

## *Onopordum acanthium* Özütünün *Acanthamoeba castellanii* Trofozoitleri Üzerinde Amoebisidal Etkisinin, DNA Hasarına Karşı Koruyucu ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması

Bülent KAYNAK<sup>1\*</sup>, Gülizar AYDOĞDU<sup>2</sup>, Zeynep KOLÖREN<sup>3</sup>

### Öz

Çalışmada *Onopordum acanthium*'un etanolik kök özütünün; *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine karşı amoebisidal aktivitesi ile özütün kimyasal kompozisyonu, memeli hücrelerinde sitotoksitesi ve DNA koruyucu aktivitesi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki (82, 41, 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL) özütün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal etkisi tespit edilmiştir. Özütün, epitel hücre olduğu için seçilen HeLa (serviks adenokarsinomu) hücre hattında sitotoksitesi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analiziyle araştırılmıştır. Özütün fitobileşikleri Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile saptanmıştır. Hidroksil radikaliyle pBR322 plazmid DNA'sında oluşturulan DNA hasarına karşı özütlerin DNA koruyucu potansiyeli araştırılmıştır. *O. acanthium* özütünün 82 mg/mL konsantrasyonda 72. saatte canlı trofozoite rastlanmadığı gözlenmiştir. IC<sub>50</sub> değerinin sırasıyla 72., 48., 24. saatlerde 3,09, 5,55 ve 13,6 mg/mL olarak tespit edilmiştir. MTT analizi sonucunda, özütün farklı konsantrasyonlarıyla (14, 13, 11, 9,8, 7, 4, 3, 1,50, 0,44, 0,22 mg/mL) muamele edilen HeLa hücrelerinin canlılığı doza bağlı olarak azalmıştır. 72. saatte IC<sub>50</sub> değeri 8,04 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Hidroksil radikali ile indüklenen DNA hasarını engelleme üzerine etkileri incelendiğinde, özütün 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarda DNA hasarını engelleme etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilerle özütün günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçlara alternatif olarak önerilebilecek bir aday olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Acanthamoeba castellanii*, GC-MS, HeLa Hücresi, *Onopordum acanthium*, pBR322 Plazmid DNA.

## Investigation of *Onopordum acanthium* Extract Regarding Its Amoebicidal Activity Against *Acanthamoeba castellanii* Trophozoites, DNA-protecting and Cytotoxic Activities

### Abstract

The amoebicidal activity of the ethanolic root extract of *Onopordum acanthium* against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites, its chemical composition, cytotoxicity in mammalian cells, and DNA protective activity were investigated. The amoebicidal effect of the extract was assessed at various concentrations (82, 41, 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL) on *A. castellanii* trophozoites. The cytotoxicity of the extract in the HeLa (cervix adenocarcinoma) cell line, which was selected due to it is an epithelial nature, was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analysis. The phyto-compounds present in the extract were identified using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The DNA protective potential of the extracts against hydroxyl radical induced DNA damage in pBR322 plasmid DNA was also examined. At a concentration of 82 mg/mL of *O. acanthium* extract, no viable trophozoites were observed at the 72<sup>nd</sup> hour. The IC<sub>50</sub> values were 3,09, 5,55 and 13,6 mg/mL at 72, 48 and 24 hours, respectively. MTT analysis revealed a dose-dependent decrease in the viability of HeLa cells treated with various concentrations of the extract (14, 13, 11, 9,8, 7, 4, 3, 1,50, 0,44, 0,22 mg/mL), with an IC<sub>50</sub> value of 8,04 mg/mL at 24 hours. Furthermore, the extract exhibited protective effects against DNA damage induced by hydroxyl radicals at concentrations of 20,5, 10,25, 5,125, 2,56 and 1,28 mg/mL. According to our results, the extract is proposed as a potential alternative to current medications used to treat *Acanthamoeba* infections.

**Keywords:** *Acanthamoeba castellanii*, GC-MS, HeLa Cell, *Onopordum acanthium*, pBR322 Plasmid DNA.

<sup>1,2,3</sup>Ordu Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Ordu, Türkiye,

bulentkaynak2004@gmail.com

gulizaraydogdu@yahoo.com

zeynep.koloren@gmail.com

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author

## 1. Giriş

Serbest yaşayan amiplerden olan *Acanthamoeba castellanii* su ve toprak başta olmak üzere dünyada geniş yayılım gösteren, insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olan, trofozoit ve kist formlarında bulunabilen, Acanthamoebidae ailesine ait bir tür olan, mitozla çoğalan ökaryotik bir protozoondur (Visvesvara ve ark., 2007; De Lacerda ve Lira, 2021).

Toprak, içme ve yüzme suları, kaplıcalar, lağımlar, akvaryumlar, klimalar, hastaneler ile dış tedavi birimleri ve diyaliz üniteleri, kontakt lens saklama konteynerleri ile lens dezenfektanları, hücre kültürleri, bazı bitkiler ve omurgalı canlılar insanların nazal mukoza, boğaz, enfekte beyin ve akciğer dokusu ile deri lezyonları ve keratitli hastaların kornea dokusu *Acanthamoeba* türlerinin yaşam alanlarıdır (Aykur ve Dagci, 2023).

Büyüme ve gelişme, beslenme, hareket etme ve üreme faaliyetlerinin yürütüldüğü trofozoit evresi ve olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olan kist evresi olmak üzere yaşam döngüsü 2 evreye sahiptir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak ve ark., 2018).

Çoğunlukla kontakt lens kullananlarda görülen ve ihmal edildiğinde görme kaybıyla sonuçlanabilen *Acanthamoeba Keratiti* (AK), ender görülen ve ölümle sonuçlanabilen Granülomatöz Amoebik Ensefalit (GAE) ve Kutanöz *Acanthamoebiasis Acanthamoeba* kaynaklı önemli hastalıklardır. Ayrıca immün sistemi zayıflamış bireylerde görülen pnömoni, yayılım enfeksiyonu, deri lezyonları parazitin sebep olduğu diğer hastalıklardır (Siddiqui ve Khan, 2012; Stetkevich ve ark., 2022).

Günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçların yeterince etkili olamamaları, uzun süren tedavilerin hastalar tarafında iyi tolere edilememesi ve ilaçların ciddi yan etkilerinin olması, öte yandan kullanılan ilaçlara karşı parazitin direnç geliştirmesi, parazitin kist formunun ilaç ve dezenfektanlara karşı dirençli olması ve parazitin ökaryotik yapıda olması gibi sorunlar nedeniyle *Acanthamoeba* türlerinin trofozoit ve kist formları üzerinde iyi tolere edilebilen, etkin ve non-sitotoksik ilaç arayışları halen sürmektedir (Fiori ve ark., 2006; Kaynak ve ark., 2019).

*Onopordum acanthium* (Galagan ya da Kangal) Asteraceae familyasına ait bir tür olup iki yıllık otsu formda ortalama 1,5 m büyüyeabilen bir bitkidir. Amonyum tuzları bakımından zengin kayalık, yamaç, çalılık, yol kenarları ve tarlalarda yetişen bu tür, Haziran- Eylül aylarında çiçeklenmektedir. Kökü kalın ve sulu olan bitkinin gövdesi dik ve dallı olup kenarları dikenli kanatlara sahiptir. Yapraklar rozet şeklindedir (Cavers ve ark., 2011; Garsiya ve ark., 2019). Bitki, Afrika'da (Cezayir), Asya'da (Türkiye, Rusya, Çin, Hindistan, Pakistan, vb.), Avrupa'da (Almanya, Hollanda, Yunanistan, İtalya, Fransa, Portekiz, Norveç, vb.) Avustralya, Kuzey ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bitki, Türkiye'de Karadeniz'in doğusu, Doğu Marmara, Orta ve Doğu Anadolu ile Orta Akdeniz'de yayılış göstermektedir (Al-Snafi, 2020).

Farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan *O. acanthium*'un toprak üstü kısmının kaynatılarak tüketildiğinde sakinleştirici ve idrar söktürücü etkisi bildirilmiştir. Ayrıca merkezi sinir sistemini uyaran bitki, kardiyotonik ve hemostatik özelliklere sahiptir (Mobli ve ark., 2015; Garsiya ve ark., 2019). Yaprak ve çiçek infüzyonu ödemi azaltıcı etkiye sahiptir (Mamedov ve ark., 2015; Garsiya ve ark., 2019). *O. acanthium*'un çiçek, yaprak ve gövdesinden elde edilen etanolik özütler kozmetik alanda krem ve merhemlerde kullanılmaktadır. Bu özütler derinin yeniden yapılanmasını sağlar, nemlendirir ve yaşlanma karşıtı etkilere sahiptir (Garsiya ve ark., 2019).

Bu çalışmanın amacı, *O. acanthium*'un *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesini ve hidroksil radikali ile indüklenen DNA hasarını engelleme aktivitesini araştırmaktır. Ayrıca *O. acanthium*'un doza bağlı olarak HeLa hücre hattında hücre canlılığını etkileyip etkilemediğini belirlemektir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1 Bitki Özütünün Hazırlanması

Bitkinin kök kısmından 60 g hassas terazide tartılıp, 180 mL etanolla öğütülmüştür. Karışım 100 rpm çalkalayıcıda 72 saat bekletilmiş, süre sonunda filtre kâğıdından süzildikten sonra evaporatörde 35°C'de etanol uzaklaştırılmıştır. Son konsantrasyonu 82 mg/mL hesaplanmıştır (Kaynak ve ark., 2018).

### 2.2 *A. castellanii* Trofozoit Kültürü

Ringer agar besiyerlerine 1'er mL Ringer broth eklendikten sonra 0,5'er ml *E. coli* (ATCC 25922) süspansiyonu (*Acanthamoeba* ksenik kültüründe canlı besin olarak kullanılmıştır) ve *A. castellanii* (ATCC 30010) suşundan 350'şer µL eklenerek steril özeyle ekim yapılmıştır. 26°C etüvde 96 saat inkübasyondan sonra trofozoitler, Ringer broth ile yıkanarak toplanmış ve thoma lamında mL'deki trofozoit sayısı ve %0,4'lük trypan blue boyası ile canlılık testi yapılmıştır. Deneye  $1 \times 10^6$ /mL trofozoit sayısı ve %100 canlılıkla başlanılmıştır (Kaynak ve ark., 2018).

### 2.3 Özütün Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi

*O. acanthium* özütü 82, 41, 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlardan 200'er µL alınarak 200'er µL trofozoitle karıştırılmıştır. Negatif kontrol (NK) (trofozoit + steril deiyonize su) ile pozitif kontrol (PK) (trofozoit+%0,05

klorheksidin glukonat) hazırlanarak 26°C etüvde 24, 48, 72 saat bekletilmiş, her süre bitiminde %0,4'lük trypan blue eklenip thoma lamında sayılmıştır. Her sayım üç kez tekrarlanmıştır (Kaynak ve ark., 2018).

## 2.4 MTT Sitotoksikite Testi

*O. acanthium* özütü 14, 13, 11, 9,8, 7, 4, 3, 1,50, 0,44, 0,22 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanarak memeli hücrelerinde sitotoksik etkisi HeLa hücre hattı kullanılarak test edilmiştir. HeLa hücreleri %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ile 2 mM l-glutamin, 100 µg/mL streptomisin, 100 U/mL penisilin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kültür ortamında 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde T75'lik hücre kaplarında büyütülmüştür. HeLa hücrelerinin 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 5x10<sup>3</sup> hücre olarak %10 FBS içeren DMEM besiyerine ekimi yapılmıştır. Ertesi gün hücrelere özüt, farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 24 saat bekletilmiştir. Elabscience MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kiti kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50 µL serumsuz besiyeri ile 50 µL MTT reaktifi eklenmiştir. Kontrol için, hücre içermeyen bir kuyucuğa 50 µL MTT reaktifi eklenmiştir. %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C inkübatörde 3 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklara 150 µL MTT solvent eklenmiştir. 15 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Süre sonunda Tecan i-control™ Microplate Reader'da 570 nm'de absorbansı okutulmuştur.

## 2.5 Özütün DNA Koruyucu Aktivitesinin Test Edilmesi

*O. acanthium* özütü hidroksil radikali ile indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmak için 15 µL son hacimde 0,25 µg/µL pBR322 plazmit DNA'sı, 2,5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 2,5 mM Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Özüt 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarda 50 mM fosfat tamponunda (pH 7) bulunduğu bir reaksiyon karışımı hazırlanarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler elektroforez için %1 agaroz (0,5 mg/mL etidyum bromür içeren) yüklenmiştir. Elektroforezden sonra çalışma tamponunda (1X Tris asetik EDTA; TAE) UV ışığı altında görüntüler kaydedilmiştir (Col-Ayvaz ve ark., 2018).

## 2.6 Özütün GC-MS Analizi:

*O. acanthium* kök özütünün içerisindeki etanol ve su evaporatörde tamamen uçurulduktan sonra DMSO (Dimetil sülfoksit) çözücü kullanılarak 2000 ppm konsantrasyonda hazırlanarak GC-MS analizi Restek-Rtx-5 kapiller kolonda (30,0m x 0,25mm x 0,25µm) 70 ev'de elektron darbe modu;

helyum (%99) kullanılarak yapılmıştır. Taşıyıcı gaz 1 mL/dakika sabit akışta ve enjeksiyon hacmi 1 µL olarak ayarlanmıştır. Split ratio 1/10, enjektör sıcaklığı 240°C ve iyon kaynağı sıcaklığı 200°C olacak şekilde fırın sıcaklığı 40°C'de 2 dakikadan başlayarak 4°C /dakikalık bir artışla 240°C'ye (10 dakika) çıkarılmış ve toplam çalışma süresi 50 dakika olmuştur (El-Beltagi ve ark., 2019). Verilerin değerlendirilmesinde özel bir kütle spektral veritabanı (WILEY), Aroma ve Koku Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) ve Doğal ve Sentetik Bileşikler Kütüphanesi (FFNSC3), kütüphanelerinden faydalanılmıştır.

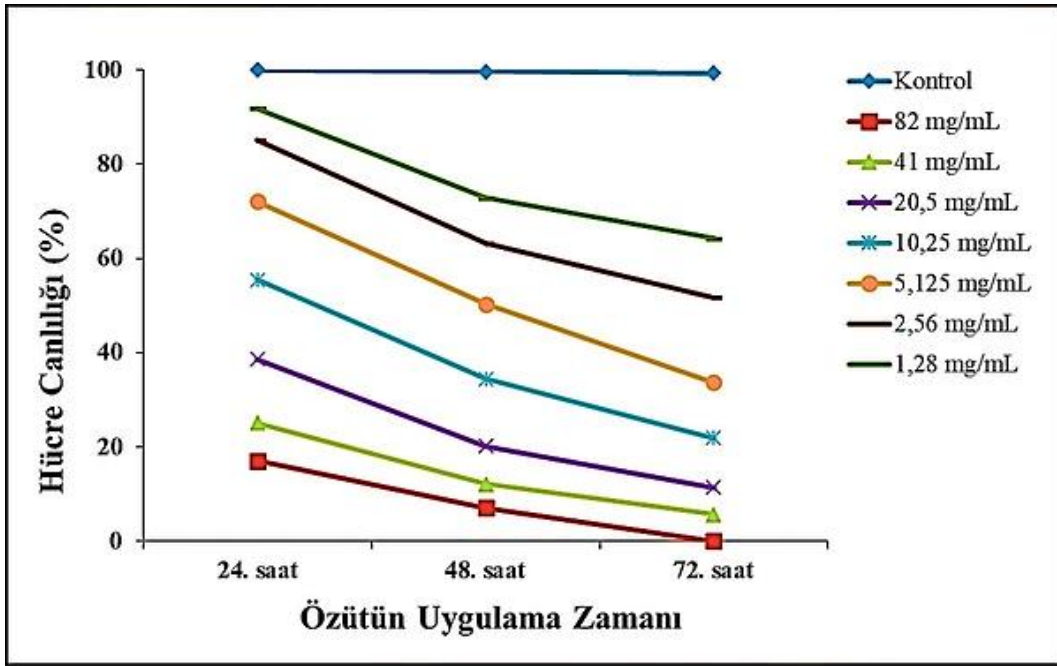
## 2.7 İstatistiksel Analiz

Kontrol (K) ile özüt test gruplarının 24., 48., 72. saatlerdeki değişimlerine ait veriler ve farklı konsantrasyonlardaki özütün HeLa hücrelerinde sitotoksikite testine ait veri girişi, grafikler ve tanımlayıcı veri analizi Microsoft Excel ile IBM SPSS Statistics 27.0.1 programları ile yapılmıştır. Veriler ortalama (Mean) ± standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. p değeri <0,01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Özütün amoebisidal aktivitesini gösteren % canlılık sayım sonuçları IBM SPSS Statistics 27.0.1 kullanılarak post-Hock çoklu karşılaştırma analizi, Tukey ikili grup karşılaştırılması yapılarak değerlendirilmiştir. Trofozoitler ve HeLa hücrelerinde letal aktivite gösteren özütün farklı konsantrasyonları, IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanmasında logaritmik regresyon analizi kullanılmıştır. Açıklayıcı değişkenler ve tüm konsantrasyonların sonuçlarını özetlerken Principal Component Analysis (PCA) Jamovi 2.4.11 programı ile görselleştirilmiştir.

## 3. Bulgular

### 3.1 Özütün Amoebisidal Aktivitesi

*O. acanthium* özütünün 82 mg/mL konsantrasyonda 24. saatte trofozoitlerin çoğunda letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 72. saatte canlı trofozoite rastlanmadığı, 41 mg/mL konsantrasyonda ise 72. saatte trofozoitlerin çoğunda önemli oranda letal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *O. acanthium* özütünün farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği

*O. acanthium* özütünün trofozoitler üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 3,09, 5,55 ve 13,6 mg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı konsantrasyonlardaki *O. acanthium* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki  $IC_{50}$  değerleri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan Saat	%50 İnhibitör Konsantrasyon ( $IC_{50}$ )
Trofozoit	72	3,09 mg/mL
	48	5,55 mg/mL
	24	13,6 mg/mL

*O. acanthium* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan özüt dozlarının canlılık üzerine etkileri incelendiğinde, özüt dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek canlılık 1,28 mg/mL'de, en düşük canlılık 82 mg/mL'de ölçülmüştür. Bekleme süresi arttıkça da canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatte, en düşük canlılık 72. saatte ölçülmüştür (Tablo 2).

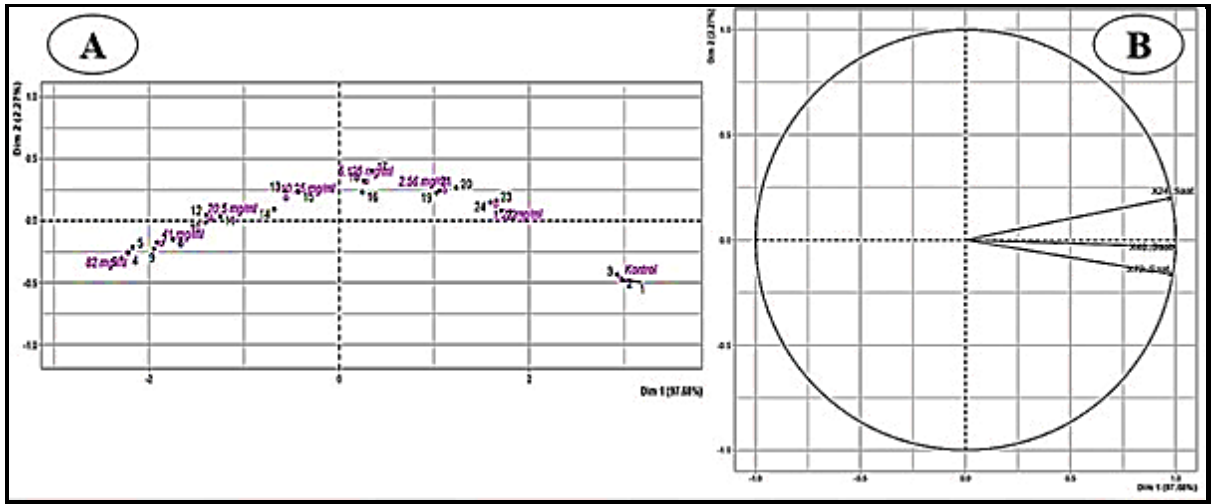
Tablo 2. *O. acanthium*'un farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki hücre canlılığına etkisi

Doz/Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	$\Sigma$
Kontrol	100±0,00 <sup>a</sup>	99,66±0,57 <sup>a</sup>	99,33±1,15 <sup>a</sup>	99,66±0,70 <sup>a</sup>
1,28 mg/mL	91,78±1,10 <sup>b</sup>	72,83±1,35 <sup>d</sup>	64,28±2,01 <sup>e</sup>	76,30±12,26 <sup>b</sup>
2,56 mg/mL	85,01±2,31 <sup>c</sup>	63,17±2,16 <sup>e</sup>	51,69±1,64 <sup>f</sup>	66,62±14,76 <sup>c</sup>
5,125 mg/mL	72,06±2,67 <sup>d</sup>	50,32±1,08 <sup>f</sup>	33,72±1,53 <sup>g</sup>	52,03±16,73 <sup>d</sup>

10,25 mg/mL	55,42±3,94 <sup>f</sup>	34,44±1,60 <sup>g</sup>	21,89±1,72 <sup>hi</sup>	37,25±14,84 <sup>e</sup>
20,5 mg/mL	38,62±1,78 <sup>g</sup>	20,10±2,05 <sup>hi</sup>	11,32±1,07 <sup>jk</sup>	23,35±12,15 <sup>f</sup>
41 mg/mL	25,07±2,50 <sup>h</sup>	12,12±2,17 <sup>k</sup>	5,65±1,14 <sup>kl</sup>	14,28±8,74 <sup>g</sup>
82 mg/mL	17,04±1,88 <sup>ij</sup>	7,04±1,19 <sup>jk</sup>	0,00±0,00 <sup>l</sup>	8,03±7,50 <sup>h</sup>
Σ	60,62±30,10 <sup>a</sup>	44,96±31,04 <sup>b</sup>	35,98±32,49 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen değerler ile farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

*O. acanthium* özüt dozlarının trofozoitler üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Açıklama oranı (%99,97) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda 82, 41, 20,5, 10,25 mg/mL'deki dozlar ile kontrol, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL dozlar arasında negatif korelasyon göstermektedir (Şekil 2A). *O. acanthium*'un tüm dozlarının 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri ile 72 saatteki değerler arasında önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri, eksenin ortasında yer aldığından tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir (Şekil 2B).



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlardaki *O. acanthium* özütünün PCA ile gösterimi (A), *O. acanthium* özütünün farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi (B).

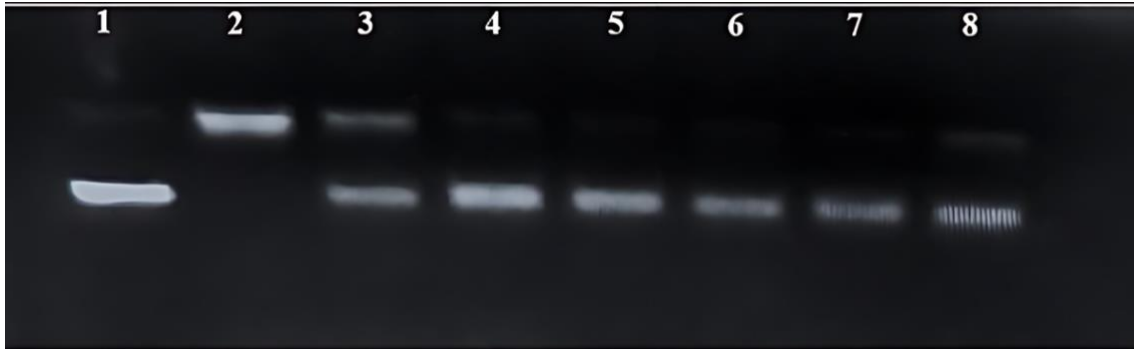
*O. acanthium*'un özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi incelendiğinde tüm eksenler varyansların %100'ünü açıklamaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. *O. acanthium*'un özdeğer ve kümülatif varyans yüzdeleri

	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	%Kümülatif
Dim. 1	2,93027	97,6756	97,7
Dim. 2	0,06817	2,2723	99,9
Dim. 3	0,00156	0,0521	100,0

### 3.2 Özütün DNA Koruyucu Aktivitesi

*O. acanthium* özütünün hidroksil radikali ile indüklenmiş DNA hasarını engelleyici aktivitesini araştırmak amacıyla hidroksil radikali ile indüklenmiş pBR322 plazmid DNA'sı agaroz jel elektroforeziyle incelenmiştir. pBR322 plazmid DNA'sı stressiz şartlar altında süper coil haldedir. Hidroksil radikali ile oluşturulan DNA hasarı sonucunda DNA sirküler ve lineer hale geçmektedir. Trolox gibi antioksidan ajan kullanılan pozitif kontrollerinde olduğu gibi DNA hasarı engellendiğinde DNA tekrar süpercoil hale dönmektedir. *O. acanthium* özütünün 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarının hidroksil radikali ile oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin güçlü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).



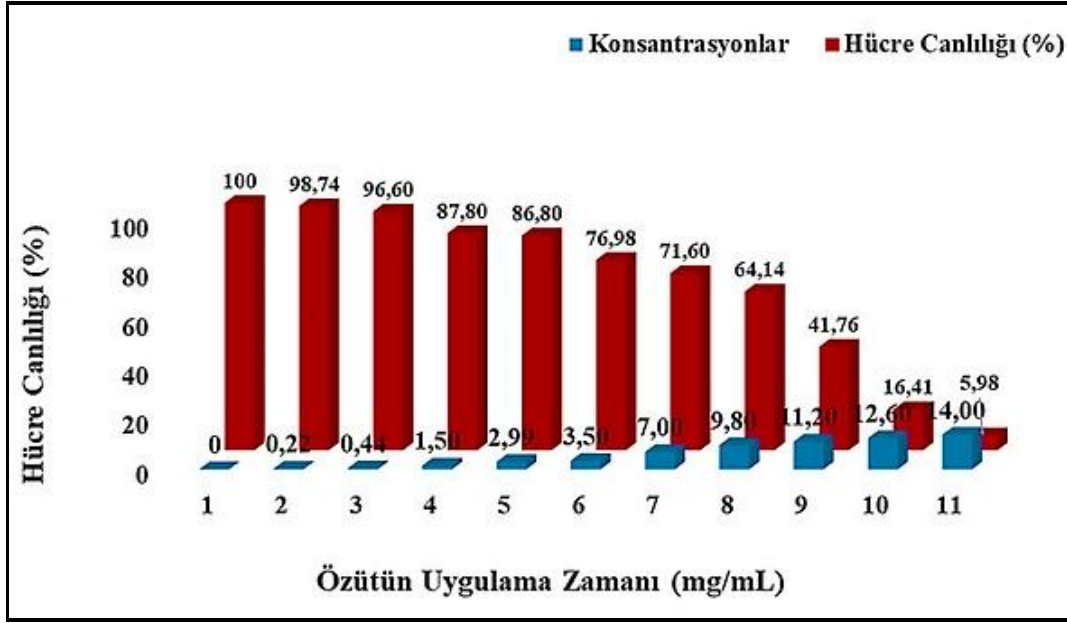
**Şekil 3.** *O. acanthium* özütünün pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde hidroksil radikalinin neden olduğu DNA hasarına karşı DNA koruyucu aktivitesini gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü

- 1: DNA
- 2: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 3: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +Trolox
- 4-10: Trolox yerine farklı konsantrasyonlardaki *O. acanthium* özütleri (20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL).

### 3.3 Özütün Sitotoksik Aktivitesi

*O. acanthium* özütü farklı konsantrasyonlarda (14, 13, 11, 9,8, 7, 4, 3, 1,50, 0,44, 0,22 mg/mL) HeLa hücre hattında 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Özütün doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. 72 saat sonra yaklaşık IC<sub>50</sub> değerinin 8,04 mg/mL olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). *O. acanthium* özütün HeLa hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu görülmüştür.





Şekil 4. *O. acanthium* özütünün farklı konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerinde 24 saatteki sitotoksitesi.

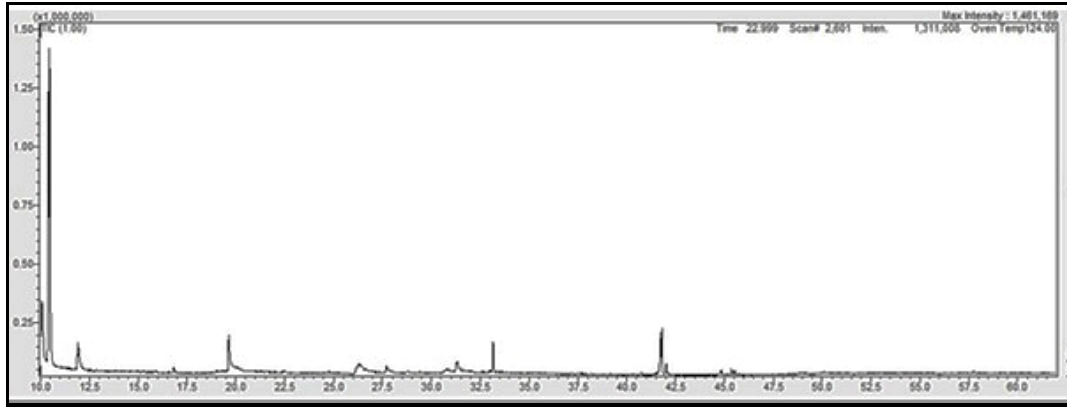
### 3.4 Özütün Kimyasal Kompozisyonun Belirlenmesi

*O. acanthium* özütü GC-MS ile analiz edildiğinde (Tablo 4) bitkinin kimyasal kompozisyonu arasında bulunan bazı fitobileşiklerin [Dimethylsulfoxonium formylmethylide (Jha ve ark., 2022), Butyrate (Du ve ark., 2021), 5-Hydroxymethyl furfural (Ntalli ve ark., 2010)] kapsamlı literatür taraması sonucunda antimikrobiyal etkilerinin tespit edildiği çalışmalara rastlanmıştır. *O. acanthium* kök özütünün GC-MS analiz grafiği Şekil 5'te sunulmuştur.

Tablo 4. *O. acanthium* Özütünün Kimyasal Kompozisyonu

Pik	Tutulma Süresi	Alan %	Kimyasalın Adı	CAS No	Formül	Molekül Ağırlığı (MW)	Kütüphane (Library)
1	10,063	12,35	Dimethylsulfoxonium formylmethylide	31043-74-0	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S	120	NIST11
2	10,459	44,3	Methanesulfonyl chloride	124-63-0	CH <sub>3</sub> ClO <sub>2</sub> S	144	NIST11
3	11,924	3,73	Chloromethanesulfonyl chloride	3518-65-8	ClCH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> Cl	149	NIST11
4	19,64	4,94	2(5H)-Furanone, 4-methyl-5-(2-methyl-2-propenyl)-	89902-24-9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	152	NIST11
5	31,317	2,11	Decanoic acid, silver (1+) salt	13126-67-5	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> AgO <sub>2</sub>	279	NIST11
6	33,162	3,16	Cyclohexane, 1-butenylidene-	89902-24-9	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	NIST11
7	41,72	3,37	9,12,15-Octadecatrienal	26537-71-3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	262	NIST11
8	41,79	4,39	9,17-Octadecadienal, (Z)-	56554-35-9	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	264	NIST11
9	10,063	12,35	Methane, sulfinylbis- (CAS) Dimethyl sulfoxide	67-68-5	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O S	78	WILEY 7
10	10,459	44,3	Methane, sulfonylbis- (CAS) Dimethyl sulfone	67-71-0	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	94	WILEY 7
11	11,924	3,73	1-Chloro-2-fluoroethane	0-00-0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ClF	82	WILEY 7
12	19,64	4,94	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)- (CAS) HMF	67-47-0	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126	WILEY 7
13	31,317	2,11	Quinic Acid	77-95-2	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	192	WILEY 7

14	33,162	3,16	1,4,8-Dodecatriene, (E,E,E)- (CAS)	24252-85-5	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub>	162	WILEY 7
15	41,72	3,37	11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester (CAS) Methyl-11,14,17-Eicosatrienoate	55682-88-7	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	320	WILEY 7
16	41,79	4,39	Tetradecadien-4,9 ol-1	0-00-0	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O	210	WILEY 7
17	10,063	12,35	Sclerosol	67-68-5	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O S	78	FFNSC 3
18	10,391	18,05	Norborneol <exo-2->	497-37-0	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	112	FFNSC 3
19	11,924	3,73	Disulfide <methyl-, 2-methyl-, 3-furyl->	65505-17-1	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> OS <sub>2</sub>	160	FFNSC 3
20	19,64	4,94	5-Hydroxymethylfurfural	67-47-0	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126	FFNSC 3
21	31,317	2,11	Butyrate <decyl->	5454-09-1	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228	FFNSC 3
22	33,162	3,16	Dodeca-(8E,10E)-dienyl acetate	53880-51-6	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	224	FFNSC 3
23	41,72	3,37	Civetone	542-46-1	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O	250	FFNSC 3



Şekil 5. *O. acanthium* özütünün GC-MS analiz grafiği

#### 4. Tartışma

Günümüzde bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar giderek artış göstermektedir. Bazı *Onopordum* türlerinin antibakteriyel [*O. alexandrinum* (Abd El-Moaty ve ark., 2016), *O. acanthium* (Al-Snafi, 2020), *P. umbonatum* ve *O. jordanicum* (Obeidat, 2018)], antifungal [*O. alexandrinum* (Abd El-Moaty ve ark., 2016), *P. umbonatum* ve *O. jordanicum* (Obeidat, 2018), *O. acanthium* (Mouffouk ve ark., 2023)] ve antimalaryal [*O. alexandrinum* (Abd El-Moaty ve ark., 2016)] aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Çalışmamızda ise; *O. acanthium*'un *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi araştırılmıştır. *O. acanthium*'un 82 mg/mL'de 24. saatte trofozoitlerin çoğunda letal etki gösterdiği, 72. saatte canlı trofozoite rastlanmadığı, 41 mg/mL'de 72. saatte trofozoitlerin çoğunda önemli oranda letal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2). *O. acanthium*'un trofozoitler üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 3,09, 5,55 ve 13,6 mg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 2). *O. acanthium*'un dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 1,28 mg/mL'de, en düşük canlılık 82 mg/mL'de ölçülmüştür. Bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatte, en düşük canlılık 72. saatte ölçülmüştür (Tablo

3) PCA'ya göre açıklama oranı (%99,97) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda 82, 41, 20,5, 10,25 mg/mL'deki dozlar ile kontrol, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL dozlar arasında negatif korelasyon göstermektedir. *O. acanthium*'un tüm dozlarının 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri ile 72 saatteki değerler arasında önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri, eksenin ortasında yer aldığından tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir (Şekil 3).

Asteraceae familyasına ait bazı bitki türlerine [*Tanacetum kotschyi* ve *Tanacetum tomentellum* (Savci ve ark., 2019), *Lactuca sativa* (Naseem ve Ismail, 2022), *Wedelia chinensis* (Pandey ve ark., 2024)] ait özütlerin pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde DNA koruyucu aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır. Çalışmamızda da Asteraceae familyasına ait olan *O. acanthium*'un hidrosil radikali ile oluşturulan DNA hasarına karşı pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde *O. acanthium* kökünden elde edilen özütün DNA hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. *O. acanthium* özütünün 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarının DNA hasarına karşı koruyucu etkisi ilk kez bu yayımla gösterilmiştir (Şekil 4).

Bazı *Onopordum* türlerinin [*O. heteracanthum* (Durak ve Aysu, 2014), *O. arenarium* (Bouazzi ve ark., 2020), *O. Anatolicum* ve *O. heteracanthum* (Basturk ve Peker, 2021)] GC-MS analizi ile fitokimyasal bileşiklerin incelendiği çalışmalar da yapılmıştır. Çalışmamızda da *O. acanthium*'un GC-MS analizi ile kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir. Kapsamlı literatür taraması sonucunda bu kimyasal bileşiklerin bazılarının [Dimethylsulfoxonium formylmethyilde (Jha ve ark., 2022), Butyrate (Du ve ark., 2021), 5-Hydroxymethyl furfural (Ntalli ve ark., 2010)] antimikrobiyal etkilerinin tespit edildiği çalışmalara rastlanmıştır.

Bazı araştırmacılar *Onopordum*'un bazı türlerinin [*O. cynarocephalum* (Formisano ve ark., 2012), *O. leptolepis* (Mirzaei ve ark., 2018)] MTT analizi ile memeli hücrelerinde sitotoksitelerinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur. Çalışmamızda da *O. acanthium*'un memeli hücrelerinde sitotoksik aktivitesi MTT ile HeLa hücre hattı kullanılarak test edilmiştir. *O. acanthium*'un hücre canlılığı üzerinde test edilen dozlara bağlı azalma gözlenmiş ve 72. saatte yaklaşık IC<sub>50</sub> değerinin 8,04 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. *O. acanthium*'un HeLa hücre hattı için sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

## 5. Sonuçlar ve Öneriler

Çalışmamızda *O. acanthium*'un *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi araştırılmıştır. *O. acanthium*'un 82 mg/mL'de 24. saatte trofozoitlerin çoğunda letal etki gösterdiği, 72. saatte canlı trofozoite rastlanmadığı, bulunmuştur. *O. acanthium*'un trofozoitler üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 3,09, 5,55 ve 13,6 mg/mL olarak bulunmuştur.

*O. acanthium*'un dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 1,28 mg/mL'de, en düşük canlılık 82 mg/mL'de ölçülmüştür. Bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatte, en düşük canlılık 72. saatte ölçülmüştür. *O. acanthium*'un GC-MS analizi ile kimyasal kompozisyonu da belirlenmiştir.

Ayrıca *O. acanthium* özütünün hidroksil radikali ile oluşturulan DNA hasarına karşı pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde DNA hasarına karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Özütünün 20,5, 10,25, 5,125, 2,56, 1,28 mg/mL konsantrasyonlarının DNA hasarına karşı koruyucu etkileri bulunmuştur.

İlave olarak *O. acanthium*'un memeli hücrelerinde sitotoksik aktivitesi HeLa hücre hattı kullanılarak MTT ile test edilmiştir. *O. acanthium*'un hücre canlılığı üzerinde test edilen dozlara bağlı azalma gözlenmiş ve 72. saatte yaklaşık IC<sub>50</sub> değerinin 8,04 mg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında *O. acanthium* özütünün HeLa hücrelerine karşı sitotoksik etkisi ve oksidatif stres ile oluşan DNA hasarına karşı koruyucu aktivite göstermesinin yanı sıra *A. castellanii* trofozoitlerine karşı amoebisidal aktivitesi tespit edilmiştir. Bu noktadan hareketle kontrollü şartlar altında *O. acanthium* özütünün *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif veya kombine olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir. Ancak çalışmanın sonraki aşamasında, deney hayvanlarında non-toksik olup olmadığının in vivo çalışmalar ile ortaya konulması gerektiği düşünülmektedir.

### **Yazarların Katkısı**

Tüm yazarlar çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### **Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı**

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

### **Kaynaklar**

- Abd El-Moaty, H. I., Wanas, A. S., Radwan, M. M., Desoukey, S. Y. (2016). Glycosides of *Onopordum alexandrinum* Boiss. and its Central Nervous System (CNS) and some biological activities. *Int. J. Pharmacog. Phytochem. Res*, 7,1088-1098.
- Al-Snafi, A. E. (2020). Constituents and pharmacology of *Onopordum acanthium*. *IOSR Journal of Pharmacy*, 202(10), 3.

- Aykur, M. and Dagi, H. (2023). Molecular identification of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* in soil samples using quantitative real-time PCR assay in Turkey; Hidden danger in the soil. *Acta Tropica*, 244, 106956.
- Basturk, A. and Peker, S. (2021). Antioxidant Capacity, Fatty Acid Profile and Volatile Components of the *Onopordum Anatolicum* and *Onopordum Heteracanthum* Species Seeds Grown in Van, Turkey. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(4), 2810-2822.
- Bouazzi, S., El-Mokni, R., Nakbi, H., Dhaouadi, H., Joshi, R. K., Hammami, S. (2020). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and hexane extract of *Onopordum arenarium* from Tunisia. *Journal of Chromatographic Science*, 58(4), 287-293.
- Cavers, P.B., Qaderi, M. M., Threadgill, P. F., Steel, M. G. (2011). The Biology of Canadian Weeds. 147. *Onopordum acanthium* L. *Can. J. Plant Sci*, 91(4), 739-758.
- Col-Ayvaz, M., Omur, B., Erturk, O., Kabakci, D. (2018). Phenolic profiles, antioxidant, antimicrobial, and DNA damage inhibitory activities of chestnut honeys from Black Sea Region of Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 42(3), e12502.
- De Lacerda, A. G. and Lira, M. (2021). *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 41(1), 116-135.
- Du, K., Bereswill, S., Heimesaat, M. M. (2021). A literature survey on antimicrobial and immune-modulatory effects of butyrate revealing non-antibiotic approaches to tackle bacterial infections. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 11(1), 1-9.
- Durak, H. and Aysu, T. (2014). Effects of catalysts and solvents on liquefaction of *Onopordum heteracanthum* for production of bio-oils. *Bioresource technology*, 166, 309-317.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I., Abdelazeem, A. S., Youssef, R. and Safwat, G. (2019). GC-MS analysis, antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of extracts from *Ficus sycomorus* fruits and leaves. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 493-505.
- Fiori, P. L., Mattana, A., Dessi, D., Conti, S. (2006). In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother*, 57(5), 891-898.
- Formisano, C., Rigano, D., Russo, A., Cardile, V., Caggia, S., Arnold, N. A., ... & Bruno, M. (2012). Phytochemical profile and apoptotic activity of *Onopordum cynarocephalum*. *Planta medica*, 78(15), 1651-1660.
- Garsiya, E. R., Konovalov, D. A., Shamilov, A.A., Glushko, M. P., Orynbasarova, K. K. (2019). Traditional medicine plant, *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae): chemical composition and pharmacological research. *Plants*, 8(2), 40.
- Jha, V., Risbud, A., Matharoo, D. K., Preman, G., Thube, S., Bhosale, A., Aslam, F. (2022). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil obtained from *Jasminum Sambac*. *J. Plant Biol. Crop. Res*, 5, 1065.
- Kaynak, B., Koloren, Z., Karaman, U. (2018). Investigation of in vitro amoebicidal activities of *Ornithogalum sigmoideum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Annals of Medical Research*, 25(4), 709-15.
- Kaynak, B., Koloren, Z., Karaman, U. (2019). Investigation of in vitro amoebicidal activities of *Trachystemon orientalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Van Medical Journal*, 26(4), 483-490.
- Mamedov, N. A., Mehdiyeva, N. P., Craker, L. E. (2015). Medicinal plants used in traditional medicine of the Caucasus and North America. *J. Med. Active Plants*, 4, 42-66.
- Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 273-307.
- Mirzaei, N., Mokhtari, B., Kolahi, M. (2018). Evaluation of phytochemical and anticancer properties of cotton thistle (*Onopordum leptolepis* DC.) extract on the survival of CACO<sub>2</sub> cancer cells. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 23(2), 57-69.
- Mobli, M., Qaraaty, M., Amin, G., Haririan, I., Hajimahmoodi, M., Rahimi, R. (2015). Scientific evaluation of medicinal plants used for the treatment of abnormal uterine bleeding by Avicenna, *Arch. Gynecol. Obstet*, 292, 21-35.
- Mouffouk, C., Mouffouk, S., Mouffouk, S., Haba, H. (2023). Traditional use, phytochemistry and pharmacological properties of the genus *Onopordum*. *Current Chemical Biology*, 17(2), 124-139.
- Naseem, S. and Ismail, H. (2022). In vitro and in vivo evaluations of antioxidative, anti-Alzheimer, antidiabetic and anticancer potentials of hydroponically and soil grown *Lactuca sativa*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 30.

- Ntalli, N. G, Vargiu, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., Caboni, P. (2010). Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(21),11390-11394.
- Obeidat, M. (2018). Antimicrobial activities from extracts of seven medicinal plant species against multidrug-resistant bacteria and fungi. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(3), 45-55.
- Pandey, B. C., Gupta, A., Sahu, A. N., Dey, R., Raghuwanshi, R., Kumari, N. (2024). Biogenic synthesis of silver nanoparticle from flower extract of *Wedelia chinensis* and their antibacterial and antioxidant activity. *NanoExpress*, 5,025027.
- Savci, A., Alan, Y., Kocpinar, E. F., Kursat, M., Topdemir, S., Karatas, M., & Cakmak, B. (2019). Phenolic contents and biological activities of *Tanacetum kotschyi* (Boiss.) Grierson and *Tanacetum tomentellum* (Boiss.) Grierson extracts. *Suleyman Demirel University Faculty of Arts and Sciences Journal of Science*, 14, 112-126
- Siddiqui, R. and Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5, 6.
- Stetkevich, S. A., Le, S. T., Ford, A. R., Brassard, A., Kiuru, M., Fung, M. A. and Tartar, D. M. (2022). Isolated cutaneous acanthamoebiasis under prophylactic anticryptococcal treatment in an immunocompromised patient. *JAAD Case Reports*, 28, 77-79.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1-26.