae ailesine ait bakteriler enfeksiyonlara ve yara kontaminasyonlarına yol açmakta, aynı zamanda klasik antibiyotiklere karşı artan direnç göstermektedir. Bu durum, alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Wasihun vd., 2023).

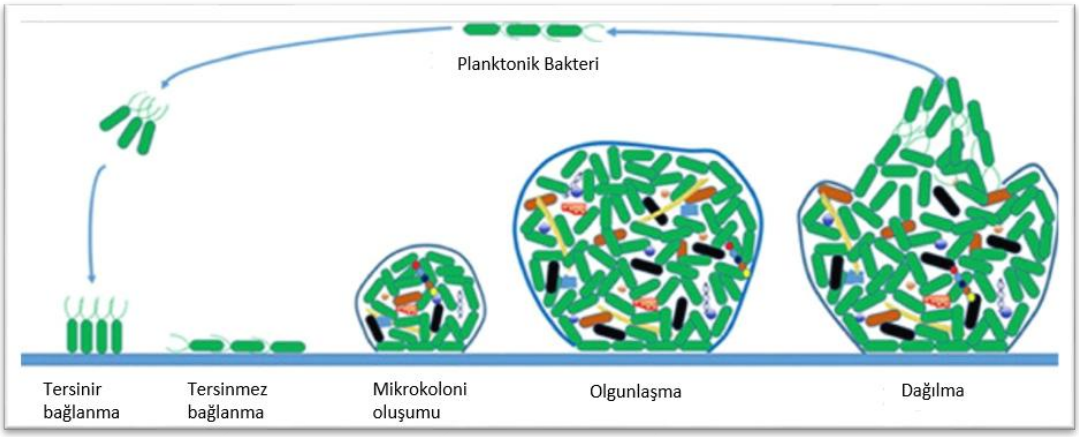
Geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan tıbbi bitkiler, günümüzde modern tedavilere tamamlayıcı ya da alternatif bir seçenek olarak giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bitkiler, sahip oldukları zengin yapısal ve biyolojik çeşitlilik sayesinde çok sayıda fitokimyasal bileşik üretirler. Bu fitokimyasalların çoğu, patojen mikroorganizmaların büyümesini engelleyici özellikler göstermektedir (Ingle vd.,

2017). Dolayısıyla, çeşitli bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin araştırılması güncelliğini ve bilimsel önemini hâlâ korumaktadır.

1.4 Biyofilm Oluşum Mekanizması

Mikroorganizmalar serbest halde veya biyofilm adı verilen farklı veya aynı türlerden oluşan bir konsorsiyum halinde yaşayabilir. Biyofilmler, ürettikleri hücre dışı polimerik madde (EPS) matrisi içinde yaşayan, canlı veya cansız yüzeylerde birbirlerine yapışmış, planktonik formlarına kıyasla büyüme hızı ve gen ekspresyonu açısından farklılıklar gösteren, düzenli ve organize bir mikroorganizma grubudur. Konakçı ile bir ilişki geliştirmek, zararlı dış koşullara karşı direnç göstermek, antibiyotikler ve diğer çevresel koşullarla başa çıkmak için mikroorganizmalar kendi etraflarında koruyucu bir örtü oluşturacak şekilde evrimleşmiştir (Gupta vd., 2016).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin serbest yüzen planktonik formdan biyofilm formuna geçişini içeren çok adımlı ve karmaşık bir süreçtir. Tüm oluşum süreci sıcaklık, pH, yerçekimi kuvvetleri, hidrodinamik kuvvetler, yüzeyin doğası, sinyal molekülleri vb. gibi dış koşullardan etkilenir. Şekil 1.4'de gösterildiği gibi, biyofilm oluşumunun farklı aşamaları dört ana aşamaya ayrılabilir.



Şekil 1.4 Biyofilm oluşum aşamaları (Rather vd., 2021)

Çok aşamalı biyofilm oluşumu, planktonik mikroorganizmaların yüzeylere bağlanmasıyla başlar ve bu da tersinir ve tersinmez bağlanma olarak ikiye ayrılır, ardından mikrokoloniler oluşturmak için mikrobiyal bölünme gerçekleşir. Mikrokoloniler belirli bir kompozisyon, şekil ve mimari ile karakterize edilen

olgunlaşmaya uğrar ve ardından döngüyü tekrarlamak için biyofilm dağılır. Olgun bir biyofilm, planktonik (yeşil kamçılı), sapsız (yeşil), kalıcı (kahverengi), ölü (siyah) hücrelerin, su kanallarının ve asil-homoserin laktonlar (AHL), lipidler, polisakkaritler, proteinler, hücre dışı DNA (eDNA) gibi farklı sinyal ve stabilizasyon moleküllerinin heterojen bir karışımıdır (Rather vd., 2021).

Biyofilm oluşumu stresle başa çıkmada rol oynayan, mikroorganizmaların koruyucu mekanizmasıdır. Mikroorganizmalar biyofilm içinde bulunduklarında strese dayanabildikleri için olumsuz koşullarda hayatta kalma süreleri uzayabilir. Bu durum planktonik hücreler için geçerli değildir çünkü bu tür koşullarda kolayca ölebilirler. Biyofilm oluşumu en sık, Gram-pozitif (*Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus viridanso*) ve Gram-negatif bakterilerde (*Escherichia coli, Proteus Mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*) bulunur (Rahmani Fard ve Zeighami, 2017; Rumbaugh ve Sauer, 2020).

Bitki ve hayvan kaynaklı biyoaktif bileşiklerin kullanımının Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin yanı sıra diğer biyofilm organizmalarına karşı etkili olduğu gösterilmiş olup, fiziksel ve kimyasal kontrol yöntemlerine kıyasla daha güvenli olduğu düşünülmektedir (Samrot vd., 2021).

1.4.1 *Staphylococcus aureus* Biyofilm Oluşumu

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) gram pozitif, fakültatif anaerob bir bakteridir ve hastane ortamlarında sık karşılaşılan bir patojendir. Konakçı dokulara ve kalıcı tıbbi cihaz yüzeylerine tutunarak burada kalıcılığını sürdürebilir. Bu özelliği, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomiyelit, endokardit, pnömoni ve bakteriyemi gibi çeşitli klinik tablolara yol açabilir. Ancak bu enfeksiyonların tedavisi, *S. aureus*'un biyofilm oluşturarak antibiyotiklere karşı direncini artırması nedeniyle oldukça güçtür (Lee vd., 2020).

Sonuç olarak bakteriler, hızla yerleşerek konak savunma mekanizmalarından korunabilir ve konak yüzeylerine tutunmayı artırarak kalıcı enfeksiyonların gelişimini destekleyebilir. Bu bağlamda biyofilm oluşumu, bakterilerin kendilerini korumaya yönelik ilk savunma hattı olarak öne çıkar. Biyofilm oluşturan bakterilerin büyük

çoğunluğu antibiyotiklere karşı tolerans ve azalmış duyarlılık göstermektedir. Mevcut klinik antibiyotiklerin çoğunun etkinliği, serbest (planktonik) halde bulunan mikrobiyal hücreleri hedef üzerinde değerlendirilmiştir. Bu durumda, antibiyotikler planktonik hücreleri baskılarken biyofilm içindeki bakterilerin korunmasına ve avantaj kazanmasına neden olabilmektedir. Dolayısıyla, biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi genellikle yüksek dozda ve uzun süreli antibiyotik kullanımını gerektirir. Ancak bu tür tedavi stratejileri, antibiyotik direncinin gelişmesi ve ilaç toksisitesi riskinin artması gibi önemli sorunlara neden olabilir (Beloin vd., 2014).

Yapışma aşamasında, *S. aureus* planktonik hücreleri, konakçı ile birleşmeyi teşvik etmek için hücre duvarına bağlı protein (CWP), adhezin ve eDNA ekspresyonu gibi bir dizi farklı faktör ve ilgili düzenleyici mekanizmayı kullanır. Bu düzenlemelerin en karakteristik özelliği, esas olarak fibronektin bağlayıcı proteinleri (FnbA ve FnbB dahil FnBP'ler), fibrinojen bağlayıcı proteini (Fib), kümelenme faktörlerini (ClfA, ClfB) ve serin-aspartat tekrar ailesi proteinlerini (SdrC, SdrD ve SdrE) içeren yapışkan matris moleküllerini (MSCRAMM'ler) tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenlerinin organizasyonudur. Bu bileşenler, doğal dokulara ve biyomateryal yüzeylere bakteriyel yapışmaya aracılık eder. Yüzeylere yapıştıktan sonra, yapışan bakteri hücreleri yeterli besin kaynağının varlığında bölünmeye ve birikmeye başlar. Toplanma aşamasında bakteriler, düzenleyici ağları ve hücre içi sinyal moleküllerini tetikleyen çevresel sinyalleri algılayarak biyofilm oluşumunu düzenler. Olgunlaşma aşamasında, biyofilmin yapısı yüksek oranda yapılandırılır ve kompakt üç boyutlu bir mantar veya kule yapısı oluşur. Dağılma adımı, biyofilm yaşam döngüsünün son aşaması ve başka bir yaşam döngüsünün başlangıcıdır (Peng vd., 2022).

1.5 Çalışmanın Amacı

Tıbbi bitkiler, geleneksel halk tıbbında önemli bir rol oynamakta ve modern tıpta da bu önemlerini sürdürmektedirler. Bu bitkilerin sağlık üzerindeki çeşitli olumlu etkileri, geniş çaplı araştırmalara konu olmaktadır. Bu araştırmalar, tıbbi bitkilerin antienflamatuar, antidiyabetik, antikanser ve antimikrobiyal gibi çeşitli biyoaktif özelliklerini incelemekte ve potansiyellerini ortaya koymaktadır.

Kanser terapötiklerindeki son araştırmalar, geleneksel bitkisel ilaçları yeniden gözden geçirmektedir, çünkü geleneksel ilaçlara dayalı bitki özleri veya karışımları, kimyasal bileşikler ve hedefleyici antikorlar dahil olmak üzere diğer antikanser terapötiklerine kıyasla hiç veya daha az yan etki ile antikanser etkiler göstermişlerdir. Literatürde birçok farklı bitki ekstraktının birçok farklı kanser hücre hattı ve farklı patojenler üzerinde test edildiği çalışmalar mevcuttur. Patojenlerle mücadelede farklı biyoaktif bileşenler içeren tıbbi bitkilerin kullanıma kazandırılması için antimikrobiyal testler yapılmaktadır.

Asteraceae familyası oldukça geniş bir ailedir ve birçok farklı üyesinin antikanser ve antimikrobiyal potansiyelleri gerçekleştirilen çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat literatür incelendiğinde *O. tauricum* bitkisinin antikanser ve antimikrobiyal potansiyelini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, *O. tauricum* bitkisine ait toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol, etil asetat, etanol-su ve su ekstraktlarının çok yönlü biyoaktif özellikleri araştırılmıştır; bunun için ekstraktların meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerinde antikanser etkileri ve klinik öneme sahip mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri *in vitro* koşullarda değerlendirmektir. Çalışma kapsamında, bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda meme kanseri hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik ve antiproliferatif etkiler analiz edilmiş; ayrıca üç Gram-pozitif, dört Gram-negatif bakteri ve bir maya üzerindeki antimikrobiyal etkileri standart mikrobiyolojik yöntemlerle test edilmiştir. Bu çalışma, *Onopordum tauricum*'un terapötik potansiyelini hem onkolojik hem de mikrobiyal enfeksiyonlar bağlamında bilimsel olarak incelemeyi ve alternatif tedavi yaklaşımlarına katkı sunmayı amaçlamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Onopordum cinsi yaklaşık 50 tür içerir (Garsiya vd., 2019a). Bu cins birçok insan hastalığının tedavisinde halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılan çok yıllık ve spermatofit bitkilerden oluşur. Bu cinsin bitkileri, çok çeşitli farmakolojik uygulamalara sahip ilginç bir biyoaktif molekül kaynağıdır. Geleneksel olarak mide, böbrek, solunum, idrar ve jinekolojik hastalıkların tedavisinde ve gıda endüstrisinde peynir üretiminde kullanılırlar. Bu bitkiler, antioksidan, antimikrobiyal, antiproliferatif, sitotoksik, antitümör, analjezik, hipotansif ve antiepileptik aktiviteler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivite sergilerler. (Mouffouk vd., 2023) Literatürde bu cinse ait bitkilerle yapılan birçok çalışma mevcuttur.

2.1 *Onopordum* Cinsine Ait Kanser Çalışmaları

Csupor-Löffler vd. (2009), Macaristan'a ait 26 türden hazırlanan sulu ve organik ekstraktların antiproliferatif aktiviteleri Cynereae ve Lactuceae (Asteraceae), HeLa (serviks epitelyal adenokarsinom), A431 (deri epidermoid karsinom) ve MCF7 (meme epitelyal adenokarsinom) hücrelerine karşı Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) testi kullanılarak *in vitro* olarak test etmiştir. N-hekzan, kloroform, %50 metanol ve su ile elde edilen farklı bitki kısımlarının test edilen 200 ekstraktından 16'sı kayda değer biçimde hücre büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (10 µg/mL konsantrasyonda >%50 inhibisyon). Çalışmada, ekstraktların IC_{50} değerleri belirlenmiş ve doğrudan sitotoksik etkileri ölçülmüştür. Bazı *Centaurea*, *Cirsium*, *Cichorium*, *Lactuca*, *Onopordum* ve *Scorsonera* özütleri için antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteler arasında, doğrudan öldürme etkilerinden ziyade gerçek bir hücre proliferasyon inhibitör aktivitesini gösteren yüksek farklılıklar bulunmuştur (Csupor-Löffler vd., 2009).

Csupor-Löffler vd. (2014), *Onopordum acanthium* kökünün kloroform ekstraklarını, çok aşamalı kromatografik ayrıştırmaya tabi tutmuştur. Bu deney sonucunda seskiterpen laktonlar 4β,14-dihidro-3-dehidrozaluzanin C, zaluzanin C ve 4β,15,11β,13-tetrahidrozaluzanin C, neolignan nitidanin-diisovalerianat, ayrıca 13-okso-9Z,11E-oktadekadienoik asit, 24-metilenkolesterol, α-linolenik asit, linoleik asit,

stigmasterol ve β-sitosterol izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapıları, analitik veriler (NMR, MS) ve bunların literatürde bildirilenlerle karşılaştırılması yoluyla belirlenmiştir. Çalışmada bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri, serviks adenokarsinomu HeLa, meme adenokarsinomu MCF7 ve deri epidermoid karsinomu A431 hücreleri üzerinde MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstraktın en aktif antiproliferatif bileşiği olan 4beta,14-dihidro-3-dehidrozaluzanin C'nin kayda değer tümör hücresi büyüme inhibitör aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (IC_{50} 2,7-15,1 µM) (Csupor-Löffler vd., 2014).

Eslami Tehrani vd. (2017), İran-Erdebil'den toplanan 18 bitkinin sitotoksik etkilerini araştırmıştır. Toplam metanol ekstraktının ve petrol eteri, kloroform ve metanol ekstraktlarının sitotoksik etkisi, seçilen 4 insan kanser hücre hattı MCF7, HepG-2, A-549, HT-29 ve ayrıca sağlıklı bir hücre hattı olan MDBK' ya karşı MTT testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, *Onopordon acanthium*' un toprak üstü kısımlarının toplam metanol ekstraktı ve kloroform ekstraktu, sırasıyla $12,51 \leq IC_{50} \leq 55,72$ ve $6,49 \leq IC_{50} \leq 31,5$ ile tüm hücre hatlarına karşı önemli sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Eslami Tehrani vd., 2017).

Delalat vd. (2022), gümüş klorür nanopartikülleri (AgClNPs) *Onopordum acanthium* ekstraktı kullanılarak üretmiş ve meme kanseri MDA-MB-231 ve sağlıklı insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) hücre hatları üzerindeki sitotoksisite özelliklerini değerlendirmiştir. Sonuç olarak, meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 66,04 µg/mL IC_{50} değeri ile önemli sitotoksisite özellikleri sergilerken, 101,04 µg/mL IC_{50} değeri ile normal insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) hücrelerine karşı toksisiteyi azaltıcı etki gösterdiği değerlendirilmiştir (Delalat vd., 2022).

2.2 *Onopordum* Cinsine Ait Antimikrobiyal Çalışmaları

Njeh vd. (2017), *Onopordum espinae* yapraklarının hekzan, etil asetat ve metanol ekstraktlarını *Bacillus cereus, S. aureus, E. faecalis, E. coli, P. aeruginosa* ve *Salmonella enteritidis*'e karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından incelemiştir. Hekzan ve etil asetat ekstraktları Gram-pozitif bakterilere karşı 12 ila 30 mm arasında değişen inhibisyon zonları ile güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir. Metanol

ekstraktlarının ise test edilen mikroorganizmalara karşı inaktif olduğu belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite sadece Gram-pozitif bakterilere karşı gözlenmiş, Gram-negatif olanlar test edilen ekstraktlara direnç göstermiştir. En iyi aktiviteyi, gıda zehirlenmesine neden olan en yaygın Gram-pozitif bakterilerden biri olan *Staphylococcus aureus* 'a karşı etil asetat ekstraktı göstermiş, bunu *Bacillus cereus* izlemiştir (Njeh vd., 2017).

Gasimova vd. (2024), Muğla'dan (Türkiye) toplanan *Onopordum bracteatum*' un yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen farklı ekstraktlarının (metanol, aseton ve su) antioksidan aktiviteleri ve toplam sekonder metabolit miktarlarını belirlemiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil Radikal Süpürme Kapasitesi), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit), β-Karoten/linoleik asit, FRAP (Ferrik indirgeyici antioksidan güç) ve CUPRAC (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) testleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, FRAP testi hariç tüm testlerde en yüksek antioksidan aktiviteye, *O. bracteatum'* un yaprak metanol ekstraktı ile ulaşılmıştır (Gasimova vd., 2024).

Zare vd. (2014), *O. acanthium* tohumlarının toplam fenolik içeriğini (TPC) ve n-hekzan ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel özelliklerini incelemiştir. *O. acanthium*' un antibakteriyel aktiviteleri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus loteus* gibi bazı gram-pozitif bakteriler ile *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia* gibi gram-negatif bakterilere karşı disk difüzyon yöntemi, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve resazurin mikrotitre testi kullanılarak araştırılmıştır. Bitki metanol ekstraktı gram-pozitif bakteriler olan *Staphylococcus epidermidis* ve *Micrococcus luteus*' a karşı önemli antibakteriyel aktivite gösterirken (MİK= 0,612 mg/ml ile), n-hekzan ekstraktı gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı ihmal edilebilir aktivite göstermiş ya da hiç inhibitör aktivite göstermemiştir (Zare vd., 2014).

Uğur vd. (2011), *O. caricum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının hekzan, kloroform, etil asetat ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini kağıt disk difüzyon yöntemi kullanılarak, mutasyona dirençli bakterileri de içeren mikroorganizmalara karşı değerlendirmiştir. Sonuçlara göre, etanol ve kloroform ekstraktları önemli

antibakteriyel aktivite sergilemiştir. *O. caricum*' un kloroform ve etanol ekstraktlarının çoklu dirençli *Stenetrophomonas maltophilia, S. aureus* ve bazı stafilokokların büyümesini engelleme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, *O. caricum* ekstraktlarının çoklu antibiyotik dirençli bakteriler için alternatif antimikrobiyal ajanlar olabileceği ortaya konmuştur (Ugur vd., 2011).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Bitki Örnekleri

Tez çalışmasında kullanılan *Onopordum tauricum* bitki örnekleri, 2022 yılında Elazığ ilinde gerçekleştirilen arazi çalışmaları sırasında toplanmıştır. Bitki örneklerinin taksonomik teşhisi, Munzur Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Uğur Çakılcıoğlu tarafından yapılmıştır (UC-22/22). Bitki ekstraktları analize kadar 4°C'de saklanmıştır.

3.1.2 Kullanılan Hücre Hatları

Onopordum tauricum bitkisine ait toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol (EtOH), etil asetat (EA), etanol-su (EtOH/Su) ve su ekstraktlarının antikanser aktivitelerini değerlendirmek amacıyla MDA-MB-231 ve MCF-7 olmak üzere iki farklı meme kanseri hücre hattı üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları, Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden sağlanmıştır.

3.1.3 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Onopordum tauricum'un toprak üstü kısmından elde edilen etanol, etil asetat, etanol-su ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, dört Gram-negatif, üç Gram-pozitif ve bir maya olmak üzere toplam 8 tür mikroorganizmaya karşı araştırılmıştır. Deneyde kullanılan mikroorganizma suşları, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) referans suşlarıdır. Mikroorganizmalar Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yer alan Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarından tedarik edilmiştir. Çalışmada incelenen mikroorganizmalar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada incelenen mikroorganizma suşları

Numara	Mikroorganizmalar	
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	Gram-pozitif kok
2	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212	Gram-pozitif kok
3	*Escherichia coli* ATCC 25922	Gram-negatif basil
4	*Salmonella Typhimurium* ATCC 14028	Gram-negatif basil
5	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	Gram-negatif basil
6	*Candida albicans* ATCC 10231	Maya
7	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883	Gram negatif basil
8	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	Gram pozitif basil

3.1.4 Analizlerde Kullanılan Kimyasal Reaktifler, Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Yürütülen analizlerde kullanılan kimyasal reaktifler, analitik cihazlar ve sarf malzemeler; Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesindeki Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı ile Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde yer alan Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nın mevcut altyapısından yararlanılarak temin edilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal reaktifler Tablo 3.2'de, kullanılan cihazlar ile sarf malzemeler ise Tablo 3.3'te ayrıntılı şekilde gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Analizlerde kullanılan kimyasal reaktifler

Numara	Kimyasal Adı	Marka
1	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT)	Thermo Fisher Scientific
2	Penisilin/Streptomisin karışımı (%0,1)	Thermo Fisher
3	İnsülin (0,01 mg/ml)	Pan Biotech
4	Dimetilsülfoksit (DMSO)	Isolab, Biofroxx
5	Fosfat Tampolu Tuz Çözeltisi (PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
6	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
7	Non-Esansiyel Amino Asit (NEAA)	Pan Biotech
8	Tripsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific
9	Fetal Bovine Serum(FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
10	Levofloksasin	Tokyo Chemical Industry
11	Kristal viyole	Merck
12	Etanol (EtOH)	Isolab
14	Mueller Hinton Agar (MHA)	Biolife
15	Mueller Hinton Broth (MHB)	Biolife
16	Luria Bertani Broth (LB)	Nzytech
17	Nutrient Agar (NA)	Merck
18	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Merck-Millipore
19	Nistatin	Roth

Tablo 3.3 Analizlerde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Numara	Cihaz Adı	Marka/Model
1	-20/+4 Buzdolabı	Arçelik / 4552
2	-80 Derin Dondurucu	Nuaire / Glacier-Nu 9668E
3	Buz Makinası	Hoshizaki / Scotsman
4	Hassas Terazi	Precise / XP220A
5	Saf su cihazı	Human Corporation Zeneer Power
6	Ultra saf su cihazı	Mpminipure / Dest-up
7	Vortex	Wise-Mix / VM-10
8	Çalkalamalı Kuru Blok Isıtıcı	Biosan / TSH-100
9	Çekerocak	Tezsan
10	Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Tezsan / Class II
11	Otoklav	Nüve / Steam Art
12	CO2 İnkübatörü	Nüve / EC160
13	Masaüstü Santrifüj	Nüve / NF 800
14	Mikrosantrifüj	Starlab
15	Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich/ MICRO 220R
16	Faz Konstrast Görüntüleme Sistemli Kameralı Ters Mikroskop	Leica / DMil
17	Spektrofotometre Nano Drop	Thermo Scientific / MultiskanGO UV/Vis
18	McFarland Densitometer Cihazı	Biosan / DEN-1B
19	Kimyasal Saklama Dolabı	Tezsan
20	96 Kuyucuklu mikropleytler	Techno Plastic Products
21	Steril Besiyeri Kapları	Isolab
22	Falkon Tüpler	Isolab, CAPP
23	Thoma lamı	Marienfeld-Neubauer improved
24	Hücre Petri kapları	Techno plastic products
25	Eppendorf tüpler	Isolab
26	Serolojik pipetler	Greiner bio-one
27	Mikropipetler	Eppendorf, Thermo, CAPP
28	Tek kullanımlık plastik özeler	Medster
29	pH gösterge stribi	Isolab
30	Pamuklu Eküvyon	Cultiplast/ LP Italiana
31	Pipet uçları	Isolab

3.2 Metot

3.2.1 Bitki Ekstraktlarının Elde Edilişi

Ekstraktların elde edilmesi Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gökhan Zengin tarafından gerçekleşmiştir. *Onopordum tauricum* bitkisine ait örnekler gölgede kurutulmuş, toprak üstü kısımları öğütülerek toz hâline getirilmiştir. Elde edilen bitki tozları etil asetat, etanol, etanol/su (%70, v/v) ve saf su kullanılarak ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Etil asetat, etanol ve etanol/su özütleri maserasyon yöntemi ile 24 saat süreyle sürekli karıştırılarak elde edilmiş ve Whatman mavi bant filtre kâğıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzüntüler, çözücülerin

uzaklaştırılması amacıyla 40°C'de evaporasyona tabi tutulmuştur. Su özütleri ise liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak elde edilmiştir. Ekstraktların tamamı deney gerçekleşene kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Bitki Ekstraktlarının Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Hücre kültürü deneyleri için bitki ekstraktları stok konsantrasyon 20 mg/mL olarak DMSO ve/veya steril ultra saf su ile çözülerek hazırlanmıştır. Stok konsantrasyonlardan seri seyreltme yapılarak 10 mg/mL; 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL konsantrasyonlarında çalışma stokları hazırlanmıştır. Çalışma stokları kullanıma kadar -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Hücre Kültürü

Çalışmada, *O. tauricum*' un toprak üstü kısımlarından elde edilen EA, EtOH, EtOH-Su ve su ekstraktlarının hücre kültürü düzeyinde antikanser etkileri sırasıyla MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerinde uygulanmış ve sonuçları analiz edilmiştir. Antikanser etkinliğinin belirlenmesi için Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yönteminden yararlanılmıştır.

3.2.3.1 Hücre kültürünün devamlılığı

Hücre kültürünün devamlılığı için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

3.2.3.1.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması için %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 NEAA (Non-essential Aminoasit), %0,1 penisilin/streptomisin ve 0,01 mg/ml insülin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri kullanılmış ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1.2 Hücrelerin açılması

Dondurulmuş halde -80°C'de muhafaza edilen hücreler, çözülmeleri amacıyla oda sıcaklığında kısa bir süre bekletilmiştir. Ardından, çözülmüş hücre süspansiyonundan 1 mL alınarak 90 mm çapındaki hücre kültür kaplarına 7 mL DMEM besiyeri ile birlikte eklenmiştir. Ekleme işlemi sonrasında, hücrelerin besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Homojen hücre dağılımı, hücrelerin kültür ortamında eşit şekilde yayılması ve sağlıklı bir şekilde proliferasyonlarının desteklenmesi açısından kritik öneme sahiptir.

3.2.3.1.3 Hücrelerin pasajlanması

Petrinin yüzey alanının yaklaşık %70–80'ini kaplayacak yoğunluğa ulaşan hücreler için pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, petri içerisindeki mevcut besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücrelerin yıkanması amacıyla 1 mL fosfat tamponlu salin çözeltisi (1×PBS) eklenmiştir. Yıkama işlemi ile yüzeye tutunmamış hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından, yüzeye tutunan hücrelerin ayrılabilmesi amacıyla her bir petriye 1 mL 1x Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş, hücrelerin enzimle temasını artırmak için plakalar hafifçe çalkalanmış ve 37°C; %5 CO_2 içeren inkübatörde 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, hücrelerin daha fazla ayrılmasını önlemek amacıyla, eklenen tripsin hacminin iki katı kadar DMEM besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur.

Sonrasında, hücreler bir hücre kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden kazınarak toplanmış ve 15 mL hacmindeki bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 2000 rpm hızında, 5 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve hücre pelletine 3 mL taze DMEM besiyeri ilave edilmiştir. Hücre peleti, mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak homojen şekilde çözündürülmüştür. Daha sonra, 90 mm çapındaki üç ayrı kültür kabına her birine 7 mL DMEM besiyeri ve 1 mL çözülmüş hücre süspansiyonu olacak şekilde transfer gerçekleştirilmiştir. Her petri kabı üzerine çalışılan hücre hattının adı, pasaj numarası ve deney tarihi etikete yazılarak 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 atmosferde inkübatörde kültüre alınmıştır. Tüm kültür süreci boyunca hücrelerin morfolojisi, proliferasyonu

ve canlılığı, invert mikroskop kullanılarak 10× objektif büyütmesi altında düzenli olarak takip edilmiştir.

3.2.3.1.4 Hücrelerin sayımı

Hücre sayımı işlemi için, logaritmik fazdaki hücreler falkona alınarak, pasajlama işleminde uygulandığı gibi santrifüj işlemi yapılmıştır. Sonrasında elde edilen hücre peleti 1 mL 1× DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, 1/10 oranında fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş hücre süspansiyonu, Thoma lamı üzerine yüklenmiş ve lamın alt ve üst bölgesindeki hücreler mikroskop kullanılarak sayılmıştır. Her iki bölgede sayılan hücrelerin ortalaması alınarak, hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Toplam hücre sayısı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Oranı} \times 10^4 \quad (3.1)$$

Formülde yer alan 10^4 katsayısı Thoma lamının hacim faktöründen kaynaklanmaktadır. Sayım işlemi tamamlandıktan sonra, hücreler 96 kuyucuklu kültür plakalarına uygun yoğunlukta inoküle edilmiş ve 37°C'de; %5 CO_2 atmosferinde inkübe edilmiştir.

3.2.3.2 Ekstraktların hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi - hücre canlılık testi (MTT)

Hücre canlılık aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi ile belirlenmiştir (Van Tonder vd., 2015). Ekstraktların sitotoksik aktiviteleri MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Öncelikle, %70–80 yoğunluk düzeyine ulaşan hücrelerin bulunduğu petriden besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücreler 1 mL 1× PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında, hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla petri içerisine 1 mL 1× Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreler 37 °C'de; %5 CO_2 içeren inkübatörde 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tripsin aktivitesinin sonlandırılması için kullanılan tripsin hacminin iki katı kadar DMEM besiyeri ilave eklenmiştir. Hücreler bir hücre kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden kazınarak

15 mL'lik santrifüj tüplerine toplanmış ve 2000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peleti, 1 mL 1× DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon, 1/10 oranında seyreltilmiş ve Thoma lamı kullanılarak mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Sayımı yapılan hücrelerden, düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplaklara her bir kuyucuğa 100 µL hacminde, yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, 37°C ve %5 CO_2 atmosferinde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, çalışma ekstraktlarının stok solüsyonlarından her bir kuyucuğa (kontrol grubu hariç) 10'ar µL eklenmiş ve son konsantrasyonlar 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL ve 62,5 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Kontrol grubu kuyucuklarına ise 10 µL ekstraktların çözücüsü eklenmiştir. Tüm uygulamalar, her bir ekstrakt ve konsantrasyon için üç teknik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt uygulamalarından sonra mikroplakalar 37°C ve %5 CO_2 koşullarında 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklardaki besiyeri aspire edilmiş ve ekstrakt uygulamasının etkilerini belgelemek amacıyla her bir kuyucuğun mikroskobik görüntüleri alınmıştır. Görüntüleme işlemi tamamlandıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 µL MTT çözeltisi (0,025 g MTT + 250 µL FBS + 49,75 mL saf 1× DMEM) eklenmiş ve plakalar 37°C'de %5 CO_2 atmosferinde 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki MTT çözeltisi aspire edilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µL saf DMSO eklenmiştir. Blank kontrol için ise bir kuyucuğa yalnızca 100 µL saf DMSO ilave edilmiştir. Mikroplaka 300 rpm hızında 10-12 dakika çalkalanarak homojen çözülmüş formazan kristalleri elde edilmiştir. Ardından, her bir kuyucuğun absorbans değeri, kör (blank) kuyucuğa karşı spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Elde edilen absorbans değerleri, kontrol grubu değerlerine oranlanarak yüzde hücre canlılığı hesaplanmıştır. Bu hesaplama, ekstrakt uygulanan kuyucuktaki absorbans değerinin kontrol kuyucuğundaki absorbans değerine bölünmesi ve elde edilen sonucun 100 ile çarpılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Deneyler, birbirinden bağımsız en az üç teknik tekrar ile yapılmıştır. Hücre canlılık yüzdeleri belirlendikten sonra, her ekstrakt için yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmıştır.

IC_{50} değeri, uygulanan ekstrakt konsantrasyonunun hücre canlılığını %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyonu ifade etmektedir. IC_{50} hesaplaması için, her bir ekstraktın farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen hücre canlılık yüzdeleri, GraphPad Prism 8 yazılımına girilmiştir.

3.2.4 Antimikrobiyal Aktivite Testleri

3.2.4.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması

Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller Hinton Broth (MHB) ve %4 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) gibi ticari olarak toz formda temin edilen besiyerleri, üretici firmaların talimatlarına uygun şekilde distile su içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir besiyerinin pH değeri ölçülerek doğruluğu kontrol edilmiştir. Besiyerleri, sterilizasyon işlemi için 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Otoklavlama sonrasında, besiyerleri yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulmuş ve aseptik koşullar altında 90 mm çapındaki petri kaplarına her biri 25 mL olacak şekilde dökülmüştür. Katılaşan besiyerleri, kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, -80°C'de saklanan stok kültürlerden alınarak genel bir agar besiyerine pasajlanmış ve bu şekilde reaktivasyonları sağlanmıştır. Reaktivasyon sonrasında mikroorganizmaların saflıkları mikroskobik ve makroskobik olarak kontrol edilerek saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürlerden seçilen izole koloniler kullanılarak taze alt kültürler hazırlanmış ve deneysel uygulamalar bu taze kültürler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2 Agar kuyucuk difüzyon testi

Test edilen mikroorganizmaların taze kültürlerinden, steril %0,9 NaCl (serum fizyolojik) çözeltisi içerisinde hücre densitometresi (Biosan / DEN-1B) kullanılarak 0,5 McFarland standardına uygun inokulumlar hazırlanmıştır. Bu inokulumlar, bakteriler için yaklaşık $1–2 \times 10^8$ kob/mL, mayalar için ise yaklaşık $1–2 \times 10^6$ kob/mL hücre yoğunluğuna karşılık gelmektedir. Hazırlanan inokulumlar, bakteriler için Mueller Hinton Agar (MHA), mayalar için ise Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

besiyerlerine steril pamuklu eküvyon yardımıyla üç yönlü yüzey ekimi yapılarak uygulanmıştır.

Ekimi takiben, besiyeri yüzeyinde 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve her bir kuyucuğa ekstraktların 20 mg/mL stok çözeltilerinden 50 µL (toplam 1000 µg/kuyucuk) damlatılmıştır. Pozitif kontrol grubu için bakterilere yönelik levofloksasin (5 µg/kuyucuk), mayalara yönelik ise nistatin (100 U/kuyucuk) kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ekstraktların çözücüleri uygulanmıştır.

Tüm işlemler tamamlandıktan sonra kültürler; 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zon çapları cetvel yardımıyla milimetre (mm) cinsinden ölçülmüştür.

3.2.4.3 Sıvı mikrodilüsyon testi (MİK tespiti)

Antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenen ekstraktların minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri, EUCAST 2023 standartları esas alınarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (Wiegand vd., 2008). Deneyler, 96 kuyucuklu steril mikroplaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Test edilecek ekstraktlar, Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde çözülerek 1000–31,25 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Mikroplakların ilk kuyucuğuna 180 µL MHB, diğer kuyucuklara ise 100 µL MHB eklenmiştir. Ardından, ekstraktın 10 mg/mL stok çözeltisinden ilk kuyucuğa 20 µL ilave edilerek başlangıç kuyucuğunda ekstraktın son konsantrasyonu 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunu takiben, iki kat seri dilüsyon yöntemi uygulanarak ekstraktın test edilecek konsantrasyonları elde edilmiştir.

Pozitif kontrol (PK) olarak levofloksasin kullanılmış ve 8–0,25 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir. Bu amaçla, levofloksasinin 80 µg/mL stok çözeltisinden ilk kuyucuğa 20 µL eklenmiş ve seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak ekstraktların hazırlanmasında kullanılan çözücüler kullanılmıştır.

Her deney grubunda, yalnızca bakteri ve besiyeri içeren üreme kontrolü ile yalnızca besiyeri bulunan sterilite kontrolü kuyucukları oluşturulmuştur. Tüm kuyucuklara, son bakteri yoğunluğu 5×10^5 kob/mL olacak şekilde standartlaştırılmış bakteri süspansiyonu eklenmiştir.

Mikroplaklar, uygulamaların ardından steril kapakları kapatılarak 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklar görsel olarak değerlendirilmiş ve gözle görünür mikroorganizma üremesinin saptanmadığı en düşük ekstrakt konsantrasyonu ilgili mikroorganizma için MİK değeri olarak kaydedilmiştir.

MİK değerlerinin belirlenmesini takiben, minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri tespit edilmiştir. Bu aşamada, MİK değerine eşit ve MİK değerinin üzerindeki konsantrasyonları içeren kuyucuklardan alınan örnekler genel amaçlı agar besiyerine ekilerek alt kültürler oluşturulmuştur. Ekim yapılan plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 50'den az koloni gelişimi gözlenen en düşük ekstrakt konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir.

MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) ve MBK (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon) kavramları, antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin değerlendirilmesinde birbirini tamamlayan iki önemli parametreyi ifade etmektedir. MİK, test edilen antimikrobiyal ajan veya ekstraktın mikroorganizmaların görünür çoğalmasını inhibe ettiği en düşük konsantrasyonu tanımlar. Buna karşılık MBK, mikroorganizmaların %99,9 oranında öldürüldüğü ve canlı bakteri gelişiminin gözlenmediği en düşük konsantrasyon olarak kabul edilmektedir.

3.2.5 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyi

3.2.5.1 Biyofilm inhibisyon deneyi

Ekstraktların biyofilm inhibitör etkisi, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Coffey ve Anderson, 2014). Çalışmanın başlangıcında, taze *S. aureus* kültüründen izole edilen bir koloni 5 mL LB broth besiyerine aktarılıp inokülasyon gerçekleştirilmiştir ve 37°C'de, 150 rpm hızında çalkalamalı inkübasyon cihazında 16 saat süreyle inkübe

edilmiştir. İnkübasyonun ardından, elde edilen kültür temiz LB broth ile 1/100 oranında seyreltilerek ~ 1,0 x 10^6 kob/mL yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır.

Deneyler, düztabanlı 96 kuyucuklu polistiren mikroplakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her kuyucuğa 180 µL seyreltilmiş bakteri süspansiyonu transfer edilmiştir. Kör kuyucuğuna ise bakteri içermeyen 200 µL steril LB broth eklenmiştir. Ekstraktların sub-MİK (MİK altında kalan konsantrasyonlar) konsantrasyonlarında (31,25-1000 µg/mL) test edilmesi amacıyla, 10 mg/mL'lik çalışma stoğundan 20'şer µL eklenmiştir. Her bir uygulama üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Mikroplaka, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklardaki süspansiyon dikkatlice aspire edilmiştir. Planktonik hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla kuyucuklar distile su ile üç kez yıkanmış ve ardından plakalar kurutulmuştur. Sonrasında her kuyucuğa 200 µL %0,1'lik kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Boyama süresinin sonunda, kuyucuklardaki fazla kristal viyole uzaklaştırılmış ve aynı yıkama prosedürü tekrarlanarak serbest boyaların arındırılması sağlanmıştır.

Biyofilm tabakası tarafından tutulan boyayı çözündürmek amacıyla her kuyucuğa 200 µL %96 etanol eklenmiştir. Mikroplaka, oda sıcaklığında 350 rpm karıştırma ile ~10-15 dakika tutulmuştur. Elde edilen çözeltilerin absorbans değerleri, etanol içeren blank kuyucuğa karşı, spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Ekstrakt ile muamele edilmiş kuyucukların absorbans değerleri, kontrol grubu absorbans değerine oranlanarak ve sonuçlar 100 ile çarpılarak biyofilm oluşum oranları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Böylece ekstraktların biyofilm inhibitör etkinliği nicel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma birbirinden bağımsız olarak en az üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.2 Biyofilm eradikasyon deneyi

Biyofilm eradikasyon deneyi için, yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan *S. aureus* inokulumundan her bir mikroplaka kuyucuğuna 200 µL dağıtılmış ve plakalar 37°C'de

24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklardaki içerikler uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 250 µg/mL ekstrakt içeren 200 µL taze LB broth eklenmiştir. 31,25-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Plakalar, aynı koşullarda (37°C) 24 saat daha inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, yukarıda açıklanan kristal viyole boyama protokolü uygulanarak biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ekstrakt uygulaması sonrası biyofilm inhibisyon oranı (%) olarak hesaplanmıştır.

Her iki yöntem için genel hesaplama formülü aşağıdaki gibidir:

$$Biyofilm\ İnhibisyonu\ veya\ Eradikasyonu\ (\%) = \left(1 - \frac{Örnek\ Absorbası}{Kontrol\ Absorbansı}\right) * 100 \quad (3.2)$$

3.2.6 İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler, birbirinden bağımsız olacak şekilde en az üç teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılık yüzdeleri, Microsoft Office Excel 2016 programı kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar grafiklerle görselleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel analizleri, IBM SPSS Statistics 23 paket programı kullanılarak, bağımsız gruplar için t-testi yöntemi ile yapılmıştır. Antikanser ve anti-biyofilm aktivite çalışmalarına ait veriler, ortalama ± standart sapma (SEM) şeklinde sunulmuş ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirilmiştir. Normal dağılım varsayımını sağlamayan verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Mann–Whitney U testi**,** normal dağılım gösteren veriler için ise bağımsız örneklem t-testi (Student'ın t-testi) kullanılmıştır. Mann–Whitney U testi sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p < 0,05$); bağımsız örneklem t-testi ile yapılan analizlerde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4. BULGULAR

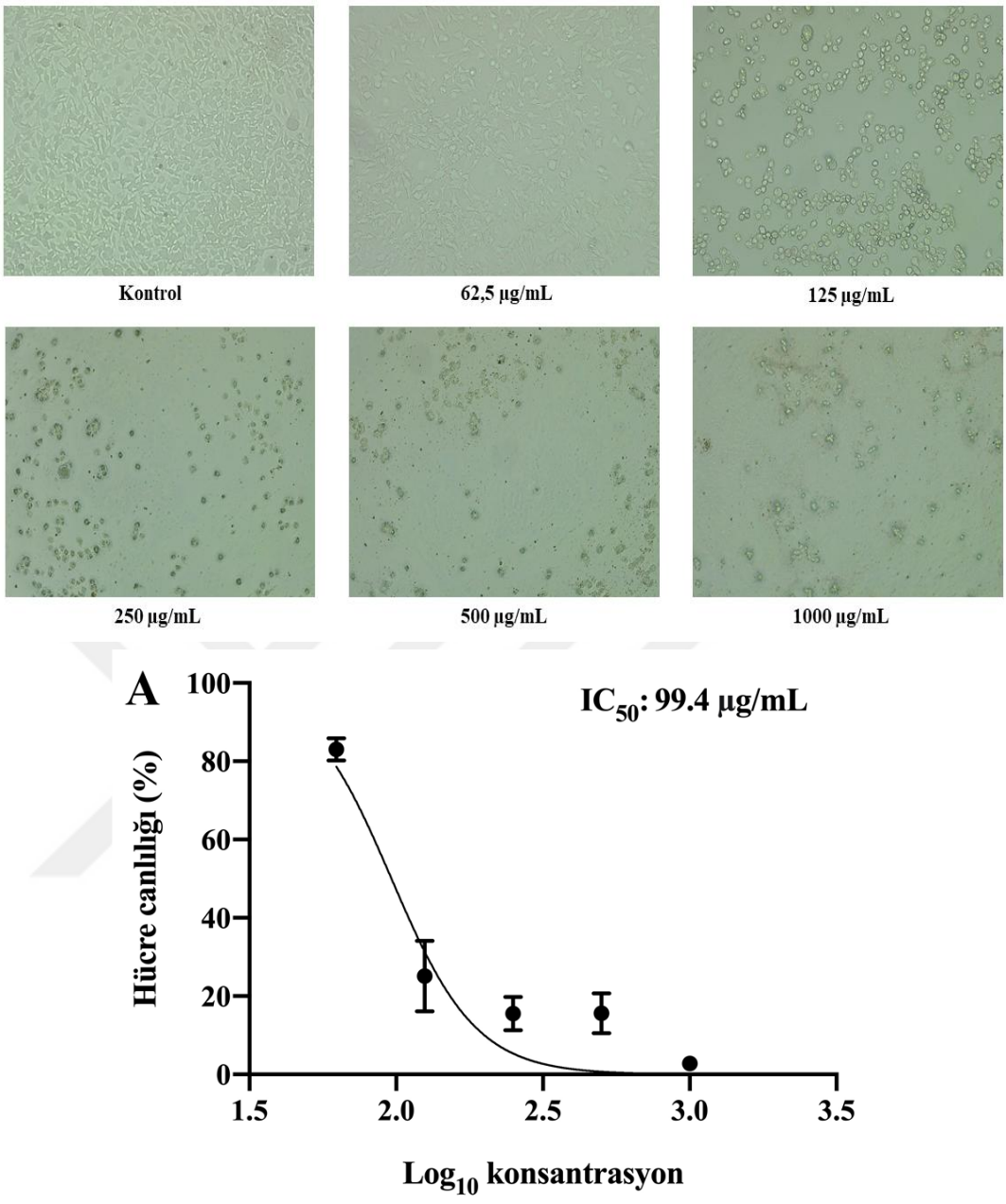
4.1 Antikanser Aktivite Bulguları

Bu tez çalışmasında, *Onopordum tauricum* bitkisine ait farklı ekstraktların meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları, etil asetat, etanol, etanol-su ve su ekstraktları ile farklı konsantrasyonlarda (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL ve 62,5 µg/mL) 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Belirtilen süre sonunda, ekstraktların hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre canlılığı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar sonrası hücrelerin morfolojik değişimleri ve canlılık durumları ters ışık mikroskobu altında değerlendirilmiş, hücrelerde meydana gelen yapısal değişiklikler görsel olarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler, ekstraktların konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde oluşturduğu etkilerin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi için kullanılmıştır.

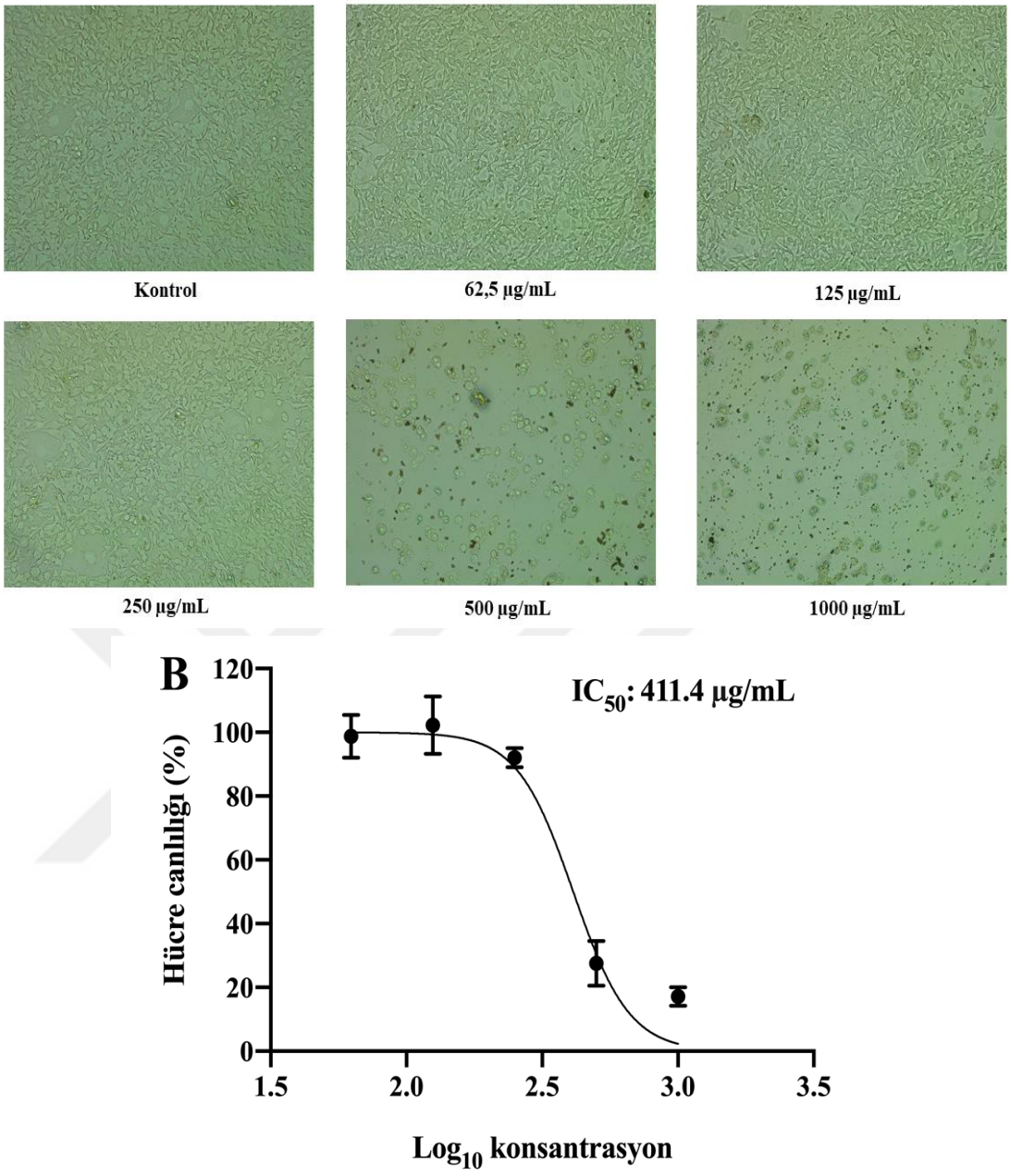
4.1.1 MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerinde Bitki Ekstraktlarının Antikanser Aktivitesine Ait Bulgular

Onopordum tauricum bitkisinden elde edilen etil asetat ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisi değerlendirildiğinde, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %2,8±0,7'sinin canlı kaldığı; 500 µg/mL konsantrasyonda ise %15,6±5,1'inin canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. IC_{50} değeri ise 99,4 µg/mL olarak bulunmuştur. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.

Onopordum tauricum bitkisinin etanol ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisine bakıldığında, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %17,1±2,9'unun canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise hücrelerin %27,5±7,0'sinin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri ise 411,4 µg/mL olarak saptanmıştır. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.

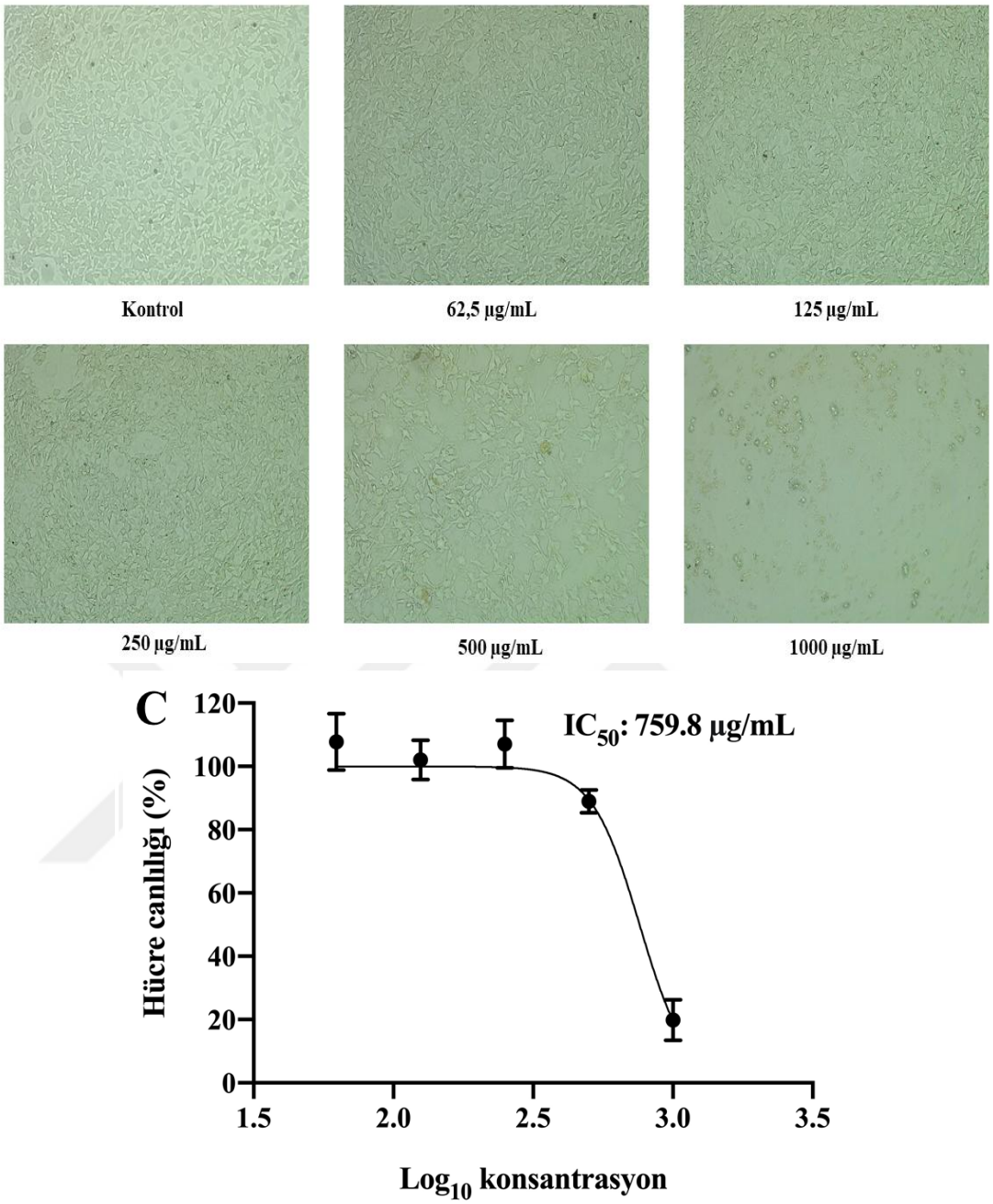


Şekil 4.1 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri



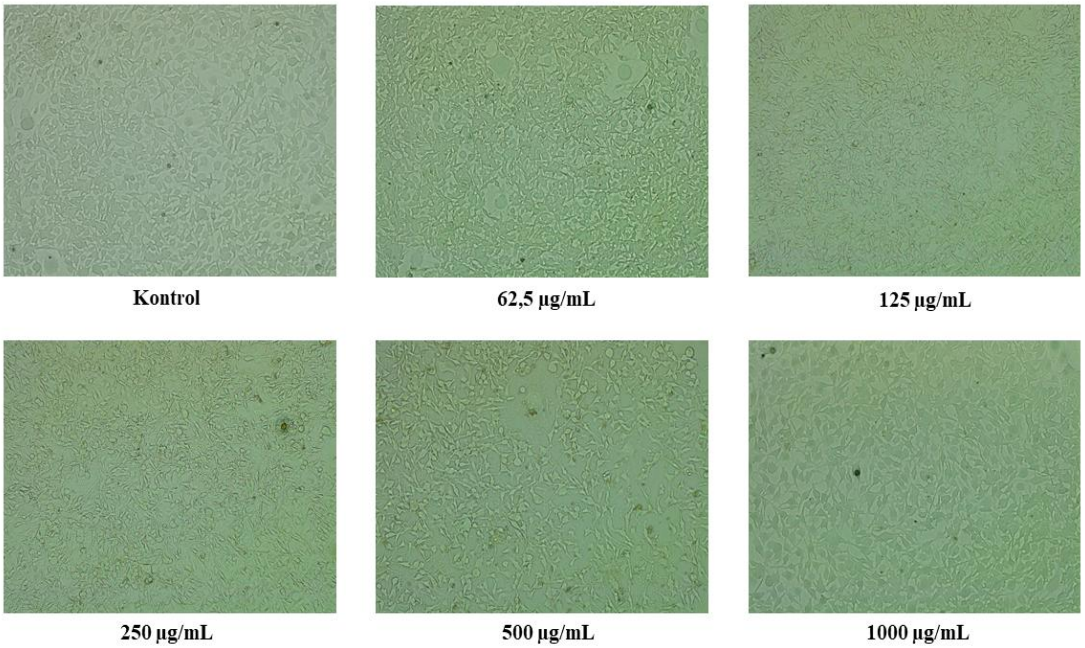
Şekil 4.2 Etanol ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri

Onopordum tauricum bitkisinin etanol-su ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisine bakıldığında, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %19,9±6,4'ünün canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise hücrelerin %88,9±3,6'sının canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri ise 759,8 µg/mL olarak saptanmıştır. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} grafiği Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3 Etanol-su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri

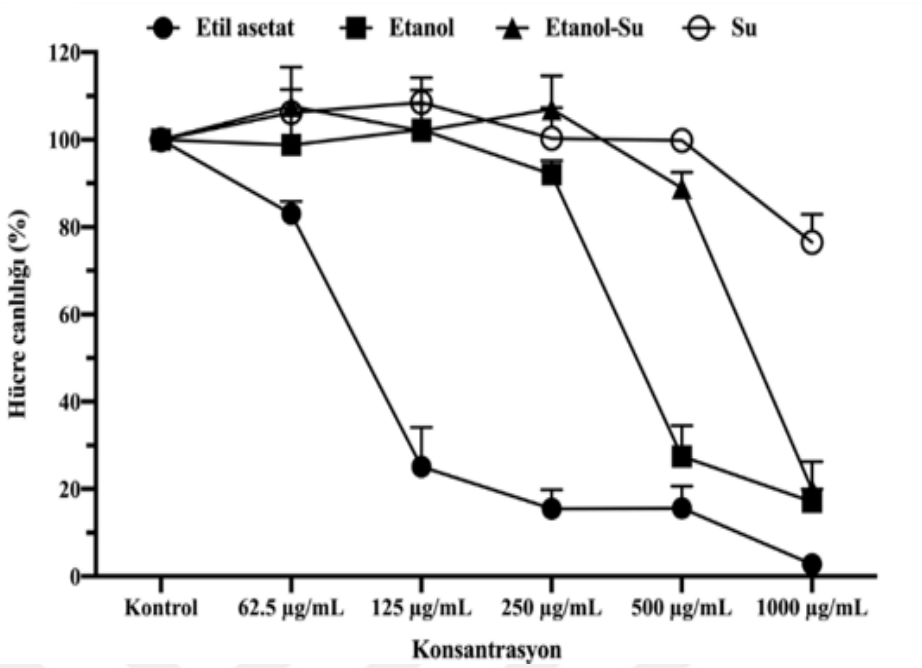
Onopordum tauricum bitkisinin su ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisi değerlendirildiğinde, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %76,5±6,4'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Su ekstraktının IC_{50} değeri ise > 1000 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4 Su ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri

Tablo 4.1 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, hücre canlılık oranı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir

Canlılık Oranı (%)				
Derişim	**Etil asetat**	**Etanol**	**Etanol-su**	**Su**
Kontrol	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0
62,5 µg/mL	83±2,9	98,8±6,8	107,7±8,9	106,2±5,3
125 µg/mL	25,1±9,0	102,3±9,1	102,0±6,2	108,5±5,7
250 µg/mL	15,5±4,3	92,1±3,1	107,0±7,6	100,3±7,0
500 µg/mL	15,6±5,1	27,5±7,0	88,9±3,6	99,8±2,5
1000 µg/mL	2,8±0,7	17,1±2,9	19,9±6,4	76,5±6,4



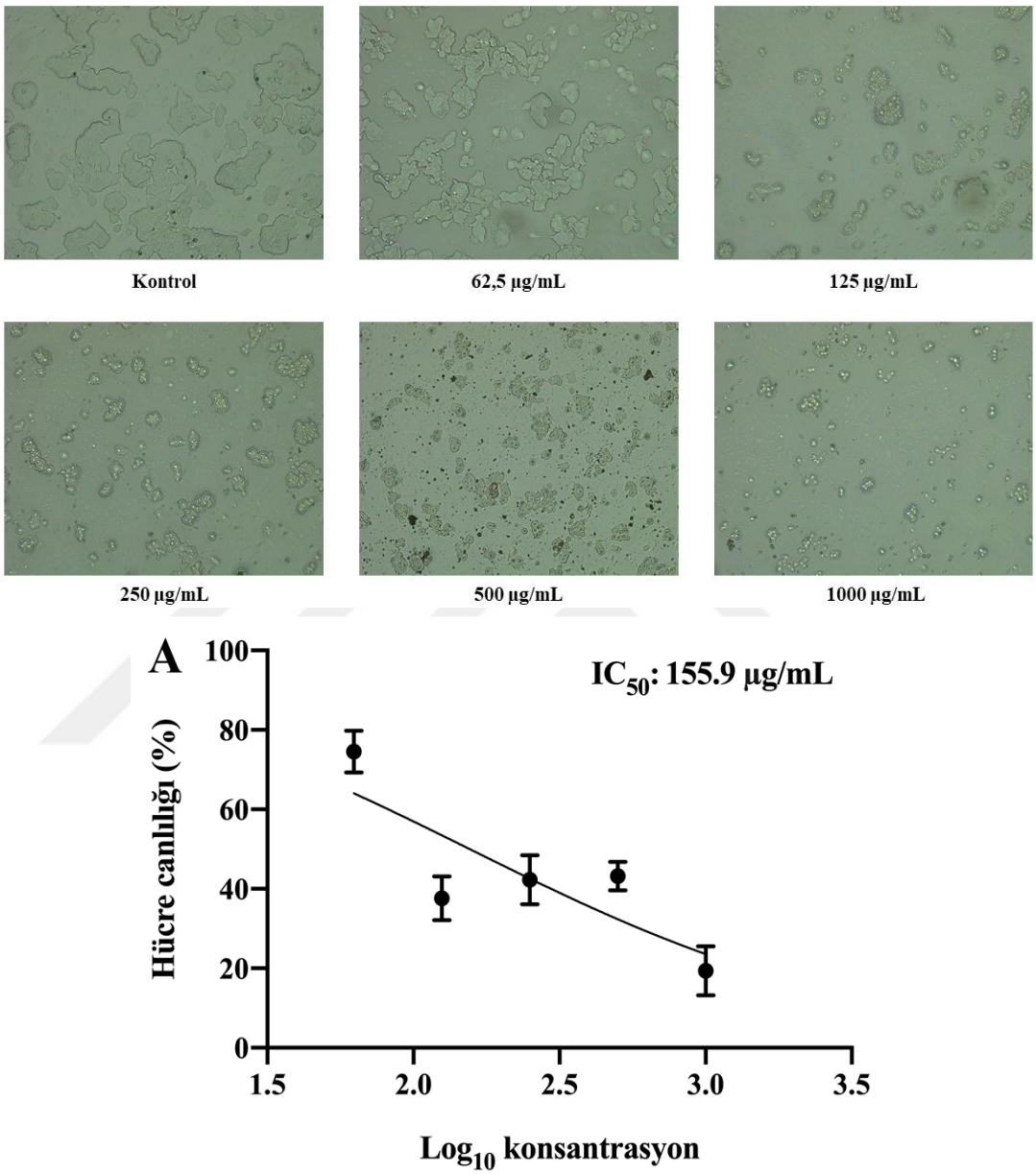
Grafik 4.1 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yüzde (%) canlılık oranları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Ekstraktların 48. saatte, MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildiğinde en düşük hücre canlılığının ve IC_{50} değerinin etil asetat ekstraktına ait olduğu belirlenmiştir. Diğer ekstraktlar ile karşılaştırıldığında; etanol, etanol-su ekstraktlarının hücre canlılığına daha az etki ettiği tespit edilmiştir. Su ekstraktının ise hücre canlılığına en az etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışılan tüm ekstraktların doza bağlı olarak MDA-MB-231 hücre hattına karşı sitotoksik aktivite sergilediği tespit edilmiştir ve tüm ekstraktların hücre canlılığı üzerine etkisi, Grafik 4.1'de gösterilmiştir. Hücre canlılık oranları ise, yüzdesel (%) olarak Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

4.1.2 MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Bitki Ekstraktlarının Antikanser Aktivitesine Ait Bulgular

Onopordum tauricum bitkisinin etil asetat ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisi değerlendirildiğinde, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %19,4±6,2'sinin canlı kaldığı tespit edilmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise %43,2±3,6'inin canlılığını koruduğu belirlenmiştir. IC_{50} değeri ise 155,9 µg/mL

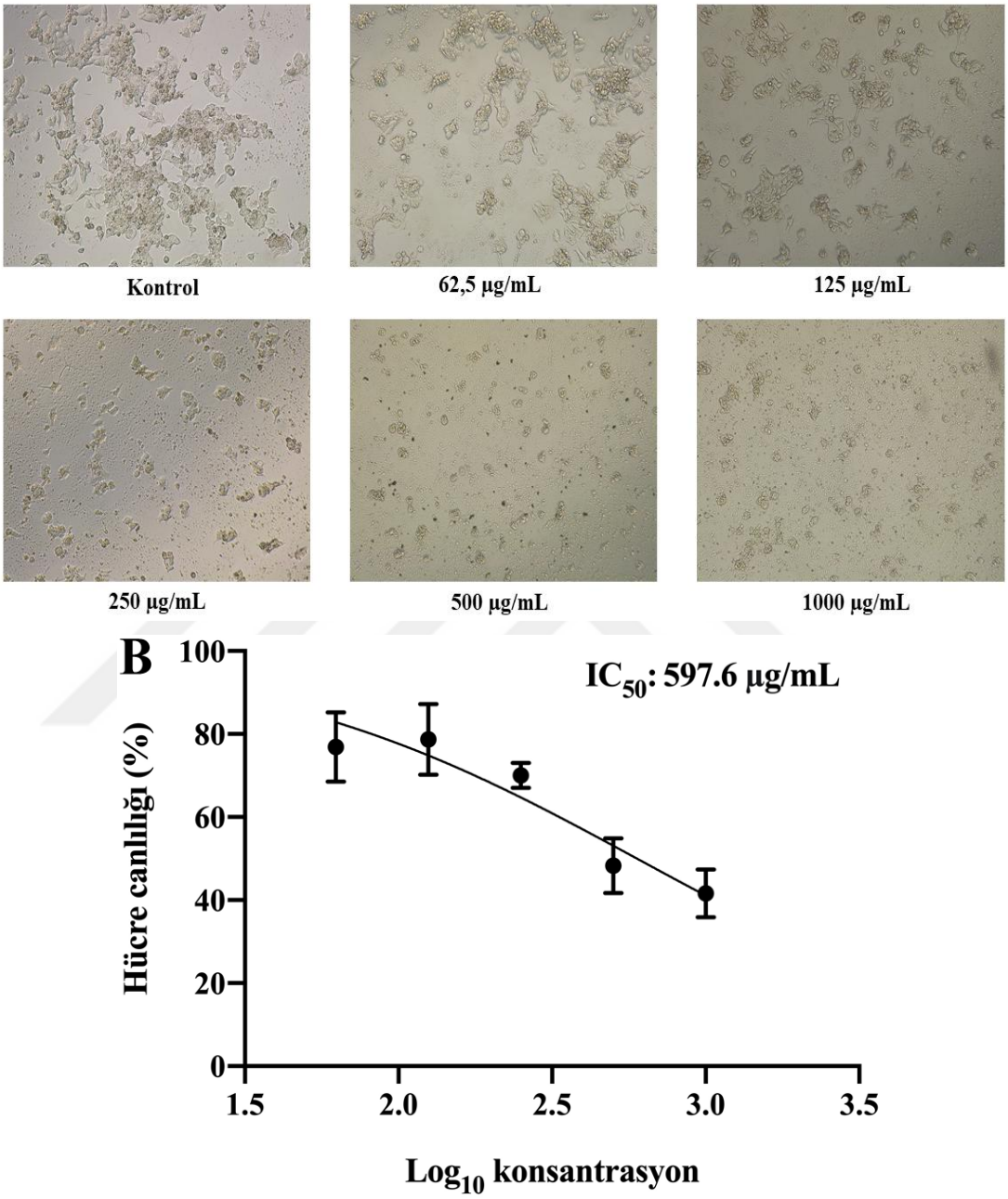
olarak bulunmuştur. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} grafiği Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Etil asetat ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri

Onopordum tauricum bitkisinin etanol ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisine bakıldığında, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %41,6±5,8'unun canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise hücrelerin %48,3±6,6'sinin canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri ise 597,6

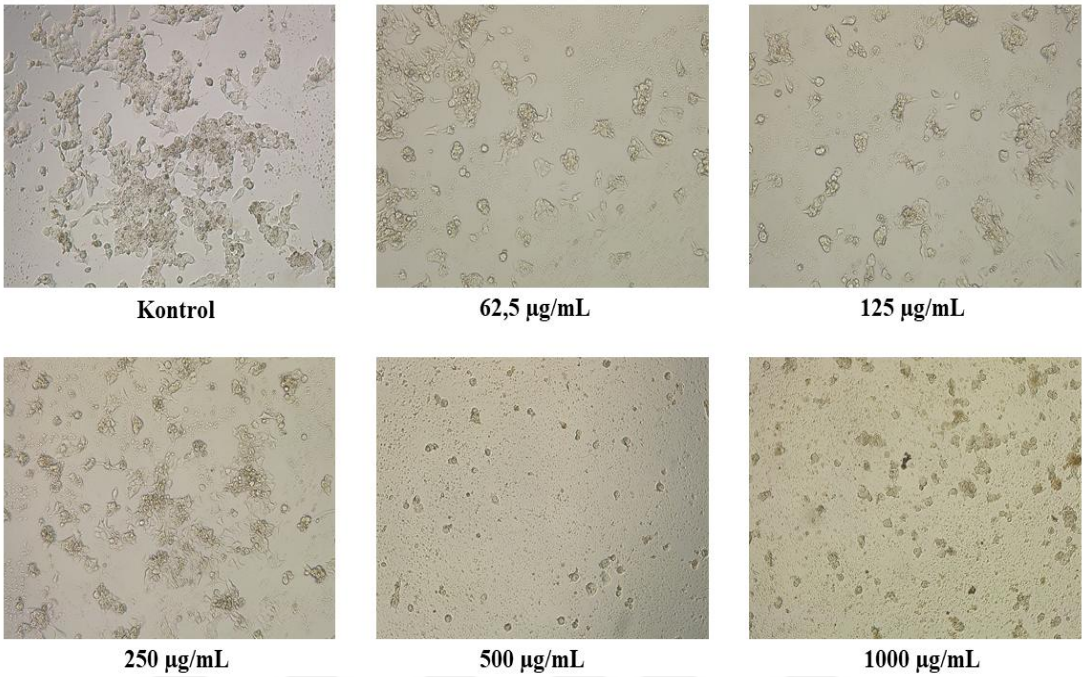
µg/mL olarak saptanmıştır. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} grafiği Şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.6 Etanol ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve IC_{50} değeri

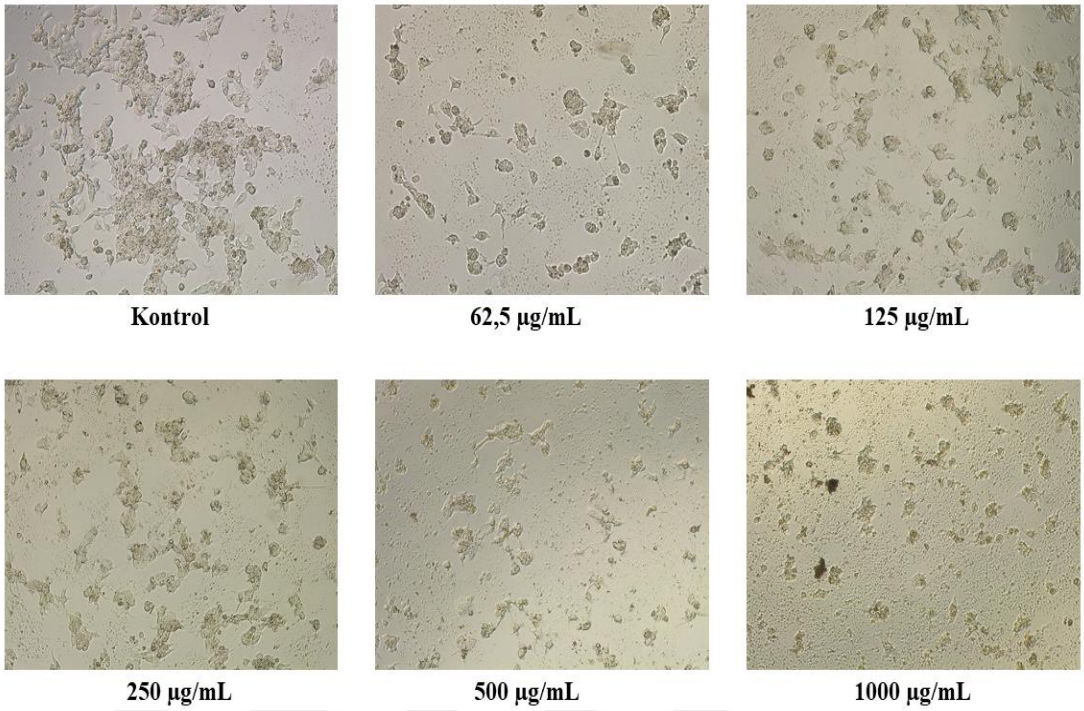
Onopordum tauricum bitkisinin etanol-su ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisine bakıldığında, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %69,5±11,4'ünün canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise hücrelerin %71,8±0,8'sının canlı kaldığı tespit edilmiştir. IC_{50} değeri ise > 1000

µg/mL olarak saptanmıştır. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

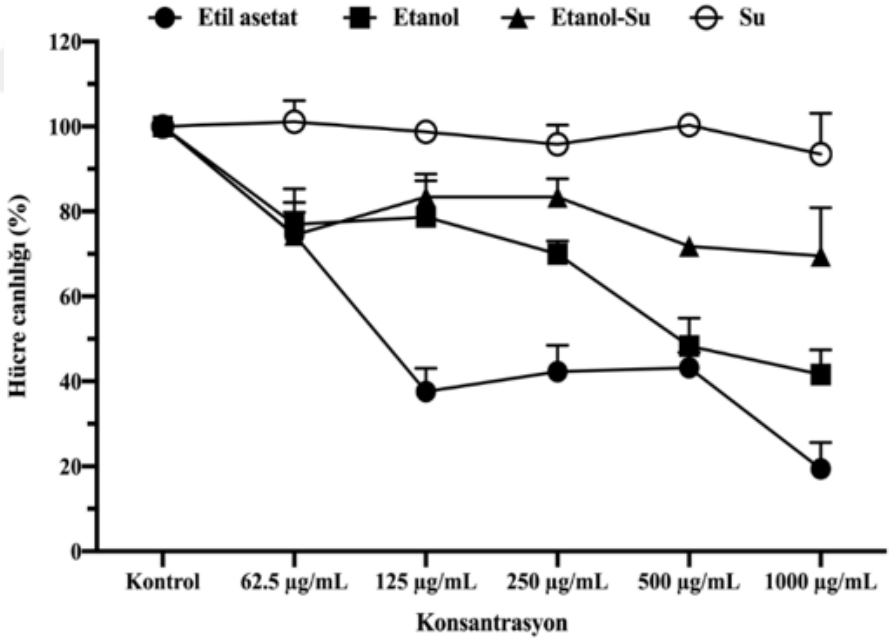


Şekil 4.7 Etanol-su ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri.

Onopordum tauricum bitkisinin su ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat sonundaki etkisi değerlendirildiğinde, 1000 µg/mL konsantrasyonda hücrelerin %93,5±9,6'ünün canlı kaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerin 48. saat sonundaki morfolojik görüntüleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Su ekstraktının IC_{50} değeri ise > 1000 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8 Su ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücre hattının 48 saat sonundaki morfolojik görüntüleri



Grafik 4.2 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde yüzde (%) canlılık oranları. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 4.2 *Onopordum tauricum* ekstraktlarının farklı derişimlerde, 48 saat sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde, hücre canlılık oranı değerleri. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

Canlılık Oranı (%)				
Derişim	**Etil asetat**	**Etanol**	**Etanol-su**	**Su**
Kontrol	100±0,0	100±0,0	100±0,0	100±0,0
62,5 µg/mL	74,5±5,3	76,9±8,4	74,4±7,7	101,9±5,0
125 µg/mL	37,6±5,5	78,7±8,5	83,4±5,4	98,7±1,9
250 µg/mL	42,3±6,2	70±3,0	83,4±4,3	95,8±4,5
500 µg/mL	43,2±3,6	48,3±6,6	71,8±0,8	100,3±2,3
1000 µg/mL	19,4±6,2	41,6±5,8	69,5±11,4	93,5±9,6

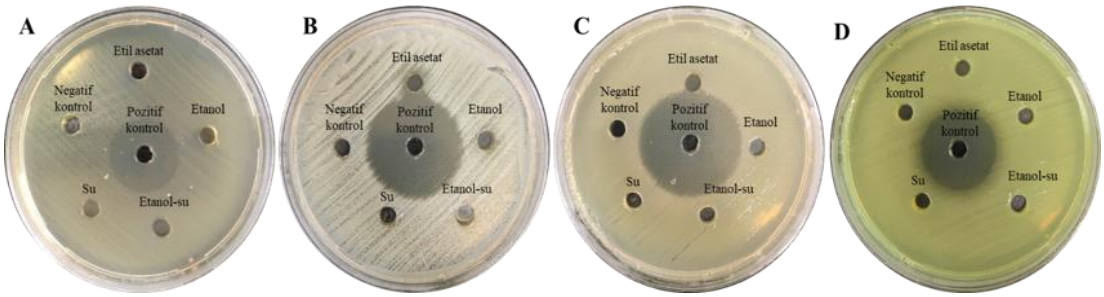
Ekstraktların 48. saatte, MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildiğinde en düşük hücre canlılığının ve IC_{50} değerinin etil asetat ekstraktına ait olduğu belirlenmiştir. Diğer ekstraktlar ile karşılaştırıldığında; etanol, etanol-su ekstraktlarının hücre canlılığına daha az etki ettiği tespit edilmiştir. Su ekstraktının ise hücre canlılığına en az etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Tüm ekstraktların hücre canlılığı üzerine etkisi, Grafik 4.2'de gösterilmiştir. Hücre canlılık oranları ise, yüzdesel (%) olarak Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

4.2 Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Ekstraktların antimikrobiyal etkinliği agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılmıştır.

4.2.1 Agar Kuyucuk Difüzyon Test

Onopordum tauricum'un toprak üstü kısımlarının hazırlanan etil asetat, etanol, etanol-su ve su ekstraktlarının dört gram negatif, üç gram pozitif bakteri ve bir maya olmak üzere toplam sekiz suş (Tablo 3.1) üzerine antimikrobiyal aktivite etkinlikleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneyine yönelik temsili görseller Şekil 4.9 'da gösterilmiştir. Sonuç olarak test edilen konsantrasyonda (1000 µg/kuyucuk) antimikrobiyal aktivite etkinliği saptanmamıştır. Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) Tablo 4.3'de özetlenmiştir.



Şekil 4.9 Agar kuyucuk diffüzyon test sonuçları (A: *Enterococcus faecalis*, B: *Staphylococcus aureus*, C: *Salmonella Typhimurium*, D: *Pseudomonas aeruginosa*)

Tablo 4.3 Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm).

	Test Mikroorganizmaları							
Test Materyali	***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	***Escherichia coli* ATCC 25922**	***Salmonella Typhimurium* ATCC 14028**	***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	***Candida albicans* ATCC 10231**
Etil asetat ekstraktı (1000 µg/kuyucuk)	0	0	0	0	0	0	0	0
Etanol ekstraktı (1000 µg/kuyucuk)	0	0	0	0	0	0	0	0
Etanol–su ekstraktı (1000 µg/kuyucuk)	0	0	0	0	0	0	0	0
Su ekstraktı (1000 µg/kuyucuk)	0	0	0	0	0	0	0	0
Levofloksasin (5 µg/kuyucuk)	36	21	31	35	33	36	25	–
Nistatin (100 U/kuyucuk)	–	–	–	–	–	–	–	23
(-) Çalışılmadı								

4.2.2 Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Bu çalışmada, *Onopordum tauricum*'un toprak üstü kısımlarının hazırlanan etil asetat, etanol, etanol-su ve su ekstraktlarının dört gram negatif, üç gram pozitif bakteri ve bir maya olmak üzere toplam sekiz suş üzerine antimikrobiyal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Ekstraktlar 1000–31,25 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir.

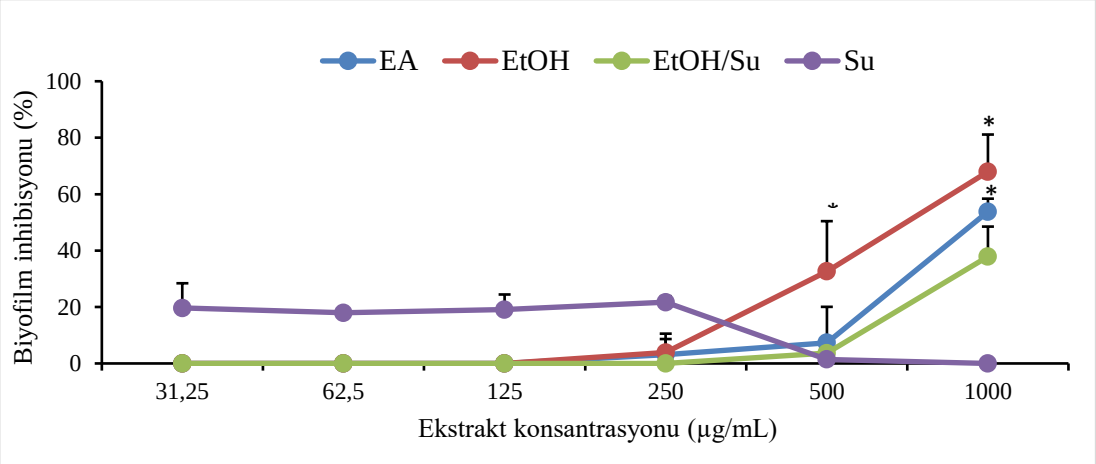
Elde edilen sonuçlara göre, ekstraktların çalışılan bu suşlara karşı test edilen konsantrasyon aralığında antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiş; bu mikroorganizmalar için MİK değerleri >1000 µg/mL olarak saptanmıştır.

Pozitif kontrol olarak kullanılan levofloksasin, test edilen bakteriyel suşlara karşı beklenen şekilde düşük MİK değerleri göstermiştir. Negatif kontrol kuyucuklarında ise mikroorganizma üremesi gözlenmiştir.

4.3 Anti-Biyofilm Aktivite Deneyleri Bulguları

4.3.1 Biyofilm İnhibisyon Deneyi Bulguları

Onopordum tauricum bitkisinin toprak üstü ekstraktları, biyofilm oluşturan bakterilerden biri olan *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde test edilerek biyofilm oluşum inhibisyon aktivitesi kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır.



Grafik 4.3 *O. tauricum* ekstaktlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon etkinliği. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir. * p<0,05

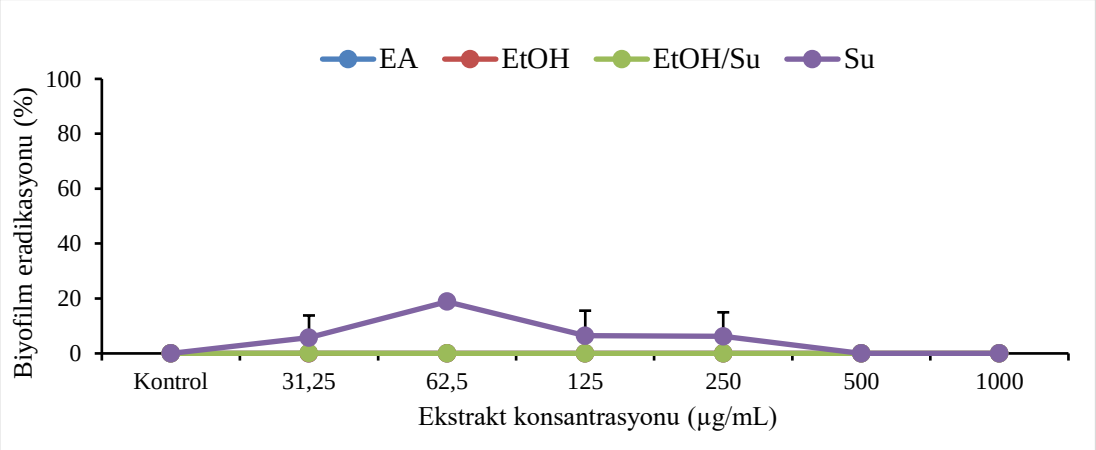
Tüm ekstraktlar ile beş farklı biyofilm inhibisyon testi gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar ortalama olarak hesaplanmıştır. 1000 µg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktı %68; etil asetat ekstraktı %53,8 ve etanol su ekstaktı %37,9 oranında biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Su ekstraktının 31,25; 62,5; 125 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında biyofilm formasyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde, Mann-Whitney U testi ile kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmişken ($p < 0,05$), parametrik testlerde (bağımsız örneklem t-testi) bu

farklılıklar anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte; 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında su ekstraktı, biyofilm formasyonunu anlamlı düzeyde teşvik etmiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyonların biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etkide bulunduğunu göstermektedir (Grafik 4.3).

4.3.2 Biyofilm Eradikasyon Deneyi Bulguları

Onopordum tauricum bitkisinin toprak üstü ekstraktları *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde test edilerek biyofilm eradikasyon aktivitesi kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır.

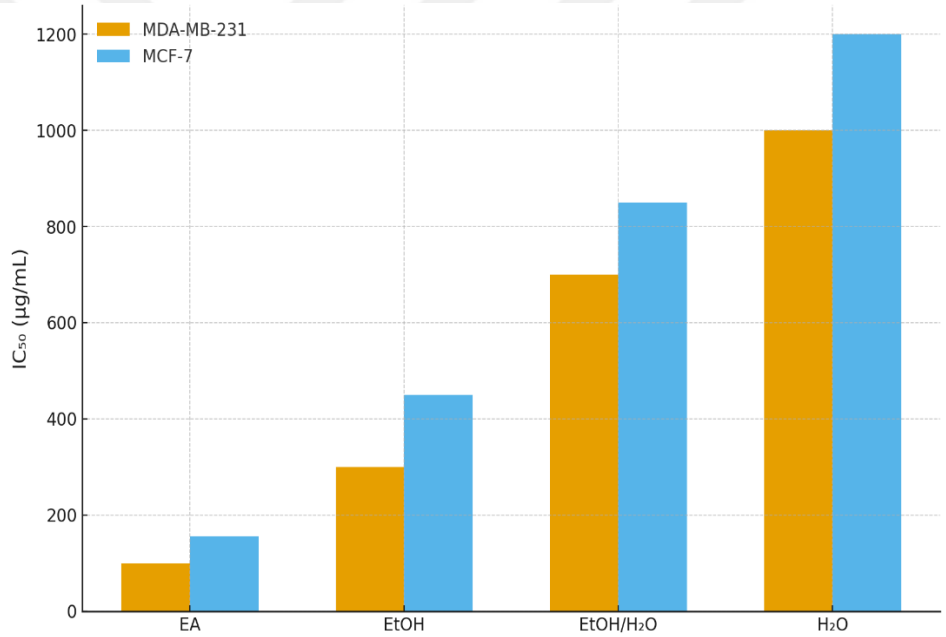
Tüm ekstraktlar ile beş farklı biyofilm eredikasyon testi gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar ortalama olarak hesaplanmıştır. Etil asetat, etanol ve etanol-su ekstratlarında biyofilm eredikasyon özelliği saptanamamıştır. Sadece su ekstratının 62,5 µg/mL konsantrasyonda %18,8 oranında biyofilm eredikasyon özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Su ekstraktının 31,25 µg/mL; 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında biyofilm eradikasyon oranları sırasıyla %5,7; %6,5 ve %6,2 olarak tespit edilmiştir. (Grafik 4.4)



Grafik 4.4 *O. tauricum* ekstaktlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm eredikasyon etkinliği. Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında *Onopordum tauricum*'un topraküstü ekstraktları arasında en güçlü sitotoksik yanıtın etil asetat (EA) ekstraktında yoğunlaştığı (MDA-MB-231 için IC_{50} ≈ 99,4 µg/mL; MCF-7 için IC_{50} ≈ 155,9 µg/mL), etanolün orta, etanol/su'nun zayıf, su ekstraktının ise 1 mg/mL düzeyinde dahi sınırlı etki gösterdiği bulunmuştur. Bu ekstrakt-bağımlı desen, *Onopordum* cinsi ve geniş Asteraceae literatüründeki yarı-polar ekstraktlarda zenginleşen seskiterpen laktonlar (SL) ve eşlik eden flavonoid/fenoliklerin antikanser aktivitesi ile uyumludur (Formisano vd., 2017; Garsiya vd., 2019b; Molnár vd., 2016; Salama vd., 2011).



Grafik 5.1 EA, EtOH, EtOH/H_2O ve H_2O ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki IC_{50} (µg/mL) değerleri. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin, kullanılan çözücü tipine ve hücre hattına bağlı olarak farklılık gösterdiği görülmektedir

Bu çalışmada elde edilen sitotoksisite sonuçları, ekstraksiyonda kullanılan çözücü tipinin hücre hatları üzerindeki biyolojik etkilerle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Grafik 5.1). EA ve EtOH ekstraktlarının her iki hücre hattında da görece daha düşük IC_{50} değerleri göstermesi, bu çözücülerin sitotoksik etkiyle ilişkili bileşenleri daha etkin şekilde ekstrakte etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, EtOH/H_2O ve H_2O ekstraktlarında daha yüksek IC_{50} değerlerinin belirlenmesi, bu ekstraktların sitotoksik etkilerinin daha sınırlı olabileceğine işaret

etmektedir. Bu farklılıkların, ekstraktların kimyasal içeriklerindeki çözücüye ve çözücünün polaritesine bağlı değişimlerle ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

Hücre hatları arasında gözlenen yanıt farklılıkları da dikkate değerdir. MCF-7 hücre hattında genel olarak MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla daha yüksek IC_{50} değerlerinin saptanması (Şekil 4.10), hücre hatlarının biyolojik özellikleri ve ekstraktlara karşı duyarlılıklarının farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmada elde edilen bulgular söz konusu farklılıkların mekanizmasına ilişkin doğrudan bir çıkarım yapılmasına olanak tanımamaktadır. Benzer şekilde, literatürde bitkisel ekstraktların biyolojik aktivitelerinin ekstraksiyon çözücüsüne bağlı olarak değişebildiği bildirilmiştir.

Onopordum acanthium üzerinde yeşil sentezli gümüş nanoparçacıklarının (AgNPs-OAL) MDA-MB-231'de reaktif oksijen türleri (ROS) artışı ve apoptotik yolakları tetikleyerek anlamlı sitotoksisite oluşturduğu, benzer biçimde kaynaklı AgClNP'lerin MDA-MB-232 hücrelerinde apoptotik ölüm ve ROS artışıyla etkili olduğu gösterilmiştir ; ham yaprak ekstraktı U-373 glioblastoma hattında ≈ 309 µg/mL IC_{50} ile sitotoksik bulunurken, *in vitro* HL-60 modelinde saf SL'lerin (ör. zaluzanin/artekanin türevleri) µM ölçeğinde belirgin antiproliferatif etkiler verdiği bildirilmiştir (Delalat vd., 2022). Mevcut çalışmada EA ekstraktının MDA-MB-231'de MCF-7'den daha düşük IC_{50} üretmesi, üçlü negatif fenotipte sık aktive olan NF-κB/STAT3 ekseninin SL-türevli alkilleyici baskıya duyarlılığı ve yarı-polar lipofilik bileşenlerin membran geçirgenliği/ hedefe erişimiyle tutarlıdır; söz konusu mekanistik çerçeve, *Onopordum*'un farklı hücre modellerinde gözlenen apoptoz-odaklı etkileriyle kesişmektedir (Delalat vd., 2022; Shahcheraghi vd., 2022). Ayrıca, *O. tauricum* yapraklarının kloroform ından on farklı SL'in (bir yeni elamanolid ve dört yeni eudesmanolid dâhil) izole edilmiş olması, çalışmamızda EA ekstraktında gözlenen gücün kimyasal zeminini doğrudan desteklemektedir; yarı-polar çözücülerle (kloroform/EA) zenginleşen bu iskeletler, Asteraceae'de antikanser aktivitenin ana "kimyasal imzası"dır (Miski vd., 1988). Bilgimiz dâhilinde, bu tez çalışması *O. tauricum*'un insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik/biyolojik etkilerini sistematik biçimde değerlendiren ilk çalışma niteliğindedir ve *Onopordum* literatürüne tür-özgül yeni veriler eklemektedir.

AgNPs-OAL ve AgClNP çalışmalarında ROS üretiminin artması, Bax ekspresyonunun yükselmesi, CAD aktivasyonu ve sub-G1 faz genişlemesiyle tanımlanan mitokondri-aracılı apoptoz belirteçleri meme kanseri hücrelerinde tekrar tekrar doğrulanmıştır (Delalat vd., 2022; Shahcheraghi vd., 2022). SL'lerin α-metilen-γ-lakton fonksiyonel grubuyla nükleofilik protein hedefleri (ör. NF-κB p65) alkilleyerek pro-apoptotik yanıt doğurması, hem nanoparçacık çalışmalarındaki ROS/kaspaz bulgularıyla hem de HL-60 modelinde Bax/Bcl-2 dengesinin tümör aleyhine kayması ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin baskılanmasıyla tutarlıdır (Molnár vd., 2016). Ayrıca *O. acanthium*'a ilişkin bazı çalışmalar, metanolik yaprak ının kaspaz-3 aracılı pro-apoptotik aktivitesiyle ilişkili sitotoksisite mekanizmasını vurgulayarak bu ekseni desteklemektedir (Abusamra vd., 2015; Garsiya vd., 2019b). Bu tez çalışmasında EA ekstraktının iki farklı meme kanseri alt tipinde (TNBC MDA-MB-231 ve ER^+/PR^+ MCF-7) gözlenen güçlü sitotoksisitesi, *O. tauricum*'da da benzer bileşen sınıflarının (SL + flavonoid) etkin olabileceğini düşündürmüştür; bu yorumu Asteraceae'de yarı-polar larda SL/flavonoid zenginliği ve Onopordum'un antikanser çalışmaları birlikte desteklemektedir (Garsiya vd., 2019b; Molnár vd., 2016). İlaveten, ROS-odaklı hücre ölüm programının, yüksek bazal oksidatif stres düzeylerine ve invazif fenotipe sahip MDA-MB-231 gibi hücre hatlarında daha geniş bir "terapötik pencere" sağlayabileceği; buna karşılık, antioksidan tampon kapasitesi yüksek olan ER^+ hücre hatlarında (ör. MCF-7) benzer dozlarda daha ılımlı bir yanıtın ortaya çıkmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez, ileride gerçekleştirilecek antioksidan kurtarma (N-asetilsistein), mitokondriyel ROS inhibitörleri (Mito-TEMPO) ve kaspaz inhibitörleri (z-VAD-fmk) kullanılarak yapılacak tersine-çevrim deneyleriyle sınanabilir.

Onopordum cynarocephalum etanolik ekstraktı, kolorektal kanser modellerinde (HCT-116 [p53 wt] ve HT-29 [p53 mut]) apoptozu uyarmıştır; p53-yabanıl tip hücrelerin daha duyarlı olduğu gösterilmiştir ve 1,2-dimetilhidrazin modeli üzerinde *in vivo* tümör yükünde ≈ %64 azalma raporlanmıştır (El-Najjar vd., 2007). Bu iki bulgu, p53 durumunun *Onopordum* fenolik/terpenik imzasına verilen yanıtı etkileyebileceğini ve yabanıl p53 arka planında apoptoz yanıtının daha belirgin olabileceğini düşündürür. Meme kanserinde MDA-MB-231 (p53 mut) ile MCF-7 (p53 wt) arasındaki duyarlılık farkında p53 tek belirleyici değildir; NF-κB/STAT3

aktivasyon düzeyi, antioksidan tampon kapasitesi ve adezyon-migrasyon fenotipi de EA ekstraktına yanıtı şekillendirebilir. Bununla birlikte kolon kanser verileri, *Onopordum* bileşenlerinin p53-bağımlı/bağımsız apoptoz yollarını eşzamanlı etkileyebildiğine işaret eder; bu, farklı meme kanseri alt tiplerinde gözlenen IC_{50} ayrışmasını açıklamaya katkı sağlar. Bu perspektife ek olarak, p53-bağımsız stres tepkilerinde merkezi role sahip MAPK (JNK/p38) ve keza STAT3/NF-κB eksenlerinin SL'lere duyarlılığı, TNBC'de hedefe erişimi kolaylaştırabilir; fosfo-JNK/p38, fosfo-STAT3 ve IκBα bozunumu gibi göstergelerin EA-maruziyeti sonrasında doğrulanması, hat-özgül farklılıkları mekanistik düzeyde ayırdetmeyi mümkün kılacaktır (Bai vd., 2016; Chun vd., 2015; Cui vd., 2018)**.**

HL-60'ta 3,6–13,5 µM aralığında rapor edilen saf SL'lerin gücü, ham lara kıyasla beklenen biçimde daha yüksektir (Molnár vd., 2016); bu fark, etkin bileşik derişiminin ham larda düşük olmasına, taşıyıcı matriksin hücre içine giriş/hücre içi hedeflere erişimi sınırlamasına ve çoklu bileşen sinyallerinin karşılıklı antagonizmasına bağlanabilir. U-373 üzerinde 80% metanolik *O. acanthium* ekstraktı için $IC_{50} \approx 309$ µg/mL ölçülmesi (Abusamra vd., 2015), ham larda yüzlerce µg/mL mertebesinin tipik olduğunu; buna karşı mevcut çalışmada EA ekstraktının TNBC hattında ≈ 100 µg/mL düzeyine inebilmesinin etkin bileşenlerin zenginleştiğini düşündürmüştür. Nanoparçacık çalışmalarında gözlenen daha güçlü/hızlı etkiler ise gümüş çekirdeğin kendine özgü redoks reaktivitesinin bitki-türevi kaplayıcılarla birleşmesinden kaynaklanır (Delalat vd., 2022); bu platformlar *O. tauricum* için doğrudan birebir karşılaştırma olmamakla birlikte, ROS-ağırlıklı ölüm programının *Onopordum* kimyasıyla sinerjik biçimde devreye girebileceğini işaret eder. Buna paralel, *O. leptolepis* üzerinde GC-MS ile tanımlanan neo-oleanan triterpenleri ve fenolik/alkaloid bileşikleri, antioksidan kapasiteyle birlikte Caco2 hattında antiproliferatif bir etki profili göstermiştir (Mirzaei vd., 2018); bu durum, SL-dışı bileşenlerin de (triterpen/alkaloid) bağlam-bağımlı katkı sağlayabileceğini ve ekstrakt kompozisyonunun IC_{50} ölçeğini anlamlı biçimde etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Türler arası veriler, *Onopordum* cinsinde ortak bir "çekirdek" fitokimyasal motife işaret eder: SL (onopordopikrin ve eudesmanolid/germakranolid türevleri), flavonoidler ve fenolik asitler; kimi türlerde triterpen/alkaloidler de tabloya eklenir

(Miski vd., 1988). *O. cynarocephalum*'da etanolik ın p53/p21 eksenini aktive ederek hem *in vitro* apoptoz hem de *in vivo* tümör azalması sağlaması (El-Najjar vd., 2007), *O. leptolepis*'te fenolik-triterpenik imzanın antiproliferatif fenotiple eşleşmesi (Mirzaei vd., 2018) ve *O. acanthium*'da ROS-kaspaz eksenine yerleşen güçlü etkiler (Delalat vd., 2022), bu tez EA ekstraktında bulunduğu düşünülen bileşiklerin (SL'ler, flavonoidler vb.) etkisi, literatürde diğer *Onopordum* türlerinde gösterilen mekanizmalarla uyumlu olduğundan, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların da kimyasal bileşim üzerinden açıklanması mantıklıdır. *O. tauricum*'un klasik fitokimyasal çalışmasında tanımlanan elamanolid/eudesmanolid içeriği (Miski vd., 1988), mevcut çalışmadaki EA üstünlüğünün SL-zenginleşmesi ile açıklanabileceğini göstermektedir; buna karşı hidrofilik ekstraktların (EtOH/H_2O; H_2O) fenolik şekerler/inülin gibi daha çok antioksidan-destekleyici ancak doğrudan sitotoksik etkisi sınırlı bileşenlerce baskılanması beklenir. Ek olarak, SL'lerin yapısal motif-etki ilişkisi (α-metilen-γ-lakton ve α,β-doymamış karbonil), NF-κB/STAT3 baskılanması ve redoks-duyarlı sinyaller üzerinden antiproliferatif çıktılar verme eğilimini açıklar; bu sınıfın farmakofor özellikleri Asteraceae genelinde kapsamlı biçimde tanımlanmıştır ve *O. tauricum'daki* lakton profili bu çerçeveye iyi oturmaktadır (Olesińska, 2018).

Toplam tablo, *O. tauricum*'un özellikle EA ekstraktında yoğunlaşan bileşenlerle apoptoz-odaklı bir antikanser potansiyel taşıdığını; bu potansiyelin TNBC fenotipinde (MDA-MB-231) daha belirgin hale gelebildiğini düşündürür. *O. acanthium*'da AgNP/AgClNP platformlarının ROS-kaspaz eksenini güçlü biçimde tetiklediği bulgusu (Delalat vd., 2022; Shahcheraghi vd., 2022) , *O. tauricum* için de ROS/mitokondri/kaspaz hattında hedef-doğrulama gerekliliğine işaret eder (Annexin V/PI, kaspaz-3/7 aktivitesi, Δψm-JC-1, ROS-DCF-DA, PARP kırılması ve hücre döngüsü profillemesi). Buna ek olarak, hedef-bağımlı "kimyasal biyogösterge" doğrulamaları—örneğin NF-κB p65 nükleer translokasyonunun immünofloresanla, STAT3 Tyr705 fosforilasyonunun Western blot ile, JNK/p38 aktivasyonunun fosfo-özgül antikorlarla izlenmesi—alt-tip-özgül duyarlılık farklarını mekanistik düzeyde açıklığa kavuşturacaktır. *O. cynarocephalum* verilerinin işaret ettiği p53 duyarlılığı (El-Najjar vd., 2007) göz önünde bulundurularak p53-durumuna göre alt-tip-özgül yanıtların sistematik değerlendirilmesi, seçicilik indeksinin (ör. MCF-10A/HEK293

gibi normal hatlarla) belirlenmesi ve biyoyönlendirilmiş fraksiyonlamayla majör SL/flavonoidlerin LC-MS/MS tabanlı tanımlanması rasyonel görünmektedir. İzole edilen aday bileşiklerin (veya zengin fraksiyonların) anti-invazyon/migrasyon (wound-healing, Transwell) ve klonojenik testlerle değerlendirilmesi, *in vivo* doğrulamaya geçiş için gerekli kanıt tabanını güçlendirecektir. Son olarak, klinik-öncesi stratejide "kombinasyon mantığı" da dikkate değerdir; SL-zengin fraksiyonların, DNA hasar yanıtını hedefleyen ajanlar (örn. doksorubisin) veya redoks ortamını modüle eden bileşiklerle (örn. sulforafan) alt-optimal dozlarda birleştirilmesi; ekstraktın NF-κB/STAT3 baskılayıcı etkisiyle kemorezistans yollarını eşzamanlı kırma potansiyeli taşıyabilir. Bu yaklaşım, ekstraktın tek başına bakterisidal olmayan ancak virülans modülatörü rolüyle antibiyotik adjuvanı olabilmesi analojisinin onkolojiye yansıması olarak görülebilir ve sistematik ekstrakt-ilaç "checkerboard" sinerji taramalarıyla test edilmelidir. Bu çerçevede, *O. tauricum*'un hem tümör hücreleri hem de patojen biyofilmleri üzerindeki etkilerinin aynı fitokimyasal havuzdan (SL'ler, flavonoidler, triterpenler) kaynaklanıp kaynaklanmadığının, ortak hedefler (örn. redoks-duyarlı sinyal yolları, membran bütünlüğü, protein alkilasyonu) üzerinden karşılaştırmalı olarak incelenmesi ileride önemli bir araştırma ekseni oluşturacaktır.

O. tauricum'da EA ekstraktının MDA-MB-231 ve MCF-7 üzerinde sergilediği belirgin sitotoksisite, *Onopordum* cinsinde farklı modellerde belgelenen ROS-aracılı apoptoz ve SL/flavonoid odaklı antiproliferatif mekanizmalarla aynı eksene yerleşmektedir. Türler ve platformlar arası farklılıklar (ham –saf bileşik– nanoparçacık) IC_{50} ölçeğinde değişkenlik yaratsa da, ortak mekanistik payda mitokondri-kaspaz hattıdır. Bu bağlamda *O. tauricum* EA ekstraktı, ekstrakt-bileşen tanımlaması, hedef bağlı doğrulama ve seçicilik indeksinin ortaya konması sonrasında, özellikle TNBC gibi tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu alt tiplerde "kurşun bileşik" keşfi için güçlü bir adaydır.

Bu tez çalışmasında *Onopordum tauricum*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen dört farklı ın (EA, EtOH, EtOH-su, su) geniş bir panelde (dört Gram-negatif, üç Gram-pozitif bakteri ve *Candida albicans*) klasik agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle test edilmesine rağmen, çalışılan konsantrasyon

aralığında (1000 µg/kuyucuk; 62,5–1000 µg/mL) belirgin bir antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır. Buna karşın, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde kristal viyole yöntemiyle değerlendirilen biyofilm oluşumu ve eradikasyonu açısından özellikle etil asetat, etanol ve etanol-su larının inhibitör; su ının ise konsantrasyona bağlı çift yönlü (hem artırıcı hem azaltıcı) etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, *O. tauricum*'un klasik anlamda bakterisidal/bakteriyostatik bir ajan olmaktan ziyade, biyofilm dinamiklerini modüle eden bir fitokimyasal kaynak olabileceğine işaret etmektedir.

Elde edilen sonuçlar, *Onopordum* cinsine ait diğer türlerle kıyaslandığında dikkat çekici bir tür ve/veya kemotip farklılığına işaret etmektedir. *O. espinae* yaprak larında Njeh ve ark. (2017), hekzan ve etil asetat ekstraktlarının *Bacillus cereus, S. aureus* ve *E. faecalis* gibi Gram-pozitif bakterilere karşı 12–30 mm arasında değişen geniş inhibisyon zonları oluşturduğunu, buna karşın metanol ının inaktif olduğunu bildirmiştir (Njeh vd., 2017). Mevcut çalışmada EA ve EtOH larının 1000 µg/kuyucuk düzeyinde dahi benzer bir zon oluşturamaması, *O. tauricum*'un lipofilik ekstraktlarında *O. espinae*'de tanımlanan hispidulin ve dehydromelitensin-8-(4'-hydroxy-methacrylate) gibi güçlü antimikrobiyal flavonoid/terpenoidlerin ya daha düşük düzeyde bulunduğunu ya da farklı bir fitokimyasal profile sahip olduğunu düşündürmektedir. Aynı şekilde, Ürdün florasından *O. jordanicolum* çiçeklerinin etanolik ı, *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) dahil olmak üzere çoklu dirençli izolatlara karşı anlamlı MIC/MMC değerleriyle antibakteriyel aktivite sergilerken, aynı çalışmada *O. blancheanum* etanolik ının da *S. aureus, E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* üzerinde belirgin inhibisyon oluşturduğu bildirilmektedir (Obeidat, 2018). Bu literatür, *Onopordum* cinsi içinde antimikrobiyal aktivitenin türler ve hatta bitki organları arasında belirgin şekilde değişebildiğini ve *O. tauricum*'un bu açıdan nispeten "zayıf" bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır.

Onopordum cinsine ait diğer üyelerle ilgili veriler de bu farklılığı destekler niteliktedir. *O. acanthium* tohum metanol ının toplam fenolik içeriği 168,56 mg GAE/g düzeyinde bulunmuş ve özellikle *S. epidermidis* ve *Micrococcus luteus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivite (MIC: 0,612 mg/mL) sergilediği gösterilmiştir (Zare vd., 2014). Daha yakın tarihli bir çalışmada Parzhanova vd. (2023), *O. acanthium*'un farklı

organlarından hazırlanan etanol ve su larının fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan kapasitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ve bu ların Gram-pozitif bakterilere karşı orta–yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilediğini rapor etmiştir (Parzhanova vd., 2023). Bununla birlikte, hem Zare vd. hem de Parzhanova vd. çalışmalarında, Gram-negatif türlere (örneğin *E. coli, K. pneumoniae*) karşı etkinliğin sınırlı olduğu veya bazı ekstraktlarda tamamen kaybolduğu vurgulanmaktadır; bu durum çalışmamızda seçilen klinik öneme sahip Gram-negatif suşlarda (*E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae, Salmonella typhimurium*) aktivite gözlenmemesiyle uyumlu görünmektedir.

Benzer bir desen *O. caricum* için de bildirilmiştir (Ugur vd., 2011). Uğur vd. (2011), endemik *O. caricum*'un kloroform ve etanol larının çoklu antibiyotik dirençli *S. maltophilia* ve *S. aureus* suşlarını inhibe edebildiğini ve bu etkinin uçucu/yarı uçucu terpenik bileşenler ile fenoliklerin birlikte varlığıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Ugur vd., 2011). Buna karşın, bizim çalışmamızda kullanılan EA ve EtOH larının *S. aureus* ATCC suşlarında dahi zon oluşturmaması, *O. tauricum*'un bu tür lipofilik antimikrobiyal bileşenler bakımından daha fakir bir kemotip olabileceğini düşündürmektedir. Bu yorum, *O. tauricum*'un fitokimyasal profili üzerine yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada, türün özellikle çiçek başlarında prebiyotik fruktanlar ve inülin, fenolik asitler ve flavonoidler açısından zengin olmakla birlikte seskiterpen lakton repertuarının diğer *Onopordum* türlerine göre kısmen farklılaştığını ortaya koyan bulgularla da uyumludur (Miski vd., 1988; Obeidat, 2018; Parzhanova vd., 2023). Özellikle seskiterpen laktonların antimikrobiyal etkinliği, α-metilen-γ-lakton halkası gibi elektrofilik merkezlerin bakteriyel proteinlerle kovalent etkileşimine bağlı olduğundan, halka yapısı veya substitüsyon paternindeki küçük farklılıklar dahi aktivite profilini dramatik şekilde değiştirebilmektedir.

Bu bağlamda, *O. tauricum*'un antimikrobiyal açıdan "negatif" sonuçları, *Onopordum* cinsinin genel antimikrobiyal potansiyeliyle çelişmekten ziyade, cins içi kemotipik ve ekolojik varyasyonların önemini vurgulamaktadır. *O. bracteatum* üzerinde yapılan bir çalışmada, yaprak ve çiçek metanol/aseton larının çok yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile güçlü DPPH, ABTS, β-karoten/linoleik asit ve CUPRAC antioksidan aktiviteleri sergilediği; ancak doğrudan antimikrobiyal testlerin

yapılmadığı bildirilmiştir (Gasimova vd., 2024). Benzer şekilde, *O. nervosum* ssp. *platylepis* çiçek ları üzerinde yapılan çalışmada, yüksek fenolik/tanen içeriği ve güçlü antioksidan kapasiteye ek olarak mikrobiyolojik kalite testlerinin tatmin edici düzeyde olduğu, ancak özgül hedef patojenlere karşı sistematik bir antimikrobiyal değerlendirme yapılmadığı görülmektedir (Essaidi vd., 2023). Bu iki çalışma, fenolik zenginliğin çoğu zaman potansiyel antimikrobiyal aktivite için bir gösterge olarak ele alınsa da, her fenolik profili sergileyen *Onopordum* türünün doğrudan anlamlı bir antibiyotik benzeri etki göstermesinin beklenmemesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Mevcut tez çalışmasında elde edilen bulgular da, *O. tauricum*'un muhtemelen antioksidan ve prebiyotik niteliği baskın bir tür olduğunu ve klasik antimikrobiyal etkinlik açısından sınırlı bir profil sergilediğini desteklemektedir.

Tez çalışmasının sonuçları kullanılan yöntemlerin doğası açısından da değerlendirilmelidir. Agar kuyucuk difüzyon testi, düşük molekül ağırlıklı ve iyi difüze olabilen antibiyotikler için oldukça duyarlı iken, lipofilik, yüksek molekül ağırlıklı veya matriksle kompleks oluşturan bitkisel bileşiklerin aktivitesini olduğundan daha düşük gösterebilmektedir (Eloff, 2019; King vd., 2008). Nitekim Njeh vd. (2017), *O. espinae* etil asetat ekstraktında tespit ettikleri hispidulin türevlerinin antimikrobiyal etki göstermesine rağmen, metanol ekstraktının hem zayıf difüzyon hem de muhtemel antagonistik bileşenler nedeniyle inaktif bulunduğunu vurgulamıştır (Njeh vd., 2017). Mevcut tez çalışmasında agar difüzyonuna ek olarak sıvı mikrodilüsyonla MİK/MBK tayini yapılmış ve 62,5–1000 µg/mL aralığında üremenin inhibe edilmediği görülmüştür; bu durum, test edilen mikroorganizmalar için ların gerçekten de planktonik hücre düzeyinde anlamlı bir inhibitör konsantrasyona ulaşamadığını göstermektedir. Bununla birlikte, MİK altı konsantrasyonlarda saptanan biyofilm modülasyonunun, "antibiyotik olmayan" fitokimyasalların kronik enfeksiyonlar bağlamındaki önemini ön plana çıkardığı düşünülmelidir.

S. aureus ATCC 25923 suşunda kristal viyole yöntemiyle değerlendirilen biyofilm oluşum deneylerinde, 1000 µg/mL'de etanol ekstraktı %68, etil asetat ekstraktı yaklaşık %53,8 ve etanol-su ekstraktı %37,9 oranında biyofilm inhibisyonu sağlamıştır. Bu etkinin, planktonik üreme üzerinde belirgin bir baskı olmaksızın ortaya

çıkması, ların antibiyotik benzeri bakterisidal/bakteriyostatik etkiden çok, yüzey adezyonu, hücre–hücre etkileşimleri veya EPS matriks sentezi gibi biyofilm-özgül süreçleri hedef alabileceğini düşündürmektedir. Bitki kökenli polifenoller ve terpenoidlerin, özellikle Gram-pozitiflerde biyofilm oluşumunun erken basamaklarını baskıladığı, adezyon proteinlerinin (MSCRAMM'ler), otolizin/eDNA salınımının ve quorum-sensing sinyallerinin modülasyonu yoluyla etkili olabildiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Salinas vd., 2022; Ta ve Arnason, 2015); bu mekanizmalar *Onopordum* türlerinde henüz ayrıntılı olarak çalışılmamış olsa da, Asteraceae ailesine ait benzer polifenolik profiller taşıyan bitkilerin antibiyofilm özellikleri bu yorumu desteklemektedir.

Su ekstraktı için elde edilen sonuçlar, biyofilm biyolojisi açısından özellikle dikkat çekicidir. Düşük konsantrasyonda (62,5 µg/mL) su ı, önceden oluşmuş biyofilmin yaklaşık %18,8 oranında eradikasyonuna yol açarken, daha yüksek konsantrasyonlarda (500 ve 1000 µg/mL) biyofilm formasyonunu anlamlı ölçüde artırmıştır. Bu çift yönlü, doz bağımlı desen, fitokimyasalların biyofilm üzerinde sıklıkla gözlenen hormetik etkileriyle uyumludur. Fruktan ve inülin gibi prebiyotik polisakkaritlerce zengin olduğu bilinen *O. tauricum* çiçek ve yapraklarının (Petkova ve Mihaylova, 2016), yüksek konsantrasyonlarda *S. aureus* için ek bir karbon/kaynak sağlayarak biyofilm biyokütlesini artırabileceği; buna karşılık düşük konsantrasyonlarda matriksin fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek veya hücre–matriks etkileşimlerini zayıflatarak kısmi bir ayrışma yaratabileceği düşünülebilir. Ayrıca, su larının fenolik asit, küçük şeker türevleri ve organik asitler gibi daha hidrofilik bileşenleri içermesi; bu bileşenlerin pH, yüzey gerilimi veya iyonik güç üzerinden biyofilmi ince ama anlamlı biçimde etkileyebilmesi olasıdır. Bununla birlikte, bu çalışmada biyofilm eradikasyon oranlarının mutlak değeri nispeten düşük olduğundan (%20'nin altında), su ının tek başına "biyo-temizleyici" bir ajan olarak kullanımı yerine, antibiyotikler veya antiseptiklerle kombinasyon halinde sinerji potansiyelinin araştırılması daha gerçekçi bir yaklaşımdır.

Elde edilen antibiyofilm verileri, mevcut *Onopordum* literatüründe doğrudan karşılaştırılabilecek az sayıda çalışma bulunması nedeniyle özellikle özgün niteliktedir. O. *espinae*, *O. jordanicolum* veya *O. acanthium* üzerine yapılan

çalışmaların çoğu planktonik hücreler üzerindeki MIC/MBC parametrelerine odaklanmış; biyofilm oluşumu veya eradikasyonuna dair sistematik değerlendirmeler yapılmamıştır (Njeh vd., 2017; Obeidat, 2018; Parzhanova vd., 2023; Zare vd., 2014). Bu açıdan bakıldığında, *Onopordum* cinsinin antimikrobiyal potansiyelini sadece klasik MIC/zon ölçümleri üzerinden değerlendiren yaklaşımların eksik olduğu ve özellikle sağlık bakım ilişkili *S. aureus* enfeksiyonlarında biyofilm modülasyonunu hedefleyen yeni tasarımlarda *O. tauricum* gibi türlerin yeniden ele alınması gerektiği söylenebilir.

Sonuç olarak, bu çalışma *O. tauricum*'un, *Onopordum* cinsi içindeki bazı türlerin aksine, planktonik bakteriler üzerinde anlamlı bir antimikrobiyal aktivite sergilemediğini, ancak *S. aureus* biyofilmini modüle etme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. *O. espinae, O. jordanicolum, O. acanthium* ve *O. caricum* gibi türlerde bildirilen belirgin antibakteriyel etkilerle karşılaştırıldığında, *O. tauricum*'un daha çok prebiyotik ve antioksidan niteliği baskın, biyofilm oluşumuna müdahale eden ama doğrudan etki eden olmayan bir fitokimyasal profil sergilediği söylenebilir. Bu farklılık, *Onopordum* türlerinin terapötik potansiyelini değerlendirirken tür, organ, hazırlama yöntemi ve hedef mikroorganizma düzeyinde ince ayarlı bir yaklaşım benimsenmesi gerektiğini; ayrıca antimikrobiyal etkinliğin yalnızca "büyüme inhibisyonu" parametreleriyle değil, biyofilm ve virülans modülasyonu perspektifinden de ele alınmasının zorunlu olduğunu ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *Onopordum tauricum*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat (EA), etanol, etanol–su ve su larının, meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231, MCF-7) ile seçilmiş patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen temel sonuçlar şöyle özetlenebilir:

- EA ekstraktı, her iki meme kanseri hücre hattında da en güçlü sitotoksik etkiyi göstermiş; MDA-MB-231 hücrelerinde $IC_{50} \approx 99{,}4$ µg/mL, MCF-7 hücrelerinde $IC_{50} \approx 155{,}9$ µg/mL olarak hesaplanmıştır.

- Etanol ekstraktı orta düzeyde, etanol–su ekstraktı daha zayıf düzeyde sitotoksik etki sergilemiş; su ekstraktında ise 1000 µg/mL konsantrasyonda dahi belirgin bir azalma gözlenmemiş ve IC_{50} değeri > 1000 µg/mL bulunmuştur.

- Test edilen konsantrasyon aralığında (62,5–1000 µg/mL) lar, çalışılan Gram-pozitif/Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans* üzerinde klasik anlamda antimikrobiyal aktivite (zon oluşumu, MİK/MBK) göstermemiştir.

- Buna karşın, *S. aureus* ATCC 25923 suşunda biyofilm oluşumu üzerine yapılan çalışmalarda EA, etanol ve etanol–su ekstraktlarının, özellikle yüksek konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu anlamlı düzeyde inhibe ettiği belirlenmiştir.

- Su ekstraktı düşük konsantrasyonda sınırlı biyofilm eradikasyonu sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu artırıcı etki göstermiştir.

Bu bulgular, *O. tauricum*'un özellikle EA ekstraktında antikanser potansiyel taşıyan, antimikrobiyal açıdan ise planktonik hücrelerden ziyade biyofilm dinamiklerini modüle eden bir tür olabileceğini göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar, *O. tauricum*'un terapötik potansiyelinin daha net ortaya konulabilmesi için ileri düzey fitokimyasal ve mekanistik çalışmaların gerekliliğine

işaret etmektedir. Özellikle etil asetat ekstraktında yoğunlaştığı düşünülen seskiterpen laktonlar, flavonoidler ve diğer olası biyoaktif bileşiklerin LC–MS/MS ve NMR gibi yöntemlerle ayrıntılı olarak tanımlanması; antikanser ve antibiyofilm etkinliği en yüksek ekstraktların biyoyönlendirilmiş fraksiyonlama stratejileriyle zenginleştirilmesi ve majör bileşiklerin saflaştırılarak tekil düzeyde biyolojik olarak test edilmesi, sonraki çalışmalar için öncelikli adımlar arasında görülmelidir. Bu bileşiklerin apoptoz, hücre döngüsü, mitokondriyel yolaklar ve oksidatif stres üzerindeki etkilerinin Annexin V/PI boyaması, kaspaz aktivite analizleri, ROS ve hücre döngüsü profillemesi gibi yöntemlerle detaylandırılması; farklı meme kanseri alt tipleri ve normal hücre hatları kullanılarak seçicilik indeksinin ortaya konması, *O. tauricum* kaynaklı bileşiklerin antikanser "aday molekül" olarak rasyonel değerlendirilmesini mümkün kılacaktır.

Bu *in vitro* bulguları desteklemek amacıyla uygun hayvan modellerinde (örneğin MDA-MB-231 ksenograft modelleri) etil asetat ekstraktı ve/veya seçilen saf bileşiklerin antitümör etkinliğinin test edilmesi; eş zamanlı olarak akut ve mümkünse subkronik toksisite çalışmalarının yürütülerek vücut ağırlığı, hematolojik ve biyokimyasal parametreler ile organ histopatolojisi üzerinden güvenlilik profilinin belirlenmesi önerilmektedir. Elde edilecek bu veriler, *O. tauricum*'un farmakolojik açıdan klinik-öncesi değerlendirilebilir bir doğal ürün kaynağı olarak konumlandırılmasını destekleyebilecektir. Ayrıca, etil asetat ekstraktı veya izole bileşiklerin kemoterapötik ajanlarla (örneğin doksorubisin, paklitaksel vb.) düşük doz kombinasyonlarının *in vitro* modellerde test edilmesi; doz–yanıt ve checkerboard analizleri ile olası sinerjik ya da additif etkilerin gösterilmesi durumunda, özellikle tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu üçlü negatif meme kanseri gibi alt tiplerde "doğal ürün adjuvanı" yaklaşımının değerlendirilmesine bilimsel zemin sağlayacaktır.

Çalışmanın antimikrobiyal boyutunda elde edilen veriler, *O. tauricum*'un planktonik bakteriler üzerinde belirgin bir antibakteriyel etki göstermediğini, buna karşın *S. aureus* biyofilmi üzerinde modülatör bir rol üstlenebildiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda *S. aureus*'a ek olarak *S. epidermidis, P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* gibi klinik öneme sahip biyofilm oluşturan türlerle tek tür ve çok tür içeren biyofilm modelleri kurulması; *O. tauricum* ekstrakt ve bileşiklerinin biyofilm

oluşumu ve eradikasyonu üzerindeki etkilerinin tıbbi cihaz materyallerine özgü yüzey modellerinde değerlendirilmesi yerinde olacaktır. Bu kapsamda, antimikrobiyal etkinliği sınırlı olmakla birlikte biyofilm oluşumunu baskılayabilen ekstraktların, seçilmiş antibiyotiklerle MİK altı konsantrasyonlarda kombinasyon halinde test edilmesi; checkerboard ve zaman–öldürme çalışmaları ile antibiyotik etkinliğinin artışı, biyofilm biyokütlesinde azalma veya direnç gelişiminin yavaşlaması gibi sonuçların ortaya konulması, *O. tauricum*'un "antibiyotik adjuvanı" olarak kullanım potansiyeline ışık tutabilir.

Son olarak, *O. tauricum*'un halk hekimliğinde bildirilen kullanımlarına ilişkin etnobotanik bilgilerin sistematik olarak derlenmesi ve bu bilgilerin bu tez kapsamında elde edilen *in vitro* bulgularla birlikte değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Geleneksel kullanım şekilleri, süreleri ve doz aralıkları; olası bitki–ilaç etkileşimleri ve özellikle hassas gruplar (gebelik, emzirme, pediatrik ve geriatrik popülasyonlar, kronik hastalığı olan bireyler) açısından risk değerlendirmesi ile birlikte ele alınmalıdır. Tüm bu önerilerin hayata geçirilmesiyle, *O. tauricum*'un hem onkolojik uygulamalar hem de biyofilm ilişkili enfeksiyonların yönetimi bağlamında, bilimsel olarak tanımlanmış ve rasyonel biçimde değerlendirilebilen bir doğal ürün kaynağı haline gelmesi mümkün görünmektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında elde edilen bulgular, *Onopordum tauricum*'un şimdiye kadar büyük ölçüde ihmal edilmiş olan biyolojik potansiyelini hem antikanser aktivite hem de biyofilm modülasyonu ekseninde ilk kez sistematik biçimde ortaya koymuştur. Etil asetat ekstraktının özellikle meme kanseri modellerinde sergilediği belirgin sitotoksik etki ve *Staphylococcus aureus* biyofilmi üzerinde gözlenen düzenleyici rolü, bu türün yalnızca geleneksel kullanımla sınırlı kalmayıp, güncel farmakolojik araştırmalar için de dikkate alınması gereken bir fitokimyasal kaynak olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, antimikrobiyal açıdan klasik anlamda güçlü bir planktonik büyüme inhibitörü profilinin saptanmamış olması, *O. tauricum*'un daha çok hedefe yönelik, bağlama duyarlı ve çok bileşenli etki mekanizmalarına sahip olabileceğine işaret etmekte; bu durum, doğal ürün araştırmalarında tek boyutlu etkinlik ölçütleri yerine, çok katmanlı ve mekanizma odaklı değerlendirme yaklaşımının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu

çalışma ile oluşturulan veriler ve önerilen araştırma eksenleri, *O. tauricum*'un ileride yürütülecek fitokimyasal, farmakolojik ve toksikolojik çalışmalar için sağlam bir başlangıç noktası sunmakta; böylece türün hem bilimsel hem de potansiyel klinik ve/veya endüstriyel uygulamalar açısından daha kapsamlı ve rasyonel bir çerçevede ele alınabilmesinin yolunu açmaktadır.

KAYNAKLAR

Abbott, I., McMullan, B., Merlino, J., Sandaradura, I., Sehu, M. & Su, Y. (2012). Update on antimicrobial resistance: mechanisms, methods and practice. *Pathology*, *44*. https://doi.org/10.1016/s0031-3025(16)32718-0

Abusamra, Y. A.-K., Scuruchi, M., Habibatni, S., Maammeri, Z., Benayache, S., D'Ascola, A., Avenoso, A., Campo, G. M. & Spina, E. (2015). Evaluation of putative cytotoxic activity of crude extracts from Onopordum acanthium leaves and Spartium junceum flowers against the U-373 glioblastoma cell line. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *28*(4).

Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A. & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, *2*, 100081.

Al-Snafi, A. E. (2020). Constituents and pharmacology of Onopordum acanthium. *IOSR Journal of Pharmacy*, *202*(10), 3.

Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M. & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*, *3*(3), 3279-3330.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S. & Heiss, E. H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, *33*(8), 1582-1614.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M. & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, *20*(3), 200-216.

Bağcı, Y., Erdoğan, R. & Doğu, S. (2016). Sarıveliler (Karaman) ve çevresinde yetişen bitkilerin etnobotanik özellikleri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, *42*(1), 84-107.

Bai, Y., Zhu, W., Hu, X., Sun, C., Li, Y., Wang, D., Wang, Q., Pei, G., Zhang, Y., Guo, A., Zhao, H., Lu, H., Mu, X., Hu, J., Zhou, X. & Xie, C. G. (2016). Genome-Wide Analysis of the bZIP Gene Family Identifies Two ABI5-Like bZIP Transcription Factors, BrABI5a and BrABI5b, as Positive Modulators of ABA Signalling in Chinese Cabbage. *PLoS One*, *11*(7), e0158966. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158966

Beloin, C., Renard, S., Ghigo, J.-M. & Lebeaux, D. (2014). Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Current opinion in pharmacology*, *18*, 61-68.

Ben Amira, A., Besbes, S., Attia, H. & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese

making: A review. *International Journal of Food Properties*, *20*(sup1), S76-S93.

Bentke-Imiolek, A., Szlęzak, D., Zarzycka, M., Wróbel, M. & Bronowicka-Adamska, P. (2024). S-Allyl-L-cysteine affects cell proliferation and expression of H2S-synthetizing enzymes in MCF-7 and MDA-MB-231 adenocarcinoma cell lines. *Biomolecules*, *14*(2), 188.

Bhardwaj, S., Verma, R. & Gupta, J. (2018). Challenges and future prospects of herbal medicine. *Int Res Med Health Sci*, *1*(1), 12-15.

Biglia, N., Defabiani, E., Ponzone, R., Mariani, L., Marenco, D. & Sismondi, P. (2004). Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocrine-related cancer*, *11*(1), 69-83.

Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World journal of clinical oncology*, *7*(1), 54.

Brekelmans, C. T. (2003). Risk factors and risk reduction of breast and ovarian cancer. *Current opinion in Obstetrics and Gynecology*, *15*(1), 63-68.

Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., Safder, M. & Bancheva, S. (2011). The metabolites of the genus Onopordum (Asteraceae): Chemistry and biological properties. *Current Organic Chemistry*, *15*(6), 888-927.

Cakilcioglu, U. & Turkoglu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, *132*(1), 165-175.

Casavecchia, S., Giannelli, F., Giovannotti, M., Trucchi, E., Carducci, F., Quattrini, G., Lucchetti, L., Barucca, M., Canapa, A. & Biscotti, M. A. (2024). Morphological and Genomic Differences in the Italian Populations of Onopordum tauricum Willd.—A New Source of Vegetable Rennet. *Plants*, *13*(5), 654.

Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. (2011). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*, *32*(1-2), 35-48.

Chun, J., Li, R.-J., Cheng, M.-S. & Kim, Y. S. (2015). Alantolactone selectively suppresses STAT3 activation and exhibits potent anticancer activity in MDA-MB-231 cells. *Cancer letters*, *357*(1), 393-403.

Coffey, B. M. & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In *Pseudomonas methods and protocols* (pp. 631-641). Springer.

Comşa, Ş., Cimpean, A. M. & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, *35*(6), 3147-3154.

Csupor-Löffler, B., Zupkó, I., Molnár, J., Forgo, P. & Hohmann, J. (2014). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from the roots of Onopordum acanthium. *Natural product communications*, *9*(3), 1934578X1400900313.

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Réthy, B., Zupkó, I., Máthé, I., Rédei, T., Falkay, G. & Hohmann, J. (2009). Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(8), 1109-1115.

Cui, L., Bu, W., Song, J., Feng, L., Xu, T., Liu, D., Ding, W., Wang, J., Li, C. & Ma, B. (2018). Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway. *Archives of pharmacal research*, *41*(3), 299-313.

Delalat, R., Sadat Shandiz, S. A. & Pakpour, B. (2022). Antineoplastic effectiveness of silver nanoparticles synthesized from Onopordum acanthium L. extract (AgNPs-OAL) toward MDA-MB231 breast cancer cells. *Molecular Biology Reports*, *49*(2), 1113-1120.

Dumitrescu, R. & Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, *9*(1), 208-221.

El-Najjar, N., Saliba, N., Talhouk, S. & Gali-Muhtasib, H. (2007). Onopordum cynarocephalum induces apoptosis and protects against 1, 2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Oncology reports*, *17*(6), 1517-1523.

Eloff, J. N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC complementary and alternative medicine*, *19*(1), 106.

Eslami Tehrani, B., Shahrestani, R., Bahmani, B. & Mosaddegh, M. (2017). Cytotoxic activity of plants from Ardebil province. *Research Journal of Pharmacognosy*, *4*(Supplement), 53-53.

Essaidi, I., Dhen, N., Lassoued, G., Kouki, R., Haouala, F., Alhudhaibi, A. M., Alrudayni, H. A. & Dridi Almohandes, B. (2023). Onopordum nervosum Ssp. Platylepis flowers as a promising source of antioxidant and clotting milk agents: behavior of spontaneous and cultivated plants under different drying methodologies. *Processes*, *11*(10), 2962.

Foligni, R., Mannozzi, C., Gasparrini, M., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Tejada, L., Bande-De Leon, C., Orsini, R., Manzi, P. & Di Costanzo, M. G. (2022). Potentialities of aqueous extract from cultivated Onopordum tauricum (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Research International*, *158*, 111592.

Formisano, C., Sanna, C., Ballero, M., Chianese, G., Sirignano, C., Rigano, D., Millán, E., Muñoz, E. & Taglialatela-Scafati, O. (2017). Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from Onopordum illyricum L. (Asteraceae), an Italian medicinal plant. *Fitoterapia*, *116*, 61-65.

Garsiya, E. R., Konovalov, D. A., Shamilov, A. A., Glushko, M. P. & Orynbasarova, K. K. (2019a). Traditional Medicine Plant, Onopordum acanthium L. (Asteraceae): Chemical Composition and Pharmacological Research. *Plants*, *8*(2), 40. https://www.mdpi.com/2223-7747/8/2/40

Garsiya, E. R., Konovalov, D. A., Shamilov, A. A., Glushko, M. P. & Orynbasarova, K. K. (2019b). Traditional medicine plant, Onopordum acanthium L.(Asteraceae): chemical composition and pharmacological research. *Plants (Basel)*, *8*(2), 40.

Gasimova, A., Mammadov, R., Tatlı, B. & Alper, M. (2024). Determination of radical scavenging activity, secondary metabolite amount, and toxicity of Onopordum bracteatum extracts. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, *42*(5), 1612-1620.

Grill, S., Yahiaoui-Doktor, M., Dukatz, R., Lammert, J., Ullrich, M., Engel, C., Pfeifer, K., Basrai, M., Siniatchkin, M. & Schmidt, T. (2017). Smoking and physical inactivity increase cancer prevalence in BRCA-1 and BRCA-2 mutation carriers: results from a retrospective observational analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *296*(6), 1135-1144.

Guardabassi, L. & Courvalin, P. (2005). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, 1-18.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*, *198*(1), 1-15.

Hejmadi, M. (2014). *Introduction to cancer biology* (Çevirmen, Trans.). Bookboon.

Hu, C. (2018). Taraxacum: Phytochemistry and health benefits. *Chinese Herbal Medicines*, *10*(4), 353-361.

Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhare, M. S., Moharil, M. P. & Khelurkar, V. C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(1), 32-36.

Janick, J. (2003). Herbals: The connection between horticulture and medicine. *HortTechnology*, *13*(2), 229-238.

King, T., Dykes, G. & Kristianti, R. (2008). Comparative evaluation of methods commonly used to determine antimicrobial susceptibility to plant extracts and phenolic compounds. *Journal of AOAC International*, *91*(6), 1423-1429.

Koc, S., Isgor, B. S., Isgor, Y. G., Shomali Moghaddam, N. & Yildirim, O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical biology*, *53*(5), 746-751.

Lee, A. V., Oesterreich, S. & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the national cancer institute*, *107*(7), djv073.

Lee, J., Zilm, P. S. & Kidd, S. P. (2020). Novel research models for Staphylococcus aureus small colony variants (SCV) development: co-pathogenesis and growth rate. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 321.

Lee, M. W., Chakraborty, S., Schmidt, N. W., Murgai, R., Gellman, S. H. & Wong, G. C. (2014). Two interdependent mechanisms of antimicrobial activity allow for efficient killing in nylon-3-based polymeric mimics of innate immunity peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1838*(9), 2269-2279.

Liu, L., Wang, Y., Miao, L., Liu, Q., Musetti, S., Li, J. & Huang, L. (2018). Combination immunotherapy of MUC1 mRNA nano-vaccine and CTLA-4 blockade effectively inhibits growth of triple negative breast cancer. *Molecular Therapy*, *26*(1), 45-55.

Martinez, M. & Silley, P. (2010). Antimicrobial drug resistance. *Handbook of experimental pharmacology*, *199*, 227-264. https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_10

Michel, J., Abd Rani, N. Z. & Husain, K. (2020). A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases [Review]. *Frontiers in Pharmacology, Volume 11 - 2020*. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00852

Michl, T. D., Hibbs, B., Hyde, L., Postma, A., Tran, D. T. T., Zhalgasbaikyzy, A., Vasilev, K., Meagher, L., Griesser, H. J. & Locock, K. E. (2020). Bacterial membrane permeability of antimicrobial polymethacrylates: Evidence for a complex mechanism from super-resolution fluorescence imaging. *Acta Biomaterialia*, *108*, 168-177.

Mirzaei, N., Mokhtari, B. & Kolahi, M. (2018). Evalution of phytochemical and anticancer properties of cotton thistle (Onopordon leptolepis DC.) extract on the survival of CACO2 cancer cells. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, *23*(2), 57-69.

Miski, M., Meriçli, A. H. & Mabry, T. J. (1988). Sesquiterpene lactones of Onopordon tauricum. *Phytochemistry*, *27*(5), 1417-1420.

Molnár, J., Szebeni, G. J., Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Szekeres, T., Saiko, P., Ocsovszki, I., Puskás, L. G., Hohmann, J. & Zupkó, I. (2016). Investigation of the Antiproliferative Properties of Natural Sesquiterpenes from Artemisia asiatica and Onopordum acanthium on HL-60 Cells in Vitro. *International journal of molecular sciences*, *17*(2), 83.

Mouffouk, C., Mouffouk, S., Mouffouk, S. & Haba, H. (2023). Traditional use, phytochemistry and pharmacological properties of the genus onopordum. *Current Chemical Biology*, *17*(2), 124-139.

Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, *83*(3), 770-803.

Njeh, F., Mhalla, D., Hammouda, I. B., Trigui, M. & Mezghani-Jarraya, R. (2017). Antibacterial Activity of Onopordum Espinae: Identification of Hispidulin and Dehydromelitensin-8-(4'-Hydroxy-Methacrylate). *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *16*(4), 1531.

Obeidat, M. (2018). Antimicrobial activities from extracts of seven medicinal plant species against multidrug-resistant bacteria and fungi. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, *10*(3), 45-55.

Olesińska, K. (2018). Sesquiterpene lactones–occurrence and biological properties. A review. *Agronomy Science*, *73*(3), 83-95.

Pan, S.-Y., Zhou, S.-F., Gao, S.-H., Yu, Z.-L., Zhang, S.-F., Tang, M.-K., Sun, J.-N., Ma, D.-L., Han, Y.-F. & Fong, W.-F. (2013). New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM′ S outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 627375.

Parzhanova, A., Yanakieva, V., Vasileva, I., Momchilova, M., Dimitrov, D., Ivanova, P. & Tumbarski, Y. (2023). Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of three medicinal plants from the western part of the Rhodope Mountains, Bulgaria. *Life*, *13*(12), 2237.

Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N. & Yuan, W. (2022). A review of biofilm formation of Staphylococcus aureus and its regulation mechanism. *Antibiotics*, *12*(1), 12.

Perović, J., Šaponjac, V. T., Kojić, J., Krulj, J., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Bodroža-Solarov, M. & Ilić, N. (2021). Chicory (Cichorium intybus L.) as a food ingredient–Nutritional composition, bioactivity, safety, and health claims: A review. *Food chemistry*, *336*, 127676.

Petkova, N. & Mihaylova, D. (2016). Flower heads of Onopordum tauricum Willd. and Carduus acanthoides L-source of prebiotics and antioxidants. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, *28*(10).

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, *6*(11), 1.

Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, *5*(3), 237-243.

Rahmani Fard, S. & Zeighami, H. (2017). Bacterial biofilms. *Laboratory and Diagnosis*, *9*(37), 21-29.

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

Rather, M. A., Gupta, K. & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(4), 1701-1718.

Richie, R. C. & Swanson, J. O. (2003). Breast cancer: a review of the literature. *Journal Of Insurance Medicine-New York Then Denver*, *35*(2), 85-101.

Rolnik, A. & Olas, B. (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International journal of molecular sciences*, *22*(6), 3009.

Rumbaugh, K. P. & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 571-586.

Sahana, J., Cortés-Sánchez, J. L., Sandt, V., Melnik, D., Corydon, T. J., Schulz, H., Cai, Z., Evert, K., Grimm, D. & Wehland, M. (2023). Long-term simulation of microgravity induces changes in gene expression in breast cancer cells. *International journal of molecular sciences*, *24*(2), 1181.

Salama, M. M., Ezzat, S. M. & Sleem, A. A. (2011). A new hepatoprotective flavone glycoside from the flowers of Onopordum alexandrinum growing in Egypt. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *66*(5-6), 251-259.

Salinas, C., Florentín, G., Rodríguez, F., Alvarenga, N. & Guillén, R. (2022). Terpenes combinations inhibit biofilm formation in Staphyloccocus aureus by interfering with initial adhesion. *Microorganisms*, *10*(8), 1527.

Samrot, A. V., Abubakar Mohamed, A., Faradjeva, E., Si Jie, L., Hooi Sze, C., Arif, A., Chuan Sean, T., Norbert Michael, E., Yeok Mun, C. & Xiao Qi, N. (2021). Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds—A review. *Medicina*, *57*(8), 839.

Senkardes, I., Dogan, A. & Emre, G. (2022). An Ethnobotanical study of medicinal plants in Taşköprü (Kastamonu–Turkey). *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 984065.

Shahcheraghi, S. N., Sadat Shandiz, S. A. & Pakpour, B. (2022). An eco-friendly fabrication of silver chloride nanoparticles (AgCLNPs) using Onopordum acanthium L. extract induces apoptosis in breast cancer MDA-MB-232 cells. *BioNanoScience*, *12*(2), 339-350.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi journal of biological sciences*, *22*(1), 90-101.

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. & Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, *1*(2), 109-126.

Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the national cancer institute*, *51*(5), 1409-1416.

Stewart, B. W. & Kleihues, P. (2003). *World cancer report* (Çevirmen, Trans.; Vol. 57). IARC press Lyon.

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P. & Zhu, H.-P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, *13*(11), 1387.

Ta, C. A. K. & Arnason, J. T. (2015). Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *21*(1), 29.

Targan, Ş., Yelboğa, E. G. & Cittan, M. (2018). Macro and trace element contents of some wild plants consumed as vegetable in Manisa District, Turkey. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, *5*(2), 751-762.

Trinh, P.-C., Le-Thi-Thanh Thao, H.-T., Ha, V. & Nguyen, T. (2020). Research Article DPPH-Scavenging and Antimicrobial Activities of Asteraceae Medicinal Plants on Uropathogenic Bacteria.

Ugur, A., Sarac, N. & Duru, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of endemic Onopordum caricum.

Van Tonder, A., Joubert, A. M. & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, *8*(1), 47.

Wasihun, Y., Alekaw Habteweld, H. & Dires Ayenew, K. (2023). Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extract of Calpurnia aurea. *Scientific reports*, *13*(1), 9767.

Welsh, J. (2013). Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In *Animal models for the study of human disease* (pp. 997-1018). Elsevier.

Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, *3*(2), 163-175.

Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, *2*(3), 251-286.

Zare, K., Nazemyeh, H., Lotfipour, F., Farabi, S., Ghiamirad, M. & Barzegari, A. (2014). Antibacterial activity and total phenolic content of the Onopordon acanthium L. seeds. *Pharmaceutical sciences*, *20*(1), 6-11.

Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S. & Paz-Ares, L. (2016). Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*, *38*(7), 1551-1566.