➢ *ORAL PRESENTATION*

Hypericum linarioides Bosse (Kan Otu)'nin İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücreleri Üzerine Antioksidan ve Sitotoksik Etkileri

Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ[1]* (*ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6860-9758*),
Ahmet ALTAY[2] (*ORCID: https://orcid.org/ 0000-0001-8120-8900*)

[*1] Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, 24030, Erzincan, TÜRKİYE
[2] Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 24030, Erzincan, TÜRKİYE

*esma.kagan@gmail.com

Özet
Bu çalışmada, *Hypericum linarioides* (*H. linarioides*) Bosse'nin toprak üstü kısımlarından farklı polariteye sahip çözücülerle elde edilen hekzan ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavanoid içerikleri sırasıyla Folin ciocalteu ve alüminyum klorür kolorimetrik analizleri ile belirlendi. Antioksidan aktivite, DPPH radikal süpürücü ve demir iyonu azaltan antioksidan güç (FRAP) deneyleri ile değerlendirildi. Ekstraktların sitotoksisitesi, insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücresi üzerinde 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-Carboxanilide (XTT) metodu ile belirlendi. Folin ciocalteu ve alüminyum klorür deneyleri, metanolik özütün fenolik ve flavonoid içeriği bakımından daha zengin olduğunu göstermiştir. Fenolik içeriğine paralel olarak metanolik ekstraktı daha yüksek yüksek DPPH radikal süpürme ve demir iyonu azaltma kapasitesini sergilerken, hekzan ekstraktı en düşük antioksidan aktiviteyi göstermiştir. XTT analiz sonuçları, metanolik özütün, daha düşük IC_{50} değeri ile test edilen MCF-7 hücre hattına karşı daha yüksek sitotoksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, tüm bu sonuçlar *H. linarioides* 'in meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlara alternatif olarak yan etkileri daha az olan bir alternatif olarak kullanılması için önemli bir temel oluşturabileceğini ve ayrıca bu tür ile yapılacak diğer preklinik çalışmalara kaynaklık edebileceğini göstermektedir.
Anahtar Kelimeler: *Hypericum linarioides* Bosse, Meme kanseri, Antioksidan aktivite, Sitotoksisite

Antioxidant and cytotoxic effects of *Hypericum linarioides* Bosse (Kan otu) on human breast cancer cell line MCF-7

Abstract
In this study, total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity and cytotoxic effects of hexane and methanol extracts obtained from the aerial parts of *Hypericum linarioides* Bosse (*H. linarioides*) were investigated. Total phenolic and total flavonoid contents of the extracts were determined by Folin ciocalteu and aluminum chloride colorimetric analysis, respectively. Antioxidant activity was evaluated by DPPH radical scavenging and iron ion reducing antioxidant power (FRAP) assays. The cytotoxicity of the extracts was investigated by XTT assay on human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell line. Folin ciocalteu and aluminum chloride studies showed that methanolic extract was richer in phenolic and flavonoid contents. In parallel to phenolic contents, methanolic extract exhibited much higher DPPH radical scavenging and iron ion reduction capacity. XTT analysis results revealed that the methanolic extract exhibited much stronger cytotoxicity against the tested MCF-7 cancerous cells with its much lower IC_{50} values. In conclusion, all these results suggest that *H. linarioides* may be an important basis for using as an alternative to chemotherapeutic drugs used in breast cancer treatment with less side effects and also can be a source for other preclinical studies to be conducted with this species.
Keywords: *Hypericum linarioides* Bosse, Breast cancer, Antioxidant activity, Cytotoxicity

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler; hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. İlaç, kozmetik, baharat gibi pek çok kullanım amacı olan ve insanlık tarihinin başlangıcından itibaren kullanılan bitkilerdir (Baytop, 1999). Günümüzde de hala pek çok bitki halk arasında çoğu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya genelinde bitkilerle tedavi; geleneksel tedavi, tamamlayıcı tedavi, doğal tedavi gibi farklı isimlerle anılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya nüfusunun %80'i sağlık sorunlarının çözümü için ilk etapta bitkisel droglara başvurduğu belirlenmiştir. Çoğu gelişmiş ülkede tedavi için kullanılan ilaçların %25'i bitkisel kökenli etken madde içermektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre dünyada kullanılan ilaçların yaklaşık %30'u bitkilerden elde edilen bileşiklerden oluşmaktadır (Gürsöz, 2018). Geçmişten günümüze tedavi amaçlı kullanılan ve kullanılmaya devam eden tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması ve doğal ürünlere daha fazla talebin olması, bu bitkilerin her geçen gün daha çok kullanılmasına sebep olmaktadır.

Günümüzde kanser dünya çapında birçok insanı etkileyen bir hastalıktır. Kanser tedavisinde kullanılan çoğu ilaç bitki kökenlidir. Sentetik ilaçlara göre bitki kökenli ilaçların daha az yan etkiye sahip olması tercih edilme oranını artırmaktadır. Bu nedenle bitkilerden etken madde elde ederek antikanser etkilerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi önemlidir. Kanser gibi çoğu hastalığın temelinde canlı vücudunun işleyişindeki aksaklıklar yatmaktadır. Canlı organizmasındaki proteinler, nükleik asitler gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek organizmanın düzenli yapısını bozabilen serbest radikaller vardır. Serbest radikaller kanser, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar gibi çoğu hastalığın sorumlusudur(Lobo ve ark.,2010; Karatoprak ve ark., 2019). Son yıllarda hem sentetik ilaçların yan etkilerinin olması hem de şifalı bitkilerin fenolik konsantrasyonları ve toplam antioksidan potansiyelinin olması birçok araştırmacıyı tıbbi ve aromatik bitkilere yönlendirmiştir. Fitokimyasal içeren bitki kaynaklı doğal ürünler kanser riskini azaltmaya yardımcı olabilir. Bu doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar, sentetik ve hali hazırda kullanılan kanser ilaçlarına göre daha az yan etkiye sahiptir. Bu nedenle doğal ürünlerin fitokimyasal özelliklerinin araştırılması, artan ilaç kullanımı göz önüne alındığında büyük önem taşımaktadır.

Hypericum türleri ile yapılan çalışmalar, bu türlerin fitokimyasında bulunan maddeler nedeniyle serbest radikallerin oluşumunu engellediğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalarla hypericum türlerinin farklı ekstrelerinin apoptoz indüksiyon özelliği ortaya konmuştur (Lobo V, ve ark., 2010; Karatoprak, G. ve ark., 2019). Hypericaceae familyası, dünyanın çeşitli bölgelerinde geleneksel şifalı bitkiler olarak kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler açısından önemli bir ailedir ve 400'den fazla türe sahip geniş bir bitki veya çalı cinsine sahiptir (Cirak C, ve ark., 2014; Crockett SL, ve ark., 2011). Türkiye florasında yaklaşık 80 tür Hypericum vardır. Hypericum türlerinin birçoğu ülkemizde ve dünyanın pek çok bölgesinde halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Guclu, ve ark., 2019). *H.linarioides'*in de içinde yer aldığı bu familya hem ülkemizde hem de dünyada çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Hypericum türlerinin; Antidepresan (Butterweck V, ve ark., 2002; Nogueira T, ve ark., 1998), Antimikrobiyal (Crockett SL. 2010; Dall'Agnol R, ve ark., 2003; Jayasuriya H, ve ark., 1989), Antikanser (Guclu, G., ve ark., 2019; Agostinis P, ve ark., 2002), Antioksidan (Cakir A, ve ark., 2003), Antiviral (Meruelo D, ve ark., 1988), Antifungal (Cakir A, ve ark., 2005; Fenner R, ve ark., 2005), Travma (Miller ND. 1998; Nogueira T, ve ark., 1998), Egzema (Tahir NA, ve ark., 2017), Alzheimer (Baytop, T. 1999; Guclu, G., ve ark., 2019), Hemoroid (Baytop, T. 1999; Tahir NA, ve ark., 2017) Sindirim hastalıkları (Miller ND. 1998; Kültür S 2007), Mide hastalıkları (Guclu, G., ve ark., 2019; Miller ND. 1998), Kardiyovasküler hastalıklar (Kültür S., 2007), Adet bozuklukları, yanık (Baytop, T. 1999; Guclu, G., ve ark., 2019) Yara iyileştirme (Öztürk N, ve ark., 2007) gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir. *Hypericum linarioides'*de halk arasında antidepresan, antimikrobiyal, yara iyileştirme, antikanser, antiviral, ve antifungal olarak kullanılmıştır. Hypericum türleri ile yapılan fitokimyasal çalışmalar, bu familyanın fitokimyasında; flovanoller (kateşinler), ksantanlar, kumarinler, glikozitler, antrakinonlar, rutin, kuersetin, flovanoidler, laktonlar, lipidler, tanenler, hidrokarbonlar, asitler, triterpenler ve uçucu yağların varlığını bildirmişlerdir. Hypericum türlerinin birçok hastalık üzerinde tedavi edici etkisi olmasına rağmen *H. linarioides'*in kanser alanındaki tıbbi çalışmaları sınırlıdır (Kızıl ve ark., 2004;

Baris ve ark., 2011; Ebrahimzadeh ve ark., 2013; Hamzeloo-Moghadam ve ark., 2015; Keser ve ark., 2018).

Bu çalışmada, *H. linarioides* bitkisinden elde edilen metanol ve hekzan ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, antioksidan kapasiteleri ve sitotoksik etkilerinin insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

KİMYASALLAR

Antioksidan aktivite çalışmaları için; 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dimetil sülfoksit (DMSO), tripan mavisi, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum hidroksit (KOH), ferrik klorür ($FeCl_3$), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), a tokoferol, gallik asit, kuersetin, alüminyum klorür, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve trikloroasetik asit (TCA), Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alındı. Hücre kültürü çalışmaları için; 2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolium-5-Karboksanilid (XTT), L-Glutamin, fetal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve Na-piruvat Biological Industries'den (BI, ABD) elde edilmiştir. Analitik çözücüler, kimyasallar ve enzimler Sigma Aldrich ve/veya Fluka'dan temin edildi.

BİTKİ MATERYALİ VE BİTKİ ÖZLERİNİN HAZIRLANMASI

H. *linarioides* türü Sakaltutan (Erzincan, Türkiye) bölgesinden (2160 m yüksekliğinde) 24 Temmuz 2018 tarihinde çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Bitki materyali Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından tanımlanmış ve Kandemir 10999 olarak numaralandırılmıştır. Bitki örnekleri Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda saklanmaktadır. Bitki örneği toplandıktan sonra incelenecek bitkinin yaprakları (1 kg) küçük parçalar halinde kesilerek mikser yardımı ile toz haline getirilmiştir. 10 g kurutulmuş bitki örneği 100 mL Heksan'da 48 saat süreyle tutulmuştur. Daha sonra ekstre Whatmann No.1 filtre kâğıdı ile süzülmüş ve çözücü rotary evaporatörde tamamen uzaklaştırılmıştır. Aynı işlemler metanol için de yapılıp elde edilen ekstreler ileriki testler için cam şişe içerisinde karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

ANTİOKSİDAN AKTİVİTE DENEYLERİ

Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Toplam fenolik bileşik, Folin-Ciocalteus reaktifi ile yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlendi. (Altay, A., ve ark.,2019; Slinkard ve Singleton, 1977). 0.1 mL bitki ekstresi 4.6 mL distile su ile karıştırıldı. Bu karışım üzerine 0,3 mL Na_2C0_3 solüsyonu (%2) ve 0,1 mL Folin-Ciocalteus reaktifi eklenmiş ve tekrar karıştırıldı. Karışım oda koşullarında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra absorbans 760 nm'de ölçüldü. Gallik asit eşdeğerleri (GAE) sonucunda özütün g^{-1} değeri hesaplandı.

Toplam Flavonoid Testinin Belirlenmesi

Bitki numunelerinin toplam flavonoid içerikleri Chang, ve diğerleri, yöntemlerle belirlendi (Xu ve ark., 2007). Buna göre 0.1 mL bitki özü 4.8 mL metanol ile karıştırıldı. Karışıma 0.1 mL Alüminyumnitrat ($Al(NO_3)_3$) (%10) ve 0.1 mL Amonyumasetat (NH_4CH_3COO) solüsyonu (1M) ilave edildi. Karışım, oda koşullarında 45 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra absorbans 415 nm'de ölçüldü. Kuarsitin eşdeğerleri (QE) sonucunda ekstrenin g^{-1} değeri hesaplandı.

DPPH· Serbest Radikal Giderme Testi

Serbest radikal giderme aktivitesi, Liana-Pathirana yöntemi ile belirlendi (Liyana-Pathirana ve Shahidi, 2005). Bu yöntemde birkaç değişiklik yapıldı (Altay, A., ve ark.,2019). Bitki metanol ekstraktları test tüplerine eklenerek farklı miktarlarda stok solüsyonları alınarak metanol ile hacim 3 mL'ye tamamlandı. Üzerlerine 1 mL DPPH eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. 30 dakika karanlık bir ortamda bekletildikten sonra absorbans 517 nm'de okundu. Elde edilen veriler IC_{50} olarak ifade edildi. Radikal süpürme aktivitesi denklemlerden hesaplandı.

$I_{DPPH}=100.[A_{kontrol}-(A_{Numune}-A_{Boş})] / A_{kontrol}$

DEMİR İNDİRGEYİCİ ANTİOKSİDAN GÜÇ TESTİ (FRAP)

FRAP analiz yöntemi Oyaiz (1986), bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Altay, A., ve ark.,2019). 0,2 M fosfat tamponunun (pH 6,6) 0,25 mL bitki özütü, 1,25 mL tamamlandı. 1.25 mL potasyum ferrisiyanid [$K_3Fe(CN)_6$] solüsyonu (%1) eklendi. Karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığına soğutulan karışıma TCA (1.25 mL, %10) ve $FeCl_3$ (0.25 mL, %0.1) solüsyonu eklendi. Karıştırıldıktan sonra 700 nm'de absorbans ölçüldü. Elde edilen sonuçlar hesaplanan Trolox eşdeğeri (TE) ile karşılaştırıldı.

SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARI

Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

İnsan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hattı ATCC'den (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, LGC Promochem, UK) satın alındı. MCF-7 hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 Na-piruvat ile desteklenmiş Eagle's minimal essential medium (EMEM)'de büyütüldü. (BI, ABD). Hücreler, 37°C'de nemlendirilmiş bir CO_2 (%5) inkübatöründe (NUVE, Türkiye) bekletildi. Çalışmalar Sınıf II güvenlik kabininde (NUVE, Türkiye) gerçekleştirildi.

Hücre Canlılığı Testi

Test edilen ekstraktların hücre proliferasyonunu inhibe edici aktivitesi, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) testi ile değerlendirildi (De Logu ve diğerleri, 2003) . Kısaca, 96 kuyucuklu kültür plakalarına 100 uL hücre süspansiyonu ($5x10^3$ hücre/kuyucuk) ilave edildi ve gece boyunca CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Ertesi gün hücreler, her bir özütün (HE ve ME) farklı konsantrasyonlarına (5-250 ug/mL) maruz bırakıldı ve 24 saat süreyle CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyondan sonra önceki besiyeri uzaklaştırıldı ve sırasıyla 100 µL taze ortam ve 50 µL XTT substratı eklendi ve ardından CO_2 inkübatöründe 5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin hücresel metabolik aktivitesini gösteren absorbansları mikroplaka okuyucu (BioTek, ABD) kullanılarak 470 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak karboplatin ve 5-Fluorourasil (5-FU) kullanıldı. Hücre canlılığı inhibisyonu (%) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

Hücre canlılığının inhibisyonu (%) = $[1 - (A_s - A_b)/(A_c - A_b)] \times 100$, burada As numunenin absorbansıdır, Ab, numunesiz ağartma absorbansıdır ve Ac absorbans değeridir kontrolün. Ekstraktların ekstraktlarının (IC_{50}) yarı maksimum inhibitör konsantrasyonları, doğrusal olmayan regresyon eğrisi ile hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Antioksidan ve sitotoksik aktivite sonuçlarının değerlendirilmesi için, GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanılarak Student t-testi ile istatistiksel analizler yapıldı. Tüm analizler üç kopya halinde (n = 3) yapıldı ve veriler ortalama ± SD olarak sunuldu. Minimum anlamLılık düzeyi olarak $P<0,05$ alınmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Şifalı bitkilerde bitki ve fitokimyasalların çok çeşitli grubunu oluşturan fenolik bileşikler, canlı organizmalarda çeşitli biyolojik aktivite gösterirler. Bu çalışmada, H.*linarioides* 'in hekzan (HE) ve metanol (ME) ekstrelerinin Toplam Fenolik (TPC) ve Flavanoid (TFC) Konsantrasyon'u belirlendi ve Tablo 1'de gösterildi. Tablo 1'de gösterildiği gibi, H.*linarioides*'in ME, HE'den daha yüksek aktivite göstermiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda ise Karatoprak ve ark.'nın İran H. *scabrum*'undan elde ettikleri su (WE) ve metanol (ME) ile ekstrelerinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarının TPC'nın sırasıyla 93.00 ± 0,22 mg CA/g ekstraktı ve 186.94 ± 2,66 mg GAE/g ekstraktı olduğunu bildirmiştir (Karatoprak ve diğerleri, 2019). Başka bir çalışmada, H. *perforatum* hariç incelenen tüm türler, bir antioksidan kapasite tayin metodu ile ilk kez test edilmiştir. (Radulović, et al., 2007). Zengin ve ark. yaptığı bir çalışmada H. *lanuginose*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol özütünün TPC'si sulu özütte sırasıyla 168,56 mg gallik asit eşdeğeri (GAE g^{-1} ekstre) ve flavonoid 53,22 mg rutin eşdeğeri (RE) içeriği olarak belirlenmiştir (Zengin ve diğerleri, 2019).

Bu sonuçlar, polar ekstraktların, hekzan gibi polar olmayan ekstraktlara kıyasla yapılarında çok daha fazla toplam fenolik içerdiğini doğrulamaktadır. Hypericum bitkisinin farklı türleri ile yapılan çalışmalarda bitkinin kullanılan kısmı, çözücünün türü ve ekstraksiyon prosedürüne göre TPC ve TF değerlerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir.

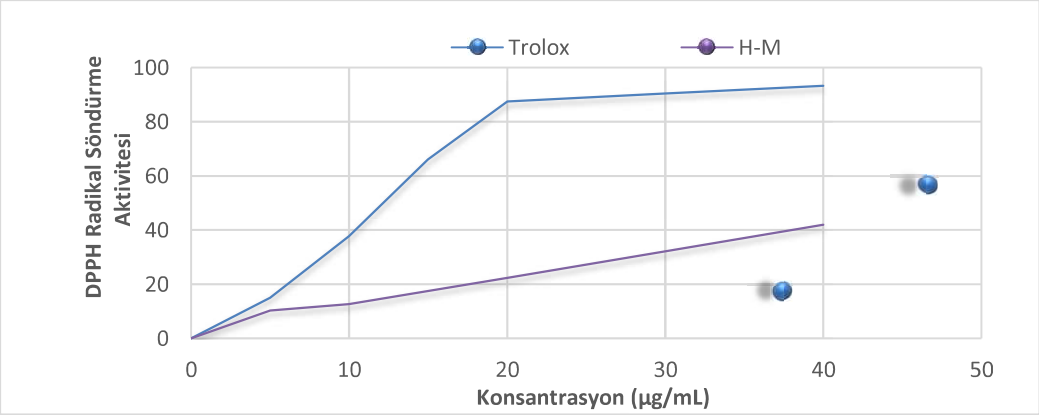
Tablo 1. *H.linarioides* ekstraktları'nın toplam fenolik, flavonoid içerikleri ve antioksidan kapasiteleri.

Numune *H.linarioides* Bosse	**DPPH IC_{50} (µg mL^{-1})**	**Demir İndirgeme Gücü mg TE g^{-1} ekstre**	**Toplam Fenolik Konsantrasyonu mg GAE g^{-1} ekstre**	**Toplam Flavanoid Konsantrasyonu mg QE g-1 ekstre**
HE	>100	2.78±0.55	5.42±0.715	0.48±0.025
ME	45.33	78.51±6.66	18.76±1.05	6.31±1.25
Trolox	11.95			

Flavonoidler, şifalı bitkilere tat, koku ve renk özelliklerinin yanı sıra sayısız biyolojik aktivite sağlar. Sonuçlar, ekstraktların toplam fenolik konsantrasyon sonuçlarında olduğu gibi ekstraktların toplam flavanoid konsantrasyonunda kullanılan solvent ile güçlü bir şekilde değiştiğini göstermiştir (Tablo 1). Metanol ekstraktının, hekzan ekstraktından daha yüksek (6,31 mg QE/g ekstrakt) flavonoid seviyesi gösterdiği belirlendi. Literatür çalışmalarına bakıldığında Zengin ve arkadaşları, Hypericum lanuginosum'dan farklı ekstraktların Toplam fenolik konsantrasyonu'nu belirlemiştir. Bu çalışma ile, sulu ekstraktın TFK'u (53,22 mg RE) açısından en zengin olduğunu, ardından sırasıyla metanolik ve etil asetat ekstraktının (30.96 ve 11,80 mg RE) olduğunu bildirmiştir (Mahomoodally ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, metanol ve suyun TFK'si H. *scabrum*'dan elde edilen ekstraktlar sırasıyla 93.00 ve 32,46 mg CA/g ekstraktı olarak rapor edilmiştir (Karatoprak ve ark., 2019). Tüm bu sonuçlar, Toplam fenolik konsantrasyonu'na paralel olarak *H.linarioides*'in TFK'sinin diğer bahsedilen türlerin TFK'ları ile benzer sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, çözücünün polaritesinin, ekstraktlardaki flavonoidlerin bolluğunu güçlü bir şekilde etkilediğini göstermektedir.

DPPH testi, serbest radikallerin biyolojik sistemlerden uzaklaştırılmasındaki kritik rolleri nedeniyle doğal ve sentetik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin tayini için yaygın bir şekilde kullanılan bir yöntemdir (Sridhar ve Charles, 2019). Ekstraktların doza bağlı DPPH radikal süpürme aktivitesi ve kullanılan standart antioksidan Şekil 1'de verilmiştir ve bunların IC_{50} değerlerinin karşılaştırması Tablo 1'de gösterilmiştir. Sonuçlar, H.*linarioides* ME'nin DPPH radikal süpürme aktivitesinin, en düşük IC_{50} değeri ile (ME 45,33 µg/mL) test edilen HE'dan (97,69 µg/mL) daha üstün olduğunu göstermiştir.

Ayrıca ME'nin DPPH temizleme kapasitesinin trolox'un (12.80 µg/mL) gücü ile eşdeğer olduğu sonucuna varabiliriz. Mevcut sonuçlar, çözücü polaritesi değiştiğinde, seçilen antioksidan bileşikleri çözme kapasitesinin değiştiğini ve böylece antioksidan aktiviteyi etkilediğini göstermektedir. *H.linarioides*'ten elde edilen ekstraktların radikal süpürücü aktivitesinin literatürde bildirilen diğer Hypericum türlerininkilere yakın olduğu gözlendi.



Şekil 1. *H. linarioides* metanol ekstresinin (H-M) ve standart antioksidan trolox' un DPPH radikal süpürme aktivitesi. Veriler, ortalama ± S.D (n=3) olarak ifade edilir.

Bir bileşiğin metal iyonu indirgeme yeteneği, elektronları radikallere vererek onları daha kararlı ve reaktif olmayan türler haline getirerek antioksidan gücünün bir tahminini oluşturmak için önemli bir göstergeye hizmet edebilir (Benzie ve Devaki, 2018). Mevcut çalışmada, ekstraktların ferrik iyon indirgeme güçleri trolox eşdeğeri (TE) olarak hesaplanmış ve Tablo 1'de gösterilmiştir. DPPH analiz sonuçlarına benzer şekilde, *H.linarioides*'ten ME, daha yüksek demir indirgeme kapasitesi (78.51 mg TE/g ekstrakt) gösterdi. Mevcut çalışmadaki ekstraktların ferrik iyon indirgeme kapasitesi, Zengin ve diğerleri tarafından bildirilen H. *lanuginosum'*dan daha fazladır. (Mahomoodally ve ark., 2019). Tüm bu veriler, her bir özütteki fenoliklerin ve flavonoidlerin tek başına veya sinerjik olarak antioksidan etkiler gösterdiğini belirtmektedir. İnsan meme (MCF-7) kanseri hücre hattına karşı *H.linarioides* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve hekzan ekstrelerinin sitotoksik aktivitesi, XTT analizi kullanılarak değerlendirildi. Turker ve ark., larının (2018) yaptığı çalışmada *H.linarioides*'in disk tümörü çalışmasında kullanılan su ekstresinin tümörler üzerinde % 67 oranında inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışma neticesinde elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde yer alan ekstre bazlı çalışmalarla benzer sonuçlar sergilemektedir. *H.linarioides*'in metanol ve hekzan ekstraktlarının MCF-7 hücre hattının proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi (Tablo 2). Test edilen ekstraktlar arasında, H.*linarioides* metanolik ekstrakt (ME), 263.04 µg/mL IC_{50} değeri ile MCF-7 hücrelerine karşı en iyi sitotoksik aktiviteyi gösterirken, hekzan ekstraktı (HE), MCF-7 hücresinde zayıf sitotoksik etki gösterdi. IC_{50} ile> 500 µg/mL.

Tablo 2. *H. linarioides* ekstrelerinin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktiviteleri

Numune **H.*linarioides* Bosse**	**MCF-7** **IC_{50} (µg/mL)**
ME	263,0438
HE	>500
Cisplatin	101,1

SONUÇ

Kansere karşı yeni ve çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve uygulanmasına rağmen, bu tedaviler neticesinde elde edilen sonuçlar günümüzde halen yetersizdir. Bu yöntemlerin bir kısmı çok yüksek bütçeli iken bir kısmı da yan etkilerinin çok fazla olmasından dolayı insan sağlığı için tehlikelidir. Son yıllarda bilim insanları kanserin etiyolojisinden ziyade özellikle hastalığın tedavisi üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır. Bu alanda, hale hazırda kullanılmakta olan tedavi yöntemlerine alternatif olabilecek yan etkisi çok daha az olan veya olmayan, moleküller ya da doğal ürünler bulma çabası içine girilmiştir. Kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalar, genelde bitki özütleri üzerinden ilaç keşiflerine dayanmaktadır ki; son yarım asırdan beri bitkilerin sahip olduğu aktif bileşikler modern klinik uygulamalarda kansere karşı kullanılmaktadır (Mehta, R. G., ve ark.,2010).

Bu çalışmada *H. Linarioides* bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin; toplam fenolik içeriği (18.76±1.05 mg GAE g^{-1} ekstre) hekzan ekstresine göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Toplam flavanoid içeriğinde de metanol ektresinin, hekzan ekstraktından daha yüksek (6,31 mg QE/g ekstrakt) flavonoid seviyesi gösterdiği belirlenmiştir. Yine H.*linarioides* ME'nin DPPH radikal süpürme aktivitesinin, en düşük IC_{50} değeri ile (ME 45,33 µg/mL) test edilen HE'dan (97,69 µg/mL) daha üstün olduğu belirlenmiştir. H.*linarioides*'ten elde edilen ME, HE'dan daha yüksek demir indirgeme kapasitesi (78.51 mg TE/g ekstrakt) göstermiştir.

H.linarioides bitkisi, yüksek fenolik içeriğiyle iyi bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir, öte yandan, meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde de oluşturduğu yüksek sitotoksik etki nedeniyle de doğal bir kemoterapötik ajan olarak ileri antikanser çalışmaları ile değerlendirilebilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi FBA-2020-736 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Yazarlar olarak bitkinin tanımlanması, herbarium numarası ve teşhisindeki katkılarından dolayı Prof.Dr. Ali KANDEMİR'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Abdullahi, A. A. (2011). Trends and challenges of traditional medicine in Africa. African journal of traditional, complementary and alternative medicines, 8(5S).

ACIBUCA, V., & BUDAK, D. B. (2018). Dünya'da ve Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova Tarım ve Gıda BilimLeri Dergisi, 33(1), 37-44.

Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, De WPAM. (2002). Hypericin in cancer treatment: More light on the way. Int J Biochem Cell Biol 34:221–41.

Altay, A., Suloglu, A. K., Celep, G. S., Selmanoglu, G., & Bozoglu, F. (2019). Anatolıan sage Salvıa frutıcosa ınhıbıts cytosolıc glutathıone-s-transferase actıvıty and colon cancer cell prolıferatıon. Journal of Food Measurement and Characterization, 13(2), 1390-1399.

Baris D, Kizil M, Aytekin C, Kizil G, Yavuz M, Ceken B, Ertekin AS (2011). In vitro antimicrobial and antioxidant activity of ethanol extract of three Hypericum and three Achillea species from Turkey. International Journal of Food Properties 4:339-355.

Baytop T. (1984). Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Istanbul, Turkey: Istanbul Univ. Pub. No. 3255, 166–7.

Baytop, T. (1999). Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün. Nobel Tıp Kitabevleri.

Benzie, I. F., & Devaki, M. (2018). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications Wiley, New York, 11, 77-106.

Butterweck V, Bockers T, Korte B, et al. (2002). Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. Brain Res 930:21–9.

Cakir A, Kordali S, Kilic H, Kaya E. (2005). Antifungal properties of essential oils and crude extracts of Hypericum linarioides. Biochem Syst Ecol 33:245–56.

Cakir A, Mavi A, Yildirim A, et al. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of Hypericum hyssopifolium L. by activity-guided fractionation. J Ethnopharmacol 87:73–83.

Cirak C, Kurt D (2014). OnemLi tıbbi bitkiler olarak Hypericum turleri. Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute 24:42-58.

Crockett SL, Robson NKB (2011). Taxonomy and chemotaxonomy of the genus Hypericum. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 5:1-13.

Crockett SL. (2010). Essential oil and volatile components of the genus Hypericum (Hypericaceae). Nat Prod Commun 5:1493–506.

Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, et al. (2003). Antimicrobial activity of some Hypericum species. Phytomedicine 10:511–1

Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Ahangar N (2013). Anticonvulsant activity of Hypericum scabrum L: possible mechanism involved. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 17(16):2141-2144.

Fenner R, Sortino M, Kuze Rates SM, et al. (2005). Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. Phytomedicine 12:236–40.

Guclu, G., Ayca, T. A. S., Tulimat, M., Eruygur, N., & Silig, Y. (2019). Anticancer Activity of Water and Methanol Extracts of Hypericum scabrum L. on Different Cancer Cell Lines. Notulae Scientia Biologicae, 11(4), 333-336.

GÜRSÖZ, H. (2018). TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU. TÜRK FARMAKOPE DERGİSİ, 8.

Hamzeloo-Moghadam M, Khalaj A, Malekmohammad M (2015). Cytotoxic activity and apoptosis induction of Hypericum scabrum L. 336 Iranian Red Crescent Medical Journal 17(10): e19453.

Jayasuriya H, McChesney JD, Swanson SM, Pezzuto JM. (1989). Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from Hypericum drummondi. J Nat Prod 52:325–31.

Karatoprak, G. Ş., Yücel, Ç., Kaytan, H. Ç., İlgün, S., Şafak, E. K., & Koşar, M. (2019). Antioxidant and Cytotoxic Activities of Aerial and Underground Parts of Hypericum Scabrum L. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 43(5), 2107-2113.

Keser S, Keser F, Kaygili O, Tekin S, Demir E, Turkoglu I, … Sandal S (2018). Phytochemical compounds and antiradical, antimicrobial, and cytotoxic activities of the extracts from Hypericum scabrum L. Flowers. Natural Product Research 2018:1-6.

Kizil G, Toker Z, Ozen HC, Aytekin C (2004). The antimicrobial activity of essential oils of Hypericum scabrum, Hypericum scabroides and Hypericum triquetrifolium. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 18(4):339-341.

Kültür S (2007) Medicinal plants used in KIrklareli Province (Turkey). J Ethnopharmacol 111(2):341–364

Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F., & Alasalvar, C. (2006). Antioxidant activity of cherry laurel fruit (Laurocerasus officinalis Roem.) and its concentrated juice. Food chemistry, 99(1), 121-128.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev 4(8):118–126.

Mahomoodally, M. F., Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Mollica, A., Stefanucci, A., Sinan, K. I., & Aumeeruddy, M. Z. (2019). Metabolomics profiling, bio-pharmaceutical properties of Hypericum lanuginosum extracts by in vitro and in silico approaches. Industrial Crops and Products, 133, 373-382.

Mehta, R. G., Murillo, G., Naithani, R., & Peng, X. (2010). Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come?. Pharmaceutical research, 27(6), 950-961.

Meral, A. V. C. I. (2012). ÇEŞİTLİLİK VE ENDEMİZM AÇISINDAN TÜRKİYE'NİN BİTKİ ÖRTÜSÜ. Coğrafya Dergisi, (13).

Meruelo D, Lavie G, Lavie D. (1988). Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proc Natl Acad Sci USA 85:5230–4.

Miller ND. (1998). St John's wort (Hypericum perforatum): Clinical effects on depression and other conditions. Alter Med Rev 3:18–26.

Nogueira T, Duarte F, Venaˆncio F, Tavares R, Lousa˜ M, Bicchi C, Rubiolo P (1998) Aspectos Quimiotaxono´micos do Ge´nero Hypericum L. em Portugal. Silva Lusitana 6(1): 55–61

Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y (2007) Wound-healing activity of St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) on chicken embryonic fibroblasts. J Ethnopharmacol 111(1):33–39

Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American journal of enology and viticulture, 28(1), 49-55.

Sridhar, K., & Charles, A. L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. Food Chemistry, 275, 41-49.

Tahir NA, Azeez HA, Muhammad KA, Faqe SA, Omer DA. 2017. Exploring of bioactive compounds in essential oil acquired from the stem and root derivatives of Hypericum triquetrifolium callus cultures. Natural Product Research. Accepted Manuscript DOI: 10.1080/ 14786419.2017.1419228.

Turker, A. U., Yildirim, A. B., Karakas, F. P., & Turker, H. (2018). In vitro antibacterial and antitumor efficiency of some traditional plants from Turkey.

Xu, B. J., Yuan, S. H., & Chang, S. K. C. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. Journal of food science, 72(2), S167-S177.

Yapıcı, İ., Altay, A., Öztürk Sarıkaya, B., Korkmaz, M., Atila, A., Gülçin, İ., & Köksal, E. (2021). In vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of Extracts of Endemic Tanacetum erzincanense Together with Phenolic Content by LC-ESI-QTOF-MS. Chemistry & Biodiversity, 18(3), e2000812.