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

# *Lamium orientalis* BİTKİSİNİN FARKLI ORGANLARINA AİT METANOL EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**EBRAR ÇAĞLIYAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU**

**HAZİRAN - 2022**
**KASTAMONU**

## TEZ ONAYI

**Ebrar ÇAĞLIYAN** tarafından hazırlanan "***Lamium orientalis* Bitkisinin Farklı Organlarına ait Metanol Ekstraktlarının Antikanser ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **21.06.2022** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

| | | |
|---|---|---|
| **Danışman** | Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU<br>Kastamonu Üniversitesi | ..... |
| **Jüri Üyesi** | Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU<br>Kastamonu Üniversitesi | ..... |
| **Jüri Üyesi** | Doç. Dr. Gökhan ZENGİN<br>Selçuk Üniversitesi | ..... |

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

Enstitü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

## TAAHHÜTNAME

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

**Ebrar ÇAĞLIYAN**

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## L*amium orientalis* BİTKİSİNİN FARKLI ORGANLARINA AİT METANOL EKSTRAKTLARININ ANTİKANSER VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**EBRAR ÇAĞLIYAN**

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

**DANIŞMAN:PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU**
**EŞ DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ ENİS FUAT TÜFEKCİ**

Tıbbi ve aromatik bitkilerin kimyasal içeriklerinin keşfi ile bu bitkilerin ilaç hammaddesi olarak kullanılabileceği öngörülmüş ve bitkilerin biyolojik etkinlikleri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Polifenolik bileşikler bakımından oldukça zengin olan *Lamiaceae* familyasına ait bitkilerin biyolojik potansiyellerinin yüksek olduğu bilinmektedir. Literatürde *Lamium orientalis* Fisch & Mey. bitkisinin biyolojik potansiyeli hakkında çok fazla bir veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında *L. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının metanol (MeOH) ekstraktlarının antikanser, antibakteriyel ve anti-Quorum Sensing (anti-QS) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ekstraktların antikanser aktivitesi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine MTT testi uygulanarak incelenmiştir. Sonuç olarak, en iyi antikanser aktiviteyi kökün MeOH ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerine gösterdiği tespit edilmiş, 48 saat sonunda $IC_{50}$ değeri 425,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstraktların referans bakteri suşları üzerine antibakteriyel etkinlikleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraktların çalışılan konsantrasyonlarda test edilen bakteri suşlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri tespit edilmemiştir. Anti-QS aktivitenin belirlenmesi için ekstraktların *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşları üzerine sırasıyla viyolasin pigment üretiminin ve biyofilm oluşumunun inhibitör etkinlikleri araştırılmıştır. Ancak ekstraktların çalışılan konsantrasyonlarda anti-QS aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması, *L. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktlarının birtakım biyolojik aktiviteleri hakkında ön bilgi niteliği taşımaktadır. Bitkinin kök kısmının MeOH ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerine potansiyel bir antikanser aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. İlave olarak *L. orientalis* bitkisinin yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:***Lamium orientalis*, antikanser, antibakteriyel, anti-QS aktivite

Haziran 2022, 53 Sayfa

# ABSTRACT

## MSC THESIS

## THE EXPLORATION OF ANTICANCER AND SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF METHANOL EXTRACTS BELONGING TO DIFFERENT ORGANS OF L*amium orientalis* PLANT

**EBRAR ÇAĞLIYAN**

**KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**
**DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERIN**

**SUPERVISOR:PROF. DR. MEHMET CENGİZ BALOĞLU**
**CO-SUPERVISOR:DR. ÖĞR. ÜYESİ ENİS FUAT TÜFEKCİ**

With the discovery of the chemical contents of medicinal and aromatic plants, it was predicted that these plants could be used as raw materials for medicine, and studies on the biological activities of plants increased. It is known that plants belonging to the *Lamiaceae* family, which are very rich in polyphenolic compounds, have high biological potential. In the literature, there is not much data on the biological potential of *Lamium orientalis* Fisch & Mey. In this thesis study, anticancer, antibacterial, and anti-Quorum Sensing (anti-QS) activities of methanol (MeOH) extracts of the root, stem, leaf, and flower parts of the *L. orientalis* were evaluated. The anticancer activity of the extracts was investigated by using the MTT test on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. As a result, it was determined that the MeOH extract of the root part with the best anticancer activity was on the MCF-7 cell line, and the $IC_{50}$ value was calculated as 425,7 μg/mL at the end of 48 hours. The antibacterial activities of the extracts on standard bacterial strains were determined by the broth microdilution method. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extracts could not be determined against the strains at the concentrations studied. To determine the anti-QS activities of the extracts, violacein pigment production, and biofilm formation on *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains, respectively, were investigated. However, it was determined that the extracts did not have anti-QS activity at the concentrations studied.

This thesis study is a preliminary information about some biological activities of MeOH extracts of the root, stem, leaf, and flower parts of the *L. orientalis*. It was observed that the MeOH extract of the root part of the plant has anticancer activity potential on the MCF-7 cell line. In addition, it is foreseen that the *L. orientalis* will contribute to the development of new chemotherapeutic agents.

**KEYWORDS:***Lamium orientalis*, anticancer, antibacterial, anti-QS activity

June 2022, 53 Page

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresi boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çalışmamın tüm deneysel aşamalarında öneri ve yönlendirmeleri ile bana yol gösteren danışman hocalarım Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU ve Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU hocalarıma, çalışmalarda kullandığım ekstrakların temin edilmesini sağlayan Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e ve çalışmaları beraber sürdürdüğüm arkadaşım Gamze BURCU'ya teşekkür ederim.

Hayatım ve eğitimim boyunca her zaman yanımda olup bana her türlü desteği veren canım annem Sevil BİLİR'e, manevi desteğini esirgemeyen ve her daim yanımda olan değerli Ersin YAMAN'a, Gülce DERNEKÇİLER'e ve Özge ARSLAN'a en içten duygularımla sonsuz teşekkür ederim.

Ebrar ÇAĞLIYAN

Kastamonu, 2022

# 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 *Lamiaceae* Familyası Hakkında Genel Bilgiler ..... 2
1.2 *Lamium orientalis* Türü ..... 3
1.2.1 *L. orientalis* Türünün Fiziksel Özellikleri ..... 4
1.2.2 *L. orientalis* Türünün Fitokimyasal İçeriği ..... 4
1.3 Kanser ..... 5
1.3.1 Meme Kanseri ..... 6
1.3.1.1 MCF-7 hücre hattı ..... 7
1.3.1.2 MDA-MB-231 hücre hattı ..... 8
1.4 Antibakteriyel Aktivite ..... 8
1.5 Quorum Sensing (QS) Mekanizması ..... 9
1.5.1 *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ..... 10
1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ..... 11
1.6 Çalışmanın Amacı ..... 12
**2. MATERYAL VE METOT** ..... **13**
2.1 Materyaller ..... 13
2.1.1 Bitki Materyali ve Ekstraktların Elde Edilmesi ..... 13
2.1.2 Kanser Hücre Hatları ..... 13
2.1.3 Bakteri Suşları ..... 13
2.1.4 Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler ..... 14
2.2 Metot ..... 16
2.2.1 Ekstraktların Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması ..... 16
2.2.2 Hücre Kültürü ..... 17
2.2.2.1 Hücre kültürünün devamlılığı ..... 17
2.2.2.2 Hücre canlılık testi (MTT) ..... 18
2.2.3 Antibakteriyel Aktivite ..... 19
2.2.3.1 Bakteri besiyerlerinin ve kültürlerinin hazırlanması ..... 19
2.2.3.2 MİK tespiti ..... 20
2.2.4 QS İnhibisyon Testleri ..... 20
2.2.4.1 Viyolasin inhibisyon testi ..... 20
2.2.4.2 Biyofilm inhibisyon testi ..... 21
2.2.5 İstatistiksel Analizler ..... 22
**3. BULGULAR** ..... **23**
3.1 Antikanser Aktivite Bulguları ..... 23

3.1.1 Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları ..... 23
3.1.2 Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları ..... 29
3.2 Antibakteriyel Aktivite Bulguları ..... 33
3.3 QS İnhibisyon Testi Bulguları ..... 34
3.3.1 Viyolasin İnhibisyon Testi Bulguları ..... 34
3.3.2 Biyofilm İnhibisyon Testi Bulguları ..... 35
**4. TARTIŞMA ..... 37**
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 45**
**KAYNAKLAR ..... 46**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 53**

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Sayfa**

**Şekil 1.1** *Lamium orientalis* bitkisinin görseli ..... 4
**Şekil 1.2** *C. violaceum*'un viyolasin sentezi ve regülasyonu ..... 11
**Şekil 2.1** MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 48. saat MTT işleminden sonra mikropleyt görüntüsü ..... 19
**Şekil 3.1** MCF-7 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 24. saatteki morfolojik görüntüleri ..... 23
**Şekil 3.2** MCF-7 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 48. saatteki morfolojik görüntüleri ..... 24
**Şekil 3.3** Kök ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri 25
**Şekil 3.4** Gövde ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri ..... 26
**Şekil 3.5** Yaprak ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri ..... 28
**Şekil 3.6** Çiçek ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri ..... 29
**Şekil 3.7** MDA-MB-231 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 24. saatteki morfolojik görüntüleri ..... 30
**Şekil 3.8** MDA-MB-231 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 48. saatteki morfolojik görüntüleri ..... 30
**Şekil 3.9** *C. violaceum* ATCC 12472'de viyolasin inhibisyon testi (1: Pozitif kontrol, 2: Kök ekstraktı, 3: Gövde ekstraktı, 4: Yaprak ekstraktı, 5: Çiçek ekstraktı) ..... 35

# TABLOLAR DİZİNİ

**Sayfa**

**Tablo 2.1** Çalışmada kullanılan bakteri suşları ..... 14
**Tablo 2.2** Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler ..... 15
**Tablo 2.3** Çalışmada kullanılan kimyasallar ..... 16
**Tablo 3.1** MCF-7 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 24
**Tablo 3.2** MCF-7 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 26
**Tablo 3.3** MCF-7 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 27
**Tablo 3.4** MCF-7 hücre hattı üzerine çiçek ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 29
**Tablo 3.5** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 31
**Tablo 3.6** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 32
**Tablo 3.7** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 32
**Tablo 3.8** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur..... 33
**Tablo 3.9** Ekstraktların ve levofloksasinin MİK değerleri..... 34
**Tablo 3.10** Ekstraktların biyofilm oluşumu üzerine etkisi. Veriler±standat sapma şeklinde sunulmuştur..... 36

## GRAFİKLER DİZİNİ

**Sayfa**

**Grafik 3.1** MCF-7 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 25
**Grafik 3.2** MCF-7 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 26
**Grafik 3.3** MCF-7 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 27
**Grafik 3.4** MCF-7 hücre hattı üzerine çiçek ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 28
**Grafik 3.5** MDA-MB-231hücre hattı kök 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ... 31
**Grafik 3.6** MDA-MB-231hücre hattı gövde 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 31
**Grafik 3.7** MDA-MB-231hücre hattı yaprak 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 32
**Grafik 3.8** MDA-MB-231hücre hattı yaprak 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri ..... 33
**Grafik 3.9** Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunun üreme ve gelişmesi üzerine etkisi. ..... 36
**Grafik 3.10** Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm oluşumu üzerine etkisi. ..... 36

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

## Simgeler

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

## Kısaltmalar

| | |
|---|---|
| **AHL** | **:** N- açil homoserin lakton |
| **CO2** | **:** Karbondioksit |
| **$dH_2O$** | **:** Distile su |
| **DMEM** | **:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| **DMSO** | **:** Dimetil sülfoksit |
| **DNA** | **:** Deoksiribonükleik asit |
| **DSÖ** | **:** Dünya Sağlık Örgütü |
| **EACC** | **:** Avrupa kimliği doğrulanmış hücre kültürleri koleksiyonu |
| **ER-α** | **:** Östrojen Reseptörü Alfa |
| **FBS** | **:** Fetal bovin serum |
| **HER2** | **:** İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 |
| **IC50** | **:** 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 |
| **QS** | **:** Quorum Sensing |
| **TNBC** | **:** Üçlü negatif meme kanseri |

# 1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze kadar olan sürede, geleneksel ve modern tıpta birçok hastalığın tedavisinde tıbbi ve aromatik bitkilerden yararlanılmıştır. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %80'inin, tıbbi açıdan bitkileri kullandığı düşünülmektedir (Shoeb, 2006). Sentetik ilaçların yan etkilerinin oldukça fazla olmasından dolayı bitkilerin sentetik maddelere alternatif olarak doğal ilaç etken maddesi olabileceği araştırmacılar tarafından düşünülmüş ve bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Uritu vd., 2018). Bilim insanları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, bitkilerin içerdiği fenolik bileşiklerden ve biyolojik aktivitelerde sergiledikleri çeşitlilikten dolayı birçok hastalığa karşı etkinlik gösterebildiğini kanıtlamışlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafınca 91 ülkede yapılan araştırmalara göre, kimyasal ilaçlara alternatif olarak kullanılabilecek 20.000'den fazla bitki türünün olduğu rapor edilmiştir. Bu araştırmada, coğrafi konumu sebebiyle tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından oldukça zengin olduğu bilinen Türkiye'den yaklaşık olarak 140 tıbbi bitkinin kayıtlara geçtiği bildirilmiştir (Bozyel vd., 2019; Temel vd., 2018). Aynı zamanda günümüzde kullanılan ilaçların %25'inin tıbbi bitkilerden yararlanılarak üretildiği DSÖ tarafından bildirilmektedir (Acıbuca ve Bostan, 2018).

Fenolik bileşiklerin kendi içerisinde basit fenoller ve polifenoller olarak iki gruba ayrıldığı bilinmektedir. Bitkiler, genellikle sekonder yapıya sahip, doğal metabolit olarak bilinen ve biyoflavonoidler olarak adlandırılan polifenolleri içermektedir. Polifenollerin ise stibenler, tanenler ve flavonoidler olarak üç gruba ayrıldığı bilinmektedir. Flavonoidler, toksik etkiye neden olmadığı ve aksine insan vücuduna yararlı olduğu bilinen bileşiklerdir. Antioksidan özellik gösteren flavonoidler, fenolik bileşikler ve ikincil metabolitler, vücut içerisinde hücresel süreci etkileyerek antikarsinojenik, antimutajenik, antibakteriyel ve benzeri aktiviteler gösterebilmektedir. Aynı zamanda bitkilerden yararlanılarak doğal antibiyotiklerin elde edilmesi ve geliştirilmesi mümkündür. Geliştirilen antibiyotiklerin de canlı üzerinde bakteriyostatik veya bakterisidal etkiye neden oldukları gözlemlenmiş ve bildirilmiştir (Oses vd., 2016; Salehi vd., 2019). Birçok hastalığı hedef alan yeni

ilaçların geliştirilmesinde bitkilerin umut vadeden kaynaklar oldukları bilinmektedir (Vladimir-Knežević vd., 2014).

Bitkiler, farklı biyolojik aktivitelere etki gösterdiğinden dolayı *in vitro* çalışmalar ile bitkilerin hangi biyolojik aktiviteye etki ettiği tespit edilebilmektedir. Yirmi farklı ülkeden yaklaşık 35.000 bitki örneği üzerinden hazırlanan 114.000 ekstraktın Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından antikanser etkinlikleri araştırılmış ve 1983-1994 yılları arasında dünya genelinde onaylanmış antikanser ilaçlarından ticari olarak satılan 92 tanesinin %60'ının doğal kökenli olduğu belirtilmiştir (Shoeb, 2006). Bir başka çalışmada ise 53 bitki ailesinden 160 tıbbi bitki üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, fenolik bileşikler bakımından en fazla tıbbi bitkinin *Lamiaceae* familyasına ait olduğu saptanmıştır (Bozyel vd., 2019).

## 1.1 *Lamiaceae* Familyası Hakkında Genel Bilgiler

*Lamiaceae* familyası, polifenolik bileşikler bakımından zengin, birçok biyolojik ve tıbbi uygulamalar açısından oldukça önemli güzel kokulu, tek veya çok yıllık otlar ya da çalılar (Ghoneim vd., 2018) olarak bilinen bitkisel familyalardan biridir (Uritu vd., 2018). *Lamiaceae* familyası dünyada 250 cins ve 7000 tür ile, ülkemizde ise 48 cins ve 782 takson ile temsil edilmektedir (Akkoyunlu ve Dulger 2019; Koyuncu vd., 2010). Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası olarak bilinen *Lamiaceae* familyası, endemik taksonlardan olup biyolojik ve tıbbi uygulamalar açısından oldukça önemli bitkisel familyalardan biridir. Bu familyadaki çoğu türün, geleneksel olarak *Verbenaceae* familyası ile yakından ilişkili çiçekli bitkiler olduğu düşünülmüş fakat yapılan filogenetik analizler sonucunda *Verbenaceae* familyası adı altında sınıflandırılmış olan türlerin aslında *Lamiaceae* familyasına ait olduğu anlaşılmıştır (Raja, 2012).

Eski zamanlarda *Lamiaceae* familyasına ait *Lamium* türleri, kırık, felç, yatıştırıcı, idrar söktürücü, hipertansiyon, menoraji, prostat ve birçok kadın hastalıklarının tedavisi için kullanılmıştır (Dulger, 2009; Raja, 2012). *Lamium* türlerinin birçok hastalık üzerine etkilerinin yapılarında bulunan iridoidler ve sekoiridoidler, fenilpropanoidler, flavonoidler, antosiyaninler, fitoekdisteroidler, betainler,

benzoksazinoidler, terpenler, megastigmen bileşikleri ve uçucu yağlara bağlı olduğu bulunmuştur (Yalçın ve Kaya, 2006). Ayrıca sahip oldukları bileşikler sayesinde yüksek antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösterdikleri de bilinmektedir (Kaliora ve Andrikopoulos, 2005; Yorulmaz Salman vd., 2014).

## 1.2 *Lamium orientalis* Türü

*Lamium orientalis* Fisch. & Mey., *Lamiaceae* familyasının bir türü olup *Wiedemannia orientalis* Fisch. & Mey. olarak da adlandırılmaktadır (Çali, 2017). Türkiye'de ise doğu ballıbaba veya güzelce adıyla bilinmekte ve Nisan-Haziran ayları arasında çiçeklenme göstermektedir. Türkiye'de yaklaşık olarak 700-1650 m yüksekliklerde görülen *L. orientalis*, bozkır, kayalık kenarları, çakıllı kurak yamaçlar, tarla ve yol kenarları gibi iyi güneş ışığı alan yerlerde yetişir. Anadolu'nun büyük bir kısmında yetişen endemik bir tür olup tek yıllık otsu bir bitkidir (URL-1, 2021). *L. orientalis*'in taksonomik basamakları şu şekildedir (URL-4, 2020).

Üst Alem: *Eucaryota* (Ökaryotlar)

Alem: *Plantae*

Bölüm: *Spermatophyta*

Alt bölüm: *Angiospermae*

Sınıf: *Dicotyledones*

Alt sınıf: *Sympetale*

Takım: *Lamiales*

Familya: *Lamiaceae*

Cins: *Lamium*

Tür: *Lamium orientalis*



**Şekil 1.1** *Lamium orientalis* bitkisinin görseli (URL-2, 2022)

### 1.2.1 *L. orientalis* Türünün Fiziksel Özellikleri

*L. orientalis* bitkisi 7-35 cm arasında boy uzaması gösterebilmektedir. Gövdesinde yumuşak bir dokuya sahip ince, kısa yoğun veya seyrek tüylere sahiptir. Yaprakları hem alt kısımda hem de üst kısımda bulunmaktadır. Alt kısımda olan yapraklar saplı, üst kısımda olan yapraklar ise sapsızdır. Yapraklar yaklaşık olarak 16-50 x 5-30 mm boyutlarında, kenarları tırtıklı, tüylü ve genellikle dikdörtgenimsi formda bulunmaktadır. Çanak kısmı 6-10 mm olan bitkinin olgunlaştıkça 8-14 mm olduğu ve taç kısmının ise 9-20 mm boyda olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Lamiaceae* familyasına özgü taksonomik değere sahip glandüler trikomlara sahiptir. Genellikle pembe veya mor renklerde görüldüğü bilinmektedir (Akcin ve Camili, 2018; URL-3, 2016).

### 1.2.2 *L. orientalis* Türünün Fitokimyasal İçeriği

Literatürde *L. orientalis*'in kimyasal içeriği hakkında çok fazla veri bulunmamaktadır. Taze toprak üstü kısımları üzerinde yapılan bir çalışmaya göre beş iridoid glikozit (lamiid, ipolamiid, ipolamiidoside, 6β-hidroxyipolamiide ve 5-hydroxy-8-epi-loganin) ve beş flavonoid glikozit (apigenin 7-O-β-glukopiranosid, luteolin 5-O-β-glukopiranosid, isorhamnetin 3-O-rutinoside, quercetin 3-O-rutinoside ve apigenin 7-O-(600-O-trans-p-kumaroil) p-glukopiranosid) içerdiği

tespit edilmiştir. Ayrıca feniletanoid glikozit olarak bilinen akteosid varlığının olduğu da bildirilmiştir (Özbek vd., 2006).

Bir başka çalışmaya göre *L. orientalis*'in metanol ekstraktlarının fenolik asitleri ve flavonoidleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tespit edilmiştir. Bunun sonucunda kimyasal içeriğinde kateşin, 3-4 dihidroksi benzoik asit, ferulik asit, gallik asit, hesperidin, naringenin, 4-Hidroksi benzoik asit, kaempferol ve rutin + ellagic asit olduğu saptanmıştır. Ancak *L. orientalis*'in metanol ekstraktlarının ana bileşenleri incelendiğinde en yüksek seviyede rutin + ellagik asit olduğu, bunun yanı sıra ikincil olarak kaempferol ve ferulik asitin de ana bileşen olduğu belirtilmiştir (Albayrak ve Aksoy, 2013).

## 1.3 Kanser

Kanser, küresel çapta bir sağlık sorunudur. Hücrelerin geri dönüşümsüz olarak zarar görmesi sonucunda programlı hücre ölümü mekanizmasına karşı oluşan sinyal yolaklarının aktivitesini engelleyerek, kontrolsüz hücre bölünmeleri ile kanser hücreleri oluşmakta ve vücut içerisinde yayılım gösterebilmektedirler (Srancikova vd., 2013). Bireylerin %10-15'inde, ebeveynlerinden aktarılan genler nedeniyle kalıtımsal olarak kanser oluşumu gözlendiği ve %85-90'ının ise çeşitli çevresel faktörlere maruz kalmasıyla, DNA'larında oluşan progresif değişimler ile replikasyonda oluşan bazı hataların kanser oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012). Normal hücreler, çoğalmak için büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Ancak kanser hücreleri geçirdikleri mutasyonlar nedeniyle büyüme faktörlerini kendileri üretebilmektedir. Her sağlıklı hücre, homeostasisi sağlamak için belirli miktarda büyüme gösterdikten sonra büyümeyi durdururken, kanser hücreleri büyümeyi engelleyici faktörlerin bağlandığı reseptörleri bozarak büyüme evresini durdurmayı önlemektedir. Ayrıca bağışıklık sisteminden, sağlıklı hücrelerin yüzeylerinde taşıdığı proteinler ile kendini gizleyerek sürekli bölünmeler gerçekleştirir ve invazyon yoluyla metastaz yapabilirler (Weinberg, 2021). Çok fazla bölündüklerinden dolayı yoğun enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle, ortamda oksijen varlığına bakmadan direkt olarak enerji üretimi için glikozu kullanmaları ile Warburg etkisi adı verilen olay gerçekleşir. Vücutta kontrolsüz enerji kaybı ve

oksijen yetersizliği meydana gelir. Bu da sağlıklı hücrelerin apoptozuna sebep olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Robey vd., 2008). Kanser hücreleri iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere iki tür tümör oluşumuna sebep olurlar. İyi huylu tümörler belirli bir alanda çoğalır ve vücuda yayılım göstermezler. Bu nedenle cerrahi operasyon veya hedefe yönelik tedavi ile vücuttan uzaklaştırılabilirler. Kötü huylu tümörlere karşı ise hormon tedavisi, kemoterapi, immünoterapi ve biyolojik terapi gibi çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Yalameha, 2018).

Gelişmekte olan ülkelerde kanser önde gelen ölüm sebeplerinden biridir (Yilmaz vd., 2011) ve günümüzde 185 ülkede bilinen 36 kanser çeşidi bulunmaktadır. DSÖ tarafından yapılan araştırmalar doğrultusunda, 2020 yılında kansere bağlı ölüm oranlarının %70'ten fazla olduğu belirtilmiştir. Tüm kanserlerin %50'sinden fazlasını oluşturan ve dünyada bilinen en yaygın beş kanser türü sırası ile meme, akciğer, kolerektal, prostat ve mide kanseridir (Sung vd., 2021). Türkiye'de ise yapılan istatistiklere göre en yaygın kanserlerin sırası ile akciğer, meme, kolerektal, prostat ve tiroid kanserleri olduğu belirtilmiştir. Tüm kanser türlerine karşı çeşitli tipte kemoterapötik ajanlar geliştirilmekte ve bu ajanlar hücre içi sinyal iletim yolu inhibitörleri, anjiogenezis inhibitörleri, DNA sentez ve tamir inhibitörleri olarak aktivite göstermektedirler. Ancak bazı ajanların mikrotübül oluşumunu engelleyip mitozu durdurarak aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Demircan ve Mater, 2019; Horwitz vd., 1975).

### 1.3.1 Meme Kanseri

Dünya genelinde bilinen en yaygın kanserlerin başında %11,7 oranı ile meme kanseri gelmektedir. Meme kanserine bağlı ölüm oranı ise %6,9 olarak belirtilmiştir (Sung vd., 2021). Genellikle kadınlarda görülürken nadiren erkeklerde de görülebilen, çoğunlukla belirtilerini göstermeye başladığından çok daha önce oluşumu gözlenen bir adenokanser çeşididir (Aydıntuğ, 2014).

Meme, yapısal olarak kadınlarda süt üretimini sağlayan farklılaşmış bir ter bezidir. Kanser hücreleri çoğunlukla süt üretiminin gerçekleştiği lobüllerde veya süt kanallarında oluşabilmektedir. Bu süt kanalları aracılığı ile tümörleşmiş kanser

hücreleri zamanla kendi bazal membranlarından ilerleyerek bağ doku içerisine geçebilmektedir. Böylece kan damarlarını kullanarak diğer organlara metastaz yapabilmekte ve tedavi edilmediği takdirde ölüme sebep olabilmektedir (Aydıntuğ, 2004). Klinik araştırma laboratuvarlarında yapılan çalışmalar sonucunda meme kanserinin; HER2, luminal A, luminal B, bazal benzeri ve normal benzeri olmak üzere beş farklı alt tipe sahip olduğu tespit edilmiştir (Barnard vd., 2015). Bu beş farklı alt tipe göre kanser hücrelerinin farklılık gösterebildiği kanıtlanmış ve farklı hücre tiplerinin aynı kansere sebep olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinin tedavisi için kullanılan kemoterapötik ilaçların geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda genellikle MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmaktadır.

#### 1.3.1.1 MCF-7 hücre hattı

Luminal A tipi meme kanseri hücre hatlarından biri olan ve 1973 yılında kurulan Michigan Kanser Vakfının (Michigan Cancer Foundation) baş harflerinin oluşturduğu MCF-7 hücreleri, 69 yaşındaki meme kanseri hastasının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. MCF-7 hücreleri östrojen reseptörü alfa (Erα) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) negatif, metastatik kabiliyeti zayıf ve epitelloid yapıdadır (Comsa vd., 2015; Demircan ve Mater, 2019). Bu hücre hattı düşük miktarlarda ERβ, yüksek miktarlarda ERα östrojen reseptörlerini temsil etmektedir. Bu nedenle östrojene duyarlıdır ve hormonal tedaviye yanıt verme düzeyinin yüksek olduğu bilinmektedir (Young vd., 2018). Horwitz ve arkadaşları tarafından 1975 yılında yapılan çalışmalara göre tümör nekroz faktör alfa'nın (TNF-α) MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda anti-östrojen etkili bir ilaç olan tamoksifenin, MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, fakat östrojen tarafından inhibisyonun tersine döndürüldüğü bildirilmiştir. MCF-7 hücre hattı, dünya genelinde meme kanseri üzerine yapılan *in vitro* çalışmalarda tercih edilen standart ve iyi bir modeldir.

#### 1.3.1.2 MDA-MB-231 hücre hattı

Bazal benzeri tipi meme kanseri hücre hatlarından biri olan MDA-MB-231 hücreleri metastatik meme adenokarsinomuna sahip 51 yaşındaki hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri için östrojen reseptörü alfa (ERα) ve progesteron reseptörünün (PR) negatif olduğu, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) içermediği ve tümör proteini olan p53 geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir. Ayrıca HER2 reseptörünün olmamasından dolayı oldukça invazif ve agresif yapıda olduğu bilinen farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) modelini temsil etmektedir (EACC, 2017). Tıbbi araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı, moleküler düzeyde incelenerek potansiyel olabilecek aktif maddeler üzerinde yeni ilaç geliştirmeye yönelik birçok çalışmada tercih edilen özel bir modeldir.

## 1.4 Antibakteriyel Aktivite

Antibiyotikler, bakterileri öldüren veya üremelerini bloke eden ajanlardır. Çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak aşırı ve yanlış kullanılmaları antibiyotiklere dirençli suşların giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur. Böylece günümüzde ticari olarak kullanılan antibiyotiklerin patojenler üzerine etkisini kaybettiği görülmektedir. Bakteriler arasında gelişen antibiyotik direnci, bulaşıcı hastalıklarla mücadelede yeni antibakteriyel ajanlara olan ihtiyacı arttırmıştır (Ulukanlı vd., 2005).

Antibiyotiklerin günümüzde etki ettikleri mekanizmalar ile geçmiş zamanda antibiyotik amaçlı kullanılan bitkisel karışımların etki ettiği mekanizmaların aynı oldukları görülmektedir. Bu nedenle doğada hali hazırda bulunan bitkilerin içerdiği bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesi ile sentetik maddelere alternatif olarak yeni ve etkili antibakteriyel ajanların elde edilebileceği düşünülerek buna yönelik çalışmalara rağbet artmıştır (Yorulmaz Salman vd., 2014).

## 1.5 Quorum Sensing (QS) Mekanizması

QS, bakterilerin çeşitli sinyal moleküllerini kullanarak birtakım fizyolojik ve biyokimyasal aktivitelerini düzenlemek adına birbirleriyle iletişim kurduğu bir olgudur. Bu olgu tür içi ve türler arasında gerçekleşebilmektedir. Bu iletişim ile bakterilerin populasyon yoğunluğunu kontrol etme, sporulasyon, biyofilm oluşumu, pigment üretimi, çeşitli enzim ve toksinlerin sentezi gibi faaliyetleri düzenledikleri bilinmektedir (Miller ve Massler, 2001; Wai-Leung, 2009). Bakterilerin QS sistemini kullanabilmesi için temelde üç yeteneğe sahip olması gerekmektedir (Pan ve Ren, 2009):

I) Sinyal molekülü salgılayabilme

II) Spesifik moleküler etkileşim ile sinyal moleküllerini tespit edebilme otoindüktör salgılayabilme

III) Yanıt olarak gen transkripsiyonunu düzenleyebilme

İlk olarak 1970-1980 yılları arasında Kenneth Nealson ve Terry Platt tarafından biyolüminesan üreten bir deniz bakterisi olan *Aliivibrio fischeri* (*Vibro fischeri*) üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmacılar, *A. fischeri*'nin belli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra otoindüktör olarak adlandırılan sinyal moleküllerini kullanarak biyolüminesan pigmentini ürettiğini göstermişlerdir (Saraçlı, 2006). Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı yapılarının farklı olmasından dolayı farklı sinyal moleküllerini kullandıkları bildirilmiştir. Gram-negatif bakteriler sinyal molekülü olarak farklı zincir uzunluğuna sahip *N*- açil homoserin lakton (AHL) moleküllerini kullanmaktadır. Bu sinyal molekülleri yeterli seviyeye ulaştığında LuxR tipinde transkripsiyonel aktive edici proteine (R-protein) veya diğer transkripsiyonel aktivatörlere bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu indükleyebilirler. Gram-pozitif bakteriler ise sinyal molekülü olarak posttranslasyonel olarak modifiye edilmiş kısa oligopeptid moleküllerini kullanır. Bakteri miktarı ve gelişimi ise bir histidin kinaz ile sinyal iletim sensör elemanının etkileşmesi sonucunda düzenlenmektedir (De Kievit ve Iglewski, 2000; Diggle vd.,

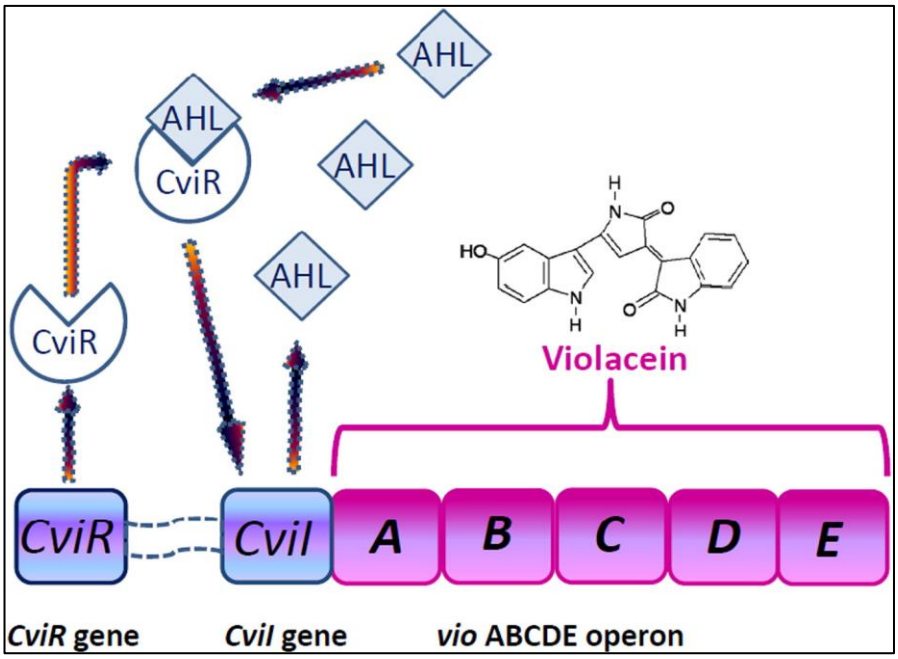
2007). Aynı zamanda hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerin ikinci sinyal molekülü olarak furanol borat diester türevlerini kullanmaktadır (Avcı, 2009).

Antibiyotikler duyarlı bakterileri öldürerek seçici bir baskı oluşturur ve dirençli bakterilerin hayatta kalarak çoğalmasını sağlayabilir. Yeni bir antibiyotik keşfi sonucunda, bakteriler o antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiğinde ortamdaki duyarlı bakterilerin yok olması ile birlikte dirençli bakteriler popülasyonda yayılım gösterebilirler. Bu nedenle enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede antibiyotiklere alternatif farklı tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. QS sisteminin inhibisyonunun alternatif bir antibakteriyel tedavi yöntemi olabileceği öngörülmektedir. Çünkü QS inhibitörleri aracılığı ile bakteriler arası iletişimin kesileceği ve bakterilerin patojenitelerini kaybedeceği öngörülmektedir (Williams 2007). Günümüzde QS inhibitör özelliği bulunan maddelerin birçoğu insan kullanımı için uygun değildir. Bundan dolayı güvenilir ve doğal QS inhibitörlerinin keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Çepni ve Gürel, 2011). Özellikle anti-QS özelliğine sahip, kullanımı güvenilir olan bitkilerin araştırılması önem arz etmektedir.

QS inhibitörü adayı ajanların etkinliklerinin araştırılmasında *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ve *P. aeruginosa* PAO1 yaygın olarak kullanılan biyoraportör suşlardır.

### 1.5.1 *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

*C. violaceum* doğada yaygın olarak bulunan Gram-negatif bir bakteri türüdür. *C. violaceum*'un ATCC 12472 suşu *cviI* genini kullanarak uzun zincirli (C10-C16) AHL moleküllerini üretirler. Bu moleküller ise doğal antibiyotik olarak bilinen ve viyolasin olarak adlandırılan mavi-mor renkli ve suda çözünmeyen bir pigmentin sentezinde görev alırlar. Bu türde QS mekanizması CviI/R sistemi ile gerçekleşir. CviI, S-adenozilmetiyonin ve yağ asitlerinden AHL moleküllerini sentezler. Bu AHL molekülleri belli bir eşik değerine ulaştıktan sonra CviR reseptör proteinine bağlanır ve viyolasin pigmenti üretiminden sorumlu olan operonu aktive eder (Duran vd., 2016).




**Şekil 1.2** *C. violaceum*'un viyolasin sentezi ve regülasyonu (Duran vd., 2016)

### 1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

*P. aeruginosa* insanlarda ve hayvanlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan Gram-negatif bir bakteri türüdür. Bu türler AHL moleküllerini kullanarak çeşitli virülans faktörlerinin sentezi ve düzenlenmesini sağlar. QS mekanizması olarak *C. violaceum* türlerinde olduğu gibi CviI/R homoloğu olan LasI/R ve RhII/R sistemlerini kullanırlar. LasI ile 3-oxo-C12-AHL, RhII ile de C4-AHL moleküllerini üretirler. Bu AHL molekülleri belli bir eşik değerine ulaştıktan sonra sırasıyla LasR ve RhIR reseptör proteinlerine bağlanırlar. 3-oxo-C12-AHL molekülü ile proteaz, elastaz, ekzotoksin; C4-AHL molekülü ile piyosiyanin, siderefor ve rhamnolipit gibi çeşitli virülans faktörlerini sentezlerler (Williams, 2007).

Biyofilmler, bakterilerin kendi kendilerine ürettikleri bir polisaakkarit matris içerisinde kalmasını ve herhangi bir dış etkene maruz kalmamalarını sağlayarak kalkan görevi gören yapılardır (Hoiby vd., 2017). QS sistemleri ile ilişkisi keşfedildiğinden itibaren *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu (Shih ve Huang, 2002), anti-QS sistem deneylerinde sıklıkla tercih edilen ve biyofilm oluşumu gözlenen bakterilerden biridir. Bu bakteri suşu, biyofilm oluşumunu, en az iki N-asetil homoserin lakton kodlayan LasI ve RhlI olarak tanımlanan QS sistemleri

kontrolünde gerçekleştirmektedir (De Kievit vd., 2001). LasI QS sistemi, sinyal molekülü olarak N-(3-oksododekanoyl)-L-homoserin (OdDHL) laktonlarını (3-okso-C12-AHL), RhlI QS sistemi ise sinyal molekülü olarak N-bütiril-L-homoserin (BHL) laktonlarını (C4-AHL) kullanmaktadır (Sırıken ve Öz, 2017).

## 1.6 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada *Lamiaceae* familyasına ait *Lamium orientalis* Fisch. & Mey. bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından hazırlanan MeOH ekstraktlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları üzerine antikanser, insan patojenlerini temsil eden suşlara karşı antibakteriyel ve bazı biyoraportör suşlara karşı anti-QS aktivitelerinin belirlenmesine yönelik *in vitro* çalışmalar yapılarak ilaç etken maddesi olma potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

# 2. MATERYAL VE METOT

## 2.1 Materyaller

### 2.1.1 Bitki Materyali ve Ekstraktların Elde Edilmesi

Tez kapsamında kullanılan örnekler, 2019 yılında Konya' da gerçekleştirilen arazi çalışması sırasında toplanmıştır (Konya, Yazır Mahallesi, 1100 m). Bitki örneklerinin taksonomik olarak tanımlanması, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY tarafından yapılmıştır.

Bitki örnekleri, çiçek, yaprak, gövde ve kök kısımları ayrılarak gölgede kurutulduktan sonra örnekler değirmende toz haline getirildi. Her bir kısmın, metanol (MeOH) özütleri maserasyon tekniği kullanılarak çıkarıldı. Bu amaçla, bitki materyalleri (5 g), oda sıcaklığında (yaklaşık 25°C) 24 saat boyunca 100 ml metanol ile ekstrakte edildi. Daha sonra çözücüler rotary evaporatör kullanılarak buharlaştırıldı. Tüm ekstraktlar analize kadar +4°C'de saklanmıştır.

### 2.1.2 Kanser Hücre Hatları

*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktları ile antikanser özelliğinin tespiti için, iki farklı meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hatları negatif meme kanseri modelini temsil eden MDA-MB-231 hücre hattı ve pozitif meme kanseri modelini temsil eden MCF-7 hücre hattıdır. Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden, MCF-7 hücre hattı ise Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden temin edilmiştir.

### 2.1.3 Bakteri Suşları

*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek ksımılarının MeOH ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği, 10 Gram-negatif ve üç Gram-pozitif olmak üzere toplam 13

referans bakteri suşuna karşı araştırılmıştır (Tablo 2.1). Anti-QS testleri için ise *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ve *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu kullanılmıştır. Suşlar, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC) ve Ulusal Tipi Kültür Koleksiyonu (National Collection of Type Cultures, NCTC) referans suşlarıdır. Suşlar Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

**Tablo 2.1** Çalışmada kullanılan bakteri suşları

| Suş | Gram reaksiyonu |
|---|---|
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | Gram-negatif basil |
| *Escherichia coli* NCTC 13846 | Gram-negatif basil |
| *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 | Gram-negatif basil |
| *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 | Gram-negatif basil |
| *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 | Gram-negatif basil |
| *Proteus mirabilis* ATCC 7002 | Gram-negatif basil |
| *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 | Gram-negatif basil |
| *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 | Gram-negatif basil |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 | Gram-negatif basil |
| *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 | Gram-negatif basil |
| *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 | Gram-negatif basil |
| *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002 | Gram-negatif kokobasil |
| *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 | Gram-pozitif kok |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | Gram-pozitif kok |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | Gram-pozitif basil |

### 2.1.4 Kimyasallar, Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Bu deneysel çalışma, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Kanser Genetiği ve Biyoinformatik Laboratuvarı ile Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nün Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma laboratuvarının mevcut altyapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan ekipmanlar modelleri ile birlikte Tablo 2.2'de ve deneylerde kullanılan kimyasallar Tablo 2.3'de listelenmiştir.

**Tablo 2.2** Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler

| Numara | Ekipman 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 / ClassII |
| **11** | Test Kabini | Nüve / TK-252 |
| **12** | $CO_2$ İnkübatörü | Nüve / EC160 |
| **13** | Isı Kontrollü İnkübatör | Thermo |
| **14** | Otoklav | Nüve / Steam Art |
| **15** | Masaüstü Santrifüj | Nüve / NF 800 |
| **16** | Mikrosantrifüj | Starlab |
| **17** | Soğutmalı Mikrosantrifüj | Hettich / MICRO 220R |
| **18** | Faz Konstrast Görüntüleme Sistemli Kameralı Ters Mikroskop | Leica / DMi1 |
| **19** | Spektrofotometre Nano Drop | Thermo Scientific / MulskanGO UV/Vis |
| **20** | Mcfarland Densitometer Cihazı | Biosan / DEN-1B |
| **21** | Kimyasal Saklama Dolabı | Tezsan |
| **22** | 96 Kuyucuklu Mikropleytler | Techno Plastic Products |
| **23** | Steril Besiyeri Kapları (90mm çaplı) | Isolab |
| **24** | Falkon Tüpler | Isolab, Kırgen, CAPP |
| **25** | Hücre Sıyırıcı | Techno Plastic Products |
| **26** | Eppendorf Tüpler (Cryotüp) | Isolab |
| **27** | Serolojik Pipetler | Biologix |
| **28** | Mikropipetler (tek ve çok kanallı) | Eppendorf, Thermo, CAPP, Topscien |
| **29** | Tek kullanımlık plastik özeler | Isolab |
| **30** | pH gösterge stribi | Isolab |
| **31** | Thoma Lamı | Marienfeld-Neubauer-improved |
| **32** | Pamuklu eküvyon | Cultiplast/LP Italiana spa |

**Tablo 2.3** Çalışmada kullanılan kimyasallar

| Numara | Kimyasal Adı | Üretici Firma |
|---|---|---|
| **1** | 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) | Thermo Fisher Scientific |
| **2** | Penisilin/Streptomisin karışımı (%0,1) | Thermo Fisher |
| **3** | İnsülin (0,01 mg/ml) | Pan Biotech |
| **4** | Dimetilsülfoksit (DMSO) | Rjedel-de Haen |
| **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 |
| **11** | Levofloksasin | Tokyo Chemical Indıstry |
| **12** | Kristal viyole | Merck/ Germany |
| **13** | Etanol (EtOH) | - |
| **14** | Serum Fizyolojik (Sodyum klorür) | - |
| **15** | Mueller Hinton agar (MHA) | Merck |
| **16** | Mueller Hinton broth (MHB) | Merck |
| **17** | Luria Bertani broth (LB) | NZYTech, Lisbon, Portugal |
| **18** | Nutrient agar (NA) | Merck |
| **19** | Bakteriyolojik Agar (%0,5) | - |

## 2.2 Metot

### 2.2.1 Ekstraktların Çalışma Konsantrasyonlarının Hazırlanması

*L. orientalis*'nin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktlarının *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi için, son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde ultra saf suda çözünerek ana stoklar hazırlanmıştır. Ana stoklardan seri dilüsyon işlemi yapılarak 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL çalışma stokları elde edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için ise son konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde ultra saf suda çözünerek ana stoklar hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoklardan

seri dilüsyon işlemi yapılarak 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL çalışma stokları elde edilmiştir.

QS inhibisyon testleri için ise son konsantrasyonu 10 mg/mL ve 5 mg/mL olacak şekilde ultra saf suda çözünerek ana stoklar hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çalışma stokları ileride kullanılmak üzere -20˚C' de muhafaza edilmiştir.

### 2.2.2 Hücre Kültürü

Çalışmada, *L. orientalis*'nin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktlarının meme kanseri üzerine *in vitro* antikanser aktivitesi MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde test edilerek değerlendirilmiştir. Antikanser aktivitenin tespiti için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) metodu (Mitokondriyal Dehidrogenez Enzim Aktivitesi) uygulanmıştır.

#### 2.2.2.1 Hücre kültürünün devamlılığı

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğaltılması için %10 FBS, %1 NEAA, %0,1 penisilin/streptomisin ve 0,01 mg/ml insülin içeren 1X DMEM besiyeri kullanılmış ve 4˚C'de muhafaza edilmiştir. Her iki hücre hattı için de aynı besiyeri kullanılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri 90 mm çapındaki petrilerde 37˚C'de ve %5 $CO_2$ koşullarını sağlayan inkübatörde kültürlenmiştir. Hücre pasajlama işlemi, hücrelerin logaritmik faza (hücrelerin petri kabının ~ %70-80'lik yoğunluğa ulaşması) gelmesi durumunda gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin gerekli yoğunluğa gelmesi ile birlikte, hücreler tarafından kullanılmış besiyeri dökülerek 1 mL 1X konsantrasyonundaki fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra petri yüzeyine yapışmış hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak için petri kabına 1 mL 1X Tripsin-EDTA eklenmiştir. Enzim aktivitesinin gerçekleşmesi için petri 37˚C'de %5 $CO_2$ koşullarını sağlayan inkübatörde beş dakika tutulmuştur. İnkübasyonun ardından hücrelerin tripsin tarafından zarar görmemesi için petri kabına 1 mL taze DMEM besiyeri ilave edilmiş ve hücre sıyırıcı yardımı ile hücreler petri yüzeyinden yavaşça toplanmıştır. Petri yüzeyinden ayrılan hücreler, 15 mL'lik falkon tüpü içerisine aktarılmış ve 2.000

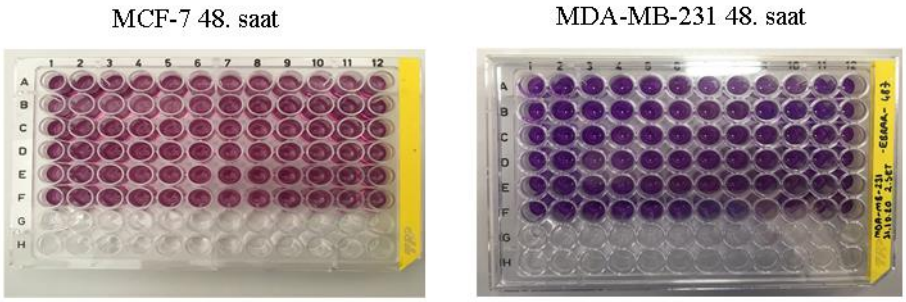
rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant dökülerek pellet 1 mL taze DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon 90 mm çaplı üç petri kabına aktarılarak inkübasyona kaldırılmıştır.

#### 2.2.2.2 Hücre canlılık testi (MTT)

Ekstraktların antikanser aktivitesi MTT yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. MTT, bulundurduğu tetrazolium halkalarının canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimi yardımıyla parçalanması sonucunda mor renkli formazan kristalleri oluştururlar. Sonrasında bu formazan kristallerinin DMSO gibi bir çözücü ile çözünmesi sonucunda elde edilen türbiditenin optik dansitesine göre hücrelerin canlılık oranı değerlendirilir (Moskova-Doumanova vd., 2012).

Hücreler pasajlama işleminde olduğu gibi kazınıp santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 1 mL taze 1X DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspansiyon 1/10 oranında seyreltildikten sonra hücreler bir hemositometre yardımı ile invert mikroskop altında sayılmış ve süspansiyonun mL'sindeki hücre sayısı hesaplanmıştır. Ardından 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropleytte 10.000 hücre/100 µL olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Petri kabı 37˚C'de %5 $CO_2$'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Can vd., 2020). Süre sonunda *L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarına ait MeOH ekstraktlarının çalışma stoklarından sırasıyla 10'ar µL konulmuş ve 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL son konsantrasyonları elde edilmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise 10'ar µL ultra saf su konulmuş ve petri kabı 24 ve 48 saate kadar inkübe edilmiştir. Kontrol ve her bir ekstrakt muamelesi üç kuyucukta tekrar edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin invert mikroskop altında 10X büyütmede fotoğrafları çekilmiştir. Bu işlemden sonra kuyucuklardaki içerik dikkatli bir şekilde aspire edilmiştir. Sonra her kuyucuğa 50 mL'lik falkon tüp içerisine hazırlanmış MTT solüsyonundan (0,025 g MTT + 250 µL FBS + 49,75 mL saf 1X DMEM) 100 µL konulmuş ve petri kabı dört saat 37˚C'de %5 $CO_2$'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki MTT solüsyonu aspire edilmiş ve ardından 100'er µL saf DMSO konulmuştur. Petri kabı, oda sıcaklığında 300 rpm'de ~10-15 dakika tutularak formazan kristallerinin çözülmesi sağlanmıştır. Elde edilen türbidite, DMSO blank

kuyucuğuna karşı spektrofotometre cihazı kullanılarak 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Ekstraktlar ile muamele edilmiş kuyucuklardaki hücre canlılığı kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmış ve sonuçlar yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Deney, birbirinden bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmıştır. Veriler ortalama ± standart hata şeklinde sunulmuştur. Ekstraktların $IC_{50}$ (hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu) değeri GraphPad Prism 8 programında gerçekleşmiştir.




**Şekil 2.1** MCF-7 ve MDA-MB-231 MTT işleminden sonra mikropleyt görüntüsü

### 2.2.3 Antibakteriyel Aktivite

Ekstraktların antimikrobiyal etkinliği Wiegend vd., (2008) tarif ettiği şekilde sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

#### 2.2.3.1 Bakteri besiyerlerinin ve kültürlerinin hazırlanması

Ticari olarak toz halinde bulunan MHA, MHB ve LB broth üretici firmaların önerileri doğrultusunda distile suda eritilmiş ve pH değerleri kontrol edilmiştir. Ardından otoklav (121ºC'de, 1.5 atm, 15 dk) edildikten sonra ~50ºC'ye kadar soğutulmuş ve 90 mm çaplı petri plaklarına 20-25 mL hacminde dökülmüştür.

Çalışmada kullanılan ve -80˚C'de muhafaza edilen suşlar MHA besiyerinde canlandırılarak taze kültürleri hazırlanmıştır.

#### 2.2.3.2 MİK tespiti

Ekstraktların test edilen bakteri suşlarına karşı MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. EUCAST önerileri doğrultusunda ekstraktların 15,6-500 µg/mL konsantrasyon aralığı test edilmiştir (EUCAST 2021). Özetle, her bir ekstrakt için her bakteri suşuna karşı 96 kuyucuklu mikropleytin ilk kuyucuklarına 180 µL, diğer kuyucuklarına ise 100 µL hacminde MHB konulmuştur. Ardından ilk kuyucuğa 20 µL hacminde ekstrakt (5 mg/mL) konulmuş ve ilk kuyucukta 500 µg/mL ekstrakt konsantrasyonu sağlanmıştır. Sonra ilk kuyucuktan 100 µL alınarak 15,6 µg/mL'e konsantrasyonu elde edilene kadar seri sulandırım işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki basamakta bakterilerin taze kültürlerinden bir densitometre yardımı ile McFarland 0,5 (1-2 x $10^8$ kob/mL) standardı yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. Ardından bu inokulum steril serum fizyolojik içerisinde 10 kat seyreltilmiş ve 5'er µL hacminde kuyucuklara inoküle edilmiştir. Her test için bir kuyucuk üreme kontrolü (ekstrakt mevcut değil), bir kuyucuk ise sterilite kontrolü (bakteri inoküle edilmemiş) olarak kullanılmıştır. Deneyde referans antibiyotik olarak geniş spektrumlu bir antibiyotik olan levofloksasin (0,015-128 µg/mL) kullanılmıştır. Petri kabının, steril kapağı kapatıldıktan sonra 37ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklarda gözle görülür bakteri üremesinin olmadığı son ekstrakt/antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edilmiştir.

### 2.2.4 QS İnhibisyon Testleri

#### 2.2.4.1 Viyolasin inhibisyon testi

Ekstraktların *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin pigment üretimi üzerine inhibitör etkinlikleri McClean vd., (1997) tarif ettiği şekilde yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır. Özetle *C. violaceum*'un taze kültüründen bir koloni alınarak 5 mL LB broth'da 30°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültürden 50 µL alınarak 5 mL hacminde eritilmiş ve 50ºC'ye soğutulmuş LB yumuşak agar (%0,5 agar) içerisine inoküle edilmiştir. Agar-kültür karışımı maksimum hızda vortekslendikten sonra hızlı bir şekilde daha önceden hazırlanmış LB agar yüzeyine dökülmüş ve donması için ~15 dk beklenmiştir. Yumuşak agar donduktan sonra

yüzeyine her bir ekstrakt için steril bir pens yardımı ile 6 mm çapında boş diskler yerleştirilmiştir. Disklerin üzerine ekstraktların 5 mg/mL konsantrasyonundaki çalışma stoklarından 20 µL damlatılmış (son konsantrasyon 100 µg/disk) ve kuruması için biyogüvenlik kabini altında ~15 dk bekletilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO1 suşunun bir gecelik kültürünün supernatantı kullanılmıştır. Kültürler 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından disklerin etrafında viyolasin inhibisyonu araştırılmıştır. QS inhibisyonu disklerin etrafında renksiz, opak bir zon çapının varlığı ile belirlenmiştir.

#### 2.2.4.2 Biyofilm inhibisyon testi

Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkileri O'Toole (2011) tarafından tarif edildiği şekilde kristal viyole yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla *P. aeruginosa*'nın taze kültüründen bir koloni alınarak 5 mL LB broth'da 37°C'de 16 saat inkübasyon gerçekleşmiştir. Süre sonunda kültür yeni LB broth ile 100 kat seyreltilmiş ve 96 kuyucuklu mikropleytin tüm kuyucuklarına 180 µL hacminde inoküle edilmiştir. Ardından, ekstraktların kuyucuklardaki nihai konsantrasyonları 500 ve 1000 µg/mL olması için sırasıyla 5 ve 10 mg/mL çalışma stoklarından 20'şer µL alınmış ve 180 µL'nin üzerine ilave edilmiştir. Kontrol kuyucukları için ekstraktların çözücüsü olarak aynı hacimde steril distile su konulmuştur. Kontrol ve her bir ekstrakt muamelesi üç kuyucukta tekrar edilmiştir. Petri kabı steril bir kapak ile kapatıldıktan sonra 37°C'de 24 saat stabil olarak inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından ekstraktların bulunduğu kuyucuklardaki bakteri üreme ve gelişmenin baskılanıp baskılanmadığı 600 nm'de okutularak kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmıştır. Ardından kuyucuklardaki besiyeri dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra planktonik hücrelerin uzaklaştırılması için petri kabı steril distile su içeren üç kaba sırasıyla yavaş bir şekilde daldırılıp çıkarılarak yıkanmıştır. Yıkama işlemleri sonrasında tüm kuyucuklara 200 µL %0,1'lik kristal viyole boyası pipetlenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Süre sonunda fazla boya dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve yukarıda anlatıldığı gibi distile su ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Son yıkama aşamasından sonra pleyt 50°C'de 30 dk tutularak suyun

kuyucuklardan tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından, biyofilm tabakası tarafından tutulan kristal viyole boyası 100 µL hacminde saf EtOH ile çözülmüştür. Elde edilen türbidite, EtOH blank kuyucuğuna karşı 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Ekstraktlar ile muamele edilmiş kuyucuklardaki biyofilm oluşumu kontrol kuyucukları ile karşılaştırılmış ve sonuçlar yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Deney, birbirinden bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmıştır.

### 2.2.5 İstatistiksel Analizler

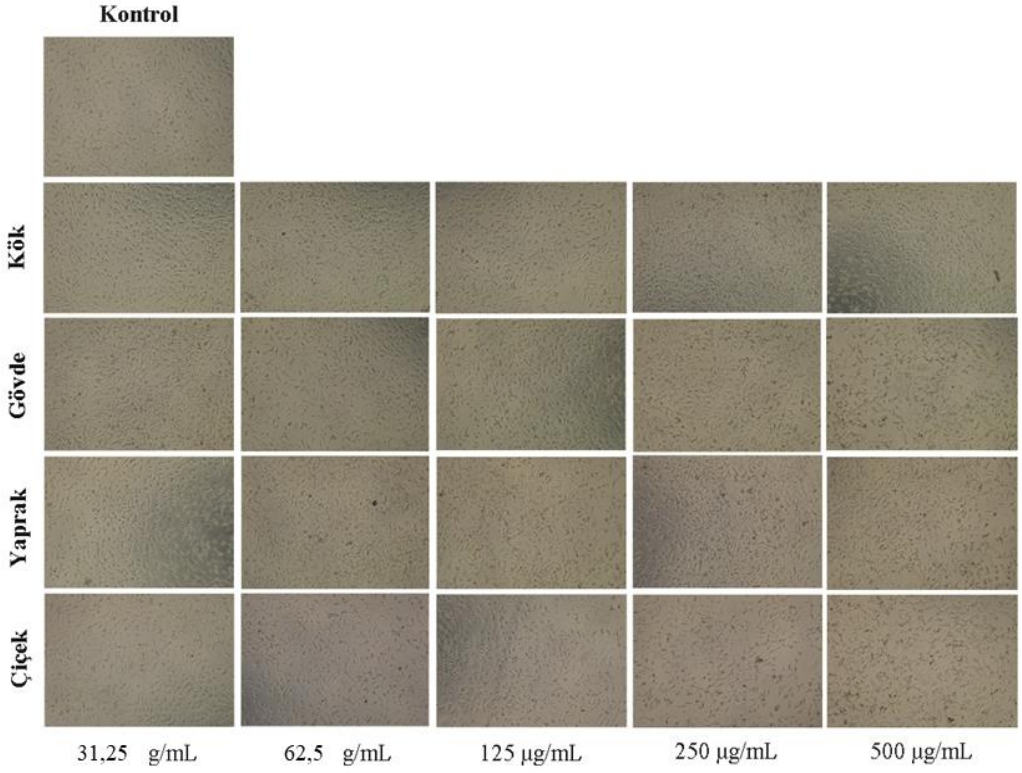
Deneyler birbirinden bağımsız olarak en az üç kez tekrarlanmıştır. Hücre canlılık testi için veriler ortalama ± standart hata, biyofilm inhibisyon testine ait veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. Grafiklerin oluşturulmasında Microsoft Office Excel 2016 programı kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi Windows için IBM SPSS 23. paket programı (IBM, Armonk, NY, ABD) ve Excel 2016 programları kullanılarak bağımsız grup t-testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

# 3. BULGULAR

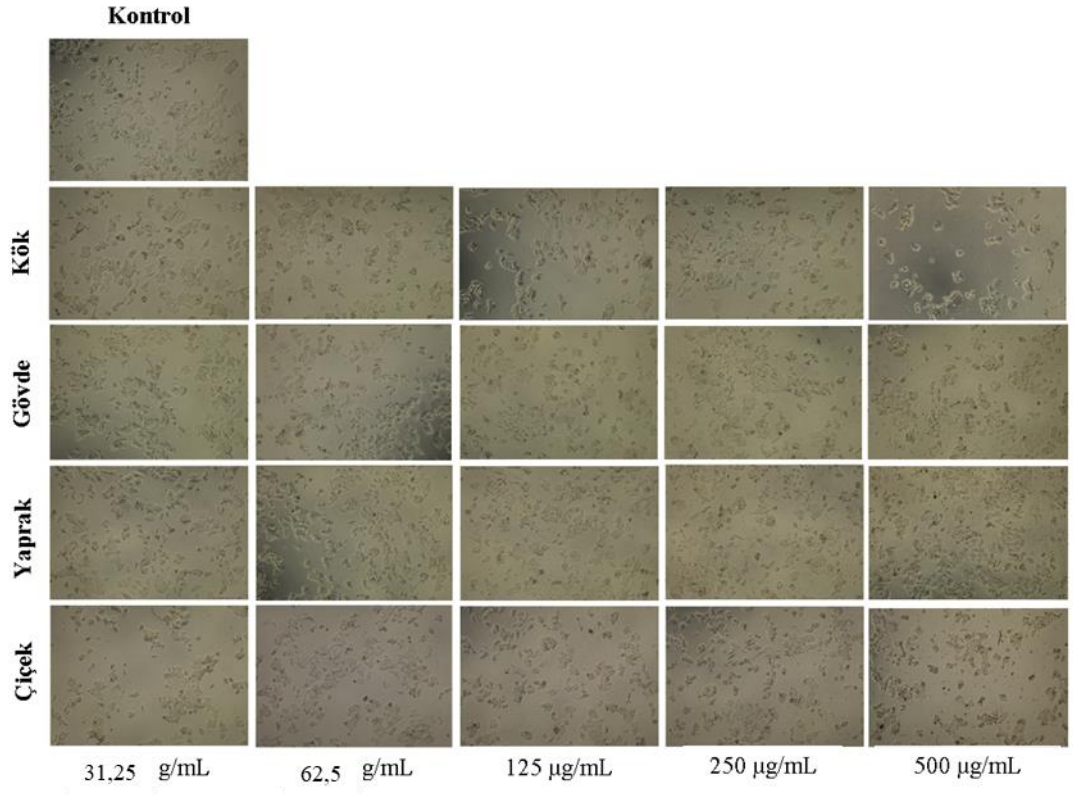
## 3.1 Antikanser Aktivite Bulguları

### 3.1.1 Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Aktivite Bulguları

*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktlarının, MCF-7 hücreleri üzerinde antikanser aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olduğu saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin canlılık oranları ve morfolojik görüntüleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerine karşı antikanser etkinliğin en fazla 500 µg/mL konsantrasyonundaki kök ekstraktından elde edildiği tespit edilmiştir.




**Şekil 3.1** MCF-7 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 24. saatteki morfolojik görüntüleri

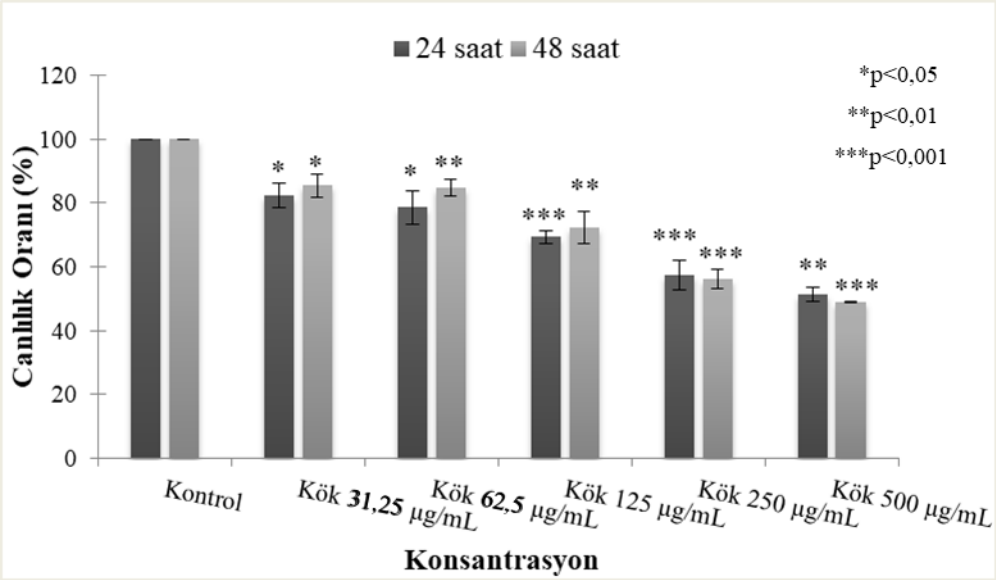



**Şekil 3.2** MCF-7 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 48. saatteki morfolojik görüntüleri

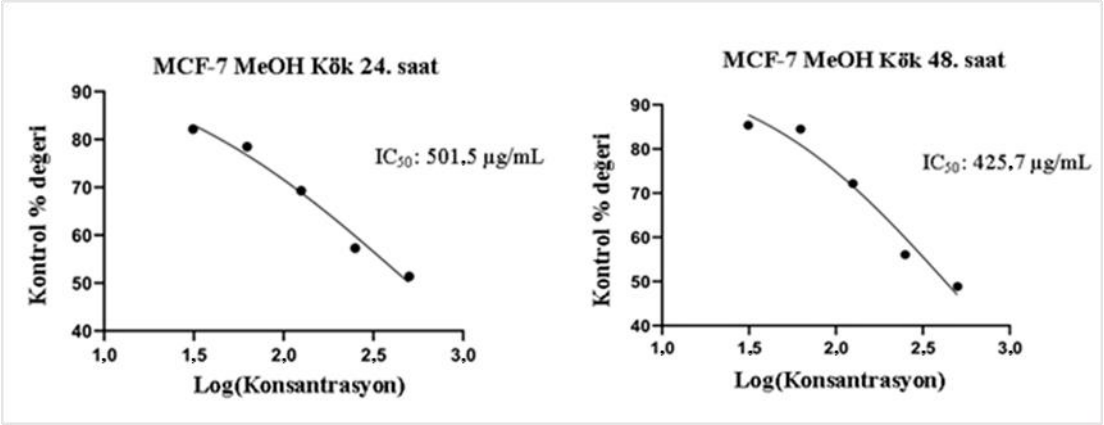
Kök ekstraktının test edilen konsantrasyonlarda 24. ve 48. saat sonunda MCF-7 kanser hücrelerinin canlılık oranı üzerine etkisi Grafik 3.1 ve Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Kök ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonunda ve 24. saatte MCF-7 hücrelerinin canlılık oranını %51,4'e, 48. saatte ise %48,9'a kadar azalttığı bulunmuştur. Kök ekstraktı için elde edilen $IC_{50}$ değerleri ise 24. saat için 501,5 µg/mL, 48. saat için 425,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.3).

**Tablo 3.1** MCF-7 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | **Canlılık Oranı (%)** | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 82,2±3,8 | 87,9±3,6 |
| 62,5 µg/mL | 78,5±5,4 | 84,6±2,6 |
| 125 µg/mL | 69,3±2,1 | 75,5±5,2 |
| 250 µg/mL | 57,3±4,8 | 68,6±3,2 |
| 500 µg/mL | 51,4±2,2 | 48,9±0,1 |



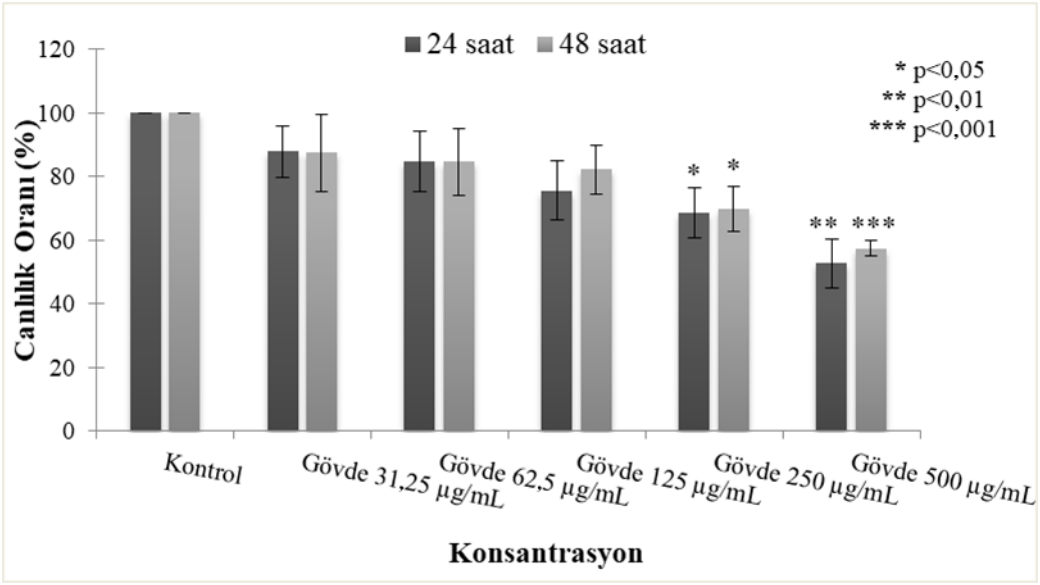

**Grafik 3.1** MCF-7 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri




**Şekil 3.3** Kök ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri

*L. orientalis*'in gövde, yaprak ve çiçek ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser etkisinin kök ekstraktına göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

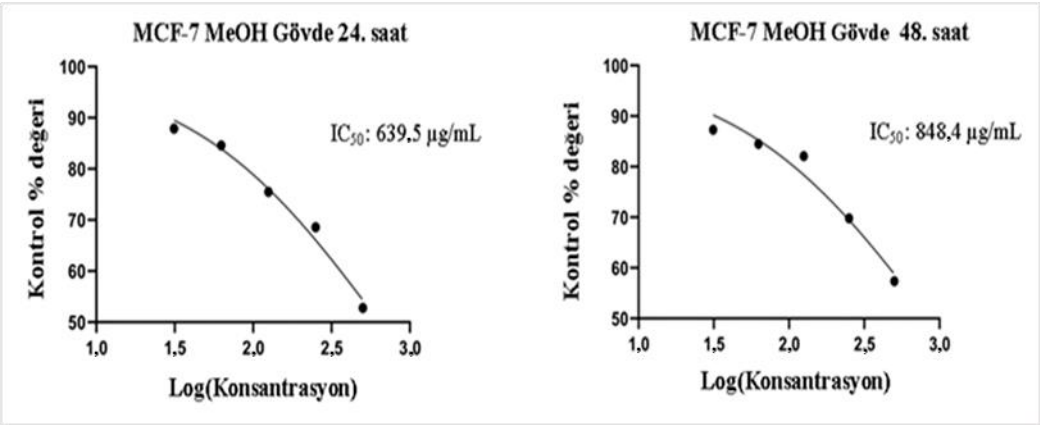
Gövde ekstraktının test edilen konsantrasyonlarda 24. ve 48. saat sonunda MCF-7 kanser hücrelerinin canlılık oranı üzerine etkisi Grafik 3.2 ve Tablo 3.2'de özetlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin canlılık oranlarını 24. saatte %52,8'e, 48. saatte ise %57,4'e kadar azalttığı bulunmuştur. Gövde ekstraktı için elde edilen $IC_{50}$ değerleri ise 24. saat için 639,5 µg/mL, 48. saat için 848,4 µg/mL olarak hesaplanmış ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.




**Grafik 3.2** MCF-7 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.2** MCF-7 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

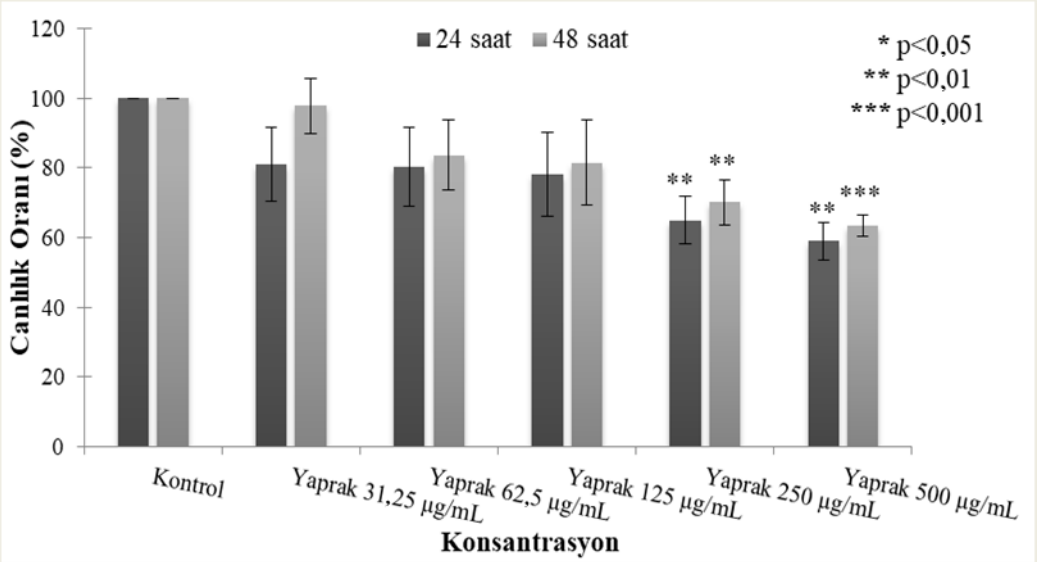
| | **Canlılık Oranı (%)** | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 87,9±8,1 | 87,3±12,1 |
| 62,5 µg/mL | 84,6±9,5 | 84,5±10,5 |
| 125 µg/mL | 75,5±9,4 | 82,1±7,8 |
| 250 µg/mL | 68,6±8,0 | 69,8±7,2 |
| 500 µg/mL | 52,8±7,7 | 57,4±2,4 |




**Şekil 3.4** Gövde ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri

Yaprak ekstraktının test edilen konsantrasyonlarda 24. ve 48. saat sonunda MCF-7 kanser hücrelerinin canlılık oranı üzerine etkisi Grafik 3.3 ve Tablo 3.3'de

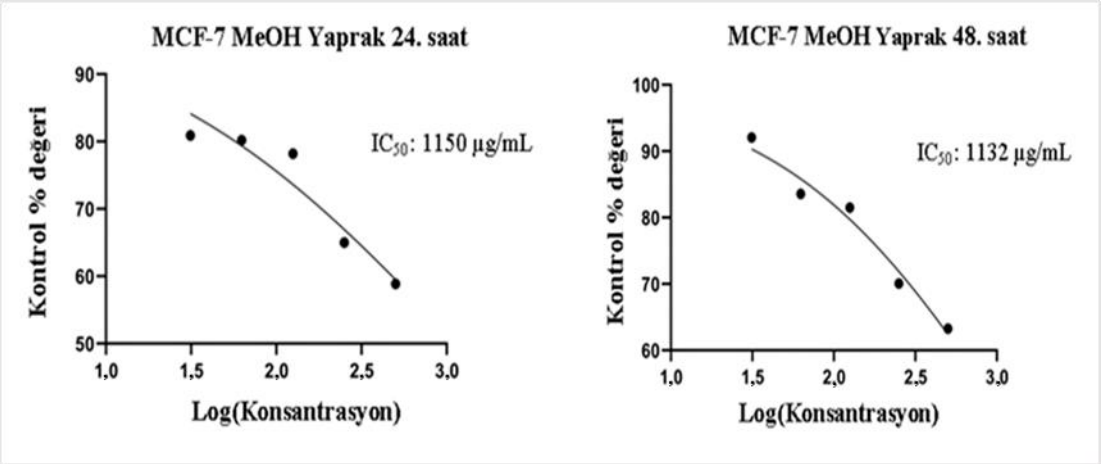
özetlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin canlılık oranlarını 24. saatte %58,9'a, 48. saatte ise %63,3'e kadar azalttığı bulunmuştur. Yaprak ekstraktı için elde edilen $IC_{50}$ değerleri ise 24. saat için 1150 µg/mL, 48. saat için 1132 µg/mL olarak hesaplanmış ve Şekil 3.5'de gösterilmiştir.




**Grafik 3.3** MCF-7 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

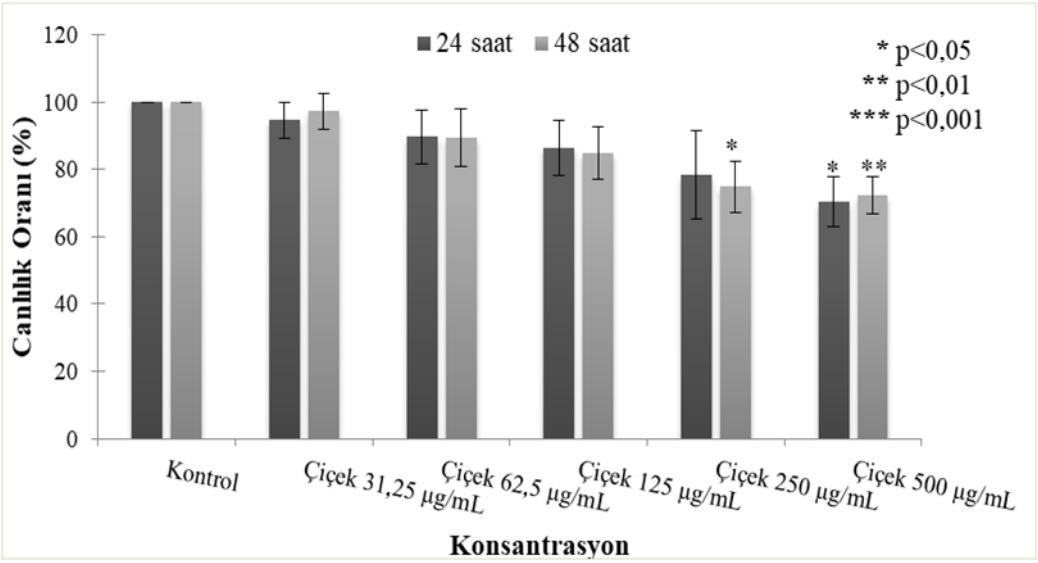
**Tablo 3.3** MCF-7 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | **Canlılık Oranı (%)** | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 80,9±10,5 | 97,8±8,0 |
| 62,5 µg/mL | 80,2±11,3 | 83,6±10,1 |
| 125 µg/mL | 78,2±12,0 | 81,5±12,4 |
| 250 µg/mL | 65,0±6,7 | 70,1±6,4 |
| 500 µg/mL | 58,9±5,4 | 63,3±3,2 |




**Şekil 3.5** Yaprak ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri

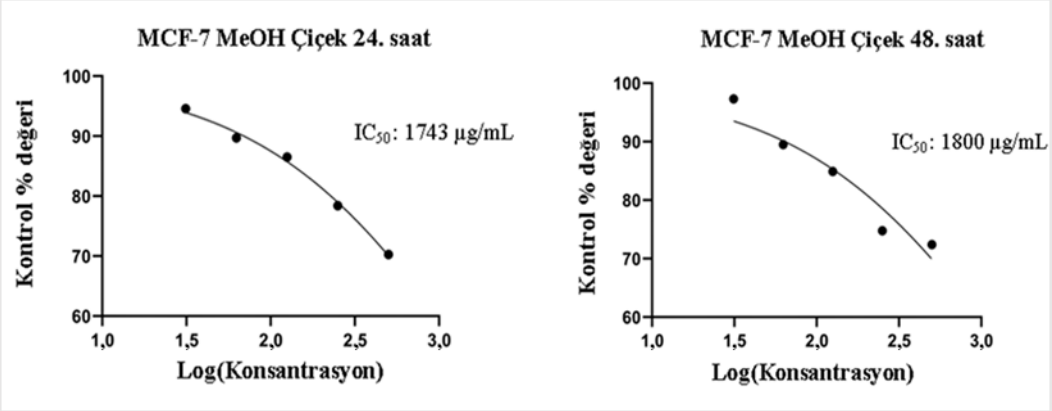
Çiçek ekstraktının test edilen konsantrasyonlarda 24. ve 48. saat sonunda MCF-7 kanser hücrelerinin canlılık oranı üzerine etkisi Grafik 3.4 ve Tablo 3.4'de özetlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin canlılık oranlarını 24. saatte %70,3'e, 48. saatte ise %72,4'e kadar azalttığı bulunmuştur. Çiçek ekstraktı için elde edilen $IC_{50}$ değerleri ise 24. saat için 1743 µg/mL, 48. saat için 1800 µg/mL olarak hesaplanmış ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.




**Grafik 3.4** MCF-7 hücre hattı üzerine çiçek ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.4** MCF-7 hücre hattı üzerine çiçek ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | Canlılık Oranı (%) | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 94,6±5,4 | 97,3±5,2 |
| 62,5 µg/mL | 89,7±8,0 | 89,5±8,5 |
| 125 µg/mL | 86,5±8,3 | 84,9±7,9 |
| 250 µg/mL | 78,4±13,1 | 74,8±7,7 |
| 500 µg/mL | 70,3±7,5 | 72,4±5,5 |



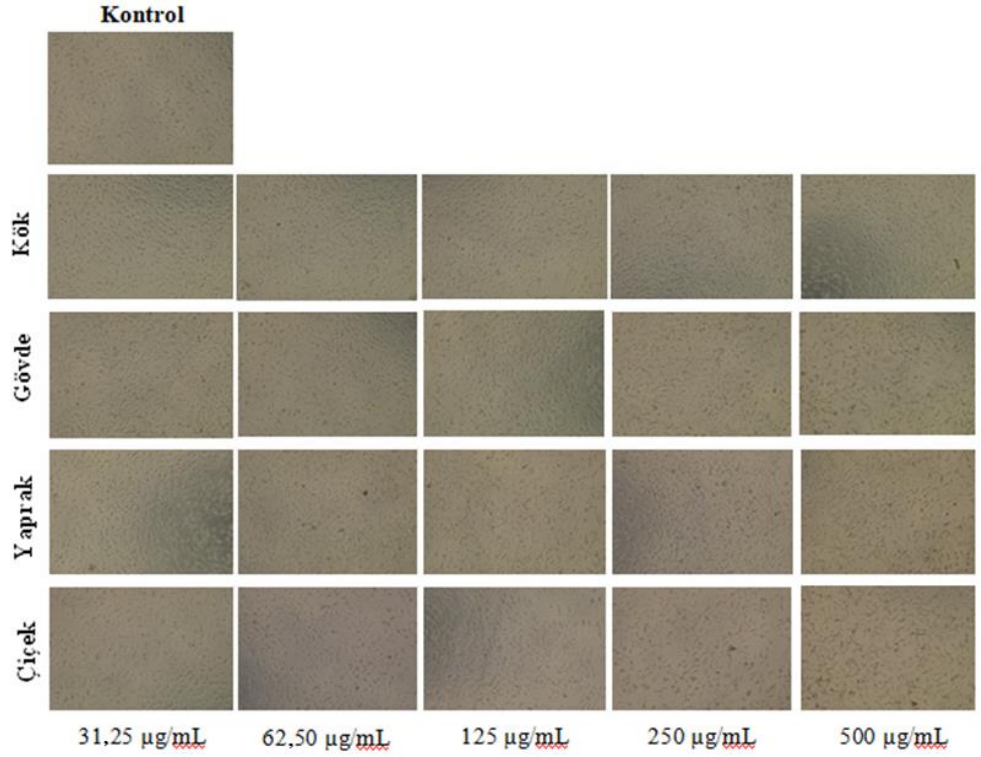

**Şekil 3.6** Çiçek ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerine 24. ve 48. saat $IC_{50}$ değerleri

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

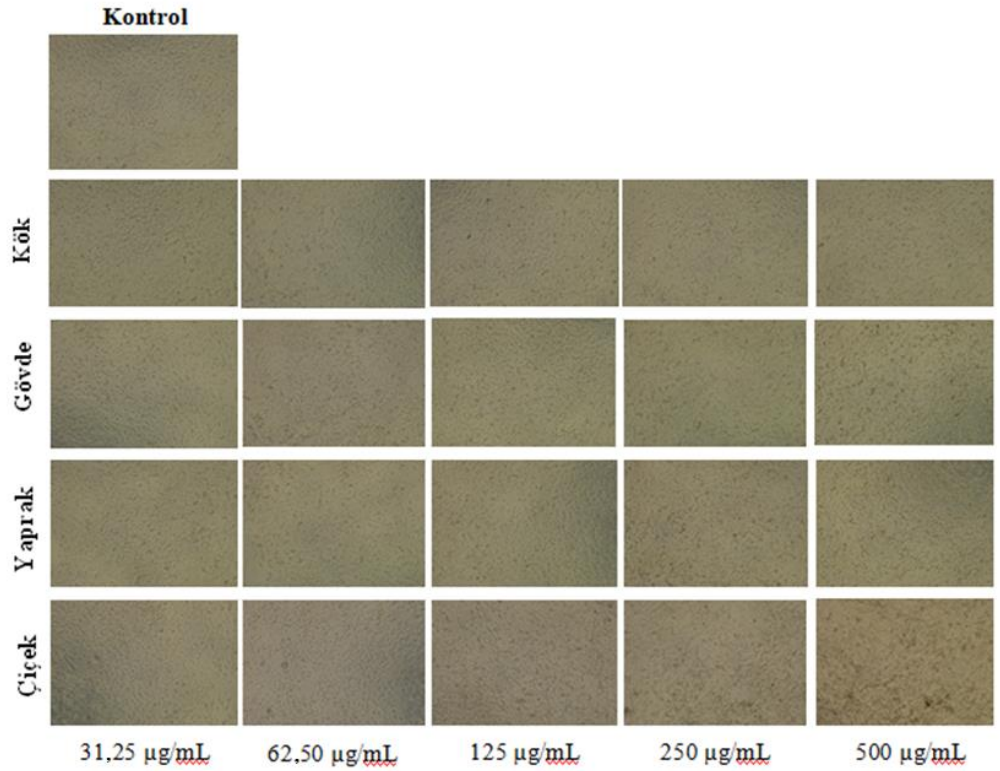
MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık oranları ve morfolojik görüntüleri Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı için 24. ve 48. saatlerdeki etkiler incelendiğinde, *L. orientalis*'in kök ekstraktının 48. saat sonunda hafif bir şekilde hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Gövde, yaprak ve çiçek MeOH ekstraktlarında ise hücre canlılık oranlarında azalma olmadığı aksine 48. saat sonunda hücre canlılık oranında artış olduğu saptanmıştır. MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonucunda elde edilen veriler ile *L. orientalis* bitkisinin farklı organlarına ait ekstraktlarının hiçbirinde $IC_{50}$ değeri hesaplanamamıştır.

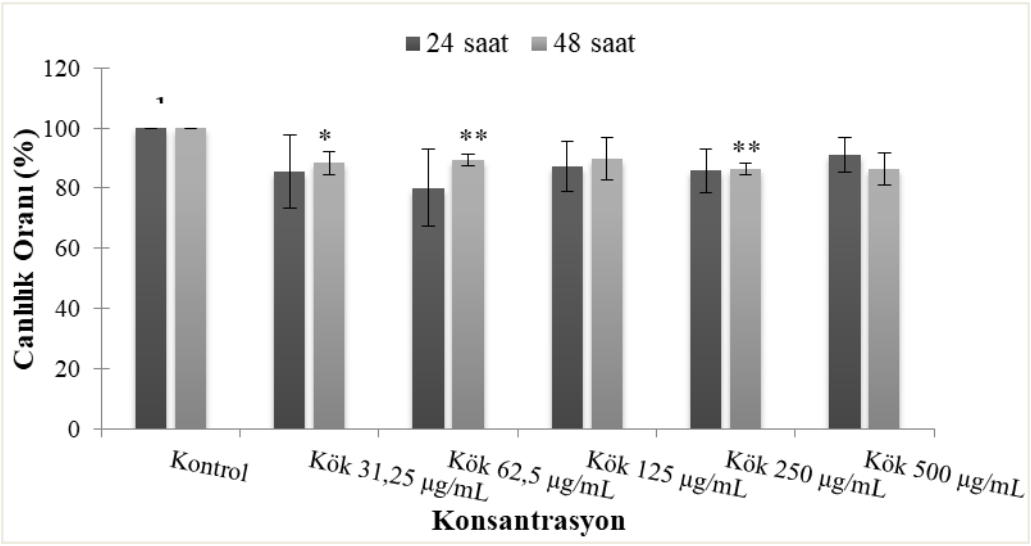
Kök ekstraktı muamelesi sonucunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin 24. ve 48. sonundaki canlılık oranları Grafik 3.5'de ve Tablo 3.5'de sunulmuştur.




**Şekil 3.7** MDA-MB-231 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 24. saatteki morfolojik görüntüleri




**Şekil 3.8** MDA-MB-231 hücrelerinin ekstraktlar ile muamelesinin 48. saatteki morfolojik görüntüleri

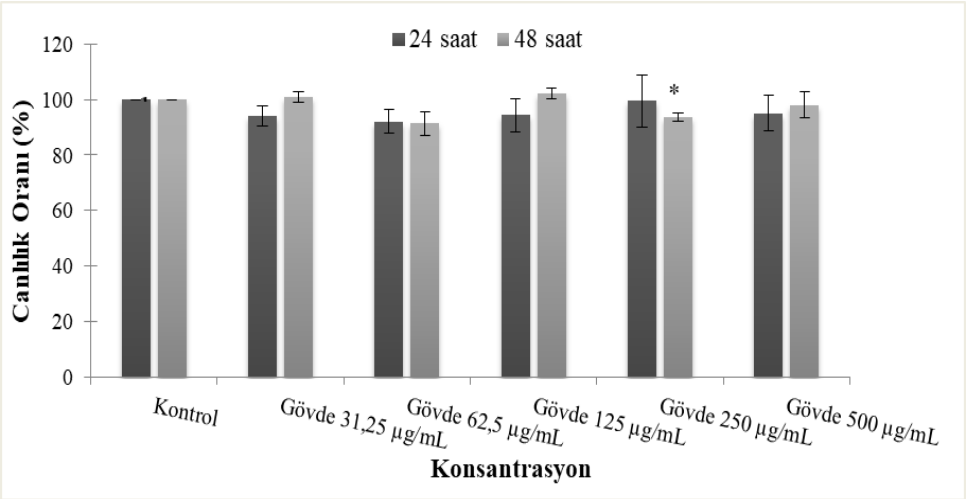



**Grafik 3.5** MDA-MB-231 hücre hattı kök 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.5** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine kök ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | **Canlılık Oranı (%)** | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 85,6±12,2 | 88,3±4,0 |
| 62,5 µg/mL | 80,0±12,8 | 89,3±1,9 |
| 125 µg/mL | 87,1±8,4 | 89,8±7,0 |
| 250 µg/mL | 85,9±7,3 | 86,3±2,0 |
| 500 µg/mL | 90,9±5,8 | 86,3±5,2 |

Gövde ekstraktı muamelesi sonucunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin 24. ve 48. sonundaki canlılık oranları Grafik 3.6'de ve Tablo 3.6'de sunulmuştur.

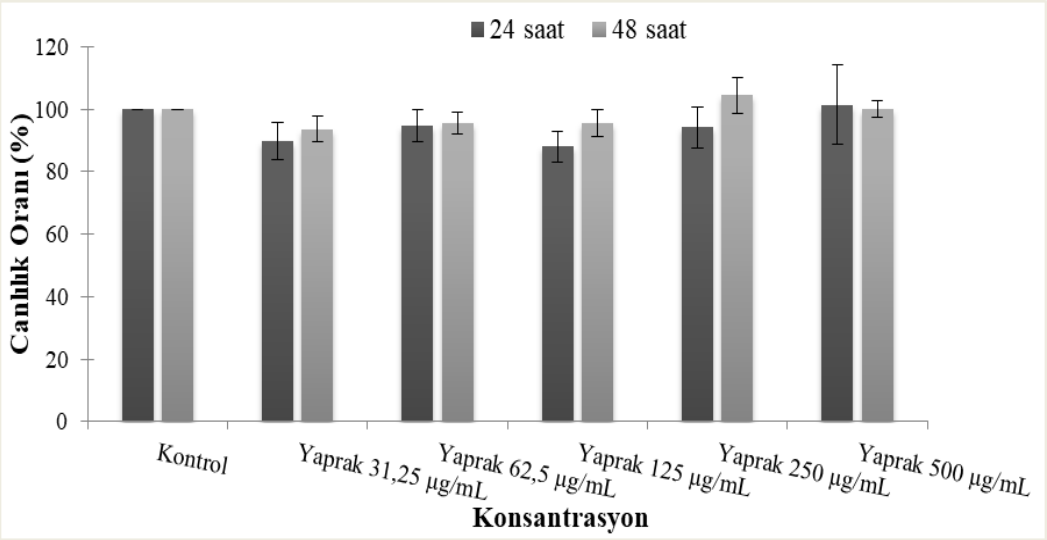



**Grafik 3.6** MDA-MB-231hücre hattı gövde 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.6** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine gövde ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | Canlılık Oranı (%) | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 94,0±3,7 | 100,9±1,9 |
| 62,5 µg/mL | 92,1±4,3 | 91,3±4,4 |
| 125 µg/mL | 94,3±6,0 | 102,3±2,0 |
| 250 µg/mL | 99,4±9,6 | 93,7±1,4 |
| 500 µg/mL | 95,0±6,5 | 97,9±4,7 |

Yaprak ekstraktı muamelesi sonucunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin 24. ve 48. sonundaki canlılık oranları Grafik 3.7'de ve Tablo 3.7'de sunulmuştur.

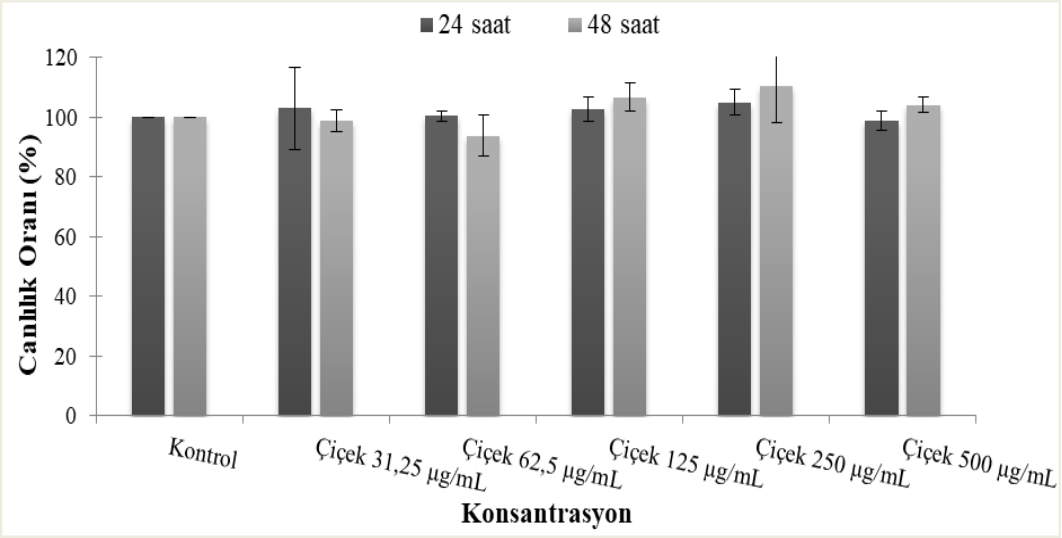



**Grafik 3.7** MDA-MB-231hücre hattı yaprak 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.7** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yaprak ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | Canlılık Oranı (%) | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 89,7±6,1 | 93,5±4,1 |
| 62,5 µg/mL | 94,6±5,0 | 95,5±3,7 |
| 125 µg/mL | 88,0±5,0 | 95,5±4,3 |
| 250 µg/mL | 94,1±6,6 | 104,5±5,7 |
| 500 µg/mL | 101,3±12,8 | 100,0±2,7 |

Çiçek ekstraktı muamelesi sonucunda MDA-MB-231 kanser hücrelerinin 24. ve 48. sonundaki canlılık oranları Grafik 3.8'de ve Tablo 3.8'de sunulmuştur.




**Grafik 3.8** MDA-MB-231hücre hattı çiçek 24. ve 48. saat canlılık oranı verileri

**Tablo 3.8** MDA-MB-231 hücre hattı üzerine çiçek ekstraktının 24. ve 48. saat canlılık oranı (%). Veriler±standart hata şeklinde sunulmuştur.

| | **Canlılık Oranı (%)** | |
|---|---|---|
| **Konsantrasyon** | **24. saat** | **48. saat** |
| Kontrol (0 µg/mL) | 100 | 100 |
| 31,25 µg/mL | 89,7±6,1 | 93,5±4,1 |
| 62,5 µg/mL | 94,6±5,0 | 95,5±3,7 |
| 125 µg/mL | 88,0±5,0 | 95,5±4,3 |
| 250 µg/mL | 94,1±6,6 | 104,5±5,7 |
| 500 µg/mL | 101,3±12,8 | 100,0±2,7 |

## 3.2 Antibakteriyel Aktivite Bulguları

*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstraktlarının, 10 gram negatif ve üç gram pozitif olmak üzere toplam 13 bakteri suşu üzerine MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak çalışılan konsantrasyonlarda ekstraktların test edilen suşlara karşı MİK değeri elde edilememiştir (MİK > 500 µg/mL) (Tablo 3.1). Böylece *L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının MeOH ekstratlarının 15,6-500 µg/mL konsantrasyon aralığında antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

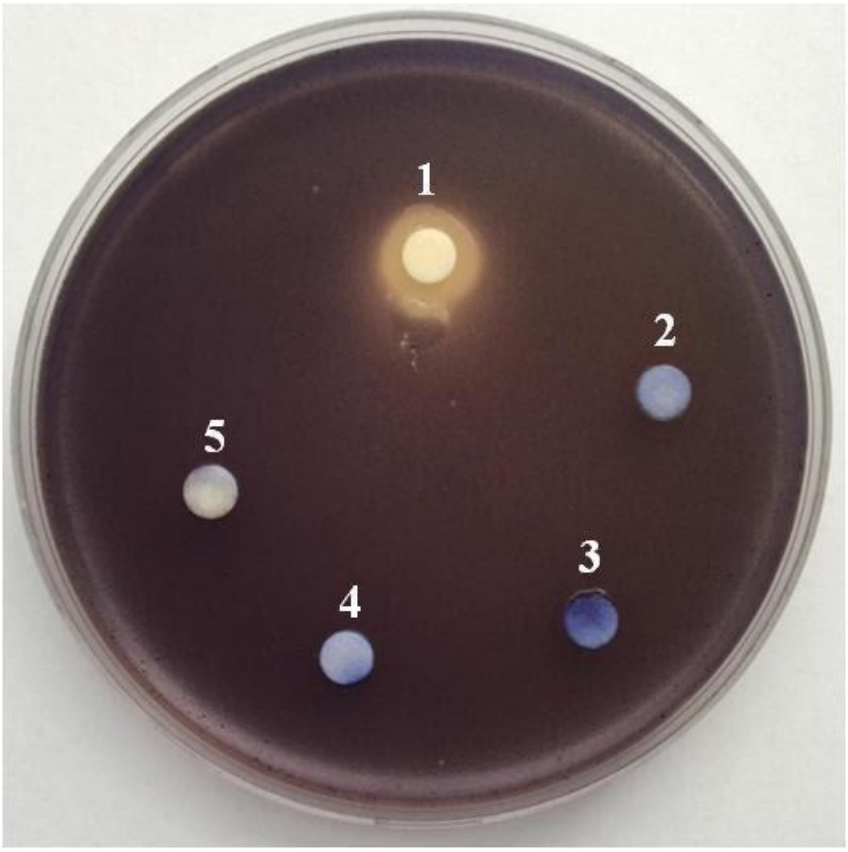
**Tablo 3.9** Ekstraktların ve levofloksasinin MİK değerleri

| Bakteri Suşları | MeOH Ekstraktları | | | | Levofloksasin (Standart Antibiyotik) |
|---|---|---|---|---|---|
| | Kök | Gövde | Yaprak | Çiçek | |
| *Escherichia coli* ATCC 25922 | >500 | >500 | >500 | >500 | 0,125 µg/mL |
| *Escherichia coli* NCTC 13846 | >500 | >500 | >500 | >500 | 32 µg/mL |
| *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 | >500 | >500 | >500 | >500 | 0,125 µg/mL |
| *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 | >500 | >500 | >500 | >500 | 4 µg/mL |
| *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 | >500 | >500 | >500 | >500 | 4 µg/mL |
| *Proteus mirabilis* ATCC 7002 | >500 | >500 | >500 | >500 | 1 µg/mL |
| *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 | >500 | >500 | >500 | >500 | 1 µg/mL |
| *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 | >500 | >500 | >500 | >500 | 1 µg/mL |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 | >500 | >500 | >500 | >500 | 1 µg/mL |
| *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002 | >500 | >500 | >500 | >500 | 0,125 µg/mL |
| *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 | >500 | >500 | >500 | >500 | 8 µg/mL |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | >500 | >500 | >500 | >500 | 1 µg/mL |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633 | >500 | >500 | >500 | >500 | 0,25 µg/mL |

## 3.3 QS İnhibisyon Testi Bulguları

### 3.3.1 Viyolasin İnhibisyon Testi Bulguları

*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarına ait ekstraktların *C. violaceum* ATCC 12472'da viyolasin üretimi üzerine inhibitör etkinliği yumuşak agar yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak test edilen konsantrasyonlarda pigment inhibisyonu saptanmamıştır (Şekil 3.7).



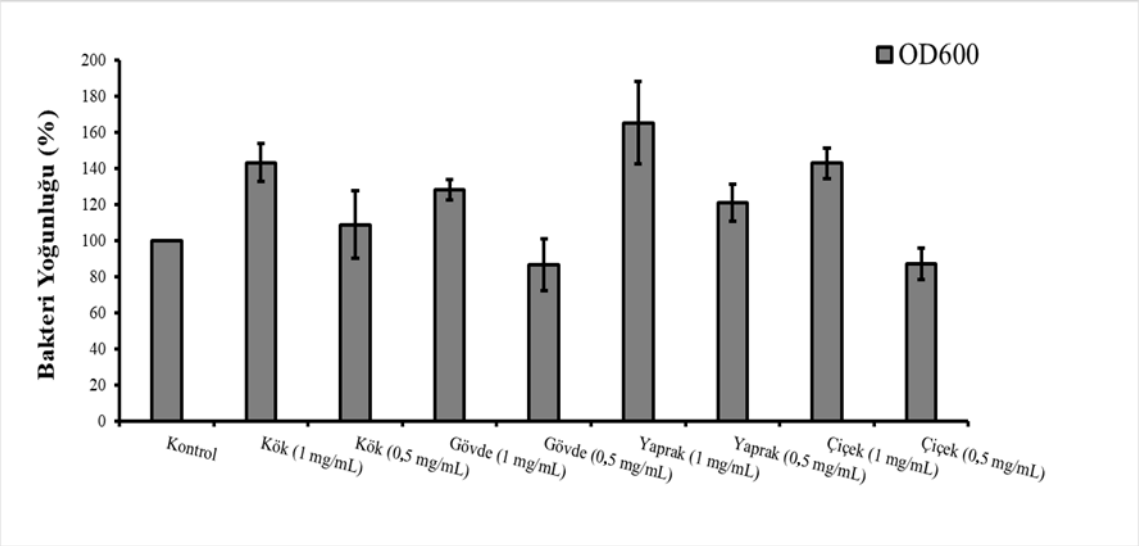

**Şekil 3.9** *C. violaceum* ATCC 12472'de viyolasin inhibisyon testi (1: Pozitif kontrol, 2: Kök ekstraktı, 3: Gövde ekstraktı, 4: Yaprak ekstraktı, 5: Çiçek ekstraktı)

### 3.3.2 Biyofilm İnhibisyon Testi Bulguları

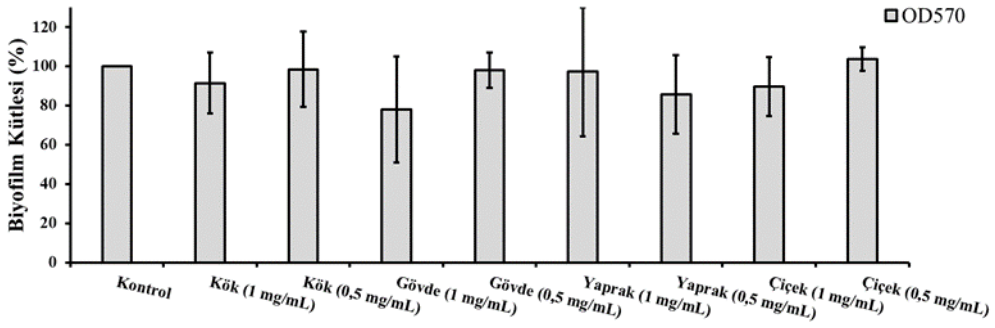
*L. orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçek ekstraktları, biyofilm oluşturan bakterilerden biri olan *P. aeruginosa* PAO1 suşu üzerinde test edilerek anti-biyofilm özelliği araştırılmıştır. Tüm ekstraktların test edilen konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun üreme ve gelişmesini baskılamadığı tespit edilmiştir. Ekstraktların biyofilm oluşumu üzerine etkileri Tablo 3.10'de özetlenmiştir. Bunun yanı sıra ekstraktların 1 mg/mL konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu kontrole göre kısmen inhibe ettiği gözlense de bu inhibisyonun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur (Grafik 3.10).

**Tablo 3.10** Ekstraktların biyofilm oluşumu üzerine etkisi. Veriler±standat sapma şeklinde sunulmuştur.

| Ekstrakt (Konsantrasyon) | Biyofilm kütlesi (%) |
|---|---|
| Control | 100±0 |
| Kök (1 mg/mL) | 91,4±15,5 |
| Kök (0,5 mg/mL) | 98,4±19,1 |
| Gövde (1 mg/mL) | 78±26,9 |
| Gövde (0,5 mg/mL) | 97,9±9,0 |
| Yaprak (1 mg/mL) | 97,2±32,8 |
| Yaprak (0,5 mg/mL) | 85,6±20,1 |
| Çiçek (1 mg/mL) | 89,7±14,9 |
| Çiçek (0,5mg/mL) | 103,5±6,0 |




**Grafik 3.9** Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunun üreme ve gelişmesi üzerine etkisi.




**Grafik 3.10** Ekstraktların *P. aeruginosa* PAO1 suşunda biyofilm oluşumu üzerine etkisi.

# 4. TARTIŞMA

Hücreler, düzenli bir şekilde birçok kontrol aşamasından geçerek bölünüp hayatta kalabilir ve çoğalabilirler. Fakat hücrede görülen mutasyonlar ve kontrol aşamalarında gerçekleşen problemler doğrultusunda hasar gördüklerinde apoptoz adı verilen programlı hücre ölümü mekanizması ile ölürler. Böylece yerlerini sağlıklı hücrelere bırakırlar (Demircan ve Mater, 2019). Ancak ebeveynlerinden aktarılan genler veya çevresel faktörler nedeniyle bireylerin DNA'larında oluşan progresif değişimler ile replikasyonda oluşan bazı hataların kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Kanser oluşumu gözlenen hücreler, programlı hücre ölüm mekanizmasını engeller, kontrolsüz olarak bölünme ve çoğalma ile sağlıklı hücrelerden farklılık gösterirler (Savran vd., 2014). Geçmişten günümüze kadar birbirinden farklı birçok bitkinin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Teknolojinin ilerlemesi ile kanserin tedavisi için üretilen kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi için bitkilerden yararlanılmaya başlanmıştır (Shoeb, 2006). Kanser tedavisi için kullanıma giren ilk ajanların pervane çiçeği olarak da bilinen *Catharanthus roseus* bitkisinden elde edilen vinca alkaloidleri, vinblastin ve vinkristinin olduğu bilinmektedir. Başta meme kanseri olmak üzere birçok kanser çeşidinin tedavisinde kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılmıştır (Shoeb, 2006).

Çalışmamızda *Lamium orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından maserasyon ile elde edilen MeOH ekstraktlarının, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerine antikanser aktivitesi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda (31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, ve 500 µg/mL) 24. ve 48. saat sonundaki değerlendirmeler sonucunda elde edilen verilere göre; MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine en iyi antikanser aktiviteye kök ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Kök ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonunda 24. ve 48. saatlerdeki etkileri incelendiğinde hücrelerin canlılık oranları kontrole göre 24. ve 48. saat sonunda sırasıyla %51,4 ve %48,9 olarak hesaplanmıştır. Böylece 24. saat sonunda doza bağlı olarak antikanser aktivite gösterdiği fakat hücre canlılığının %50'nin

altına düşmediği görülmüştür. Kırk sekizinci saat sonunda ise antikanser etkinliğin doza bağlı olduğu ve hücre canlılığının kontrole göre %50'nin altına düştüğü saptanmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine 24. ve 48. saatlerdeki etkiler incelendiğinde ise önemli bir antikanser aktivite bulgusu tespit edilmemiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda tüm ekstraktlar ve çalışılan konsantrasyonlar için hücre canlılık oranının kontrole göre %50'nin üzerinde olduğu saptanmıştır. Hatta gövde, yaprak ve çiçek MeOH ekstraktlarında hücre canlılık oranlarında azalma olmadığı gibi aksine 48. saat sonunda kontrole göre hücre artışı olduğu gözlenmiştir.

Literatürde *Lamiaceae* familyasına ait türlerin kimyasal içerikleri hakkında çeşitli bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda bitkilerin kimyasal bileşenlerinin antioksidan özellik gösterdiği saptanmıştır. Özbek ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *L. orientalis*'in kimyasal bileşenleri belirlenmiştir. Bu bileşenlerden quercetin 3-O-rutinoside'nin ve acteoside'nin antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda yapısında bulunun diğer bileşenlerden lamiide ve ipolamiide'nin antiinflamatuar aktivite gösterdiği, Ipolamiidoside'nin ise antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Özbek vd., 2006). Öte yandan flavonoidler, diterpenler ve fenollerin bitkinin bileşenleri içerisinde bulundukları takdirde antikanser aktivite sergileyebileceği bilinmektedir (Scandlyn vd., 2008). Ancak bitkinin içinde bulundurduğu bileşen miktarlarına göre etki etme seviyesinin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Aynı zamanda ana bileşenleri içerisinde kateşin bulunan bitkilerin özellikle meme kanseri hücrelerine karşı yüksek düzeyde antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Scandlyn vd., 2008). *L. orientalis*'in MeOH ekstraktları üzerine yapılan bir çalışmada ana bileşenleri rutin + ellagik asit, kaempferol ve ferulik asit olarak tanımlanmıştır (Albayrak ve Aksoy, 2013). Literatürde, *Pistacia vera L.* türünün kateşin ve epikateşin miktarının yüksek olduğu ve MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan antikanser çalışması sonucunda bitki ekstraktlarının doza bağlı olarak yüksek potansiyel gösterdiği bildirilmiştir (Koyuncu, 2018). Bu sonuçlara dayanarak, *L. orientalis*'in ana bileşenleri içerisinde kateşin bulunmadığı için negatif meme kanseri modeli olan MDA-MB-231 hücreleri üzerine bir antikanser aktivite göstermediği düşünülebilir. Hücrelerin östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olduğu durumlarda hormonal tedaviye yanıt verme düzeyinin yüksek olduğu bilinmektedir (Young vd., 2018). Bu

nedenle pozitif meme kanseri modeli olan MCF-7 hücrelerine bitki ekstraktlarının ana bileşenlerinin veya içerdiği diğer bileşenlerin, bahsedilen reseptörlere etki ederek hücresel süreci etkilemiş ve çoğalmayı engellemiş olabileceği düşünülebilir.

Bilindiği kadarıyla literatürde *L. orientalis*'in antikanser etkinliğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak *Lamiaceae* familyasına ait diğer türlerin çeşitli hücre hatları üzerine antikanser etkinliklerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. *Lamiaceae* familyasının en önemli türlerinden biri olan *Lamium albüm* L.'nin metanol ekstratlarının akciğer kanseri A549 karsinom hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Neticede bitkinin hücrelerin membran bütünlüğünü bozarak hücrelerin yapışma özelliğini azalttığı tespit edilmiştir (Moskova-Doumanova vd., 2012). Ayrıca sağlıklı, hücrelerin onarımı sırasında, herhangi bir nedenden dolayı bitkisel bileşenlerin müdahale etmediği gözlenmiştir (Topouzova-Hristova vd., 2012). Bu da bileşenlerin bazılarının seçici etki gösterdiği anlamına gelmektedir. Bir diğer *Lamium* türü olan *L. purpureum* L.'nin ise melanom kanseri B16F10 hücre hattı üzerine zayıf bir antikanser aktivite sergilediği bildirilmiştir (Akkoyunlu ve Dülger, 2019). *Lamium* türlerinden *Marribium vulgare*'nin metanol özütünün içerdiği flavonoidler, diterpenler ve fenollerin antioksidan ve antienflamatuar özellik gösterdikleri rapor edilmektedir (Yousefi vd., 2014). *Salvia triloba* ve *Salvia dominica* türlerinin etanol ekstraktlarının MCF-7 ve T47D meme kanseri hücrelerinin üremesini engelleyerek antikanser aktivite gösterdiği ve bu nedenle söz konusu türlerin meme kanserine karşı mücadelede kullanılabileceği bildirilmektedir (Abu-Dahab vd., 2014). Yapılan başka bir çalışmaya göre, *Marrubium parviflorum* Fish & Mey. ve *Lamium amplexicaule* L. türlerinin metanol ve heksan ektraklarının antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiş olup özellikle metanol ekstraktlarının yüksek seviyelerde fenolik bileşikler içerdikleri saptanmıştır. Fenolik bileşiklerden *M. parviflorum*'da rosmarinik asit, *L. amplexicaule*'de ise valinik asitin yüksek seviyede oldukları belirtilmiştir. Buna bağlı olarak *M. parviflorum* bitkisinin metanol ekstaktlarının *L. amplexicaule* bitkisinin metanol ekstraklarına göre daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (Yumrutaş ve Demirors, 2010).

Farklı familyalara ait bitkiler üzerinde yapılan araştırmalara baktığımızda antikanser aktivite sonuçlarımız ile benzer olduğu görülmektedir. Örneğin *Thymelaeaceae*

ailesinden olan *Daphne gnidioides* bitkisinin MeOH ekstrakları HeLa hücreleri üzerine antikanser aktiviteleri incelenmiş ve kök ekstraktında umut vadeden antikanser aktivite gözlemlenirken MDA-MB-231 hücreleri üzerinde antikanser aktivite tespit edilmemiştir (Can vd., 2020). *Ericaceae* familyasının bir türü olan *Rhododendron luteum* türüne ait çeşitli kısımlarının MeOH, su ve etil asetat ekstraktları ile akciğer kanseri A549 karsinom hücreleri üzerine antikanser aktivite çalışmaları yapılmıştır. *R. luteum* bitkisinin içerdiği fenolik bileşik miktarının yüksek seviyede olması nedeniyle iyi antioksidan ve antikanser aktivite sergilediği bildirilmiştir. Fakat antioksidan aktiviteye tirozinaz, kolinesteraz ve a-glukosidaz gibi ikincil metabolitlerin büyük bir etkisi olduğu düşünülmüştür (Mahomoodally vd., 2019).

Daha önce de belirtildiği gibi, genellikle ana bileşiklerinde kateşin içeren bitkilerin meme kanseri hücrelerine karşı yüksek düzeyde antikanser aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Scandlyn vd., 2008). Ancak *L. orientalis* bitkisinin ana bileşiklerinde kateşin bulunmamaktadır (Scandlyn vd., 2008). Litaretür araştırmasına dayanarak *L. orientalis* bitkisinin içeriğindeki ana bileşiklerden olan rutin + ellagik asit, kaempferol ve ferulik asitin pozitif meme kanseri modeli olan MCF-7 hücreleri üzerinde antikanser aktivite gösterdiği düşünülebilir. Çünkü *L. orientalis*'in MeOH ekstraktlarında en yüksek seviyede bulunan rutin'in antioksidan ve antitrombotik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Ekici vd., 2019). Ayrıca *L. orientalis*'in bir diğer ana bileşeni olan ellagik asidin birçok kansere karşı antikanserojenik etkileri olduğu bildirilmiştir. Özellikle meme ve prostat kanseri hücrelerinin büyümesini ve gelişimini yavaşlatarak kansere neden olan bazı genleri inaktif hale getirdiği tespit edilmiştir. Antikanser aktivitenin araştırıldığı çalışmalarda, genel olarak yapısında bulunan ikincil metabolitlerin antikanser aktiviteye bir katkısı olabileceği de düşünülmüştür (Evcimen ve Aslan, 2015). Bu nedenle *L. orientalis*'in için moleküler düzeyde analizler yapılarak, ekstrakların içerdiği bileşiklerin ve bunların işleyişlerinin mekanizması tam olarak ortaya çıkarılmalıdır. Böylece içerdiği bileşenlerden hangisinin antikanser aktiviteye ne düzeyde etkili olduğu tespit edilebilir.

Bu çalışmada *L. orientalis*'in antibakteriyel aktivitesi 10 Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC 13846, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* NCTC 13440, *P. mirabilis* ATCC 7002, *S.* Typhimurium ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. aerogenes* ATCC 13048, *A. haemolyticus* ATCC 19002) ve üç Gram-pozitif (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633) bakteri suşu üzerine araştırılmış ve tüm ekstraktların MİK değeri >500 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak ekstraktların çalışılan konsantrasyonlarda antibakteriyel aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Literatürde *Lamiaceae* familyasına ait birçok tür için antibakteriyel aktivite çalışmaları mevcuttur. İlave olarak *L. orientalis*'in yaprak ve çiçek kısımlarından hazırlanan metanol ekstraktlarının antibakteriyel etkinliğinin incelendiği bir çalışma bulunmaktadır. O çalışmaya göre *L. orientalis*'in metanol ekstraktlarının, *S. aureus* ATCC 29213 ve *K. pneumoniae* FMC 5 suşları üzerine antibakteriyel etki gösterdiği fakat *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *Morganella morganii* ve *S. Typhimurium* NRRLE 4463 suşlarına karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir *L. orientalis*'in MeOH ekstraktlarının potansiyel bir antimikrobiyal ajan kaynağı olabileceği düşünülse de detaylı bir fenolik bileşik izolasyonu yapılması gerektiği belirtilmiştir (Albayrak ve Aksoy, 2013). Benzer şekilde *L. amplexicaule, Lamium galactophyllum* ve *Lamium macrodon*'un çeşitli kısımlarından elde edilen kloroform ve heksan ekstraktlarının da antibakteriyel etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (Erbil vd., 2014). Fakat *L. amplexicaule*'nin etanol ekstraktlarının içerdiği ikincil metabolitlerin (fitol, izorhamnetin, 3,4-dihidroksi-metil benzoat) test edilen patojenlere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği saptanmıştır (Ghoneim vd., 2018).

*Lamiaceae* familyasına ait türlerin, genel olarak sahip oldukları kimyasal bileşiklerden ötürü, bu türler antibakteriyel aktivite çalışmaları için sık olarak tercih edilmektedir (Chipeva vd., 2013). Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteri suşlarına karşı etki gösterebilen nadir *Lamium* türlerinden birisi *Lamium garganicum* subsp. *laevigatum*'dur. Ancak zamanla daha fazla bitki üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiş ve özellikle *L. album*'un çiçek kısmından hazırlanan kloroform ekstraktının 11 Gram-pozitif ve 10 Gram-negatif bakteri suşuna antibakteriyel etki

gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra *L. album*'un yaprak kısmının MeOH ve etanol ekstraktlarının çeşitli suşlar üzerine etkin bir şekilde antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Chipeva vd., 2013). Bu etkinin *L. album*'un yüksek miktarda gallik asit, rosmarinik asit ve rutosid asit içermesine bağlanabilir (Zinicovscaia vd., 2020). *Lamiaceae* familyasına ait 23 türün etanol ekstraktlarının antibakteriyel etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada bazı türlerin yüksek, bazılarının düşük, bazılarının ise hiçbir şekilde antibakteriyel aktivite göstermediği bulunmuştur. Ayrıca her bitki ekstraktının her bakteriye etki etmediği sonucuna varılmıştır (Saraç ve Uğur, 2007). Önceki çalışmalar çözücü madde farklılığının bitkideki antibakteriyel etkinliği belirlemede ana faktör olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda da MeOH çözücüsü ile *L. orientalis*'in antibakteriyel etki gösterecek bileşenleri ekstrakte edilememiş olabilir. Bundan dolayı da antibakteriyel etki gözlenmemiş olabilir. İlave olarak bitkinin bulunduğu coğrafi bölge, bitkinin hasat zamanı ve yaşı da antibakteriyel etkinin ortaya çıkmasında rol oynayabilir (Erbil vd., 2014). Bu çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarında antibakteriyel özellik gösterebilecek kimyasal içerik miktarlarının düşük olduğu düşünülebilir.

Patojenler arasında giderek artan antibiyotik direnci, enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede yeni antimikrobiyallere ve/veya alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç doğurmuştur. Günümüzde bakterilerin QS mekanizmasını kullanarak toksin üretimi, biyofilm oluşumu, enzim sentezi, pigment üretimi gibi bir takım virülans faktörlerini sentezleyebildiği bilinmektedir (Avcı, 2009). Bakterilerde QS mekanizmasının inhibisyonunun enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede alternatif bir tedavi yöntemi olacağı öngörülmüş ve QS inhibitörü ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır. Literatür araştırmalarına göre bu çalışma, *L. orientalis* türünün anti-QS aktivitesinin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Bu çalışmada *L. orientalis*'in çeşitli kısımlarından hazırlanan MeOH ekstraktlarının QS mekanizması ile sentezlenen viyolasin ve biyofilm oluşumu üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır.

Sonuçlar irdelendiğinde ekstraktların test edilen konsantrasyonlarda *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin pigment üretimini inhibe etmediği saptanmıştır. Bunun nedeni test edilen konsantrasyonun yetersiz kalması veya bitkinin kimyasal

içeriğine bağlı olabilir. Örneğin, *Ferula elaeochytris* Korovin'in viyolasin pigmenti üzerine inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada viyolasin inhibisyonu gözlenmemiş ve bunun nedeni olarak da bitkinin uzun zincirli AHL moleküllerini inhibe edemediği yorumunda bulunulmuştur (Tüfekci vd., 2020).

*P. aeruginosa* PAO1 suşunda QS mekanizması ile regüle edilen biyofilm oluşumunun inhibisyonu üzerine yapılan deney sonucunda ekstraktların 1 mg/mL konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu kontrole göre kısmen inhibe ettiği ancak bu inhibisyonun anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

*P. aeruginosa* PAO1 suşu, biyofilm oluşumunu, LasI ve RhlI olarak tanımlanan QS sistemleri kontrolünde oluşturmaktadır (De Kievit vd., 2001). Daha önce de bahsedildiği gibi bakterilerin biyofilm oluşturması için LasI sistemi, sinyal molekülü olarak N-(3-oksododekanoyl)-L-homoserin (OdDHL) laktonlarını (3-okso-C12-HSL), RhlI sistemi ise sinyal molekülü olarak N-bütiril-L-homoserin (BHL) laktonlarını (C4-HSL) kullanmaktadır (Sırıken ve Öz, 2017). Bakteri suşlarının viyolasin sentezi ve biyofilm oluşumunda uzun zincirli AHL moleküllerini kullandığından dolayı, çalışmamızda viyolasin ve biyofilm inhibisyonu gözlenmemesinin nedeni bitki içeriğinin uzun zincirli AHL moleküllerini inhibe edememesinden kaynaklanabilir.

*Lamiaceae* familyasına ait hiçbir türde viyolasin inhibisyon testleri üzerine yapılan çalışma bulunmamaktadır. Ancak *Lamiaceae* familyasına ait bazı türlerin antibiyofilm özelliğini araştıran çalışmalar mevcuttur. Örneğin; *Marrubium vulgare* L.'nin etanol ekstraktları kullanılarak yapılan biyofilm inhibisyon testinde *Staphylococcus auerus* bakteri türünde kök ekstraktının oldukça potent olduğu tespit edilmiştir (Quave ve Smeltzer, 2009). *Salvia sclarea* L.'nin MeOH ekstraktlarının kullanıldığı bir çalışmada *S. aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990'e karşı antibiyofilm özellik tespit edilememiştir (Küçük vd., 2019). Bitkilerin çoğunda fenilpropen olarak bilinen eugenol bulunmaktadır (Zhou vd., 2013). Bu eugenol'un, 50-200 µM konsantrasyon aralığında *C. violaceum*'da viyolasin üretimini ve *P. aeruginosa* PAO1'de biyofilm oluşumunu %32-56 oranında

inhibe ettiği bildirilmektedir. Aynı zamanda resveratrol ve pterostilben gibi bazı stilbenlerin de biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhou vd., 2013).

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, *L. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından hazırlanan MeOH ekstraktlarının antikanser ve anti-QS aktivitelerini araştıran ilk çalışmadır. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerinde değerlendirilen antikanser aktivite sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücre hattına karşı kayda değer bir etki saptanmazken MCF-7 hücre hattına karşı umut vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle kök ekstraktının yeni antikanser ajanların geliştirilmesi adına bir potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. İleri çalışmalarda antikanser aktivite adına ekstraktların etki mekanizmalarının moleküler düzeyde araştırılabilir. İlave olarak ekstraktların farklı kanser hücre hatları üzerine etkinliğinin araştırılması ve hangi kanser türlerine karşı etkili olacağı hakkında ön verilerin elde edilmesi gerekmektedir. Ekstraktların çalışılan konsantrasyonlarda antibakteriyel ve anti-QS aktivitesi tespit edilmemiştir. İleri çalışmalarda antibakteriyel etkinin daha yüksek konsantrasyonlarda test edilmesi ve ilave olarak antifungal aktivitenin araştırılması önerilmektedir. Ayrıca ekstraktların QS sistemi ile regüle edilen diğer virülans faktörlerini (piyosiyanin pigment üretimi, swarming hereketi vb.) inhibe etme yeteneklerinin de araştırılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR


Abu-Dahab, R., Abdallah, M. R., Kasabri, V., Mhaidat, N. M., & Afifi, F. U. (2014). Mechanistic studies of antiproliferative effects of *Salvia triloba* and *Salvia dominica* (*Lamiaceae*) on breast cancer cell lines (MCF7 and T47D), Zeitschrift für Naturforschung C, 69(11-12), 443-451

Acıbuca, V., & Bostan Budak, D. (2018). Dünya'da ve Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 33 (1), 37-44.

Akcin, T, Camili, B. (2018). Anatomical and micromorphological investigations on Turkish endemic *Marrubium cephalanthum* subsp. *montanum* (*Lamiaceae*). Journal of International Environmental Application and Science, 13 (2), 97-104.

Akkoyunlu, A., Dulger, G. Chemical composition of *Lamium purpureum L.* and determination of anticancer activity of its essential oil on melanoma. Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi (2019). Cilt. 7, Sayı. 3, ss 1755-1763.

Albayrak, S., Aksoy, A. Biological activities of *Wiedemannia multifida* (*Linnaeus*) bentham and *Wiedemannnia orientalis* Fisch. & Mey. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(3):196-201. doi:10.1016/S2221-1691(13)60049-0.

Avcı, M.K. 2009. Quorum sensing odaklı yenilikler ve biyoteknolojik uygulamalar, MBG 617 Biyoteknolojide yeni gelişmeler, ss 1-14

Aydıntuğ, S. (2004). Meme Kanserinde Erken Tanı (2004). Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, Cilt. 13, Sayı. 6, ss 226

Aydıntuğ, S., Meme Kanserinde Erken Tanı (2014). Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, Cilt. 12, Sayı. 6, ss 228

Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1856(1), 73-85.

Bozyel ME, Merdamert Bozyel E, Canlı K, Altuner EM (2019). Türk Geleneksel Tıbbında Tıbbi Bitkilerin Antikanser Kullanımları. KSU J. Agric Nat. 22 (Ek 2): 465-484. doi: 10.18016 / ksutarimdoga.vi.550334

Can, T. H., Tufekci, E. F., Altunoglu, Y. C., Baloglu, M. C., Llorent-Martínez, E. J., Stefanucci, A., Mollica, A., Cichelli, A., & Zengin, G. (2020). Chemical characterization, computational analysis and biological views on *Daphne gnidioides* Jaub. & Spach extracts: Can a new raw material be provided for biopharmaceutical applications? Computational biology and chemistry, 87, 107273. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107273

Chipeva, V. A., Petrova, D. C., Geneva, M. E., Dimitrova, M. A., Moncheva, P. A., & Kapchina-Toteva, V. M. (2013). Antimicrobial activity of extracts from in vivo and *in vitro* propagated *Lamium album L.* plants. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines. AJTCAM, 10(6), 559–562. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i6.30

Comsa, Ş., Cîmpean, 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.

Çali Ö. İ. (2017). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Lamium orientale* (*Lamiaceae*). Modern Phytomorphology 11: 15-19. doi:10.5281/zenodo.398865

Çepni, E. ve Gürel, A. F. (2011). Bitkilerden elde edilen anti-quorum sensing bileşikleri ve yeni ilaç geliştirmedeki potansiyelleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, cilt. 41, ss.4, 131-138.

Demircan G, Mater Y. (2019). Effects of fluorescent marked maackia amurensis-lectin-1 and wheat germ aglutin on the cell surface glycan profiles in two different breast cancer cell lines. Journal of Istanbul Faculty of Medicine, 82(2), 89-95. doi:10.26650/IUITFD.429263

De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B. H. (2001). Quorumsensing genes in Pseudomonas aeruginosa biofilms: their role and expression patterns. Apply Environment Microbiology, 67(4), 1865-73.

De Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infection and immunity, 68(9), 4839–4849. https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000

Diggle, S. P., Crusz, S. A., & Cámara, M. (2007). Quorum sensing. Current biology: CB, 17(21), 907–910. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.045

Dulger B. (2009). Antifungal activity of *Lamium tenuiflorum* against some medical yeast Candida and Cryptococcus species. Pharmaceutical Biology. 47(5):467-470. doi:10.1080/13880200902824881

Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., & Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. Biotechnology and applied biochemistry, 48(3), 127–133. https://doi.org/10.1042/BA20070115

Ekici, L., İnanır, C. & Albayrak, S. (2019). Karabuğdayın Fitokimyası, Farmakolojisi ve Biyofonksiyonel Özellikleri. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, (16), 713-722. doi: 10.31590/ejosat.580742

Erbil, Nurcan & Alan, Yusuf & Diğrak, Metin. (2014). Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Lamium galactophyllum* Boiss & Reuter, *L-macrodon* Boiss & Huet and *L-amplexicaule* from Turkish Flora. Asian Journal of Chemistry. 26. 549-554. doi:10.14233/ajchem.2014.15748.

European Collection of Authenticated Cell Cultures (EACC). Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424), June 2017.

Evcimen, M, Aslan, R. (2015). Physiological Effects of Commonly Used Medicinal and Aromatic Plant's Antioxidant Phytochemicals. Kocatepe Veterinary Journal, 8 (2), 65-78. Retrieved from https://dergipark.org.tr/en/pub/kvj/issue/32991/368894

Ghoneim MM, Musa A, El-Hela AA, Elokely KM. (2018). Evaluation and understanding the molecular basis of the antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of secondary metabolites isolated from *Lamium amplexicaule*. Pharmacognosy Magazine, 14, 3-7.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hoiby N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 125(4), 272–275. https://doi.org/10.1111/apm.12686

Horwitz, K. B., Costlow, M. E., & McGuire, W. L. (1975). MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. Steroids, 26(6), 785–795. https://doi.org/10.1016/0039-128x(75)90110-5

Kaliora, A. C., & Andrikopoulos, N. K. (2005). Effect of Alkanna albugam root on LDL oxidation. A comparative study with species of the *Lamiaceae* family. Phytotherapy research: PTR, 19(12), 1077–1079. https://doi.org/10.1002/ptr.1774

Koyuncu İ. (2018). Urfa fıstığından (*Pistacia vera L.*) elde edilen çeşitli ekstraktların antikanser özelliklerinin incelenmesi. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 15(2): 72-75.

Koyuncu O., Yaylacı Ö., Öztürk D., Erkara İ. P., Savaroğlu F., Akcoşkun Ö. & Ardıç M. (2010). Risk categories and ethnobotanical features of the *Lamiaceae* taxa growing naturally in Osmaneli (Bilecik/Turkey) and environs. Biological Diversity and Conservation, 3(3), 31- 45. ISSN: 1308-5301 / 1308-8084

Küçük S., Soyer, P., Tunalı, Y. (2019). *Salvia sclarea L.* (*Lamiaceae*) Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Türk Kimya Derneği Dergisi Bölüm A: Kimya.

Mahomoodally MF, Sieniawska E, Sinan KI, Nancy Picot-Allain MC, Yerlikaya S, Cengiz Baloglu M, Altunoglu YC, Senkardes I, Rengasamy KR, Zengin G. (2019). Utilisation of Rhododendron luteum Sweet bioactive compounds as valuable source of enzymes inhibitors, antioxidant, and anticancer agents. Food Chem Toxicol. 2020 Jan; 135:111052. doi: 10.1016/j.fct.2019.111052.

McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology (Reading, England), 143 (Pt 12), 3703–3711. https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. Annual review of microbiology, 55, 165–199. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165

Moskova-Doumanova V., Miteva G., Dimitrova M., Topouzova-Hristova T., Kapchina V. (2012), Methanol and Chloroform Extracts from *Lamium album L.* Affect Cell Properties of A549 Cancer Lung Cell Line, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 26:sup1, 120-125, doi:10.5504/50YRTIMB.2011.0022

Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M., & Sancho, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. Food chemistry, 196, 1215–1223. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050

O'Toole G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of visualized experiments: JoVE, (47), 2437. https://doi.org/10.3791/2437

Özbek Z. H., Ünsalar T., Kazaz C. ve Demirezer L. (2006). *Wiedemannia orientalis'ten* İridoid, Flavonoid ve Feniletanoid Glikozitler, Türk Kimya Dergisi, c. 30, sayı. 3, ss. 391-400

Quave, C., & Smeltzer, M. (2009). Anti-Biofilm Activity of *Marrubium vulgare L.* (*Lamiaceae*) Extract on MRSA. Planta Medica, 75(04). doi:10.1055/s-2009-1216534

Pan, J., & Ren, D. (2009). Quorum sensing inhibitors: a patent overview. Expert opinion on therapeutic patents, 19(11), 1581–1601. https://doi.org/10.1517/13543770903222293

Robey, I. F., Stephen, R. M., Brown, K. S., Baggett, B. K., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2008). Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. Neoplasia (New York, N.Y.), 10(8), 745–756. https://doi.org/10.1593/neo.07724

R. Ramasubramania Raja, (2012). Medicinally Potential Plants of *Labiatae* (*Lamiaceae*) Family: An Overview. Research Journal of Medicinal Plants, 6: 203-213. doi:10.3923/rjmp.2012.203.213

Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Beyatli, A., Sharmeen, J., Mahomoodally, M. F., Sharopov, F., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Abenavoli, L., Capasso, R., & Sharifi-Rad, J. (2019). *Lamium* Plants-A Comprehensive Review on Health Benefits and Biological Activities. Molecules (Basel, Switzerland), 24(10), 1913. https://doi.org/10.3390/molecules24101913

Saraçlı A. M. (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? Gülhane Tıp Dergisi, (48); 244-250

Saraç N, Uğur A. (2007) Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some *Lamiaceae* species growing in Muğla, Turkey. EurAsian Journal of BioSciences (elektronik). (1); 28 - 34.

Savran, B., Yerlikaya, A., Erdoğan, E., & Genç, O. (2014). Anticancer agent ukrain and bortezomib combination is synergistic in 4T1 breast cancer cells. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 14(3), 466–472. https://doi.org/10.2174/18715206113139990318

Scandlyn, M. J., Stuart, E. C., Somers-Edgar, T. J., Menzies, A. R., & Rosengren, R. J. (2008). A new role for tamoxifen in oestrogen receptor-negative breast cancer when it is combined with epigallocatechin gallate. British journal of cancer, 99(7), 1056–1063. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604634

Shih, P. C., & Huang, C. T. (2002). Effects of quorum-sensing deficiency on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and antibiotic resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 49(2), 309–314. https://doi.org/10.1093/jac/49.2.309

Shoeb M. (2006). Anti-cancer agents from medicinal plants. Bangladesh J Pharmacol. 1: 35-41. doi: 10.3329/bjp.v1i2.486

Sırıken, B. & Öz, V. (2017). Pseudomonas aeruginosa: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, (18) , 42-52 . Retrieved from https://dergipark.org.tr/tr/pub/bursagida/issue/39981/475192

Srancikova, A., Horvathova, E., & Kozics, K. (2013). Biological effects of four frequently used medicinal plants of *Lamiaceae*. Neoplasma, 60(6), 585–597. https://doi.org/10.4149/neo_2013_076

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Temel, M, Tınmaz A. B., Öztürk, M., Gündüz, O. (2018). Dünyada ve Türkiye'de Tıbbi-Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Ticareti. KSÜ Tar Doğa Derg 21(Özel Sayı) : 198-214, doi : 10.18016/ ksutarimdoga.vi.473036

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 11.0, 2021. http://www.eucast.org.

Topouzova-Hristova, T., Moskova-Doumanova V., Keremidarska M., Doumanov J., Miteva G., Petkova B. and Kapchina-Toteva V. (2012). "Anticancer effect of plant extracts from *Lamium albüm L.* By Induction of cell death *in vitro*. Sci. and Technol., 2(1):55-59

Tüfekci, E., Alkateeb, A., Akar, S., Corum, O., Çelik Altunoğlu, Y., Baloğlu, M., Kiraz, M., Cöplü, N. (2020). Antimicrobial and anti-quorum sensing activities of giant fennel (Ferula elaeochytris Korovin) from the Hatay region. Eurasian Journal of Veterinary Sciences. 36. 214-220. 10.15312/EurasianJVetSci.2020.281.

Ulukanli, Z., Ulukanli, S., Ozbay, H., Ilcim, A., & Tuzcu, M. (2005). Antimicrobial Activities of Some Plants from the Eastern Anatolia Region of Turkey. Pharmaceutical biology, 43(4), 334–339. https://doi.org/10.1080/13880200590951757

Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G. D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M. M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S., & Tamba, B. I. (2018). Medicinal Plants of the Family *Lamiaceae* in Pain Therapy: A Review. Pain research & management, 2018, 7801543. https://doi.org/10.1155/2018/7801543

URL-1 https://www.biyologlar.com/lamium-orientalis-wiedemannia-orientalis. Erişim Tarihi: 30.04.2011

URL-2 http://yabanicicekler.com/flower/wiedemannia-orientalis-sin-lamium-orientalis-307. Erişim Tarihi: 01.03.2022

URL-3 https://www.gezenadam.com/flora/AI.php?ID=481. Erişim Tarihi: 01.03.2022

URL-4 http://sagmalcilar.meb.k12.tr/meb iys dosyalar/34/25/972861/dosyalar/2017 06/07170915 Cansu Gykcan Rapor.pdf. Erişim Tarihi:01.03.2020

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D., & Brantner, A. H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the *Lamiaceae* family. Molecules (Basel, Switzerland), 19(1), 767–782. https://doi.org/10.3390/molecules19010767

Wai-Leung, Ng., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. Annual review of genetics, 43, 197–222. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304

Weinberg R. A. (1996). How cancer arises. Scientific American, 275(3), 62–70. https://doi.org/10.1038/scientificamerican0996-62

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. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

Williams P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. Microbiology (Reading, England), 153(Pt 12), 3923–3938. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0

Yalameha, B. (2018). Administration of herbal antioxidant to prevent and treatment of cancers. Ann Res Antioxid, 3(1): e02

Yalçin, F. & Kaya Bilecenoglu, D. (2006). Ethnobotany, pharmacology and phytochemistry of the genus *Lamium* (*Lamiaceae*). Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences. 31. 43-53.

Yılmaz, H. H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinç, A., Olcayto, E. Ö., Ozgül, N., & Tuncer, M. (2011). Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. Japanese journal of clinical oncology, 41(1), 10–16. https://doi.org/10.1093/jjco/hyq075

Yokuş B. ve Çakır D. Ü. Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2012: 1(2): 7-18 http://www.dicle.edu.tr/bolum/Muh/veteriner/dergi/ Elektronik:ISSN: 1308-0679

Yorulmaz Salman, S., Saritas, S., Kara, N., Ay, R. (2014). Acaricidal and Ovicidal Effects of Sage (*Salvia officinalis L.*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) (*Lamiaceae*) Extracts on Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae). Tarim Bilimleri Dergisi. 20. 358-367. doi:10.15832/tbd.63488.

Young A, Guan J, Daemen A, Friedman L, Lin K. Abstract-B36: Progesterone receptor signaling in estrogen receptor-positive breast cancer. Proceedings of the 77 AACR Special Conference: Advances in Breast Cancer Research; AACR; Mol Cancer Res, 2018, 16(8): 8.

Yousefi, K., Fathiazad, F., Soraya, H., Rameshrad, M., Maleki-Dizaji, N., & Garjani, A. (2014). *Marrubium vulgare L.* methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. BioImpacts: BI, 4(1), 21–27. https://doi.org/10.5681/bi.2014.001

Yumrutas O., Demirors Saygideger S. Determination of *in vitro* antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish et Mey. and *Lamium amplexicaule L.* from South east of Turkey J. Med. Plants Res., 4 (2010), 2164-2172

Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., & Gong, Q. (2013). Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. Biotechnology letters, 35(4), 631–637. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1126-x

Zinicovscaia, I., Gundorina, S., Vergel, K., Grozdov, D., Ciocarlan, A., Aricu, A., Dragalin, I., Ciocarlan, N. (2020). Elemental analysis of *Lamiaceae* medicinal and aromatic plants growing in the Republic of Moldova using neutron activation analysis. Phytochemistry Letters, 35(), 119–127. doi:10.1016/j.phytol.2019.10.009