

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ziziphora clinopodioides Lam. subsp. *rigida* (Boiss.) Rech.f. (LAMIACEAE)
UÇUCU YAĞININ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEGIN YADOLLAHI

DENİZLİ, OCAK 2024

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



Ziziphora clinopodioides Lam. subsp. *rigida* (Boiss.) Rech.f. (LAMIACEAE)
UÇUCU YAĞININ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEGIN YADOLLAHI

DENİZLİ, OCAK 2024

Bu alışma Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022FEBE049 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Negin YADOLLAHI

ÖZET

Ziziphora clinopodioides Lam. subsp. *rigida* (Boiss.) Rech.f. (LAMIACEAE)
UÇUCU YAĞININ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
NEGIN YADOLLAHI
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜRKAN SEMİZ)

DENİZLİ, OCAK 2024

Bitkiler insanlık tarihi boyunca kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde, bitkilerin sahip olduğu sekonder metabolitler ve etki mekanizmalarını ortaya çıkarmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Sağlıklı dokulara zarar vermeyen ve anti-karsinojen etkilere sahip ajanlar üzerindeki araştırmalar son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağlar da kimyasal içerikleri düşünüldüğünde potansiyel ilaçlar için geniş bir kaynak sağlamaktadır. Bu çalışma ile İran’da yayılış gösteren ve insanlar tarafından sıklıkla tüketilen *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* türünden uçucu yağ elde edilmesi, elde edilen uçucu yağın kimyasal içerik analizi, uçucu yağın kolorektal kanser hücre hatlarında (CACO-2 ve HCT116) sitotoksik aktivite ve apoptoz analizleri etkilerini incelenmesi amaçlanmıştır. Kontrol olarak sağlıklı embriyonik hücre hattı HEK293 kullanılmıştır. Bu hücre hatlarından elde edilen EC₅₀ değeri kullanarak apoptoz analizleri, Annexin FITC/PI boyaması ile yapılmış, apoptoz ilişkili genlerin (*BAX*, *BCL2*, *Caspase 3*, *Caspase 8* ve *Caspase 9*) seviyelerini ölçmek üzere mRNA izole edilmiş ve qRT-PCR ile ölçümleri gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağın kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi sağlıklı hücre hattındaki etkisine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Apoptoz analizi sonucunda *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının yüksek apoptoz etki gösterdiğini ve ayrıca antiapoptotik geni (*BCL2*) inhibe ettiğini, apoptotik genlerini (*BAX*, *Caspase 3*, *Caspase 8* ve *Caspase 9*) teşvik ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak tarafımızca yürütülen çalışmanın sonuçları *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* türünün kolorektal kansere karşı terapötik bir ajan olabilme potansiyeline sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Apoptotik, GC-MS, Lamiaceae, Sitotoksik, Uçucu yağ, *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida*.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF ESSENTIAL OIL OF *Ziziphora clinopodioides* Lam. subsp. *rigida* (Boiss.)

Rech.f. (LAMIACEAE)

MSc THESIS

NEGIN YADOLLAHI

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GURKAN SEMIZ)

DENİZLİ, JANUARY 2024

Plants have been used throughout human history to treat various diseases, including cancer. Nowadays, many studies are being carried out to reveal the secondary metabolites of plants and their mechanisms of action. Research on agents that do not harm healthy tissues and have anti-carcinogenic effects has become very popular in recent years. Extracts and essential oils obtained from plants also provide a wide source of potential drugs, considering their chemical content. The aim of this study was to obtain essential oil from the *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida*, which was widespread in Iran and frequently consumed by humans, to analyze the chemical content of the essential oil, and to examine the effects of essential oil on cytotoxicity activities and apoptosis on colorectal cancer cell lines (CACO-2 and HCT116). The healthy embryonic cell line HEK293 was used as a control. Apoptosis analyses were performed by Annexin FITC/PI staining using the EC50 values. mRNA was isolated to measure the levels of apoptosis-related genes (*BAX*, *BCL2*, *Caspase 3*, *Caspase 8* and *Caspase 9*) and all measurements were carried out by qRT-PCR. According to the results, it was shown that the cytotoxicity effect of *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* essential oil on colorectal cancer cell lines was higher than its effect on healthy cell lines. As a result of the apoptosis analysis, it was shown that *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* essential oil has a high apoptosis effect and also inhibits the antiapoptotic gene (*BCL2*) and induces apoptosis by promoting apoptotic genes (*BAX*, *Caspase 3*, *Caspase 8* and *Caspase 9*). In conclusion, the results of the study conducted have shown for the first time that *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* has the potential to be a therapeutic agent against colorectal cancer.

KEYWORDS: Apoptotic, cytotoxic, GC-MS, Lamiaceae, essential oil, *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri.....	2
2.2 <i>Ziziphora</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	3
2.3 Kanser	8
2.4 Tezin Amacı.....	11
3. YÖNTEM.....	12
3.1 Bitki Materyalinin Toplanması	12
3.2 Uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS Analizleri.....	12
3.3 Malzemeler	13
3.3.1 Kullanılan Kimyasallar	13
3.3.2 Kullanılan Cihazlar	13
3.4 Hücre kültürü ve sitotoksitenin belirlenmesi	14
3.5 Apoptozun Belirlenmesi	15
3.6 Apoptozda görev alan genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonlarının analizi.....	15
3.7 İstatistiksel Analiz.....	16
4. BULGULAR	17
4.1 <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> uçucu yağının kimyasal bileşimi	17
4.2 Sitotoksite sonuçları	18
4.3 Apoptoz Analizleri.....	21
4.3.1 Annexin-V/PI Boyama Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi ...	21
4.4 Toplam RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	22
4.5 Apoptozda Görev Alan Genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi ...	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
6. KAYNAKLAR.....	35
7. ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının insan kolon kanseri (CACO-2) hücre canlılığına etkisi	19
Şekil 4.2: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının insan kolon kanseri (HCT116) hücre canlılığına etkisi	19
Şekil 4.3: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) hücre canlılığına etkisi.....	20
Şekil 4.4: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının 24 saatlik uygulamasının CACO-2 hücre hattının apoptozuna etkisi	21
Şekil 4.5: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının 24 saatlik uygulamasının HCT116 hücre hattının apoptozuna etkisi.....	22
Şekil 4.6: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> yağının 24 saat uygulamalarının ardından CACO-2, HCT116, hücre hattından elde edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi.....	23
Şekil 4.7: CACO-2 hücre hattında apoptotik yollarda görev alan <i>BCL2</i> , <i>BAX</i> , <i>Caspase 3</i> , <i>Caspase 8</i> , <i>Caspase 9</i> ve <i>P53</i> 'ün mRNA düzeylerine EC50 dozu sonrası etkisi	24
Şekil 4.8: HCT116 hücre hattında apoptotik yollarda görev alan <i>BCL2</i> , <i>BAX</i> , <i>Caspase 3</i> , <i>Caspase 8</i> , <i>Caspase 9</i> ve <i>P53</i> 'ün mRNA düzeylerine EC50 dozu sonrası etkisi	25

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.....	16
Tablo 4.1: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> uçucu yağının kimyasal bileşimi.....	17
Tablo 4.2: <i>Z. clinopodioides</i> subsp. <i>rigida</i> bileşiklerin 24 saat EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) değerleri.....	20

SEMBOL LİSTESİ

\pm	: Artı-Eksi
%	: Yüzde
μm	: Mikrometre
μ	: Mikron
$^{\circ}$: Derece
>	: Büyük
<	: Küçük

KISALTMALAR LİSTESİ

CACO-2	: Kolorektal adenokarsinom
cDNA	: Komplementer DNA
CRC	: Kolorektal kanser
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EC50	: Yarı maksimal etkili konsantrasyon
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
HCT116	: İnsan kolon karsinomu
HEK293	: Sağlıklı insan embriyonik böbrek
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	: 3-(4,5- dimetiltiazoş-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromid
PI	: Propidyum iyodür

ÖNSÖZ

Bilgi, rehberlik ve destekleriyle bana her zaman ilham veren ve tecrübesini benden hiç esirgemeyen, sabırla yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocalarıma minnettarım. Öncelikle, bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında en büyük katkıyı sağlayan tez danışman hocam Prof. Dr. Gürkan SEMİZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunmak isterim. Üzerimde emeği olan diğer hocalarım Prof. Dr. Şevki ARSLAN ve Şirvan Üniversitesi Yüksek Öğrenim Kompleksi'nde Doç. Dr. Mohammad KHEİRKHAH'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan her zaman yanımda ve yardımcı oldukları için, Shayesteh POORHOSEİN GHAZİ MAHALEH, Doğukan MUTLU, ve Amine HAFİS ABDELSALAM, Arş Gör. Batıkan GÜNAL, Gıda Yüksek Müh. Ünkan URGANCI ve aileme özel bir teşekkür etmek istiyorum. Onların destekleri, cesaretleri ve sevgileri olmadan bu çalışma asla tamamlanamazdı. Her zaman beni cesaretlendiren, inancımı güçlendiren ve en zor zamanlarda dahi yanımda oldukları için hepsine minnettarım. Tez çalışmama maddi desteklerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yol arkadaşım, hem sevgisini hem de desteğini her daim hissettiğim sevgili eşim Mehmet ERDOĞAN'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

NEGIN YADOLLAHI

1. GİRİŞ

Kalıtsal faktörler veya çevresel ajanların etkisiyle hücrelerde meydana gelen genetik hasar ya da mutasyonlar sonucunda birçok kanser türü oluşabilmektedir. Günümüzde kanser tedavisi yaklaşımlarında önemli derecede ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, çeşitli kanser türlerinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmadaki zorluklar ve tedavilerinde yaşanan yan etkiler sebebiyle tamamlayıcı tedaviler olarak doğal ürünlerin kullanıldığı tedavi yaklaşımları tercih edilmeye başlanmıştır. Doğal ürünler, yan etkilerin azaltılmasında çoğunlukla kullanılan bileşikler ortaya çıkarırken, geleneksel tıpta uygulanması terapötik etkiye sahip potansiyel yeni bileşik kaynaklarına işaret etmektedir (Khafaei ve diğ. 2019).

Fosil kayıtları, insanların bitkileri ilaç olarak kullanımını yaklaşık 60.000 yıl öncesine kadar tarihlendirmektedir (Solecki 1975). Bu noktadan itibaren, bitkileri bir tedavi aracı olarak kullanan geleneksel tıbbi sistemlerin gelişimi, yalnızca onların benzerliklerini gösteren kayıtlı belgelere kadar izlenebilmektedir. Bununla birlikte, bu sistemlerin değeri, önemli bir antropolojik veya arkeolojik olgudan çok daha fazlasıdır. Bu değer, Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre dünya nüfusunun neredeyse %65'inin temel sağlık hizmetleri yöntemine dahil ettiği bir metodolojidir (Farnsworth ve diğ. 1985).

Bitkileri terapötik madde kaynağı olarak kullanmanın amaçları şunlardır: a) doğrudan ilaç olarak kullanılmak üzere biyoaktif bileşikler izole etmek; b) daha yüksek aktiviteye ve/veya daha düşük toksisiteye sahip patentlenebilir yeni veya bilinen yapılara sahip biyoaktif bileşikler üretmek; c) farmakolojik amaçlı ajanlar üretmek ve d) bitkinin tamamını veya bir kısmını bitkisel ilaç olarak kullanmak (Fabricant ve Farnsworth, 2001).

Bitkiler, insanlar tarafından uzun süreli (çoğunlukla yüzlerce veya binlerce yıl) kullanılmaları nedeniyle potansiyel tedavi açısından avantajlı durumdadırlar. Bu tür bitkilerden elde edilen herhangi bir biyoaktif bileşimin düşük toksisiteye sahip olması beklenen bir durumdur. Bu bitkilerden bazıları, bu etkileri belgeleyecek bir raporlama sistemi olmayan durumlarda toksik özelliğe sahip olabilir. Bununla birlikte, bir

bitkinin kullanılmasından sonra görülebilecek akut toksik etkiler her zaman net bir şekilde fark edilemeyebilir (Yousefbeyk ve diğ. 2016).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Altıncı en büyük Angiosperm familyası olan Lamiaceae, 245'ten fazla cins ve yaklaşık 7900 tür içerir ve dünya genelinde bir dağılım gösterir (Celep ve Dirmenci 2017). Ekonomik ve tıbbi açıdan önemli birçok türü içeren familyanın (Harley ve diğ. 2004) en bilinen üyeleri kekik, nane, fesleğen, adaçayı, biberiye, mercanköşk, melisa gibi çeşitli aromatik bitkilerdir (Bekut ve diğ. 2018). Lamiaceae familyasının genel kimyası oldukça karmaşık olabilmektedir. Çünkü bu bitki ailesinde birçok grup ve alt grup kimyasal yapı bir arada bulunabilmektedir. Bu kimyasal grupların her biri kendi kimyasal yapı ve özelliklerine sahiptir. Lamiaceae familyası içerisinde belirgin iki grup karakterize edilmektedir. Birincisi esas olarak uçucu yağda bulunan uçucu terpenoidlere sahip olan gruplar, diğeri ise esas olarak polar fraksiyonda uçucu olmayan metabolitler ürettiği bilinen ve zayıf uçucu yapılara sahip olan türlerin bulunduğu gruplardır (Frezza ve diğ. 2019).

Lamiaceae türlerinin uçucu yağları özellikle sırasıyla 10, 15 ve 20 karbon atomundan oluşan uçucu monoterpenler, seskiterpenler ve diterpenler açısından zengindir. Monoterpenler arasında ana bileşikler α -pinene, β -pinene, 1,8-cineole, menthol, limonene ve γ -terpinene'dir (Panizzi ve diğ. 1993; Hajhashemi ve diğ. 2003; Bozin ve diğ. 2006; Delamare ve diğ. 2007; Carović-Stanko ve diğ. 2010; Hussain ve diğ. 2011). Bunların yanında germacrene-D, caryophyllene ve spathulenol ana seskiterpen bileşiklerini temsil eder (Daferera ve diğ. 2000; Mohagheghzadeh ve diğ. 2000; Aligiannis ve diğ. 2001; Arrigoni-Blank ve diğ. 2008). Lamiaceae türlerinin uçucu yağı yağ asitleri de içermektedir (Daferera ve diğ. 2000; Estévez ve diğ. 2007; Taarit ve diğ. 2010). Bunlar serbest şekilde bulunabilir veya digliserit ve trigliserit formunda bir araya gelebilir. Ayrıca yapıları orta (C14 ve C16) veya uzun zincirler (C18) gösterebilir (Frezza ve diğ. 2019).

Lamiaceae türleri, sağladıkları faydalı farmakolojik etki nedeniyle, tüm dünyadaki ülkelerin yöresel tıbbında kullanım geleneğine sahiptir. Ayrıca bu durum yüzyıllar geçse de hiç azalmamıştır. *Nepetoideae* alt familyası üyeleri dünya genelinde antimikrobiyal, antifungal, antiviral, insektisidal, antiseptik, antiinflamatuvar, sitotoksik ve antitümör ajanı olarak kullanılmaktadır (Rijo ve diğ. 2009; Zhong ve diğ. 2012; Taran ve diğ. 2013; Venditti ve diğ. 2017; Shahla 2012). Bunun yanında deri hastalıkları, romatizma, bronşit, soğuk algınlığı gibi hastalıklarda yöre halkı tarafından tercih edilmektedir (Rivera ve Obón 1995; Fernandez ve diğ. 2003; Liu ve diğ. 2007; Alnamer ve diğ. 2012; Sambath ve diğ. 2015).

2.2 *Ziziphora* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Lamiaceae familyasında yer alan ve tıbbi özelliği olan bazı türleri bünyesinde barındıran *Ziziphora* L. bu familyanın önemli bir cinsidir. *Ziziphora* dünyada Akdeniz ülkeleri, Doğu ve Batı Asya, Orta Avrupa ve Kuzey Afrika'da yayılış göstermekte olup 19 tür ve 31 taksonla temsil edilmektedir. Türkiye'de 5 türe bağlı 9 takson (Selvi ve diğ. 2015), İran'da ise 4 türle temsil edilmektedir (Mozaffarian 1996; Salehi ve diğ. 2005).

Ziziphora taksonlarında bulunan glandular tüyler (kapitat ve peltat türleri) bol miktarda uçucu yağ biriktirir ve salgılar. Bu nedenle etrafına keskin ve aromatik bir koku yayar (Satıl ve Selvi 2020). *Ziziphora* taksonunun uçucu yağları üzerine birçok kimyasal çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda uçucu yağların bileşiminde en çok bulunan bileşiğin “pulegone” olduğu görülmektedir (Kaya ve diğ. 2013). Monoterpen hidrokarbonların en öne çıkanları limonene ve β -pinene'dir (Konyalıoğlu ve diğ. 2006; Kılıç ve Bağcı 2013; Piryaei ve diğ. 2015). *Ziziphora* türleri üzerine yapılan çalışmaların çoğunda en çok bulunan bileşenlerin oksijenli monoterpenler olduğu görülmüştür. Ancak bazı durumlarda seskiterpen hidrokarbonlar da bol miktarda bulunabilmektedir (Ebrahimi ve diğ. 2009; Delnavazi ve diğ. 2014). Ebrahimi ve diğ. (2009), *Z. capitata* L. türünün eterik yağında, başlıca germacrene-D (%21,3), limonene (%7,8), β -caryophyllene (%7,5), bicyclogermacrene (%5,5) gibi seskiterpen hidrokarbonların yanında daha düşük miktarlarda spathulenol (%4,5) gibi oksijenli seskiterpenler bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ancak *Z. tenuior* L.'nin eterik yağları

hakkında benzer bir raporda seskiterpen hidrokarbonların (%25,8) ve oksijenli monoterpenlerin (%23,9) yüzdeleri arasında yalnızca küçük bir farkın olduğu rapor edilmiştir (Delnavazi ve diğ. 2014). Ayrıca, solvent ekstraksiyonu yaklaşımını kullanan Nadaf ve diğ. (2013), polar olmayan solvent *n*-hekzan kullanılarak *Z. persica* Bunge'nin toprak üstü kısımlarının ekstraktı için tamamen farklı bir profil bulmuşlardır. Bu ekstrakt esas olarak bis(2-ethylhexyl)1,2-benzenedicarboxylate (% 12,9), *n*-dodecane (% 12,5), *n*-decane (% 7,8), tetradecane (% 5,9), ethyl palmitate (% 4,1), and *n*-hexadecane (% 3,0) gibi bazı olağandışı bileşikleri içerdiği gösterilmiştir.

İran ve Türk geleneksel halk hekimliğinde *Ziziphora* türleri sakinleştirici, mide ağrısı ve gaz giderici gibi çeşitli amaçlarla infüzyon olarak kullanılmaktadır (Öztürk ve Ercişli 2007). İran'da bu bitkinin kurutulmuş toprak üstü kısımları soğuk algınlığı ve öksürük tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Zargari 1995). *Ziziphora* türleri ayrıca antiseptik ve yara iyileştirme gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Öztürk ve diğ. 1995). Geçtiğimiz yıllarda *Ziziphora* taksonlarına ait çeşitli esansiyel yağların, ekstraktların ve uçucu bileşenlerin kimyasal karakterizasyonu ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda farklı *Ziziphora* türlerinin uçucu yağlarını analiz etmek için gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. Ancak 1990'dan önce araştırmacılar ilgili profilleri taramak için genellikle alev iyonizasyon dedektörünü (FID) kullanmışlardır. Fakat, 1990'dan sonra bitki materyallerinden elde edilen çoğu uçucu yağ, GC-MS ile analiz edilmiştir (Mohammadhosseini 2017). Bu araştırmaların çoğunda, esansiyel yağların, ekstraktların veya uçucu bileşenlerin izolasyonu için *Ziziphora* cinsinin farklı türlerinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bu çalışmalardan yola çıkarak, *Ziziphora* cinsinde en sık tanımlanan bileşenin pulegone olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca sıklıkla oluşan diğer oksijenli monoterpen bileşikler izomenton, isopulegone, thymol, mentone, piperitone, piperitenone, neomentol, mentol, carvacrol, 1,8-cineole ve carvone'dur (Belyaev ve Demeubaeva 1999; Schulz ve diğ. 2005; Sonboli ve diğ. 2006; Behravan ve diğ. 2007; Kheirkhah ve diğ. 2015; Kakaei ve Shahbazi 2016).

Z. clinopodioides (Farsça: Kakoti Kohi; Türkçe: dağ reyhanı) çok yıllık bir bitkidir ve genellikle çok sayıda gövdesi olan bir çalıdır. Gövdeler kökten çıkar ve basit, dallanmamış yaprakları olan, 7-50 santimetre yüksekliğinde, dik, kıvrık veya

tırmanan bir yapısı vardır. Yapraklar genellikle kuyruklu olup, düz, mızrak şeklinde veya yumurta şeklinde olabilirler. Çiçeklenme yaprakları düz, dikdörtgen veya yumurta şeklinde ve çiçekler çoğunlukla sap başlarını oluşturan çok sayıda sap içermeyen başlar şeklinde, yeşil veya mor renkte tüp çiçeklerden oluşur. Çiçeklerin dudakları beyazdan pembe veya mora kadar değişen renklere sahiptir ve üst dudak düzdür, alt dudak ise üç eşit lobla bölünmüştür. Meyve, uzunlamasına oval, kahverengi renkte bir kapsül şeklindedir (Ghorbani Ranjbari ve diğ. 2016). *Z. clinopodioides* bitkisi, genellikle yarı kurak bölgelerin dağlık arazilerinde yetişen çok yıllık bir bitkidir. Bu bitkinin deniz seviyesinden 800 ile 3700 metre yüksekliğe kadar olan rakım aralığında yetiştiği rapor edilmiştir (Modiri ve diğ. 2013). *Z. clinopodioides*'in, İran'da dokuz alt türü bulunmaktadır. Bu bitkinin dünya çapında yayılışı ise Türkiye, Irak, Sibirya, Kafkasya, Orta Asya, Afganistan, Pakistan ve İran'ı içerir. İran'daki coğrafi yayılımı, Gülistan, Azerbaycan, Zencan, Kürdistan, İsfahan, Tahran, Kermanshah, Luristan, Hemedan, Fars, Chaharmahal ve Bakhtiari, Kerman, Hürmüzgan, Huzestan, Horasan, Semnan, Kohgiluyeh ve Boyer-Ahmad, Tehran, Gom, Gazvin, Merkazi ve Elborz illerini kapsamaktadır (Jamzad 2009).

Z. clinopodioides türünün farklı alttürleri, antibakteriyel (Salehi ve diğ. 2005; Sonboli ve diğ. 2006; Öztürk ve Erçişli 2007), antioksidan (Konyalioglu 2005), sindirim sistemini rahatlatma (Öztürk ve Erçişli 2007) ve soğuk algınlığına karşı koruyucu etkilere sahiptir. *Z. clinopodioides* bitkisinin ağrı kesici ve iltihap giderici etkileri de kanıtlanmıştır. Farklı *Ziziphora* türlerinde yüksek miktarda bulunan pulegone, gıda, ilaç ve sağlık endüstrilerindeki önemi nedeniyle, kurak ve yarı kurak bölgelerinde geniş coğrafi dağılıma sahip iki alttürü üzerinde çalışma yapılmıştır (Batooli ve diğ. 2012). Ayrıca, *Ziziphora*'nın toprak üstü kısmının alkol ekstraktı, menthol gibi bileşenler nedeniyle çeşitli kanser hücrelerinde (örneğin HT-29 ve T-47D hücre hatları) sitotoksositeye yol açabilir. (Azadmehr ve diğ. 2014). *Z. clinopodioides* türünün bileşenleri anti-tümör aktiviteye sahiptir ve bazı kötü huylu tümör türlerinin büyümesini %32,6 ve kanserli bezlerin büyümesini %5,47 azaltır (Chachoyan ve Oganesyanyan 1996) Araştırmacılar farklı *Z. clinopodioides* alttürlerinin esansiyel yağı ve ekstraktının anti-oksidant ve antimikrobiyal özelliklerinin etkisi araştırmış ve pulegone'un uçucu yağlarının etkin maddesi olduğu rapor etmişlerdir (Inouya ve diğ. 2001). Aynı zamanda gıda ürünlerinde koruyucu ve doğal aroma bileşiği olarak da önerilmektedir. (Mehraban Sengataş ve diğ. 2007) .

Sonboli ve diğ. (2006) gerçekleştirdiği çalışma ile *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech.f. taksonunun toprak üstü çiçekli kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimini GC-MS ile analiz etmişlerdir. Toplam yağın %97,1'ini temsil eden otuz iki bileşen belirlemişlerdir. Monoterpenlerden (%94,3), ana bileşenler olarak pulegone (%65,2), iso-neomenthol (%11,9), 1,8-cineole (%7,8) ve piperitenone (%6,5) ile yağın temel fraksiyonunu oluşturmuştur. Yağın ve ayrıca iki ana bileşenin (pulegone ve 1,8-cineole) antibakteriyel aktivitesi yedi bakteriye karşı test edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre yağın *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı 3,75 mg/ml MIC değeriyle ilginç antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Öztürk ve Ercişli (2007), gerçekleştirdikleri çalışma ile Türkiye'nin doğusundan toplanan *Ziziphora clinopodioides* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstraktının kimyasal bileşimlerini incelemiş ve 52 Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi açısından değerlendirmiştir. GC-MS analizleri ile de 18 kimyasal bileşik belirlenmiştir. Esansiyel yağların ana bileşenleri pulegone (%31,86), 1,8-cineole (%12,21), limonene (%10,48), menthol (%9,13), α -pinene (%6,88), menthone (%6,73), piperitenone (%5,30) ve piperitone (%4,18) olarak rapor edilmiştir.

Amiri (2009), *Z. clinopodioides*'in toprak üstü kısımlarından elde edilen eterik yağlardaki nicel ve nitel değişikliklere odaklanan bir çalışma yürütmüştür. İran'ın Lorestan bölgesinden toplanan örnekler üç gelişim evresine göre ayrılmıştır: çiçeklenme öncesi aşama, çiçeklenme aşaması ve çiçeklenme sonrası aşama. Bu dönemlere ait bitki uçucu yağ verimleri sırasıyla %1,1, %0,6 ve %0,8 (w/w) şeklinde sıralanmıştır. Bu çalışmada her üç aşamada da en yüksek orandaki bileşenin pulegone olduğu görülmüştür.

Sonboli ve diğ. (2010), İran'ın Hemedan Eyaletinden *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*'nın dokuz eterik yağının kimyasal bileşimlerini taramış ve sonuç olarak pulegonun yedi örnekte en bol bulunan bileşen olduğu ve sadece bir örnekte (neomentolden sonra) ikinci sırada yer aldığı bulunmuştur.

Z. tenuior'un toprak üstü kısımlarından elde edilen eterik yağların ve uçucu bileşenlerinin profili, her durumda pulegonun toplam eterik yağların %50'sinden

fazlasını oluşturduğunu göstermiştir (Piryaei ve diğ. 2015). Pulegone ayrıca Türkiye'nin Çoruh vadisinde yabani olarak yetişen *Z. clinopodioides*'ın sekiz ekotipinin tüm profillerinde en yüksek miktarda tespit edilen bileşiktir (Alp ve diğ. 2016). Son olarak pulegone, *Z. capitata*'nın toprak üstü kısımlarından ayrılan uçucu maddelerin ana bileşeni olarak gösterilmiştir (Mohammadhosseini ve diğ. 2016).

Ayrıca, Hint geleneksel tıbbında, *Z. clinopodioides*'nin kurutulmuş yaprakları tifo tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu bitkinin demlenmiş yaprakları ayrıca sıcak yaz aylarında serinletici içeceklerin yapımında ve süt ürünlerinin diğer türevlerinde kullanılır (Sajadi 2003). Bu bitkinin yaprakları ve çiçekleri, antiseptik ve anti-enflamatuar etkilere sahip olmaları nedeniyle soğuk algınlığının tedavisinde kullanılır, bu karışımın ağrı kesici ve iltihap giderici etkileri, farklı nane ailesi bitkilerinde bulunan bileşenler sayesinde iyi bir şekilde belirlenmiştir (Sezik ve diğ. 1991).

Z. clinopodioides türünün bileşenleri, antitümöral etkilere sahiptir ve bazı malign (kötü huylu) tümörlerin büyümesini %32'ye kadar ve kanserli lezyonları %47'ye kadar azaltabileceği gösterilmiştir (Chachoyan ve Oganessian 1996). *Z. clinopodioides* genellikle kalp rahatsızlıkları, yüksek tansiyon, bronşit, anormal kalp atışları, astım ve akciğer abseleri gibi sağlık sorunlarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Tian ve diğ. 2011).

Ghazanfari ve diğ. (2013), aralarında *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Zingiber officinale* Roscoe, *Z. clinopodioides* ve *Crocus sativus* L.'un da bulunduğu bazı bitkilerin ekstraktlarının mide kanseri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda Hücrelerin 1,0, 2,0 ve 5,0 mg/mL *Z. clinopodioides* uçucu yağı ile tedavi edildiğini rapor etmişlerdir. Eterik yağ, tedavi edilmemiş hücrelerine göre hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca hücrelerinin canlılığı açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

2.3 Kanser

Kanser, somatik hücrelerde genetik veya epitenal değişikliklerden kaynaklanan ve vücudun diğer kısımlarına yayılabilen anormal hücrelerin büyümesine neden olan ölümcül bir hastalıktır. 2018'de dünya çapında erkeklerde 9,5 milyon kadınlarda 8,5 milyon olmak üzere toplamda 18 milyon kanser vakası tespit edilmiştir. Dünyadaki en yüksek kanser oranı prostat, meme, akciğer, mide, kolon ve cilt kanseridir. Ancak insanları etkileyen 100 tip kanser bulunmaktadır. Son zamanlarda, kanser tedavisi için daha etkili ve doğru ilaçlar ortaya koymak üzere çok fazla araştırma yapılmaktadır. Böylece hastayı en kısa sürede geri kazanmaya ve hastanın sağlığına kavuşmasına yardımcı olmaya çalışılmaktadır (Saini ve diğ. 2020). Kanser řu anda önde gelen ölüm nedenidir ve ölümlerin çoğu akciğer, karaciğer, mide, kolorektal, meme, prostat ve özofagus kanserleridir. Önümüzdeki yirmi yılda kanser vakalarının günümüze göre %70 oranında artması beklenmektedir (WHO 2015).

Karsinogenezin farklı aşamaları, kanserin evrimsel doğasının gereği, tedaviye duyarlılıkta değişikliklere yol açan farklı kemoterapötik yaklaşımlar gerektirir. Spesifik olarak, tümör progresyonu, diğerleri arasında hücre proliferasyonu, apoptoz ve DNA onarımında yer alan faktörler için mutasyonların birikmesi yoluyla genetik ile ilişkilidir (Sarroc ve diğ. 2005). Kemoterapi ilaçları, hücresel proliferasyon inhibisyonu, artan hücre ölümü oranı ve tümör hücresi farklılaşmasının indüklenmesi gibi yollarla ilerleme aşamasında kansere etki etmektedir (Cosse ve Michiels 2008).

Kolorektal kanser dünya genelinde en yaygın üçüncü kanser türü olup, en çok ölüme neden olan kanser türleri arasında ikinci sıradadır. Kanser Araştırma Merkezi'nin araştırmasına göre, 2020'de dünya çapında yaklaşık 1,89 milyon yeni kolorektal kanser vakası tespit edilmiş ve bunların yaklaşık 916.000'i ölümle sonuçlanmıştır. Kolon kanseri, yeni teşhis edilen tüm vakalarının yaklaşık %38,8'ini oluşturmuş (Sung ve diğ. 2021) ve bu vakaların çoğu başlangıçta lokalize bir hastalık olarak belirlenmiştir (Siegel ve diğ. 2020). Kolorektal kanser, dünya genelinde özellikle yetişkinler arasında yaygın olan bir hastalıktır. Bu kötü huylu tümörü engellemek için minimal yan etkilerle yeni yöntemlere acil bir ihtiyaç bulunmaktadır. Günümüzde, kanseri tedavi etmek için çeşitli kimya, kemoterapi ve radyoterapi teknikleri kullanılmaktadır. Ancak yeni tedavi yöntemlerinin hareketine yönelik

araştırmaları yönlendiren sağlıklı hücreleri kaybetmenin yan etkilerinden biridir (Akbari ve diğ. 2014; Rawla ve diğ. 2019). CACO-2, laboratuvar ve kliniklerde epitel hücre kanseri ve kolorektal kanser tedavisinin davranışını taklit etmek için en yaygın epitel hatlarından biri olan bir adenokarsinom hücrelidir (Ahmed ve diğ. 2017; Hirsch ve diğ. 2020). Kolon ve rektum duvarlarında oluşan polipler sıklıkla 50 yaş üstü kişilerde görülen kitlelerdir. Bu poliplerin çoğu zararsızdır, yani kanserli değildirler ancak bazı türleri, özellikle de adenomlar gelecekte kanserli hale gelebilmektedir. Poliplerin erken tespiti ve çıkarılması kolorektal kansere yakalanma riskini önemli ölçüde azaltabilir. Kolon kanserine yakalanma riski yaşla birlikte artar ve tanı konulan ortalama yaş 72 olarak görölmektedir (Aydınlı 2011). Çevresel ve genetik faktörler kolorektal kolon kanseri olasılığını arttırır (Chan 2010). Fakat aile geçmişi gibi genetik faktörlerin ya da günlük fiziksel aktivitelerin kolon kanser ile olan detaylı ilişkisi halen yeterli şekilde açıklanamamıştır (Wei ve diğ. 2004). Aile adenomatozu (FAP) ve terapötik olmayan kolorektal kanser (HNPCC) CRC vakalarının %5'inden daha azını oluşursa da, aile kolon kanserlerinde en yaygın olanlarıdır (Leon ve diğ. 1993; Burt ve diğ. 1995).

Kolorektal kanser öyküsü olan kişilerin, özellikle de genç yaşta teşhis edilenlerin yakın akrabalarında (anne, baba, kardeş veya çocuklar) hastalığa yakalanma riski daha yüksektir. Birden fazla akrabada kolorektal kanser öyküsü varsa risk önemli ölçüde artabilir. Bazı genlerdeki meydana gelen mutasyonlar kolorektal kansere yakalanma riskini arttırabilir. Örneğin herediter non-polipozis kolorektal kanserdir (HNPCC) olarak bilinen kalıtsal olmayan kolon kanseri genetik bir hastalıktır ve tüm kolon kanseri vakalarının yaklaşık %2'sini oluşturur. HNPCC'deki genetik değişiklikler sıklıkla kolon kanserine yol açaabilir ve tanı anında ortalama yaş 44'tür. (Lynch ve diğ. 1993).

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) adı verilen nadir bir hastalık vardır. Bu hastalıkta kolon ve rektumda adenomatöz polipozis coli geni APC adı verilen spesifik bir gendeki değişikliğin neden olduğu yüzlerce polip oluşur. Tedavi edilmezse FAP, genellikle 40 yaşına gelindiğinde kolorektal kansere yol açaabilir. Ancak bu hastalık genellikle kolon ve rektumun tamamının çıkarılmasıyla tedavi edilebilir. Bu nedenle poliplerin zamanında tespiti ve düzenli taramalarla uzaklaştırılması kolorektal kanser riskinin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca aile öyküsü, genetik faktörler

ve belirli yaş aralıklarında yapılan taramalar da erken tanı ve tedavi süreçlerinde oldukça önemlidir (Crawford 1997).

Bitkisel ilaç çalışmaları sadece bitkilerdeki aktif bileşenleri tanımlamak için değil aynı zamanda bitkilerin tıbbi özelliklerine bilimsel destek sağlamak amacıyla da yapılmaktadır (Ahmadi ve diğ. 2021). Ayrıca literatür sıklıkla tıbbi bitkiler ve bileşenlerinin hastalıkların önlenmesinde kullanıldığı bildirilmektedir (Çınar 2018). Artık birçok kişi tıbbi bitkileri kullandığından, insan sağlığına etkilerinin anlaşılabilmesi için besin maddelerinin bileşiminin belirlenmesi de önemlidir (Ekor 2014). Bitkilerdeki bu bileşikler hücrelerin, genlerin ve membran fonksiyonlarının bakımı ve düzenlenmesinde de rol oynayabilmektedir (AbdulSattar ve diğ. 2012).

Doğal ürünler, yüzyıllardır farklı kültürler tarafından kullanılmakta, geleneksel ve tamamlayıcı tıbbın temelini oluşturmaktadır (Petrovska 2012). Bu doğal kaynakların ve bunlardan izole edilen bileşiklerin çok büyük bir kısmı antikanser, antioksidan, immünomodülatör, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikler gibi çok sayıda terapötik etki göstermektedir (Michel ve diğ. 2020). Kimyasal bileşimlerine göre, uçucu yağlar genel olarak oksijenli bileşikler ve hidrokarbonlar olarak sınıflandırılır (Bakkali ve diğ. 2007). Oksijenli bileşikler arasında esterler, aldehitler, ketonlar, alkoller ve fenoller bulunur. Diğer aktif gruplar arasında aromatikler ve kükürt içeren bileşenler bulunur (Legault ve diğ. 2007; Van de Vel ve diğ. 2019). Hidrokarbon bileşikleri, terpen adı verilen özel bir kimyasal gruptan oluşur ve değişen sayıda izopren birimi (C₅) içerirler. Monoterpenler 10 ve seskiterpenler 15 ve diterpenler 20 karbon içermektedir. Monoterpenler, uçucu yağları genel bileşenlerinin %90'ına katkıda bulunur. Hem monoterpenler hem de seskiterpenler, diğer biyolojik olarak aktif fonksiyonel gruplarla (monoterpenoidler) birleşerek ve oksijenli grupların (seskiterpenoidler) kimyasal yeniden düzenlenmesi ve eklenmesi yoluyla çok çeşitli yapılar sunmaktadır. Terpenler ayrıca asiklik, monosiklik veya bisiklik olabilir, ve bir aromatik grup içerebilir. İzopren zinciri ne kadar uzun olursa, olası kimyasal varyasyonlar o kadar fazla olabilmektedir (Bakkali ve diğ. 2007).

2.4 Tezin Amacı

Bu çalışma ile İran’da doğal olarak yayılış gösteren ve halk tarafından sıklıkla tüketilen *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* taksonundan elde edilen uçucu yağın terpen içeriği GC-MS analizi ile belirlenmesi ilk amaç olarak belirlenmiştir. Devamında uçucu yağın insan kolon (CACO-2 ve HCT116) kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin taranması hedeflenmiştir. Son olarak da kanser hücre hatları üzerindeki apoptoz analizleri ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1 Bitki Materyalinin Toplanması

Bitki materyali olan *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* örnekleri 2022 yılında İran'ın Kuzey Horasan eyaletinin Bojnord şehrine bağlı Lenger, Goreh Nodeh ve Baba Aman köylerinden çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri genel herbaryum tekniklerine uygun bir şekilde preslenmiş ve kurutulmuştur (Herbaryum no: GSE-2490). Uçucu yağın eldesi için toplanan örneklerin toprak üstü kısımları kuru ve serin bir yerde kurutulmuştur. Herbaryum haline getirilen örnekler Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kimyasal Ekoloji Laboratuvarında muhafaza edilmektedir.

Kurutulmuş ve parçalanmış bitki örnekleri tartım işleminden sonra Clevenger cihazına yerleştirilmiş (yaklaşık 100 gr olacak şekilde), distile su ilave edilip yaklaşık 4 saat distilasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Uçucu yağların verimleri ml/100 g bitki örneği cinsinden hesaplanmış ve analiz edilinceye kadar +4°C'de amber şişelerde muhafaza edilmiştir.

3.2 Uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS Analizleri

Z. clinopodioides subsp. *rigida* türüne ait uçucu yağların kimyasal bileşenlerinin analizleri GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi, Agilent GC Type, 7820A, MSD 5795, Agilent,. USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu analizler Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kimyasal Ekoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Cihaza ait kullanılacak bazı metot bilgileri ise şöyledir; 30 m uzunluğunda kapillar kolon (HP-5MS) kullanılmıştır. Kolon özelliği ID 0,25 mm, film kalınlığı 0,25 mm (Hewlett Packard) şeklindedir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış ve terpenlere ait sıcaklık programı ise 50 °C'den 250 °C'ye artış hızı 5 °C/dk olacak şekilde düzenlenmiştir. İyon kaynağı sıcaklığı 230 °C olarak ayarlanmıştır. Her bir bileşiğe ait değerler yüzdelik olarak hesaplanmıştır. Çalışma konusu olan bitkinin uçucu yağı 1/100 oranında *n*-hekzan ile seyreltilmiş ve analiz

edilmiştir. Cihazın kütle okumalarına ait kütüphaneler Wiley 7 MS ve NIST02 olarak kullanılmıştır.

3.3 Malzemeler

3.3.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki şekilde listelenmektedir:

- * Kristal Viyole (Merck, 548-62-9)
- * Etanol (%99,8, Sigma 51976)
- * *n*-hekzan (%99,8, Sigma 34859)
- * Metanol (%99,8, Sigma 322415)
- * DMSO, Dimetil sülfoksit (Carlo Erba 445106)
- * PBS, Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Biowest L0616)
- * DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma D1145)
- * Tripsin-EDTA (Sigma T3924)
- * L-glutamin (Gibco 25030081)
- * FBS, Fetal Sığır Serumumu (Biowest S1810)
- * Tripan Blue (Biological Industries 2041813)
- * Penisilin (Capricorn PS-B)

3.3.2 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar aşağıdaki şekilde listelenmektedir:

- * Etüv (Nüve, EN055)
- * CO₂ İnkübatörü (Nüve, EC160)
- * Biyogüvenlik Kabini (Nüve, MN 120)
- * Santrifüj (Zentrifugen, Mikro, 200R)

- * Mini Santrifüj (Zentrifugen, EBA20)
- * Otoklav (Nüve, OT40L)
- * Ultra Derin Dondurucu (Nüve, DF490)
- * Yatay Jel Elektroforez Sistemi (Major Science, ME20)
- * Jel Görüntüleme Cihazı (gelLite, Cleaver Scientific)
- * Güç Kaynağı (Major Science, MP-30V)
- * Vorteks (Dragon Lab, MX-F)
- * Spektrofotometre (Epoch, BioTek)
- * Take 3 NanoDrop Aparatı (Epoch, BioTek)
- * Hassas Terazı (Denver Instrument, SI-234)
- * Çalkalamalı İnkübatör (Comecta, WY-100)
- * Işık Mikroskobu (Olympus, CX21)
- * StepOnePlus Gerçek Zamanlı-PZR Sistemi (Applied Biosystems, Thermo).
- * PCR (Optimus, 96G)
- * Saf Su Cihazı (New Human Power, I S-UV).

3.4 Hücre kültürü ve sitotoksitenin belirlenmesi

Çalışma için kullanılmak üzere *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* taksonundan elde edilen uçucu yağın sitotoksik aktiviteleri; insan kolon (CACO-2 ve HCT116) kanser hücre hatları ve sağlıklı insan embriyonik böbrek (HEK293) hücre hattı üzerinde test edilmiştir. Projede kullanılacak hücre hatları 37°C’de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde ve %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyerinde çoğaltılmış ve yaklaşık %85 yoğunluğa ulaştığında uygulama yapılmıştır. Uçucu yağın hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) kullanılarak tespit edilmiştir. Özetle, uçucu yağ farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş hücrelere (her kuyucuğa 2x10³ hücre olacak şekilde) uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyon edilmiştir. Özüt ve saflaştırılan maddeler konsantrasyonu %0,5'i geçmeyecek şekilde dimetilsülfoksit Dimethyl sulfoxide (DMSO) ile çözülmüş ve kontrol hücreleri için de aynı konsantrasyonda çözücü uygulanmıştır. 24 saat sonra, besiyeri dikkatlice uzaklaştırılmış ve 100 µl yeni besiyeri ortamı ile 10 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve 37°C’de 4 saatlik inkübasyonun sonunda

ortaya çıkan formazon kristelleri 50 µl DMSO eklenerek çözülmesi sağlanmıştır. Absorbans, bir mikropilaka spektrofotometre okuyucu kullanılarak 590nm’de ölçülmüş ve hücre canlılık yüzdesi değerlendirilmiştir. Verilerin yüzdesi hesaplanarak elde edilecek olan EC50 (Yarı maksimal etkili konsantrasyon) değeri ilgili hücrelerde sonraki analizlerde kullanılmıştır.

3.5 Apoptozun Belirlenmesi

Sitotoksik aktiviteye sahip uçucu yağın etkili (EC50) dozlarının uygulandığı hücreler Annexin-V ve Propidyum İyodür (PI) ile boyanmış, flow sitometri cihazına (CytoFLEX, Beckman Coulter) yüklenmiş ve CytExpert programı ile analiz edilmiştir. Bu amaçla hücreler tripsin-EDTA (Ethylendiaminetetraacetic acid) yardımıyla kaldırıldıktan sonra 2000 rpm 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı uzaklaştırılmıştır. Ardından, PBS (Public Broadcasting Service) ardımıyla yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilmiştir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda bağlanma tamponu içerisinde Annexin-V ve PI boya ile muamele edilen hücreler 15-20 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra cihaza yüklenmiştir. Cihazda görüntülenen ve analiz edilen örneklerin canlı, apoptotik ve nekrotik/ölü hücre yüzdeleri elde edilmiştir.

3.6 Apoptozda görev alan genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonlarının analizi

Apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri Gerçek Zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile kantite edilmiştir; kullanılan ileri ve geri primer dizileri Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Bu amaçla, Total RNA (Ribonükleik asit) izolasyonu Analytik Jena markasının innuPREP RNA Mini Kit’i kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ uygulanan yaklaşık 1×10^6 hücreden elde edilen RNA’lar -80°C ’de saklanmıştır. Ayrıca elde edilen RNA kalitesi %1’lik agaroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna görüntülenmiştir ve Epoch

Mikroplaka Spektrofotometre yardımıyla 260/280 nm ölçümü ile miktarı belirlenerek cDNA sentezi sırasında 5 µg RNA kullanılması sağlanmıştır.

Elde edilen RNA'lerden cDNA (Komplementer DNA) entezi ABM markasının OneScript cDNA Sentez Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokolu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, gerçek zamanlı RT-PZR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Yukarıda belirtilen genlerin ekspresyon düzeylerine incelemek için, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptanmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemi "SyberGreen I" kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 5 µl cDNA (1/10 kez seyreltilmiş), 15 µl "SyberGreen I", primer, Taq polimeraz ve steril su içeren karışımın karıştırılarak PZR cihazının içerisine yerleştirilmiştir. Tüm genler için bu ön optimizasyon yapılarak uygun koşullar belirlenmiştir.

Tablo 3.1: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri

Genler	İleri Primer Dizisi	Geri Primer Dizisi
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<i>P53</i>	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
<i>BAX</i>	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
<i>BCL2</i>	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<i>CASP3</i>	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
<i>CASP8</i>	AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA	TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
<i>CASP9</i>	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

3.7 İstatistiksel Analiz

Tüm veriler üç tekrar halinde ölçülmüş ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. Kontrol ve *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulanan gruplar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar için GraphPad Prism v.9 uygulaması kullanılmıştır ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının kimyasal bileşimi

Bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın analizi GC-MS ile tanımlanmıştır. Yağ verimi 0,80 (v/w) olarak kaydedilmiştir. *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* taksonunun toplam uçucu yağının %95,08'ini temsil eden ve ana bileşenleri piperitone (%22,26), isomenthone (%14,00), menthol (%9,82), eugenol (%8,94) ve thymol (%8,43) olan toplamda 37 farklı bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının kimyasal bileşimi

No	RI ^a	RI ^b	Bileşik ^c	%
1	928	924	α -thujene	0,06
2	936	932	α -pinene	0,69
3	950	946	camphene	0,25
4	978	974	β -pinene	1,05
5	982	974	1-octen-3-ol	0,09
6	984	979	3-octanone	0,06
7	990	988	β -myrcene	0,14
8	993	988	3-octanol	0,20
9	1004	1004	3-hexenyl acetate	0,09
10	1017	1014	α -terpinene	0,15
11	1032	1026	1,8-cineole	7,64
12	1060	1054	γ -terpinene	2,05
13	1087	1086	α -terpinolene	0,39
14	1099	1095	linalool	0,78
15	1159	1158	isomenthone	14,00
16	1177	1174	terpinene-4-ol	1,91
17	1180	1179	menthol	9,82
18	1192	1195	myrthenal	0,24
19	1234	1233	pulegone	3,30
20	1254	1249	piperitone	22,26
21	1290	1289	thymol	8,43
22	1299	1298	carvacrol	5,62
23	1358	1356	eugenol	8,94
24	1380	1379	geranyl acetate	0,82
25	1406	1408	trans- β -caryophyllene	1,47
26	1480	1484	germacrene-D	1,38
27	1486	1487	β -ionene	0,07

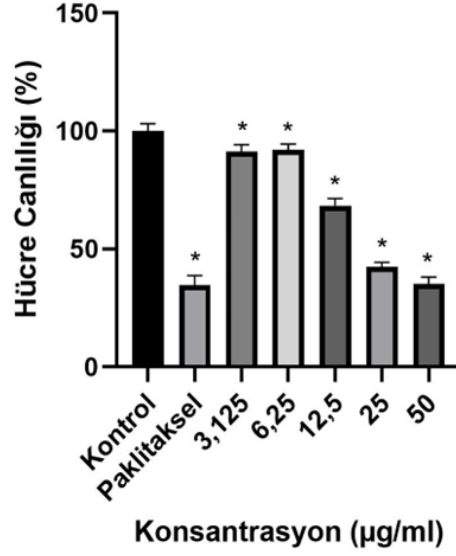
28	1508	1505	β -bisabolene	0,17
29	1513	1513	γ -cadinene	0,18
30	1523	1522	δ -cadinene	0,31
31	1560	1561	cis-nerolidol	0,14
32	1576	1577	spathulenol	0,63
33	1581	1582	caryophyllene oxide	1,00
34	1604	1608	humule epoxide II	0,32
35	1643	1644	α -muurolol	0,18
36	2091	2095	methyl linolenate	0,16
37	2126	2124	methyl octadecanoate	0,11

^a Babushok ve diğ. (2011), ^b Adams, (2007), ^c Bileşikler GC kolonunun (HP-5MS) alıkonma sırasına göre listelenmiştir.

4.2 Sitotoksosite sonuçları

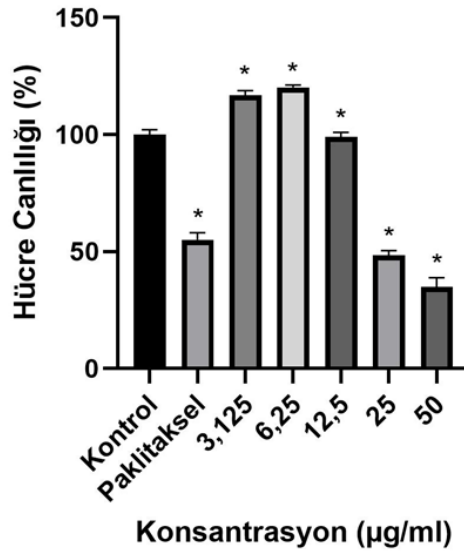
Çalışma için kullanılmak üzere *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* taksonundan elde edilen uçucu yağın sitotoksik aktiviteleri; insan kolon (CACO-2 ve HCT116) kanser hücre hatları ve kontrol hücresi olarak sağlıklı insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) üzerinde test edilmiştir. CACO-2, HCT116 ve HEK293 hücre hatları 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde ve %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır ve yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında 96 kuyuculu plakalara 2x10³ ekilmiştir. *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağı DMSO ile çözülmüş ve farklı konsantrasyonları (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL) ile 24 saatlik muamele edilmiştir ve pozitif kontrol olarak paklitaksel (13,7 µM) kullanılmıştır. Muamele süresinin sonunda MTT yönetimi ile elde edilen sonuçları Excel ve Graphpad uygulamaların yardımıyla analiz edilmiştir (Şekil 4.1-3).

Kolon kanser hücre hattı (CACO-2) üzerinde *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* taksonundan elde edilen uçucu yağın farklı konsantrasyonları (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL) ile 24 saatlik muamele ardından elde edilen sonuçlar incelendiğinde sitotoksosite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1) ve yarımaksimal dozu (EC50) Tablo 4.2'de verilmiştir.



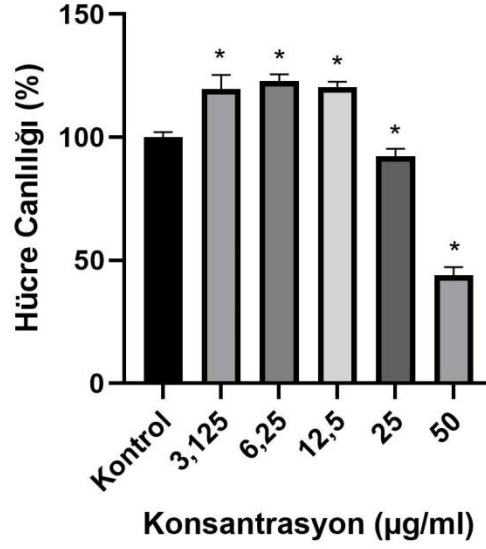
Şekil 4.1: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının insan kolon kanseri (CACO-2) hücre canlılığına etkisi. *Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p<0,05$).

Z. clinopodioides subsp. *rigida* yağının farklı konsantrasyonları (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL) ile HCT116 hücre hattında 24 saatlik uygulama sonunda ardından elde edilen sonuçlara göre *Z. clinopodioides* yağının HCT116 üzerinde sitotoksikiteye sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2) ve EC50 değeri Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının insan kolon kanseri (HCT116) hücre canlılığına etkisi. *Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p<0,05$).

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) üzerinde *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağın farklı konsantrasyonları (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 μ M) ile 24 saatlik muamele ardından elde edile sonuçları incelendiğinde sitotoksosite gösterdiğini ancak kanser hücre hatlarındaki etkilerine kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3) ve yarımaksimal dozu (EC50) Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.3: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) hücre canlılığına etkisi. *Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p < 0,05$).

Tablo 4.2: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* bileşiklerin 24 saat EC50 (μ g/mL) değerleri

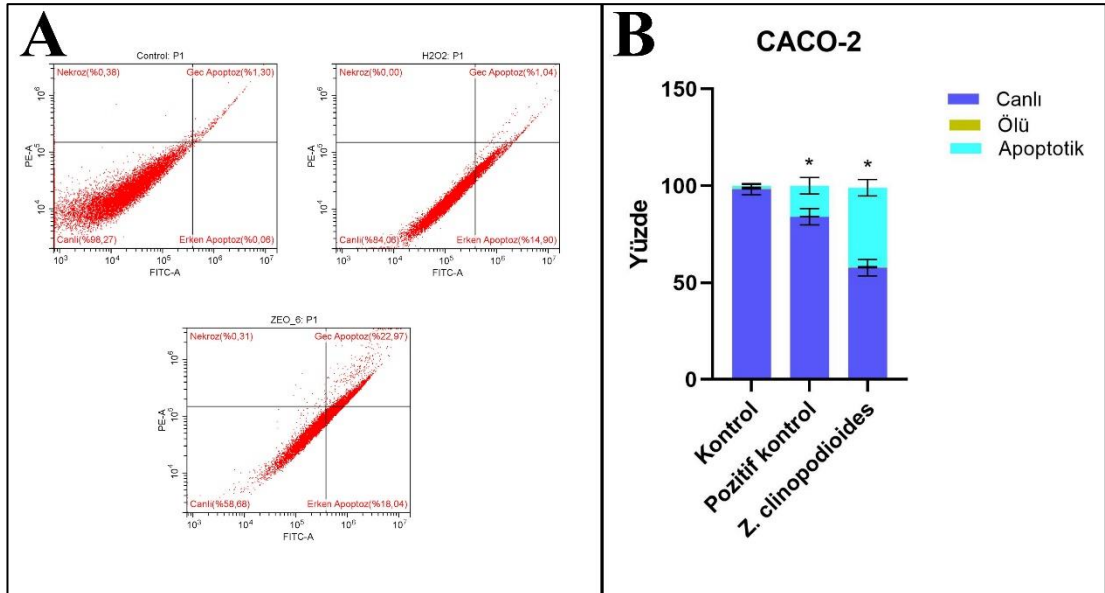
	CAO-2	HCT116	HEK293
EC50	19,271	22,716	46,592
SD	0,59	0,375	0,567

4.3 Apoptoz Analizleri

4.3.1 Annexin-V/PI Boyama Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi amacıyla boyunca *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının etkili dozları (EC50) CACO-2 ve HCT116 kanser hücre hatlarına 24 saat uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak 0,2 mM H₂O₂ kullanılmıştır. 24 saat sonra besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantları uzaklaştırılmış ve hücre peleti PBS ile yıkanmış tekrar. Hücrelerin canlı, ölü ve erken ve geç apoptotik oranları Annexin-V/FITC apoptoz kiti ile gerçekleştirilmiştir ve floresan görüntü sitometri cihazında analiz edilmiştir (Şekil 4.4-5).

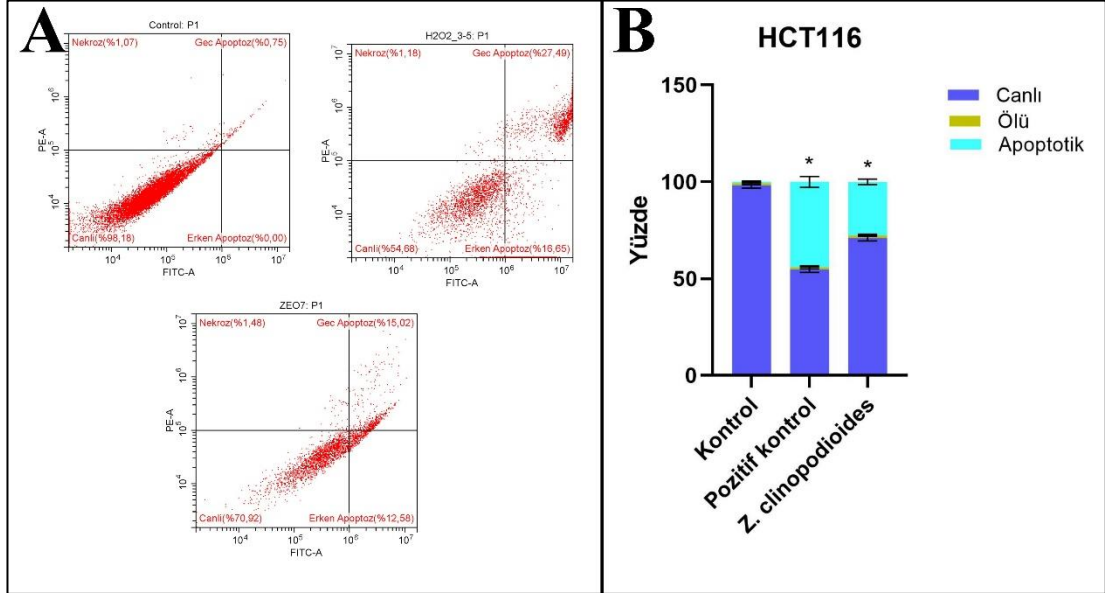
CACO-2 hücre hattına 24 saat boyunca *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulandığında, kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla %98,27, %0,38 ve %1,36 olarak bulunurken, pozitif kontrol grubunda sırasıyla %84,06, %0,00 ve %15,94 olarak belirlenmiştir. Doz grubunda ise hücre dağılımı %58,68 canlı, %0,31 ölü ve %41,01 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının 24 saatlik uygulamasının CACO-2 hücre hattının apoptozuna etkisi. **a)** floresan görüntü sitometri cihazında görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzdelerin çubuk grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H₂O₂.

* Negatif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p < 0,05$).

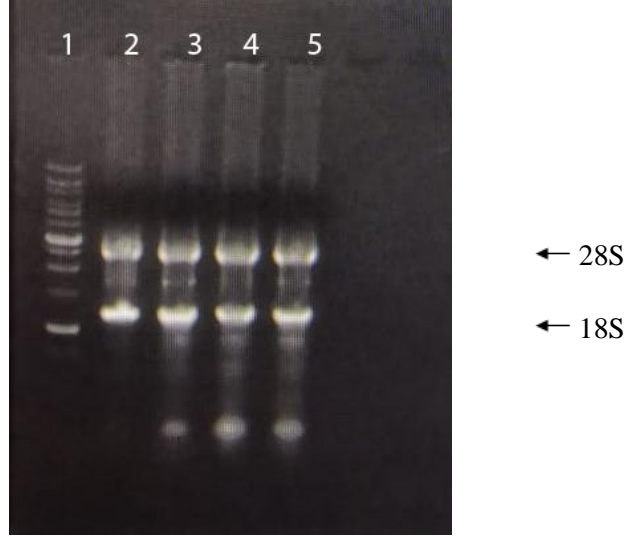
HCT116 hücre hattına 24 saat boyunca *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulandığında, kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla %98,18, %1,07 ve %0,75 olarak bulunurken, pozitif kontrol grubunda sırasıyla %54,68, %1,18 ve %44,14 olarak belirlenmiştir. Doz grubunda ise hücre dağılımı %70,92 canlı, %1,45 ölü ve %27,58 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının 24 saatlik uygulamasının HCT116 hücre hattının apoptozuna etkisi. **a)** floresan görüntü sitometri cihazında görüntüleri ve **b)** canlı, ölü ve apoptotik yüzdelerin çubuk grafiği. Pozitif kontrol: 0,2 mM H₂O₂. * Negatif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p < 0,05$).

4.4 Toplam RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi

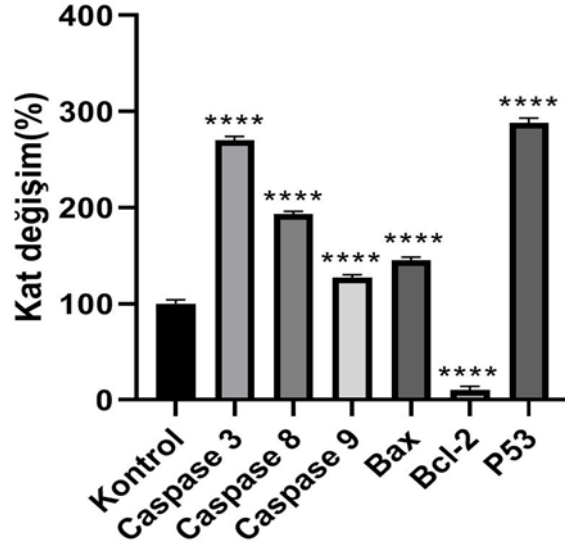
CACO-2, HCT116 hücre hatları %80 ile 90 yoğunluğa ulaştığında 6 kuyucuklu plakalara 30×10^3 hücre ekilmiş ve *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının EC50 konsantrasyonları ile 24 saatlik muamele edilmiştir. Ardından hücreleri parçalamak üzere trizol (RiboEX) 500 µl verilmiş ve kazıyarak toplanmış ve GeneAll protokoluna göre toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. %1 agaroz jele yüklenmiş ve 90 Volt, 500 mA'de 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda jel UV transilluminatörde Jel Görüntüleme Cihazı'nda görüntülenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının 24 saat uygulamalarının ardından CACO-2, HCT116, hücre hattından elde edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa (1) Marker, (2) CACO-2 Kontrol, (3) *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulanmış CACO-2, (4) HCT116 kontrol, (5) *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulanmış HCT116.

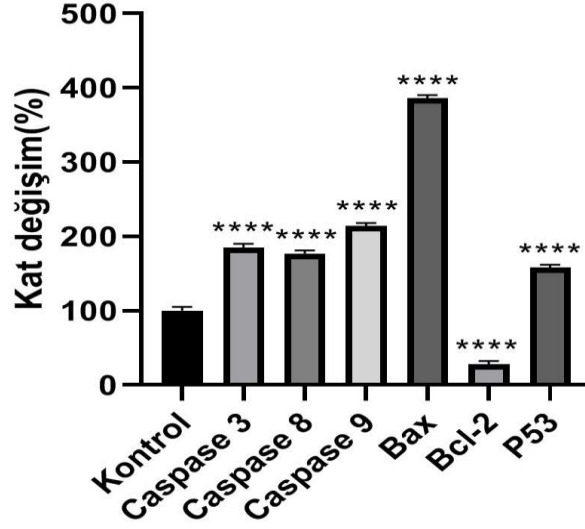
4.5 Apoptozda Görev Alan Genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Analizi

CACO-2 ve HCT116 hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmalarında belirlenen *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının etkili dozları (EC50) 24 saatlik uygulanması sonucunda, Apoptotik yollarda rol alan *BAX*, *P53*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* ve *BCL2* genlerin mRNA düzeylerinde değişiklikleri Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının EC50 dozunun CACO-2 üzerinde 24 saat uygulanması ardından izole edilen RNA'lar cDNA'ya çevirilmiş; RT-PZR ile elde edilen Ct (döngü eşik) değerleri incelendiğinde anti-apoptotik geni olan *BCL2*'de %89,49 düşüş saptanmış, ayrıca apoptoz genleri olan *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*, *BAX* ve *P53*'ün sırasıyla, 2,7; 1,93; 1,27; 1,45 ve 2,88 kat artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: CACO-2 hücre hattında apoptotik yollarda görev alan *BCL2*, *BAX*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* ve *P53*'ün mRNA düzeylerine EC50 dozu sonrası etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değeri %100 olarak kabul edilmiş ****: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p < 0,01$).

Z. clinopodioides subsp. *rigida* yağının EC50 dozunun HCT116 üzerinde 24 saat uygulanması ardından izole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir ve RT-PZR yardımıyla elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri incelendiğinde *BCL2*'de %71,38 oranında bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*, *BAX* ve *P53* genlerinde sırasıyla, 1,85; 1,77; 2,14; 3,86 ve 1,58 kat artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: HCT116 hücre hattında apoptotik yollarda görev alan *BCL2*, *BAX*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9* ve *P53*'ün mRNA düzeylerine EC50 dozu sonrası etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değeri %100 olarak kabul edilmiş ****: Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda farklıdır ($p < 0,01$).

Kanser, bir dizi genomik/moleküler değişikliğin hücrelerin kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına neden olan ve vücudu etkilenen kısımlarında doku kütlelerinde hızlı bir artışa neden olduğu heterojen ve çok faktörlü bir hastalıktır (Janssen ve diğ. 2017). Normal koşullar altında bir hücre, ölmesi ve yerine genç ve sağlıklı bir hücrenin gelmesi için sinyaller almaktadır. Kanser hücreleri vücudun oksijenini ve takviyelerini kullanarak büyür ve diğer hücreleri düzenli takviyelerden ve büyüme faktörlerinden mahrum bırakmaktadır. Kanserli hücreler kendi ihtiyaçlarını karşılamak için diğer hücrelerin fizyolojisinden yararlanabilmektedir (Laplagne ve diğ. 2019).

Kolorektal kanser olarak da bilinen kolon kanseri, kolon veya rektumdan kaynaklanan yaygın ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir kanser türüdür. Kalın bağırsağın iç kısmındaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanır ve tümör oluşumuna yol açmaktadır. Kolon kanseri, milyonlarca kişiyi etkileyen ve sağlık sistemleri üzerinde önemli bir yük oluşturan önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kolorektal kanser, her iki cinsiyet için de üçüncü en yaygın tanı ve ikinci en ölümcül malignitedir. Yeni vakaların ve ölümlerin görülme sıklığını önlemek amacıyla, araştırmacılar tarafından yoğun ilgi ve yeni ilaç adayları geliştirmek için çalışmaları sürdürmektedir (Saran ve diğ. 2023).

Bu çalışmada *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının, insan kolon kanser hücre hatları (CACO-2 ve HCT116) üzerinde sitotoksik etkisi ve apoptotik potansiyelini araştırmak amacıyla planlanmıştır. Kolon kanser hücre hatları (CACO-2 ve HCT116), sağlıklı embironik hücre hattı (Hek293) kontrol hücresi olarak kullanılarak hücre canlılık testi MTT yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının farklı konsantrasyonları (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL) ile seçilen hücre hatlarında 24 saatlik muamele edilmiş ve sürenin sonunda MTT solüsyonu (5mg/ml) uygulanmış, 2-4 saat inkübe edilmiş ve oluşan farmazonu DMSO ile çözülmüştür. Edilen verilere göre, CACO-2 ve HCT116 hücre hatlarında sırasıyla (19.27, 22.716 µg/mL) yarı-maksimal dozu bulunmuştur (tablo 2'de). Ayrıca kontrol olarak kullanılmış sağlıklı embironik hücresinde ise (46.592 µg/mL) yarı-maksimal dozu belirlenmiştir (Tablo 2). Bu sonuçların doğrultusunda, *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağı kolon kanser hücre hatlarında düşük konsantrasyonlarda sitotoksikite etki gösterirken sağlıklı hücre hattında ise daha yüksek dozlara da sitotoksikite etkisi kaydedilmiştir (Şekil 4.1-3).

Ghazanfari ve diğ. (2013) tarafından mide kanser hücre hattı (AGS) üzerinde *Z. clinopodioides* sulu ekstraktının sitotoksik etkilerini incelenmiştir. *Z. clinopodioides* sulu ekstraktının farklı konsantrasyonları (1, 2 ve 5 mg/mL) ile AGS hücre hattında 48 ve 72 saatlik muamele edilmiş ve MTT yöntemi ile hücre canlılık testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Z. clinopodioides* sulu ekstraktı doz ve süreye bağlı bir sitotoksikite gösterdiği ve 72 saatte hücre canlılığı yaklaşık %88 oranında azaldığı bulunmuştur.

Yousefbeyk ve diğ. (2016) gerçekleştikleri çalışmalarda, kolon karsinomu (H-T29), lösemi (K-526), meme duktal karsinomu (T-47D) ve İsviçre fare embriyo fibroblastı (NIH-3T3) hücre hatlarında *Z. clinopodioides* n-hekzan fraksiyonu ile uygulayarak sitotoksikite etkileri incelenmiştir. Sitotoksikite değerlendirmesinin sonuçları göre *Z. clinopodioides* n-hekzan fraksiyonu, önemli bir aktivite olmamasına rağmen, T-47D ve K-562 hücre hatlarında sırasıyla $77,41 \pm 12,89$ ve $80 \pm 2,56$ µg/mL EC50 seviyesiyle toksisite gösteren bir etki saptanmıştır.

Mahdavi ve diğ. (2020), *Z. clinopodioides* yapraklarının sulu ekstraktı kullanılarak titanyum nanopartikülleri ile insan göbek damarı endotel hücreleri

üzerinde sitotoksosite etkileri araştırılmıştır, Sentezlenen, doza bağlı olarak hücre canlılığına sahip olduğunu ve sitotoksik olmadığını saptanmıştır.

Sitotoksosite çalışmalarının sonucunda EC50 gösteren *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağı CACO-2 ve HCT116 hücre hatlarında apoptoz etkileri incelemek üzere 24 saatlik uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre CACO-2 ve HCT116 hücre hatlarında kontrol ve proksit kontrol (H₂O₂) gruplarıyla kıyaslanarak apoptotik etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.1-3). *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* ucuu yağının EC50 değeri ile CACO-2 hücre hattına 24 saat boyunca uygulandığında, kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla %98,27, %0,38 ve %1,36 olarak bulunurken, pozitif kontrol grubunda sırasıyla %84,06, %0,00 ve %15,94 olarak belirlenmiştir. Doz grubunda ise hücre dağılımı %58,68 canlı, %0,31 ölü ve %41,01 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4). HCT116 hücre hattına 24 saat boyunca *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağı uygulandığında, kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla %98,18, %1,07 ve %0,75 olarak bulunurken, pozitif kontrol grubunda sırasıyla %54,68, %1,18 ve %44,14 olarak belirlenmiştir. Doz grubunda ise hücre dağılımı %70,92 canlı, %1,45 ölü ve %27,58 apoptotik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca apoptotik sonuçları doğrulamak üzere *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının EC50 dozunun CACO-2 üzerinde 24 saat uygulanması *BCL2*'de %89,49 düşüşe neden olurken *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*, *BAX* ve *P53* genleri sırasıyla, 2,7; 1,93; 1,27; 1,45 ve 2,88 kat artış göstermiştir (Şekil 4.7). Aynı şekilde HCT116 hücre hattı üzerinde *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* yağının EC50 dozu ile 24 saat uygulanmasının *BCL2*'de %71,38 düşüşe neden olduğu; *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*, *BAX* ve *P53* genlerinde ise sırasıyla, 1,85; 1,77; 2,14; 3,86 ve 1,58 kat artışa neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.8).

Azimi ve diğ. (2021), *Z. tenuior* uçucu yağının HT-29 hücre hattı üzerinde sitotoksosite ve apoptoz etkilerini araştırmışlardır. 24 saatlik uygulama sonuçlarına göre, HT-29 üzerinde 50 µg/ml EC50 değeri bulunmuştur. Ayrıca mRNA ve protein düzeyinde, *Caspase 3* ve *Caspase 9* düzeylerini artırdığını ve *BCL2* miktarını azalttığını göstermiştir. *Z. tenuior* uçucu yağının HT-29 hücrelerinde NF-κB yolu yoluyla apoptoza neden olabileceği ve aynı zamanda TRPM8 kanalı yoluyla *Caspase* ları aktive edebileceği oldukça muhtemel görülmüştür. Abdolsamad ve diğ. (2021) tarafından ağırlıkları 200-250 g olan 24 adet erkek Wistar sıçanı rastgele dört gruba

ayrılmıştır (kontrol, kompresyon, sulu tedavi ve alkollü ekstraktlar). Ekstraktlar, kompresyon gününde ve yedi gün sonra intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. 28 gün sonra perfüzyon yöntemi uygulandıktan sonra lomber omurilikten örnekler alınmış ve örnekler incelenmiştir. Daha sonra her grupta lomber omurilikten total RNA izole edilerek cDNA sentezlenmiş ve *Caspase 3* ve *Caspase 9*'daki ifade değişiklikleri kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, nöron sayısı kompresyon grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı ve sulu ekstrakt grubunda kompresyon grubuna kıyasla önemli bir artış göstermiştir. *Caspase 3* ve *Caspase 9* ekspresyonunun miktarı, kontrol grubuna kıyasla kompresyon grubunda önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca *Caspase 3* ve *Caspase 9* gen ekspresyonu, sulu ekstrakt grubunda, kompresyon grubuna kıyasla arttığı bulunmuştur ($P<0.001$). Aynı çalışma ayrıca *Z. clinopodioides* ekstraktının antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra pulegone gibi fenolik ve flavonoid bileşikleri ihtiva etmesi sayesinde nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmiştir.

Zhaparkulova ve diğ. (2022), Kazakistan'da yetişen *Z. bungeana*'nın kimyasal içeriğini HPLC-ESI-QTOF-MS/MS ile belirlemiştir. Ayrıca türün antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik aktivitesini de araştırmışlardır. *Z. bungeana*'dan elde edilen ekstraktların, biyolojik aktivitelerini sağlayan bileşenlerin flavonoidler, fenolik asitler, organik asitler ve terpen türevli olduğunu göstermişlerdir. Ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyonları Gram-pozitif bakteriler için (1,25-10 mg/mL), Gram-negatif bakteri ve mantarlara (5-20 mg/mL) göre daha düşüktür. Antiradikal aktivite için hesaplanan EC50 değeri, ABTS ve DPPH analizleri için sırasıyla $15,00 \pm 1,06$ $\mu\text{g/mL}$ ve $13,21 \pm 3,24$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değişmektedir. *Z. bungeana* ekstraktlarının, kojik asit gibi tirozinaz aktivitesini %50 (200 $\mu\text{g/mL}$ 'de) azalttığı ve insan melanom A375 hücre dizisi (200 $\mu\text{g/mL}$ 'de) için hafif sitotoksik olduğu ve HaCat keratinositleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığı bulunmuştur.

Batent ve diğ. (2020), *Z. tenuior* bitkisinin metanolik ekstraktının A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerinde apoptozun indüksiyonunu ölçmek üzere bir çalışma yapmıştır. Hücrede canlılık testi MTT yöntemi ile, *BAX* ve *BCL2* gen ekspresyon seviyeleri ise gerçek zamanlı PZR yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre *Z. tenuior*'un metanolik ekstraktının A549 hücrelerinin büyümesini azalttığını bildirmişlerdir ($P<0,01$). Ayrıca, gerçek zamanlı PZR analizinin sonuçları, bitki

ekstraktının, *BAX* geninin ekspresyonundaki artışla ilişkili olan kanser hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermiştir. Araştırmacılar, *Z. tenuior*'un akciğer kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve apoptotik özelliklere sahip olduğu ortaya koymuştur.

Özkan ve diğ. (2020), geleneksel tıbbi bir bitki olarak Türk halk hekimliğinde kullanılan *Z. clinopodioides*'in antioksidan, enzim inhibitör, antimikrobiyal aktiviteleri ve antikanser potansiyelini araştırmıştır. Araştırma sonuçları, bitkinin toprak üstü kısmının antioksidan aktivitesinin kök ekstraktına göre daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, ekstraktların Cu^{2+} indirgeme aktivitesi gösterdiği ve çeşitli hücre hatlarına (A498, UO-31, COLO205 ve KM12) karşı sitotoksik aktivite sergilemediği belirlenmiştir.

Hazrati ve diğ. (2020) yaptıkları çalışmada, *Z. clinopodioides* ve *Z. tenuior* türlerinden izole edilen uçucu yağların kimyasal bileşikleri GC ve GC-MS yöntemleriyle analiz etmiştir. Araştırmacılar *Z. clinopodioides* ve *Z. tenuior*'da sırasıyla 17 ve 21 uçucu bileşik belirlenmiştir. Ana bileşikler, *Z. clinopodioides* için pulegone (%70,4) ve menthone (%11,5), *Z. tenuior* için pulegone (%55,1) ve limonene (%8,2) olarak rapor edilmiştir. Her iki türün de yüksek antioksidan özelliklere sahip olduğu ve antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada zengin fenolik madde kompozisyonları ile öne çıkan bu türlerin doğal antioksidan ve antibakteriyel malzeme kaynağı olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır.

Shabbir ve diğ. (2018), yaptıkları çalışmada *Z. clinopodioides* bitki ekstraktının antiinflamatuvar özelliklerini kronik eklem iltihabını (romatoid artrit) iyileştirme potansiyeli ve akut inflamatuvar pençe ödemi modelleri üzerinden değerlendirmiştir. Sonuçlar, *Z. clinopodioides*'in romatoid artrit önemli ölçüde iyileştirdiğini, artrit gelişimi ve pençe ödeminin inhibisyonunu sağladığını göstermiştir. Histopatolojik incelemede, pannus oluşumu, kemik erozyonu ve eklem iltihabında belirgin azalma olduğu belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının hepatotoksik veya nefrotoksik etkilere sahip olmadığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, *Z. clinopodioides*'in anti-artrit ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu ve otakoidlerin inhibisyonuna katkıda bulunduğu rapor edilmiştir.

Ma ve diğ. (2016) *Z. clinopodioides* bitkisinin *in vitro* ve *in vivo* antifungal etkilerini araştırmışlardır. Örneklerin GC-MS analizi ile bitkinin uçucu yağının pulegone (%53,5), isomenthone (%10,4) ve carvone (%5,7) gibi bileşenler iğerdiğini ortaya koymuşlardır. *Sclerotinia sclerotiorum* adlı mantara karşı yapılan deneylerde, uçucu yağın misel büyümesini ve türün gelişimini tamamen inhibe ettiği gözlemlenmiştir. *Z. clinopodioides* uçucu yağının *S. sclerotiorum*'un büyümesini doza bağlı olarak inhibe ettiği, mantar hiphalarında ve sklerotlarda morfolojik değişikliklere neden olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, *Z. clinopodioides* uçucu yağı, bitki koruma amacıyla kullanılabilir etkili bir inhibe edici özelliğe de sahip olarak görülmüştür.

Behravan ve diğ. (2007), İran'dan toplanan *Z. clinopodioides* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri hidrodistilasyon yöntemiyle izole etmiş ve yağı GC-MS ile analiz etmişlerdir. Uçucu yağda 27 farklı bileşen tespit edilmiş, bunlar arasında pulegone (%44,5), terpineol (%14,5), methyl acetate (%10,9), *iso*-neomentol (%7,1) ve 1,8-cineole (%4,1) olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, *Z. clinopodioides*'in uçucu yağının antifungal ve antimikrobiyal aktiviteleri çeşitli konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Bitkinin %0,003, %0,033, %0,033, %0,067 ve %0,067 (v/v) konsantrasyonlarındaki ekstraktlarının *Trichophyton rubrum* ve *Microsporum gypseum*'a karşı fungisidal etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu dozların *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* ve *Klebsiella pneumonia*'ya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmanın sonuçlara göre, *Z. clinopodioides* uçucu yağının antimikrobiyal bileşenler iğerdiğini ve bu bileşenlerin bakterilere, mantarlara, virüslere ve protozoalara karşı etkili olabileceğini belirlenmiştir.

Sezik ve diğ. (1991), gerçeletirdikleri çalışma ile Türkiye'nin iki farklı bölgesinden *Z. tenuior* türünün uçucu bileşenlerini araştırmışlardır. GC-MS cihazı analizleri ile toplamda 33 farklı bileşik tespit etmişlerdir. Tanımlanan bileşenler örneklerin sırasıyla %99,4'ünü ve %98,8'ini temsil etmektedir. Bulunan ana bileşen pulegone (örneklerin %87,1'i ve %86,3'ü) olarak rapor edilmiştir.

Pakniyat ve Mousavi (2014), gerçeletirdikleri çalışma ile Orta İran'daki Shahrabak'ta yetişen *Z. tenuior* türünün toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yoluyla elde edilen uçucu yağı GC-MS ile analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar pulegone (%38,3), 3',5'-dihidroksiasetofenon (%22,83), isomenthone (%7,06), 2-

methyl-5-(1-methylethyl)-phenol (%3,41), limonene (%2,59) ve 2-acetyl-4,4-dimethyl-cyclopent-2-enone (%2,49) bileşiklerinin en bol bulunan bileşenler olduğu göstermiştir.

Mohammadhosseini ve diğ. (2016), gerçekleştirdikleri çalışma ile *Z. capitata* türünün toprak üstü kısımlarının uçucu bileşenlerini GC ve GC-MS cihazları aracılığıyla analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda eterik yağın içinde bulunan başlıca uçucu bileşiklerin pulegone (%23,8), p-mentha-3,8-dien (%17,0), α -pinene (%11,4), β -pinene (%11,3) ve p-ment-3-en-8-ol (%8,3) olduğu tespit edilmiştir.

Nadaf ve diğ. (2013), *Z. persica* Bunge bitkisinin toprak üstü kısımlarının uçucu yağ bileşikleri solvent ekstraksiyonu ile izole etmişlerdir. Yağın %77,5'inden fazlasını temsil eden toplam 57 bileşeni, GC-MS ile tanımlamışlardır. *Z. persica* ekstraktında en çok bulunan bileşikler ise bis(2-ethylhexyl)1,2-benzenedicarboxylate (%12,88), dodecane (%12,47), decane (%7,8), tetradecane (%5,93), ethyl palmitate (%4,12) ve hexadecane (%2,99) olarak tanımlanmıştır. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında incelenen *Ziziphora* taksonlarının eterik yağlarında en çok bulunan bileşik pulegone olarak görülmektedir. Bu durum çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla bağdaşmamaktadır. Bu durumun nedeni bitkinin genetik yapısından kaynaklanabileceği gibi, sıcaklık, ışık veya nem gibi iklimsel faktörlerden de kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Sonboli ve diğ. (2006), gerçekleştirdiği çalışma ile *Z. clinopodioides* subsp. *bungeana* taksonunun toprak üstü çiçekli kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimini GC-MS ile analiz etmişlerdir. Toplam yağın %97,1'ini temsil eden otuz iki bileşen belirlemişlerdir. Ana bileşenler olarak pulegone (%65,2), isomenthone (%11,9), 1,8-cineole (%7,8) ve piperitenone (%6,5) belirlenmiştir Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında oksijenli monoterpenlerin baskın olması paralellik gösterirken ana bileşenin piperitone olması yönüyle farklılık göstermektedir. Her ne kadar ana bileşenler farklı olsa da elde edilen bileşenlerdeki paralellik dikkat çekmektedir.

Öztürk ve Ercişli (2007), gerçekleştirdikleri çalışma ile Türkiye'nin doğusundan toplanan *Z. clinopodioides* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstraktının kimyasal bileşimlerini incelemiştir. GC-MS

analizleri ile 18 bileşik belirlenmiştir. Esansiyel yağların ana bileşenleri (+)-pulegone (%31,86), 1,8-cineole (%12,21), limonene (%10,48), mentol (%9,13), α -pinene (%6,88), mentone (%6,73), piperitenone (%5,30) ve piperitone (%4,18) olarak rapor edilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada elde ettiğimiz bulgular bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu bulgulara göre çalışmada kullanılan yağın ana bileşenleri piperitone (%22,26), isomenthone (%14,00), menthol (%9,82), eugenol (%8,94) ve thymol (%8,43)'dür.

Amiri (2009), gerçekleştirdiği çalışma ile *Z. clinopodioides* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimini farklı büyüme aşamalarında GC-MS kullanarak analiz etmiştir. Çiçeklenme öncesi dönemdeki ana bileşenler pulegone (%30,1), thymol (%21,3), *p*-mentha-3-en-8-ol (%12,9) ve piperitenone (%9,3) olarak rapor edilmiştir. Çiçeklenme aşamasında pulegone (%44,6), *p*-mentha-3-en-8-ol (%10,5), 1,8-cineol (%10,4), piperitenone (%8,7) ve thymol (%6,7) başlıca bileşenler olarak tespit edilirken, çiçeklenme sonrası aşamada, pulegone (%41,3), isomenthone (%11,6), *p*-mentha-3-en-8-ol (%11), *p*-mentha-3,8-diene (%7,2) ve thymol (%5,8) ana bileşenler olarak belirlenmiştir. Çiçeklenme döneminde toplanan örneklerle ait uçucu yağın incelendiği çalışmamızda elde ettiğimiz ana bileşenler göz önüne alındığında, sonuçların paralellik gösterdiği görülmüştür.

Hakkim ve diğ. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile Umman'da bulunan *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. türünün meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231), rahim ağzı kanseri hücreleri (Hep-2) ve Vero hücreleri (normal) üzerindeki sitotoksik etkisi test edilmiş ve kimyasal profili GC-MS ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kimyasal profil verileri, piperitonun yaklaşık %38,6 oranında ana bileşen olduğunu, ardından elemol (%27,9), α -eudesmol (%14,5) ve β -eudesmol (%4,6) geldiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, ana bileşenin piperitone olması nedeniyle elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir. Apoptoz testlerinde elde ettikleri EC50 değerleri incelendiğinde elde ettikleri sonuçların MDA-MB-231 hücre hattı için 67,4 μ g/ml, Hep-2 hücre hattı için 74,3 μ g/ml ve Vero hücre hattı için >100 μ g/ml olduğu görülmektedir. Tez çalışmasında elde ettiğimiz apoptoz testi sonuçları ile karşılaştırıldığında *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının daha apoptotik olduğu görülmektedir.

Bayala ve diğ. (2023) gerçekleştirdikleri çalışma ile Burkina Faso'dan *Cymbopogon schoenanthus* esansiyel yağının, prostat kanserinden türetilen LNCaP hücreleri ve rahim ağzı kanserinden türetilen HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Esansiyel yağ, hidrodistilasyon yoluyla ekstrakte edilmiş ve GC-FID ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda otuz yedi bileşik tanımlanmıştır. Uçucu yağın ana bileşenlerinin piperiton (%49,9), δ -2-karen (%24,02), elemol (%5,79) ve limonen (%4,31) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, uçucu yağın LNCaP ve HeLa hücrelerinin çoğalmasını $135,53 \pm 5,27 \mu\text{g/mL}$ ve $146,17 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ EC50 değerleriyle azalttığı tespit edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlarda uçucu yağın içeriğinde en yüksek konsantrasyonda piperitone olması çalışmamızdaki sonuçlarla paralellik göstermiştir. Ancak elde ettiğimiz HCT116 ve CaCO-2 EC50 sonuçları bakımından karşılaştırıldığında Bayala ve diğ. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmadan daha düşük olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özellikle İran'ın doğusundaki Horasan eyaletinde *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* türü sıklıkla tüketilmektedir. Ayrıca *Z. clinopodioides*, geleneksel İran tıbbında gastrointestinal bozuklukların, soğuk algınlığının ve iltihapların tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Flavonoid ve terpen bileşikleri bakımından zengin yapısından dolayı, çeşitli hastalıklara karşı kayda değer tedavi edici etkilere sahip olabilmektedir. Bu çalışmada *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC-MS ile analizi yapılmıştır. *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* toplam uçucu yağının %95,08'ini temsil eden ve ana bileşenleri piperitone (%22,26), isomenthone (%14,00), menthol (%9,82), eugenol (%8,94) ve thymol (%8,43) olan 37 farklı bileşen belirlenmiştir. Ayrıca, insan kolorektal kanseri (CACO-2 ve HCT116) hücre hatlarında ve kontrol hücre olarak İnsan sağlıklı Embryonic böbrek (HEK293) hücre hattında *in vitro* şartlar altında sitotoksosite ve ayrıca anti-apoptotik etkilerini incelenmiştir. Gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre *Z. clinopodioides* subsp. *rigida* uçucu yağının kolorektal kanser hücre hatlarında anti-kanser geni olan *BCL2*'yi inhibe ettiğini ve kanser genlerini (*BAX*, *Caspase 3*, *Caspase 8* ve *Caspase 9*) aktivleştirerek apoptotik bir ajan olabileceği gösterilmiştir. Tarafımızdan yürütülen çalışmanın sonuçları ile *Z. clinopodioides* subsp. *rigida*'nın hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gerçekleştirilen çalışmalar ışığında, türün zengin bir biyolojik aktiviteye sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca dünya genelinde önde gelen, insan sağlığına sorun yaratan ve ölüm ile sonuçlanan kolorektal kansere karşı terapötik bir ajan olabilme potansiyeli taşıması bakımından daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abdolsamad Halaf, I. A., Tehranipour, M. and Mahmodzadeh Akharat, H., “Effect of aqueous and alcoholic extracts of *Ziziphora clinopodioides* on apoptosis and alteration of caspase-3 and caspase-9 gene expression in anterior horn neurons of the spinal cord after sciatic nerve compression in male rats”, *J. Birjand Univ. Med. Sci.*, 28(3), 222–235, (2021).

AbdulSattar, S., Seetharami Reddy, B., Koteswara Rao, V., Pradeep, A., Naga Raju, G., Ramanarayana, K. and Bhuloka Reddy, S., “Estimation of trace elements in some anti-epileptic medicinal plants by PIXE”, *J. Radioanal. Nucl. Chem*, 294(3), 337–341, (2012).

Ahmed, M., Chaudhari, K., Babaei-Jadidi, R., Dekker, L. V. and Shams Nateri, A., “Concise review: emerging drugs targeting epithelial cancer stem-like cells”, *Stem Cells*, 35(4), 839–850, (2017).

Ahmadi, A., Gandomi, H., Derakhshandeh, A., Misaghi, A. and Noori, N., “Phytochemical composition and *in vitro* safety evaluation of *Ziziphora clinopodioides* Lam. ethanolic extract: Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity assessment”, *J. Ethnopharmacol.*, 266, 113428, (2021).

Akbari, A., Amanpour, S. and Muhammadnejad, S., “Evaluation of antitumor activity of a TGF-beta receptor I inhibitor (SD-208) on human colon adenocarcinoma”, *DARU J. Pharm. Sci.*, 22 (1), 1–7, (2014).

Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I.B., “Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species”, *J. Agric. Food. Chem.*, 49(9), 4168–4170, (2001).

Alnamer, R., Alaoui, K., Boudida, E.H., Benjouad, A. and Cherrah, Y., “Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of *Lavandula officinalis* from Morocco”, *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 2012, 270824, (2012).

Alp, S., Ercisli, S., Dogan, H., Temim, E., Leto, A., Zia-Ul-Haq, M. and Aladag, H., “Chemical composition and antioxidant activity *Ziziphora clinopodioides* ecotypes from Turkey”, *Rom. Biotechnol. Lett.*, 21(2), 11298–11303, (2016).

Amiri, H., “Influence of growth phase on the essential oil composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam”, *Nat. Prod. Res.*, 23(7), 601–606, (2009).

Arrigoni-Blank, M.F., Antonioli, A.R., Caetano, L.C., Campos, D.A., Blank, A.F. and Alves, P.B., “Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes”, *Phytomedicine*, 15(5), 334–339, (2008).

Aydınlı, M.S., Kuzu, A. ve Tekiner, S., “Kolorektal kanser tanısı alan hastaların koruyucu hekimlik açısından durumları ve tanı sürecinin değerlendirilmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı*, (2011).

Azadmehr, A., Latifi, R., Mosalla, S., Hajiaghaee, R. and Shahnazi, M., “Immunomodulatory effects of *Ziziphora tenuior* L. extract on the dendritic cells”, *DARU J. Pharm. Sci.*, 22(1), 63, (2014).

Azimi, M., Mehrzad, J., Ahmadi, A., Ahmadi, E. and Ghorbani Ranjbary, A., “Apoptosis induced by *Ziziphora tenuior* essential oil in human colorectal cancer cells”, *Biomed. Res. Int.*, 5522964, 9, (2021).

Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M., “Biological effects of essential oils—a review”, *Food. Chem. Toxicol.*, 46(2), 446–475, (2007).

Batent, C., Taheri, M., Borbor, M. and Nasri, S., “Cytotoxic effects of methanolic extract of *ziziphora tenuior* l. on the growth of the lung cancer cell line”, *Indian J. Pharm. Sci.*, 45(3), 195–204, (2020).

Batooli, H., Akhbari, M. and Hoseinzadeh, M.J., “Effect of different methods on the quality and quantity of essential oils of two species of *Ziziphora*”, *J. Med. Herb.*, 3(2), 135–146, (2012).

Bayala, B., Coulibaly, L.L., Djigma, F., Bunay, J., Yonli, A., Traore, L., Baron, S., Figueredo, G., Simpore, J. and Lobaccaro, J.M.A., “Chemical Composition of Essential Oil of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng from Burkina Faso, and Effects against Prostate and Cervical Cancer Cell Lines”, *Molecules*, 28(11), 4561, (2023).

Behravan, J., Ramezani, M., Hassanzadeh, M.K., Eskandari, M., Kasaian, J. and Sabeti, Z., “Composition, antimycotic and antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil from Iran”, *J. Essen., Oil-Bear. Plants.*, 10(4), 339–345, (2007).

Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N. and Božin, B., “Potential of selected Lamiaceae plants in anti (retro) viral therapy”, *Pharmacol. Res.*, 133, 301–314, (2018).

Belyaev, N. F. and Demeubaeva, A. M., “Chromatographic study of the composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides*, a vicarious form of *Origanum vulgare*”, *Chem. Nat. Com.*, 35, 52–54, (1999).

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. and Anackov, G., “Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils”, *J. Agric. Food. Chem.*, 54(5), 1822–1828, (2006).

Burt, R.W., DiSario, J.A. and Cannon-Albright, L., “Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk”, *Annu. Rev. Med.*, 46, 371–379, (1995).

Carović-Stanko, K., Orlić, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M. and Satovic., “Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*”, *Food. Chem.*, 119(1), 196–201, (2010).

Celep, F. and Dirmenci, T., “Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey”, *NVEO.*, 4(4), 14–27, (2017).

Chachoyan, A.A. and Oganesyanyan, G.B., “Anti-tumor activity of some species of the family Lamiaceae”, *Rastitel'nye Resursy*, 32, 59–63, (1996).

Chan, A.T. and Giovannucci, E.L., “Primary prevention of colorectal cancer”, *Gastroenterol.*, 138, 2029–2043, (2010).

Cosse, J. P. and Michiels, C., “Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression”, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 8(7), 790–797, (2008).

Crawford, J. M., “The oral cavity and gastrointestinal tract”, (Eds: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL), *Basic pathology*, Philadelphia: W.B. Saunders, 470–515, (1997).

Çınar, İ., “*Rheum ribes* L. bitki ekstraktlarının kolorektal kanser hücre hatlarında antikanserijenik etkisinin araştırılması”, Doktora Tezi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya, (2018).

Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., “GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*”, *J. Agric. Food. Chem.*, 48(6), 2576–2581, (2000).

Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L. and Echeverrigaray, S., “Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia*

officinalis L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil”, *Food. Chem.*, 100(2), 603–608, (2007).

Delnavazi, M.R., Baba-Ali, F., Soufiabadi, S., Sherafatmand, M., Ghahremani, F., Tavakoli, S. and Yassa, N., “Essential oil composition, antioxidant activity and total phenolic content of some Lamiaceae taxa growing in Northwest of Iran”, *Pharm. Sci.*, 20(1), 22–28, (2014).

Ebrahimi, S.N., Hadian, J. and Sonboli, A., “Chemical composition of the essential oil of *Ziziphora capitata* L. from Iran”, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 12(6), 678–682, (2009).

Ekor, M., “The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety”, *Front. Pharmacol.*, 4, 177, (2014).

Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. and Cava, R., “Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté”, *Lwt - Food Science and Technology*, 40(1), 58–65, (2007).

Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R., “The value of plants used in traditional medicine for drug discovery”, *Environ. Health Perspect.*, 199(suppl 1), 69–75, (2001).

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. and Guo, Z., “Medicinal plants in therapy”, *Bull. World Health Organ.* 63(6), 965–981, (1985).

Fernandez, E.C., Sandi, Y. E. and Kokoska, L., “Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department”, *Bolivia. Fitoterapia*, 74(4), 407–416, (2003).

Frezza, C., Venditti, A., Serafini, M. and Bianco, A., “Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae”, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 62, 125–178, (2019).

Ghazanfari, T. Yaraee, R., Shams, J., Rahmati, B., Radjabian, T. and Hakimzadeh, H., “Cytotoxic effect of four herbal medicines on gastric cancer (AGS) cell line”, *Food. Agric. Immunol*, 24(1), 1–7, (2013).

Ghorbani Ranjbary, A., Asmarian, S., Ghorat, F. and Jaber, N., “Effect of hydroalcoholic leaves extract of *Ziziphora tenuior* L. on pain in male rats”, *J. Basic Clin. Pathophysiol.*, 4(2), 17–22, (2016).

- Hajhashemi, V. Ghannadi, A. and Sharif, B., “Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill”, *J. Ethnopharmacol.*, 89(1), 67–71. (2003).
- Hakkim, F.L., Al-Buloshi, M. and Achankunhu, J., “Growth Inhibitory Effect of *Cymbopogon schoenanthus* on Triple Negative Breast Cancer (MDA-MB-231) and Cervical Cancer (HEp-2) Cells: Piperitone and Elemol as an Active Principle”, *Austin J. Med. Oncol.*, 3(1), 1027, (2016).
- Harley, R.M. Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P.H., Conn, B., Grayer, R., Harley, M.M., Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, A., Paton, A.J., Ryding, O. and Upson, T., “Labiatae”, (Eds: Kadereit, J.W. and Kubitzki, K.), *The families and genera of vascular plants*, 167–275, (2004).
- Hazrati, S., Govahi, M., Sedaghat, M. and Kashkooli, A. B. A., “Comparative study of essential oil profile, antibacterial and antioxidant activities of two cultivated *Ziziphora* species (*Z. clinopodioides* and *Z. tenuior*)”, *Ind. Crops Prod.*, 157, 112942, (2020).
- Hirsch, D., Seyfried, S. and Staib T., “Newly established gastrointestinal cancer cell lines retain the genomic and immunophenotypic landscape of their parental cancers”, *Sci. Rep.*, 10(1), 17895, (2020).
- Hussain, A. I., Anwar, F., Iqbal, T. and Bhatti, I. A., “Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils”, *Pak. J. Bot.*, 43(2), 1315–1321, (2011).
- Inouya, S., Takizawa, T. and Yamaguchi, H., “Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 47, 565–573, (2001).
- Jamzad, Z., “*Thymus* and *Satureja* species of Iran”, *Research Institute of Forests and Rangelands*, 171, (2009).
- Janssen, L.M., Ramsay, E.E., Logsdon, C.D. and Overwijk, W.W., “The immune system in cancer metastasis: friend or foe”, *JITC.*, 5(1), 1–14, (2017).
- Kakaei, S. and Shahbazi, Y., “Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet”, *LWT - Food Sci. Technol.*, 72, 432–438, (2016).
- Kaya, A. Satıl, F., Dirmenci, T. and Selvi, S., “Trichome micromorphology in Turkish species of *Ziziphora* (Lamiaceae) ”, *Nord. J. Bot.*, 31(3), 270–277, (2013).

- Khafaei, M., Rezaie, E., Mohammadi, A., Shahnazi Gerdehsang, P., Ghavidel, S., Kadkhoda, S. and Tavallaie, M. “miR- 9: From function to therapeutic potential in cancer”, *J. Cell. Physiol.*, 234(9), 14651–14665, (2019).
- Kheirkhah, M. Ghasemi, V., Yazdi, A. K. and Rahban, S., “Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Ziziphora clinopodioides* Lam. used against the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller”, *J. Plant Prot. Res.*, 55(3), 260–265, (2015).
- Kılıç, O. and Bağcı, E., “Essential oils of three *Ziziphora* L. Taxa from Turkey and their chemotaxonomy”, *Asian J. Chem.*, 25(13), 7263, (2013).
- Konyalıoğlu, S. Öztürk, B. and Meral, G.E., “Comparison of chemical compositions and antioxidant activities of the essential oils of two *Ziziphora* taxa from Anatolia”, *Pharm. Biol.*, 44(2), 121–126, (2006).
- Laplagne, C., Domagala, M., and Le Naour, S., Wuemerais, C., Hamel, D., Fournié, J.J., Couderc, B., Bousquet, C., Ferrand, A. and Poupot, M., “Latest advances in targeting the tumor microenvironment for tumor suppression” *Int. J. Mol. Sci.*, 20(19), 4719, (2019).
- Legault, J. and Pichette A., “Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel”, *J. Pharm. Pharmacol*, 59(12), 1643–1647, (2007).
- Leon, M., Sassatelli, R., Benatti, P. and Roncucci L., “Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population, The 6-year experience of a population-based registry”, *Cancer*, 71, 3493, (1993).
- Liu, A. Lee, S. M., Wang, Y. and Du, G., “Elsholtzia: review of traditional uses, chemistry and pharmacology”, *J. Chin. Pharm. Sci.*, 16(2), 73, (2007).
- Lynch, HT., Smyrk, T.C. and Watson, P., “Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review”, *Gastroenterol.*, 104(5), 1535–1549, (1993).
- Ma, B. X. Ban, X. Q. He, J. S., Huang, B., Zeng, H., Tian, J. and Wang, Y. W., “Antifungal activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed plants (*Brassica campestris* L.)”, *Crop Prot.*, 89, 289–295, (2016).
- Mahdavi, B., Paydarfard, S., Zangeneh, M. M., Goorani, S., Seydi, N. and Zangeneh, A., “Assessment of antioxidant, cytotoxicity, antibacterial, antifungal, and cutaneous wound healing activities of green synthesized

manganese nanoparticles using *Ziziphora clinopodioides* Lam leaves under *in vitro* and *in vivo* condition”, *Appl. Organomet. Chem.*, 34(1), e5248, (2020).

Mehraban Sangatash, M., Karajian, R. and Beiraghi Tosi, Sh., “Study the effect of microbial spoilage and pathogenic bacteria extract *Ziziphora clinopodioides*”, *J. Food Sci.*, 4(3), 9–14, (2007).

Michel, J. Abd Rani, N. Z. and Husain, K., “A review on the potential use of medicinal plants from Asteraceae and Lamiaceae plant family in cardiovascular diseases”, *Front. Pharmacol.*, 11, 852, (2020).

Modiri, E., Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Tavasoli, A., “Extraction and identification of essential oil composition of different subspecies of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from different habitats of Iran”, *IJMAPR*, 29(3), 611–620. (2013.)

Mohagheghzadeh, A. Shams- Ardakani, M. and Ghannadi, A., “Volatile constituents of callus and flower- bearing tops of *Zataria multiflora* Boiss. (Lamiaceae)”, *Flavour Fragr. J.*, 15(6), 373–376, (2000).

Mohammadhosseini, M., “The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological properties and medicinal applications of essential oils and extracts of different *Ziziphora* species”, *Ind. Crops Prod.*, 105, 164–192, (2017).

Mohammadhosseini, M. Akbarzadeh, A., Hashemi-Moghaddam, H., Shahnama, M., Fahimi, B. and Azami, S., “Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by HS-SPME-GC-MS technique from aerial parts of *Ziziphora capitata* L., and evaluation for biological activity”, *Orient. J. Chem.*, 32(3), 1439–1451, (2016).

Mozaffarian, V., *Dictionary of Iranian Plant Names: Latin-English-Persian*, Tehran: Farhang Moaser, (1996).

Nadaf, M. Halimi, M. and Nasrabadi, M., “Identification of compounds nonpolar extract *Ziziphora persica* growing in Iran by GC-MS”, *Middle East J. Sci. Res.*, 13, 187–190, (2013).

Özkan, E. E., Boğa, M., Yilmaz, M. A., Kara, E. M. and Yeşil, Y., “LC-MS/MS analyses of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from Turkey: Antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial and, anticancer activities”, *Istanbul J. Pharm.*, 50(1), 33–41, (2020).

Öztürk, S. and Ercişli, S., “Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*”, *Food Cont.*, 18(5), 535–540, (2007).

- Öztürk, Y. Aydın, S., Tecik, B. and Başer, K. H. C., “Effects of essential oils from certain *Ziziphora* species on swimming performance in mice”, *Phytother. Res.*, 9(3), 225–227, (1995).
- Pakniyat, E. and Mousavi, M., “Improvement of GC-MS analysis of Shahrabak *Ziziphora tenuior* essential oil by using multivariate curve resolution approaches”, *J. Chin. Chem. Soc.*, 61(6), 649–658, (2014).
- Panizzi, L. Flamini, G., Cioni, P. L. and Morelli, I., “Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae”, *J. Ethnopharmacol.*, 39(3), 167–170, (1993).
- Petrovska, B. B., “Historical review of medicinal plants’ usage”, *Pharmacog. Rev.*, 6(11), 1, (2012).
- Piryaei, M. Abolghasemi, M. M. and Nazemiyeh, H., “Fast determination of *Ziziphora tenuior* L. essential oil by inorganic–organic hybrid material based on ZnO nanoparticles anchored to a composite made from polythiophene and hexagonally ordered silica”, *Nat. Prod. Res.*, 29(9), 833–837, (2015).
- Rawla, P., Sunkara, T. and Barsouk, A., “Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors”, *Prz. Gastroenterol.*, 14(2), 89–103, (2019).
- Rijo, P. Simões, M. F., Duarte, A. and Rodríguez, B., “Isopimarane diterpenoids from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity”, *Phytochem.*, 70(9), 1161–1165, (2009).
- Rivera, D. and Obón, C., “The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands: a review”, *J. Ethnopharmacol.*, 46(2), 73–93, (1995).
- Saini, A., Kumar, M., Bhatt, S., Saini, V. and Malik, A., “Cancer causes and treatments”, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 11(7), 3121–3134, (2020).
- Sajadi, S. E., Ghasemi Dehkordi, N. A. and Baluchi, M., “Volatile constituents of *Ziziphora clinopodioides* Lam.”, *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 16(1), 97–100 (2003).
- Salehi, P. Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., “Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (Boiss.) Rech.f. from Iran”, *Biol. Pharm. Bull.*, 28(10), 1892–1896, (2005).

- Sambath, G. Komalavalli, N. and Ravikumar, R., “Traditional healthcare practice for common ailments of children in Pudukkottai district, TamilNadu-A survey”, *Ind. J. Nat. Sci.*, 6(33), 10475–10483, (2015).
- Saran, U., Chandrasekaran, B., Tyagi, A., Shukla, V., Singh, A., Sharma, A. K. and Damodaran, C., “A small molecule inhibitor of Notch1 modulates stemness and suppresses breast cancer cell growth”, *Front. Pharmacol.*, 14, 1150774, (2023).
- Sarroca, C., Valle, A. D., Fresco, R., Renkonen, E., Peltömaki, P. and Lynch, H. T., “Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among Uruguayan patients with colorectal cancer”, *Clin. Genet.*, 68(1), 80–87, (2005).
- Satıl, F. and Selvi, S., “Ethnobotanical features of *Ziziphora* L.(Lamiaceae) taxa in Turkey”, *Int. J. Nat. Sci.*, 4(1), 56–65, (2020).
- Schulz, H. Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H. and Özcan, M., “Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy”, *Vib. Spectrosc.*, 39(2), 249–256, (2005).
- Selvi, S. Satıl, F., Martin, E., Çelenk, S. and Dirmenci, T., “Some evidence for infrageneric classification in *Ziziphora* L.(Lamiaceae: Mentheae)”, *Plant Biosyst.*, 149(2), 415–423, (2015).
- Sezik, E. Tümen, G. and Başer, K. H. C., “*Ziziphora tenuior* L., a new source of pulegone”, *Flavour Fragr. J.*, 6(1), 101–103, (1991).
- Shabbir, A., Batool, S. A., Basheer, M. I., Shahzad, M., Sultana, K., Tareen, R. B. and Iqbal, J., “*Ziziphora clinopodioides* ameliorated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in different models of acute and chronic inflammation”, *Biomed. Pharmacother.*, 97, 1710–1721, (2018).
- Shahla, S. N., “Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against some pathogenic bacteria”, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(7), 1504–1508, (2012).
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Goding, Sauer, A., Fedewa, S.A., Butterly, L.F., Anderson, J.C., Cercek, A., Smith, R.A. and Jemal, A., “Colorectal cancer statistics, 2020”, *CA Cancer J. Clin.*, 70(3), 145–164, (2020).
- Solecki, R. S. and Shanidar, I. V., “A Neanderthal flower burial in northern Iraq”, *Science*, 190(4217), 880–881, (1975).

Sonboli, A., Atri, M. and Shafiei, S., “Intraspecific variability of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. *rigida* from Iran”, *Chem. Biodivers.*, 7(7), 1784–1789, (2010).

Sonboli, A., Mirjalili, M. H., Hadian, J., Ebrahimi, S. N. and Yousefzadi, M., “Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech.f. from Iran”, *Z. Naturforsch. C.*, 61(9-10), 677–680, (2006).

Sung, H., Ferlay, J., Siegel R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray F., “Global Cancer Statistics 2020. Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA Cancer J. Clin.*, 2021,71(3), 209–249, (2021).

Taarit, M. B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B., “Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress”, *Food Chem.*, 119(3), 951–956, (2010).

Taran, M., Karimi, N., Abdi, J., Sohailikhah, Z. and Asadi, N., “Larvicidal effects of essential oil and methanolic extract of *Hymenocarter longiflorus* (Lamiaceae) against *Echinococcus granulosus*”, *J. Essent. Oil-Bear.*, 16(1), 85–91, (2013).

Tian, S., Shi, Y., Zhou, X., Ge, L. and Upur, H., “Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different *Ziziphora clinopodioides* Lam. extracts”, *Pharmacogn. Mag.*, 7(25), 65, (2011).

Van de Vel, E., Sampers, I. and Raes, K., “A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 59(3), 357–378, (2019).

Venditti, A., Frezza, C., Celona, D., Sciubba, F., Foddai, S., Delfini, M. and Bianco, A., “Phytochemical comparison with quantitative analysis between two flower phenotypes of *Mentha aquatica* L. pink-violet and white”, *AIMS Mol. Sci.*, 4(3), 288–300, (2017).

Wei, E.K., Giovannucci, E. and Wu, K., “Comparison of risk factors for colon and rectal cancer”, *Int. J. Cancer*, 108, 433–442, (2004).

WHO., Breast cancer: prevention and control [online], (10.09.2023), Web adresi: : <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#>, (2015).

Yousefbeyk, F. Tabaside, J., Ostad, S. N., Salehi Sourmaghi, M. H. and Amin, G. R., “Investigation of chemical composition and cytotoxic activity of aerial

parts of *Ziziphora clinopodioides* Lam”, *Res. J. Pharmacogn.*, 3(2), 47–51, (2016).

Zargari, A ., *Iranian Medicinal Plants*, Tehran: Tehran University press, 103-104, (1995).

Zhaparkulova, K., Karaubayeva, A., Sakipova, Z., Biernasiuk, A., Gawel-Beben, K., Laskowski, T. and Kukula-Koch, W., “Multidirectional characterization of phytochemical profile and health-promoting effects of *Ziziphora bungeana* Juz”, *Extracts. Mol.*, 27(24), 8994, (2022).

Zhong, M. L., Xu, X. D., Yu, S. C. and Sun, G. L., “Advances in studies on medicinal plants in *Clinopodium* Linn”, *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 43(4), 820–828, (2012).