

Centaurea pterocaula özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi

Ahmet UYSAL, Gökhan ZENGİN, Yusuf DURAK, Abdurrahman AKTÜMSEK

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, *Centaurea pterocaula* bitkisinden elde edilen üç özütün (etil asetat, metanol ve su) antioksidan kapasiteleri, mutajenik/antimutajenik özellikleri ve enzim inhibitör etkilerini değerlendirmektir. Özütlerin antioksidan özellikler radikal giderme (süpürme) (DPPH testi), indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC testleri), fosfomolibdat ve metal şelatlama testleri gibi *in vitro* antioksidan yöntemler kullanılarak araştırıldı. Özütlerin enzim inhibitör etkiler kolinesteraz, tirozinaz, amilaz ve glukozidaza karşı test edildi. Ames testi özütlerin mutajenik/antimutajenik özelliklerini göstermek için kullanıldı. Metanol özütünün en güçlü radikal giderme (31.06 mgTE/g özüt) ve indirgeme gücüne (CUPRAC testinde 66.95 mgTE/g özüt ve FRAP testinde 51.03 mgTE/g özüt) sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca, etil asetat özütü

glikozidaz enzimi hariç test edilen tüm enzimlere karşı en güçlü etkiyi sergiledi. Özütlerin toplam fenolik ve flavonoid içerik sırasıyla 15.77-25.22 mg GAE/g özüt ve 0.67-31.44 mg RE/g özüt aralıklarında değiştiği bulundu. Test edilen özütlerin hiçbirinde mutajenik etki görülmezken, bazı örneklerin önemli oranda antimutajeniteye sahip olduğu tespit edildi. Metabolik aktivasyon (S9) varlığında etil asetat ve metanol özütlerinin 2-aminoflorene karşı 5000 µg/plak dozlarında çok güçlü (sırası ile % 92 ve % 92) antimutajenik etkiye sahip oldukları bulundu. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *C. pterocaula* yeni nutrasötik veya farmasötiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: *Centaurea pterocaula*, antioksidan, enzim inhibisyonu, antimutajenite, doğal ajanlar.

GİRİŞ

Günümüzde bilimsel araştırmaların temelinde sadece hastaları bireysel anlamda iyileştirmek değil, aynı zamanda toplumu etkileyen kitlesel sağlık sorunlarına çok yönlü çözümler üretmek ve bunlarla mücadelede rol oynayacak yeni kaynakların tespiti yatmaktadır. Bu amaçla birçok hastalık için sentetik çözümler sunulmasına karşılık toplumdaki sentetik ürünlerin tümü zararlı gibi kaygılar bu çözümleri şüpheli hale getirmektedir. Bu bağlamda bitkilerin tıbbi özelliklerine yönelik çalışmalar oldukça hız kazanmıştır.

Bitkilerin tıbbi özelliklerinin ortaya konulduğu çalışmalar değerlendirildiğinde, bitkiler tarafından üretilen “sekonder metabolit” olarak nitelendirilen bileşiklerin bu tıbbi özelliklerden sorumlu ana etken grup olduğu rapor edilmiştir. Son yıllarda özellikle beslenme meyve ve sebze tüketimi ile kanser, kardiyovasküler hastalıkları gibi kronik hastalıklara yakalanma riski arasında ters bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir. Bu durumun özellikle sekonder metabolitlerden kaynaklandığı ve bu bileşikler içerisinde fenolik bileşiklerin

Ahmet Uysal
Selçuk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Programı, Konya, Türkiye

Gokhan Zengin, Yusuf Durak, Abdurrahman Aktumsek
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Türkiye

Sorumlu Yazar:
Ahmet Uysal
Tel: +903322231068
e-mail: ahuyisal@selcuk.edu.tr

Gönderilme/Submitted: 28.03.2016 **Düzeltilme /Revised:** 21.04.2016
Kabul/Accepted: 24.04.2016

diğer bileşenlere kıyasla daha etkin rol aldıkları rapor edilmiştir (1-3). Fenolikler yapılarında aromatik halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu içerirler ve flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ile lignanlar olarak dört temel sınıfa ayrılırlar (4). Sağlıklı bir yaşam için flavonoidlerin diyetle alınması gerektiği ve bu durumun kalp damar sistemi üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirtilmektedir. Örneğin, damar sistemi ile ilgili bozuklukların tedavisinde rutin ve hesperidin'in etkin rol oynadığı gözlenmiştir. Fenolik bileşiklerin bu etkileri antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (5-7).

İnsan çevresi sürekli olarak mutajenik ve karsinojenik ajanlarla karşılaşmakta ve bu etkenlerin ortamdan uzaklaştırılması oldukça uğraştırıcı ve zor bir tablo ortaya koymaktadır. Son zamanlarda, bitkiler ve bitkisel bazı metabolitlerin antimutajenik potansiyele sahip bileşiklerin ana kaynakları olduğu kabul edilen bir gerçektir. Hatta bazı sekonder bitkisel metabolitler, genotoksik ajanlara karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu antimutajenler ve antikarsinojenler, karsinojenik işlem basamaklarının birini ya da birkaçını inhibe ederek kanser oluşumunu önleyebilir (8). Bu bağlamda pek çok bitki türü antimutajenik potansiyelleri yönünden araştırılmıştır (9, 10).

Türkiye florası aromatik bitkilerin kaynağı olarak da büyük önem taşır ve ülkemizde yaklaşık 3000 civarında aromatik bitki olduğu varsayılmaktadır. Ülkemizde tıbbi amaçlı kullanılan bitki sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte, 500 civarında olduğu tahmin edilmekte ve yaklaşık 200 tıbbi bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir. Tüm bu belirtilen noktalar dikkate alındığında Anadolu'da geleneksel halk hekimliğine birçok hastalığın tedavisinde şifa kaynağı olarak başvurulmaktadır. Ancak, geleneksel halk hekimliği hakkında bilimsel veriler oldukça sınırlıdır (11).

Asteraceae familyasının *Centaurea* cinsi dayanıklı, otsu, tek, iki veya çok yıllık yaklaşık 500 tür içerir ve Asya, Avrupa ve Kuzey Amerikanın birçok kısmında dağılım gösterir (12). Ülkemizde bu cins 179 türle temsil edilir ve bu türlerden 111 tanesi endemik olup endemizm oranı %61'dir (13). Bu endemizm oranı ile Türkiye florasında bünyesinde en çok endemik tür bulunduran 3. cins konumundadır ve bu durum bitkinin gen merkezinin Türkiye olduğunun bir göstergesidir. Bu cinsine ait birçok tür geleneksel halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Örneğin, *C. drabifolia*, *C. pulchella* ve *C. solstitialis* abse, hemoroid ve soğuk algınlığı tedavisinde, *C. aspera* kan şekerini düşürücü, *C. behen* sarılık tedavisinde ve afrodizyak olarak, *C. calcitrapa* diüretik, temizleyici, tonik etkili ve sarılık ile soğuk algınlığı tedavisinde, *C. cyanus* ise diüretik, kan durdurucu olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *C.*

acaulis, *C. centaurium*, *C. cyanus*, *C. monantha*, *C. nigra*, *C. salonitana* ve *C. scabiosa* anti-kanser ve anti-tümör özelliklere sahiptir (14, 15). *Centaurea* cinsine ait bazı türlerin çeşitli kısımlarının fitokimyasal ve biyolojik aktiviteleri bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur (16).

Centaurea cinsine ait bazı türlerin halk hekimliğinde yoğun olarak kullanılmasından dolayı, bu cinsine ait olan diğer türlerin biyolojik özelliklerinin tespiti oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca bu türlerin etken maddelerinin izole edilerek, farmakolojik olarak değişik amaçlarla kullanılan hazır ürünler halinde sunulabileceği belirtilmektedir (17). Bu bağlamda bu çalışmada *C. pterocaula*'dan elde edilen üç özütün antioksidan, antimutajenik özellikleri ve çeşitli farmakolojik enzimleri inhibe etme potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. *C. pterocaula*'nın antioksidan bazı antioksidan özellikleri rapor edilmiş (18) olmasına rağmen mevcut çalışma oldukça kapsamlı olup, mutajenik/ antimutajenik aktivite ve enzim inhibisyonları açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bitki materyali ve özütlerin çıkarılması

Centaurea pterocaula bitkisi, 2014 yılı Ağustos ayında Konya ili Cihanbeyli ilçesi Gölyazı ile Günyüzü köyleri arasından toplandı. Bitkinin botanik tanımlaması Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Evren Yıldızgüç tarafından yapıldı (Örnek No: EY 2976). Bitkinin toprak üstü kısımları toplanarak gölgede kurutulduktan sonra değirmende iyice toz haline getirildi. Bitkinin etil asetat ve metanol özütleri, 10 g öğütülmüş bitki materyali 200 ml çözücü ile oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmasıyla elde edildi. Özütlerin çözücüleri rotary-evaporator kullanılarak uzaklaştırıldı. Su özütü için ise 10 g öğütülmüş bitki tohumları 300 ml kaynar su ile 15 dk karıştırıldı ve liyofilize edildi.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Yöntemde, bitkisel özütlerden (2 mg/ml) 250 µl deney tüplerine alındı ve sonra her bir tüpe 1ml Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilmiş) ilave edildi. Ardından her bir tüpe 750 µl %1'lik Na₂CO₃ çözeltisinden eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbansları ölçüldü (Shimadzu UV-1800). Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği g özütte gallik asit eş değeri (mg GAE/g) olarak verildi (19).

Toplam flavonoid madde tayini

Yöntemde, bitkisel özütlerden (1 mg/ml) 1 ml µl deney tüplerine alındı ve sonra her bir tüpe 1ml metanolik AlCl₃

çözeltisi ilave edildi. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbanı belirlendi. Aynı işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Sonuçta özütlerin toplam flavonoid madde içerikleri g özütte rutin eş değeri (mg RE/g) olarak verildi (20).

DPPH radikal giderme (süpürme) aktivitesinin belirlenmesi

Bitkisel özütlerin DPPH radikali süpürme aktivitesi Sarikurkcu (21)'ye göre yapıldı. Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel özütlerin 1 ml'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 ml'si ile karıştırıldı. Tüpler ağızları kapatılıp kuvvetlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanlar 517 nm'de okundu. Aynı işlemler troloks için de yapıldı ve bitkisel özütlerin DPPH radikali giderme (süpürme) aktiviteleri g özütte troloks eş değeri olarak verildi (mgTEs/g).

FRAP testi

FRAP testinin uygulanmasında öncelikle FRAP reaktifi hazırlandı. FRAP reaktifi, 0.3 M, pH'sı 3.6 olan asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl₃'ün 10:1:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı. Bitkisel özütlerin 0.1 ml'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 ml'si ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların absorbanları 593 nm'de okundu. Testin sonuçları g özütte troloks eşdeğeri olarak değerlendirildi (mgTE/g) (22).

CUPRAC testi

Yöntemde bitkisel özütlerden 0.5 ml alındı ve her bir deney tüpüne 1 ml CuCl₂.2H₂O (10 mM), 1 ml amonyum asetat (1 M; pH:7) ile 1 ml neokuproin (7.5 mM) çözeltileri eklendi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda absorbanları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları g özütte troloks eşdeğeri (mgTE/g) olarak yorumlandı (23).

Fosfomolibdat testi

Bu Yöntemde 2 mg/ml konsantrasyonunda bitkisel özütlerden 0.3 ml bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden (0.6 M H₂SO₄, 28 mM Na₂HPO₄.12H₂O ve 4 mM amonyum molibdat) 3 ml eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95°C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbanı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de yapıldı. Antioksidan aktivite g özütte troloks eşdeğeri (mmolTE/g) olarak hesaplandı (24).

Metal şelatlama aktivitesi

Örneklerin Fe²⁺ iyonlarını şelatlama kapasiteleri Dinis ve ark. (25) yöntemine göre belirlendi. İçerisinde 2 ml bitkisel özüt (1 mg/ml) bulunan deney tüplerine 2 mM 0.05 ml FeCl₂ çözeltisi ilave edildi. Tepkime 0.2 ml 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı. Tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 562 nm'de absorban ölçümü yapıldı. Aynı işlemler şelatlayıcı ajan olan EDTA içinde yapıldı. Testin sonuçları g özütte EDTA eş değeri olarak değerlendirildi (mg EDTA/g).

Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler

Anti-kolinesteraz aktivitesi

Kolinesteraz inhibitör aktivite Ellman's yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikrolakalarda ölçülmüştür (26). Mikrolakadaki kuyucuklara 2 mg/ml konsantrasyondaki 50 µl bitki özütü, 125 µl DTNB (5,5-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit), 25 µl Tris-HCl tamponun (pH 8.0)'da hazırlanmış AChE veya BChE enzim çözeltisi konuldu. Bu karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 25 µl asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCI) eklendi. Benzer şekilde, AChE veya BChE enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış tepkime reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Örnek ve körlerin absorbanları oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 405 nm de okundu. Körlerin absorbanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanlar elde edildi. Kolinesteraz inhibitör aktiviteleri g özütte galantamine eşdeğeri olarak hesaplandı (mg GALAE/g).

Anti-amilaz aktivitesi

α-amilaz inhibitör aktivite Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (8). Mikrolakadaki kuyucuklara 25 µl örnek çözelti ve fosfat tamponunda (pH 6.9, 6 mM sodyum klorür) hazırlanmış 50 µl α-amilaz çözeltisi eklendi ve 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra inkübe edilmiş örneklere % 0.05'lik 50 µl nişasta çözeltisi ilave edildi. Benzer şekilde, α-amilaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Karışım 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. 1 M 25 µl HCl ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve bunu takiben 100 µl iyot-potasyum iyodür çözeltisi eklendi. Örnek ve körlerin absorbanları 630 nm de okundu. Körlerin absorbanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanlar elde edildi. α-Amilaz inhibitör aktiviteleri g özütte akarboza eşdeğeri olarak hesaplandı (mmol AKAE/g).

Anti-glukozidaz aktivitesi

Mikroplakadaki kuyucuklara 50 µl örnek çözelti, 50 µl glutasyon, fosfat tamponunda (pH: 7.0) çözünmüş 50 µl α-glukozidaz çözeltisi ve 50 µl PNPG (4-p-nitrofenil-α-D-glukopiranozid) eklenerek 37°C de 10 dakika inkübe edildi. Benzer şekilde, α- glukozidaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Reaksiyon 0.2 M 50 µl sodyum karbonat konularak tamamlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 400 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. α- Glukozidaz inhibitör aktiviteleri g özütte akarboza eşdeğer olarak hesaplandı (mmolAKAE/g) (27).

Anti-tirozinaz aktivitesi

Tirozinaz inhibitör aktivite L-DOPA 'nın substrat olarak kullanıldığı dopakrom yöntemi ile ölçüldü. Mikroplakadaki kuyucuklara 25 µl örnek çözelti, 40 µl tirozinaz çözeltisi ve 100 µl fosfat tamponu (pH 6.8) eklendi. Bu karışım 25°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 40 µl L-DOPA konuldu. Benzer şekilde, tirozinaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış tepkime reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 492 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. α-Glukozidaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğer olarak hesaplandı. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. Tirozinaz inhibitör aktiviteleri g özütte kojik asite eşdeğer olarak hesaplandı (mgKAE/g) (28).

Mutajenite/Antimutajenite testi

Çalışmada kullanılmak üzere mutant *Salmonella typhimurium* test suşları TA98 ve TA 100 Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Bu suşlardan TA98 çerçeve kayması mutasyonlarını tespit ederken, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirlemede kullanılmaktadır. *Centaureae* özütlerinin toksik dozlarının belirlenmesi amacı ile Dean ve ark. (29) tarafından belirlenen yöntem kullanıldı. Özütlerin potansiyel mutajenik etkilerini belirlemek amacı ile *Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanıldı. Çalışmada Maron ve Ames (30) tarafından önerilen plak inkorporasyon yöntemi uygulandı. Mililitresinde yaklaşık 1-2x10⁹ bakteri içeren gecelik taze bakteri kültüründen 100 µl, S9 karışımından 500 µl (veya 500 µl fosfat tamponu) ve son olarak farklı dozlarda bitki özütlerinden 100 µl alınarak, 45°C'de bekletilen 2.5 ml hacimdeki üst agara

eklendi. Kısa süreli çalkalama işleminin ardından karışım önceden hazırlanan minimal glukoz agarlı plaklara döküldü ve hızlı bir şekilde çevrilerek yüzeye yayıldı. Katılaşmanın ardından plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi (31). Bu sürenin sonunda plaklardaki geri dönen (revertant) koloniler sayılarak kaydedildi. Çalışma esnasında pozitif kontrol plakları olarak S9 yokluğunda TA98 suşu için 4-nitrofenilendiamin (4-NPDA) ve S9 varlığında 2-aminofloren (2-AF) kullanıldı. TA100 suşu için S9 yokluğunda sodyum azid (SA) ve S9 varlığında 2-aminoantrasen (2-AA) kullanıldı. Negatif kontrol plakları olarak özütlerin çözülmediği dimetil sülfoksit içeren plaklar da hazırlandı. Sadece bakteri içeren revertant plakları da ayrıca hazırlandı. Test edilen özütlerin *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olabilmesi için, her özüt ile eşzamanlı olarak hazırlanan kontrol plaklarındaki (0 dozu) koloni sayısının; maksimum sayılarının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olması gerekmektedir (30).

Antimutajenite deneyinde ise iki test suşu üzerinde mutajen olduğu bilinen maddelerin, mutajenik etkilerinin bitki özütleri tarafından inhibe edilme oranları belirlenmektedir. Bu amaçla Maron ve Ames (30) tarafından önerilen ve Zengin ve ark. (8) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanıldı. Kısaca; 100 µl bakteri kültürü (1-2x10⁹ bakteri/ml), 100 µl farklı dozda bitki özütü, 100 µl pozitif mutajen çözeltisi ve 500 µl S9 karışımı ya da fosfat tamponu (S9'suz deney için), 2.5 ml üst agar içerisine ilave edildi. Karışım vorteks ile çalkalanarak minimal glukoz agar plakalarının yüzeyine dökülerek hızlı bir şekilde yayıldı. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı ve bu sürenin ardından revertant koloniler sayıldı. İçerisinde bitki özütü olmayan ve sadece bakteri ve mutajenik madde ilave edilen plaklarda mutajenite oranı %100 (yani %0 antimutajenite) olarak belirlendi. Özütlerin antimutajenite oranları ise [(A-B)/(A-C)]x 100 formülü ile hesaplandı. Bu formülde A= Bakteri+mutajen plağındaki revertant koloni sayısı; B=Bakteri+mutajen+özüt plağındaki revertant koloni sayısı; C=Kendiliğinden geri dönen revertant koloni sayısını (sadece bakteri plağı) ifade etmektedir (10). Buradan elde edilen sonuçlara göre % 0-25 aralığındaki inhibisyon: zayıf antimutajenite veya aktivite yok; %26-40 aralığındaki inhibisyon: orta dereceli antimutajenite; %40 ve üzeri inhibisyon: güçlü antimutajenite olarak belirlendi (32).

İstatistik değerlendirme

Bütün testler üç tekrarlı deneyler yapılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar üç tekrarlı deneylerin ortalaması ve standart

sapması olarak verildi. Sonuçlar arasındaki anlamlılık testleri SPSS v22. programı kullanılarak ANOVA varyans analizi yardımıyla %95 güven aralığı seçilmek suretiyle ($\alpha=0.05$) Tukey testiyle belirlendi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Antioksidan kapasite

Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmasına karşılık antioksidan kapasiteyi tümüyle yansıtan tek bir metot geliştirilememiştir. Bu nedenle farklı kimyasal test sistemleri kullanılarak antioksidan kapasitenin tümüyle yorumlanması gerekmektedir. Bu noktadan hareketle çalışmamızda farklı antioksidan test sistemleri kullanılmış ve her bir özüt için ayrıca toplam fenolik ve flavonoid içerik hesaplanmıştır.

Çalışılan özütlerin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri sırasıyla Folin ve $AlCl_3$ metotları kullanılarak belirlenmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid içerik bakımından en zengin özüt olarak metanol özütü belirlenmiş ve bunu sırasıyla etil asetat ile su özütü takip etmektedir (Tablo 1). Çalışmamızı doğrular nitelikte birçok çalışmada da metanol özütü fenolik içerik bakımından en zengin özüt olarak nitelendirilmiştir (33, 34). *Centaurea* üyeleri üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda toplam fenolik içerik rapor edilmiştir (35-37).

Tablo 1. *C. pterocaula* özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile DPPH radikal giderme aktivitesi

Özütler	Toplam fenolik içerik (mgGA-E/g özüt)	Toplam flavonoid içerik (mg-RE/g özüt)	DPPH radikal giderme aktivitesi (mgTE/g özüt)
Etil asetat	22.47±0.10b*	20.62±0.12b	13.93±0.95c
Metanol	25.22±0.20a	31.14±0.34a	31.06±0.72a
Su	15.77±0.15c	0.67±0.02c	18.35±0.70b

* Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma. GAE: gallik asit eşdeğeri; RE: rutin eşdeğeri; TE: trolox eşdeğeri; ^{abc} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, $p<0.05$).

Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda en az bir serbest radikal kullanılarak bu radikalın bitki özütü tarafından ne oranda giderildiği hesaplanmaktadır. Bu radikaller içerisinde en yaygın olanı DPPH'dir. Stabil bir radikal olan DPPH mor renklidir ve antioksidan moleküllerden bir elektron alarak sarı pikrilhidrazil formuna dönmektedir. Bu dönüşüm spektrofotometrik olarak 515-517 nm'de takip edilmektedir. Çalışmamızda *C. pterocaula* özütlerinin DPPH giderme kapasiteleri araştırılmış ve Tablo 1'de sunulmuştur. Serbest radikal giderimi bakımından en zengin özüt 31.06 mgTE/g özüt ile metanol özütüdür. Bununla birlikte su ve etil asetat özütleri için bu değer 18.35 ve 13.93 mgTE/g özüt olarak bulunmuştur. Metanol özütünde gözlenen bu güçlü aktivite fenoliklerin yüksek seviyeleri ile açıklanabilir ve bu durum çeşitli çalışmalarda da rapor edilmiştir (38, 39). *Centaurea* üyelerinin serbest radikal giderme (süpürme) etkinliği üzerine çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (40-42) ve bu çalışmalarda genellikle yarısının süpürüldüğü konsantrasyon IC_{50} hesaplanmıştır. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçlarını önceki raporlarla karşılaştırmak olanaksızdır.

İndirgemegücüantioksidan kapasitenindeğerlendirilmesinde önemli bir indikatör olarak düşünülmektedir ve bu anlamda çalışmamızda CUPRAC ve FRAP testleri uygulanmıştır. Çalışılan özütlerin indirgeme güçlerine bakıldığında her iki test sisteminde de metanolün en güçlü aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Tablo 2). Bu durum özütteki fenoliklerin yüksek seviyesi ile açıklanabilir. Fosfomolibdat testi asidik ortamda antioksidan bileşikler Mo^{6+} ya Mo^{5+} ya indirgemesine ve bu durumun 695 nm'de izlenmesine dayanır. FRAP ve CUPRAC testlerine benzer şekilde fosfomolibdat testinde de metanol özütü en güçlü aktiviteyi sergilemiştir.

Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunda bir katalizör olarak görev almakta ve dolayısıyla bunların etkisiz hale getirilmesi önemli bir antioksidan mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda *C. pterocaula* özütlerinin metal şelatlama yetenekleri ferrozin test sistemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 2). Çalışılan özütlerden su özütü en güçlü metal şelatlama yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte metanol özütü en zayıf şelatlama aktivitesi sergilemiştir. Bu durum diğer antioksidan test sistemleri ile farklılık göstermektedir. Bu durum su özütünde fenolikler dışındaki diğer şelatlayıcı ajanların varlığı ile açıklanabilir. Benzer sonuçlar çeşitli bitki özütleri içinde rapor edilmiştir (43, 44). Literatür taraması yapıldığında çeşitli *Centaurea* türleri için metal şelatlama özelliğinin rapor edildiği görülmüştür (35, 45).

Tablo 2. *C. pterocaula* özütlerinin indirgeme gücü, metal şelatlama ve fosfomolibdenum aktiviteleri

Özütler	CUPRAC (mgTE/g özüt)	FRAP (mg-TE/g özüt)	Metal Şelatlama (mgEDTA-E/g özüt)	Fosfomolibdenum (mmolTE/g özüt)
Etil asetat	49.48±0.53b*	32.71±0.31c	17.88±0.81b	1.92±0.11a
Metanol	66.95±1.31a	51.03±0.86a	15.47±0.34c	2.11±0.12a
Su	45.37±0.37c	43.12±1.12b	21.27±0.08a	0.74±0.03b

* Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma. EDTAE: EDTA eşdeğeri; TE: trolox eşdeğer, ^{abc} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

Enzim inhibitör potansiyeli

Günümüzde birçok faktöre bağlı olarak çeşitli hastalıklar küresel boyuta ulaşmıştır. Bunların başında Alzheimer hastalığı ve diyabet gelmektedir. Bu hastalıkların görülme oranı son yıllarda önemli artışlar göstermiştir. Örneğin, Amerika'da her 67 saniyede bir kişi Alzheimer'a yakalanmakta ve bu durumun 2050'de 33 saniyeye düşmesi beklenmektedir (46). Ayrıca, günümüzde 366 milyon insan diabetten etkilenirken bu sayının 2050'de 552 milyona yükselmesi beklenmektedir (47). Bu bağlamda bu hastalıkların tedavisine yönelik yeni stratejilerin ortaya konulması büyük önem arz etmektedir. Bu stratejiler arasında en çok kabul göreni anahtar enzimlerin inhibisyonudur. Bu teoriye göre hastalıkların patolojisinde rol oynayan anahtar enzimler inhibe edilerek hastalıktan kaynaklanacak semptomların hafifletilmesi sağlanır. Örneğin, asetilkolinesteraz sinaptik boşlukta asetil ve kolinin parçalanmasını katalize eder. Alzheimer hastalarında bu enzimin inhibe edilmesi ile bilişsel fonksiyonların artırılması sağlanır ve bu durum kolinerjik hipotez olarak isimlendirilir (48). α-Amilaz ve α-glukozidaz enzimleri şeker metabolizmasının temel enzimleri olup bunların faaliyeti sonucu kan glukoz seviyesi yükselmektedir. Bu anlamda, bu enzimlerin inhibe edilmesi diyabette kan glukoz seviyesinin kontrolünde önemli bir mekanizmadır (49). Yine tirozinaz enzimi melanin sentezinin en önemli enzimidir ve bu enzimin inhibe edilmesi deri hastalıklarının kontrolünde temel yoldur (50). Bu bağlamda çok çeşitli enzim inhibitörleri (kolinesteraz için galantamin, amilaz ve glukozidaz için akarboz, tirozinaz için kojik asit) sentetik olarak üretilmiştir. Bununla birlikte bu sentetik inhibitörlerin sindirim sistemi bozukluklara yol açması ve

hepatotoksik özellikleri bunların kullanımlarını kaygılı hale getirmiştir (51-53). Bu noktadan hareketle bitkisel kaynaklı doğal inhibitörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır.

Çalışmamızın kapsamında *C. pterocaula* özütlerinin enzim inhibisyon kapasiteleri spektrofotometrik metotlarla araştırılmış ve sonuçlar Tablo 3' de verilmiştir. Çalışılan özütlerin kolinesteraz inhibisyon aktiviteleri karşılaştırıldığında, etil asetat ve metanol özütleri asetilkolinesteraz üzerine benzer etkinlik sergilemiştir. Bununla birlikte yalnızca etil asetat özütü butirikolinesteraz üzerine aktiftir. Tirozinaz inhibisyonuna bakıldığında yine etil asetat ve methanol özütlerinde inhibisyon aktivitesi gözlenirken su özütü tirozinaz üzerine etkili değildir. Amilaz inhibisyonu bakımından en güçlü özüt etil asetat iken glukozidaz üzerine en etkin özüt metanoldür. Genel itibariyle su özütü enzim inhibisyonları bakımından en zayıf özüt olarak tespit edilmiştir. *Centaurea* üyelerinin enzim inhibisyonları üzerine çeşitli çalışmalar olmasına karşılık (35, 54, 55), *C. pterocaula* için herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Tablo 3. *C. pterocaula* özütlerinin enzim inhibitör potansiyelleri

Özütler	AChE İnhibisyonu (mgGALA-E/g özüt)	BChE İnhibisyonu (mgGALA-E/g özüt)	Tirozinaz İnhibisyonu (mgKAE/g özüt)	Amilaz İnhibisyonu (mmo-lACAE/g özüt)	Glukozidaz İnhibisyonu (mmo-lACAE/g özüt)
Etil asetat	1.87±0.01a*	1.07±0.01	56.72±0.15a	1.13±0.01a	0.66±0.01b
Metanol	1.87±0.01a	-	35.45±0.08b	0.59±0.01b	0.92±0.01a
Su	-	-	-	0.14±0.01c	0.57±0.01c

* Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma. GALAE: galatamin eşdeğeri; KAE: kojik asit eşdeğeri; ACAE: akarboz eşdeğeri; - aktivite yok. ^{abc} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

Mutajenik/Antimutajenik özellikler

Tablo 4' de görüldüğü üzere mutajenite deneyi sonucu elde edilen tüm revertant koloni sayıları mutajenite limitlerine ulaşmadı. Diğer bir ifade ile *Centaurea* özütleri revertant koloni sayılarını, normalin iki katına yakın ya da iki katından fazla bir sayıya ulaştıracak bir etki göstermedi. Bu durumda *Centaurea* özütleri S9 varlığında ve yokluğunda yapılan Ames testi sonuçlarına göre TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik bulunmadı (Tablo 4).

Tablo 4. *C. pterocaula* özütlerinin S9 varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik aktiviteleri

	Konsantrasyon (µg/plak)	His ⁺ revertant sayıları (revertant/plak)			
		TA 98		TA 100	
		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
*Negatif kontrol	100 µl/plak	28±2a	35±6a	113±6a	120±6a
†Pozitif kontrol		513±81b	4560±164b	4642±132b	4876±175b
Centaurea etil asetat	0	36±5a	41±4a	154±10ac	165±8c
	5000	35±3a	44±4a	156±1c	138±10a
	1000	40±2a	38±5a	144±12a	153±13ac
	500	38±3a	41±3a	109±2a	143±16a
Centaurea metanol	0	36±5a	41±4a	154±10ac	165±8c
	5000	28±9a	35±5a	123±38ac	142±11ac
	1000	44±2ac	39±6a	132±21ac	137±16a
	500	51±2c	44±3a	171±36c	154±9ac
Centaurea su	0	36±5a	41±4a	154±10ac	165±8c
	5000	34±2a	39±5a	141±3a	145±23a
	1000	49±5ad	45±4a	160±14ac	158±19ac
	500	42±1ad	40±6a	118±20a	147±22ac

* Negatif kontrol: DMSO (100 µl/plak) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda negatif kontrol olarak kullanıldı.

† Pozitif kontroller:

2-Aminofloren (7.5 µg/plak) TA98 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; 4-nitro-*O*-fenilendiamin (5 µg/plate) TA98 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

2-Aminoanthracene (5 µg/plate) TA100 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; Sodium azid (5 µg/plate) TA100 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

^{abc} Aynı sütündeki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

Antimutajenite açısından değerlendirildiğinde; *Centaurea* su özütlerinin TA98 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda 4-NPDA'ya karşı %40'ın üzerinde ve %82'lere ulaşan oranlarda inhibisyon ortaya koyduğu dolayısı ile güçlü antimutajenik olduğu belirlendi (Tablo 5). Metanol özütünün 5000 ve 1000 µg/plak dozlarında %49 ve %44 inhibisyon oranları ile güçlü antimutajenik olmasına rağmen, etil asetat özütünün tüm konsantrasyonlarda orta dereceli antimutajenik olduğu (%28, %26, %26) tespit edildi. S9 karışımı varlığında ise etil asetat ve metanol özütleri 2-AF'ye karşı 5000 µg/plak dozlarda çok güçlü (sırası ile %92 ve %92) antimutajenik aktivite ortaya koydu. Buna rağmen su özütü sadece 5000 µg/plak dozunda orta dereceli antimutajenik olarak belirlendi (%39 inhibisyon) (Tablo 5). Su özütünün TA100 suşu üzerinde S9 karışımı yokluğunda SA'ya karşı sırası ile %58, %58 ve %61 inhibisyon oranları ile güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu görüldü. Etil asetat özütü SA'ya karşı 5000 µg/plak dozunda S9 yokluğunda %46 inhibisyon oranı ile güçlü antimutajenik

olarak belirlenmesine rağmen, aynı dozda metanol özütü %30 inhibisyon ile orta dereceli antimutajenite gösterdi. S9 karışımının ilavesi ile metanol ve etil asetat özütlerinin inhibisyon oranlarının yükseldiği görüldü. 2-AA'ya karşı bu oranlar 5000 µg/plak dozunda etil asetat için %91 ve metanol için %87 olarak tespit edildi. Aynı zamanda etil asetat özütü 1000 µg/plak dozunda da %68 inhibisyon oranına yükselerek güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Su özütlerinde ise hem TA98 hem de TA100 suşları üzerinde S9 karışımı ilavesi, S9 yokluğunda elde edilen inhibisyon oranlarını oldukça düşürerek 2-AF ve 2-AA'ya karşı zayıf antimutajenik olarak değerlendirilmelerine sebep oldu. Sonuç olarak *C. pterocaula* özütlerinin, baz çifti değişimi ve çerçeve kayması mutasyonlarını tetikleyen mutajenlere karşı önemli oranda inhibisyona yani antimutajenik aktiviteye sahip oldukları *Salmonella*/mikrozom testi (Ames testi) ile ortaya kondu.

Tablo 5. *C. pterocaula* özütlerinin S9 varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde, mutajen maddelere karşı belirlenen revertant koloni sayıları ve inhibisyon oranları

	Konsant- rasyon (µg/ plak)	His ⁺ revertant sayıları (revertant/plak)							
		TA 98				TA 100			
		S9 (-)	% inhi- bisyon	S9 (+)	% inhi- bisyon	S9 (-)	% inhi- bisyon	S9 (+)	% inhi- bisyon
*Negatif kontrol	100 µl/plak	32±3a		45±5a		135±9a		151±14a	
†Pozitif kontrol		530±17b	0	3100±171b	0	2022±48b	0	5244±148b	0
<i>Centaurea</i> etil asetat	0	29±2a		53±4a		163±12a		169±9a	
	5000	389±15c	28	305±9c	92	1160±25c	46	606±30c	91
	1000	401±71bc	26	1962±205bc	37	1467±80c	30	1798±40d	68
	500	400±50bc	26	3534±666c	0	1606±43c	22	3299±574bd	38
*Negatif kontrol	100 µl/plak	32±3a		45±5a		135±9a		151±14a	
†Pozitif kontrol		530±17b	0	3100±171b	0	2022±48b	0	5244±148b	0
<i>Centaurea</i> metanol	0	29±2a		53±4a		163±12a		169±9a	
	5000	284±31c	49	304±7c	92	1462±25c	30	805±6c	87
	1000	311±73c	44	2647±365b	15	1622±79bc	22	4611±383b	12
	500	335±7c	39	3847±67b	0	1593±195bc	23	5245±197b	0
*Negatif kontrol	100 µl/plak	45±5a		45±5a		151±14a		151±14a	
†Pozitif kontrol		3100±171b	0	3100±171b	0	5244±148b	0	5244±148b	0
<i>Centaurea</i> su	0	53±4a		53±4a		169±9a		169±9a	
	5000	590±24c	82	1901±398c	39	2281±60c	58	4913±98b	7
	1000	654±22c	80	3527±70b	0	2313±16c	58	5014±160b	5
	500	611±82c	82	3396±666b	0	2153±117c	61	4939±177b	6

* Negatif kontrol: DMSO (100 µl/plak) *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları için S9 varlığında ve yokluğunda negatif kontrol olarak kullanıldı.

† Pozitif kontroller:

2-Aminofloren (7.5 µg/plak) TA98 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; 4-nitro-*O*-fenilendiamin (5 µg/plak) TA98 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

2-Aminoanthracene (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 varlığında pozitif indirek mutajen olarak kullanıldı; Sodium azid (5 µg/plak) TA100 suşu için S9 yokluğunda pozitif direk mutajen olarak kullanıldı.

^{abcd} Aynı sütundaki farklı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, p<0.05).

SONUÇ

Günümüzde değişen hayat şartları ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak kronik ve dejeneratif hastalıklara yakalanma riski her geçen gün artış göstermektedir. Bu noktadan hareketle, bu durumun minimize edilmesi bilim dünyasının ana konularından biridir. Bu bağlamda, bitkiler ve onların sergiledikleri biyolojik aktiviteler, yeni ilaç ve

gıda formülasyonlarının geliştirilmesinde oldukça yararlı bir havuz olarak görülmektedir. Bu temelde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonucunda, etil asetat ile metanol özütü etkin antioksidan, enzim inhibitör ve antimutajenik etkiler sergilemiştir. Güvenli ve etkin fonksiyonel ajanların tespitinin önemli olduğu günümüzde, *Centaurea pterocaula* doğal ajanların önemli bir kaynağı olarak düşünülebilir.

Screening for antioxidant and antimutagenic properties of extracts from *Centaurea pterocaula* as well as their enzyme inhibitory potentials

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antioxidant capacities, mutagenic/antimutagenic properties and enzyme inhibitory effects of three extracts (ethyl acetate, methanol and water) of *Centaurea pterocaula*. The antioxidant properties were investigated using *in vitro* antioxidant methods such as radical scavenging (DPPH assay), reducing power (FRAP and CUPRAC assays), phosphomolybdenum and metal chelating activity. Enzyme inhibitory effects were tested against cholinesterase, tyrosinase, amylase and glucosidase. Ames test was used to show mutagenic/antimutagenic properties of these extracts. Methanol extract had the strongest free radical scavenging (31.06 mgTE/g extract) and reducing power abilities (66.95 mgTE/g extract

for CUPRAC and 51.03 mgTE/g extract for FRAP). Also, ethyl acetate extract exhibited the strongest effect on the tested enzymes (except for glucosidase). Total phenolic and flavonoid contents were found to be 15.77-25.22 mg GAE/g extract and 0.67-31.44 mg RE/g extract, respectively. The mutagenicity was not seen for all extracts tested, while it was determined that some samples had significant antimutagenicity. In the condition of presence of S9 mix, ethyl acetate and methanol extracts revealed excellent antimutagenic activity (92% and 92%) at a dose of 5000 µg/plate against 2-aminofluorene (2-AF) for TA98 strain. According to the results of the present study, *C. pterocaula* can be considered as a potential source for developing new nutraceuticals or pharmaceuticals.

Keywords: *Centaurea pterocaula*, antioxidant, enzyme inhibition, antimutagenic, natural agents.

KAYNAKLAR

- Larsson SC, Virtamo J, Wolk A. Total and specific fruit and vegetable consumption and risk of stroke: A prospective study. *Atherosclerosis* 2013; 227: 147-52.
- Malta LG, Tessaro EP, Eberlin M, Pastore GM, Liu RH. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. *Food Res Int* 2013; 53: 417-25.
- Ramos B, Miller FA, Brandao TRS, Teixeira P, Silva CLM. Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innov Food Sci Emerg* 2013; 20: 1-15.
- Spencer JPE, Mohsen MMA, Minihaane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Brit J Nutr* 2008; 99: 12-22.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003; 133: 3248S-54S.
- Cook NC, Samman S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 66-76.
- Liu Q, Cai WS, Shao XG. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* 2008; 77: 679-83.
- Zengin G, Uysal A, Gunes E, Aktumsek A. Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch et Mey.): A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. *Plos One* 2014; 9: 1-13.
- Akin D, Durak Y, Uysal A, Gunes E, Aladag MO. Assessment of Antimutagenic Action of *Celtis glabrata* Steven ex Planch. (Cannabaceae) Extracts Against Base Pair Exchange and Frame Shift Mutations on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 Strains by Ames Test. *Drug Chem Toxicol* 2016; 39: 312-21.
- Uysal A, Gunes E, Sarikurkcu C, Celik H, Durak Y, Uren MC. New Prospective Materials for Chemoprevention: Three Phlomis. *Brit J Pharm Res* 2016; 10:1-13.
- Baser KHC. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl Chem* 2002; 74: 527-45.
- Clapman A, Tutin T, Warburg W. The flora of the British Isles. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1952.
- Davis PH. Flora of Turkey and the east Aegean islands: Edinburgh University Press. 1965.
- Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2001; 75: 95-115.
- Grieve M. A Modern Herbal 2002. Available from: <http://botanical.com/botanical/mgmh/c/centau46.html>.
- Sarker SD, Savchenko T, Whiting P, Sik V, Dinan LN. Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: Four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Nat Prod Lett* 1997; 9: 189-99.
- Reyhan A, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea L.* species. *Gazi University J Sci* 2004; 17: 149-64.
- Tekeli Y, Sezgin M, Aydın Ş. Konya'da Yetişen *Centaurea pterocaula* Truatv.'in Fenolik Yapısı ve Antioksidan Etkisi. *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi* 2008; 35-41.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic* 1977; 28: 49-55.
- Berk S, Tepe B, Arslan S, Sarikurkcu C. Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. *Afr J Biotechnol* 2011; 10: 8902-8.
- Sarikurkcu C. Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. tubers and leaves. *Afr J Biotechnol* 2013; 10: 831-9.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay.

- Anal Biochem 1996; 239: 70-6.
23. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE, Ercag E. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr* 2006; 57: 292-304.
 24. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999; 269: 337-41.
 25. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid-Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Arch Biochem and Biophys* 1994; 315: 161-9.
 26. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
 27. Palanisamy UD, Ling LT, Manaharan T, Appleton D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chem* 2011; 127: 21-7.
 28. Orhan IE, Senol FS, Gulpinar AR, Sekeroglu N, Kartal M, Sener B. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chem* 2012; 130: 882-8.
 29. Dean BJ, Brooks TM, Hodsonwalker G, Hutson DH. Genetic Toxicology Testing of 41 Industrial-Chemicals. *Mutat Res* 1985; 153: 57-77.
 30. Maron DM, Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
 31. Uysal A, Lazarova I, Zengin G, Gunes E, Aktumsek A, Gevrenova R. New Perspectives on *Asphodeline lutea* from Bulgaria and Turkey: Anti-mutagenic, Anti-microbial and Anti-methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity. *Brit J Pharm Res* 2016; 10.
 32. Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003; 80: 393-7.
 33. Šamec D, Valek-Žulj L, Martinez S, Grúz J, Piljac A, Piljac-Žegarac J. Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts. *Ind Crop Prod* 2016; 84: 104-7.
 34. Yasir M, Sultana B, Nigam PS, Owusu-Apenten R. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC-ESIMS/MS identification of phenolic components. *Food Chem* 2016; 199: 307-13.
 35. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 290-6.
 36. Zengin G, Cakmak YS, Guler GO, Aktumsek A. In vitro antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2638-41.
 37. Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Aktumsek A. Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschy* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *persica* (Boiss.) Wagenitz from Turkey. *Grasas Y Aceites* 2011; 62: 90-5.
 38. Akkari H, Hajaji S, B'chir F, Rezik M, Gharbi M. Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2016; 221: 46-53.
 39. Kolniak-Ostek J. Chemical composition and antioxidant capacity of different anatomical parts of pear (*Pyrus communis* L.). *Food Chem* 2016; 203: 491-7.
 40. Tekeli Y, Sezgin M, Aktumsek A. Antioxidant property of *Centaurea solstitialis* L. from Konya, Turkey. *Asian J Chem* 2008; 20: 4831-5.
 41. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Yumrutas O, Sokmen A. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chem* 2006; 98: 9-13.
 42. Zengin G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS, Kan Y. Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey. *Nat Prod Res* 2012; 26: 1-10.
 43. Marathe SA, Rajalakshmi V, Jamdar SN, Sharma A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 2005-12.
 44. Wang T, Jonsdottir R, Olafsdottir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* 2009; 116: 240-8.
 45. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 2914-20.
 46. Alzheimer Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2014; 10: e47-e92. [Available at ; https://www.alz.org/downloads/facts_figures_2014.pdf; Last access; 03.05.2016]
 47. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pr* 2011; 94: 311-21.
 48. Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 388-413.
 49. Etxeberria U, de la Garza AL, Campion J, Martinez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 269-97.
 50. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1707-23.
 51. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN. Antidiabetic Indian Plants: A Good Source of Potent Amylase Inhibitors. *Evid-Based Complement Alternat Med* 2011: 1-6.
 52. Gulacti T, Kusman T. Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's

- Disease. *Bezmialem Science*. 2014; 1: 1-25.
53. Kamagaju L, Morandini R, Bizuru E, Nyetera P, Nduwayezu JB, Stevigny C, et al. Tyrosinase modulation by five Rwandese herbal medicines traditionally used for skin treatment. *J Ethnopharmacol* 2013; 146: 824-34.
54. Ertas A, Goren AC, Boga M, Demirci S, Kolak U. Chemical Composition of The Essential Oils of Three *Centaurea* Species Growing Wild in Anatolia and Their Anticholinesterase Activities. *J Essent Oil Bear Pl* 2014; 17: 922-6.
55. Ozsoy N, Kultur S, Yilmaz-Ozden T, Celik BO, Can A, Melikoglu G. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acetylcholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Activities of Turkish Endemic *Centaurea Antiochia* Var-*Praealta*. *J Food Biochem* 2015; 39: 771-6.