T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK ORIGANUM HYPERICIFOLIUM VE KÜLTÜR ÜRÜNÜ COFFEA ARABICA UÇUCU YAĞ VE EKSTRAKTLARININ C6, HEPG2 VE A549 HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİSİ

Buse BAHAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ

Mayıs, 2019

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK ORIGANUM HYPERICIFOLIUM VE KÜLTÜR ÜRÜNÜ COFFEA ARABICA UÇUCU YAĞ VE EKSTRAKTLARININ C6, HEPG2 VE A549 HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİSİ

Buse BAHAR tarafından hazırlanan tez çalışması çalışması 17.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK	Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi	Altınbaş Üniversitesi
Danışman	Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ, Üye
Altınbaş Üniversitesi _____

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Sezgin ÇELİK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Bitki ve Kanser Biyolojisi başlıklı çalışmalarda veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Buse BAHAR

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün 3375 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

arkadaşlarıma

TEŞEKKÜR

Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yapmış olduğum tez çalışmam boyunca derin bilgileri ile beni aydınlatan, her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sezgin ÇELİK başta olmak üzere, tüm hayatım boyunca en büyük idolüm olacak olan çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Çimen ATAK, tezim hakkında beni yönlendiren hocam Sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU' na, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocam Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin SERVİ'ye teşekkür ederim. Bana moleküler biyolojinin temelini sorgulamam gerektiğini ve sorgulayarak öğrenmem gerektiğini öğreten sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Z. Neslihan ÖZTÜRK GÖKÇE'ye, lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince yanımda olan tüm hocalarıma, deneylerimin yürümesi ve sonuçlarımın çıkmasını sağlayan MSc. Tuğçe Nur ERALP'e, teşekkür ederim.

Tez çalışmamda beni hep destekleyen deneylerimin başlamasını sağlayan, bu süreçte yaşadığım zorluklarda beni yalnız bırakmayan ve deneyimlerini benimle paylaşarak hep yanımda olan MSc. Utku ÖZBEY'e, ekip arkadaşım ve bu süreçteki yoldaşım Bsc. Merve YÜKSEL'e ve nerde olursa olsun bizlerin yanında olan arkadaşım Bsc. Abdullah DEMİR'e her sıkıntımda, derdimde çözümü sanki kendi problemleriymiş gibi benimle beraber aradıkları ve her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, bana doğru ve yanlışı ayırt etmeyi öğreten, tüm hayatlarını bana ve kardeşime adamış olan, değeri biçilemeyecek boyuttaki sevgileriyle, sonsuz sabır, özveri, maddi ve manevi hep yanımda olan ve hep yanımda olacak olan tüm hayatım boyunca bana sevgi dolu bir aile ortamı sağlayan sevgili annem Tülay BAHAR ve babam Erkan BAHAR'a, en yakın arkadaşım, sırdaşım, dostum bana hep doğruları olduğu gibi gösteren sevgili kardeşim İrem BAHAR'a teşekkür ederim.

Buse BAHAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ VIII

KISALTMA LİSTESİ IX

ŞEKİL LİSTESİ XI

TABLO LİSTESİ XII

ÇİZELGE LİSTESİ XIV

ÖZET XV

ABSTRACT XVII

1 Giriş 1

1.1. Literatür Özeti 1

1.2.Tezin Amacı 4

1.3.Hipotez 5

2 Genel Bilgi 6

2.1.Kanser 6

2.2. Hücre Sinyal Yolakları 13

2.3. *Origanum hypericifolium* Schwarz *et P. H. Davis* 13

2.4. *Coffea Arabica* L. 37

2.5. A549 38

2.6. HepG2 40

2.7. C6 41

2.9. Roscovitine 43

3 Materyal Method 44

3.1. Deneysel Süreçte Kullanılan Malzemeler 44

3.2. Uçucu Yağ Eldesi 47
3.3. Maserasyon 47
3.4. Yapılan Hesaplamalar 48
3.5. Hücre Kültürü 50
3.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin İçeriği 50
3.7. MTT 51
3.8.Hücre Sağkalım Testi 53
4 Sonuç ve Öneriler 54
KAYNAKÇA 69
Tezden Üretilmiş Yayınlar 79

SİMGE LİSTESİ

µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
°C	Santigrat Derece
gr	Gram
µM	Mikro Molar
Na	Moleküler ağırlık
n	Mol
V	Hacim

KISALTMA LİSTESİ

A549	Lung adenocarcinoma 549
Akt	Protein Kinase B
ATCC	American Tissue Culture CollectionBAX
Bcl-2	associated X protein
BBB	Kan Beyin Bariyeri
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BM	Bei Mu
C6	Glioblastoma Cell
Cdk4	Cyclin Dependent Kinase 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DIOC6	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
FOXO1	Forkhead box protein O1
GBM	Glioblastoma
HepG2	Hpataceluluar Carcinoma 2
JNK	c-Jun N-terminal kinases
JG	Jie-Geng
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7

MCF10A	Michigan Cancer Foundation 7
MMDT	Mai – Men – Dong – Tang
mTOR	phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase family of protein kinases
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidium iodide
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
P53	tümör protein 53
P38	P38 mitogen-activated protein kinases
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PARP	Pharmacological inhibitors of the enzyme poly ADP ribose polymerase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Ras	Protein superfamily of small GTPases
ROS	Reactive oxygen species

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Mutasyon geçirmiş olan hücerin invaziv kanser yapısına dönüşmesi 8

Şekil 2.2 Hanah ve Weinberg'in 2000 yılında yayınladığı kanserin 6 özelliği. 9

Şekil 2.3 2011'deki düzenlenmiş hali ile kanserin özellikleri 10

Şekil 2.4 2001de yapılan bir çalışmada yedi farklı kekikte yapılan incelemeler sonucu elde edilen ana bileşenlerinin yapısı 18

Şekil 2.5 Taze Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis Bitkisi ... 19

Şekil 2.6 Oregano türlerinin ana birleşikleri..... 20

Şekil 2.7 Kavrulmuş kahve çekirdekleri 37

Şekil 2.8 Hücre içi sinyalizasyonu ile bitklerden elde edilen kimyasalların ilişkisi 39

Şekil 2.9 Linalool kaynaklı HepG2 büyüme inhibisyonunda rol oynayan etki mekanizmaları model 41

Şekil 2.10 GBM'nin doğal ürün bazlı duyarlılık mekanizması. 42

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Türkiye'ye özgü endemik kekik türleri..... 15

Tablo 2.2 Bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarları 21

Tablo 2.3 Origanum hypericifolium'un GS/MS analizine. 36

Tablo 3.1 Deneysel süreçte kullanılan malzemeler 44

Tablo 4.1 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 54

Tablo 4.2 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 55

Tablo 4.3 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 56

Tablo 4.4 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 57

Tablo 4.5 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 58

Tablo 4.6 *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 59

Tablo 4.7 *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 60

Tablo 4.8 *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 61

Tablo 4.9 Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu..... 62

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT grafiği. 54

Çizelge 4.2 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçları..... 55

Çizelge 4.3 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları 56

Çizelge 4.4 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları 57

Çizelge 4.5 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları .. 58

Çizelge 4.6 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş Coffea arabica L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları .. 59

Çizelge 4.7 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları..... 60

Çizelge 4.8 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları..... 61

Çizelge 4.9 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçları..... 62

ÖZET

Endemik *Orıganum hypericifolıum* ve Kültür Ürünü *Coffea arabica* Uçucu Yağ Ve Ekstraktlarının C6, HepG2 ve A549 Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkisi

Buse BAHAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Eş-Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Akın SEVİNÇ

Son yıllarda çağımızın hastalığı olarak bilinen kanserin artış gösterdiği ve kanserden korunmak için ilaçların yanı sıra doğal ürünlerin kullanımına başvurulduğu görülmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda kanserli dokuyu öldürmek, çoğalmasını durdurmak ya da sabit kalmasını sağlamak için bir bitkiyi kullanırken bir içeriğe odaklanıp onu elde edene kadar saflaştırarak kullanılır. Fakat ilaç olarak alınmadığı sürece bu maddeler vücuda saf halleriyle girmezler. Vücuda girene daha yakın bir halini inceleyebilmek için *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis ve *Coffea arabica* L. çekirdeklerinin kavrulmuş ve kavrulmamış hallerinin yağ asitleri ve uçucu yağları farklı türde kanser hücreleri üzerindeki etkisi incelenecektir.

Ülkemiz çok zengin bir bitki örtüsü çeşitliliğine sahiptir. Bu çeşitlilik bize çok değerli endemik bitkiler sunmaktadır. Bunlardan biri olan *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri uzun yıllardır bilinen Lamiaceae ailesine ait ülkemize endemik

bir bitkidir. Uzun yıllardır halk tıbbında mide ve diyabet için kullanılmıştır. Yapılan bazı çalışmalar serviks kanseri ve akciğer kanseri üzerinde antikanser özelliği olduğu tespit edilmiştir. *Coffea arabica* L. ülkemizde yetişmeyen Rubiaceae ailesine ait işlenmiş bir bitki türüdür. Genellikle Türk kahvesi bu tür ile yapılmaktadır. Birçok çalışmada antikanser özelliği tespit edilmiştir. Bu bitkiler günlük yaşamımızda çok tüketilmekte olup laboratuarımızda da hali hazırda kuru halde bulunmaktadır.

Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis ve *Coffea arabica* L. çekirdeklerinin C6, HepG2 ve A549 hücre hatları üzerindeki etkisini araştırmak için laboratuvarımızdaki kurutulmuş bitkiler kullanılmıştır.

Ülkemizde endemik olarak bulunan Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis'un ve antitoksik özelliğinde olduğu bilinen ve farklı uygulamalarının bazı kanser hücre hatlarında pozitif sonuçlar verdiği bilinen kavrulmuş ve kavrulmamış Coffea arabica L. çekirdeklerinin yağ asitlerinin C6, HepG2 ve A549 hücre hatları üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Birçok faydası olduğunu bildiğimiz ülkemizde günlük tüketimi fazla olan *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve Coffea arabica L. çekirdeğinin çiğ ve kavrulmuş halinin yağ asitlerinin C6, HepG2 ve A549 hücre hatları üzerinde nasıl bir etkisi olduğu MTT ile incelenmiştir.

Sonuç olarak, C6, HepG2 ve A549 hücre hatlarının, çiğ ve kavrulmuş *Coffea arabica* L. çekirdeğinin yağ asitleri ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'in uçucu yağlardan nasıl etkilendiği *in vitro* olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Origanum hypericifolium, Coffea arabica, A549, HepG2, C6, MTT

ABSTRACT

Endemic *Origanum hypericifolium* and Culture *Coffea arabica* Effect Of Essential Oils and Extracts On C6, HepG2 and A549 Cell Lines

Buse BAHAR

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Akın SEVİNÇ

In recent years, it has been seen that cancer, known as epilepsy, has increased and the use of natural products as well as medicines has been applied to protect against cancer. Most of the studies done are used by killing a cancerous tissue, stopping proliferation or using a plant to keep it constant, focusing on a content and purifying it until it is obtained. However, unless they are taken as medicines, these substances do not enter the body in their pure state. In order to be able to examine the body closer, the effects of fatty acids and essential oils of different types of cancer cells on the roasted and unroasted forms of *Coffea arabica* L. beans and *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis will be examined.

Our country has a very rich vegetation variety. This diversity offers us endemic plants of great value. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, an antimicrobial and antioxidant, is an endemic plant of the Lamiaceae family, which has been known for a long time. For many years folk medicine has been used for stomach and diabetes. Some studies have

been found to be anticancer properties on cervical cancer and lung cancer. *Coffea arabica* L. is a cultivated plant species of Rubiaceae family that does not grow in our country. Usually Turkish coffee is made with this type of coffee. Anticancer properties have been identified in many studies. These plants, which we have dry form in our laboratory, are consumed very much in our daily life's.

Dried plants in our laboratory will be used to investigate the effect of *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis and *Coffea arabica* L. beans on C6, HepG2 and A549 cell lines.

The effects of essential on C6, HepG2 and A549 cell lines of *Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis* which is known to be endemic in our country. Roasted and unroasted *Coffea arabica* L. and *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis known to be antitoxic and whose different applications are believed to give positive results on certain cancer cell lines, will be examined. The effect of fatty acids and essential oils of C6, HepG2 and A549 cell lines on the carbohydrate of *Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis* and raw and roasted *Coffea arabica L.* bean, which we know to be very beneficial in our country, will be examined. Cytotoxicity will be determined by the MTT process a chemotherapeutic agent will be informed of cells.

As a result, how C6, HepG2 and A549 cell lines are affected by raw and roasted *Coffea arabica* L. beans fatty acids and *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis essential oils will be examined *in vitro.*

Key Words: *Origanum hypericifolium, Coffea arabica,* A549, HepG2, C6, MTT

1
Giriş

1.1. Literatür Özeti

Bitkiler ve doğal ürünlerden gelen şifa günümüzün en önemli konularından biridir. Son yıllarda çağımızın hastalığı olarak bilinen kanserin artış gösterdiği ve kanserden korunmak için ilaçların yanı sıra doğal ürünlerin kullanımına başvurulduğu görülmektedir (Mann, 2002).

Kekik dünyadaki en yaygın şifalı bitkilerden biridir. İtalya ve Meksika yemeklerinde taze ve kurutulmuş formda yaygın olarak kullanılır. Kurutulmuş bitkiler ayrıca et, et ürünleri, aperatif gıdalar ve süt ürünleri gibi birçok işlenmiş gıda da kullanılır. *Origanum* türlerinden ekstrakte edilen esansiyel yağlar; halk tıbbı, yemeklerde aroma, parfüm ve ilaç endüstrisi gibi günlük yaşamda birçok kullanışı mevcuttur. Antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri uzun yıllardır bilinmektedir ve antibiyotik özelliklerinin keşfi için bakteriler, virüsler ve mantarlar kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır (Temel ve Tokur, 2009). *Origanum* L. cinsinin dâhil olduğu *Lamiaceae (Labiatae)* familyası dünyada yaklaşık 200 cins ve 3500 türle temsil olunmaktadır. Bu familya üyeleri başlıca Akdeniz havzası ülkeleri olmak üzere Avusturalya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'ya kadar yayılış göstermektedir. Yurdumuzda ise 45 cins ve 546'dan fazla türe sahiptir (Temel vd., 2011). *Origanum* L. cinsi 15 endemik tür de dâhil olmak üzere Türkiye'de 26 takson ile temsil edilmektedir. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, dağılımı sınırlı olan endemik bir türdür (Çelik vd., 2010). *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, yerli halk tarafından "Çökelek kekiği" veya "Kekik" olarak bilinir ve Denizli bölgesi için endemiktir. Bu bitki, özellikle bitkisel çay olarak diyabet için ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılır (Ocak vd., 2013). Oregano türlerinin antispazmodik, antitümoral, antifungal ve analjezik etkinlikleri bildirilmiştir. *Oregano*, balgam söktürücü, antiparazitik ve

gastrointestinal şikâyetlerinde Türk halk tıbbında kullanılmıştır. Origanum'un uçucu yağında bulunan carvacrol muhtemelen protanoidler gibi inflamatuar medyatörlerin salınmasına sentezlenmesine müdahale ederek mide ülserlerinin iyileşme sürecini destekler. Ayrıca bir halk tedavisi olarak kolik, öksürük, diş ağrısı ve düzensiz menstrüel döngülere karşı kullanılır. *Origano* türleri aynı zamanda parfümlerde ve kokulu sabunlarda güçlü bir dezenfektan ve aroma verici olarak kullanılırlar (Shayista vd., 2013). *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, yaprak ve çiçeklerinden yapılan çayın günde bir kez içilmesi meme kanseri tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir (Sağıroğlu vd., 2013). Histokimyasal analizler sonucunda *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis ekstraktı, gastrointestinal sistemdeki kalın bağırsaktaki ve bazı glikan kısımlarındaki asit mukozasının yoğunluğunda hafif değişikliğe neden olduğunu ortaya çıkarmıştır (Keskin vd., 2012). *Origano hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağı bir çeşit serviks kanseri ve bir çeşit akciğer kanseri üzerinde denemiş ve içeriğindeki carvacrol sayesinde antikanser özellikte olduğunu göstermiştir (Baser, 2008).

Kahve, günde yaklaşık 2 milyar fincan tüketilip, sudan sonra dünyadaki en popüler ikinci içecektir. Düşük maliyeti ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle, hemen hemen tüm ülkelerde ve nüfusun tüm sosyal sınıfları tarafından farklı hazırlanma çeşitleri ile tüketilir. Basit bir görünüm sergileyen bir fincan kahve aslında yüzlerce molekülü içeren, bileşimi ve konsantrasyonu çok değişen ve kahve ağacının kökeni veya metabolizması gibi faktörlere bağlı olan değişiklik gösteren karmaşık bir karışımdır. Aşırı kahve tüketimi zararlı olabilse de, bu siyah karışımda bulunan birçok molekül antikanser özellikleri sergiler (Gaascht vd.,2015). Epidemiyolojik çalışmalardan birinde kahve tüketimi ile kolorektal kanserler gibi belirli kanser türlerine yakalanma riski arasında ters bir ilişki bulmuştur. Hayvan deneylerinin verileri, *Coffea arabica* L.'nın kimyasal önleyici bir etkisi olduğunu desteklemektedir. Bu faydalı etkilerden sorumlu olabilecek kahve bileşenlerini tanımlamak için önemli araştırmalar yapılmıştır. *Coffea arabica* L.'daki kafestol ve kahveol gibi çeşitli bileşenler kanserojenlerin genotoksisitesinin azalmasına neden olan geniş bir biyokimyasal etki serisi ürettiği gösterilmiştir (Calvin vd., 2002). *Coffea arabica* L. tüketimi, kafein etkisi ile bazal hücre karsinoması gelişimine karşı orta düzeyde koruyucu bir etki yapmaktadır (Caini vd., 2017). Epidemiyolojik

araştırmalarda, kahve içimi hepatoselüler karsinom ve kolon kanseri ile ters orantılı bulunmuştur. *Coffea arabica* L., çiğ, kavurulmuş olma ve hazırlama çeşitlerine bağlı olarak konsantrasyonu değişebilen antioksidan etkinliğe sahip birçok bileşik içerir. Kavurma esnasında kısmen kaybolan fenolik bileşiklerin yanı sıra kavurma sırasında çoğunlukla üretilen melanoidinler hayvan modellerindeki ve hücre kültürü sistemlerindeki çalışmalar antikarsinojenik etkilere sahip olabilecek diterpenler sentezlediği bulunmuştur. Özellikle, hem kafestol hem de kahveol, polisiklik aromatik hidrokarbonlar da dahil olmak üzere çeşitli kanserojenlerin etkisinin azalmasına neden olan geniş bir biyokimyasal etki serisi üretmektedir (Bravi vd., 2008). Başka bir çalışmada elde edilen bulgular, *Coffea arabica* L.'daki kafeinin postmenopozdaki kadınlar için meme kanseri riski ile zayıf şekilde ilişkili olabileceğini ve BRCA1 mutasyon taşıyıcıları, arasında kahve ile meme kanseri riski arasında kuvvetli ve anlamlı bir ilişki bulunduğunu ortaya koymuştur (Jiang vd., 2013).

Kanser ve doğal ürünler hakkında yaptığım literatür taramalarına dayanarak bo olguların birbiri ile bağlantisini anlatmak isterim. Meme kanseri, kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Gen ekspresyon profili, histolojik tip, tümör derecesi, lenf nodu durumu, östrojen reseptörü ve insan epidermal büyümesi gibi prediktif belirteçlerin varlığı gibi basit önlemlere dayanan moleküler düzeyde bu heterojenite anlayışımıza önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Holliday ve Speirs, 2011). Meme kanseri, dünyadaki kadınlarda en sık rastlanan onkolojik hastalıktır. Bununla rağmen, hâlihazırda mevcut olan ilaçların etkinliği çok sınırlıdır. Doğal olarak oluşan bitki temelli ajanları kapsayan çalışmalar, kanser ve ilgili hastalıkların yönetimi için yeni stratejilerin geliştirilmesine yol açabilir. Belirli gıdalardaki spesifik bileşiklerin, insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını, apoptoz ve hücre döngüsünde tutukluklar yoluyla azalttığı gösterilmiştir (Shafi vd., 2012). Meme kanserine model hücre hatlarından biri olan MCF7 hücreleri, 69 yaşında beyaz ırk bir bayan hastanın meme epitel dokusundan elde edilmiştir. Tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hattıdır(Levenson ve Jordan, 1997). MCF10A, 36 yaşında beyaz ırk bir bayandan alınmıştır (Soule vd., 1990). MCF10A insan meme bezi epitelyal hücre hattıdır. Birincil kültürden ölümsüzleştirilmiştir (Cowell vd., 2005). Bu nedenle MCF7 hücreleri için kontrol olarak kullanılan sağlıklı epitel

meme hücreleridir. Optimum koşullarda çalışabilmesi için bullet kit ile kullanılması gereklidir (Patnala vd., 2014).

Gliomablastoma ya da glioma beyinde ve omurilikte oluşan bir tümör türüdür. Gliomalar, sinir hücrelerini çevreleyen yapışkan destekleyici hücrelerde (glial hücreler) başlarlar. C6 Glioblastoma sıçanda neoplastik hücreler tarafından santral sinir sisteminin nörolojik işlev bozukluğuna ve eninde sonunda ölümüne yol açar (Grobben vd., 2002).

Bir homojenizasyon tekniği olan ekstraksiyon işlemi için kurutulmuş bitki materyali kullanılıp maserasyon işlemi yapılır. Polar olmayan hekzan polar olan yağ asitlerini bitkiden çekip alır. Maserasyon sonrası sıvı kısım süzgeç kâğıdında süzülür, çözücüler evaporatörde uçurulur. Bitkilerde uçucu yağ elde edilmesinde hidrodistilasyon yöntemi kullanılır (Özcan ve Cahlchat, 2005).

Herhangi bir kemoterapötik ajanın hücre canlılığına etkisini anlamak için kolorimetrik bir test olan MTT testi yapılır. Test, ölü hücreleri değil yaşayan hücreleri tespit eder ve üretilen sinyal hücrelerin aktivasyon derecesine bağlıdır. Bu nedenle bu yöntem, sitotoksisite, proliferasyon veya aktivasyonu ölçmek için kullanılabilir (Mosmann, 1983). Hücre Sağkalım Testi ile elde edilen koloniler mikroskop yardımıyla sayılır (Franken vd., 2006).

1.2. Tezin Amacı

Yağ asidi eldesi ve uçucu yağ eldesi ile *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, kavrulmuş *Coffea arabica* L. çekirdeği ve kavrulmamış Coffea arabica L. çekirdeğinin daha kompleks ama hücre içerisine verilebilecek halde elde edilip roscovitine ile karşılaştırılmalı olarak incelenmesi hedeflenmektedir. Bu şekilde bitkisel ürünlerimizin hâlihazırda kullanılan bir kemoterapatik ajan kadar etkili olup olmadığının tespiti hedeflenmiştir.

1.3. Hipotez

Kanser çağımızın hastalığı olup her geçen gün daha fazla büyüyen bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Hâlihazırda kullanılan ilaçların yan etkinliklerinin sınırlı kalmasına neden olmaktadır. İstenmeyen bu yan etkileri azaltmak için en güvenilir yol alınan ilaçların dozunu düşürmek için yeni çözümler geliştirmemiz gerekmektedir. Kemoteropötik ajanların kanserli hücreleri etkilerken diğer hücrelere verdiği zararı azaltmak için verilen dozu azaltmak için ek ve zararsız ürünlere ihtiyaç vardır. Bu zararsız destekleyicileri doğal ürünler ile sağlayabiliriz. İşte bu nedenle bu çalışmamızda, kullanmakta olduğumuz uçucu yağların hâlihazırda kemoteropötik ajan olarak kullanılmakta olan Roscovitine ilacı ile karşılaştırarak kanser hücreleri üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu gözlemlemeyi hedeflemekteyiz.

2
Genel Bilgi

2.1. Kanser

2.1.1. Tarihçe

İnsalığa ait ulaşılmış en eski yazıtlarda bile kanserin izleri görülmektedir. Kanser ile ilgil bilinen en eski yazıtlar Eski Mısır'a ait papiruslardır. Edwin Smithe, milattan önce 1600 civarında yazılmış bir papiruse dayanarak kanserin bir tanımını yapmış ve memedeki tümörleşmiş dokuların koterizasyon yoluyla çıkarması prosedürünü anlatmaktadır (American Cancer Society, 2009).

Yunan hekim Hipokrat tuttuğu kayıtlarda, yengeç ya da kerevitlere benzerliğinin vurgulamış ve birkaç kanser türünü tarif etmiştir. Aynı zamanlarda çalışan şifacılar ise ölümden sonra vucuda zarar vermek geleneklere karşı olduğu için, deri, burun ve meme gibi dışarıdan görülebilen tümör yapılarını çizimleri ile göstermişlerdir. Milattan sonra 2. yüzyılda, Yunan şifacı Galen, kanserli dokuyu tanımlamak için onkos tanımını kullanmış ve malign tümörler için kullanıllan karsinos tanımını bu tanımdan ayırmıştır. Galen'in kullanımları bu günkü modern terminolojiye kadar ulaşmış ve o günlerde temelleri atılan kelimelerden türettiğimiz onkoloji tanımını hala kullanmaktayız (American Cancer Society, 2009). Bu şekilde kanser, karsinoma ve kanser hastalığı ile ilgili temel terimlerin kökenleri de o zamanlara dayanmaktadır.

2.1.2. 16., 17. Yüzyıl ve Sonrasında Kanser

16. ve 17. Yüzyıllarda hekimler ölümlerin nedenlerini merak etmeye başlamışlar ve bu şekilde otopsi kavramı ortaya çıkmıştır. Alman Profesör Wilhelm Fabry yaptığı araştırmalar sonucu meme kanserinin bir meme kanalındaki süt pıhtısından kaynaklandığı kanısına varmıştır (Murrel, 1995). Hollandalı Profesör Francois de la Boe Sylvius, tüm hastalıkların kimyasal süreçler sonucu oluştuğuna

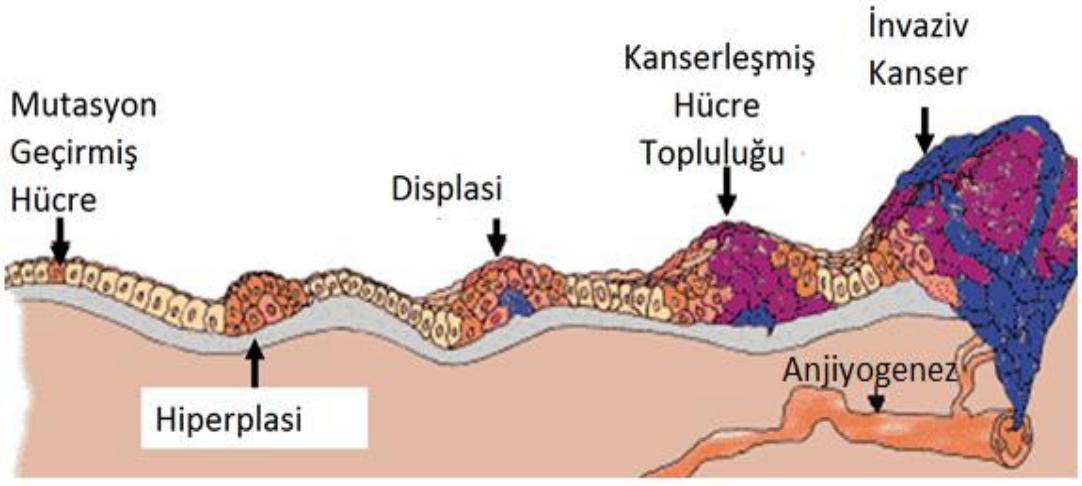
ve lenf sistemindeki asidik lenf sıvısının kansere neden olduğuna inanmıştır (Perumal, 2016). Nicolaes Tulp ise yaptığı araştırmalar sonucu kanserin yavaş yavaş yayılan bir zehir ve bulaşıcı olduğu sonucuna varmıştır (Ekmektzoglou, 2009).

Bilim ile uğraşan insanların kanseri görebilmeleri bazı fikirler oluşturmaları bir tanım yada sonuç oluşturmaya yetmemişti. 1775 yılında İngiliz cerrah Percivall Pott, yaptığı taramalar sonucunda kanserin yaygın bir hastalık olduğunu keşfetmiş ve kanserin ilk tanımını ortaya koymuştur. Dünyanın farklı yerlerinde bunu tek başına araştıran her araştırmacıdan ayrı fikirler çıkmasına ramen beraber çözüm bulmaya çalışmaları ile farklı düşüncelerin bir araya gelmesi sonuca giden yolda ilk adım olmuştur (American Cancer Society, 2009).

Mikroskopun 18. yüzyılda yaygın kullanıma başlaması ile "kanser zehirinin" aslında bir zehir olmadı ve o zehir olarak gözlemlenen maddenin de lenf nodlarından diğer bölgelere metastas yapmış olan primer tümörlere ait olduğu keşfedilmiştir. Hastalığın bu görüşü ilk olarak 1871 ve 1874 yılları arasında İngiliz cerrah Campbell De Morgan çalışmalarının sonuçlarında tanımlanmıştır. O dönemlerdeki hijyen sorunları nedeni ile her hastalıkta bir sorun oluşturduğu gibi kanser tedavisinde de cerrahinin kullanımı kötü sonuçlara neden olmuştur (Grange, 2002). Bunun yanında aynı dönemlerde, İskoç cerrah Alexander Monro, iki yıl boyunca 60 kanserli hasta üzerinde yaptığı cerrahi çalışmalarda sadece 2 meme kanserli hastanın hayatta kalmasını sağlayabilmiştir. 19. yüzyılda, cerrahi çalışmalardaki hijyenik koşullar iyileştirilince cerrahi müdahaleler sonucu hayatta kalma istatistikler yükseldi. Bu da tümörün cerrahi olarak çıkarılmasını kanser tedavisinin birincil tedavi prosedürü haline getirmiş oldu. Aynı dönemde yapılan farklı çalışmalar sonucunda hücrenin keşfi ile vücudun çeşitli dokulardan oluştuğu ve milyonlarca hücre itiva ettiği düşüncesine bağlı olarak vücuttaki kimyasal dengesizlikler hakkında birçok karışık teori ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu da kanser tedavilerini tekrardan sorgulamaya neden olmuştur (Hajdu, 2012).

2.1.3. Kanser Nedir?

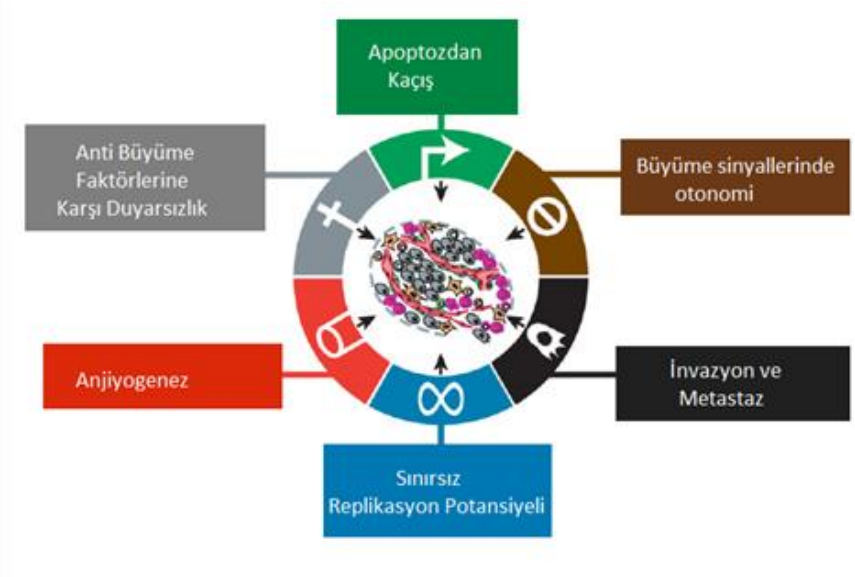
Kanser, bir hücredeki bir hasar sonucu kontrolsüz ve önlenemeyen hücre bölünmelerinden orjinlen bir hastalık gurubudur. Sağlıklı bir hücre ne kadar büyümesi gerektiğini ve ne zaman apoptoza gitmesi gerektiğini bilir. Bu şekilde bütün doku ve organlar sorunsuz bir şekilde çalışır. Bazen hücrelerdeki bazı mutasyonlar sonucu hücrelerde fazla büyüme söz konusu olabilir. Fakat bunların hepsi kanser demek değildir. Hiperplasi ve displasi gibi hücre büyümeleri her zaman kanser oluşumu ile sonlanmaz. Siğiller ya da nasırlar bunların zararsız örnekleri olarak gösteriliebir. Hiperplaziyi hacimce büyüme ve displaziyi ise hücrelerin şekilsiz büyümesi olarak tanımlayabiliriz. Bu aşamadan sonra hücrelerin nasıl farklılaşacağı ve nasıl bir büyüme göstereceği önemlidir. Yani o hücrede oluşan mutasyon çok büyük bir önem teşkil eder (Nakayama, 1996). Şekil 2.1'de gördüğümüz gibi bir hücre mutasyon sonucu hiperplasik bir hücre topluluğu oluşturur sonra displsik bir hücre topluluğuna dönüşür. Sonrasında artık kontrolün kaybedildiği bir kanserleşmiş hücre topluluğu ve arkasından invasiv kanser oluşumuna gider.



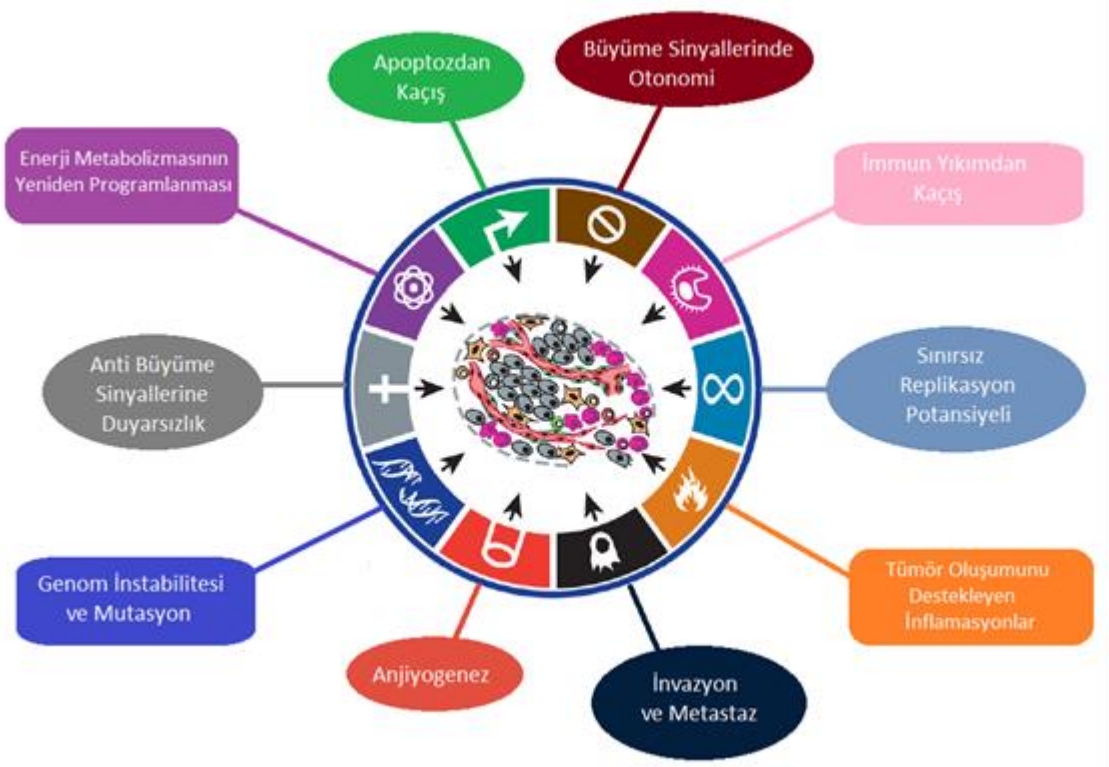
Şekil 2.1 Mutasyon geçirmiş olan hücerin invaziv kanser yapısına dönüşmesi. (2016, The Biology of Cancer)

Kanser, hücre proliferasyonunun regülasyonunda rol oynayan genlerde genetik ve epigenetik mutasyonların birikmesine ve kontrolsüz hücre büyümesine neden olmasından kaynaklanır (Kanwala, 2012). Her tümör oluşumu kanser değildir. Eğer tümör, bening bir tümör ise bu metastaz yapamaz ve kanser değildir. Fakat oluşmuş tümör dokusu malign bir tümör ise bu tümör metastaz yaparak başka dokulara yayılabilen bir kanser tümörüdür. Öncelikle kanser bir hastalık grubudur. Kanserlerin büyük bir çoğunluğunu Epitel hücrelerden türevlenen karsinomalar oluşturur. Kanserler kemik, kas gibi mezoderm hücrelerden kökenlenmiş ise bunlara sarkoma, eğer meme gibi salgı dokulardan meydana geliyor ise bunlarada adenokarsinomalar denir (Hill, 2001).

2000'den bu yana Hanahan ve Winberg'in kanserin özellikleri ile ilgili yaptığı çalışma kural gibi görülmekte ve çoğu araştırmacıya ışık tutmaktadır. Bunlar şekildede gördüğümüz gibi otonom büyüme sinyali, anti büyüme faktörlerine karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potasyeli, anjiyogenez, invazyon ve metastazdır. Fakat 2011'de çokan makalede buna dört madde daha eklenmiştir. Bunlar; tümörü destekleyen inflamasyon, genom instabilitesi ve mutasyon, İmmun yıkımdan kaçınmak ve enerji metabolizmasının yeniden programlanmasıdır (Hanahan, 2011).



Şekil 1.2 Hanah ve Weinberg'in 2000 yılında yayınladığı kanserin 6 özelliği.



Şekil 2.3 2011'deki düzenlenmiş hali ile kanserin özellikleri (Hanahan, 2011).

2.1.3.1. Otonom Büyüme Sinyali

Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerinden gelen sinyallere ihtiyaç duyar. Kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyallerine bağlı değildir. Büyüme uyarıcı sinyalleri hücrelere ileten hücre yüzeyi reseptörleri, aşırı eksprese olabilir veya yapısal olarak değiştirilmiş olabilir böylece liganddan bağımsız sinyal iletimine yol açabilir. Bu yeni sinyal yolu downstream hedeflerini de değiştirilebilir (Hanahan, 2011).

2.1.3.2. Büyüme Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık

Normal hücreler, homeostaziyi korumak için inhibitör sinyaller ile sürekli iletişim halindedir gelen sinyallere cevap verir. Fakat kanser hücreleri büyüme engelleyici sinyallere cevap vermez ve edinilmiş mutasyonlar veya gen susturulması ve inhibitör yolaklara müdahale eder. Kanser hücreleri, uygun büyüme sinyalleri gelene kadar hücreleri, olağan proliferasyon döngüsünden çıkmaya zorlar ya da hücrelerin proliferatif potansiyelini tamamen ortadan kaldıracak olan

farklılaşmayı indükleyebilir. Bu iki mekanizma ile kanser hücreleri anti-büyüme sinyalleri ile proliferasyonu bloke edebilir (Hanahan, 2000).

2.1.3.3. Apoptozdan Kaçış

Hücrelerin belirli mekanizmalar tarafından kontrol edilerek bölünmelerini gerçekleştirirler. Günümüzde bu önceden programlanmış hücre ölümü olarak bilinse de apoptoz kelime anlamı olarak bakıldığında eski Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelnektedir. Apoptoz normal embriyonik gelişimde rastlanan bir durum olarak bilinmektedir. Ayrıca normal hücrelerde bağışıklık sistemi ajanlarının mutasyon geçirmiş kromozomların çiftlenmesi durumunda tahmir mekanizması niteliğinde karşımıza çıkıyor olsada bunların yanısıra DNA hasarına yol açan UV radyasyonu, iyonize radyasyon, oksidatif stres, replikasyon hataları ve genotoksinler de apoptozu tetikleyen etmenler arasında yer almaktadır (Özbey, 2016)

DNA hasarı olan hücreler apoptoz ile yok ediliri Fakat kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçar. Buna örnek olarak, normalde pro-apoptotik proteinleri aktive eden p53'ün kaybı ile en yaygın proapoptotik regülatör kaybı yaşanarak hücrenin apoptoza gitmesi engellenir (Hanahan, 2000).

2.1.3.4. Sınırsız Replikasyon Potansiyeli

Memeli hücreleri hücre jenerasyonlarının sayısını takip ederek çoğalmasını sınırlandıran bir mekanizma taşır. Bu mekanizma ile telomerler, her DNA replikasyonu sonunda kromozomal uçlarından kısalır. Fakat kanser hücrelerinde bu telomerler kısalmaz ve telomer aktivitesinin bozulması, sınırsız replikatif potansiyeli sağlar (Cuozzo, 2007).

2.1.3.5. Anjiyogenez

Normal hücreler, oksijen ve besinlerini kan damarları vasıtası ile elde eder. Yetişkinlerde bu vasküler yapı neredeyse sabittir. Kanser hücreleri meydana getirdikleri tümörün hayatta kalması, beslenmesi ve büyümesi için gerekli besini elde edebilmek için anjiyogenez ile kendine yeni bir damar ağı oluşturur (Wu, 2015).

2.1.3.6. İnvazyon ve Metastaz

Normal hücrelerin vücutta sabit yerleri vardır ve genellikle göç etmezler. Fakan kanser hücreleri daha fazla yerre ulaşabilmek için vücudun başka bölgelerine haraket eder. Kanser hücreleri hücre dışı matriks ve bazal membran ile karmaşık bir ilişki halindedir. Aktin hücre iskeleti ile bir hücre çıkıntısını oluşturarak matrikse girebilirler. Hücreler bazal memrana girip metastaz yapmak için bazal membranı parçalar. Tümör hücreleri bir çeşit aktivatör olan plazminojeni aktif bir proteaz olan plazmine dönüştüren bir protein salgılar. Bu protein diğer proteaz aktiviteleri ile birlikte artan plazmin aktivitesini tetikler ve bazal membranı sindirerek metastazı kolaylaştırır (Hanahan, 2011).

2.1.3.7. Genom İnstabilitesi ve Mutasyon

Kanser hücresinin genel özelliklerini kazanması genomik değişikliklere bağlıdır. DNA tamir yolaklarında meydana gelen hatalar genomik instabilitenin ortaya çıkmasını sağlar (Negrini, 2010).

2.1.3.8. Tümörü Destekleyen İnflamasyon

Neredeyse tüm tümörler inflamatuar bağışıklık hücreleri içerir. İnflamasyon, kanserin temel ayırt edici özelliklerini edinme yeteneğini kolaylaştırabilen bir bağışıklık yanıttır. İnflamatuar hücreler mutajenik olan oksijen türlerini serbest bırakırlar. Bunun yanında, anjiyogenez ve invazyonu destekleyen büyüme faktörleri ve enzimler sağlarlar (Ward, 2012).

2.1.3.9. İmmün Yıkımdan Kaçış

Bazı kanser hücresi tiplerini tespit ederek ortadan kaldıran bağışık hücreleri mevcuttur. Fakat kanser hücrelerinin geneli immün yanıt oluşumunu engeller. Bu şekilde immün sistem kanser ile savaşamaz çünkü onu bir tehdit olarak görmez (Negrini, 2010)

2.1.3.10. Enerji Metabolizmasının Yeniden Programlanması

Kontrolsüz hücre bölünmelerinin çoğalması enerji ihtiyacını arttırır. O nedenle kanser hücreleri enerji metabolizmasını tekrardan düzenleyerek oksijen varlığında

bile glikoliz yaparak glikoliz ara ürünlerini biyosentetik yolaklarda kullanabilecekleri bir sistem kurarlar (Ward, 2012).

2.2. Hücre Sinyal Yolakları

Bir hücrede büyüme negatif ve pozitif faktörler ile dengelenir. Kanserle ilişkili mutasyonlar ya tümör baskılayıcı genler ya da onkogenler ile olur. Proto-onkogenler normal bir hücrede zaten vardır. Fakat bunlar mutasyona uğraryarak onkogenlere dönüşür. Bu da hücrenin normal devrini bozar. Tümör supresor genler, büyümeyi baskılamada hücre devrini durdumada görevli genlerdir. Bu nedenle normal işleyişe sağip hücrelerde tümör oluşumunuda engel olur. Fakat bu tümör supresör genlerde oluşan mutasyonlar bunların işlevsizleşmesine neden olur (Liu, 1993).

Normal bir hücrenin organizmanın ölümüne yol açabilecek bu olumsuz özellikleri kazanmasına karsinogenez denir. Karsinogenez, kanser hücresinin yaşaması, hücrenin büyümesinin kontrolü ve diferansiasyonu gibi işlevsel olayları etkileyen mutasyonların biraraya gelmesi sürecidir. Bir hücre kanser oluşumuna giderken mutasyonlar sonucu kendine yeni fenopler edinir. Zeten bu yeni özellikler tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalıp çevre dokulara yayılmalarına, sinyalizasyondan bağımsız yaşamalarına ve metastaz yapabilmelerine neden olur (McCormick, 1999). Kanser hücre sinyal yollaklarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sebep olur. Hücre sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalması, büyümesi ve apoptoza gitmesi gibi birincil işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır ve hücre içi sinyal iletimi, tümör gelişim süreci, invazyon ve metastaz gibi kanser oluşum süreçlerinde etkin rol oynamaktadır (Hanahan, 2000).

2.3. *Origanum hypericifolium* Schwarz *et P. H. Davis*

Kekik dünyadaki en yaygın şifalı bitkilerden biridir. Eski zamanlardan beri tedavi amaçlı kullanılmakta olduğu bilinmektedir. X. Yüzyılda öksürüğü gidermek için şarapla kaynatılmış kekik kullanılması, epilepsisi olan hastaların kekikten yapılmış bir zemin üzerinde tedavi edilmesi, su toplamış dokular üzerinde ve narkotik

zehirlere karşı kullandığını kanıtlayan birçok makale mevcuttur (İli, 2003). Bunun yanında tüm dünya mutfaklarında kullanılan ana baharatlardan biri olduğu bilinmektedir. İtalya ve Meksika yemeklerinde taze ve kurutulmuş formda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kurutulmuş olarak et, et ürünleri, aperatif gıdalar ve süt ürünleri gibi birçok işlenmiş gıda da kullanılmaktadır. *Origanum* türlerinden ekstrakte edilen esansiyel yağların bir çağlar boyunca birçok alanda kullanıldığı bilinmektedir. Geleneksel halk tıbbı, gıda ürünlerinde aroma, parfüm ve ilaç endüstrisi gibi günlük yaşamda birçok kullanım alanı olduğu bilinmektedir. Bunun yanında antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri uzun yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Aynı bitkinin antibiyotik özelliklerinin keşfi için bakteriler, virüsler ve mantarlar kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalarda umut verici sonuçlar alınmıştır (Temel ve Tokur, 2009). Ayrıca 2012 de Pamukkale üniversitesinde yapılan bir doktora tez çalışmasında güneşin ultraviyole ışnlarına karşı da koruyucu bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır (İli, 2012). Bu çalışmalara baktığımız zaman halk arasında günlük hayatta sadece gıdaları lezzetlendiren aromatik bir ürün olarak yer ettiği düşünülen kekiğin aslında halk tarafından bilinmeyen birçok faydası olduğu görülmektedir.

Anadolu birçok bitki türüne ev sahipliği yaptığı bilinen verimli topraklara sahiptir (Çelik vd., 2004). Ülkemiz bitki florası çeşitlilği bakımından çok zengin topraklara sahip olmakla birlikte birçok endemik türe de ev sahipliği yapmaktadır. Origanum L. cinsinin dâhil olduğu *Lamiaceae (Labiatae)* familyası dünyada yaklaşık 200 cins ve 3500 tür ile geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu familya üyeleri başlıca Akdeniz havzası ülkeleri olmak üzere Avusturalya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'ya kadar geniş bir alana yayılım göstermektedir. Ülkemizin ise 45 cins ve 546'dan fazla türe ev sahipliği yaptığı bilinmektedir (Temel vd., 2011). Türkiye'de 15 endemik türü olduğu literatürlerden bilinmektedir. *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis, dağılımı sınırlı olan endemik bir türdür (Çelik vd., 2010). *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis, yerli halk tarafından "Çökelek kekiği" olarak bilinmektedir ve Denizli bölgesi için endemiktir. Bu bitki yerel halk tarafından özellikle bitkisel çay olarak diyabet ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ocak vd., 2013). Bizim bu tez çalışmamız sırasında kullandığımız *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis Delik mercanı olarak da bilinen

ve Muğla'da Köyceğiz, Sandras Dağından 1410 m'den Pinus Nigara Ormanı ve açıklıklarından Mehmet Çiçek tarafından 01.07.2017 tarihinde toplanmıştır.

Tablo 2.1 Türkiye'ye özgü endemik kekik türleri (İli, 2003)

Türkiye'nin Origanum Türleri
Seksiyon Amaracus (Gleditsch) Bentham
O.boissieri Ietswaart [E]
O.saccatum Davis [E]
O.solymicum Davis [E]
Seksiyon Natolicon Bentham
O.hypericifolium Schwartz et Davis [E]
O.sipyleum L. [E]
Seksiyon Brevifilamentum Ietswaart
O.acutidens (Hand.-Mazz.) Ietswaart [E]
O.bargyli Mouterde
O.brevidens (Bornm.) Dinsmore [E]
O.haussknechtii Boiss. [E]
O.leptocladum Boiss. [E]
O.rotundifolium Boiss.
O.munzurense Kit Tan et Sorger [E]
O.husnucan-baseri H.Duman, Z.Aytaç et A.Duran [E]
Seksiyon Longitubus Ieatswaart
O.amanum Post [E]
Seksiyon Chilocalyx (Briq.) Ietswaart
O.bilgeri Davis [E]
O.micranthum Vogel [E]

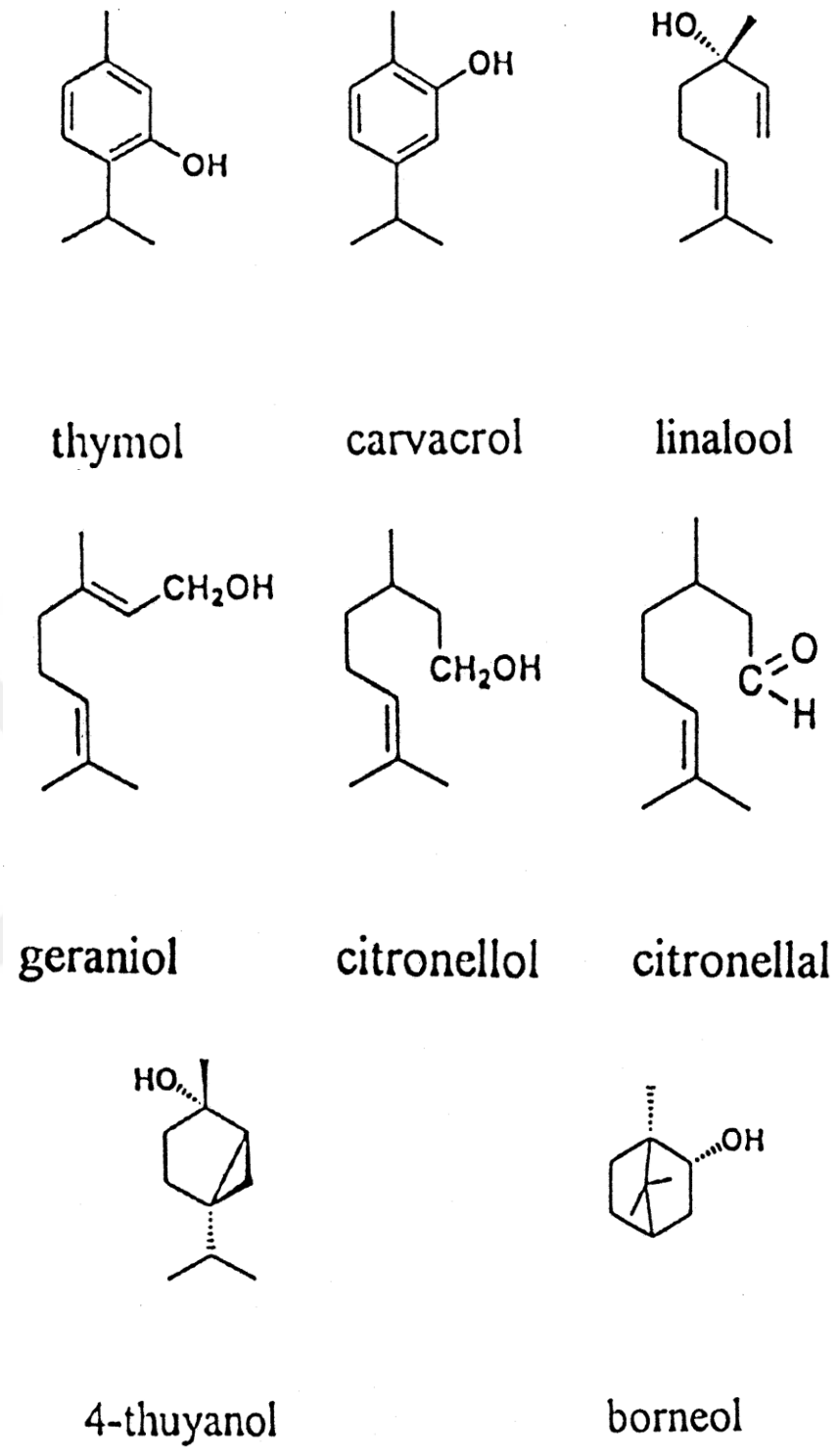
Tablo 2.1 Türkiye'ye özgü endemik kekik türleri (devamı)

O.minutiflorum Schwartz et Davis [E]
Seksiyon Majorana (Miller) Benth.
O.majorana L. [Syn.: *O. dubium* Boiss.]
O.onites L. [Syn.: *O. smyrnaeum* L.]
O.syriacum var. bevanii (Holmes) Ietswaart [Syn.: O. bevani Holmes]
Seksiyon Origanum L.
21*. O.vulgare* L. subsp. *vulgare* [Syn.: *O. creticum* L.]
O.vulgare L.subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart [Syn.:*O.tyttanthum* Gontsch.]
O.vulgare L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart [Syn.: *O. heracleoticum* L.]
O.vulgare L. subsp. *viride* (Boiss.) Hayek [Syn.: *O. heracleoticum* L.]
Seksiyon Prolaticorolla Ietswaart
O.laevigatum Boiss. [E]
Hibritler
O. x dolichosiphon P.H.Davis [*O.amanum* Post x *O.laevigatum* Boiss.] [E]
O. x intermedium P.H.Davis [*O.sipyleum* L. x *O.onites* L.] [E]
O. x symeonis Mouterde [*O.syriacum* L. x *O.laevigatum* Boiss.] [E]
O. x intercedens Rech. fil. [*O.vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart x *O.onites* L.]
O. x vulgare L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart x *O.micranthum* Vogel [E]
O. x adanense Baser et Duman [*O.laevigatum* Boiss. x *O.bargyli* Mouterde] [E]

Tablo 2.1 Türkiye'ye özgü endemik kekik türleri tablosu (devamı)

O. x majoricum Cambess [*O.vulgare* L. subsp*. virens* (Hoffm. et Link) Ietswaart x *O.majorana* L.]

Biz bu tez çalışmamızda uçuç yağlar ve yağ asiti içeren ekstraktlar ile çalışmayı tercih ettik. Bu bitkiyi seçerken yaptığımız değerlendirmeler sonucu en çok uçucu yağ itiva eden bitkiler arasından seçim yaparak *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis'i kullanmaya karar verdik. Uçucu yağlar en çok *Lamiaceae, Myrtaceae, Ruaceae, Coniferae, Compositae, Umbelliferae* ve *Graminae* familyalarında bulunmaktadır. Bitkide uçucu yağların, koruyucu, tozlaşmayı kolaylaştırıcı, su kaybını azaltıcı, yaralanmalarda bitkiyi koruyucu, görevi biten reçineleri yok edici ve bitkinin kullanmadığı depo ürünleri yok edici görevleri olduğu düşünülmektedir. Uçucu yağlar terpenoitler ve fenilpropandan oluşan aromatik içerikli ürünlerdir. Uçucu yağlar en çok molekül ağırlığı çok yüksek olan monoterpenler ve seskiterpenleri barıdırmaktadır. Kekik, Lamiaceae familyasına ait bir bitki olduğu için bol miktarda uçucu yağ itiva eder ve bu nedenle bazı kimyasalları daha yoğun şekilde bulundurduğu bilinmektedir. Bir çok türü olduğu bilinen kekiğin *Thymus*, *Thymbra, Satureja, Majorana, Origanum* ve *Corydothymus* türleri, timol, karvakrol, geraniol, linalol, α-terpineol veya α-terpineol ile birlikte t-4-tuyanol, cis-8-mirsenol ve sineol ile p-simen ve terpinolen gibi hidrokarbonları ana bileşen olarak bulundurmaktadır (İli, 2003).



Şekil 2.4 2001de yapılan bir çalışmada yedi farklı kekikte yapılan incelemeler sonucu elde edilen ana bileşenlerinin yapısı (Pothier vd., 2001)

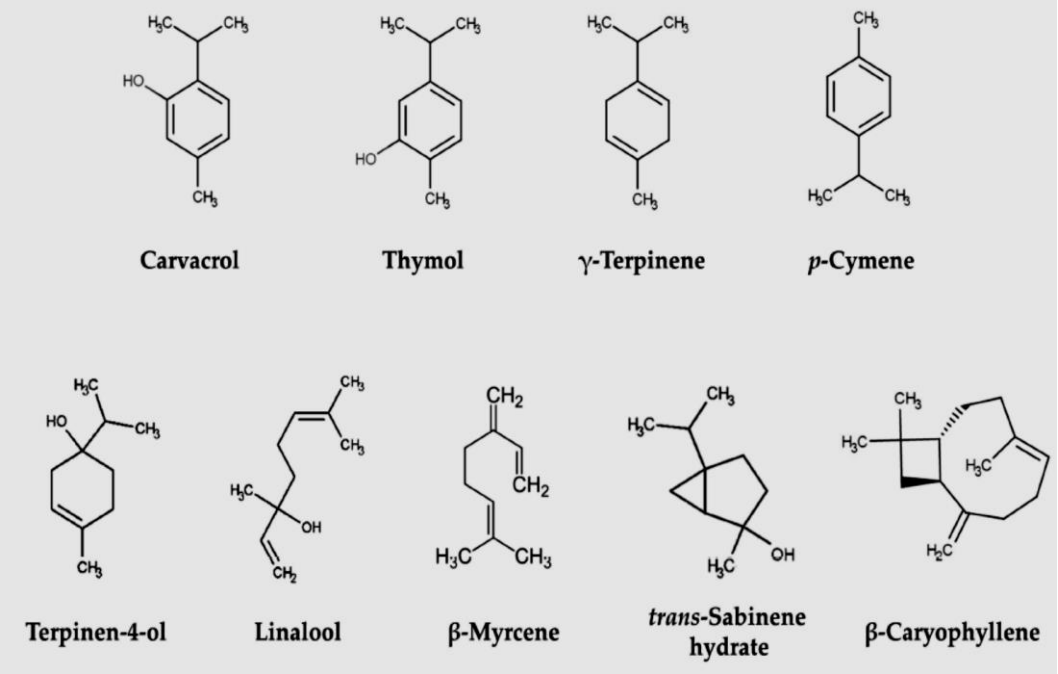


Şekil 2.5 Taze *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis Bitkisi (Fakir, 2015)

Origanum türlerinin antispazmodik, antitümoral, antifungal ve analjezik etkinlikleri literatürlerde yer almaktadır. *Origanum,* balgam söktürücü, antiparazitik ve gastrointestinal şikâyetlerin giderilmesi için Türk halk tıbbında ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Origanum'un uçucu yağında bulunan carvacrol muhtemelen protanoidler gibi inflamatuar medyatörlerin salınmasına sentezlenmesine müdahale ederek mide ülserlerinin iyileşme sürecini desteklediği için hastalara kısa sürede rahatlama sağlayan bir aromatik yapıya sahiptir. Ayrıca bir halk tedavisi olarak kolik, öksürük, diş ağrısı ve düzensiz menstrüel döngülere karşı kullanıldığı da literatürlerde yer almaktadır. Origanum türleri aynı zamanda parfümlerde ve kokulu sabunlarda güçlü bir dezenfektan ve aroma verici olarak kullanılmaktadır (Shayista vd., 2013). 2016 yılında Pamukkale Üniversitesinde yapılan tez çalışmasında *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis'un diyabet üzerine etkileri fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile kanıtlanmaktadır (Kütükçü, 2016). 2013'te yapılan bir çalışmada *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis, yaprak ve çiçeklerinden yapılan çayın günde bir kez içilmesi meme kanseri tedavisinde etkili olduğunu göstermektedir (Sağıroğlu vd., 2013). Histokimyasal analizler sonucunda *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P.

H. Davis ekstraktı, gastrointestinal sistemdeki kalın bağırsaktaki ve bazı glikan kısımlarındaki asit mukozasının yoğunluğunda hafif değişikliğe neden olduğunu ortaya koymuştur (Keskin vd., 2012). *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis uçucu yağı bir çeşit serviks kanseri ve bir çeşit akciğer kanseri üzerinde denemiş ve içeriğindeki carvacrol sayesinde antikanser özellikte olduğunu göstermektedir (Baser, 2008).

Dünya çapında yapılan çalışmalar bize her Oregano türünün aynı içeriğe aynı miktarda sahip olmadığını göstermektedir. Genel olarak ana bileşenleri aynı olmasına ramen içeriklerindeki farklılıklar farklı türlerle yapılan çalışmaların sonuçlarının aynı olmamasının en büyük nedenlerindendir. Farklı türlerin içerikleri ve yetiştikleri yerler tablo 2 de gösterilmiştir.



Şekil 2.6 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre Oregano türlerinin ana birleşikleri (Leyva-López vd., 2017).

Tüm *Oregano* türleri genel olarak bu ana bileşenleri barındırmaktadır. Fakat bitkilerin cinsine göre bu etken maddelerin içerikleri değişmektedir. Bitkilerin toplandıkları tarih, bekleme süreleri, kurutulma teknikleri uçucu yağların verimini etkilemektedir. Bu da uçucu yağ içeriklerini etkilemektedir.

Tablo 1.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı *Oregano* türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablo (Leyva-López vd., 2017)

Oregano Türü	Bulunduğu Ülke	İçerik	Verim
H. patens	Meksika	Thymol, trans-piperitol, carvacrol acetate, carvacrol, camphene, β-myrcene, y-terpinene, cis-p-mentha-1(7), 8-dien-2-ol, α-muurolene, α-calacorene, bulnesol, cadalene, viridiflorol	Kayıt yok
L. grandis	Brezilya	Carvacrol (% 37.12) p-cymene (%11.64) Thymol (%7.83) y-caryophyllene (%3.93)	%2.7
L. graveolens	Meksika	Thymol, carvacrol acetate, carvacrol, camphene, β-myrcene, y-terpinene, cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol, viridiflorol	Kayıt Yok
L. origanoides	Kolombiya	Thymol (%78.7) p-cymene (%6.6) y-terpinene (%2.7) trans-β-caryophyllene (%2.1)	Kayıt Yok
L. palmeri	Meksika	Thymol, α-cedrene, trans-piperitol, eugenol, carvacrol acetate, β-selinene, y -cadin	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Türkiye	Carvacrol (%76.21) p-cymene (%7.42) borneol (%3.19)	% 1.45
	Türkiye	Carvacrol (%65.13) meta-cymene (%9.15) trans-β-caryophyllene (%4.43) y-terpinene (%3.54)	% 3.1
O. x applii	Arjantin	Thymol (%30.77) Trans-sabinene hydrate (%29.63) Terpinen-4-ol (%3.23)	1.83 ± 0.27 mg/g kuru ağırlık
O. ehrenbergii	Lübnan	Carvacrol (%79.0) p-cymene (%4.4) Carvacrol methyl ether (%2.7) y-terpinene (%2.6)	%3.19
O. bilgeri	Türkiye	Carvacrol (%84.30–90.20) p-cymene (%3.40–5.85) y-terpinene (%0.47–1.20) Thymol (%0.69–1.08)	%0.54–0.57
O. libanoticum	Lübnan	β-Caryophyllene (%26.8) Caryophyllene oxide (%22.6) Thymol methyl ether (%10.5)	%0.16

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

O. majoricum	Kolombiya	Trans-Sabinene hydrate (%14.5) y-terpinene (%14.0) Carvacrol methyl ether (%6.0) Terpinen-4-ol (%6.0)	Kayıt Yok
	Türkiye	Limonene (%88.01) Thymol (%11.98)	Kayıt Yok
	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%24.3–28.1) Thymol (%12.1–17.4) y-terpinene (%7.0–7.5)	Kayıt Yok
	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%36.77) Thymol (%17.77) y-terpinene (%5.9) α-terpinene (%3.9)	3.9 ± 0.25 mg/g Kuru Ağırlık
O. hypericifolium	Türkiye	p-Cymene (%34.33) Carvacrol (%21.76) Thymol (%19.54) y-terpinene (%13.91)	%2.9
O. onites	Yunanistan	Carvacrol (%79.63) y-terpinene (%3.89) p-cymene (%3.51) β-caryophyllene (%2.24)	%3.62
	Yunanistan	Carvacrol (%62.6) p-cymene (%8.87) y-terpinene (%8.45) β-myrcene (%2.92)	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Yunanistan	Carvacrol (%69.0–92.6) p-cymene (%0.5–9.5) y-terpinene (%0.3–7.9) Borneol (%0.8–5.5)	%3.0 -7.0
	Türkiye	Carvacrol (%85.86) y-terpinene (%4.43) β-phellandrene (%3.20) p-cymene (%1.83)	%4.7±0.06
	Türkiye	Carvacrol (%83.97–88.65) Thymol (%0.80–7.48) y-terpinene (%2.63–6.15) p-cymene (%1.52–3.16)	% 2.5–3.2
O. syriacum	Mısır	Carvacrol (%81.38) p-cymene (%8.48) y-terpinene (%1.98) β-myrcene (%1.32)	%5.5
	Mısır	Thymol (%31.73) y-terpinene (%14.32) Linalool (%9.44) Terpinen-4-ol (%7.68)	%4.6
	Mısır	Thymol (%21.04) y-terpinene (%18.96) Terpinen-4-ol (%17.20) α-terpinene (%7.41)	%0.6
	Lübnan	Carvacrol (%60.8) p-cymene (%8.4) Thymol (%7.9) y-terpinene (%7.5)	%1.65

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

O. syriacum ssp. syriacum	Ürdün	Thymol (%51.8) Carvacrol (%34.4) p-cymene (%3.9)	%2.0-2.2
	Ürdün	Thymol (%72.4) y-terpinene (%7.8) p-cymene (%5.4) Carvacrol (%3.5)	%2.0-2.2
O. vulgare L.	Arjantin	p-Cymene (%26.00) y-terpinene (%21.89) Terpinen-4-ol (%16.29) β-caryophyllene (%8.25)	Kayıt Yok
	Arjantin	Carvacrol (%26.70) p-cymene (%15.20) y-terpinene (%15.10) Terpinene (%7.50)	Kayıt Yok
	Arjantin	y-terpinene (%25.1) Terpinen-4-ol (%16.7) Carvacrol (%16.2) α-terpinene (%8.54)	Kayıt Yok
	Arjantin	y-terpinene (%32.1) α-terpinene (%15.1) p-cymene (%8.0) Thymol (%8.0)	Kayıt Yok
	Brazilya	Carvacrol (%73.9) y-terpinene (%3.6) Thymol (%3.0) β-caryophyllene (%2.8)	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosunun (devamı)

O. vulgare L.	Şili	cis-β-Terpineol (%16.49) Thymol (%13.26) terpinen-4-ol (%10.24) α-terpineol (%4.35)	**Kayıt Yok**
	Çin	Carvacrol (%30.73) Thymol (%18.81) p-cymene (%10.88) β-caryophyllene (%8.21)	Kayıt Yok
	Çin	β-citronellol (%85.3) Citronellol acetate (%5.2) β-citronellal (%1.2)	%0.7
	Çin	Thymol (%42.9) Citronellol (%12.2) β-caryophyllene (%7.8) p-cymen-2-ol (%7.5)	%0.3
	Çin	β-Citronellol (%75.0) Geraniol (%7.7) Citronellol acetate (%3.4)	%0.3
	Çin	1,8-Cineole (%20.8) β-caryophyllene (%10.2) Eugenol methyl ether (%9.8) Citronellol (%8.8)	%0.3
	Çin	Caryophyllene oxide (%32.9) β-caryophyllene (%17.7) Citronellol (%10.2) Germacrene D (%9.8)	%0.1
	Kolombiya	Thymol (%21.5) p-cymene (%21.0) y-terpinene (%20.3)	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Yunanistan	Carvacrol (%63.03) Thymol (%15.09) p-cymene (%10.47) y-terpinene (%3.43)	Kayıt Yok
	Hindistan	Carvacrol (%35.02–62.81) p-cymene (%8.60–46.59) y-terpinene (%2.49–19.11)	%0.20–1.30
	İran	Carvacrol (%29.85) y-terpinene (%20.94) α-himachalene (%12.17) β-pinene (%11.67)	%0.8
	İran	Carvacrol (%23.54) y-terpinene (%20.50) Thymol (%15.41) Germacrene D-4-ol (%9.26)	%1.26
	İran	Carvacrol (%59.37) y-terpinene (%18.36) Cedrene (%6.65)	%1.66
	İran	Carvacrol (%67.09) y-terpinene (%7.71) humulene (%7.67)	%1.36
	İran	Carvacrol (%58.51) humulene (%11.46) y-terpinene (%9.56)	%0.93
	İtalya	Cavacrol (%65.94) p-cymene (%9.33) y-terpinene (%5.25) β-caryophyllene (%3.72)	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	İtalya	Carvacrol (%71.8) p-cymene (%11.6) β-caryophyllene (%2.7) linalool (%1.8)	Kayıt Yok
	Fas	Carvacrol (%34.0) y-terpinene (%21.6) p-cymene (%9.4) Thymol (%3.3)	%2.7
	Pakistan	β-Citronellol (%72.7) Thymol (%7.2) Citronellol acetate (%5.9)	%0.3
	Polonya	Carvacrol (%26.38–36.72) Thymol (%16.59–25.58) y-terpinene (%10.06–16.11) p-cymene (%6.09–6.76)	Kayıt Yok
	Portakiz	Carvacrol (%14.5) β-fenchyl alcohol (%12.8) y-terpinene (%11.6) Terpineol (%7.5)	Kayıt Yok
	Sırbistan	Sabinene (%10.2) Terpinen-4-ol (%9.3) 1,8-cineole (%5.8) y-terpinene (%5.6)	%0.17
	Sırbistan	Carvacrol (%64.5) p-cymene (%10.9) y-terpinene (%10.8) Thymol (%3.5)	%1.5

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Sırbistan	Carvacrol (%64.5) p-cymene (%10.9) y-terpinene (%10.8) Thymol (%3.5)	Kayıt Yok
	Sırbistan	Carvacrol (%77.6) p-cymene (%5.14) Trans-β-caryophyllene (%2.45) Linalool (%2.44)	Kayıt Yok
	İspanya	Terpinen-4-ol (%24.57) Carvacrol (%16.09) Thymol (%9.03) y-terpinene (%6.20)	516 mg/bitki
	Amarika	Carvacrol (%17.9–81.8) p-cymene (%2.62–25.7) y-terpinene (%2.5–19.4) β-myrcene (%0.58–6.06)	%0.114–2.312
O. vulgare L. ssp. glandulosum	Cezayir	Thymol (%34.2) Carvacrol (%30.5) y-terpinene (%13.4) p-cymene (%6.6)	%2.0 – 2.2
	Cezayir	Thymol (%51.1) y-terpinene (%14.5) p-cymene (%7.5) Carvacrol (%6.8)	%2.0 – 2.2
	Tunus	p-Cymene (%35.7–46.3) Thymol (%18.4–39.1) y-terpinene (%11.7–24.2) Carvacrol (%1.7–15.1)	%2.5–4.6

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Tunus	Thymol (%31.8–46.1) p-cymene (%11.5–35.7) y-terpinene (%24.0–27.1) α-terpinene (%1.9–3.2)	%4.3–5.8
	Tunus	Carvacrol (%65.01) p-cymene (%9.00) y-terpinene (%4.25) Borneol (%3.19)	%1.87-3.42
O. vulgare L. ssp. gracile	İran	Carvacrol (%46.86) y-terpinene (%14.16) p-cymene (%11.63) Carvacrol methyl ether (%5.97)	%2.0
	Türkiye	Thymol (%7.02–40.04) Carvacrol (%8.21–33.21) y-terpinene (%9.15–27.82) p-cymene (%3.07–23.52)	%0.25–0.50
O. vulgare L. ssp. hirtum	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%22.9) Thymol (%18.6) y-terpinene (%7.1) Terpinen-4-ol (%6.2)	Kayıt Yok
	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%17.9) Thymol (%17.1) Terpinen-4-ol (%9.5) y-terpinene (%8.0)	Kayıt Yok

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	Arjantin	y-Terpinene (%13.7) Terpinen-4-ol (%11.2) y-terpinene (%9.9) Trans-sabinene hydrate (%8.3)	Kayıt Yok
	Kolombiya	Carvacrol (%90.3) Thymol (%3.5) p-cymene (%2.7) y-terpinene (%1.0)	Kayıt Yok
	Yunanistan	Carvacrol (%70.38) p-cymene (%8.17) y-terpinene (%7.78) β-myrcene (%2.37)	Kayıt Yok
	Yunanistan	Carvacrol (%90.29) y-terpinene (%3.09) p-cymene (%2.25) β-caryophyllene (%1.81)	%7.7
	Yunanistan	Carvacrol (%81.28–91.21) p-cymene (%1.52–6.40) y-terpinene (%0.49–4.01) β-caryophyllene (%0.94–2.03)	%4.71–5.00
	Yunanistan	Carvacrol (%56.46–82.70) p-cymene (%9.54–21.40) β-disavolene (%1.09–3.06)	%0.63–4.25
	Macaristan	Carvacrol (%82.75) p-cymene (%6.58) y-terpinene (%5.78)	%4.46

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	İtalya	Terpinen-4-ol (%13.27–17.51) y-terpinene (%14.58–14.95) Carvacrol (%12.31–14.58) p-cymene (%8.43–10.07)	%0.063–0.165
	İtalya	Thymol (%37.9) y-terpinene (%24.5) p-cymene (%16.3) α-terpinene (%4.3)	Kayıt Yok
	İtalya	y-Terpinene (%29.41) Thymol (%26.86) p-cymene (%8.20) α-terpinene (%5.93)	%5.4
	İtalya	Thymol (%37.22) y-terpinene (%26.37) p-cymene (%6.83) α-terpinene (%4.02)	%2.4
	İtalya	Thymol (%36.46) y-terpinene (%20.77) p-cymene (%8.31) Carvacrol methyl ether (%6.21)	%3.6
	İtalya	Thymol (%30.25) y-terpinene (%25.89) p-cymene (%7.62) Carvacrol methyl ether (%5.63)	%4.2

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	İtalya	Thymol y carvacrol (%65.3–84.7) Linalool (%0.1–2.6) Carvacrol methyl ether (%0.4–1.9)	%1.0–2.7
	İtalya	Thymol (%18.16–56.37) y-terpinene (%12.70–32.70) p-cymene (%8.22–10.30)	%1.7–4.5
	Litvanya	Carvacrol (%72.4–88.2) y-terpinene (%4.1–8.7) p-cymene (%2.0–3.2) β-caryophyllene (%0.9–3.0)	Kayıt Yok
	Sırbistan	Carvacrol (%74.65) p-cymene (%5.87) y-terpinene (%5.04) Trans-β-caryophyllene (%1.76)	%1.34
	Türkiye	Linalool (%96.31) β-caryophyllene (%1.27)	%7.31
	Türkiye	Carvacrol (%80.09) y-terpinene (%12.01) p-cymene (%1.72) α-terpinene (%1.58)	%5.9±0.02
O. vulgare L. ssp. virens	Arjantin	trans-Sabinene hydrate (%27.77) Thymol (%26.1) y-terpinene (%5.9) α-terpinene (%4.17)	2.17 0.32 mg/g Kuru Ağırlık

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	İran	(Z)-α-Bisabolene (%39.17) Sabinene (%11.52) Carvacrol (%5.23) β-bisabolene (%4.24)	%0.3
	Portekiz	α-Terpineol (%0.1–65.1) y-terpinene (%0.3–34.25) Linalool (%2.0–27.4) Carvacrol (%0–34.2) E-caryophyllene (%2.4–11.0)	%0.8–1.2
O. vulgare L. ssp. vulgare	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%23.4–27.2) Thymol (%14.4–17.2) Terpinen-4-ol (%7.8–11.0) y -terpinene (%7.3–9.8)	Kayıt Yok
	Arjantin	Trans-Sabinene hydrate (%32.47) Thymol (%20.5) y-terpinene (%15.47) Terpinen-4-ol (%5.03)	1.97 ± 0.22 mg/g Kuru Ağırlık
	İran	Thymol (%37.13) y-terpinene (%9.67) Carvacrol (%9.57) Carvacrol methyl ether (%6.88)	%0.5
	İtalya	Spathulenol (%18.6) Carvacrol (%11.7) β-caryophyllene (%8.8) Terpinen-4-ol (%5.6)	%0.13

Tablo 2.2 2017 yılında yapılan bir çalışmaya göre bazı Oregano türlerinin ana bileşiklerinin miktarlarının verildiği tablosu (devamı)

	İtalya	Carvacrol (%14.3) Spathulenol (%9.4) β-caryophyllene (%5.3) Terpinen-4-ol (%5.0)	%0.18
	Litvanya	Sabinene (%6.6–28.2) β-caryophyllene (%7.3–15.5) E-β-ocimene (%4.4–15.1) allo-ocimene (%7.7–12.1)	Kayıt Yok
	Türkiye	Thymol (%58.31) Carvacrol (%16.11) p-cymene (%13.45) y-terpinene (4.64%)	%5.09
	Polonya	Sabinene (%10.85–25.46) Z-(β)-ocimene (%9.10–16.33) ermacrene D (%9.36–15.34) E-caryophyllene (%9.38–12.87)	%0.66–0.86

Herhangi bir *Oregano* türünde bulunan ana bileşiklerin 2012 yılında yapılan bir çalışmada *Origanum hypericifolium* O. Schwarz & P. H. Davis'da, p-cymeneden 34.33 g/100 g , carvacrolden 21.76 g/100 g , thymolden 19.54 g/100 g, γ-terpineneden 13.91 g/100 g olarak belirlenmiştir (Ocak vd., 2012).

Tablo 2.3 *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'un GS/MS analizine göre içeriklerinin yüzdelik olarak gösterildiği tablo (Ocak vd., 2012).

İçerik	İçeriğin Miktarı (%)
α-Pinene	1.83
Camphene	0.17
β-Pinene	0.09
Myrecene	0.90
α-Terpinene	1.75
γ-Terpinene	13.91
p-Cymene	34.33
1-Octen-3-ol	1.78
Terpineol	0.35
Caryophyllene	1.07
Terpinene-4-ol	0.76
Borneol	0.52
Spathulenol	0.11
Thymol	19.54
Carvacrol	21.76
Bilinmeyen içerk	1.13

2.4. *Coffea Arabica* L.

Kahve, günde yaklaşık 2 milyar fincan tüketilip, sudan sonra dünyadaki en popüler ikinci içecektir. Düşük maliyeti ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle, hemen hemen tüm ülkelerde ve nüfusun tüm sosyal sınıfları tarafından farklı hazırlanma çeşitleri ile tüketilmektedir. Basit bir görünüm sergileyen bir fincan kahve aslında yüzlerce molekülü içeren bileşimi ve konsantrasyonu çok değişen ve kahve ağacının kökeni veya metabolizması gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösteren karmaşık bir karışımdır. Aşırı kahve tüketimi zararlı olabilse de, bu lezzetli karışımda bulunan birçok molekül antikanser özellikleri sergilemektedir (Gaascht vd., 2015).



Şekil 2.7 Kavrulmuş kahve çekirdekleri (wiki, 2005)

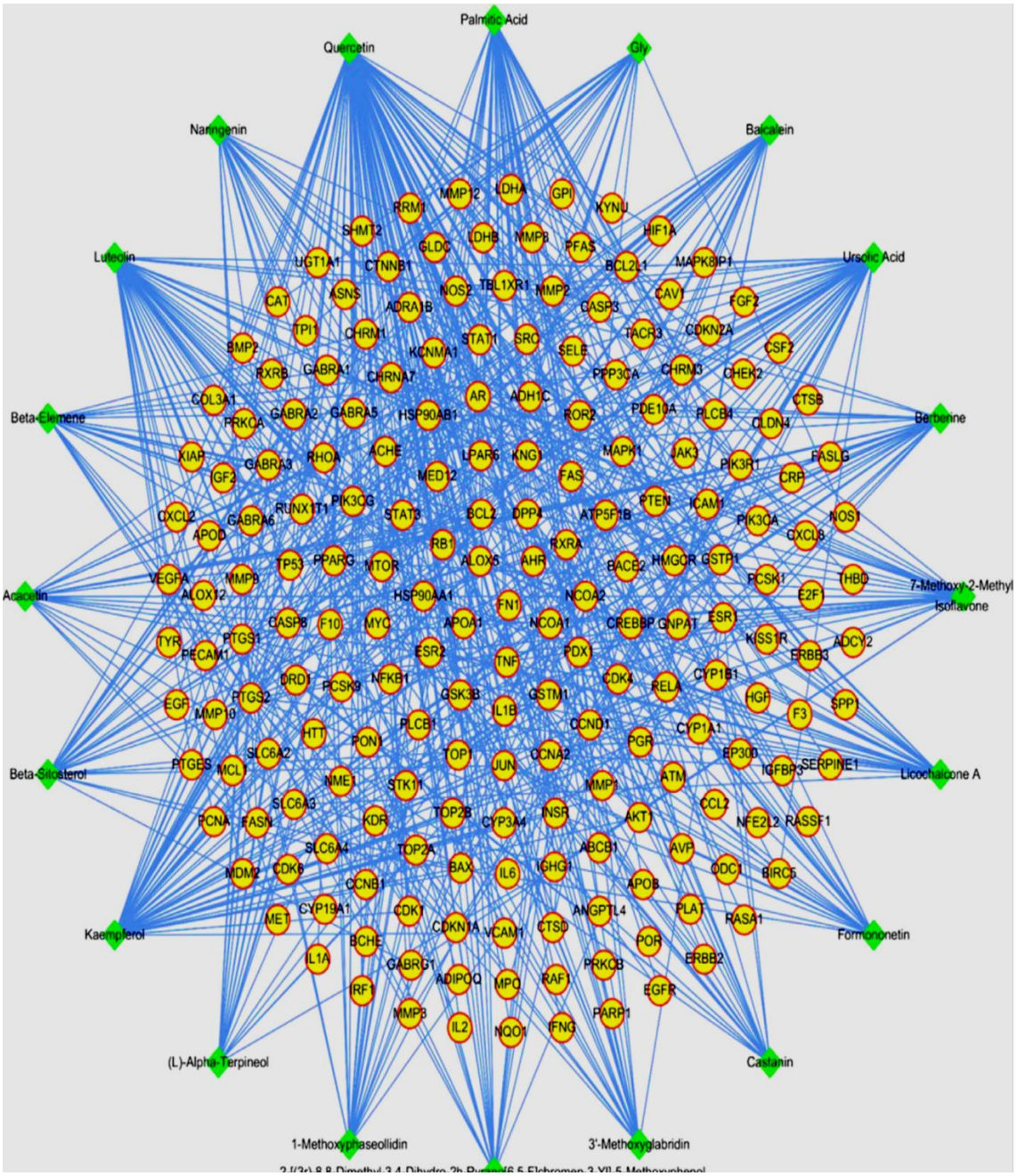
Epidemiyolojik çalışmalardan birinde kahve tüketimi ile kolorektal kanserler gibi belirli kanser türlerine yakalanma riski arasında ters bir ilişki bulmuştur. Hayvan deneylerinin verileri, *Coffea arabica* L.'nın kimyasal yapısının bu önleyici etkileri doğrular nitelikte olduğunu desteklemektedir. Bu faydalı etkilerden sorumlu olabilecek kahve bileşenlerini tanımlamak için önemli araştırmalar yapılmıştır. *Coffea arabica* L.'daki kafestol ve kahweol gibi çeşitli bileşenler kanserojenlerin genotoksisitesinin azalmasına neden olan geniş bir biyokimyasal etki serisini tetiklediğini göstermektedir (Calvin vd., 2002). Bunun yanında *Coffea arabica* L.'nın tüketiminin diğer bir ana bileşeni olan kafein etkisi ile bazal hücre karsinoması gelişimine karşı orta düzeyde koruyucu bir etki yaptığı bilinmektedir

(Caini vd., 2017). Epidemiyolojik araştırmalarda, kahve tüketiminin hepatoselüler karsinoma ve kolon kanseri ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. *Coffea arabica* L., çiğ veya kavurulmuş olması ve hazırlama çeşitlerine bağlı olarak konsantrasyonu değişebilen antioksidan etkinliğe sahip birçok bileşik içermektedir. Kavurma esnasında kısmen kaybolan fenolik bileşiklerin yanı sıra kavurma sırasında çoğunlukla açığa çıkan melanoidinler hayvan modellerindeki ve hücre kültürü sistemlerindeki çalışmalar antikarsinojenik etkilere sahip olabilecek diterpenleri sentezlediği bulunmuştur. Hem kafestol hem de kahweol, çeşitli kanserojenlerin etkisinin azalmasına neden olan geniş bir biyokimyasal etki serisini tetiklemektedir (Bravi vd., 2008). Başka bir çalışmada elde edilen bulgular, *Coffea arabica* L.'daki kafeinin postmenopozdaki kadınlar için meme kanseri riski ile zayıf şekilde ilişkili olabileceğini ve BRCA1 mutasyon taşıyıcıları arasında kahve ile meme kanseri riski arasında kuvvetli ve anlamlı bir ilişki bulunduğunu ortaya koymaktadır (Jiang vd., 2013).

2.5. A549

A549 hücre hattı, 1973 yılında sürekli çalışılabilecek bir hücre hattı soyu yaratmak için yapılan bir çalışmada akciğer adenokarsinomasından izole edilmiştir (Cooper, 2012). Bu karaciğer karsinoma hücre hattı A549 bir pulmoner adenokarsinomdan izole edilmiş olup bu türün temsilcisi olarak nitelendirilen bu hücre hattı yaklaşık 40 yıldır solunum yolu kanserlerinin araştırmalarının dayanak noktası olmaktadır (Cooper, 2016). Çin halk tıbbı çok eski zamanlara dayanmakta olup bazı inanışlarca hala kullanılmaktadır. Günümüzde tıbbın standart tedavilerine ek olarak eski zamanlarda kıllanılan bitkisel tedavilerinde ek faydaları olduğu kabul edilmeye başlanmıştır. Hâlihazırda klinik kullanımda olan Çin'e özgü bitkisel ilaçların (CHM'ler), doğal bileşikleri ve bunların antikanser özelliklerine sahip potansiyel kimyasal türevlerinin kaynağı incelenmektedir. Uzun zamandır kullanılmakta olan bu bitkiler (Bei Mu (BM), Jie-Geng (JG) ve Mai – Men – Dong – Tang (MMDT)) sağkalım oranını iyileştiren akciğer kanseri hastaları için reçete edilen önemli ve hâlihazırda tedavi amaçlı kullanılan ürünlerdir. Lin ve çalışma arkadaşlarının 2019'da yaptığı bir çalışmada hücre içi sinyal iletişiminin incelenmesi, bu üç bitkiden elde edilen bileşenlerin hücresel apoptoz, anti-apoptoz

ve hücre döngüsü ile ilgili proteinleri hedef alabileceğini göstermektedir. Ayrıca, S ve G2 / M fazlarında hücre döngüsü durması ve A549 hücrelerinde otofajiye gitmesine neden oldukları tespit edilmiştir. Araştırmacılar bileşenlerin akciğer kanseri üzerindeki farmakolojik mekanizmaları, apoptoz, otofaji, hücre döngüsü ilerlemesi ve hücre çoğalması üzerindeki modülatör etkileri ile güçlü bir şekilde bağlantılı olabileceğini düşünmektedirler (Lin, 2019).

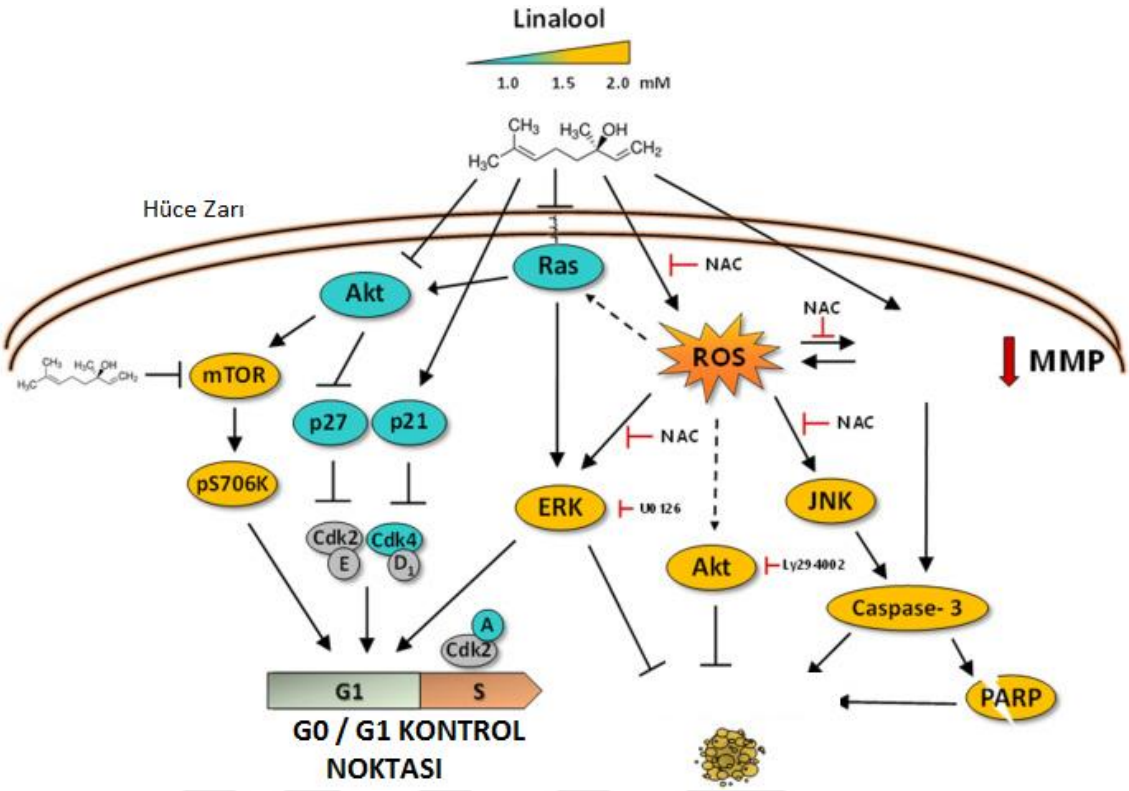


Şekil 2.8 Hücre içi sinyalizasyonu ile bitklerden elde edilen kimyasalların ilişkisi. Kırmızı işaretli sarı yuvarlaklar akciğer kanseri belirteçleridir. Yeşil kutular etkileşimi incelenen kimyasallardır. Mavi çigiler hangi kimyasalın hangi belirteçle etkileştiğini göstermektedir (Lin, 2019).

2.6. HepG2

Hepatoselüler karsinoma (HCC), dünya çapında kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada olan agrasif ve en yaygın karaciğer kanseri türlerinden biridir. Bununla birlikte, HCC'nin erken bir aşamada teşhisi zordur. Shen ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmada, geraniol ve lupeol olmak üzere iki doğal ürünün, hepatokarsinom hücre hattı üzerinde antiproliferatif ve proapoptotik etkileri incelemişler. Düşük Bcl-2 ekspresyon düzeyi ve geraniol ve lupeol varlığında BAX ve kaspazın yukarı regülasyonunun olduğunu kanıtlamışlar. Ayrıca, geraniol veya lupeol, hücre dışı sinyalleşmeler tarafından düzenlenen protein kinazı, P38 fosforilasyon seviyesini değiştirerek, mitojen ile aktifleştirilmiş protein kinaz sinyalleşmesine dahil olduğunu gösterir. Bu çalışma, geraniol ve lupeolün hepatokarsinoma hücre büyümesi ve apoptoz üzerindeki etkisini destekleyen, bu iki doğal ürünün anti-karaciğer kanseri tedavisindeki potansiyel uygulamasını gösteren doğrudan kanıtlar sağlamıştır (Shen, 2018).

Yapılan bir çalışmada, antikanser aktivitesine sahip bitki kökenli bir monoterpen olan linaloolün etki mekanizmalarını anlamak için HepG2 hücrelerinde linaloolun antikanser etki mekanizmalarını aydınlatmak istemişler. Linalool doza bağımlı olarak, G0 / G1 hücre döngüsü durmasının Cdk4 ve siklin A ekspesyonunu azalmasın, p21 ve p27 yukarı ekspresyonunun artmasını ve apoptozu, kaspaz-3 aktivasyonu, PARP ayrılması ve DNA parçalanması ile karakterize edilen hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini tespit etmişler. Düşük linalool konsantrasyonları zara bağlı Ras ve Akt aktivitesini azaltırken, yüksek miktarlarda MAPK aktivasyonu ve Akt fosforilasyonu ile ilişkili olarak mTOR inhibisyonu ve ROS oluşumu tetiklemektedir. Linalool ERK ve JNK aktivasyonunu önlediği tespit edilmiş. Ayrıca, spesifik ERK ve Akt fosforilasyon inhibitörleri, linalool anti-kanser aktivitesini kuvvetlendirdiği gözlemlenmektedir (Rodenak-Kladniew, 2018).

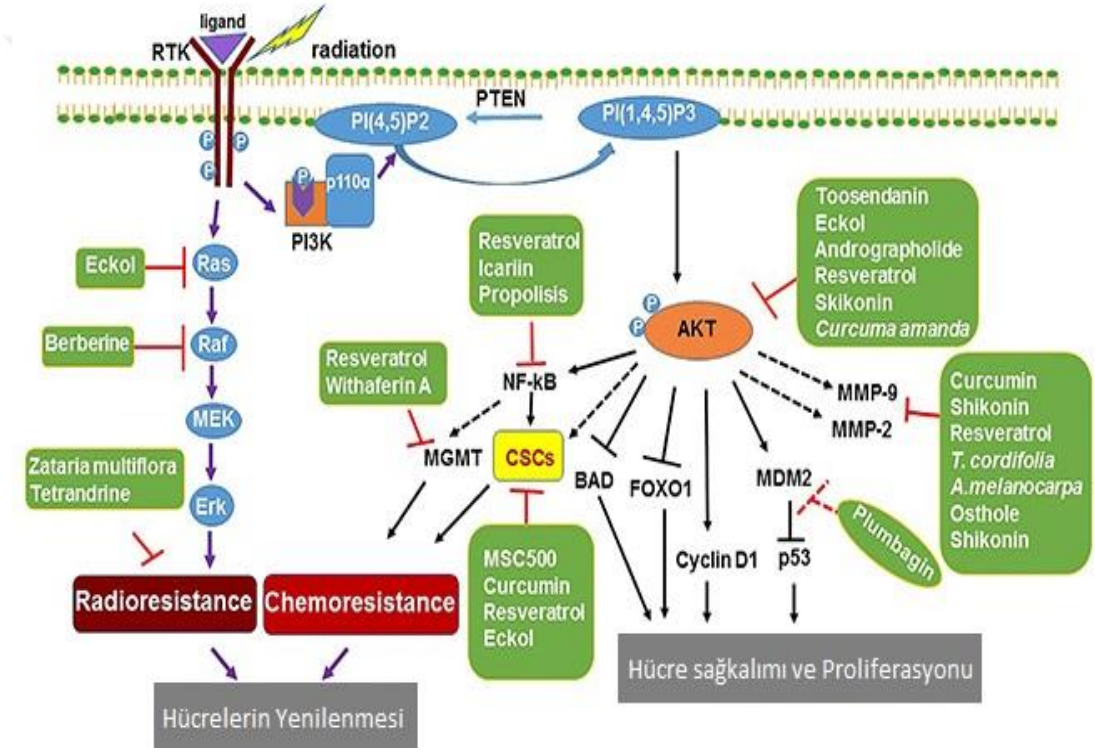


Şekil 2.9 Linalool kaynaklı HepG2 büyüme inhibisyonunda rol oynayan etki mekanizmaları model. Linalool, 1.0 mM'den Ras ve Akt inhibisyonu ile p27 ekspresyonunda artış, Cdk4 ve siklin A anlatımında azalışa yol açan ve ayrıca p21 seviyelerini artıran G0 / G1 hücre döngüsü durmasını teşvik eder. 1.5 mM'den itibaren, Ras, MAPK aktivasyonunu, MMP depolarizasyonunu ve buna bağlı olarak kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP yoluyla apoptozu teşvik eden, 2.0 mM'de artan ROS oluşumunu indükler. Hücresel strese cevap olarak, ERK ve Akt, inhibisyonları HepG2 hücre canlılığı kaybıyla sonuçlandığından anti-apoptotik ve hayatta kalma yanlısı rolleri sergileyen hale getirilirler. Ayrıca, linalool 2.0 mM, G0 / G1 tutuklanmasına katkıda bulunan mTOR / p70S6K'yı da inhibe eder (Rodenak-Kladniew, 2018).

2.7. C6

Glioblastoma (GBM), cerrahi müdahale, radyoterapi ve bunlara eşlik eden kemoterapi de dahil olmak üzere çoklu bir tedavi terapisi müdahalelerine rağmen, ortalamaya bakıldığında sağkalım oranı çok düşük olan en agresif kötü huylu tümörlerden biridir. Hedefe yönelik terapi, *in vitro* monolayer kültürlerde ümit verici görünse de kan beyin bariyeri (BBB) sebebi ile ilaçların zayıf penetrasyonundan dolayı preklinik ve klinik çalışmaların sonuçlarının bekleildiği gibi iyi olmadığı gözlemlenmiştir. Klasik kemoterapilerin ve hedeflenen ilaçların yetersizliğinden dolayı, daha az toksik madde kullanımına odaklanan araştırma

çalışmaları artmaktadır. İlginçtir ki, çoklu doğal bileşiklerin antitümör ve apoptotik etkiler göstermiştir. 2018 Nisan ayında yayımlanan bir derlemede, kan beyin bariyeri geçirgenliğini modüle etmek, hücre ölümünü indüklemek, CSC'leri ortadan kaldırmak ve GBM'in ilaçlara karşı duyarlılığını arttırmak için kullanılan doğal ürünler veya ürün analogları hakkındaki güncel literatürü çok açık bir şekide özetlemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; GBM'deki doğal ürünleri kullanarak daha fazla çalışmayı desteklemek için çok sayıda klinik öncesi veri bulmuşlardır. Hastalar için sonuçları iyileştirmek, bu konuyla ilgilenenleri alternatif tedaviler araştırmaya yöneltmektedir. Yapılan çalışmalarda doğal ürünlerin tedavilere ek olarak kullanılabileceği kanısına varmışlardır (Vengoji, 2018).



Şekil 2.10 GBM'nin doğal ürün bazlı duyarlılık mekanizması. RTK'lar, GBM hücre proliferasyonunu arttırmak için Ras / Raf / MAPK sinyalleşme kaskadını aktive eder. RTK / PI3K / AKT sinyal yolu, mitokondriden sitokrom-C salınımını inhibe etmek için pro-apoptotik protein BAD'yi fosforile ederek apoptozu inhibe eder. Ayrıca, FOXO1 transkripsiyon faktörünü fosforilasyon ile inaktive eder, bu da pro-apoptotik proteinlerin ve hücre sağkalımının inaktivasyonu ile sonuçlanır. Doğal ürünler resveratrol ve eckol hem Ras / Raf hem de PI3K / AKT sinyal yollarını zayıflatır, hücre proliferasyonunu inhibe eder, apoptozu indükler ve ayrıca GBM CSC'lerini yok eder, CSC popülasyonunu azaltır ve ABC taşıyıcılarının ifadesini düşürür. Resveratrol ve Withaferin A, MGMT ifadesini anlatımını düzenleyerek TMZ hassasiyetini arttırır (Vengoji, 2018).

2.9. Roscovitine

IUPEC adlandırmasına göre adı 2-(R)-(1-Ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine olan ve seliciclib veya CYC202 olarak da bilinen roscovitive halihazırda kullanılan bir kemotörapatik bir ajandır. Hücre döngüsündeki büyüme fazını veya durumunu değiştiren CDK2, CDK7 ve CDK9'u içeren enzim hedeflerini inhibe eden farmakolojik sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri ailesinde deneysel bir ilaçtır. CDK2 ile kompleksin yapısı 1996 yılında belirlenmesinden sonra ortaya çıkan bu ilaç CDK2 / E, CDK2 / A, CDK7 ve CDK9'u inhibe eder (De Azevedo vd., 1997). Roscovitine, küçük hücreli akciğer kanseri, Cushing hastalığı, lösemi, HIV enfeksiyonu, Parkinson hastalığı, herpes simpleks enfeksiyonu, kistik fibroz ve kronik inflamasyon bozukluklarının tedavisi araştırmalarında kullanılmaktadır (Noel vd., 2006). Bu ilacın kanserli hücrelerin apoptoza gitmesini tetiklediği bulunmuştur. Roscovitine ayrıca multipl miyelom dahil B hücreli lenfomalar için klinik deneylerdedir. Seliciclib'in RNA polimeraz II'ye bağlı transkripsiyonu ve MCL1 proteininin aşağı regülasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (MacCallum vd., 2005) (Noopur vd., 2005). Roscovitine ayrıca olası bir antiviral ajandır. HIV ile enfekte olmuş hücrelerin ölümüne neden olur ve herpes simpleks virüsünün çoğalmasını önler (Sadaie vd., 2004)(Pumfery vd., 2006) (Agbottah vd., 2005) (Schang vd., 2000) (Diwan vd., 2004). Roscovitine nötrofil granülositlerinde apoptozu indüklediği *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bu mekanizmanın *in vivo* olarak güvenli, güvenilir ve verimli olduğu ortaya çıkarsa, ilaç kistik fibroz ve artrit gibi kronik enflamasyon hastalıklarının tedavisini iyileştirebilir. Bunlar genellikle ciddi yan etkileri olan glukokortikoidlerle tedavi edilir (Rossi vd., 2006).

3
Materyal Method

2.8. Deneysel Süreçte Kullanılan Malzemeler

Aşşağıdaki tabloda deneyler süresince kullanılan malzemelerin listesi bulunmaktadır.

Tablo 3.1 Deneysel süreçte kullanılan malzemeler

Malzeme	**Tehmin Edildiği Yer**
Clavenger	İldam
Balon joje	Isolab
Isıtıcı	Tops
Kavrulmuş *Coffea Arabica* L.	Yerel market
Kavrulmamış *Coffea Arabica* L.	Yerel market
***Origanum Hypericifolium* Schwarz Et P. H. Davis**	Laboratuvarda stok olarak bulunan ürün kullanıldı
10 µl, 100 µl, 1000 µl mikropipet	Capp
10 µl, 100 µl, 1000 µl pipet uçları	Capp
+4 Buzdolabı	Bosch
15 ml falkon	TPP

Tablo 3.1 Deneysel süreçte kullanılan malzemeler tablosu (devamı)

50 ml falkon	**TPP**
T25'lik flask	TPP
T75'lik flask	TPP
200 µl çok kanallı pipet	Capp
Çok kanallı pipet rezervuarı	Capp
CO_2'li İnkübatör	Thermo Scientific
Laminar Flow	MSC-ADVANTAGE
96 kuyucuklu hücre plağı	Isolab
6 kuyucuklu hücre plağı	Isolab
Işık Mikroskobu	Olympus
Hemasitometre	Isolab
Santrifüj	Isolab
Steril şırınga	Isolab
Steril filtre	Isolab
Tüp standı	Isolab
DMEM	Pann
DMEM F12	Pann
FBS	Pann

Tablo 3.1 Deneysel süreçte kullanılan malzemeler tablosu (devamı)

PBS	**Pann**
Etil alkol	Sigma
Tripsin-EDTA	Pann
DMSO	Sigma
Penisilin	Sigma
MTT tuzu	Sigma
Roscovitin	Rosch
HepG2	ATCC
A549	ATCC
C6	ATCC

Kullanılan Hücre Hatları

Tüm hücre hatlarımız ATCC'den temin edimiştir. HepG2 hücre hattı, A549 hücre hattı, C6 glioma hücre hatları kullanılmıştır.

Kullanllan Besiyerleri :

HepG2 için DMEM

A549, C6 için F-12 DMEM

Besiyeri Hazırlama:

Besiyerinde %10 sığır fetal serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin ve % 5 CO2 bulunmaktadır, (500 m1 total besiyeri içinde 50 ml sığır fetal serumu ve 5ml antibiyotik)

MTT Solusyonunun Hazırlanması:

Her kuyuya 20 ul çözelti konulur.

MTT tuzunun moleküler ağırlığı:414,32g/mol .

M=n/V formülü uygulanır.

Her kuyuya 20 ul çarpı 100 kuyudan 2000ul. Bu bağlamda 96 kuyulu plaka için 2ml MTT çözeltisine ihtiyaç vardır. 96 kuyucuklu plaka için 20x2=40ml çözelti hazırlamak için 40 ml PBS'de MTT tuzu çözdürülmelidir.

3.2. Uçucu Yağ Eldesi

Tüm bitkilerimizden uçucu yağ elde edilmesinde hidrodistilasyon yöntemi kullanılmıştır. Uçucu yağı elde edilecek bitki küçük parçalara ayrılıp balona konulur. Bitki parçalarının üzerine 1 litre distile su konularak Clavenger Apareye bağlanmıştır. Geri soğutucu olarak Clavenger apareye su devir daim cihazı bağlanmıştır. Her 100 gr bitki için 3 saat distilasyon işlemi yapılmıştır. İşlem sonunda yağın miktarı aparey üzerinde milimetre cinsinden ölçülmüştür. Her bitki değişiminde sistem 5 saat steril edilmiştir (Baydar, 2005)(Daşdemir ve Güngör, 2008).

3.3. Maserasyon

Çözücü maddeler ile bitki içeriğindeki yağ asitilerinin çekilip alınması işlemidr. Belli bir miktar bitkiyi kapaklı kaba koyup üzerini 5 cm geçecek şekilde hegzan eklenir. Gün içinde belirli aralıklarla çalkalandı. 3 gün boyunca bu işlem devam ettirilir. 3 günün sonunda Rottarry'de hegzane uzaklaştırılır. Elde edilen ekstrakt 1 hafta ile 10 gün arasında kapağı açık şekilde bekletilir. Bu şekilde istenmeyen tüm uçucu gazlardan kurtulmuş olunur. Yüz gram kavrulmuş ve yüz gram kavrulmamış kahve çekirdegini kırılmalarını sağlayacak şekilde ezdik. Normal şartlar altında kullandığımız büyük cam şişeler yerine daha küçük kimyasal şişelerini kullanarak hegzan bitkiyi 1 cm kadar geçecek şekide (yaklaşık 250ml) ekledik. Ses dalgaları ile yağ asitlerinin hegzana daha hızlı şekilde çekilmesini sağlayacakolan su banyosunda bir süre beklettikten sonra gün içinde birkaç saat arayla şişeleri çalkaladık. Gün sonunda hegzanı süzüp yerine yeni hegzanın koyduk. Bir sonraki gün tekrar hegzanı süzdük. Hocamızın laboratuvarındaki Rotary ile

ekstraktımızdaki fazla hegzandan kulturduk. Ardından elde ettiğimiz ekstraktların falkonları aktardık. Falkonlara aktarırken cam yüzeyde kalan ekstraktları hegzan ile aldığımız için falkonun içinde bir miktar hegzan kalmış oldu. Bu kalan hegzanı Azot musluğu altında tutarak uçmasını sağladık. Bu şekilde Elimizde saf şekilde bitki ekstraktımız kalmış oldu (Kelebek vd., 2010) (Alkan vd., 2015) (Ay vd., 2006).

3.4. Yapılan Hesaplamalar

MTT Tuzu için;

Her kuyucuğa 20 ul çözelti eklenir.

MTT tuzunun moleküler ağırlığı 414,32g/mol.

$M=\frac{m/NA}{V}$ formulü ile M=n/V formülünü kullanarak gerekli hesaplamaları yaptık.

96 kuyulu plakların her kuyucuğu 20 ulx100 kuyucuktan hesapladığımızda 2000ul olarak hesapladığımızda; 96 kuyulu plak için 2ml MTT çözeltisine ihtiyacımız olduğunu buluruz. 20 adet 96 kuyulu plaka için 20x2=40ml çözelti hazırlayabilmemiz için 40 ml PBS'de MTT tuzu çözdürülmelidir.

Yaptığımız deneyler için 2 molar 2 ml stok çözelti hazırlayabilmek için yaptığımız işlemler;

Roscovitin moleküler ağırlığı: 354,45g/mol

$M=\frac{m/NA}{V}$ $2=\frac{m/354,45}{1,4178}$

= 1,4178 miligram Roskovitin

2ml	1,4178mg
X	1mg

X= 0,7089ml DMSO'da 1 mg roskovitinin çözünmesi gerekir.

10uM Roskovitin için;

2000uM	708ul DMSO'da çözünüyorsa
10uM	X

X= 3,545ul

HepG2 hücreleri için, 10uM ilaç uygulandı.

3.45x15 kuyucuk=52,5 ul 3ml besiyerine eklendi.

A549 hücreleri için, 20uM ilaç uygulandı.

3,545x2= 7ul

7ul x 15 kuyucuk= 105 ul 3ml besiyeri eklenir.

C6 hücrelerine 30uM ilaç uygulandı.

3.545x 15= 155,25ul 3 ml besiyeri eklenir.

Uçucu yağ konsantrasyonlarının ayarlanması

Origanum bitkisinden 1,1821 g yağ elde edildi.

Uçucu yağın üzerine 25 ml DMSO ve 50 ml ddH2O eklenilerek çözelti oluşturuldu.

10mg uçucu yağı 10 ml DMSO'da çözdürmek için yapılan hesaplama;

10 000 ug 1000ul

1000ug X

X=100ul

5 farklı ilaç için istediğimiz konsantrasyonu uygulamamız şu şekilde olmuştur;

1000 ug konsantrasyon için ⟶ 100ul

500 ug konsantrasyon için ⟶ 50ul

250 ug konsantrasyon için ⟶ 25ul

100 ug konsantrasyon için ⟶ 10ul

10 ug konsantrasyon için ⟶ 1ul

Konsantrasyon ayarları yapılırken seri dilüsyonlar yapılarak ilerlenildi.

96'lık plakanın 1 kuyusuna 1000ug konsantrasyonunu sağlayarak ilaç uygulayabilmek için hazırladığımız çözeltimizden 100 ul aldık. 96'lık plakanın 10 kuyusuna 1000ug konsantrasyonunda ilaç uygulayabilmek için 1000ul hazırladığımız uçucu yağ çözeltisi ve 1000ul besiyeri ekledik. Stok olarak sayabileceğimiz 2000ul'lik çözelti hazırlamış olduk. Seri dilisyonlarımızı aşşağıdaki tabloda görebiliriz. Bunun yanında, 10 ug için 1:3 dilisyon

uyguladığımızı da belirtmek isterim. (Mamur, 2019) (Erdoğan vd., 2018) (Aktaş vd., 2018) (Arslan vd., 2014)

3.5. Hücre Kültürü

Sıvı azot içerisinde donmuş halde bulunan erken pasaj numarasına sahip hücrelerin kriyovialleri seçilir. Dondurulmuş hücreler hızlı bir şekilde eritilerek üzerlerine bir miktar DMEM besiyeri eklenir falkonda pipetaj yapılır. Falkonlar satrifüj edilir. Santrifüjün ardından süpernatant atılır. Böylece dondurma besiyerinde bulunan hücreler için toksik etkisi olan DMSO ortamdan uzaklaştırılmış olur. Pelletin üzaerine 4 ml besiyeriş eklenir ve pipetaj yapılır. Pipetajın ardından hücreler T25 flasklara aktarılır. T25 kaplarının ağızları kapalı CO_2 ayarlı (%5 CO_2) etüve kaldırılır. Bir gece etüvde bekletilen T25 flasklar ertesi gün mikroskopta tekrar incelenir.

Etüvde bulunan T25 flasklar laminar flow içinde dik konuma getirilir ve mikropipet yardımıyla T25 flasklardaki besiyeri çekilir ve atılır. Hücreleri yıkamak için T25 flasklara 1 ml PBS eklenir ve hücreler bu şekilde yıkanır. PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasının ardından ortama 1ml Tripsin-EDTA eklenir ve T25 flasklar etüve 2 dakika bekletilir. Hücreleri kaldırma işleminden sonra hücrelerin enzimatik reaksiyondan zarar görmemesi için T25'in içine 1 ml besiyeri konulur. Flasktaki hücreler falkonlara toplanır ve santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılır ve pelletin üzerine besiyeri eklenerek pipetaj yapılır. Hücre süspansiyonundan 10 µL alınır ve hemositometrede hücre sayımı gerçekleştirilir. 1ml'deki hücre sayısı bulunarak yeni T25 flaska eklenecek hücre sayısı için hesaplamalar yapılır (Obakan-Yerlikaya vd., 2017) (Çoker-Gürkan vd. 2015).

3.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin İçeriği

Hücre kültürlerinde çalışılan hücre hatlarının sanki vücut ortamındaymış gibi yaşatılması lazım. Eğer doğal ortamı sağlanmaz ise yaptığımız çalışmanın ileride hayvan deneklerde işe yaramasını ve çıkardığımız sonuçların doğal ortama uygun olmasını sağlayamayız. Bu yüzden özel hazırlanmış bazı besiyerleri ile çalışırız. Bunlar hücrelerin besin kaynağı olup büyürken stabil şekilde çalışılmasını sağlar. Bizim çalışmamızda kullandığımız DMEM besiyerinin içerikleri aşağıdaki

tabloda belirtildi. Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solüsyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir (Kusako, 1994).

3.7. MTT

Herhangi bir kemoterapötik ajanın hücre canlılığına etkisini anlamak için kolorimetrik bir testtir. Hücre denemelerinin hangi doz ve sürelerde yapılacağının belirleneceği yönremdir. Bir tetrazolyum tuzu, memeli hücre sağkalımı ve proliferasyonu için niceliksel bir kolorimetrik analiz geliştirmek için kullanılır. Test, ölü hücreleri değil yaşayan hücreleri tespit eder ve üretilen sinyal hücrelerin aktivasyon derecesine bağlıdır. Bu nedenle bu yöntem, sitotoksisite, proliferasyon veya aktivasyonu ölçmek için kullanılabilir. Sonuçlar, çoklu tarama spektrofotometresinde okunabilir ve yüksek derecede hassasiyet gösterebilir. Testte yıkama yüzeye yapışan hücrelerin yıkama esnasından kaldırılmaması için uygulama özenli bir şekilde yapılmalıdır. Hücrelere 2 ml soğuk 1X PBS eklenmesinin ardından kazıyıcı yardımı ile tüm hücre materyali kaldırılır ve 2 ml steril mikrofüj tüpüne aktarılır. En son kalan hücre topluluğunu aktarmak için 2 ml soğuk 1X PBS 6 kuyucuklu hücre petrisine konur ve kazıyıcı yardımıyla son hücreler de alınarak aynı 2 ml mikrofüj tüpünde tüm materyal toplanır. Hücreler maksimum hızda daha önce soğutulmuş santrifüjde 4°C'de 30 saniye süre ile çökertilir. Üst sıvı hücre pelletine zarar vermeyecek şekilde atıldıktan sonra, pellet üzerine 20-50 ml hücre lizis tamponu konulur ve buzda 15 dakika bekletilir. Maksimum hızda 4°C'de 15 dakika santrifüj edilir. Kolorimetrik tahlilin başlıca avantajları, hızı ve hassaslığı ve herhangi bir radyoizotop eksikliğidir. Proliferatif lenfokinleri, mitojen uyarılarını ve kompleman aracılı lizizi ölçmek için bu tahlil kullanılır (Mercier vd., 2005). T25 flaskı içerisinde bulunan hücreler kaldırıp ve

hemositometrede sayılır. Bu hücre sayısı 1000 ile çarpılır ve böylece 1 ml hücre süspansiyonunda kaç hücre olduğu hesaplanır. MTT analizi için her kuyucuğa yaklaşık 10.000 hücre konulur. Ana stoğumuz ona göre dilüe edilir. Dilüe edilen solüsyondan her kuyucuk için kaç µL ana stok çekileceği belirlenir ve kuyucuğa aktarılır. Ana stoğu 10 mM olan ilaç için M1xV1=M2xV2 formülü kullanılır. Hesaplaması yapılan hücreler 96 kuyucuklu petrilere 4 tekrarlı olacak şekilde ekilenir. Hücrelere 0-100 µM kontrol ilaç 24 saat boyunca uygulanır. Aynı anda bitkilerimizden elde ettiğimiz yağ asitleri ve uçucu yağlarda hücrelere uygulanır. 24 saat sonunda MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu bileşiklerin verdiği mor renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulur ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklere oranlama yapılarak bağıl sitotoksik düzey belirlenir. Sonuçlar üzerinden grafik çizilerek yorumlanır (Mosmann, 1983) (Franken vd., 2006).

Bu tez çalışmasında biz 96 kuyulu plaklara kuyu başına 6000 hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. Uçucu yağları ve Maserasyon sonucu elde ettiğimiz ekstraktları 5 farklı konsantrasyonda uyguladık. Bu konsantrasyonları yaptığımız hesaplamalar sonucu 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml olarak belirledik. 24 saat sonraki gözlemlemeler sonucunda hücrelerin plaklara yeterince yapışmış ve ilaç uygulamak için ideal bir durumda olduğu belirlendi. 24 saat konsantrasyonu ayarlanmış olan uçucu yağlara maruz bırakılan hücrelere MTT çözeltisi eklendi ve 4 saat bekletildi. 4 saat bekletildikten sonra hücrelerden besiyerleri uzaklaştırılıp her bir kuyuya 100 µl DMSO konularak 5 dk karanlık ortamda bekletildi. ELİSA reader'da 595 nm dalga boyunda okumaları gerçekleştirildi. Burdan elde ettiğimiz sonuçlar tablo haline getirilerek ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı(Mosmann, 1983) (Franken vd., 2006).

3.8. Hücre Sağkalım Testi

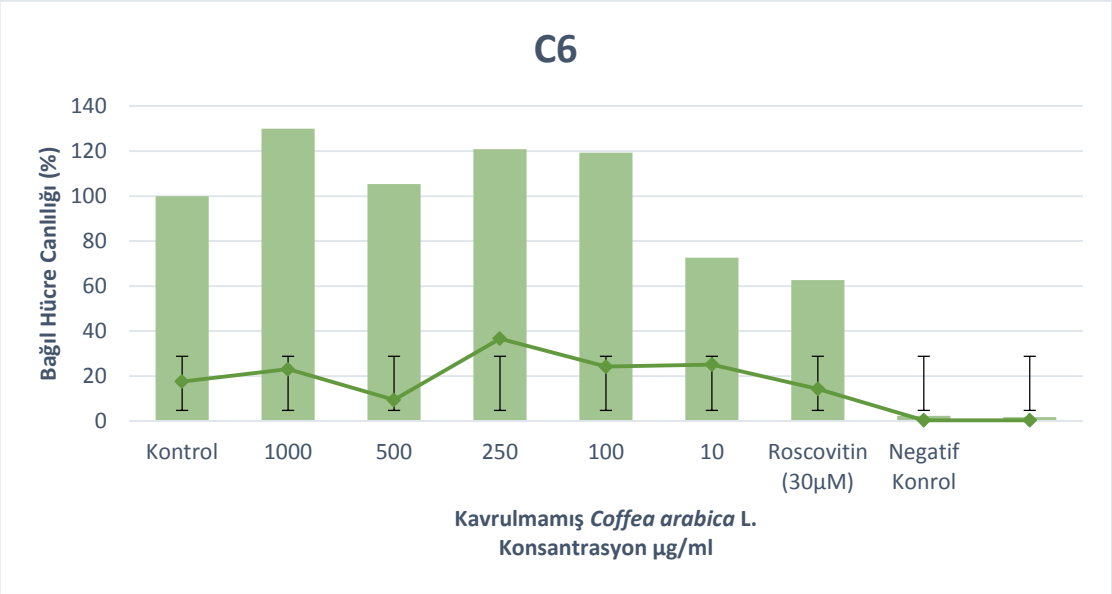
Etüvde bulunan T25 flasklar laminar flow içinde dik konuma getirilir ve mikropipet yardımıyla T25 flasklardaki besiyeri çekilir ve atılır. Hücreleri yıkamak T25 flasklara 1 ml PBS eklenir ve hücreler yıkanır. PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasının ardından ortama 1ml Tripsin-EDTA eklenir ve T25 flasklar etüve 2 dakika bekletilir. Hücreleri kaldırma işleminden sonra hücrelerin enzimatik reaksiyondan zarar görmemesi için T25'in içine 1 ml besiyeri konulur ve tripsin aktivitesi durdurulmuş olunur. Flasktaki hücreler falkonlara toplanır ve santrijüişlemi gerçekleştirilir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant atılır ve pelletin üzerine besiyeri eklenerek pipetaj yapılır. Hücre süspansiyonundan 10 µL alınır ve hemositometrede hücre sayımı gerçekleştirilir. 1ml'deki hücre sayısı bulunarak yeni T25 flaska eklenecek hücre sayısı için hesaplamalar yapılır (Obakan-Yerlikaya vd., 2017) (Çoker-Gürkan vd. 2015).

4
Sonuç ve Öneriler

2.9. Sonuçlar

Kahveler İçin;

Çizelge 4.1 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT grafiği.

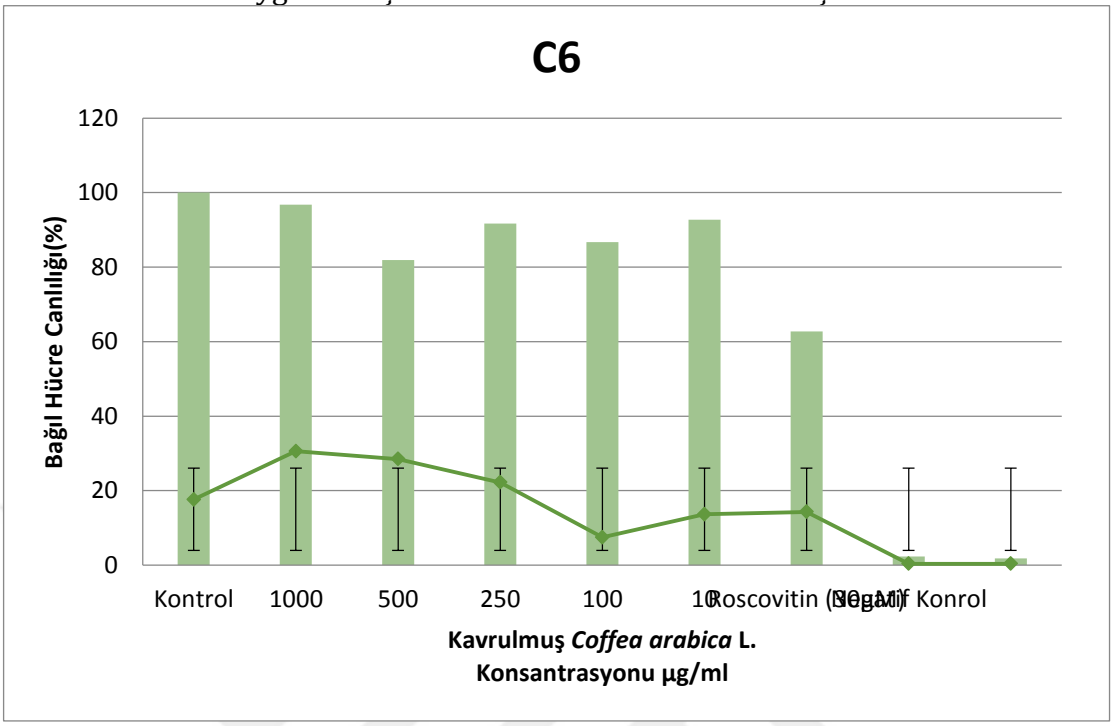


Tablo4.1 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	20.97

Roscovitine ile karşılaştırdığımız zaman kavrulmamış *Coffea arabica*'nın hücreler üzerinde öldürücü bir etkisi olmadığını hatta C6 glioma hücre hatları için canlılığı arttırdığını söyleyebiliriz. IC50 %50 canlılık oranlarına baktığımız zaman ise 20.97 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçları

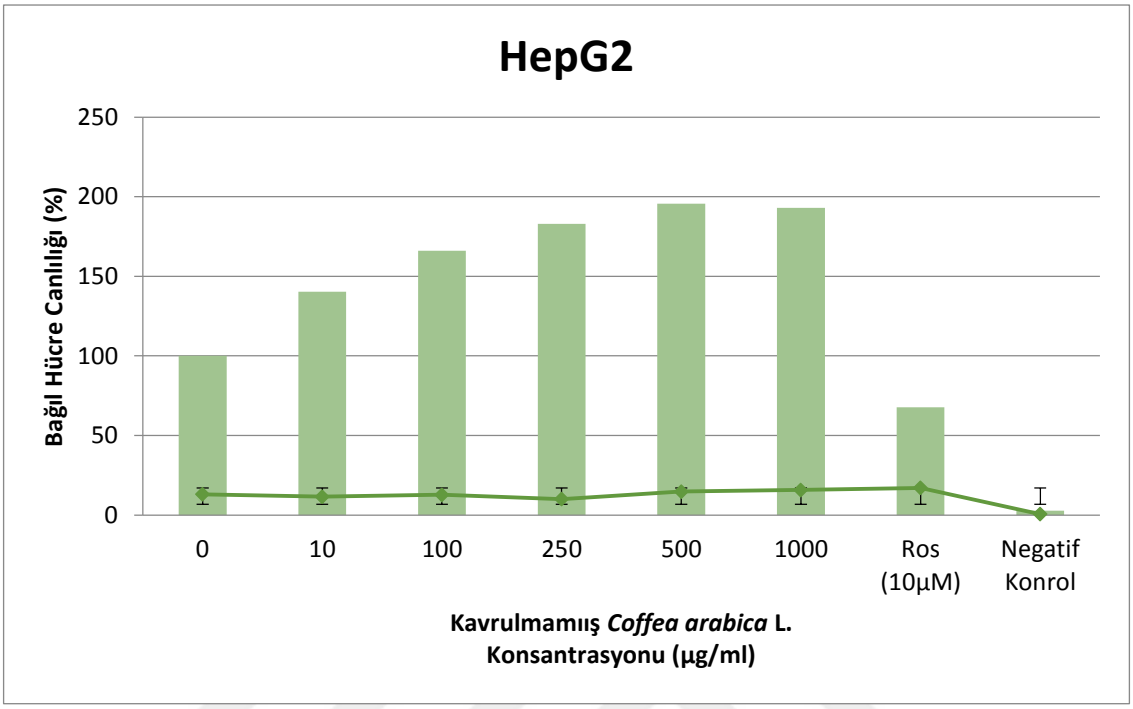


Tablo 4.2 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	8.2

Kavrulmuş *Coffea arabica*'nın C6 için sonuçlarına baktığımızda C6'ların roscovitine için %60'larda olan bir canlılık görmekteyiz. Fakat *Coffea arabica*'nın en iyi sonuçları bile %80 dolaylarında bir canlılık göstermektedir. Biz bu MTT sonuçlarından yola çıktığımız zaman IC50 değeri için 8.2 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları

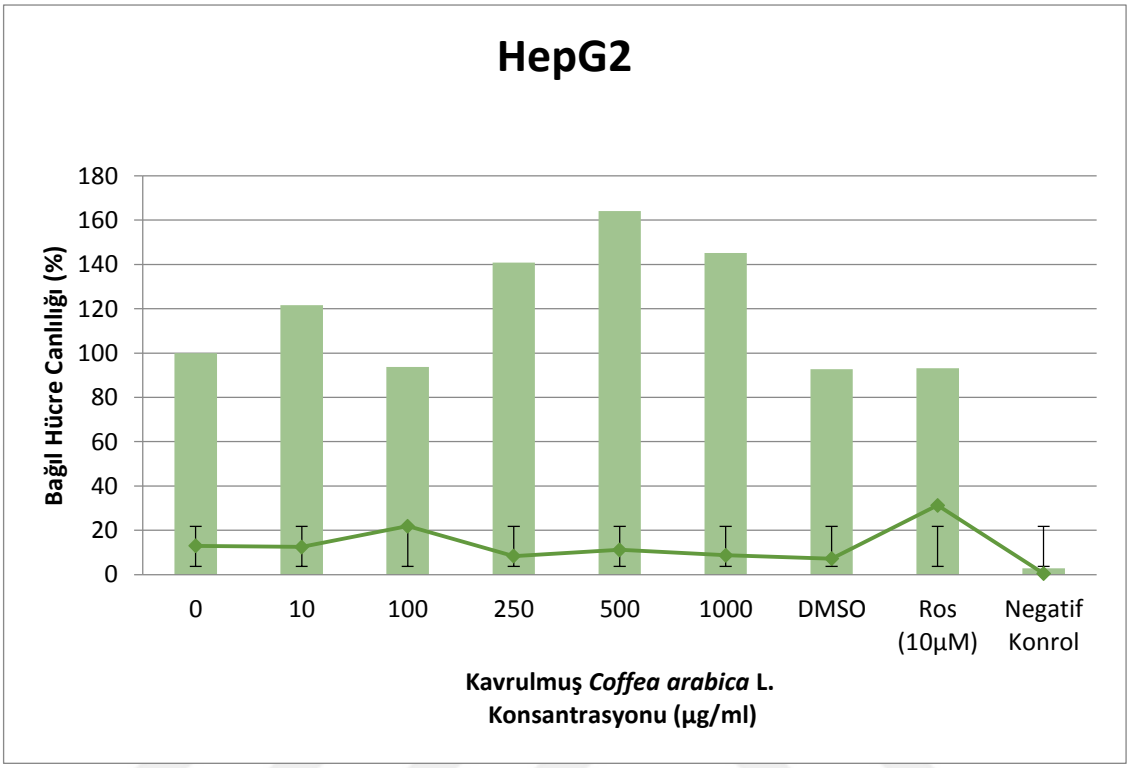


Tablo 4.3 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	1,39

Kavrulmamış *Coffea arabica* sonuçlarına baktığımızda roscovitinin canlılığını ortalama %60'larda görüyoruz. Fakat bizim uyguladığımız ilacımızın HepG2 hücrelerinde canlılığı arttırdığını bu tabloda görmekteyiz. Uyguladığımız ilaç dozu ile canlılık arasına doğru orantılı bir artış görülmekte. Bu sonuçlar doğrultusunda IC 50 oranını 1.39 µg/ml olarak belirlendi.

Çizelge 4.4 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları

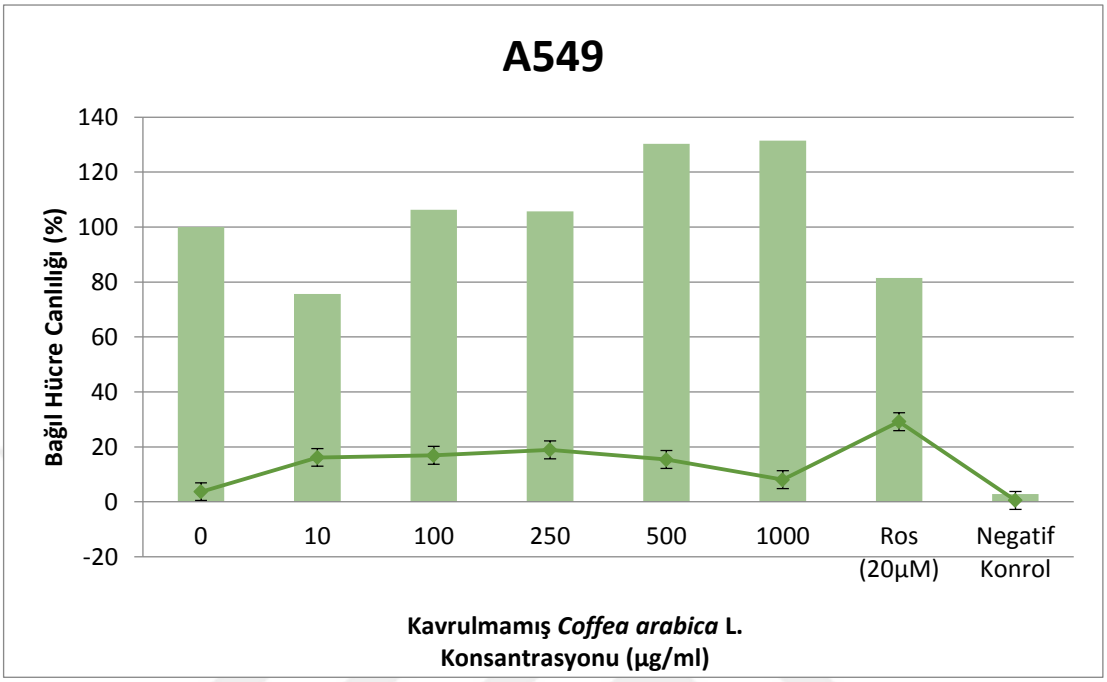


Tablo 4.4 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	0,07

Kavrulmuş *Coffea arabica* sonuçlarına baktığımızda 100 µg/ml'de roscovitine ile benzer sonuçlar olduğunu görmekteyiz. Deneylerimiz 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir ve bu tablolar çıkan sonuçların ortalaması ile oluşturulmuştur. Bu neden ile pipetaj hatası olmadığını kabul etmekteyiz. Diğer değerlerdeki artış nedeni ile hazırladığımız bitkisel drugın hücre canlılığını arttırmış olduğunu söyleyebiliriz. Kavrulmuş *Coffea arabica* sonuçları için IC 50 canlılık oranını 0,07 µg/ml olarak belirledik.

Çizelge 4.5 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları

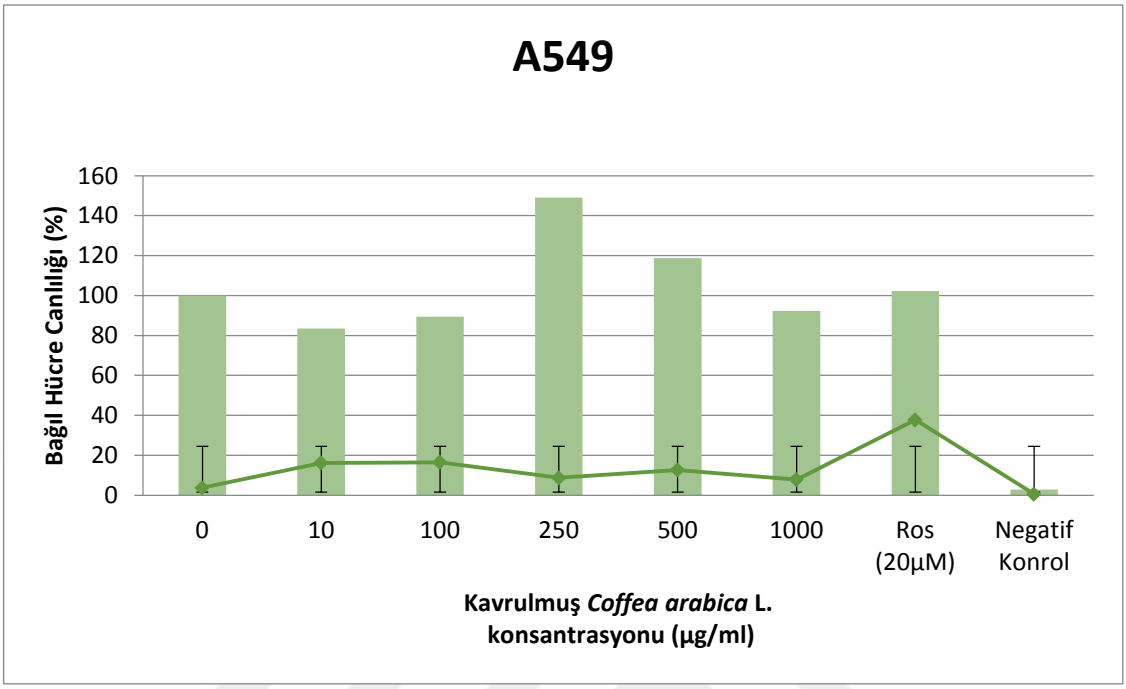


Tablo 4.5 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmamış *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	19,15

Kavrulmamış *Coffea arabica'*nın A549 hücre hatları üzerindeki sonuçları bize hazırladığımız bitkisel ürünün 10 µg/ml'da roscovitinden daha etkin olmasına ramen diğer sonuçlarda canlılığın arttığını göstermektedir. Sonuçlar 3 tekrarlı yapılmış olan deneylerin ortalamasını göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda IC 50 canlılık değeri 19,15 µg/ml olarak belirlendi.

Çizelge 4.6 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları



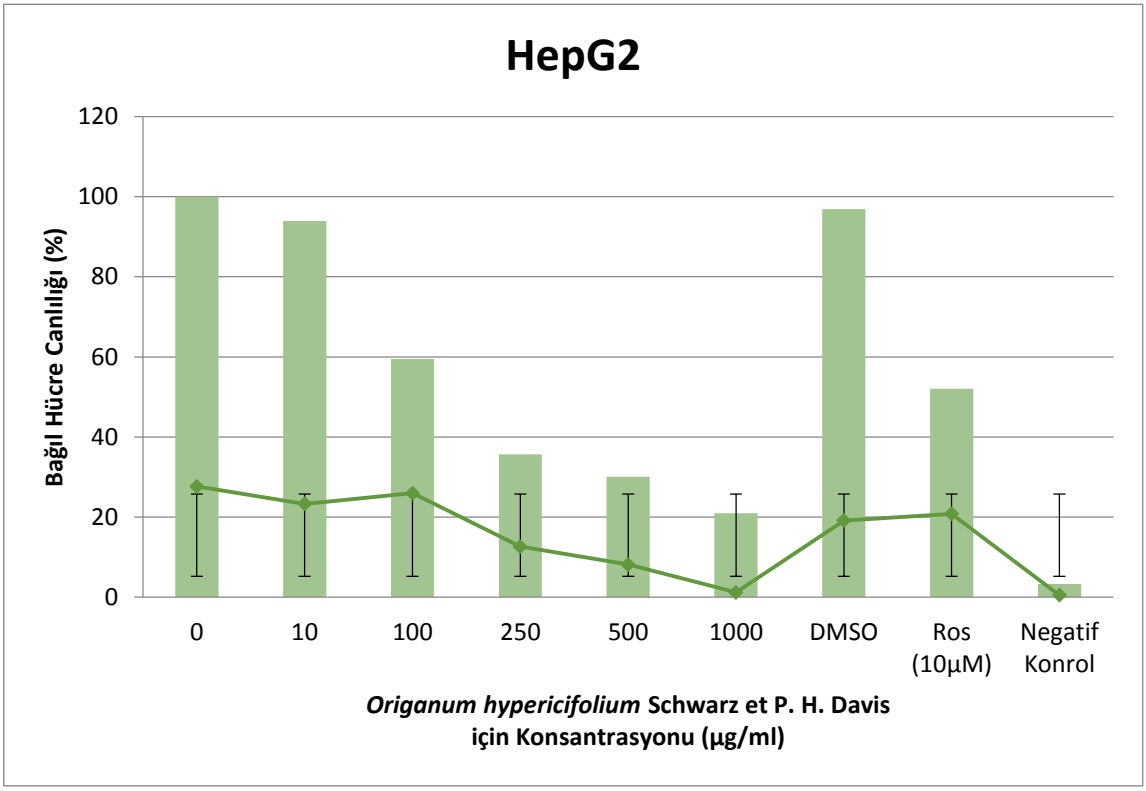
Tablo 4.6 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında kavrulmuş *Coffea arabica* L. ekstraktı ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	641,07

Kavrulmuş *Coffea arabica*'nın A549 hücre hatlarındaki sonuçları kontrol ilacımızın da bizim hazırladığımız druglarında canlılığı arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Bu hücre hattı üzerinde bu bitkisel ürünün IC 50 canlılık değeri 641,07 µg/ml olarak belirlenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış olup sonuçlar ortalamalarını vermektedir.

***Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için;**

Çizelge 4.7 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçları

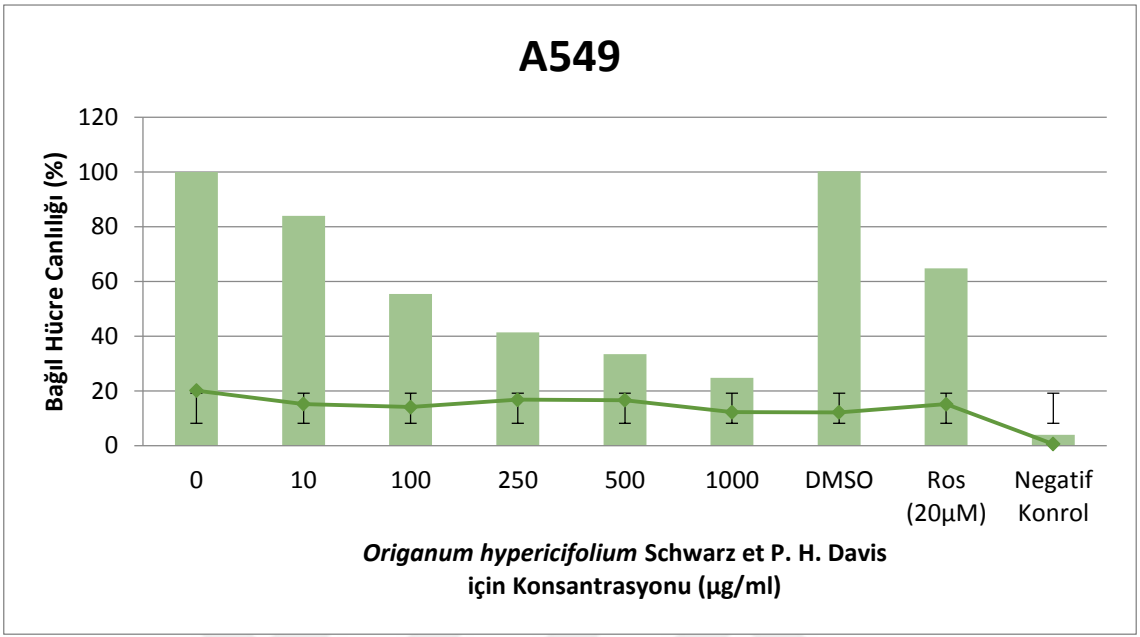


Tablo 4.7 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış HepG2 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	169,48

Origanum hypericifolium için HepG2 hücre hattı üzerindeki sitatoksisite sonuçları roscovitin kadar etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir. Hücrelere verilen ilaç konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı tam beklenildiği gibi azalmaktadır.

Çizelge 4.8 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçları

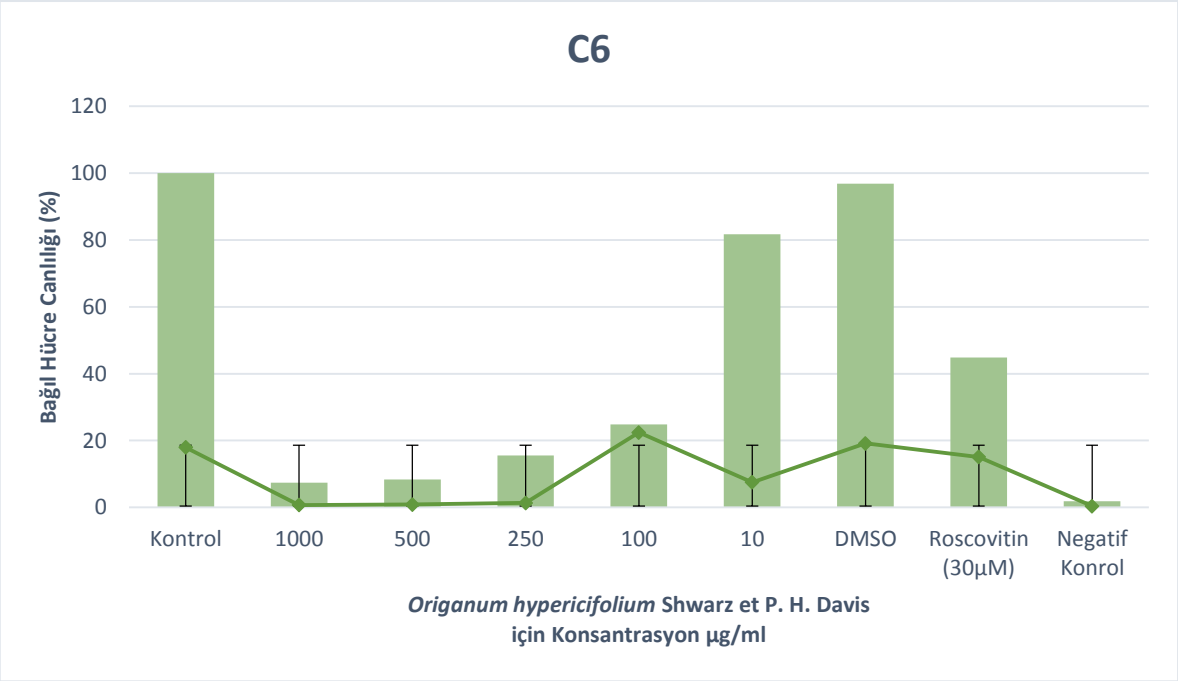


Tablo 4.8 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış A549 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	142,91

Origanum hypericifolium A549 sonuçlarına bakıldığı zaman bizim doğal ürünümüzün halihazırda kullanılan kontrol kemoteropötik ilaçtan daha iyi bir etkinliğe sahip olduğunu gözlemlenmektedir. Tam beklenilen doğrultuda ilaç konsantrasyonu arttıkça hücre canlılılğının düştüğü gözlemlenmektedir. Bu hücre hattı için bu doğal ürünün IC 50 canlılık değeri 142,91 µg/ml olarak belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup sonuç grafikleri bu tekrarların ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.9 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında Origanum hypericifolium Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçları



Tablo 4.9 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağlarının ve roscovitine uygulanmış C6 Hücre hatlarının MTT sonuçlarına göre CompuSyn Report programında canlılık oranlarının değerlendirilmesi sonucu

IC Değerleri	IC 50 Değeri Dozu µg/ml
IC 50	39,71

Origanum hypericifolium C6 sonuçlarına bakıldığı zaman *Origanum hypericifolium* uçucu yağının kullanılan kontrol kemoteropötik ilaçtan daha iyi bir etkinliğe sahip olduğunu gözlemlenmektedir. İlaç konsantrasyonu arttıkça hücre canlılılğının düştüğü gözlemlenmektedir. Bu hücre hattı için bu doğal ürünün IC 50 yüzde canlılık değeri 39,71 µg/ml olarak belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup sonuç grafikleri bu tekrarların ortalamasını göstermektedir.

2.10. Tartışma ve Öneriler

Bitkilerden gelen şifa günümüzün en önemli konularından biridir. Halihazırde tedavi gören hastaların doktorlarından aldıkları yardım dışında halk arasında kulaktan dolma bilgilere dayanarak ya da aktarlarınlarından aldıklara tavsiyelere dayanarak bitkisel ürünlere de başvurduklarını bilmekteyiz. Bunların başında gelen origanum türlerinden ekstrakte edilen esansiyel yağlar; midde ağrıları, diyabette insulinin kontrol altında tutulması gibi birçok kullanışı mevcuttur. Ülkemiz kekik üretimine elverişlidir. Bu doğrultuda birçok türünün yurdumuzda yetişiyor olması normaldir. Bunu yanısıra *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'in içinde bulunduğu birçok endemik türde bizim topraklarımda doğal olarak yetişmektedir. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis, yerli halk tarafından "Çökelek kekiği" veya "Kekik" olarak bilinir ve Denizli bölgesi için endemiktir. *Origanum* türlerinin antispazmodik, antitümoral, antifungal ve analjezik, balgam söktürücü, antiparazitik ve gastrointestinal kolik, öksürük, diş ağrısı ve düzensiz menstrüel döngüler gibi sorunlarda pozitif etki verdiği gözlemlenmiştir.

Kahve, sudan sonra dünyadaki en popüler ikinci içecektir. Düşük maliyeti ve hazırlanma kolaylığı nedeniyle, hemen hemen tüm ülkelerde ve nüfusun tüm sosyal sınıfları tarafından farklı hazırlanma çeşitleri ile tüketilir. Basit bir görünüm sergileyen bir fincan kahve aslında yüzlerce molekülü içerir ve bize hâlihazırda keşvedilecek kocaman bir okyanus sağlamaktadır. Birçok kanser türünün oluşumuna engel olabileceği ya da tedavi destekçisi olabileceği bilinmektedir. Ekstraksiyon işlemi bir homojenizasyon tekniğidir ve kurutulmuş bitki materyali kullanılarak yapılır. Polar olmayan hekzan polar olan yağ asitlerini bitkiden çekip alır. İşlem sonrası sıvı kısım süzgeç kâğıdında süzülür, çözücüler evaporatörde uçurulur. Bitkilerde uçucu yağ elde edilmesinde ise hidrodistilasyon yöntemi kullanılır. Bu tez çalışmaına ben de bu iki yöntemi kullandım. Bu şekilde elde ettiğim doğal ürünleri en karmaşık halleri ile hücre hatlarına uygulayarak bu ürünlerin etkilerini hâlihazırda kullanılmakta olan bir kematörapatik ajan ile karşılaştırdık. Bu aşamada laboratuvarımızda yeterli miktarda malzeme

olmamasından kaynaklı olarak en stabil koşullarda çalışabilecğimiz bitkisel ürünler ile yolumuza devam etmemiz gerekti.

MTT bize bir kemoterapötik ajanın hücre canlılığına etkisini anlatmak için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Bu şekilde, ölü hücreler yerine yaşayan hücreleri tespit edebiliriz. Bu yöntem bize sitotoksisite, proliferasyon veya aktivasyonu ölçmek konularında doğru ve kolay yoldan ulaşılan bir bilgi sağlamaktadır. A549 hücre hattı için yaptığımız ekimlerde *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağı 1 gramı, %0,1'lik DMSO ve ddH2O'da ekstraktlar ise DMSO yerine %1lik EtOH'da çözdürülerek 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında ve 20 µM Roskovitin A549 akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda ilaç uygulaması yapılmamıştır. İlaç uygulaması yapılmadığı için yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. 10 µg/ml ilaç uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %77, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %82 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %83 olarak gözlenmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kavrulmamış kahve için %110, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %85 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %57 olarak gözlenmiştir. 250 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %110, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %150 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %42 olduğu gözlenmiştir. 500 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %130, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %120 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %35 olduğu gözlenmiştir. 1000 µg/ml en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %130, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %90 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %25 olduğu gözlenmiştir. 20 µM Roskovitin uygulanan A549 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı ortalama %94 olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda %50 canlılık oranları kavrulmamış *Coffea arabica* L. için 19.15 µg/ml, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için 641.07 µg/ml ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için ise 142.91 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kendi doğal ürünlerimizi roscovitin ile karşılaştırdığımız zaman

A549 üzerinde *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağının hâlihazırda kullanılan bir kanser ilacından daha etkili olduğu fakat *Coffea arabica* L. ekstraktlarında böyle bir etki görülmemiştir. Fakat iki *Coffea arabica* L. ekstraktını birbiri ile kıyasladığımız zaman kavrulmamış *Coffea arabica* L.'nın biraz daha fazla etkisi olduğunu görüyoruz.

C6 hücre hattı için yaptığımız ekimlerde *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağı DMSO ve ddH2O'da *Coffea arabica* ekstraktlar ise DMSO yerine EtOH'da çözdürülerek 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında ve 30 µM Roscovitin C6 hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubuna ilaç uygulanmamıştır. Bu nedenle yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. 10 µg/ml ilaç uygulanan C6 hücrelerinde hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %70, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %90 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %82 olarak gözlenmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %120, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %85 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %25 olarak gözlenmiştir. 250 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %120, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %90 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %18 olduğu gözlenmiştir. 500 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %110, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %82 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %10 olduğu gözlenmiştir. 1000 µg/ml en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %130, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %95 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %10 olduğu gözlenmiştir. 30 µM Roscovitin uygulanan C6 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı ortalama %75 olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda %50 canlılık oranları kavrulmamış *Coffea arabica* L. için 20.97 µg/ml, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için 8.2 µg/ml ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için ise 39.71 µg/ml olarak belirlenmiştir. Roscovitinin C6 hücre hatları üzerinde A549 hücre hatlarına oranla daha fazla öldürücü etkisi olduğunu gözlemlemekteyiz. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'un C6 hücre hatlarında roscovitineden daha etkili bir

kemoteropötik ajan olabileceğini görmekteyiz bunun yanında *Coffea arabica* L.'nın kemoteropötik bir ajan olarak C6 hücre hatları üzerinde etkisi olmadığın gözlemliyoruz.

HepG2 hücre hattı için yaptığımız ekimlerde *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis uçucu yağı DMSO ve ddH2O'da *Coffea arabica* ekstraktlar ise DMSO yerine EtOH'da çözdürülerek 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarında ve 10 µM Roscovitin HepG2 hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubuna ilaç uygulanmamıştır. Bu nedenle yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. 10 µg/ml ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %145, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %120 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %95 olarak gözlenmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %170, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %95 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %60 olarak gözlenmiştir. 250 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %180, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %140 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %55 olduğu gözlenmiştir. 500 µg/ml konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %198, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %162 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %30 olduğu gözlenmiştir. 1000 µg/ml en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı kavrulmamış *Coffea arabica* L. için %180, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için %145 ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için %20 olduğu gözlenmiştir. 10 µM Roscovitin uygulanan HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı ortalama %88 olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda %50 canlılık oranları kavrulmamış *Coffea arabica* L. için 1.39 µg/ml, kavrulmuş *Coffea arabica* L. için 0.07 µg/ml ve *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis için ise 169.48 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Coffea arabica* L.'nın yüksek dozda eksrtaktlarının öldürücü etki göstermek yerine canlılığığı arttıran etkileri olduğu gözlemlenmiştir. İki *Coffea arabica* L. arasında karşılaştırma yaptığımızda kavrulmuş olanın canlılığı daha çok arttırdığını

görmekteyiz. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'un bu hücre hattında da etkileri olduğunu görmekteyim.

Benim tezimde uygulamalarımız sonuçlarında üç hücre hattında da *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'in proapoptotik bir etki gösterdiğini görmekteyiz. Uçucu yağımın C6 ve HepG2 hücrelerinde daha etkili olmasına rağmen A549 hücre hattında etkisinin daha az görüldüğünü gözlemlemekteyiz. Fakat roscovitinin de bu hücre hattında aynen bu şekide çalışmasına bağlı oalarak bunun nedenini *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. Davis'in A549'da, C6 ve HepG2 da olduğu kadar yoğun bir etkiye sahip olmamasına bağlıyorum. *Origanum hypericifolium* Schwarz et P. H. uçucu yağının üç hücre hattında da halihazırda kullanilan kemoteropötik bir ajandan çok daha etkili olduğunu görmekteyiz. *Coffea arabica* L.'da istediğim etkileri göremedim. Fakat yine de daha çok tekrar ile uygulanmaları gerektiği düşüncesindeyim.

Çağımızın en büyük sorunlarından biri olan kanserin çözümünü bulabilmek için birçok bilim insanı, doktor ve dernekler çalışmaktadır. Maalesef ki yine de çağımızın hastalığı diyebileceğimiz boyutta prevelansı olan bir hastalıktır. Biz yaptığımız çalışmalar ile en iyi tedavileri bulmak için çabalıyoruz fakat bu hastalık gurubunun bir de öteki yüzü mevcut. Kanser tedavisi gören hastaların yaşadıkları evreler melesefki çok ağır olabimektedir. Hatta doktorlar yaş ve vucut direnci gibi faaktörlerin kontrollerini yaparak bazı hastakların ne yazık ki tedavi olmamasın tavsiye edebiliyor. Benim bu teze başlarken kurduğum hipotezim tamamen kanser hastalarının yaşadıkları ağır seğiren semptoları azaltmaya yönelik bir çalışmaya adım atmayı hedeflemekteydi. Hâlihazırda kullanılan kemoteröpatik ajanların çok ağır yan etkileri vardır. Örneğin; birçok kanser türünde ilaç olarak kullanılan doksorubisinin kalp krizine neden olduğu bilinmektedir. Benim tezimde kullandığım kematetöpatik ajan olan roscovitinin hala daha kistik fibroz tedavisinde aktif olarak kullanılıyor olmasına rağmen böbreklerde oluşabilecek polikistlere neden olabilmektedirler. Nerdeyse tüm kanser tedavisi ajanlarında bu tarz ağır etkiler görüldüğü için çok düşük dozlarda uygulanmaları gerekmektedir. Uygulanan doz düştükce ilacın etkiside haliyle düşmektedir. Ben bu tez çalışmamda bu ilaçların daha az zarar verirken etkilerini arttırabileceğim bir etki

yaratabilmek için uçucu yağların belirli dozlardaki etkilerini karşılaştırdım. Bu çalışmam ile uçucu yağların sadece içlerindeki bir kimyaslı kromotgrafik yöntemleri ile ayrıştırıp gitmek yerine karmaşık yapıya sağip olan tüm ürün ile de bu kematörapatik çalışmaların da yürütülebileceğni kanıtlamış olduk. Bunun yanında yaptığım maserasyon işlemi sonucunda elde ettiğim özütlerinde kanser hücre hatları üzerindeki incelemesine ilerideki çalışmalarımda devam etmeyi hedefliyorum. Bu alanda ülkemizde bazı eksikler olduğunu görmekteyim ve ülkemize ait endemik bitkilerin bolluğuna baktığımda bu tarz çalışmaların ülkemizin geleceğine çok büyük katkılar sağlayacağını düşünmekteyim.

KAYNAKÇA

Agbottah E, de La Fuente C, Nekhai S, Barnett A, Gianella-Borradori A, Pumfery A, Kashanchi F (28 January 2005). "Antiviral activity of CYC202 in HIV-1-infected cells". J. Biol. Chem. 280 (4): 3029–42

Aktaş, B., Özdemir, P., Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., (2018). "Esansiyel Yağ Karışımı ve Üzüm Çekirdeği Ekstraktının In vitro Antioksidan Aktiviteleri, Toplam Fenolik Madde İçerikleri ve Başlıca Fenolik Bileşenleri", J. Anim. Prod., 59 (2):43-47

Alberts, B., Kirschner, M. W., Tilghman, S., Varmus, H., (2014). "Rescuing US biomedical research from its systemic flaws", Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(16), 5773–5777

Alkan, M., Cam, H., Gökçe, H., (2015). "Tanacetum abrotanifolium (L.) Druce (Asteraceae) ekstraktlarının Sitophilus granarius ile Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae)'ye uzaklaştırıcı etkilerinin zorunluluk testleri ile belirlenmesi", Bitki Koruma Bülteni, 55(3): 207-214

Amado, A. M., Pazin, W. M., Ito, A. S., Kuzmin, V. A., Borissevitch, I. E., (2017). "Acridine orange interaction with DNA: Effect of ionic strength", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1861(4), 900–909

American Cancer Society, https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer.html, 2009

Arslan, Ç., Ö., Parlak, H., Boyacıoğlu, M., Karaaslan, M., A., (2014). "Uçucu yağların Daphnia magna (Straus, 1816) üzerine akut toksisitesi", Su Ürünleri Dergisi, 31(3): 137-143

Ay, M., Bahadori, F., Öztürk, M., Kolak , U., Topçu, G., (2006). "Erica Arborea (Funda) Özütleri Ve İkincil Metabolitlerinin Antioksidan Etkinliğinin İncelenmesi", Ulusal Kimya Kongresi, Erciyes Üniversitesi, 4-8 Eylül 2006, Kayseri

Baldassarre, G., Battista, S., Belletti, B., Thakur, S., Pentimalli, F., Trapasso, F., Fusco, A., (2003). "Negative Regulation of BRCA1 Gene Expression by HMGA1 Proteins

Accounts for the Reduced BRCA1 Protein Levels in Sporadic Breast Carcinoma", Molecular and Cellular Biology, 23(7), 2225–2238

Baydar, H., (2005). "YAYLA KEKİĞİ (Origanum minutiflorum O. Schwarz Et. P. H. Davis)'nde Farklı Toplama Zamanlarının Uçucu Yağ İçeriği Ve Uçucu Yağ Bileşenleri Üzerine Etkisi", Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(2), 175-178

Burnette, W. N., (1981). ""Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A", Analytical Biochemistry, 112(2), 195–203

Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Gallus, S., Negri, E., La Vecchia, C., Tavani, A., (2009). "Coffee drinking and endometrial cancer risk: a metaanalysis of observational studies", American Journal of Obstetrics and Gynecology, 200(2), 130–135

Baser, C., K., (2008). "Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils", Current Pharmaceutical Design, 14(29), 3106–3119

Biological Industries, https://www.bioind.com/worldwide/support/media-formulations/media-formulations-dmem-high-glucose-4mm/, 2016

Caini, S., Cattaruzza, S., Bendinelli, B., Tosti, G., Masala, G., Gnagnarella, P., Gandini, S., (2016). "Coffee, tea and caffeine intake and the risk of non-melanoma skin cancer: a review of the literature and meta-analysis", European Journal of Nutrition, 56(1), 1–12

Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W., Schilter, B., (2002). "Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity", Food and Chemical Toxicology, 40(8), 1155–1163

Celik, A., Nur Herken, E., Arslan, İ., Zafer Özel, M., Mercan, N., (2010). "Screening of the constituents, antimicrobial and antioxidant activity of endemic Origanum hypericifolium O. Schwartz & P.H. Davis", Natural Product Research, 24(16), 1568–1577

Chishti, S., Kaloo, A., Z., Sultan, P., (2013). “Medicinal importance of genus Origanum: A review”, Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 5(10), 170-177

Cooper, J., Abdullatif, M., B., Burnett, E., C., Kempsell, K., E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J., E., Davies, D., E., (2016). “Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype”, 11(10): e0164438.

Cooper, J., (2012). “Cell line profile A549”, Public Health England

Cowell, J. K., LaDuca, J., Rossi, M. R., Burkhardt, T., Nowak, N. J., Matsui, S., (2005). “Molecular characterization of the t(3;9) associated with immortalization in the MCF10A cell line”, Cancer Genetics and Cytogenetics, 163(1), 23–29

Cuozzo, C., Porcellini, A., Angrisano, T., Morano, A., Lee, B., Pardo, A. D., Avvedimento, E. V., (2007). “DNA Damage, Homology-Directed Repair, and DNA Methylation”, PLoS Genetics, 3(7), e110

Çelik, A., Çiçek, M., Semiz, G., Karıncalı, M., (2004). “Taxonomical and Ecological Investigations on Some Geophytes Growing Around Denizli Province (Turkey)”, Turk J Bot, 205-211

Çoker-Gürkan, A., Arısan, E. D., Obakan, P., Akalın, K., Özbey, U., & Palavan-Unsal, N. (2015). “Purvalanol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and autophagy in a time-dependent manner in HCT116 colon cancer cells.”, Oncology Reports, 33(6), 2761–2770.

Daşdemir, İ, Güngör, E, (2008). “Küre Dağları Milli Parkı Optimum Yönetim Stratejisinin Belirlenmesi”. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 10-13

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH (1997). "Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine". Eur J Biochem, 243 (1–2): 518–526.

Diwan P, Lacasse JJ, Schang LM, (2004). "Roscovitine inhibits activation of promoters in herpes simplex virus type 1 genomes independently of promoter-specific factors". J. Virol. 78 (17): 9352–9365.

Erdoğan, A., Özkan, A., Ünal, O., Dülgeroğlu, C., (2018). “Evaluation of the cytotoxic and membrane damaging effects of mountain tea (Sideritis stricta Boiss & Heldr.) essential oil on parental and epirubicin-HCl resistant H1299 cells”, Cukurova Medical Journal, 43(3):669-677

Ekmektzoglou, K., A., Xanthos, T., German, V., Zografos, G. C., (2009). “Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century”, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 145(1), 3–8

Fakir, H., Us, A., A., Sagdic, M., Tornuk, F., (2015). “Essential Oil Composition, Antimicrobial and Bioactive Properties of Origanuım hypericifolium, An Endemic Plant Species grown in Turkey”, Research Journal of Biotechnology, 10 (11), 102-108

Franken, N., A., P., Rodermond, H., M., Stap, J., Haveman, J., vanBree, C., (2006). “Clonogenic assay of cells in vitro”, Nature Protocols, 1(5), 2315–2319

Gaascht, F., Dicato, M., Diederich, M., (2015). “Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer”, Genes & Nutrition, 10(6)

Grange J. M., Stanford J.L., Stanford C.A., (2002). "Campbell De Morgan's 'Observations on cancer', and their relevance today", Journal of the Royal Society of Medicine, 95 (6): 296–9

Grobben, B., De Deyn, P., Slegers, H., (2002). “Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion”, Cell and Tissue Research, 310(3), 257–270

Hajdu, S. I., Darvishian, F., (2013). “A note from history: Landmarks in history of cancer, part 5”, Cancer, 119(8), 1450–1466

Hanahan, D., Weinberg, R.,A., (2000). “The hallmarks of cancer”, Cell, 100, 57-70

Hanahan, D., Weinberg, R., A., (2011). “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, Cell, 144(5), 646–674

Hill, C. L., Zhang, Y., Sigurgeirsson, B., Pukkala, E., Mellemkjaer, L., Airio, A., Felson, D. T., (2001). “Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population-based study”, The Lancet, 357(9250), 96–100.

Holliday, D. L., Speirs, V., (2011). “Choosing the right cell line for breast cancer research”, Breast Cancer Research, 13(4)

Hsu, P. P., Sabatini, D. M., (2008). “Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond”, Cell, 134(5), 703–707

İli, P., (2003). “Bazı Tıbbi Bitkilerin Kimyasal İçerikleri Ve Hayvanlara Etkileri”, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi

İli, P., (2012). “Origanum hypericifolium’un Deri’de Ultraviyole Radyasyonu Hasarları Üzerindeki Sitolojik ve Histokimyasal Etkilerinin Araştırılması”, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi

Jiang, W., Wu, Y., Jiang, X., (2013). “Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: An updated dose–response meta-analysis of 37 published studies”, Gynecologic Oncology, 129(3), 620–629

Kanwal, R., Gupta, S., (2012). "Epigenetic modifications in cancer", Clinical Genetics, 81 (4): 303–11

Kelebek, H., Selli, S., Cabaş, A., (2011). “Öküzgözü Üzümlerinden Kırmızı Sarap Üretiminde Soğuk Maserasyon Uygulamasının Antosiyaninler Üzerine Etkisi”, Tarım Bilimleri Dergisi, 287-294

Keskin, N., İli, P., Sahin, B., (2012). “Histochemical demonstration of mucosubstances in the mouse gastrointestinal tract treated with Origanum hypericifolium O. Schwartz and P.H. Davis extract”, African Journal of Biotechnology, 11(10), 2436-2444

Key, T. J., (2010). “Fruit and vegetables and cancer risk”, British Journal of Cancer, 104(1), 6–11

Köse, Y., B., Altıntaş, A., Demirci, B., Çelik, S., Başer, K., C., H., (2009). “Composition of the Essential Oil of Endemic Centaurea paphlagonica (Bornm.) Wagenitz From Turkey”, Asian Journal of Chemistry, 21-3, 1719-1724

Kusaka, M., Sudo, K., Matsutani, E., Kozai, Y., Marui, S., Fujita, T., Folkman, J. (1994). "Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470)", British Journal of Cancer, 69(2), 212–216.

Kütükçü, Z., M., (2016). "Deneysel Diyabetik Dişi Sıçan Genital Sisteminde Origanum hypericifolium Esansiyel Yağının Etkilerinin İnce Yapı Düzeyinde Araştırılması", Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Larsson, S., C., Wolk, A., (2007). "Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis", Gastroenterology, 132 (5): 1740–5

Levenson, A., S., Jordan, V. C., (1997). "MCF-7: The First Hormone-responsiveBreast Cancer Cell Line", Cancer Research, 57, 3071-3078

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E., P., Vazquez-Olivo, G., Heredia, J., B., (2017). "Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties ", Molecules, 22, 989

Lin, Y., Liang, W., Chen, C., Tsange, H., Chiouc, J., Liue, X., Cheng, C., Linb, T., Liaob, T., Huang, S., Cheng, J., Tsaia, F., Lia, T., (2019). "Network analysis and mechanisms of action of Chinese herb-related natural compounds in lung cancer cells", Phytomedicine, 58, 152893

Liu, E., Weissman, B., (1993). "Oncogenes and tumor suppressor genes", Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Human Malignancies, 1, 1-10

MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP, Green SR (2005). "Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1". Cancer Research. 65 (12): 5399–5407.

Mamur, S, (2019), "Beta-Sitronellol ve (-)-Menton Monoterpenlerinin İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi", Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 3(2); 111-119

Mann, J., (2002). “Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future”, Nature Reviews Cancer, 2(2), 143–148

McCormick, F., (1999). “Signalling networks that cause cancer”, Trends in Biochemical Sciences, 24(12), 53–56

Mosmann, T., (1983). “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay”, Journal of Immunological Methods, 65(1-2), 55–63.

Murrell, T., G., C., (1995). “The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis”, Breast Cancer Research and Treatment, 35(2), 225–229

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., (1996). “Mice Lacking p27Kip1 Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors”, Cell, 85(5), 707–720.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., Halazonetis, T. D., (2010). “Genomic instability — an evolving hallmark of cancer” Nature Reviews Molecular Cell Biology, 11(3), 220–228

Noel S, Faveau C, Norez C, Rogier C, Mettey Y, Becq F (2006). "Discovery of pyrrolo[2,3-b]pyrazines derivatives as submicromolar affinity activators of wild type, G551D, and F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels". J Pharmacol Exp Ther. 319: 349–59.

Noopur Raje; Shaji Kumar; Teru Hideshima; Aldo Roccaro; Kenji Ishitsuka; Hiroshi Yasui; Norihiko Shiraishi; Dharminder Chauhan; Nikhil C. Munshi; Simon R. Green; Kenneth C. Anderson (August 1, 2005). "Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma". Blood. 106 (3): 1042–1047

Obakan-Yerlikaya, P., Arisan, E. D., Coker-Gurkan, A., Adacan, K., Ozbey, U., Somuncu, B., Baran, D., Palavan-Unsal, N., (2017). “Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells. Molecular Carcinogenesis”, 56(6), 1603–1619.

Ocak, I., Çelik, A., Özel, M., Z., Korcan, E., Konuk, M., (2012). “Antifungal Activity and Chemical Composition of Essential Oil of Origanum Hypericifolium”, International Journal of Food Properties, 15:1, 38-48

Özbey, U., (2016). “Epibrassinolid'in GSK3 ve p53 sinyal mekanizmaları üzerindeki etkilerinin incelenmesi”, İKÜ Tezler, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezleri, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Özcan, M., Chalchat, J.-C., (2005). “Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (Laurus nobilis L.) Leaves Growing Wild in Turkey”, Journal of Medicinal Food, 8(3), 408–411

Patnala, R., Lee, S.-H., Dahlstrom, J. E., Ohms, S., Chen, L., Dheen, S. T., Rangasamy, D. (2013). “Inhibition of LINE-1 retrotransposon-encoded reverse transcriptase modulates the expression of cell differentiation genes in breast cancer cells”, Breast Cancer Research and Treatment, 143(2), 239–253

Perumal, E., (2016). “Brief overview of Breast cancer: Past, Present and Future”, Malaya Journal of Biosciences, 3(1), 63-70

Pothier, J., Galand, N., Ouali, M., E., Viel, C., (2001). “Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme”, Il Farmaco, 56, 505–511

Pumfery A, de la Fuente C, Berro R, Nekhai S, Kashanchi F, Chao SH (2006). "Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics". Curr Pharm Des. 12 (16): 1949–61.

Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustin, O., de Medina, F. S., (2014). “Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting”, Analytical Biochemistry, 467, 1–3

Roasted coffee beans, https://www.wikizero.pro/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRmlsZTpSb2FzdGVkX2NvZmZlZV9iZWFucy5qcGc, 2005

Rodenak-Kladniew, B., Castro, A., Stärkel, P., De Saeger, C., De Bravo, M., G., Crespo, R., (2018). “Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells through oxidative stress generation and modulation of Ras/MAPK and Akt/mTOR pathways”, Life Sciences, 199, 48–59.

Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, Martinez-Losa M, Walker TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin MC, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C (2006). "Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis". Nature Medicine. 12 (9): 1056–1064.

Sadaie MR, Mayner R, Doniger J (January 2004). "A novel approach to develop anti-HIV drugs: adapting non-nucleoside anticancer chemotherapeutics". Antiviral Research. 61 (1): 1–18.

Sağıroğlu, M., Dalgıç, S., Toksoy, S., (2013). “Medicinal plants used in Dalaman (Muğla), Turkey”, Journal of Medicinal Plant Research, 7(28), 2053-2066

Schang LM, Rosenberg A, Schaffer PA (2000). "Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins". J. Virol. 74 (5): 2107–20.

Shafi, G., Hasan, T. N., Syed, N. A., Al-Hazzani, A. A., Alshatwi, A. A., Jyothi, A., Munshi, A., (2012). “Artemisia absinthium (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer”, Molecular Biology Reports, 39(7), 7373–7379

Shen, X., Cui, X., Cui, H., Jin, Y., Jin, W., Sun, H., (2018). “Geraniol and lupeol inhibit growth and promote apoptosis in human hepatocarcinoma cells through the MAPK signaling pathway”, Journal of Cellular Biochemistry, 10-1, 10.1002

Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., Brooks, S. C., (1990). “Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10A”, Michigan Cancer Foundation, 50, 6075-6086

Vengoji, R., Macha, M., A., Batra, S., K., Shonka, N., A., (2018). “Natural products: a hope for glioblastoma patients”, Oncotarget, 9-31, 22194-22219

Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., Hu, F. B., (2014). "Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies", BMJ, 349, 4490

Ward, P. S., Thompson, C. B., (2012). "Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate", Cancer Cell, 21(3), 297–308

Whiffen, L. K., Midgley, D. J., McGee, P. A., (2007). "Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method", Soil Biology and Biochemistry, 39(2), 691–694

Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, Y. A., (2015). "Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development", Nature, 529(7584), 43–47

Temel, M., Unver, M. C., Tokur, S., Dogan, Y., (2011). "SOIL PROPERTIES OF FOUR ORIGANUM SPECIES IN TURKEY", Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.), 7(1): 79 – 82

The Biology of Cancer, http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPHModules/PH/PH709

_ Cancer/PH709_Cancer5.html, 2016

Zheng, W., Lee, S. A., (2009). "Well-Done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk", Nutrition and Cancer, 61(4), 437–446

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi:busebahar13@gmail.com

Projeler

1. "Doğal Endemik *Origanum hypericifolium* Schwarz et P H Davis ve Kültür Ürünü Kavrulmuş ve Kavrulmamış *Coffea arabica* L Çekirdeklerinin Yağ Asitlerinin ve Uçucu Yağlarının Meme ve Beyin Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi", FYL-2018-3375, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştıma Projeleri Kordinatörlüğü, Araştırmacı