GÜFBED/GUSTIJ (2017) 7 (1): 41-50
Research/Araştırma

# *Dianthus carmelitarum* Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi

İbrahim TURAN[1,2], Selim DEMİR[3*], Rezzan ALİYAZICIOĞLU[4]
Sema MISIR[5], Yüksel ALİYAZICIOĞLU[6]

[1]*Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 29100, Gümüşhane*
[2]*Gümüşhane Üniversitesi, Tıbbi Bitkiler, Geleneksel İlaçlar Uygulama ve Araştırma Merkezi, 29100, Gümüşhane*
[3]*Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, 61080, Trabzon*
[4]*Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, 61080, Trabzon*
[5]*Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, Sivas*
[6]*Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 61080, Trabzon*

Geliş tarihi/*Received* 10.10.2016
Düzeltilerek geliş tarihi/*Received in revised form* 30.11.2016
Kabul tarihi/*Accepted* 05.12.2016

***Öz***

*Dianthus carmelitarum Reut. Ex Boiss. Dianthus cinsi ve Caryophyllaceae familyasına mensup bir bitki olup, bu cins bitkiler sıklıkla geleneksel tedavide kullanılmaktadırlar. Farklı Dianthus türlerinin farklı ekstraktlarının antioksidan ve sitotoksik etkilerini konu alan çok sayıda çalışma olmasına rağmen, D. carmelitarum ekstraktlarının bu özellikleri ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı D. carmelitarum'un dimetil sülfoksitli ekstraktının antioksidan özelliklerini ve sitotoksik etkilerini belirlemektir. Ekstraktın toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve indirgeyici antioksidan güç tayini spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlendi. Ekstraktın sitotoksik etkisi ise insan serviks (HeLa), akciğer (A549), meme (MCF-7) ve prostat (PC-3) kanser hücre serilerinde MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Ekstraktın toplam fenolik madde miktarı ve indirgeyici antioksidan güç değerleri 100 g örnek başına sırasıyla 853.9±19.4 mg gallik asit eşdeğeri ve 1378.7±87.4 mg troloks eşdeğeri olarak bulundu. Ekstrakt çalışılan tüm kanser hücre serileri üzerinde sitotoksik etki gösterdi ve* $IC_{50}$ *değerleri 117.4-142.1 µg/mL arasında hesaplandı. Bu çalışma D. carmelitarum ekstraktının kanser hücre serileri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisini ortaya koyan ilk çalışmadır. Ekstrakttaki etken molekülleri ve bunların etki mekanizmalarını belirleyebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.*

***Anahtar kelimeler:*** *Antioksidan aktivite, Dianthus carmelitarum, Kanser, Sitotoksisite*

# Investigation of Antioxidant and Cytotoxic Properties of *Dianthus carmelitarum* Extract

***Abstract***

*Dianthus carmelitarum Reut. Ex Boiss. belongs to the genus Dianthus and the family Caryophyllaceae and this genus is frequently used in traditional medicine. Numerous studies have investigated the antioxidant and cytotoxic effects of various extract of different Dianthus species,*

[*] Selim DEMİR, selim.demir@ktu.edu.tr, Tel: (0462) 377 88 41

DOI: http://dx.doi.org/10.17714/gufbed.2017.07.004 ISSN: 2146-538X http://dergipark.gov.tr/gumusfenbil

*but there have been no studies about the antioxidant and cytotoxic effect of D. carmelitarum. The aim of this study was to determine the antioxidant properties and cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide extract of D. carmelitarum. The total polyphenolic contents (TPC), total flavonoid content (TFC) and reducing antioxidant power of extract were evaluated using spectrophotometric procedures. The cytotoxic effects of extract were revealed on human cervix (HeLa), lung (A549), breast (MCF-7), and prostate (PC-3) cancer cell lines using thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. TPC and FRAP values were 853.9±19.4 mg gallic acid equivalents and 1378.7±87.4 mg trolox equivalents per 100 g sample, respectively. The extract showed cytotoxic effects on all studied cancer cell lines and $IC_{50}$ values ranged from 117.4 to 142.1 µg/mL. This is the first in vitro study to investigate the cytotoxic effect of D. carmelitarum extract on cancer cells. Further studies are required to clarify the molecules involved and their mechanisms.*

***Keywords:*** *Antioxidant activity, Cancer, Cytotoxicity, Dianthus carmelitarum*

## 1. Giriş

Kanser; hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin aşırı hücre proliferasyonu ya da azalmış apoptoz nedeniyle bozulması sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Kanser oluşum sürecinde baskılanmış ya da azalmış apoptozun önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Demir vd., 2016a). Günümüzde her yıl milyonlarca insana kanser teşhisi konulmaktadır. Amerikan Kanser Derneği verilerine göre dünya üzerindeki yıllık ölümlerin yaklaşık %2-3'ünün kanser kaynaklı olduğu ve yılda yaklaşık 3.5 milyon insanın kanserden öldüğü bildirilmektedir (Kathiresan vd., 2006). Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisi için sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Kemoterapötik ilaçlarla kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesinde iki hedef mekanizma ön plana çıkmaktadır. Bunlar; hücre büyümesinin durdurulması ya da apoptozun aktiflen-mesidir. Hücre döngüsünün durdurulması kanser hücrelerinin elimine edilmesinde etkili bir stratejidir. Apoptoz ise intrinsik ve ekstrinzik sinyal yolaklarındaki faktörlerin etkisiyle düzenlenmektedir (Liang vd., 2012). Son yıllarda kanser hücrelerine karşı kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç gelişimi ve bu ilaçların kronik kullanımının normal hücrelerde de toksisite göstermesi sebebiyle yeni nesil antikanser ajanlar geliştirme konusu oldukça popüler bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu amaçla gerek sentetik, gerekse de doğal ürünler yeni nesil antikanser ajan araştırmalarında sıklıkla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda denenmekte-dirler (Cenic-Milosevic vd., 2013). Bitkilerin asırlardır insan ve hayvan hastalıklarıyla mücadelede kullanıldıkları bilinmektedir. Bugün klinikte kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamak için kullanılan modern ilaçların yaklaşık % 50'si doğal ürünlerden elde edilmektedir (Rosangkima ve Prasad, 2004). Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların yaklaşık % 80'i primer sağlık sorunlarını gidermek için geleneksel tedaviye başvurmaktadır (Cenic-Milosevic vd., 2013). Bu nedenle doğal ürünlere potansiyel ilaç hammaddeleri gözüyle bakılmaktadır (Demir vd., 2016a).

*Dianthus* cinsi yaklaşık 300 tür içermekte olup, Kuzey Yarımküre'nin ılıman ve soğuk kuşaklarında yayılım göstermektedir (Hsieh vd., 2004). Türkiye'de ise 76 *Dianthus* türünün bulunduğu ve bunlardan 33 tanesinin endemik olduğu bildirilmektedir. *Dianthus carmelitarum* da bu endemik *Dianthus* türlerinden birisidir (Reeve, 1967; Hamzaoglu vd., 2015). *Dianthus* türleri *Caryophyllaceae* ailesine mensup tıbbi bitkiler olup halk arasında diüretik, anti-inflamatuvar, immün sistemi kuvvetlendirici ve balgam söktürücü olarak kullanıldıkları bildirilmektedir. Faydalı biyolojik etkilerinden dolayı geleneksel tedavide üriner enfeksiyon, çıban, menopoz, bel soğukluğu, öksürük ve kanser tedavilerinde kullanılmaktadırlar (Hsieh vd., 2004; Nho vd., 2012; Yu vd., 2012; Lamula ve Ashafa, 2014). *Dianthus* türlerinin alkaloidler, tanninler, saponinler, siklik peptidler ve fenolik bileşiklerce (benzoik

asidin metoksi türevleri, kuersetrin, kaempferol ve dimetoksi flavon gibi) zengin olduğu bildirilmektedir (Gou vd., 2011; Yu vd., 2012; Ding vd., 2013; Lamula ve Ashafa, 2014). *Dianthus* türlerinin içerdikleri faydalı flavonoid ve steroid yapıdaki bileşiklerden dolayı antimikrobiyal, pro-apoptotik, antioksidan ve antidiyabetik etkileri belirlenmiştir (Yu vd., 2007; Yu vd., 2012; Lamula ve Ashafa, 2014; Kazeem ve Ashafa, 2015). *Dianthus* türlerinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmalarda ise; Yu vd. (2012) *Dianthus superbus*'un etanollü ekstraktının petrol eter, etil asetat, bütanol ve su fraksiyonlarının insan karaciğer kanseri (HepG2 ve Bel-7402) ve serviks kanseri (HeLa) hücre serilerinde sitotoksik etkisini araştırmışlar ve en iyi sonuçların etil asetat fraksiyonunda elde edildiğini göstermişlerdir (Yu vd., 2007). Nho vd. (2012) ise *Dianthus chinensis*'in etanollü ekstraktının HepG2 hücre serisinde mitokondri bağımlı apoptoz yolağını aktifleyerek kaspaz aktivasyonu ile sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Nho vd., 2012). Böyle olduğu halde literatürde *Dianthus carmelitarum* ekstraktlarının sitotoksik etkinliğini konu alan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle hazırlananan bu çalışmanın amacı; *Dianthus carmelitarum*'un dimetil sülfoksit (DMSO) ekstraktının antioksidan özelliklerinin tespit edilmesi ve ekstraktın insan serviks (HeLa), akciğer (A549), meme (MCF-7) ve prostat (PC-3) kanser hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesidir.

## 2. Materyal ve Metot

### *2.1. Materyal*

#### *2.1.1. Bitkisel Materyal*

Çalışmada kullanılan *Dianthus carmelitarum* bitki örnekleri 2015 yılı yaz mevsiminde Sinop'tan toplandı. Bitkinin tür teşhisi Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk Özgen tarafından yapıldı ve AEF-26695 herbaryum numarası ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (AEF) herbaryumuna kaydettirildi.

#### *2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler*

Antioksidan aktivite ve sitotoksisite analizlerinde kullanılan tüm kimyasallar analitik ya da HPLC sınıfı saflıkta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından satın alındı. Hücre kültüründe kullanılan EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyeri ile tripsin çözeltisi Lonza (Verviers, Belçika), fetal bovin serum (FBS) Biochrom (Berlin, Almanya) ve gentamisin ise Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, İsrail) firmalarından temin edildi.

#### *2.1.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları*

Bu çalışma yapılırken laboratuvar değirmeni (Retsch ZM 200, Haan, Almanya), mikropleyt okuyucu (Molecular Devices Versamax, California, ABD), hücre kültürü kabini (Heraeus KS-12, Langenselbold, Almanya), $CO_2$ inkübatörü (Thermo Forma 381, Marietta, ABD), ters faz mikroskop (Nikon Eclipse TS100, Tokyo, Japonya), santrifüj (Eppendorf 5804, Hamburg, Almanya) ve hassas analitik terazi (Mettler Toledo AB204-S, Greifensee, İsviçre) gibi laboratuvar cihazları kullanıldı.

### *2.2. Metot*

#### *2.2.1. Ekstraksiyon*

Bitki numuneleri oda sıcaklığında 20 gün boyunca kurutuldu, süre sonunda toprak üstü kısımları dikkatlice ayrılıp laboratuvar değirmeni yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş örneklerden 0.5 g alınarak 10 mL saf DMSO ile karıştırıldı. Karışım iyice vortekslendikten sonra 45ºC'de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra karışım 1800×g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi. Elde edilen DMSO'lu ekstrakt deneylerde kullanılmak üzere alikotlanıp -20ºC'de, karanlıkta saklandı.

#### *2.2.2. Ekstraktın Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi*

#### *2.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini*

Ekstraktın toplam fenolik madde içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton, 1977). 12.5 µL örnek, 62.5 µL Folin reaktifi (1:10 saf su ile seyreltilmiş) ve 125 µL % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi ile karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 760 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Standart olarak gallik asit kullanıldı ve toplam fenolik madde miktarı mg gallik aside eşdeğer/g örnek olarak hesaplandı.

#### *2.2.2.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini*

Ekstraktın toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi (Moreno vd., 2000). 20 µL örnek; 172 µL % 80'lik etanol, 4 µL % 10'luk alüminyum klorür ve 4 µL 1 M potasyum asetat çözeltisi ile karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 415 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Standart olarak kuersetin kullanıldı ve toplam flavonoid madde miktarı mg kuersetine eşdeğer/g örnek olarak hesaplandı.

#### *2.2.2.3. Demir İndirgeyici Gücün Belirlenmesi*

Demir indirgeyici gücün belirlenmesi için Oyaizu'nun geliştirdiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Oyaizu, 1986). 40 µL numune; 100 µL 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 100 µL potasyum ferrisiyanat ile karıştırılıp, karanlıkta 50ºC'de 20 dakika inkübe edildi ve süre sonunda su altında soğutuldu. Karışımın üzerine 100 µL % 10'luk trikloroasetik asit ilave edildi ve karışım 3000×g'de 10 dakika santrifüjlendi. Üst fazlardan 100'er µL örnek alınarak 96 kuyucuklu mikropleyte aktarıldı ve üzerine 100 µL distile su ve 20 µL demir (III) klorür ilave edildi. Son karışım oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 700 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Standart olarak troloks kullanıldı ve demir indirgeyici güç mg troloksa eşdeğer/g örnek olarak hesaplandı.

### *2.2.3. Hücre Kültürü*

Çalışmada kullanılan HeLa, A549, MCF-7 ve PC-3 insan kanser hücre serileri Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den satın alındı. Hücreler % 10 fetal bovine serum (FBS) ve % 1 gentamisin ile zenginleştirilmiş L-glutamin içeren EMEM besiyeri içerisinde % 5 $CO_2$ ortamında, 37ºC'de, T-75'lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

#### *2.2.3.1. Sitotoksisite Analizleri*

Ekstraktın kanser hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesinde MTT metodu (Mosmann, 1983) modifiye edilerek kullanıldı. Sitotoksisite deneylerinde pozitif kontrol olarak cisplatin kullanıldı. Cisplatin DMSO ile çözüldü ve ara stok çözeltileri hücre kültürü besiyeri ile hazırlandı. Hücrelerin maruz kaldığı final DMSO konsantrasyonu tüm deneylerde % 0.5'in altında tutuldu. Tripsinizasyon ile flasklardan kaldırılan hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 5000 hücre düşecek şekilde 200 µL besiyeri içinde ekildi. Başlangıçtan 24 saat sonra; pleytler inkübatörden alındı, içerikleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200'er µL taze besiyeri eklendi. Taze besiyerleri üzerine son konsantrasyonları 5-500 µg/mL olacak şekilde ekstrakttan ve 1-10 µg/mL olacak şekilde cisplatin çözeltisinden uygun hacimlerde ilaveler yapılıp hücrelerin bu maddelerin farklı konsantrasyonları ile 37ºC'de 72 saat inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı ve bütün kuyucuklara 190'ar µL taze besiyeri eklendi. Her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde 10'ar µL MTT boyası eklendi ve pleytler 3 saat daha 37ºC'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er µL DMSO eklendi ve pleytler formazan kristallerin çözünmesi için 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Her bir kuyucukta oluşan mor tonundaki rengin absorbansı mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda okundu. Her örneğin her bir

konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin, herhangi bir muamele görmeyen kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak her bir maddenin her bir konsantrasyonu için % hücre canlılık değerleri hesaplandı. Elde edilen % hücre canlılığı değerlerinin logaritmik konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen grafikten her bir hücre serisinde ekstrakt ve cisplatin için $IC_{50}$ (yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri elde edildi.

### *2.2.4. İstatistiksel Analiz*

Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması ve standart sapma (mean±SD) alınarak hesaplandı. Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) 13.0.1 istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uygun oldukları görüldükten sonra ANOVA testi, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için ise post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. $p<0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 3. Bulgular ve Tartışma

Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin miktarının arttığı ve/veya bu radikalleri temizlemekle görevli antioksidan sistemin gücünün azaldığı durumlarda ortaya çıkabilen patolojik bir durumdur. Günümüzde oksidatif stresin kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok patolojik durumun etiyolojisinde rol aldığına inanılmaktadır (Aliyazicioglu vd., 2011). Antioksidan aktivite bu nedenle insan sağlığı için önem arz etmektedir ve özellikle son yıllarda pek çok biyolojik aktivitenin de antioksidan etkiden kaynaklandığı ileri sürülmeye başlanmıştır. Doğal ürünlerin de sahip oldukları fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri nedeniyle canlıları oksidatif stres ile ilişkili kronik hastalıklara karşı koruyabileceğine inanılmaktadır. Test edilen doğal bir ürünün antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, bu nedenle daha geniş kapsamlı çalışmalar için bir başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (Kaur ve Kapoor, 2001). Bitkisel ekstraktların *in vitro* antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde pek çok yöntem kullanılmakta olup, çalışmalarda en az iki bağımsız yönteme yer verilmesi gerektiği önerilmektedir (Nuutila vd., 2003). Toplam fenolik ve flavonoid madde tayinleri kullanışlı, hızlı ve ucuz olmalarından dolayı bitkisel ekstraktların antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Demir indirgeyici güç yöntemi ise sıklıkla bir bileşiğin antioksidan gücünü belirlemek için tercih edilmektedir (Turan vd., 2015a). Bu nedenlerden dolayı çalışmada hazırlanan DMSO'lu *Dianthus carmelitarum* ekstraktının antioksidan özellikleri, toplam fenolik madde tayini, toplam flavonoid madde tayini ve indirgeyici güç analizi metodları kullanılarak belirlendi ve sonuçlar Tablo 1'de gösterildi.

Cai vd. (2004) *Dianthus superbus*'un metanollü ve sulu ektsraktının toplam fenolik madde içerik değerlerini sırasıyla 590 ve 690 mg gallik asit eşdeğeri/100 g örnek olarak belirlerken (Cai vd., 2004), Gou vd. (2011) *Dianthus superbus*'un sulu ekstraktının toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerini sırasıyla 2404 mg gallik asit eşdeğeri/100 g örnek ve 327 mg rutin eşdeğeri/100 g örnek olarak rapor etmişlerdir (Gou vd., 2011).

**Tablo 1.** *Dianthus carmelitarum* ekstraktının antioksidan özellikleri

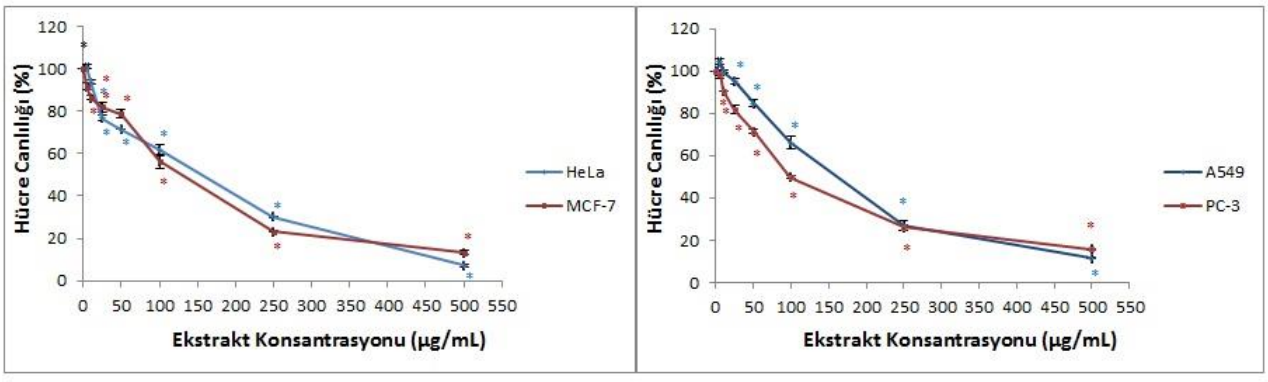
| **Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi** | |
|---|---|
| *Toplam fenolik madde miktarı** | 853.9±19.4 |
| *Toplam flavonoid madde miktarı*** | 636.5±13.1 |
| *Demir indirgeyici güç**** | 1378.7±87.4 |

*Toplam fenolik madde miktarı mg gallik aside eşdeğer/100 g örnek olarak verildi.
** Toplam flavonoid madde miktarı mg kuersetine eşdeğer/100 g örnek olarak verildi.
*** Demir indirgeyici güç mg troloksa eşdeğer/100 g örnek olarak verildi.
Tüm ölçümler üç kere tekrarlandı ve sonuçlar aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi.

*Dianthus chinensis*'in etanollü ekstraktının toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri ise sırasıyla 1900 mg gallik asit eşdeğeri/100 g örnek ve 6570 mg kuersetin eşdeğeri/100 g örnek olarak bildirilmiştir (Lee vd., 2016). Çalışmada elde edilen antioksidan aktivite değerlerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Aradaki farklılıkların kullanılan bitki türünün, bitkinin toplandığı bölgenin iklimsel özelliklerinin, kullanılan çözücü türünün veya ekstraksiyon metodunun farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kanser; hücre sinyal yolaklarında meydana gelen çoklu değişimler sonucu ortaya çıkan, genetiksel öyküyü ve çevresel etkileri de barındırabilen heterojen bir hastalıktır. Kemoterapi kanserle mücadelede sıklıkla başvurulan metod olup etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar başarı yüzdesini düşürmektedir. Bundan dolayı antikanser ilaçlara karşı olan direnci yenebilmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. İşte bu noktada doğal ürünlere yeni ilaç keşifleri için potansiyel hammadde gözüyle bakılmakta ve doğal ürünlerde bulunan polifenoller bu anlamda yapıları ve aktiviteleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Doğal ürünlerin gerek bütün haldeki ekstraktlarının, gerekse de doğal ürünlerden izole edilen bileşiklerin antikanser etkilerinin araştırılması oldukça popüler çalışma alanlarından birisi haline gelmiştir (Demir vd., 2016a; Demir vd., 2016b). *Dianthus* türleri *Caryophyllaceae* ailesine mensup tıbbi bitkiler olup alkaloidler, tanninler, saponinler, siklik peptidler ve fenolik bileşiklerce zengin oldukları bildirilmektedir (Gou vd., 2011; Yu vd., 2012; Ding vd., 2013; Lamula ve Ashafa, 2014). Çeşitli *Dianthus* türlerinin *in vitro* sitotoksik etkisini inceleyen çalışmalar bulunmakla birlikte (Yu vd., 2007; Nho vd., 2012) literatürde *Dianthus carmelitarum* ekstraktlarının sitotoksik etkisini konu alan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aday moleküllerin ya da doğal ürün ekstraktlarının sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda öncelikle *in vitro* deneylerin gerçekleştirilmesi önerilmekte, bu çalışmalardan pozitif sonuçların elde edilmesi durumunda *in vivo* ve klinik çalışmalara geçilmesi gerektiği tavsiye edilmektedir. Bu nedenle *Dianthus carmelitarum*'un sitotoksik etkinliğinin de incelendiği bu çalışma 4 farklı kanser hücre serisi üzerinde *in vitro* koşullarda gerçekleştirildi (Demir vd., 2016a; Demir vd., 2016b). Ekstraktın insan serviks, akciğer, meme ve prostat kanser hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT metodu ile değerlendirildi ve artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % hücre canlılık değerlerinin değişimleri Şekil 1'de gösterildi.

Literatürde yayınlar arası bütünlüğün sağlanması amacıyla doğal ürün ekstraktı ya da herhangi bir kimyasal maddenin sitotoksik etkinliği $IC_{50}$ değerleri cinsinden ifade edilmektedir.




**Şekil 1.** *Dianthus carmelitarum* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının 72 saatlik inkübasyon süresinde hücrelerin canlılığı üzerine etkisi (n=3). *Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark görüldü ($p<0.05$).

$IC_{50}$; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında % 50 absorbans azalması oluşturan ilaç ya da kimyasal konsantrasyonu olarak tarif edilmektedir (Demir vd., 2016a). Ekstraktın her bir hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi hücre büyüme eğrilerinden yola çıkılarak $IC_{50}$ cinsinden hesaplandı ve sonuçlar Tablo 2'de sunuldu.

Sonuçlar incelendiğinde ekstraktın çalışılan 4 kanser hücre serisindeki $IC_{50}$ değerlerinin 117-142 µg/mL konsantrasyon aralığında değiştiği görülmektedir. Literatürdeki *Dianthus* türlerinin sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmalarda ise; Yu vd. (2012) *Dianthus superbus*'un etanollü ekstraktının etil asetat fraksiyonunun HepG2 hücre serilerinde mitokondri bağımlı apoptoz yolağını aktifleyerek apoptotik özellik sergilediğini bildirirlerken (Yu vd., 2012), Shin vd. (2013) *Dianthus chinensis*'in metanollü ekstraktının ağız kanseri hücre serilerinde specificity protein 1 (Sp1) seviyelerini azaltarak apoptotik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Shin vd., 2013). Naghibi vd. (2014) yaptıkları çalışmada *Dianthus orientalis* Adams bitkisinin metanollü ekstraktlarının insan HepG2, MCF-7, A549 ve kolon kanseri (HT-29) hücre serilerinde 100 µg/mL konsantrasyona kadar herhangi bir sitotoksik etki göstermediğini bildirirlerken (Naghibi vd., 2014), Lee vd. (2016) *Dianthus chinensis*'in etanollü ekstraktının insan akciğer kanseri (H1299) ve kolon kanseri (HCT-116) hücre serilerinde 250-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Lee vd., 2016). Son yıllarda sadece *Dianthus* ekstraklarının değil, aynı zamanda bu ekstraktlardan izole edilen çeşitli bileşiklerin de sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmalara rastlanılmaktadır. Hsieh vd. (2005) *Dianthus superbus*'dan izole edilen longicalycinin A etkeninin HepG2 hücre serisinde sitotoksik etkisini bildirirlerken (Hsieh vd., 2005), Martineti vd. (2010) *Dianthus caryophyllus*'dan izole edilen kaempferide triglikozid bileşiğinin insan kolon kanseri (HCT-8) hücre serisinde hücre döngüsünü $G_0/G_1$ evresinde durdurarak antiproliferatif etki sergilediğini göstermişlerdir (Martineti vd., 2010). Ding vd. (2013) ise *Dianthus superbus'*un etil asetat fraksiyonundan izole edilen 2-[(2,4 dihidroksibenzoil) amino]-4-metoksi-benzoik asit'in HepG2 hücre serisinde güçlü bir sitotoksik etkisi olduğunu, kaempferol, kuersetrin, 3,5,7-trihidroksi-3',5'-dimetoksil-flavon ve 1-monopalmitin'in ise aynı hücre serisinde orta derecede sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Ding vd., 2013).

Polifenoller sekonder bitkisel metabolitlerin önemli bir sınıfı olup kuvvetli antioksidan özellik sergileyebildikleri bildirilmektedir. Polifenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri; reaktif oksijen türlerine elektron verebilmeleri, radikal oluşumunu hızlandıran ağır metal iyonlarını şelatlayabilmeleri ve antioksidan/detoksifikasyon enzimlerini uyarabilmeleri mekanizmaları ile açıklanmaktadır (Surh, 2003; Turan vd., 2015b). Polifenolik bileşiklerin bu özelliklerinden dolayı antioksidan, antikanser, antimutajenik, anti-aterosklerotik, antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar etkiler sergileyebildikleri bildirilmektedir (Li vd., 2014). Polifenolik bileşiklerin antikanser etkinliklerinin ise, karsinojen metabolizmasını modüle edebilme, gen ekspresyon seviyelerini değiştirebilme, hücre döngüsünü durdurabilme, apoptozu indükleyebilme ve çeşitli hücre çoğalma sinyal yolaklarını inhibe edebilme özelliklerinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Huang ve Cai, 2010).

**Tablo 2.** *Dianthus carmelitarum* ekstraktının ve cisplatinin sitotoksik etkisi ($IC_{50}$, µg/mL) (n=3)

| | **HeLa** | **A549** | **MCF-7** | **PC-3** |
|---|---|---|---|---|
| **Ekstrakt** | 131.1±4.9 | 142.1±8.9 | 117.4±4.4 | 118.7±3.1 |
| **Cisplatin** | 0.69±0.02 | 0.73±0.03 | 0.55±0.03 | 0.71±0.05 |

*Dianthus* türlerinin kaempferide, kaempferol, apigenin, luteolin ve kuersetin gibi fenolik bileşikler ve bunların glikozid türevleri yönünden zengin oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiş olup (Obmann vd., 2011a; Obmann vd., 2011b), bu bileşiklerin çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikanser özellikler sergilediklerine dair literatürler de mevcuttur (Ravishankar vd., 2013). Buradan hareketle *Dianthus carmelitarum* ekstratının sitotoksik etkinliğinin içerdiği bu fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma *Dianthus carmelitarum* ekstraktının *in vitro* sitotoksik etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışmanın yeni farmakolojik çalışmalara ışık tutması beklenmektedir. Ekstraktın sitotoksik etkisinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğinin belirlenebilmesi için daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

**Teşekkür**

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (GÜBAP) birimi tarafından 15.F5119.02.02 proje numarası ile desteklenmiştir. Bitki kimliklendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk Özgen'e teşekkür ederiz.

**4. Kaynaklar**

Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Cakiroglu, T.N., Akalin, I., Deger, O. ve Bedir, A., 2011. Preventive and protective effects of Turkish propolis on $H_2O_2$-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines, Acta Biologica Hungarica, 62, 4, 388-396.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. ve Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, Life Sciences, 74, 2157-2184.

Cenic-Milosevic, D., Tambur, Z., Bokonjic, D., Ivancajic, S., Stanojkovic, T., Grozdanic, N. ve Juranic, Z., 2013. Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells, Archives of Biological Sciences, 65, 1, 65-70.

Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Ozer Yaman, S., Akbulut, K., Kilinc, K. ve Deger, O., 2016a. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line, Nutrition and Cancer, 68, 1, 165-172.

Demir, S., Turan, I. ve Aliyazicioglu, Y., 2016b. Selective cytotoxic effect of *Rhododendron luteum* extract on human colon and liver cancer cells, Journal of Balkan Union of Oncology, 21, 4, 883-888.

Ding, C., Zhang, W., Li, J., Lei, J. ve Yu, J., 2013. Cytotoxic constituents of ethyl acetate fraction from *Dianthus superbus*, Natural Product Research, 27, 18, 1691-1694.

Gou, J., Zou, Y. ve Ahn, J., 2011. Enhancement of antioxidant and antimicrobial activities of *Dianthus superbus*, *Polygonum aviculare*, *Sophora flavescens*, and *Lygodium japonicum* by pressure-assisted water extraction, Food Science and Biotechnology, 20, 1, 283-287.

Hamzaoglu, E., Koc, M., Buyuk, I., Aksoy, A. ve Soydam Aydin, S., 2015. Presence of *Dianthus roseoluteus* Velen. (*Caryophyllaceae*) in Turkey and a new species: *Dianthus macroflorus* Hamzaoglu, Systematic Botany, 40, 208-213.

Hsieh, P.W., Chang, F.R., Wu, C.C., Wu, K.Y., Li, C.M., Chen, S.L. ve Wu, Y.C., 2004. New cytotoxic cyclic peptides and dianthramide from *Dianthus superbus*, Journal of Natural Products, 67, 1522-1527.

Hsieh, P.W., Chang, F.R., Wu, C.C., Li, C.M., Wu, K.Y., Chen, S.L., Yen, H.F. ve Wu, Y.C., 2005. Longicalycinin A, a new cytotoxic cyclic peptide from *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* (MAXIM.) WILL, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53, 3, 336-338.

Huang, W.Y. ve Cai, Y.Z., 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, Nutrition and Cancer, 62, 1, 1-20.

Kathiresan, K., Boopathy, N.S. ve Kavitha, S., 2006. Coastal vegetation-an underexplored source of anticancer drugs, Natural Product Radiance, 5, 115-119.

Kaur, C. ve Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health, International Journal of Food Science & Technology, 36, 703-725.

Kazeem, M.I. ve Ashafa, A.O.T., 2015. *In-vitro* antioxidant and antidiabetic potentials of *Dianthus basuticus* Burtt Davy whole plant extracts, Journal of Herbal Medicine, 5, 158-164.

Lamula, S.Q.N. ve Ashafa, A.O.T., 2014. Antimicrobial and cytotoxic potential of *Dianthus basuticus* used in Basotho traditional practice, Bangladesh Journal of Pharmacology, 9, 105-111.

Lee, J., Seo, Y., Lee, J. ve Ju, J., 2016. Antioxidant activities of *Dianthus chinensis* L. extract and its inhibitory activities against nitric oxide production and cancer cell growth and adhesion, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 45, 1, 44-51.

Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M. ve Li, H.B., 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols, Nutrients, 6, 12, 6020-6047.

Liang, C.H., Wang, G.H., Chou, T.H., Wang, S.H., Lin, R.J., Chan, L.P., So, E.C. ve Sheu, J.H., 2012. 5-epi-sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells, Biochimica et Biophysica Acta, 1820, 1149-1157.

Martineti, V., Tognarini, I., Azzari, C., Sala, S.C., Clematis, F., Dolci, M., Lanzotti, V., Tonelli, F., Brandi, M.L. ve Curir, P., 2010. Inhibition of *in vitro* growth and arrest in the $G_0/G_1$ phase of HCT8 line human colon cancer cells by kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus*, Phytotherapy Research, 24, 1302-1308.

Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, A.R. ve Vattuone, M.A., 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, Journal of Ethnopharmacology, 71, 1-2, 109-114.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.

Naghibi, F., Irani, M., Hassanpour, A., Pirani, A. ve Hamzeloo-Moghadam, M., 2014. Cytotoxic effects of selective species of *Caryophyllaceae* in Iran, Research Journal of Pharmacognosy, 1, 2, 29-32.

Nho, K.J., Chun, J.M. ve Kim, H.K., 2012. Ethanol extract of *Dianthus chinensis* L. induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells *in vitro*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID: 573527, doi: 10.1155/2012/573527.

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M. ve Oksman-Caldentey, K.M., 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, Food Chemistry, 81, 485-493.

Obmann, A., Zehl, M., Purevsuren, S., Narantuya, S., Reznicek, G., Kletter, C. ve Glasl, S., 2011a. Quantification of flavonoid glycosides in an aqueous extract from the traditional Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch, Journal of Seperation Science, 34, 292-298.

Obmann, A., Werner, I., Presser, A., Zehl, M., Swoboda, Z., Purevsuren, S., Narantuya, S., Kletter, C. ve Glasl, S., 2011b. Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian medicinal plant *Dianthus versicolor* Fisch, Carbohydrate Research, 346, 1868-1875.

Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.

Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F. ve Osborn, H.M., 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 45, 12, 2821-2831.

Reeve, H., 1967. *Dianthus* L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Davis, P.H. (ed), Edinburgh University Press, Edinburgh. pp. 99-131.

Rosangkima, G. ve Prasad, S.B., 2004. Antitumour activity of some plants from Meghalaya and Mizoram against murine ascites Dolton`s lymphoma, Indian Journal of Experimental Biology, 42, 981-988.

Shin, J.A., Kim, J.J., Choi, E.S., Shim, J.H., Ryu, M.H., Kwon, K.H., Park, H.M., Seo, J.Y., Lee, S.Y., Lim, D.W., Cho, N.P. ve Cho, S.D., 2013. *In vitro* apoptotic effects of methanol extracts of *Dianthus chinensis* and *Acalypha australis* L. targeting specificity protein 1 in human oral cancer cells, Head & Neck, 35, 7, 992-998.

Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55.

Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature Reviews Cancer, 3, 10, 768-780.

Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. ve Deger, O., 2015a. Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14, 5, 777-782.

Turan, I., Deger, O., Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Kilinc, K. ve Sumer, A., 2015b. Effects of Turkish propolis on expression of hOGG-1 and NEIL-1, Turkish Journal of Medical Sciences, 45, 804-811.

Yu, J.Q., Liao, Z.X., Lei, J.C. ve Hu, X.M., 2007. Antioxidant and cytotoxic activities of various fractions of ethanol extract of *Dianthus superbus*, Food Chemistry, 104, 1215-1219.

Yu, J.Q., Yin, Y., Lei, J.C., Zhang, X.Q., Chen, W., Ding, C.L., Wu, S., He, X.Y., Liu, Y.W. ve Zou, G.L., 2012. Activation of apoptosis by ethyl acetate fraction of ethanol extract of *Dianthus superbus* in HepG2 cell line, Cancer Epidemiology, 36, e40-e45.