

Centaurea babylonica L.

BİTKİSİ ÜZERİNDE

FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Yüksek Lisans Tezi

Elif DÜNDAR

Eskişehir, 2017

***Centaurea babylonica* L. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Elif DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak, 2017

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1601S022 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif DÜNDAR'ın *Centaurea babylonica* L. "Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" başlıklı tezi 10/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ
Üye	: Prof. Dr. Neşe KIRIMER
Üye	: Prof. Dr. Müberra KOŞAR



ÖZET

Centaurea babylonica L. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Elif DÜNDAR

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak, 2017

Danışman: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Bu çalışma, *Centaurea* (Asteraceae) cinsine ait *C. babylonica* türü üzerinde fitokimyasal çalışmaların yapılması, toplam fenol miktar tayini ve antioksidan aktivite çalışmalarının yapılması, uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi ve antikanser etkisinin araştırılması üzerine yürütüldü. *C. babylonica* bitkisi 2015 yılının Temmuz ayında Mersin ilinin Çamlıyayla ilçesinden toplandı. Bitkinin toprak üstü kısımları toz edildikten sonra uçucu yağ analizi ve çözücü ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen uçucu yağın analizi, elde edilen farklı polaritelerdeki ekstraktların antioksidan aktiviteleri, fitokimyasal ön denemeleri ve kimyasal kompozisyon analizleri yapılarak incelendi. *C. babylonica* bitkisinin toprak üstü kısımlarından Avrupa Farmakopesi'ne (2010) uygun olarak hazırlanmış Clevenger aparatı ile yapılan hidrodistilasyon sonucu uçucu yağ elde edilerek GK/KS ile kimyasal bileşimi incelendi. Uçucu yağ ana bileşenleri sırasıyla, metil oleat (%30,1), metil heksadekanoat (%10,5) ve trikosan (%6) olarak belirlendi. Bitkinin toprak üstü kısımlarından sırasıyla heksan, etil asetat ve metanol ekstraktları hazırlanarak ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlendi. Aynı ekstraktlar üzerinde antioksidan aktivite deneyleri 1,1-difenil-2,2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü etki tayini ve 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) yöntemleriyle değerlendirildi. Türün toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktların *in vitro* sitotoksik etkileri C6 (Glioma), A549 (insan akciğer adenokarsinoma) ve MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hatları kullanılarak MTT testi ile belirlendi. Ekstraktların DNA sentez inhibisyonuna bakılarak selektivite için sağlıklı hücre hattı üzerindeki etkileri araştırıldı. Metanol ile hazırlanan ekstrakt orta düzeyde antioksidan aktivite gösterirken, etil asetat ve heksan ekstraktlarının antioksidan özellik göstermediği tespit edildi. Sitotoksik etki yine metanol ekstresinde yüksek görüldü.

Anahtar Sözcükler: *Centaurea*, *Centaurea babylonica*, Fenolik bileşikler, Antioksidan aktivite, Antikanser aktivite.

ABSTRACT

PHARMACOGNOSIC RESEARCH on *Centaurea babylonica* L. PLANT

Elif DÜNDAR

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January, 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

In this study was concluded on research of phytochemical studies on *C. babylonica* is kind of *Centaurea* (Asteraceae), total phenol content and antioxidant activity study, detect of essential oil content and anti-cancer effect. *C. babylonica* was collected from Camliyayla sub-province in Mersin at July, 2015. Above ground part of plant was powdered after that analysed essential oil and extraction. Analysis of the acquired essential oil was examined with antioxidant activity of obtained extract different polarity, phytochemical pretesting and quantitation. Above ground part of *C. babylonica* plant contents were examined from obtained essential oil of using Clevenger apparatus, prepared in accordance the European Pharmacopoeia (2010), with GS/MS. The main components of essential oil were determination respectively, methyl oleate (30.1%), methyl hegzadekanoat (10.5%) and trikosan (6%). Amount of total phenolic substance was determined from above ground part of plant hexane, ethyl acetate and methanol extract was prepared respectively, with method of Folin-Ciocaltaeu. Antioxidant activity experiments were evaluated from 1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH) determination of radical scavenging effects and 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik acid (ABTS) methods. *In vitro* cytotoxic effects of extracts obtained from above ground part of species was determined using C6 (Glioma), A549 (Human lung adenocarcinoma) and MCF-7 (Human breast cancer) with MTT test. Effects of extracts on healthy cell line was investigated by looking at the DNA synthesis inhibition for selectivity. While prepared extract with methanol show moderate impact, extract of ethyl acetate and hexane does not show antioxidant properties were found. Cytotoxic effect was still seen higher in methanol extract.

Keywords: *Centaurea*, *Centaurea babylonica*, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Anticancer activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini sabırla benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ'a,
Anadolu Üniversite Eczacılık Fakültesi'nde bana yüksek lisans yapma şansı tanıyan Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e
Arazi çalışmalarımnda değerli vaktini benimle paylaşıp yardımını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Yavuz Bülent KÖSE'ye,
Deney aşamalarımnda bana yol gösteren ve yardımcı olan Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye, Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye ve Yrd. Doç. Dr. Fatih GÖGER'e,
Eczacılık Fakültesi'nde eğitim gören, tüm çalışmalarım sırasında manevi desteğini gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma,
Lisansüstü eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen sevgili aileme ve arkadaşım Uzm. Biyolog Murat AYCAN'a,
Tüm içtenliğimle, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10/01/2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Elif DÜNDAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası	2
1.1.2. <i>Centaurea</i> L. cins özellikleri	3
1.1.3. <i>Centaurea babylonica</i> L. tür özellikleri	4
1.1.4. <i>Centaurea</i> türleri uçucu yağları üzerine yapılmış çalışmalar	5
1.1.5. Sitotoksisite ve hücre canlılığı	8
1.1.6. Hücre bölünmesi	8
1.1.7. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ve hücre kültürü	8
1.1.8. Antioksidanlar	9
2. YÖNTEM	12
2.1. Bitkisel Materyal	12
2.2. Distilasyon İşlemleri	13
2.3. Analitik Çalışmalar	13

2.3.1. Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)	13
2.4. Ekstrelerin Hazırlanışı	14
2.5. Fitokimyasal Ön Denemeler	15
2.5.1. Kimyasal reaksiyonların ayrılması	16
2.5.1.1. Gallik ve kateşik tanenlerin teşhisi	16
2.5.1.2. İndirgenmiş bileşiklerin teşhisi	16
2.5.1.3. Alkaloid teşhisi	16
2.5.2. Hidroliz edilen ekstre için kimyasal deneyler	16
2.5.2.1. Antrasen glikozitlerinin teşhisi	17
2.5.2.2. Kumarin glikozitlerinin teşhisi	17
2.5.2.3. Flavon glikozitlerinin teşhisi	17
2.5.2.4. Triterpen ve steroid glikozitlerinin teşhisi	17
2.5.2.5. Antosiyanin glikozitlerinin teşhisi	18
2.5.3. Kül miktar tayini	18
2.5.4. Toplam fenol miktar tayini	18
2.5.5. Fitokimyasal ön deneme çalışmalarında kullanılan belirteçler	18
2.6. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	19
2.6.1. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki tayini	19
2.6.2. 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) serbest radikalini süpürücü etki tayini	20
2.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri	20
2.7.1. Hücre kültürü yöntemi ile <i>in vitro</i> sitotoksik etki çalışmaları	20
2.7.1.1. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ölçümü	20
2.7.1.2. NIH/3T3 toksisite deneyi	21
2.7.1.3. DNA sentez inhibisyonu	21
3. BULGULAR	23
3.1. Distilasyon İşlemleri Sonuçları	23

3.2. Ekstrelerin Özellikleri	23
3.3. <i>Centaurea babylonica</i> Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu	23
3.4. Fitokimyasal Ön Deneme Çalışmalarının Sonuçları	25
3.5. Miktar Tayinleri	27
3.5.1. Kül miktar tayini	27
3.5.2. Toplam fenol miktar tayini	27
3.5.3. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini	28
3.5.4. 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS•+) serbest radikalini süpürücü etki tayini	29
3.5.5. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ölçümü	30
3.5.6. NIH/3T3 toksisite deneyi	31
3.5.7. DNA sentez inhibisyonu	32
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	35
KAYNAKÇA	38
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1.	<i>Centaurea</i> Türleri Üzerine Yapılmış Uçucu Yağ Çalışmaları	5
Tablo 3.1.	<i>C. babylonica</i> Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Ekstrelerin Verim %leri	23
Tablo 3.2.	<i>C. babylonica</i> Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu	24
Tablo 3.3.	<i>C. babylonica</i> Bitkisinin Fitokimyasal Ön Deneme Çalışmalarının Sonuçları	25
Tablo 3.4.	Ekstrelerin İçerdiği Gallik Asite Eşdeğer (GAE) Toplam Fenol Miktarları	27
Tablo 3.5.	<i>C. babylonica</i> Ekstrelerinin ve Standart Maddenin DPPH• Radikalini Süpürme Kapasiteleri	28
Tablo 3.6.	<i>C. babylonica</i> Ekstrelerinin Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi	29
Tablo 3.7.	MTT Hücre Boyama Sonuçları	30
Tablo 3.8.	Ekstrelerin Fibroblastlar Üzerindeki MTT Hücre Boyama Sonuçları Değerleri	31
Tablo 3.9.	Ekstrelerin ve Sisplatin'in A549 Hücre Tipinde DNA İnhibisyon Değerleri	32
Tablo 3.10.	Ekstrelerin ve Sisplatin'in C6 Hücre Tipinde DNA İnhibisyon Değerleri	33
Tablo 3.11.	Ekstrelerin ve Sisplatin'in MCF-7 Hücre Tipinde DNA İnhibisyon Değerleri	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. <i>Centaurea babylonica</i> Bitkisinin Türkiye’de Yayılış Alanı	5
---	---

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Grafik 3.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi	27
Grafik 3.2. <i>C. babylonica</i> Ekstrelerinin ve Standart Maddenin DPPH• Radikalini Süpürme Kapasiteleri	28
Grafik 3.3. <i>C. babylonica</i> Ekstrelerinin Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasiteleri	30
Grafik 3.4. Ekstrelerin ve Sisplatin'in A549 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu.	32
Grafik 3.5. Ekstrelerin ve Sisplatin'in C6 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu	33
Grafik 3.6. Ekstrelerin ve Sisplatin'in MCF-7 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu	34

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>Centaurea babylonica</i>	12
Görsel 2.2. <i>Centaurea babylonica</i>	12
Görsel 2.3. GK/KS ve GK-AİD Sistemi	13
Görsel 2.4 Ekstrelerin Hazırlanma Aşamaları	14
Görsel 2.5 Ekstrelerin Rotavapor'da Çözücünden Uzaklaştırılması	15
Görsel 3.1. Kateşik Tanen Varlığı	25
Görsel 3.2. İndirgenmiş Bileşiklerin Varlığı	26
Görsel 3.3. Antrasen Glikozitlerinin Varlığı	26

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazoline-6-sulfonik asit)
β	: Beta
BrdU	: 5-Bromo-2'-deoksiuridin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
ED1A	: Hekzan ekstresi (sıralı ekstraksiyon)
ED1B	: Etil asetat ekstresi (sıralı ekstraksiyon)
ED1C	: %70'lik metanol ekstresi (sıralı ekstraksiyon)
ED1D	: Sulu ekstre (Clevenger aпаратыnde balon içerisindeki sulu kısım)
ED1E	: Etil asetat ekstresi (yalın ekstraksiyon)
ED1F	: %70'lik metanol ekstresi (yalın ekstraksiyon)
GAE	: Gallik asit'e eşdeğer miktar
γ	: Gama
GK	: Gaz kromatografisi
GK-AİD	: Gaz kromatografisi-Alev iyonlaşma detektörü
g	: Gram
GK/KS	: Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
KS	: Kütle spektrometresi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
μ L	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
RTI	: Relatif tutunma indisi
TEAK	: Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite

1. GİRİŞ

Centaurea cinsi, Asteraceae familyasının en büyük cinslerinden biri olup *Cardueae* tribusunda yer alır (Davis, 1975, s. 327; Davis vd., 1988). *Centaurea* L. cinsi Türkiye’de yaklaşık 195 taksonla temsil edilmekte ve %60’ı endemik olarak sınıflandırılmaktadır (Köse, 2010, s. 11). Özellikle Güneybatı, Batı ve Anadolu’nun iç kesimlerinde doğal olarak yetişmektedir (Karaalp, 2008, s. 286).

Centaurea cinsinin farklı türleri farklı yörelerde, farklı isimler ve amaçlarla kullanılmaktadır. Çok çeşitli tedavi edici özellikleri ile *Centaurea* türleri özellikle antipiretik, antidiyareik, antidiyabetik, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı, midevi, adet söktürücü olarak, karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarının, nefes darlığı, ülser ve sıtma hastalığı tedavisinde, baş, göz ve boğaz ağrılarının giderilmesinde, göz çevresinde görülen şişliklerin tedavisinde, sinüs enfeksiyonlarında, yılan ve akrep sokmasına karşı dikenleri siğile batırılarak siğillerin yok edilmesinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Tuzlacı, 2006). *Centaurea* türleri üzerinde yapılan çalışmaları kapsayan bir derlemede bu türlerin yukarıda belirtilen etnofarmakolojik kullanımlarını destekleyen antiinflamatuvar, antipiretik, antiülserojenik ve antimikrobiyal etkilerinin yanında, antimikrobiyal, antiviral, antitroviral, düz kaslar üzerinde antispazmodik, hipoglisemik, immunolojik, nörotoksik, sitotoksik ve vazodilatör etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Arif, 2004, s. 150-161). Özellikle *Centaurea* türleri ile ilgili literatürdeki son çalışmalarda, bu cinse ait bazı türlerin yara iyi edici özelliğe sahip oldukları da görülmüştür (Csopor, 2010, s. 194; Koca, 2009, s. 554).

Centaurea cinsine ait çeşitli türlerin uçucu yağlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda özellikle seskiterpen yapıdaki bileşiklerin elde edildiği ve hem bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların hem de ekstraterlerinden izole edilen bileşiklerin antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği de görülmüştür (Yaylı, 2009, s. 1744; Formisano, 2008, s. 836; Skaltsa, 2000, s. 904; Köse, 2007, s. 11; Rosselli, 2009, s. 430).

Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan tıbbi ilaçların olumsuz yan etkileri ve bazı yetersizlikleri sebebiyle, kanserden koruyucu yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebepten dolayı ilaçlarda kullanılan etken maddelerin, bitkisel kaynaklı olanlarının tümör tedavilerinde alternatif ajan olarak değerlendirilmesine

yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir. *Centaurea* cinsine ait bazı türlerin de sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir (Beltagy, 2015, s. 106; Süzergöz, 2012; Ünlü, 2012).

Bu tür üzerinde daha önce sitotoksikite çalışması yapılmamış olması, yapılan çalışmalarda ekstre edilen maddelerin biyoaktivite göstermesi ve *Centaurea* türlerinin etnobotanik kullanımlarının olması bizi *Centaurea babylonica* bitkisi üzerinde araştırma yapmaya sürüklemiştir.

Kimyasal çalışmalarda türün herbaları ana etken madde grupları açısından incelenmiştir. Fenolik bileşikler için toplam fenol miktar tayini yapılmıştır. Uçucu yağ eldesi için Clevenger apareyinde hidrodistilasyon işlemi ve analiz sonuçlarının değerlendirilmesi için Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi sistemi (GK/KS) kullanılmıştır. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri DPPH• (1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazil) ve ABTS•• (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürücü etki tayini ile belirlenmiştir. Bileşiklerin *in vitro* sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile tespit edilerek önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin DNA sentez inhibisyon etkileri araştırıldı.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası

Bazı taksonlarda latisifer veya reçineli kanalları var olan, otsular, çalılar, ağaçlar ya da sarılıcı bitkilerden oluşur.

Yapraklar basit ya da birleşik, sarmal veya karşılıklı (nadiren dairesel) dizilişli, stipulsuzdur. Çiçeklenme durum; farklı sekonder çiçek durumları halinde dizilmiş bir veya daha fazla başçıklardan (kapitula) oluşur, her bir başçık, yassıdan koniğe kadar değişen şekilli, bir ya da daha çok çiçek taşıyan (sentripetal gelişen), bir ya da fazla sıralı braketler (yani fillariler, tümü involukrum olarak adlandırılır) tarafından çevrelenmiş birleşik bir reseptakulumdan oluşur.

Çiçekler, epigin, iki ya da tek eşeyli; bazı taksonlarda kabuk veya diken (deve dikenini gibi dikenli olanlarda) olarak bilinen brakteler tarafından sarılmıştır.

Periant, iki ya da tek serilidir, hipantiyum bulunmaz. Pappus olarak bilinen kaliks, 2-∞ (bazen bitişik) kılçıklar, pullar veya çok ince tüyler şeklinde değişikliğe uğramıştır, bazılarında pappus yoktur.

Korolla, simpetal, 5 (nadiren 4) lopludur (bazılarında kenar dişlerden 3'ü körelmiş). Stamenler, 5 (4) adet, dairesel, alternipetal, genellikle singenezik, anterler, stilusun uzandığı bir tüp halinde birleşiktir.

Anterler, bazifiks, apikal uzantılara ve bazen bazal loplara sahiptir, boyuna ve içe doğru açılır. Ginekeum, sinkarp, ovaryum alt durumlu, 2 karpelli ve 1 gözlüdür. Stilus tek, uçta ikiye dallanmıştır. Stigma iki adettir, stilus dallarının adaksiyal yüzlerinde lekeli çizgiler oluşur. Plasentalanma bazal, ovüller anatrop, her ovaryumda bir tanedir. Nektaryumlar genellikle ovaryumun ucunda bulunur. Meyve aken (ya da 'sipsela' alt durumlu ovaryumdan oluşmuş bir aken); akenler tipik çoklu meyve, bazı taksonlarda meyve ve pappus arasında uzamış şekilli bir gaga oluşur. Tohumlar albüminsizdir.

1.1.2. *Centaurea L. cins özellikleri*

Centaurea cinsi, Asteraceae familyasının en büyük cinslerinden biri olup Cardueae tribusunda yer alır (Davis, 1975; Davis vd., 1988; Güner, 2000; Köse, 2010). Türkiye'de yaklaşık 195 taksonla temsil edilmekte ve %60'ı endemik olarak sınıflandırılmaktadır (Köse, 2010, s. 11). Özellikle Güneybatı, Batı ve Anadolu'nun iç kesimlerinde doğal olarak yetişmektedir (Karaalp, 2008, s.286). Türkiye Florası'nda *Centaurea* cinsi, *Astragalus* ve *Verbascum* cinslerinin ardından tür sayısı bakımından ilk üç büyük cins içerisinde yer almaktadır (Davis ve Hedge, 1975). Son yıllarda moleküler yöntemlerle akrabalık ilişkilerini inceleme üzerine yapılan araştırmalar sonucu yeni eklenen türlerle birlikte Türkiye'de yaklaşık olarak 222 *Centaurea* türü yayılış göstermektedir (Bona, 2015, s. 63). Tür sayısının ve endemizm oranının yüksek olması, Anadolu'nun *Centaurea* cinsi için gen merkezi olabileceği görüşünü desteklemektedir.

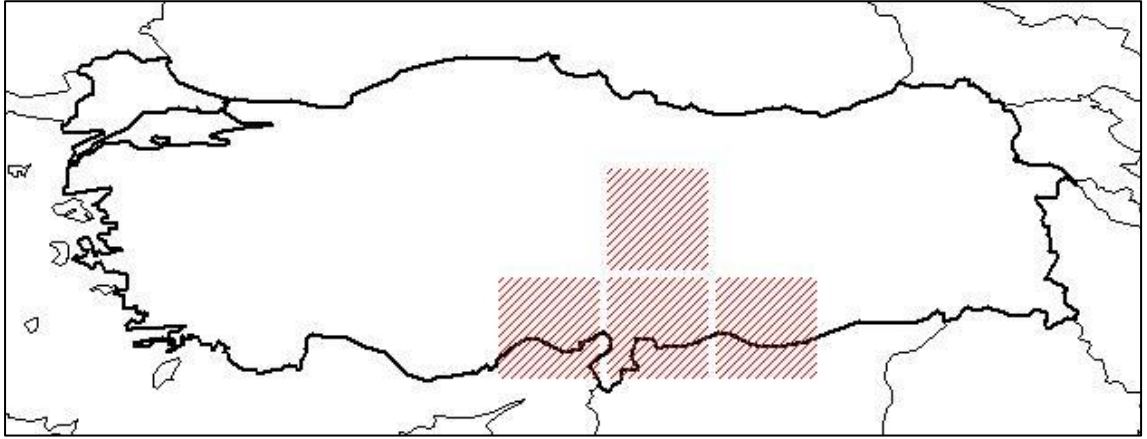
Centaurea cinsine ait türler farklı lokasyonlarda, farklı isimler ve amaçlarla kullanılmaktadır. *Centaurea* türlerinin halk arasında, özellikle antipiretik, antidiyareik, antidiyabetik, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı, midevi, adet söktürücü olarak, karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarının, nefes darlığı, ülser ve

sıtma hastalığı tedavisinde, baş, göz ve boğaz ağrılarının giderilmesinde; göz çevresinde görülen şişliklerin tedavisinde, sinüs enfeksiyonlarında; yılan ve akrep sokmasına karşı, dikenleri siğile batırılarak siğillerin yok edilmesinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Tuzlacı, 2006). *Centaurea* türleri üzerinde yapılan çalışmaları kapsayan bir derlemede bu türlerin yukarıda belirtilen etnobotanik kullanımlarını destekleyen antienflamatuvar, antipiretik, antiülserojenik ve antimalaryal etkilerinin yanında, antimikrobiyal, antiviral, antitoviral, düz kaslar üzerinde antispazmodik, hipoglisemik, immunolojik, nörotoksik, sitotoksik ve vazodilatatör etkilerinin olduğu görülmüştür (Arif, 2004). Özellikle *Centaurea* türleri ile ilgili literatürdeki son çalışmalarda, bu cinse ait bazı türlerin yara iyi edici özelliğe sahip oldukları da görülmüştür (Csupor, 2010; Koca, 2009).

1.1.3. *Centaurea babylonica* L. tür özellikleri

İki yıllık, 60-300 cm, dik, gri-tomentoz (yünsü) tüylü, çok sayıda kapitulum kanatlı bir eksende uzamış spika (başak) benzeri çiçek durumunda toplanmıştır. Alt yapraklar lirat, çok büyük, oblong terminal segmentli ve az sayıda aşağı dönük lateral segmentli; ortadaki yapraklar küçük, lanseolat, repand-dentat dişli veya tam kenarlı, dekurrent (aşağı doğru kayıcı) ve geniş kanatlı; üstteki yapraklar linear-lanseolat ve dekurrenttir. Kapitulum hemen hemen sapsız ve tek veya 3-4 tanesi eksen boyunca kısa saplıdır. İnvolutrum 19-23 x 101-5 mm ve kupa şeklindedir (tepe kısmına doğru daralır). Fillariler derimsi, yoğun olarak yatık, appendajsız (ek kısmı) veya kısa uçlu, 0.5-1 mm ve dökülücüdür. Çiçekler sarı, uçtakiler radyant değildir. Akenler 4.5-5.5 mm; papus 5-6 mm. Çiçeklenme 6-8. Çam ormanları, maki, açık alanlar, 200-1100 m.

Çoğunlukla Güney Anadolu'da Adana, Antalya'nın doğu kesimlerinde, Mersin ve Adana bölgelerinde bu türe rastlanmaktadır. Grid sistemde yayılış alanı olarak B6, C5, C6 ve C7 kareleri Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Centaurea babylonica* Bitkisinin Türkiye’de Yayılış Alanı

1.1.4. *Centaurea* türleri uçucu yağları üzerine yapılmış çalışmalar

Çok sayıda *Centaurea* türü üzerinde uçucu yağ çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmı Tablo 1.1’de uçucu yağ elde edilen kısımları ve ana bileşenleri ile birlikte şu şekilde özetlenmiştir;

Tablo 1.1. *Centaurea* Türleri Üzerine Yapılmış Uçucu Yağ Çalışmaları

Tür	Analiz yapılan bitki kısmı	Ana bileşenler	Kaynak
<i>Centaurea aladaghensis</i>	Kapitulum	Germakren D (22,7 %) α -Karyofillen (18,3 %) α -Ödesmol (11,8 %), Karyofillen oksit (7,5 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea antiochia</i> var. <i>praealta</i>	Kapitulum	Germakren D (45,1 %) Bisiklogermakren (5,5 %) α -Bisabolol (5,3 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea antitauri</i>	Kapitulum	Germakren D (40,2 %) β -Karyofillen (13,5 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea armena</i>	Herba	β -Ödesmol (19,3 %) Kalaren (10,3 %) 6,10,14-trimetil-2 pentadekanon (5,7 %)	Yaylı vd., 2005, s. 1742
<i>Centaurea babylonica</i>	Kapitulum	Germakren D (43,0 %) β -Karyofillen (9,9 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea balsamita</i>	Kapitulum	Germakren D (40,2 %) Bisiklogermakren (7,1 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
		α -Selinen (8,5 %) Hekzatriakontan (8,3 %)	Ertaş vd., 2014, s. 923

<i>Centaurea calcitrapa</i>	Herba	β -Karyofillen (5,3 %) (Z)- β -Farnesen (4,2 %) Heptanal (4,2 %)	Dob and Dahmane , 2011
<i>Centaurea cheirolepidoides</i>	Herba	Germakren D (21,7 %), β -Karyofillen (14,4 %) Karyofillen oksit (6,1 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea cunelifolia</i>	Herba	β -Ödesmol (26,5 %) Spatulenol (6,3 %) Karyofillen oksit (2,9 %)	Roselli vd., 2009, s. 430
<i>Centaurea cynaus</i>	Herba	Germakren D (14,8 %) Karyofillenoksit (19,6 %) Butanal (8,7 %)	Kılıç, Ö., 2015 ,s. 30
<i>Centaurea deflexa</i>	Kapitulum	Germakren D (21,2 %) β -Karyofillen (33,9 %) Karyofillen oksit (12,8 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea dichroa</i> (endemik)	Herba	Hekzadekanoik asit (11,8 %) Karyofillen oksit (9,8 %) Spatulenol (5,8 %)	Altıntaş vd., 2004, s. 604)
<i>Centaurea drabifolia</i> subsp. <i>detonsa</i> (endemik)	Herba	Germakren D (44,8 %) Hekzadekanoik asit (10,2 %) Karyofillen (4,7 %)	Zengin vd., 2012, s. 2
<i>Centaurea euxina</i>	Herba	Spatulenol (10,8 %) Karyofillen oksit (6,2 %) β -Ödesmol (3,9 %)	Roselli vd., 2009, s. 430
<i>Centaurea iberica</i>	Herba	Araşidik asit (25,3 %) Hekzadekanoik asit (5,9 %) Koleik asit (5,5 %)	Ertuş vd., 2014, s. 924
<i>Centaurea eryngioides</i>	Herba	β -Ödesmol (8,7 %) Karyofillen oksit (4,3 %) Karvakrol (0,8 %) Öjenol (0,5 %)	Senatore, Arnold and Bruno, 2005, s. 752
<i>Centaurea iberica</i> var. <i>hermonis</i>	Herba	4-Vinilgayakol (8,5 %) Hekzadekanoik asit (6,2 %) Dodekanoik asit (5,3 %)	Senatore, Arnold and Bruno, 2005, s. 752
<i>Centaurea iconiensis</i>	Kapitulum	1-Undeken (84,3 %) β -Karyofillen (3,4 %) Karyofillen oksit (0,5 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea lanigera</i>	Kapitulum	Germakren D (43,1 %) β -Karyofillen (13,7 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea luschaniana</i> (endemik)	Herba	Hekzadekanoik asit (40,0 %) Dodekanoik asit (12,6 %) Nonakosan (7,8 %)	Demirci vd., 2008, s. 336

<i>Centaurea lycopifolia</i>	Herba	Karyofillen oksit (9,7 %) Spatulenol (7,3 %)	Ertas vd., 20104, s. 924
<i>Centaurea paphlogonica</i> (endemik)	Herba	Hekzadekanoik asit (28,9 %) Dodekanoik asit (22,8 %) Karyofillen oksit (9,2 %)	Kose vd., 2009 s. 1719
<i>Centaurea ptosimopappoides</i>	Kapitulum	Germakren D (36,9 %) β -Karyofillen (22,5 %)	Flamini vd., 2006, s. 224
<i>Centaurea saligna</i>	Herba	Hekzadekanoik asit (41,9 %) Fitol (8,2 %) Heptakosan (5,2 %)	Altıntaş vd., 2009, s. 277
<i>Centaurea sessilis</i>	Herba	β -Ödesmol (12,4 %) Karyofillen oksit (10,0 %) Fitol (6,4 %)	Yaylı vd., 2005, s. 1742
<i>Centaurea stenolepis</i>	Çiçek (kapitulum)	Karyofillen oksit (12,6 %) Hekzadekanoik asit (10,6 %) α -Ödesmol (7,2 %)	Polatoğlu vd., 2014, s. 1273
	Gövde ve yapraklar	Hekzadekanoik asit (38,4 %) Fitol (12,9 %)	Polatoğlu vd., 2014, s. 1273
<i>Centaurea tchihatcheffii</i> (endemik)	Herba	Karyofillen oksit (15,1 %) Karvakrol (14,7 %) Asetofenon (6,2 %) Spatulenol (5,3 %)	Altıntaş vd., 2010, s. 4713)
<i>Centaurea tossiensis</i> (endemik)	Herba	Hekzadekanoik asit (50,6 %) Nonakosan (11,6 %) Heptakosan (10,7 %)	Demirci vd., 2008, s. 336
<i>Centaurea wagenitzii</i> (endemik)	Herba	Hekzadekanoik asit (25,6 %) Nonakosan (12,0 %) Heptakosan (9,8 %) Karyofillen oksit (7,3 %)	Demirci vd., 2008, s. 336

Yapılan kaynak taraması sonucunda *Centaurea* türleri uçucu yağ kompozisyonlarında heksadekanoik asit, germakren D, karyofillen oksit, dodekanoik asit, β -ödesmol, 1-undeken, bisiklogermakren, α -selinen, heksatriakontan, heptanal, spatulenol, araşidik asit ana bileşenler olarak kaydedilmiştir.

1.1.5. Sitotoksisite ve hücre canlılığı

Sitotoksisite; moleküler reaksiyonlar sonucu çeşitli makro moleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin bazı fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar ortaya çıkmasıdır.

Uygun koşul ve miktarda alınmayan her madde toksik etki yaratabilir. Bu etki, bir tür yapı değişikliği şeklinde veya biyokimyasal lezyon şeklinde gözlenebilir. Ortaya çıkan etki, tamir edilebilir olabileceği gibi hücre ölümü ile karşılaşmak da mümkündür. Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinin tespit edilmesi ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar sürdürülmektedir (Saygı, 2003, s. 294).

1.1.6. Hücre bölünmesi

Hücrelerin çoğalması ya da proliferasyonu hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşmektedir. Bir hücrenin, iki yavru hücreye bölünmesi işlemine ise hücre bölünmesi denir.

Hücre bölünme hızının tespiti, özellikle kanser gibi hastalıklarda çok önemlidir. Bu yolla tümör ikilenme zamanı gibi parametreler tespit edilebilir (Cho vd., 1986, s. 791).

Son zamanlarda kullanılmakta olan hücre proliferasyon testlerinde, proliferasyon çoğunlukla yeni DNA sentez hızı üzerinden ölçülmekte, bunun için floresan veya radyoaktif ışımaya özelliği gösteren nükleotit analoglarının yeni sentezlenen DNA zincirine eklenme hızı izlenmektedir. DNA sentez hızının ölçülebilmesi için kullanılan hücre proliferasyon kitlerinde radyoaktif olmayan 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) ve 5-etinil-2'-deoksiuridin (EdU) gibi timidin nükleotit analoglarının kullanıldığı görülmektedir (http 1).

1.1.7. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ve hücre kültürü

Mikroplate ölçümü, hücrenin canlılığı ve proliferasyonuna dayalı olarak geliştirilmiştir. Mikroplate formatında kullanılan en önemli parametreler metabolik aktivite ve DNA sentezidir. Genellikle bu yöntem hücrelerin

mitokondrial aktivitelerini ölçer. Hücreler bir kolorimetrik substrat ile birlikte (MTT) inkübe edilir (http 2).

Kolorimetrik yöntem için uygulanan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktivitesidir. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücrelerce renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptamaktadır. Örnek olarak, MTT içerisinde canlı hücreler renkli, suda çözünmez formazan tuzu tarafından indirgenirler. Formazan kristalleri çözüldükten sonra, çabuk ve kolayca klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nm de miktarı belirlenebilir (Doyle and Griffiths, 1998, s. 62). Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelere göre metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiğinden dolayı, bu yöntemle sitotoksikite ve hücre canlılığının yanında hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir.

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde çoğunlukla 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H tetrazolyum (XTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksime-toksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), metiltiyazol difenil tetrazolyum (MTT), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST1) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır.

Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanmak suretiyle formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır (http 3).

1.1.8. Antioksidanlar

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük miktarlarda, substratın pro-oksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ile başlatılan oksidasyonunu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir. Pro-oksidanlar ise lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olan ve bunun sonucunda çok çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara neden olan toksik maddelerdir. Antioksidanlar, pro-oksidanları etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürme yoluyla

hücre zararını engellerler (Sroka and Cisowski, 2003, s. 754; Cao and Prior, 1998, s. 1313). Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller olarak ifade edilirler (Halliwell and Gutteridge, 2015, s. 34). Bu eşleşmemiş elektronlar genellikle serbest radikallerin reaktivitesinin göstergesidir. Oksijen türevi radikaller, canlı organizmalarda bulunan radikaller arasında en önemli sınıfı oluştururlar (Miller, Buettner and Aust, 1990, s. 109; Kade, 2008, s. 10).

Antioksidanlar kompleks bir yapıya sahiptirler ve iki farklı mekanizmada etki gösterirler. Bunlar, doğrudan antioksidan etki gösterenler ve dolaylı antioksidan etki gösterenler olarak tanımlanırlar. Doğrudan etki gösterenler (glutatyon, fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidler gibi) fizyolojik, biyokimyasal veya hücresel proseslerde yer alarak serbest radikalleri inaktive ederler veya serbet radikaller tarafından başlatılan kimyasal reaksiyonları önlerler (Papetti vd., 2006, s. 157).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki gruptur; birincisi vücut hücreleri tarafından üretilirler (endojen) ve ikincisi, gıdalar yoluyla vücuda alınırlar (eksojen). Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), karotenoitler, polifenoller ve flavonoitlerdir. Birçok araştırmada sebze ve meyve tüketimi ile bazı kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Rice- Evans, Miller and Papanga. 1997, s. 153).

Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel kaynaklı maddelerdir. Bu bileşikler oksidatif düzende farklı şekillerde davranırlar. Örnek olarak oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya singlet oksijeni durdururlar. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürücü özelliğini kullanarak zincir reaksiyonların başlamasını önlerler veya metal iyon katalizörlerini bağlarlar (Shahidi, 1996, s. 17).

Bugüne kadar antioksidan kapasiteyi belirlemek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Prior and Cao, 1999, s. 1175, Somogyi vd., 2007, s. 50,51). Toplam

antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olarak ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin çoğu azobileşiklerin bozulması ile ortaya çıkan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayalı yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile ilgilidir. ET temelli yöntemler Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAK), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidant olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Somogyi vd., 2007, s. 50-51).

2. YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal

Centaurea babylonica bitkisi 23 Temmuz 2015 tarihinde Mersin ilinin Çamlıyayla ilçesinde 1000 m rakımda Namrun Kalesi'nin alt kısımlarından toplandı. Örnek Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda (ESSE) saklanmaktadır (ESSE No: 15080). Türün bu bölgedeki fotoğrafları Görsel 2.1 ve Görsel 2.2'de sunuldu. Kimyasal ve biyolojik aktivite deneyleri için toprak üstü kısımları (herba) kullanıldı.



Görsel 2.1. *Centaurea babylonica* (Fotoğraf: Yavuz Bülent KÖSE)



Görsel 2.2. *Centaurea babylonica* (Fotoğraf: Yavuz Bülent KÖSE)

2.2. Distilasyon İşlemleri

Bitkisel materyalden uçucu yağ elde edilmesi için laboratuvarında Clevenger apareyinde su distilasyonu işlemi yapıldı. *C. babylonica* bitkisi 100 gr tartıldı. Tartılan bitkisel materyal küçük parçalara bölünerek 2 litrelik balona doldurulduktan sonra balonun 2/3'üne kadar distile su ilave edildi ve 3 saat süreyle distilasyon işlemi yapıldı.

2.3. Analitik Çalışmalar

2.3.1. Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)

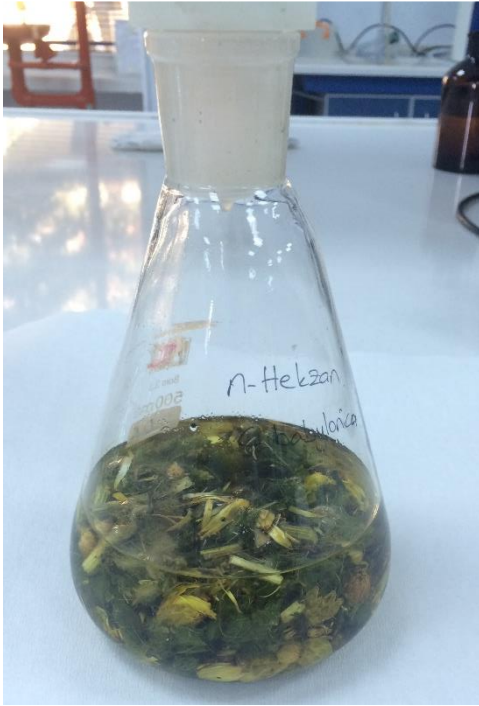
Elde edilen uçucu yağın eş zamanlı GK ve GK/KS sistemi ile analizi yapıldı. GK sisteminde kolonda ayrılan bileşikler AİD (alev iyonlaşma dedektörü) dedektör ile tespit edilerek bileşiklerin bağıl yüzdeleri belirlendi. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle spektrometrisi kısmında tek tek kütle spektrumları alındı. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" nin yanı sıra Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 2.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapıldı. GK/KS sistemi Görsel 2.3'de sunulmuştur.



Görsel 2.3. GK/KS ve GK-AİD Sistemi

2.4. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyalin kurutulmuş toprak üstü kısımları kaba toz haline getirildikten sonra çözücü olarak sırasıyla hekzan, etil asetat ve %70'lik metanol kullanılarak oda sıcaklığında 24'er saat süreyle ekstre edildi. Yapılacak deneylerde sonuçları ne derece etkileyeceğini görebilmek amacıyla toz halindeki materyal ayrıca tek tek hekzan, etil asetat ve %70'lik metanol çözücülerıyla 24'er saat ekstre edildi. Ekstre hazırlama aşaması Görsel 2.4'de sunulmaktadır. Elde edilen ekstreler rotavaporda (<math><40^{\circ}\text{C}</math>) yoğunlaştırıldı. Rotavaporda çözücünden uzaklaştırma işlemi Görsel 2.5'de sunulmaktadır. Bitkilerden Clevenger apareyinde uçucu yağlarından arındırılmış su ekstresi de yapılacak aktiviteler için ayrıldı. Ayrılan su ekstresi liyofilize edildi.



Görsel 2.4. Ekstrelerin Hazırlanma Aşamaları



Görsel 2.5. Ekstrelerin Rotavapor'da Çözücüden Uzaklaştırılması

2.5. Fitokimyasal Ön Denemeler

Fitokimyasal deneyler %70'lik metanol ekstresi ile yapıldı. Hazırlanan ekstre çözücüsünden uzaklaştırılarak saklandı. Fitokimyasal deneylerde kullanılma aşamasında test çözeltisi 50 mL miktarda, 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. 50 mL ekstrenin yarısı (25mL) kimyasal reaksiyonlar olan gallik tanenler, kateşik tanenler, indirgenmiş bileşikler ve alkaloidlerin teşhisi için ayrıldı. Diğer yarısı da hidroliz edilerek antresen glikozitleri, kumarin glikozitleri, steroid glikozitleri, triterpen glikozitleri, flavon glikozitleri ve antosiyanidin glikozitlerinin teşhisinde kullanılmak üzere ayrıldı.

2.5.1. Fitokimyasal reaksiyonlar

2.5.1.1. Gallik ve kateşik tanenlerin teşhisi

1 mL test çözeltisi üzerine 2 mL su ve 2-3 damla %5'lik demir (III) klorür'ün (FeCl_3) sulu çözeltisinden ilave edildi. Test çözeltisinde renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi.

Stiasny reaktifi de kateşik ve gallik tanen ayracı olduğundan deneyi desteklemek amacıyla test çözeltisi üzerine uygulandı ve parçalı çökelti oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

2.5.1.2. İndirgenmiş bileşiklerin teşhisi

İndirgenmiş bileşiklerin teşhisinde kullanılacak olan Fehling A ve Fehling B reaktifleri hazırlandı. Bir deney tüpü içerisine 1 mL test çözeltisi, üzerine 2 mL su eklendi. Sonrasında 2'şer damla Fehling reaktifleri (A ve B aynı tüp içerisine) ilave edilerek ısıtıldı.

2.5.1.3. Alkaloit teşhisi

20 mL test çözeltisi kapsül içine konularak su banyosunda 40 °C derecede buharlaştırıldı. Kapsül içindeki materyal kuruduktan sonra üzerine;

- 10 mL %10'luk hidroklorik asit (HCl) çözeltisi
- 3-4 damla ph 8-9 %10'luk amonyak (NH_4OH) çözeltisi
- 3 - 4 damla eter

eklenerek tekrar su banyosunda çözücünden uzaklaştırıldı. Çözücünden uzaklaştırılan ekstre üzerine 1,5 mL %2'lik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi eklendi. Kapsül içerisindeki çözelti, 0,5'er mL'lik 3 tüpe aktarıldı. Tüplerden bir tanesi kontrol kabul edilirken, diğer iki tüpten birine Mayer diğerine de Bertrand reaktifi eklendi. Alkaloit varlığına iki reaktiften en az birinin eklenmesinden sonra çökeltme görülmesi durumunda karar verildi.

2.5.2. Hidroliz edilen ekstre için kimyasal deneyler

Bu deneylerde kullanılmak üzere ayrılan 25 mL metanol ekstresi bir balona aktarıldı. Üzerine 15 mL %10'luk HCl çözeltisi eklenerek geri çeviren soğutucu

(reflux) ile 30 dakika boyunca hidroliz edildi. Hidroliz olan ekstre 3 kez 15 mL eter ile ayırma hunisinde yıkandı.

2.5.2.1. Antrasen glikozitlerinin teşhisi

4 mL eter ekstresinin 2 mL kadar yoğunlaştırıldıktan sonra üzerine 1-2 mL %25'lik amonyak çözeltisi eklenerek karışması sağlandı. Boroträger reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu çözeltinin amonyak fazının pembe renge dönüşümü beklendi.

2.5.2.2. Kumarin glikozitlerinin teşhisi

Kapsül içerisindeki 5 mL eterli ekstre buharlaştırıldı. Ekstre üzerine 2 mL sıcak su eklenerek tekrar çözüldü. Çözelti 1'er ml olmak üzere 2 tüpe ayrıldı. Tüplerden biri referans alındı, diğeri üzerine 0.5 mL %10'luk amonyak çözeltisi eklendi. Kumarin varlığını belirlemek amacıyla mavi veya yeşil renk görülmek üzere UV'de incelendi.

2.5.2.3. Flavon glikozitlerinin teşhisi

Kapsül içindeki 5 mL ekstre çözücüsünden uzaklaştırılmış ekstre üzerine 2 mL %50'lik metanol eklenerek tekrar su banyosunda ısıtılarak çözücü uzaklaştırıldı. Kuru ekstre üzerine 5 - 6 damla derişik hidroklorik asit ve 3 küçük parça magnezyum metali ilave edildi. Hidrojen gazı çıkışı ile uygun derişimde flavonda turuncu, flavonolde kırmızı, flavanonlarda mor renk meydana gelmesi beklendi.

2.5.2.4. Triterpen ve steroid glikozitlerinin teşhisi

10 mL buharlaştırılmış eter ekstresi üzerine 0,5 mL asetik anhidrit ve 0,5 mL kloroform eklenerek çözüldü. Çözelti su banyosunda tekrar buharlaştırıldı. Ekstre üzerine 1 mL glasiyel asetik asit ve sonrasında 1 -2 damla derişik sülfürik asit (H₂SO₄) ile tabakalandırıldı. Glikozit varlığında menekşe, mavi sonra yeşil renk oluşumu beklendi (Liebermann- Burchard reaksiyonu).

2.5.2.5. Antosiyanin glikozitleri teşhisi

15 mL eterli ekstre üzerine pH nötr hale gelene kadar 10 M sodyum hidroksit (NaOH) ilave edilerek, renk değişimi gözlemlendi.

2.5.3. Kül miktar tayini

Etüvde ısıtılarak sabit vazne getirilen bir porselen kroze içine kaba toz edilmiş ve tam 1 g olacak şekilde tartılmış drog konuldu ve önce düşük daha sonra 800 °C'yi geçmeyecek ısıda 30 dakika kül fırınında yakıldı. Yakma işleminin ardından kroze desikatöre alınarak soğutulduktan sonra tartıldı. Bu tartımdan boş kroze ağırlığı çıkarılarak kül miktarı bulunarak yüzde cinsinden ifade edildi.

2.5.4. Toplam fenol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton vd., 1999) kullanılarak hesaplandı. 10 µL numune üzerine 800 µL distile su ve 50 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek 1-8 dakika beklendi. Sonrasında numune üzerine 150 µL %20'lik sulu sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi eklenerek 2 saat 25 °C'de inkübe edildi. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda absorbans 760 nm'de ölçülerek gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar 3 paralel deney yapılarak ortalama değer alınarak hesaplandı.

Reaktifler şu şekilde hazırlandı;

Na₂CO₃: 20 gr sodyum karbonat tartılarak 100 mL suda çözüldü.

Gallik asit: Maddenin 1 mg/mL lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltildi.

2.5.5. Fitokimyasal ön deneme çalışmalarında kullanılan belirteçler

Stiasny reaktifi: 100 mL %30 Formaldehit, 50 mL derişik HCl asitle karıştırıldı.

%5'lik FeCl₃ (Demir III klorür) çözeltisi: 5 g FeCl₃, 100 mL suda çözülerek hazırlandı.

Mayer Reaktifi: 1,36 g HgCl₂ ve 25 g KI, 100 mL distile suda çözündürülerek hazırlandı.

Bertrand Reaktifi: 5 g Fosfotungstik asit, 80mL su içerisinde çözüldükten sonra üzerine 0.1 ml %10'luk hidroklorik asit (HCl) çözeltisi eklendi.

Kedde Reaktifi: 1 g 3,5-dinitrobenzoik asit üzeri 100 mL %96'lık alkol ile tamamlandı.

Fehling Reaktifleri

Fehling A: 34,66 g Bakır (II) sülfat 200 ml su içerisinde çözüldü.

Fehling B: 173 g sodyum ve potasyum tartarat ve 100 g sodyum hidroksit 300 ml su içerisinde çözüldü.

2.6. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

2.6.1. 1,1-Difenil-2-2 pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Numunelerin serbest radikal süpürücü etkisini belirlemek amacıyla DPPH• yöntemi kantitatif olarak yapıldı. Her numunenin metanol (MeOH)'deki stok çözeltisi 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Stok çözeltilerden, 96-kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının ilk sütununa sırasıyla 200'er µL aktarıldı. Çok-kanallı pipet aracılığıyla, eşit miktarda MeOH içinde 8 seri seyreltme yapılarak, 5 dakika boyunca vortekste karıştırıldı. DPPH• stok çözeltisi 2 mg DPPH'in 25 mL MeOH'de çözünmesiyle son konsantrasyonu 80 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µL DPPH• çözeltisinden eklenerek tepkime başlatıldı ve 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bekletildi. Gallik asit aynı konsantrasyonda pozitif kontrol, DPPH• + MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı plaklara uygulandı. UV absorbans 517 nm'de mikroplate spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında okuma yapıldı. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve istatistiksel değerlendirme ve hesaplamalarda Gen5 Data Analysis programı (BioTek) kullanıldı.

DPPH• % İnhibisyon konsantrasyonu değeri şu formül ile hesaplandı;

$$\%inhibisyon = [(A_{Kontrol} - A_{Numune}) / A_{Kontrol}] \times 100$$

2.6.2. 2,2'-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS^{•+}) radikal süpürücü etki

Standart TEAK metodu (Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi (Papandreou ve ark., 2006) kullanılarak gerçekleştirilmiş deney, ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalinin süpürülmesi ve vitamin E'nin suda çözünen analogu olan Troloks ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. 7mM ABTS^{•+} ve 2.5 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) karışımının karanlıkta 16 saat bekletilmesi sonucu mavi yeşil renkli radikal oluşumu sağlanarak, bu çözeltinin 734 nm'deki absorbansı 0,8-0,7 olacak şekilde absolü etanol ile seyreltildi. Standart olarak kullanılan Troloks çözeltileri sırasıyla 3; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mM konsantrasyonlarda hazırlandı. 10 µL örnek ve 990 µL hazırlanan ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılarak, 734 nm'de absorbansı 30. dakikada ölçüldü. Ölçümler sonucu Troloks için linear doğru denklemi oluşturuldu. Troloks'a eşdeğer antioksidan süpürücü etkisi Troloks'un kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı.

2.7. Biyolojik Aktivite Deneyleri

Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrelerin (hekzan, etil asetat, metanol) antikanser etkileri değerlendirilirken, birinci aşamada, bileşiklerin sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi ile tespit edildi. İkinci aşamada, önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin DNA sentez inhibisyon etkileri araştırıldı. Ekstrelerin toksik etkinliğini belirlemek amacıyla son olarak fibroblast hücreleri üzerinde selektivite testi (NIH/3T3) uygulandı.

2.7.1. Hücre kültürü yöntemi ile *in vitro* sitotoksik etki çalışmaları

2.7.1.1. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)

ölçümü

Bileşiklerin *in vitro* sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi. C6 (Glioma), A549 (insan akciğer adenokarsinoma) ve MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hatları kullanılarak MTT testi uygulandı. Çalışmada kullanılacak olan hücre hatları sıvı azottan (-196 °C) çıkarılarak, santrifüj edildikten sonra, C6 hücreleri Dulbeco's Modified Eagle's Medium ve A549 ve MCF-7 hücreleri RPMI ile %10 fetal sığır

serumu (FBS) içeren besi ortamının konulduğu flasklarda, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10³ hücre gelecek şekilde ekildi ve aynı zamanda hücrelere 1-1000 µg/mL konsantrasyonda örnekler eklenerek 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave edildi ve hücreler 37 °C'de 2 saat daha inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda, hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µL DMSO eklendi ve 10 dakika inkübe edildi. (Mosmann, T. 1983, s. 56) Pozitif kontrol olarak Sisplatin kullanıldı.

2.7.1.2. NIH/3T3 (fibroblast) toksisite deneyi

Bileşiklerin in vitro sitotoksik etkileri selektivite için MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, NIH/3T3 hücreleri RPMI ile % 10 Fetal sığır serumu (FBS) içeren besi ortamının konulduğu flasklarda, 37 °C'de, % 5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edildiler. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10³ hücre gelecek şekilde ekilerek ve aynı zamanda hücrelere 3,9-500 µg/mL konsantrasyonlarda bileşikler eklenerek 37 °C'de inkübe edildiler. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave edilerek, hücreler 37 °C'de 2 saat daha inkübe edildiler. Bu süre sonunda, hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µL DMSO eklendi ve 10 dakika inkübe edildiler. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildiler.

2.7.1.3. DNA sentez inhibisyon deneyi

Hücre çoğalma deneyleri 96-kuyulu tabakalarda Bromodeoksiüridin (BrdU) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler (C6, A549 ve MCF-7) 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra %0.25 tripsin/EDTA solüsyonu ile ortamdaki toplandı ve her bir kuyuya 1 x 10³ hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. DMSO içinde çözülen test maddeleri kuyulara 10, 50, 100, 200, 400 mikrogram/mL konsantrasyon aralıklarında eklendi ve her konsantrasyon aralığı için üç kuyuya ekim yapılarak ölçüm sonrası bunların ortalamaları dikkate alındı. Ekim işlemi tamamlandıktan

sonra, hücreler 37 °C'de, 24 saatlik zaman aralıklarında inkübatörde tutuldu. Her bir zaman aralığının sonunda hücreler üzerine 10 µL BrdU solüsyonu ilave edilerek 37 °C'de 2 saat daha inkübasyon gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda fiksdenat solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika karıştırılan hücreler, 100 µL anti-BrdU çalışma solüsyonu ile 90 dakika oda ısısında bekletildi. Hücreler, fosfat tuz tamponu (PBS) ile 3 kez yıkanarak fotometrik ölçüm için renk değişimi gözleninceye kadar substrat solüsyonu içine alındı ve örneklerin absorbanları 492 nm'de Elisa spektrometre ile ölçüldü.

3. BULGULAR

3.1. Distilasyon İşlemleri Sonuçları

Üç saatin sonunda Clevenger apareyindeki uçucu yağ çok az miktarda olduğundan hekzan ile alındı. Verim hesaplaması yapılamadı.

3.2. Ekstrelerin Özellikleri

Centaurea babylonica bitkisi toprak üstü kısımları hekzan (ED1A), etil asetat (ED1B) ve %70'lik metanol (ED1C) çözücülerinde sırasıyla maserasyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra etil asetat (ED1E) ve %70'lik metanol (ED1F) ekstreleri ayrıca hazırlanarak masere edildi. Clevenger apareyinde uçucu yağ alındıktan sonra balon içerisindeki sulu kısım (ED1D) da deneylerde kullanılmak üzere ayrıldı. Ekstrelerin verimleri kuru bitkisel materyal üzerinden hesaplandı. Hesaplanan veriler Tablo 3.1'de sunulmaktadır.

Tablo 3.1. *Centaurea babylonica* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Ekstrelerin Verim %leri

	Sıralı Ekstraksiyon				Doğrudan Ekstraksiyon	
Ekstreler	ED1A	ED1B	ED1C	ED1D	ED1E	ED1F
Verim %	0,96	1,14	9,453	7,7	0,76	7,86

* g ekstre / 100 g bitki

3.3. *Centaurea babylonica* uçucu yağının kimyasal bileşimi

Centaurea babylonica türü toprak üstü kısımlarının uçucu yağının kimyasal bileşimi gaz kromatografi tekniği ile araştırıldı. Bileşiklerin kalitatif analizi GK/KS, kantitatif analizi için GK-AİD sonuçları kullanıldı. Bileşikler kolondan çıkış sırasına göre Tablo 3.2'de listelenmiştir. Toprak üstü kısımlardan (sap, yaprak ve çiçek) elde edilen uçucu yağın %87,7'sini oluşturan toplam 32 bileşik tanımlandı.

Tablo 3.2. *C. babylonica* Uçucu Yağının Kimyasal Kompozisyonu

No.	RTI	Bileşik	%
1	1093	Hekzanal	3,5
2	1194	Heptanal	2,3
3	1296	Metil heptanoat	0,4
4	1393	Metil oktanoat	0,2
5	1400	Nonanal	0,6
6	1441	(E) 2- Oktenal	5,1
7	1463	1-Heptanol	0,7
8	1548	(E)-2-Nonanal	0,7
9	1506	Decanal	0,1
10	1562	Oktanol	0,4
11	1612	β -Karyofilen	1,3
12	1613	β -Cedren	0,5
13	1655	(E)-2-Dekanal	1,0
14	1662	Pulegon	0,2
15	1765	(E)-2 Undekanal	3,1
16	1827	(E,E)-2,4 Dekadienal	0,6
17	1871	Hekzanoik asit	0,3
18	1933	Tetradekanal	0,4
19	1948	γ -Oktalakton	0,4
20	2008	Karyofillen oksit	4,4
21	2040	Pentadekanal	2,2
22	2144	Spatulenol	1,4
23	2192	Nonanoik asit	0,9
24	2226	Metil hekzadekanoat	10,5
25	2245	Metil palmitoleat	1,8
26	2300	Trikosan	6,0
27	2130	Metil oktadekanoat	2,8
28	2456	Metil oleat	30,2
29	2458	Metil eleidat	1,8
30	2503	Dodekanoik asit	1,5
31	2641	Metil eikosoat	0,9
32	2670	Tetradekanoik asit	1,5
Toplam			87,7

RTI : Relatif tutunma indisi

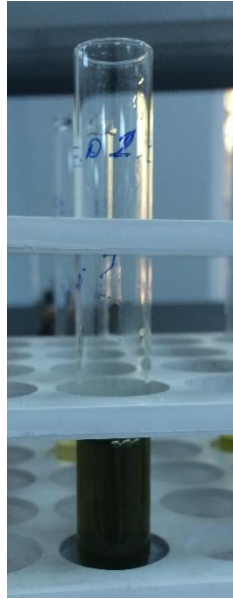
3.4. Fitokimyasal Ön Deneme Çalışmalarının Sonuçları

C. babylonica bitkisi üzerinde yapılan fitokimyasal ön deneme çalışmalarında kateşik tanen, indirgenmiş bileşikler, alkaloid ve antrasen glikozitlerinin varlığı saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.3'de sunulmaktadır.

Tablo 3.3. *C. babylonica* Bitkisinin Fitokimyasal Ön Deneme Çalışmalarının Sonuçları

Tanen	Gallik Tanen	-
	Kateşik Tanen	+
İndirgenmiş Bileşikler		+
Alkaloid		+
Antrasen Glikozitleri		+
Kumarin Glikozitleri		-
Steroid Glikozitleri		-
Triterpen Glikozitleri		-
Flavon Glikozitleri		-
Antosiyanin Glikozitleri		-

Kateşik tanenlerin varlığı test çözeltisi üzerine $FeCl_3$ damlatılmasıyla yeşil-siyah renk gözlenmesi sonucu tespit edildi (Bkz: Görsel 3.1).



Görsel 3.1. Kateşik Tanen Varlığı

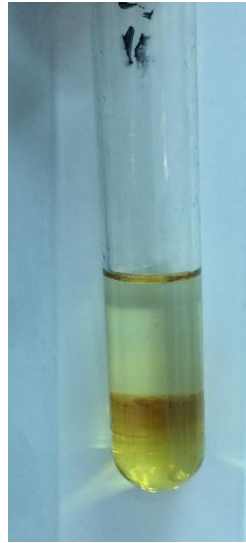
İndirgenmiş bileşiklerin varlığı, test çözeltisine reaktiflerin eklenip ısıtılmasıyla tuğla kırmızısı renk alması sonucu tespit edilmiştir (Bkz: Görsel 3.2).



Görsel 3.2. İndirgenmiş Bileşiklerin Varlığı

Alkaloit varlığı, test çözeltisine Bertrand Reaktifi eklenmesiyle beyaz-sarı renkte çökelti gözlenmesi sonucu belirlendi.

Antrasen Glikozitlerinin varlığına, Borträger reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu test çözeltisinde kırmızı halka gözlenmesiyle karar verildi (Bkz: Görsel 3.3).



Görsel 3.3. Antrasen Glikozitlerinin Varlığı

3.5. Miktar Tayinleri

3.5.1. Kül miktar tayini

C. babylonica bitkisi üzerinde yapılan kül miktar tayini sonucu %20,15 olarak belirlendi.

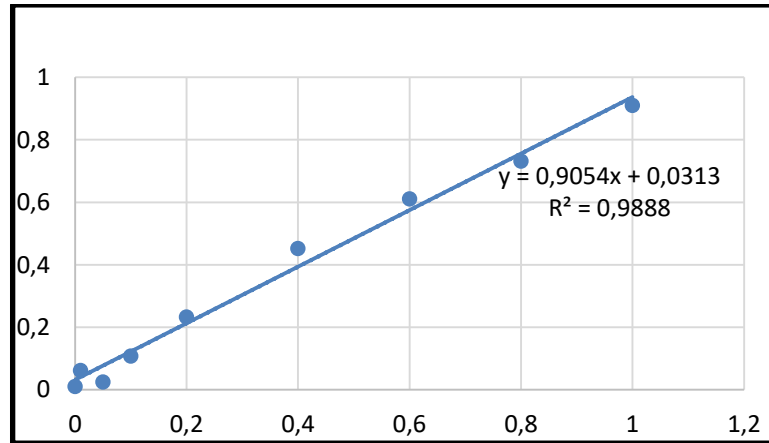
3.5.2. Toplam fenol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Tablo 3.4'te ekstrelerin toplam fenol miktarları gallik asite eşdeğer olarak verildi. Hesaplamalarda kullanılan gallik asitin kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemini ise Grafik 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.4. Ekstrelerin İçerdiği Gallik Asite Eşdeğer (GAE) Toplam Fenol Miktarları

Kod	<i>Centaurea babylonica</i> ekstreleri	Toplam Fenol Miktarı [mg _{GAE} /g _{ekstre}]
ED1A	Hekzan	0,05 ± 1,1
ED1B	Etil asetat	16,75 ± 1,3
ED1C	Metanol	60,56 ± 3,54
ED1D	Sulu ekstre	33,85 ± 0,72
ED1E	Etil asetat	3,71 ± 1,41
ED1F	Metanol	60,87 ± 9,3

Grafik 3.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi



Bitkinin ED1A, ED1B ve ED1E ekstrelerinin fenolik içerik bakımından zengin olmadığı gözlemlendi. ED1C ve ED1F ekstrelerinin fenolik bileşiklerce en zengin ekstreler olduğu belirlendi. *C. babylonica* ekstreleri içerdiği toplam fenolik

bileşik miktarları bakımından ED1F > ED1C > ED1D > ED1B > ED1E > ED1A şeklinde sıralanmaktadır.

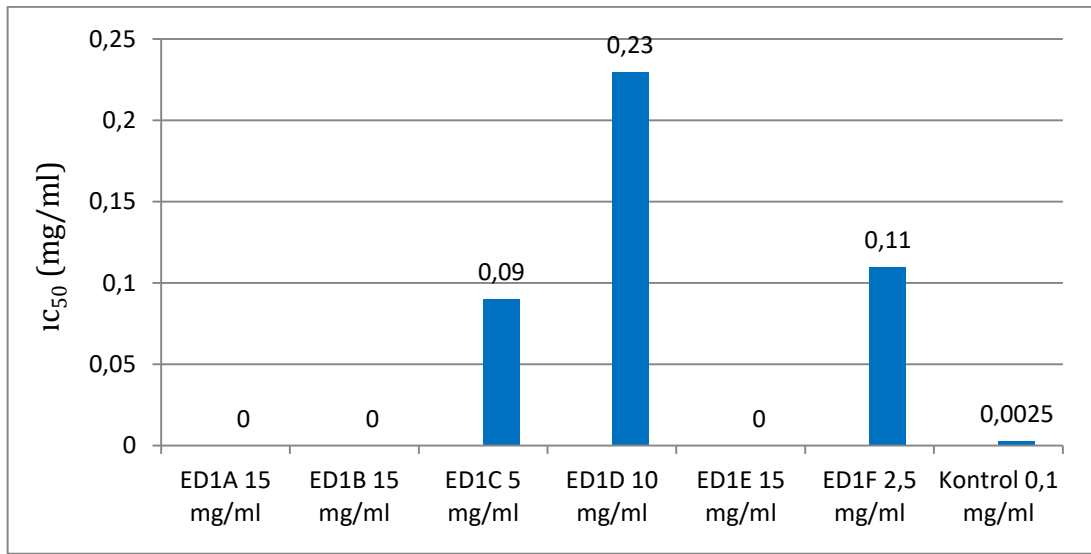
3.5.3. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

DPPH• IC₅₀ sonuçları nonlinear regresyon eğrileri kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar Tablo 3.5'te verildi. Hekzan (ED1A) ve etil asetat (ED1B, ED1E) ekstrelerinde IC₅₀ değeri 15 mg/mL'den daha büyük hesaplandı. 5 mg/mL metanol (ED1C) ekstresinde IC₅₀ değeri 0,09 ± 0,02, 10 mg/mL sulu ekstrede (ED1D) IC₅₀ değeri 0,23 ± 0,06 mg/mL, 2,5 mg/mL metanol (ED1F) ekstresinde IC₅₀ değeri 0,11 ± 0,03 mg/mL olarak tespit edilirken pozitif kontrol olan 0,1 mg/mL gallik asitin IC₅₀ değeri 0,0025 ± 0,0008 mg/mL tespit edildi.

Tablo 3.5. *C. babylonica* Ekstrelerinin ve Standart Maddenin DPPH• Radikalini Süpürme Kapasiteleri

Kod	Ekstre Tipi	IC ₅₀ (mg/mL)
ED1A	Hekzan	> 15
ED1B	Etil asetat	> 15
ED1C	Metanol	0,09 ± 0,02
ED1D	Sulu ekstre	0,23 ± 0,06
ED1E	Etil asetat	> 15
ED1F	Metanol	0,11 ± 0,03
Kontrol	Gallik asit	0,0025 ± 0,0008

Grafik 3.2. *C. babylonica* Ekstrelerinin ve Standart Maddenin DPPH• Radikalini süpürme kapasiteleri



3.5.4. 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) serbest radikalini süpürücü etki tayini

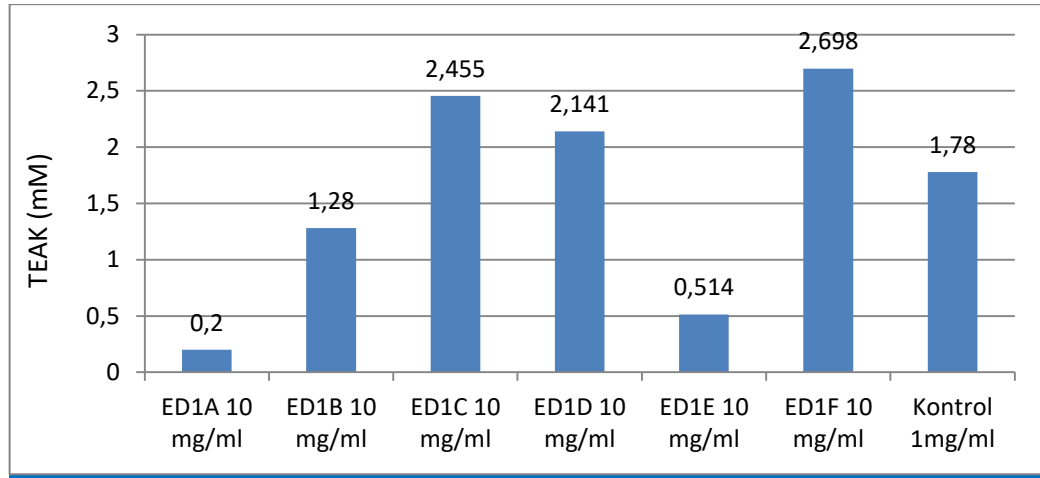
C. babylonica ekstrelerinin ABTS^{•+} serbest radikalini süpürme etkisi Troloks'un etkisine eşdeğer olarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Numunelerin antioksidan etkileri Troloks'un (standart madde) ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ile karşılaştırılarak saptandı. Numunelerin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. *C. babylonica* Ekstrelerinin Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAK)

<i>C. babylonica</i> Ekstreleri 10 mg/mL	ED1A	ED1B	ED1C	ED1D	ED1E	ED1F	KONTROL
	Hekzan ekstresi	Etil asetat ekstresi	Metanol ekstresi	Sulu ekstre	Etil asetat ekstresi	Metanol ekstresi	1 mg Gallik Asit
TEAK (mM)	0,2 ± 0,001	1,3 ± 0,09	2,45 ± 0,09	2,14 ± 0,21	0,51 ± 0,06	2,7 ± 0,22	1,78 ± 0,01

C. babylonica bitkisinin toprak üstü kısımları kullanılarak hazırlanan hekzan ekstresi (ED1A) $0,14 \pm 0,05$ mM, etil asetat ekstresi (ED1B) $1,3 \pm 0,1$ mM, metanol ekstresi (ED1C) $2,45 \pm 0,09$ mM, sulu ekstre (ED1D) $2,14 \pm 0,06$ mM, etil asetat ekstresi (ED1E) $0,51 \pm 0,06$ mM ve metanol ekstresi (ED1F) $2,7 \pm 0,22$ mM olarak tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan 1 mg gallik asit ise 1,78 mM TEAK'a eşdeğerdir. Sonuçlar Grafik 3.3'te sunulmuştur.

Grafik 3.3. C. babylonica Ekstrelerinin Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasiteleri



3.5.5. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) ölçümü

Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanıldı ve sonuçlar bu pozitif kontrole göre kıyaslandı. Doz ve zaman aralığı, literatürdeki benzer türevlerin çeşitli kanser hücre tiplerine karşı gösterdikleri sitotoksik konsantrasyonlara bağlı olarak belirlendi. MTT boyama sonrası ölçümler Tablo 3.7'de verildi.

Tablo 3.7. MTT Hücre Boyama Sonuçları

Hücre grubu Ekstreler	A 549	MCF 7	C 6
ED1A	263,33 ± 75,72	335,0 ± 21,21	445,0 ± 7,07
ED1B	20,0 ± 2,0	32,67 ± 21,18	38,33 ± 2,87
ED1C	>500	>500	>500
ED1D	>500	>500	>500
ED1E	50,0 ± 10,0	66,67 ± 15,63	14,33 ± 1,53
ED1F	18,0 ± 4,34	45,0 ± 8,29	45,67 ± 2,52
Sisplatin	17,5 ± 2,12	33,0 ± 6,24	26,67 ± 5,77

*IC₅₀/µg/mL ekstre

ED1C ve ED1D ekstreleri IC₅₀ değerlerinin 3 farklı kanser hücre tipinde 500 µg/ml'nin üzerinde olduğu görüldü.

ED1A ekstresinin de 3 farklı kanser hücre tipinde kontrol grubu olan sisplatin ile karşılaştırıldığında etkisinin düşük olduğu belirlendi.

ED1F ekstresinin A549 hücreleri için Sisplatin'in etkisine çok yakın değerde olduğu, MCF7 ve C6 hücrelerinde de IC₅₀ değerlerinin Sisplatin'e yakın olduğu saptandı.

ED1E ekstresi A549 ve MCF7 hücreleri üzerinde iyi etkili olduğu belirtilirken C6 hücreleri üzerinde kontrol grubu olan Sisplatin'in etkisinden de fazla etki gösterdiği saptandı.

Ekstrelerin hücrelerdeki antikanser etkileri aşağıdaki gibi sıralanmıştır;

A549 tip hücrelerde; F > B > A > C, D

MCF 7 tip hücrelerde; B > F > E > A > C, D

C 6 tip hücrelerde; E > B > F > A > C, D

3.5.6. NIH/3T3 toksisite deneyi

Ekstrelerin fibroblastlar üzerindeki toksik etkilerinin IC₅₀ değerleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

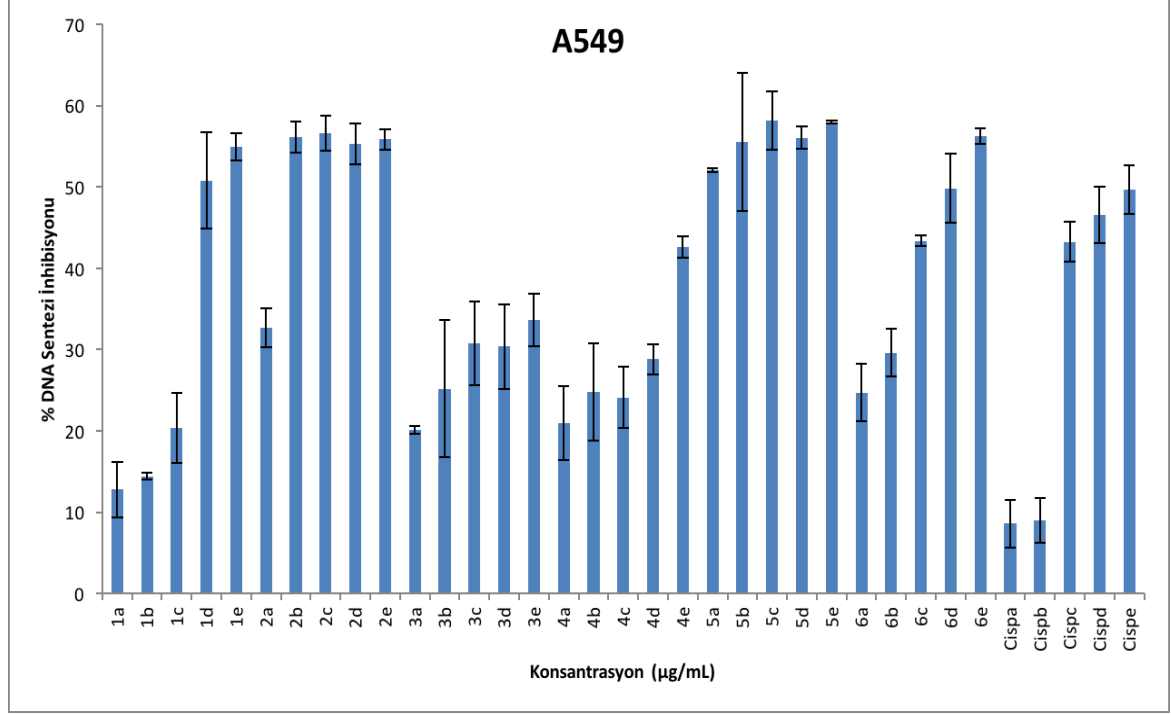
Tablo 3.8. Ekstrelerin Fibroblastlar Üzerinde MTT Hücre Boyama Sonuçları

Ekstre	Fibroblast (IC ₅₀)
ED1A	>500
ED1B	29 ± 1
ED1C	376,6 ± 25,2
ED1D	>500
ED1E	43 ± 8,8
ED1F	306,6 ± 64,3

3.5.7. DNA sentez inhibisyonu

DNA sentez inhibisyonu deney sonuçları hücre tiplerine göre Grafik 3.4, 3.5, 3.6 ve Tablo 3.9, 3.10, 3.11'da sunulmaktadır.

Grafik 3.4. Ekstrelerin ve Sisplatin'in A549 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu

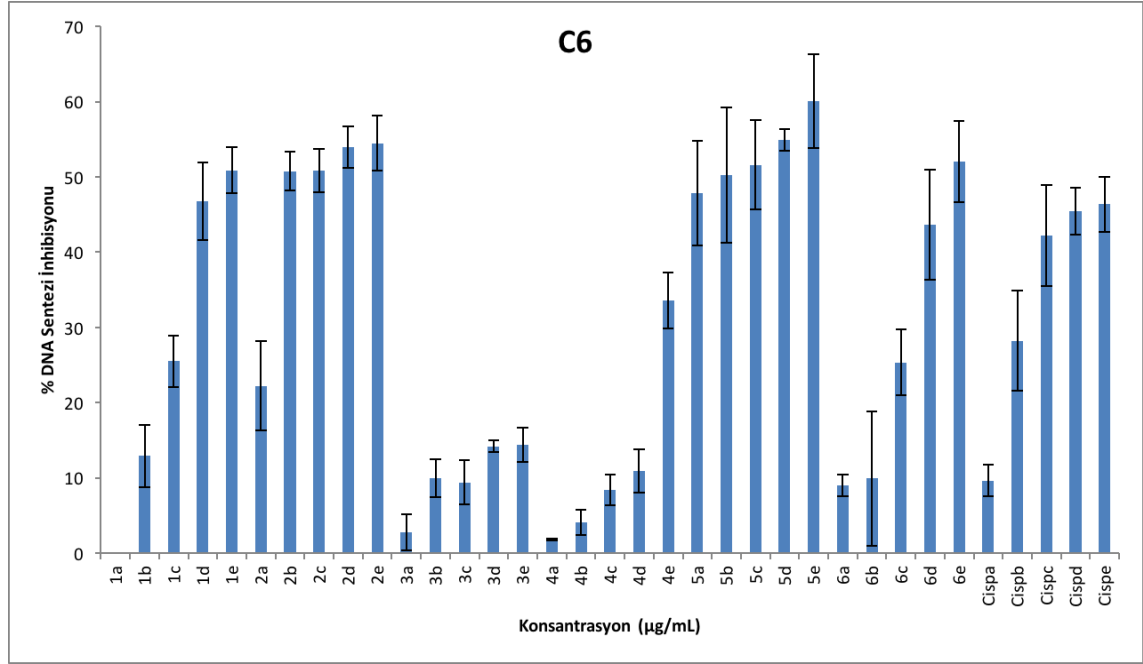


Tablo 3.9. Ekstrelerin ve Sisplatin'in A549 Hücre Tipinde DNA İnhibisyon değerleri

Ekstre Dozları µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)						
	ED1A (1)	ED1B (2)	ED1C (3)	ED1D (4)	ED1E (5)	ED1F (6)	Sisplatin (Cisp)
(a) 10	12,8 ± 3,41	32,7 ± 2,34	20,2 ± 0,5	20,9 ± 4,5	52 ± 0,2	24,6 ± 3,5	8,6 ± 2,9
(b) 50	14,4 ± 0,42	56,1 ± 1,91	25,1 ± 8,4	24,8 ± 5,9	55,5 ± 8,5	29,6 ± 2,9	8,9 ± 2,7
(c) 100	20,3 ± 4,33	56,5 ± 2,2	30,8 ± 5,13	24,1 ± 3,8	58,1 ± 3,5	43,3 ± 0,6	3,2 ± 2,4
(d) 200	50,8 ± 5,9	55,2 ± 2,54	30,4 ± 5,21	28,7 ± 1,8	56,1 ± 1,3	49,8 ± 4,2	46,5 ± 3,4
(e) 400	54,9 ± 1,7	55,8 ± 1,21	33,6 ± 3,2	42,6 ± 1,3	58 ± 0,2	56,2 ± 1	49,6 ± 3

Ekstrelerin A549 (İnsan Akciğer Kanseri Hücreleri) hücreleri üzerindeki etki sonuçlarına bakıldığında; ED1B ve ED1E ekstrelerinde 10 µg/mL dozlarında kontrol maddesi olan Sisplatin'den daha yüksek IC₅₀ değeri saptandı.

Grafik 3.5. Ekstrelerin ve Sisplatin'in C6 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu

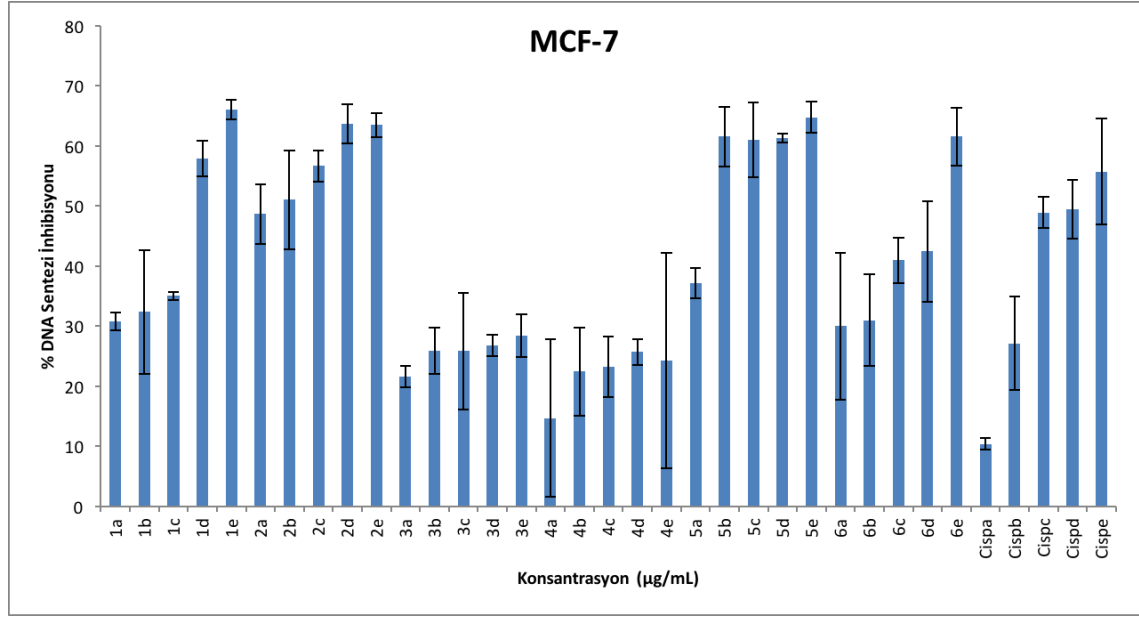


Tablo 3.10. Ekstrelerin ve Sisplatin'in C6 Hücre Tipinde DNA İnhibisyon değerleri

Ekstre Dozları µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)						Sisplatin (Cisp)
	ED1A (1)	ED1B (2)	ED1C (3)	ED1D (4)	ED1E (5)	ED1F (6)	
(a) 10	0	22,2 ± 5,9	2,7 ± 2,4	1,7 ± 0,1	47,8 ± 6,9	9 ± 1,4	9,6 ± 2,1
(b) 50	12,9 ± 4,1	50,8 ± 3,1	9,9 ± 2,5	4,1 ± 1,6	50,2 ± 9	9,9 ± 8,9	28,2 ± 6,7
(c) 100	25,5 ± 3,4	53,9 ± 2,7	9,3 ± 2,9	8,3 ± 2	51,6 ± 5,9	25,3 ± 4,4	42,2 ± 6,7
(d) 200	46,7 ± 5,2	53,9 ± 2,7	14,2 ± 0,7	10,9 ± 2,9	55 ± 1,4	43,6 ± 7,2	45,4 ± 3,1
(e) 400	50,8 ± 3,1	54,5 ± 3,7	14,3 ± 2,2	33,5 ± 3,7	60 ± 6,2	52,1 ± 5,3	46,4 ± 3,6

Ekstrelerin C6 (Glioma) hücreleri üzerindeki etki sonuçlarına bakıldığında; en yüksek etkiyi ED1E ekstresinin 10 µg/mL dozda gösterdiği saptandı.

Grafik 3.6. Ekstrelerin ve Sisplatin'in MCF-7 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu



Tablo 3.11. Ekstrelerin ve Sisplatin'in MCF-7 Hücre Tipinde DNA İnhibisyonu

Ekstre Dozları µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)						Sisplatin (Cisp)
	ED1A (1)	ED1B (2)	ED1C (3)	ED1D (4)	ED1E (5)	ED1F (6)	
(a) 10	30,8 ± 1,5	48,6 ± 4,9	21,6 ± 1,7	14,6 ± 13,1	37,1 ± 2,4	30 ± 12,2	10,4 ± 1
(b) 50	32,3 ± 10,3	51 ± 8,2	25,8 ± 3,9	22,4 ± 7,3	61,5 ± 4,9	31 ± 7,6	27,1 ± 7,8
(c) 100	35 ± 0,6	56,6 ± 2,6	25,8 ± 9,6	23,2 ± 5	61 ± 6,2	40,9 ± 3,8	48,9 ± 2,6
(d) 200	57,8 ± 3	63,6 ± 3,2	26,7 ± 1,7	25,6 ± 2,2	61,3 ± 0,7	42,4 ± 8,3	49,4 ± 4,9
(e) 400	66,1 ± 1,6	63,4 ± 1,9	28,4 ± 3,5	24,3 ± 17,9	64,7 ± 2,6	61,5 ± 4,8	55,7 ± 8,7

Ekstrelerin MCF-7 (İnsan Meme Kanseri Hücre) hücrelerindeki etkilerine bakıldığında; ED1C ve ED1D ekstrelerinin etkisinin diğer ekstrelerle göre daha az etki gösterdiği görüldü. Bu hücre tipi üzerinde Sisplatin'e en yakın değeri gösteren ED1E ekstresi olduğu saptandı.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonucunda *C. babylonica*'nın uçucu yağ analizinde ana bileşenler metil oleat (30,17%), metil hegzadekanoat (10,56%), trikosan (6,01%) olarak belirlenmiştir. Flamini vd. (2006) yaptıkları bir araştırmada *C. babylonica* bitkisinin uçucu yağ ana bileşenlerini germakren D (43,0%), β -Karyofillen (9,9%), heptil asetat (7,1%), *p*-simen (6,1%) olarak belirlemiştir. Fakat bu çalışmada yapılan analizler sonucunda; germakren D, β -Karyofillen, heptil asetat ve *p*-simen'e rastlanmamıştır.

C. babylonica türü üzerinde yapılan fitokimyasal ön deneme çalışmaları sonucunda; kateşik tanen, indirgenmiş bileşikler, alkaloid ve antresen glikozitlerinin varlığı tespit edildi.

Tez kapsamında *C. babylonica* metanol ekstresi üzerinde DPPH ve toplam fenol tayini yapılmış, sonuçlar ise sırasıyla $0,11 \pm 0,03$ mg/mL ve $60,87 \pm 9,3$ mg/mL olarak kaydedilmiştir. Aktumsek vd., (2013, s.93) aynı bitkide metanol ekstresi üzerinde yaptıkları DPPH• ve toplam fenol aktivitesinde toplam fenol miktar tayini mg GAE/g de $274,94 \pm 5,11$ olarak, DPPH aktivitesini ise IC₅₀ değerini $464,23 \pm 9,36$ mg/mL olarak bildirmişlerdir. Analiz sonuçları karşılaştırıldığında arada önemli derecede fark olduğu görülmektedir.

Bu farklılığın sebepleri şu şekilde sıralanabilir;

- Toplanan bitkisel materyal lokasyonlarının farklılığı
- Ekstrelerin hazırlanma süreci: Aktumsek vd., (2013, s. 92) bitkisel materyal Soxhlet apareyinde metanol ile ekstre edilmiştir.

Duran vd., (2015, s. 137)'nin yaptığı çalışmada ise sonuçlar biraz daha farklıdır. DPPH inhibisyonunu metanol ekstresinde %81,53 olarak kaydedilmiştir. Yaptığımız çalışmada, metanol ekstresi (ED1C) 2,5 mg/mL konsantrasyonda %57,1 inhibisyon göstermiştir. Çalışmalar arasındaki bu farkın temel nedeni; kullanılan ekstrelerin hazırlık aşamasından kaynaklanmaktadır. Duran vd., (2015) yapmış olduğu araştırmada, ekstraksiyon işlemi %90 metanol + %9su + %1 asetik asit karışımı kullanmışken, çalışmamızda %70'lik metanol kullanılmıştır.

ABTS*• deneyinde metanol ekstresinin (ED1F) yüksek etki gösterdiği görülmüştür. *C. babylonica* sulu ekstresinde de antioksidan etkinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Sitotoksisite deneylerinde MTT boyama sonrası sonuçlar oldukça etkilidir. A549 ve MCF-7 hücre tiplerinde ED1E en etkili ekstre olarak kaydedilirken, ED1C ekstresi de etkili bulunmuştur. A549 hücreleri üzerinde ED1F Sisplatin'in etkisine çok yakın değerde bulunurken bu etki aynı zamanda, MCF-7 ve C6 hücrelerinde de Sisplatin'e yakın görülmüştür. Dolayısıyla bu ekstreler A549 ve MCF7 hücreleri üzerindeki aktivitelerinin yüksek olduğunu gösterir. C6 hücreleri üzerinde en yüksek etkiyi gösteren ekstre ED1E'dir. Kontrol grubu olan Sisplatin'den daha yüksek etki göstermesi oldukça önemli bir veridir.

DNA inhibisyon ölçümlerinde, ED1A, ED1B, ED1C, ED1D, ED1E, ED1F ekstrelerinin ve kontrol olarak Sisplatin'in 10, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL dozları A549, C6 ve MCF-7 hücre hatlarının üzerinde etkisi araştırılmıştır.

A549 hücre hattında kontrol olarak kullanılan Sisplatin'in en yüksek inhibisyon değeri 400 µg/mL'de $49,6 \pm 3$ olarak ölçülmüştür. Gözlemlenen tüm değerler Sisplatin'in 10 µg/mL'de ölçülen inhibisyon değerinden yüksek olmakla birlikte 10 µg/mL'de en iyi inhibisyon değeri ED1E ekstresinde $58 \pm 0,2$ µg/mL olarak kaydedilmiştir. ED1E ekstresinin tüm dozları A549 hücre hattı için en yüksek ölçülen kontrol değerinden daha yüksek tespit edilmiştir.

C6 hücre hattında kontrol olarak kullanılan Sisplatin'in inhibisyon değerleri kullanılan doz arttıkça artmaktayken, en yüksek inhibisyon değeri 400 µg/mL'de $46,4 \pm 3,6$ olarak ölçülmüştür. ED1A 10 µg/mL hariç gözlemlenen tüm değerler Sisplatin 10 µg/mL'de ölçülen inhibisyon değerinden yüksek olmakla birlikte 10 µg/mL'de en iyi inhibisyon değeri ED1E ekstresinde $47,8 \pm 6,9$ µg/mL olarak kaydedilmiştir. ED1E ekstresinin tüm dozları C6 hücre hattı için en yüksek ölçülen kontrol değerinden daha yüksek tespit edilmiştir.

MCF-7 hücre hattında kontrol olarak kullanılan Sisplatin'in inhibisyon değerleri kullanılan doz arttıkça artmaktayken, en yüksek inhibisyon değeri 400 µg/mL'de $57,7 \pm 8,7$ olarak ölçülmüştür. Gözlemlenen tüm değerler Sisplatin 10 µg/mL'de ölçülen inhibisyon değerinden yüksek bulunmuştur. 10 µg/mL'de en iyi inhibisyon değeri ED1B ekstresinde $48,6 \pm 4,9$ µg/mL olarak kaydedilirken, ED1E

ekstresi de aynı konsantrasyondaki inhibisyon değeri $37,1\pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak kaydedilmiştir.

Centaurea cinsine ait diğer türler üzerinde yapılan sitotoksite testlerine şu şekilde örnek verilebilir;

Köse vd. (2016), *Centaurea baseri* türü üzerinde A549, C6 ve MCF7 hücrelerini kullanarak MTT ve DNA sentez inhibisyonu çalışmalarını uygulamışlardır. MTT testi sonuçlarında kontrol olan sispilatine en yakın değer MCF7 hücrelerinde görülmüştür. MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde uygulanan DNA sentez inhibisyon deneyi sonucunda iki hücre tipinin de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda Sispilatin'den düşük etki gösterdiği kaydedilmiştir.

Beltagy (2015), *Centaurea scoparea*'nın alkol ekstresi üzerinde MCF-7 hücrelerini kullanarak tetrazolyum tuzlarını içeren SRB (Sülforodamin) testini uygulamıştır. Kontrol olarak da Doksorubisin kullanılmıştır. Etanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri $8.03\mu\text{g}/\text{ml}$ bulunarak, yüksek etki gösterdiği kaydedilmiştir.

Ekstreler üzerinde uygulanan NIH/3T3 selektivite testi sonuçlarında ED1B ve ED1E ekstrelerinin sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Fakat diğer ekstreler için toksik etki söz konusu değildir.

Centaurea babylonica bitkisi üzerinde daha önce kapsamlı bir çalışma yapılmamış olması, bu tezde elde edilen herhangi bir bulguyla karşılaştırılamamıştır. Bu tez çalışmasının bundan sonra bu bitki türü üzerinde yapılacak çalışmalara ışık tutması amacıyla faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Aktümsek, A., Zengin, G., Güler, G.O., Çakmak Y.S., Duran, A. (2013). Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chemistry*, 141, 91–97.
- Altıntaş, A., Koca, U., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2010). Essential oil composition of endemic *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. and Mey. from Turkey, *Asian Journal of Chemistry*, 6, 4711-4716.
- Altıntaş, A., Köse, Y.B., Kandemir, A., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2009). Composition of the essential oil of *Centaurea saligna*, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 45, No. 2, 276-277.
- Altıntaş, A., Köse, Y.B., Yücel, E., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2004). Composition of the essential oil of *Centaurea dichroa*, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 40, (6), 604 – 605.
- Arif, R., Küpeli E., ve Ergun F. (2004). *Centaurea* L. türlerinin biyolojik aktivitesi (Derleme), GÜ, *Fen Bilimleri Dergisi*, 17(4), 149-164.
- Baytop T. (1999). Türkiye 'de bitkilerle tedavi, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul
- Beltagy, A. M. (2015). Chemical composition and cytotoxic activity of *Centaurea scoparea* Sieb against four human cell lines. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 7(3), 103-107.
- Bona, M. (2015). *Centaurea goksivriensis* (Asteraceae), a new species from Turkey. *Phytotaxa*, 203 (1), 63–68.
- Cao, G. and Prior, R.L. (1998), Comparison of different analytical methods for assesing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.
- Cho, K.G., Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J.A., Wilson, CB. (1986). Prediction of tumour doubling time in recurrent meningiomas. Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling. *Journal of Neurosurgery*. 65 (6),790-794.
- Csupor, D., Blazsó, G., Balogh, A., Hohmanna, J. (2010). The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 127, 193–195.
- Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands., Edinburgh University Press, Edinburgh. Vol. 5, s. 1-890

- Davis, P.H., Mill, R.R and Tan, K. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 1). PH Davis (Ed.), Edinburgh University Press, Edinburgh. Vol. 10
- Demirci B., Köse, Y.B., Yücel, E., Baser, K.H.C. (2008). Composition of the essential oil of three endemic *Centaurea* species from Turkey, *Journal of Essential Oil Research*, 20:4, 335-338.
- Doyle, A. and Griffiths, J.B. (1998). Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. John Wiley&Sons. 57-61:62-64.
- Duran A., Uslu N., Doğan B., Özcan M.M., Çelik M. (2015). Antioxidant activity and phenolic contents of 30 selected medicinal plants, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 21(2), 136-141.
- Ertaş, A., Gören, A.C., Boga, M., Demirci, S., Kolak, U. (2014). Chemical composition of the essential oils of three *Centaurea* species growing wild in anatolia and their anticholinesterase activities, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, (5), 922 – 926.
- Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Bağcı, Y., Dural, H., Ertuğrul, K., Uysal, T., Savran, A. (2006). A multivariate statistical approach to *Centaurea* classification using essential oil composition data of some species from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 261: 217–228.
- Formisano C., Rigano, D., Senatore, F., Çelik, S., Bruno, M., Rosselli S. (2008). Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities. *Natural Product Research*, 22 (10), 833–839.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2). Vol. 11, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine (5th ed.), Oxford University Press., 30-36.
- Kade, I.J. (2008), Interactions of organodiselenides with sülphydryl groups at the active sites of some thiol containing proteins – *in vitro* and *in vivo*

mechanistic studies in mammalian models of diabetes, *Doctor of philosophy thesis*, Universidade Federal de Santa Maria.

- Karaalp C., Tan G., Erel B. S., Demir S., Akgün İ., Bedir E. (2008). *Centaurea cyanus* L.'nin sekonder metabolitleri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 37 (4), 285 – 294.
- Kılıç, Ö. (2015). Essential oil composition of two *Centaurea* L. (Asteraceae) species from Turkey. *Düzce University Journal of Science and Technology*, 3 (1), 28-33.
- Koca, U., Süntar, I.P., Keles, H., Yesilada, E., Akkol, K.E. (2009). In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *Journal of Ethnopharmacology*. 126, 551-556.
- Köse Y.B., Alan S. ve Yücel E. (2010). *Centaurea* L. cinsi *Phalolepis* (Cass.) DC. seksiyonuna ait türlerin morfolojik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. *Biological Diversity and Conservatio.*, 3 (1), 10 - 22.
- Köse, Y B., Altıntaş, A., Demirci, B., Çelik, S., Başer, K.H.C. (2009). Composition of the essential oil of endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz From Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 21 (3), 1719-1724.
- Köse, Y B., İşcan, G., Göger, F., Akalın, G., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2016). Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri*: New Species from Turkey. *Chem. Biodiversity*, 13, 1369-1379.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions, *Free radicals in Biology and medicine*, 8, 95-109.
- Papetti, A., Daglia, M., Grisoli, P., Dacarro, C., Gregotti, C., Gazzani, G. (2006), Anti- and pro-oxidant activity of *Cichorium* genus vegetables and effect of thermal treatment in biological systems. *Food Chemistry*, 97, 157-165.
- Polatoglu, K., Sen, A., Bulut, G., Bitis, L., Gören, N. (2014) Essential oil composition of *Centaurea stenolepis* Kerner. from Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, TEOP 17 (6), 1268 – 1278.
- Prior, R.L. and Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Bio. Med.*, 27, 1173-1181.

- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1997), Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Roselli, S., Bruno, M., Maggio, A., Raccuglia, A.R., Bancheva, S., Senatore, F., Formisano, C. (2009). Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C. euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 426-431.
- Saygi S. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291 - 298.
- Senatore, F., Arnold, N.A. and Bruno, M. (2005). Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon. *Natural Product Research*, 19 (8), 749-754.
- Shahidi, F. (1996), Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, (2)-77.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M. (2000) Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*. 55, 903-908.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay Z. and Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, 28, 41-55.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. (2003), Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758.
- Süzergöz, F., Özçelik, A. ve Can, N. E. (2012). *Centaurea obtusifolia* ekstrelerinin sitotoksik etkilerinin k562 hücre dizilerinde MTT yöntemiyle araştırılması. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*. Türkiye, Ege Üniversitesi.
- Tuzlacı E. (2006). Şifa niyetine Türkiye 'nin bitkisel halk ilaçları, Alfa Yayınları, İstanbul.
- Ünlü, Ö., Aydaş, S. B. ve Aslım, B. (2012). *Centaurea depressa* (Asteraceae)'nın antigenotoksik özelliklerinin ve çeşitli kanser hücre hatları üzerine antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*. Türkiye, Ege Üniversitesi.

- Yaylı, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolaylı, S., Coşkunçelebi, K., Karaoğlu, Ş. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, 66, 1741–1745.
- Zengin, G., Aktümsek, A., Güler, G.O., Çakmak, Y.S., Kan, Y. (2012). Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey. *Natural Product Research*, 26 (1), 1–10.

Web sayfasında yayınlanan bildiriler

- http 1 : [www.rocheappliedscience.com/isis/apoptosis/index.jsp?id=cellproliferation_products_overview&fol=products &pageid=brdu_labeling_and_detection_kit_iuii](http://www.rocheappliedscience.com/isis/apoptosis/index.jsp?id=cellproliferation_products_overview&fol=products&pageid=brdu_labeling_and_detection_kit_iuii) (Erişim tarihi: 04.11.2012)
- http 2 : www.lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf, Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations. page 116-122 (Erişim Tarihi: 20.9.2012)
- http 3 : www.atcc.org/2273.pdf (Erişim Tarihi: 14.11.2012)
- http 4 : [www.biocompare.com/Articles/117892-Cell Proliferation-Assays/](http://www.biocompare.com/Articles/117892-Cell_Proliferation-Assays/) (Erişim Tarihi: 05.11.2012)