

CUSCUTA CAMPESTRIS TEDAVİSİ İLE MİDE KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZUN İNDÜKLENMESİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN OLUŞUMU YOLUYLA PROLİFERASYONUN ENGELLENMESİ

INHIBITION OF PROLIFERATION VIA INDUCING APOPTOSIS AND FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON GASTRIC CANCER CELLS WITH CUSCUTA CAMPESTRIS TREATMENT

Huri BULUT^{1,2}, Ezgi DURMUŞ², Ebru HACIOSMANOĞLU³, Kubra BOZALI⁴, Hilal ŞENTÜRK¹, Abdurrahim KOÇYİĞİT²

ÖZET

AMAÇ: Kanser tahrip edici, ölümcül bir hastalıktır ve dünya çapındaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Mide kanseri gibi kanser türleri için farklı tedavi yöntemleri mevcut olsa da çoğu tedavi yöntemleri birçok yan etkiye sahiptir. Çeşitli iyileştirici özelliklere sahip *Cuscuta campestris*' in kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması yeni bir alan olmakla beraber etkileri tam olarak çalışılmamış ve aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, *C. campestris* özütünün farklı konsantrasyonlarının mide kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve reaktif oksijen türlerinin üretimindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Araştırmamızda, *C. campestris* için antioksidan, pro-oksidan ve radikal temizleyici aktiviteleri değerlendirildi ve miktar tayini LC-MS / MS yöntemi ile analiz edildi. *C. Campestris*' in normal hücrelere kıyasla mide kanseri (AGC) hücreleri üzerindeki seçiciliğini göstermek için insan normal deri fibroblastik (CCD-1079Sk) hücre hattı kullanıldı. Apoptoz belirteçlerinin tayininde akridin oranj/etidyum bromür çift boyama, akış sitometrisi ve western blot metotlarından faydalanıldı. Genotoksik aktivite tayini, Comet analizi ile gerçekleştirildi.

BULGULAR: Sonuçlarımız, *C. Campestris* etanolik özütünün doza bağlı bir şekilde, mide kanseri hücre hattı üzerinde normal hücrelere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, elde ettiğimiz veriler *C. campestris*'in mide kanseri hücre hatlarında reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığını ve DNA hasarına neden olduğunu açıkça göstermiştir. Yapılan apoptoz tayin ölçümleri *C. campestris*' in bölünmüş kaspaz-3, bölünmüş kaspaz-9, bölünmüş PARP ve P-53'ü aktive etmesiyle kanser hücreleri üzerinde apoptotik bir etkiye sahip olduğunu da doğrulamıştır.

SONUÇ: Bu çalışmanın sonucu olarak, *C. Campestris*'in mide karsinomu tedavisinde umut vadeden bir antikanser ajanı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Cuscuta campestris*, mide karsinomu, apoptoz, DNA hasarı, reaktif oksijen türleri

ABSTRACT

AIM: Cancer is a destructive disease and second most common cause of death worldwide. Although there are different therapeutic methods for cancers such as gastric cancer, most of them possess many adverse effects. Investigating the effects of *Cuscuta campestris*, which has various medicinal properties, on cancer cells is a new field and has not been fully elucidated. In this study, we investigated the effects of cytotoxic, genotoxic, apoptotic and reactive oxygen species production on gastric cancer cells with various concentrations of *C. campestris* extract.

MATERIAL AND METHOD: Content analysis of *C. campestris* was measured by LC-MS/MS method. Selectivity on gastric cancer cell line (AGC cell line) was compared to normal cells, human normal skin fibroblastic cells (CCD-1079Sk) for all experiments. Antioxidant, pro-oxidant and radical scavenging activities were evaluated, and apoptosis indicators were measured via acridine orange/ ethidium bromide double staining, flow cytometer and western blotting assays. Genotoxic activity assay was carried out by using Comet assay.

RESULTS: Our results demonstrated that ethanolic extract of *C. campestris* has significantly higher cytotoxic effects on gastric cancer cell line than normal cells in a dose dependent manner. We also observed that *C. campestris* increased the generation of reactive oxygen species in gastric cancer cell lines and caused DNA damage. Apoptosis detection assays further confirmed that *C. campestris* has an apoptotic effect by activated of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, cleaved PARP and P-53.

CONCLUSION: Hence, *C. campestris* might represent a promising anticancer agent for gastric carcinoma treatment.

Keywords: *Cuscuta campestris*, stomach neoplasms, apoptosis, DNA damage, reactive oxygen species

¹ İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ Biyoloji ve Tıbbi Laboratuvar Araştırması, Avans Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Breda, Hollanda

Geliş Tarihi / Submitted : Mart 2021 / March 2021

Kabul Tarihi / Accepted : Temmuz 2021 / July 2021

Sorumlu Yazar / Corresponding Author:

Huri BULUT

İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Topkapı Kampüsü, Maltepe Mah., Teyyareci Sami Sk., No.3 Zeytinburnu, İstanbul, 34010 İstanbul, Türkiye

Tel: +90 850 283 60 00 Gsm: +90 530 066 04 20

E-posta: huri.bulut@istinye.edu.tr

Yazar Bilgileri / Author Information:

Huri BULUT (ORCID: 0000-0003-2706-9625),

Ezgi DURMUŞ (ORCID: 0000-0002-0760-497X) E-posta: balkanezgi90@gmail.com,

Ebru HACIOSMANOĞLU (ORCID: 0000-0001-9559-4515) E-posta: ebruhoglu@hotmail.com,

Kübra BOZALI (ORCID: 0000-0003-2416-0773) E-posta: kubrabozalii@gmail.com,

Hilal ŞENTÜRK (ORCID: 0000-0002-3908-7778) E-posta: hilal.senturk@istinye.edu.tr,

Abdurrahim KOÇYİĞİT (ORCID: 0000-0003-2335-412X) E-posta: akocycigit@bezmialem.edu.tr

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Etik Kurullar Birimi'nin 30.03.2021 tarihli, 06 sayılı Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul yazısı ile çalışmanın Etik Kurul onayına gerek olmadığına karar verilmiştir.

GİRİŞ

Mide kanseri (MK), küresel ve aynı zamanda ölümcül bir sağlık sorunudur. Dünya çapında en sık görülen dördüncü kanser türü olup tüm kanser ölümlerinin ikinci en önemli nedenidir (1). MK insidansı özellikle Doğu Asya, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika'nın bazı bölgelerinde oldukça yüksektir (2). Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavideki sınırlamalar göz önüne alındığında, mide ve diğer kanser türleri için tamamlayıcı / alternatif tıp yaklaşımlarına ilgi günden güne artmaktadır (3). Günümüzde, doğal bileşiklerin daha az toksik olması, anti-kanser ilaçlarının tedavi sonrası oluşturduğu toksisite endişesini ortadan kaldıracak şekilde düşündürmektedir.

Türkiye'nin Orta Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde özellikle Mardin'de yaygın olarak yetişen yabani ot türlerinden biri olan *Cuscuta campestris* Yuncker (*C. campestris*) (tarla küskütü) tek yıllık holoparazitik bir bitkidir (4). Dünyada yaygın olarak görülen *Cuscuta* türleri, mahsul bitkilerinde verim kaybına ve en çok ekonomik zarara neden olan parazitik bitki türüdür. Bunun yanı sıra *Cuscuta* türlerinin flavonoidler, glikozitler, alkaloidler, tanenler, ligninler ve diğer organik maddeler dahil olmak üzere birkaç fito-bileşen içerdiği bilinmektedir. Bu bileşenlerin yanı sıra uçucu yağ ve eser elementler de içerdiği gösterilmiştir. Bu içeriklerinden dolayı *Cuscuta* türleri modern tıpta kullanılmaktadır (5). *C. campestris* çoğunlukla kersetin (6), hiperosid (7) kaempferol, refleksin, klorojenik asit, kafeik asit, p-Coumaric asit, 4,5-dikaffeoilkinik asit (6) gibi fitokonstituentleri ihtiva eder. Birçok çalışma, *Cuscuta* türlerinin, anti-analjezik (ağrı kesici) ve anti-piretik (ateş düşürücü) özelliklerin yanı sıra antibakteriyel, antimikrobiyal, antioksidan, anti enflamatuar, anti-proliferatif, hepatoprotektif (karaciğer koruyucu etkileri) ve anti-ülser aktiviteyi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (5, 8, 9). Son yıllarda *Cuscuta* türlerinin anti-kanser etkileri de araştırılmıştır (5, 10). Ancak, literatürde birçok *Cuscuta* türünün kimyasal içerikleri ve biyoaktiviteyi bildirilmiş olsa da *C. campestris*'in tıbbi özelliklerini gösteren çalışmalar sınırlı veriye sahiptir. Bu nedenle, bu çalışmada *C. Campestris* etanolik özütlerinin farklı konsantrasyonlarının mide kanseri hücreleri (AGC) üzerindeki sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve reaktif oksijen üretimine (ROS) olan etkilerini inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

1-Hücre Hatları ve Kimyasallar

Mide karsinom hücreleri (AGC) ve insan fibroblast hücreleri (CCD-1079Sk), American Type Cell Culture Collection'dan (ATCC, ABD) temin edildi. Fetal sıgır serumu (FBS), Ham's F12K medyum, Eagle's minimal essential medium (EMEM), 2,7-diklorodihidrofloresin-diasetat (H2DCF-DA), penisilin-streptomisin, etidyum bromür (EB), akrinin oranj (AO) ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) alındı. Aksi belirtilmedikçe, çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitededir. Annexin V-FITC boyama kiti, Roche Life Sciences'tan (Penzberg, Almanya) sa-

tin alındı. Protein ladder'ı Thermo Fisher Scientific'ten (Massachusetts, ABD) temin edilirken, birincil ve ikincil antikorlar, Abcam'den (Cambridge, İngiltere) satın alındı. Western Blotting Luminaol Reagent, Santa Cruz'dan (Texas, ABD) satın alındı.

2- Bitkilerin toplanması ve ekstraksiyonu

C. campestris'in açıkta yetişen kısımları, Konya'dan (İç Anadolu Bölgesi, Türkiye) 2018 ilkbaharının başlarında toplandı. Bitkinin toprak üstü kısımları temizlendikten sonra parçalayıcı yardımıyla ince toz haline getirildi. 100 g bitki tozu 100 ml %80 etanol içinde süspansiyon edildi ve çalkalayıcı üzerinde 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edildi. Etanolik özüt, Whatman filtre kağıdı yardımıyla süzülükten sonra vakum altında 40°C'de döner buharlaştırıcı ile buharlaştırıldı (Heidolph Hei-Vap Value Model Rotary Evaporator, Almanya). Son olarak, sulu özüt çözeltisi liofilizasyona (Labconco FreeZone 2.5 Litre Masaüstü Dondurularak Kurutma Sistemi, ABD) tabi tutularak *C. Campestris*' in kuru tozu elde edildi.

3- *C. campestris*' in içerik ve aktivite analizi

Toplam fenolik ve flavonoid içerik

C. campestris özütünün toplam fenolik (TF) içeriği, çalışmamıza uyarlanmış bir yöntem (11) izlenerek Folin-Denis reaktifi kullanılarak belirlendi. Gallik asit, referans standart olarak kullanıldı. Elde edilen yeşil rengin absorbansı, plak okuyucu (Thermoscientific, Varioskan Flash Multimode, ABD) kullanılarak 746 nm'de ölçüldü. Toplam fenolik içerikler, gallik asit ile hazırlanmış bir standart eğrinin ($R^2 = 0.999$) doğrusal denkleminde belirlendi. Toplam fenolik bileşik içeriği 100 g kuru ağırlık başına mg cinsinden mg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

Ekstraktın toplam flavonoid (TF) içeriği Eom ve ark.'nın (12) protokolü kullanılarak analiz edildi. TF, 100 g kuru ağırlık başına mg cinsinden kersetin eşdeğerlerini (QE) kullanan kalibrasyon eğrisinden ($R^2 = 0,999$) hesaplandı.

C. campestris'in fenolik ve flavonoid içeriklerinin Yüksek Performanslı LC-MS / MS ile ölçümü

C. campestris içeriği, iyon kaynağının ESI olduğu kütle spektrometresi (Thermoscientific, Orbitrap Q-Exactive, ABD) ile saptandı. 3 µm Fortis C18 (150 x 3.0 mm kalınlığında) kolonu kullanıldı. İlk olarak, *C. campestris*'in kuru özütü HPLC faz koşullarına uygun olması için metanol içinde çözülürdü (HPLC koşulları mobil faz A; %1 formik asit- H₂O ve mobil faz B; %1 formik asit - MeOH). Kütle spektrometresinin ara yüz sıcaklığı 240°C'ye, enjeksiyon hacmi ise 2 µl'ye ayarlandı. Kütle aralığı 85m/z'den 1 500 m/z'ye kadar uygulandı. Tarama süresi, taramalar arası 0,1 saniyelik gecikmeyle 0,5 saniye olarak belirlendi. Kütüphane araştırması ise ILBER kütüphanesi kullanılarak gerçekleştirildi.

C. campestris'in toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ile pro-oksidan ve radikal temizleyici aktivitesini tayin TAK, Erel ve arkadaşlarının protokolünden yararlanılarak tayin edildi (13). TAK analizinde 2,2'-azino-bis

(3-etilbenzotiyazolın-6-sülfonik asit; ABTS) radikalının indirgenme ölçümleri baz alındı. Analiz, troloks ile kalibre edildi ve sonuçlar, litre başına mM askorbik asit eşdeğeri (mmol askorbik asit eşdeğeri / L) cinsinden ifade edildi. *C. campestris* kuru ekstresinin pro-oksidan aktivitesi, Apak ve ark.'nın yeni pro-oksidan aktivite deneyi baz alınarak gerçekleştirildi (Erel, 2004). *C. campestris*'in standart kalibrasyon eğrisi, molar konsantrasyona karşı alınan absorbans değeriyle elde edildi ve her antioksidan için modifiye edilmiş CUP-RAC analizinin molar absorptivitesi ilgili kalibrasyon çizgisinin eğiminden bulundu. Çalışmalardaki ABTS radikal temizleyici kapasite (RTK), Erel'in yönteminde belirtildiği gibi rapor edildi (13). RTK yüzdesi, aşağıdaki denklemle göre hesaplandı:

$$[(\text{Absorbans kontrol} \times \text{örnek} / \text{Absorbans kontrol}) \times 100]$$
Kalibrasyon eğrisi için askorbik asit kullanıldı (150-1 000 µM) ve sonuçlar, her 1 000 mg *C. campestris* etanolik özütü başına mmol Askorbik asit eşdeğeri cinsinden ifade edildi.

4-Hücre kültürü

AGC hücreleri, Hams F-12K, CCD-1079Sk hücreleri ise EMEM medyum içerisinde 37°C ve %5 CO₂ ortamında standart kültür koşullarında çoğaltıldı. Hücrelerin kültür ortamları, %10 FBS, 100U/ml penisilin ve 100 ng/ml streptomisin ile desteklendi. Kültürdeki canlı hücre sayısı tayini tripan mavisi kullanılarak tespit edildi.

5-Hücre canlılık testleri

Hücre canlılığı, ATP seviyelerini ölçmede kullanılan luminesans test (Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, ABD) ile belirlendi. Bu amaçla, 96 kuyulu plakların her bir kuyusuna 100 µl içinde 1 × 10⁵ adet AGC ve CCD-1079Sk hücre ekimi yapıldı. Ardından hücreler *C. campestris* ekstresi (100-600 ug / ml) ile 24 saat boyunca muamele edilirken kontrol grubu hücreler %0,1 DMSO ile muamele edildi ve plak, 30 dakika oda sıcaklığına bekletildi. Plakların her bir kuyusuna 100 µl Cell-Titer-Glo reaktifi eklendi ve orbital çalkalayıcıda 2 dakika boyunca karıştırıldı. 10 dakika inkübasyon sonrası ATP varlığında yayılan ışık, bağıl ışık birimleri (RLU) cinsinden ölçüldü. Hücre canlılığı, %100 olarak belirtilen negatif kontrol grubuna kıyasla bir yüzde olarak gösterildi. Yarı maksimal büyüme inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀) değeri, konsantrasyon-tepki eğrilerinden doğrusal olmayan regresyon analizinden hesaplandı.

6-ROS üretiminin ölçümü

Hücre içi ROS üretimi, DCFH oluşturmak için spesifik olmayan esterazlarla bölünen ve floresan DCF üretmek için ROS tarafından kantitatif olarak oksitlenen hücre geçirgen floresan prob dihidrodikloro floresan diasetat (H₂DCF-DA) kullanılarak test edildi. AGC ve CCD-1079Sk hücreleri, 24 saat boyunca *C. Campestris*'in kuru özütü (100-600 ug / ml) ile muamele edildi. İnkübasyon sonrası hücreler soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve 100µM H₂DCF-DA ile 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.

DCF floresan yoğunluğunu 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon değeri ayarlanarak, floresan plak okuyucuyla (Thermo Scientific, Varioskan Flash Multimode, ABD) ölçüldü. Analiz, üç bağımsız deney olmak üzere üçer kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Değerler, kontrol ile karşılaştırıldığında % bağıl floresan olarak ifade edildi.

7-Akridin oranj / etidyum bromür çift boyama testi

Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için akridin oranj / etidyum bromür (AO / EB) çift boyama testi Mc Gahon ve arkadaşlarının yöntemiyle gerçekleştirildi (14). Hücreler altı kuyulu plaklarda (2 x 10⁵ hücre / kuyu) 24 saat boyunca kültür ortamında bekletildi. Ardından kuyulara %0,1 DMSO içinde *C. Campestris*'in kuru ekstresi eklendi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Kontrol grubuna DMSO (%0,1) uygulandı. Hücreler, inkübasyondan sonra PBS ile yıkandı. Tripsin / EDTA uygulamasıyla hücreler plak kuyularından kaldırıldı ve 4°C'de 400 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası, süpernatant ortamdaki uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücrelerin yoğunluğu, soğuk PBS ile 2 x 10⁵ hücre / ml olacak şekilde süspanse edildi. Süspanse hücre pelletin üzerine son olarak, AO / EB solüsyonu ilave edildi ve hücrelerin nükleer morfolojileri, floresan mikroskopisi (Leica DM 1 000, Solms, Almanya) ile tayin edildi.

8-Akış sitometrisi ile apoptoz tayini

Apoptoz analizi, üretici firmanın talimatlarına göre Annexin V-FITC boyama kiti (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz için AGC ve CCD-1079Sk hücreleri altı kuyulu plaklara kuyu başına 1.5 x 10⁵ hücre olacak şekilde ekildi ve gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plak tabanına yapışan hücrelere *C. Campestris*'in IC₅₀ değerinin altındaki *C. campestris* konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edildi. 24 saatin ardından hücreler tripsin ile plak yüzeyinden kaldırıldı ve 200 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Hücre pelleti 100µL Annexin V-FITC etiketleme solüsyonu ile yeniden süspanse edildi ve 15-20 ° C'de 10-15 dakika inkübe edildikten sonra 488nm ve 525nm emisyon dalga boyunda akış sitometrisi (Becton Dickinson, FACS Canto II, ABD) ile analiz edildi.

9-SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

AGC ve CCD-1079Sk hücreleri (1.5 x 10⁵ hücre / kuyu) olacak şekilde 35x10 mm'lik petri kaplarına ekildi. 24 saat sonra *C. Campestris*'in farklı konsantrasyonları (100, 150, 225 µg / ml) ile hücreler muamele edildi. İnkübasyondan sonra hücreler toplandı ve buz üzerinde 30 dakika boyunca önceden hazırlanmış RIPA hücre liziz tamponunda (proteaz inhibitörü kokteyli ilaveli) bekletildi. Ardından hücreler 4 °C'de 10 dakika boyunca 13000 x rpm'de (Beckman Coulter, Krefeld, Almanya) santrifüjlendi ve nihai süpernatant, sitozolik fraksiyon olarak kullanıldı. Total protein konsantrasyonları, Bradford protein analiz yöntemi (15) belirlenerek denatüre edildi. Proteinler western blot analizi için %8-12'lik SDS-PAGE jel üzerinde ayrıldı. Ayrım sonrası proteinler PVDF membranına

aktarıldı. Membrana aktarılan proteinler ilk önce birincil antikorlarla daha sonrasında horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge ikincil antikorlar (Abcam, Cambridge, İngiltere) ile inkübe edildi. Protein bantları P53'e, bölünmüş kaspaz-3'e, bölünmüş kaspaz-9'a, bölünmüş PARP ve GAPDH'e (Abcam, Cambridge, İngiltere) özgü ikincil antikorlar üzerindeki enzime bağlanarak aktivite gösteren Pierce ECL Western blot substratı (Bio-Rad, CA, ABD) görsel hale getirildi. Antikorlara ait oluşan bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntüledi ve bant yoğunlukları analiz edildi.

10-Genotoksik aktivite analizi

C. campestris'in hücreler üzerindeki genotoksik etkileri Singh ve ark.'nın yöntemi baz alınarak çalışmamıza yapılan uygun değişiklikler doğrultusunda alkalın tek hücreli jel elektroforezi (komet analizi) ile değerlendirildi (16). Komet analizi öncesinde, canlı hücrelerin sayısını belirlemek için tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirildi (17). Kuyu başına yaklaşık 2×10^5 hücre düşecek şekilde hücreler 6 kuyulu plaklara ekildi ve %5 CO₂'de 37°C koşullarında inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonunun ardından, hücreler C. Campestris'in IC₅₀ değerinin altındaki C. campestris konsantrasyonları ile muamele edildi ve 37°C'de 24 saat daha inkübe edildi. Negatif kontrol olarak DMSO (%1), pozitif kontrol olarak da 50 mM hidrojen peroksit kullanıldı. Görüntüler bilgisayar ortamında uygun analiz programı (Comet Assay IV; Perceptive Instruments) kullanılarak elde edildi. Hartmann ve ark.'na göre (18), kuyruk DNA'sının yüzdesi, DNA hasarının (DNA iplik kırılmaları) ölçümü için bir parametre olarak kullanıldı. Bir elektroforezde her örnek için yüz Comet puanlandı. Ayrıca tüm bu gözlemler aynı biyokimya araştırmacı kadrosu ile tamamlandı. Bir yanlısına etkisi olmaması için DNA hasar tayini tek bir gözlemciden faydalanılarak gerçekleştirildi.

11-İstatistiksel analiz

Sonuçlar, üçer tekrar olarak gerçekleştirilen analizlerin Ortalama \pm Standart sapması (Ortalama \pm SS) şeklinde sunuldu. Tüm deneylerden elde edilen verilerin varyans analizi tek yönlü ANOVA kullanılarak istatistiksel anlamlılık açısından analiz edildi. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için post hoc analizleri yapıldı ve p < 0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre hatları üzerinden ekstresinin IC₅₀ değerleri doğrusal olmayan regresyon analizi ile hesaplandı. p < 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Windows için SPSS paket programı (Sürüm 20, Chicago, IL) kullanıldı.

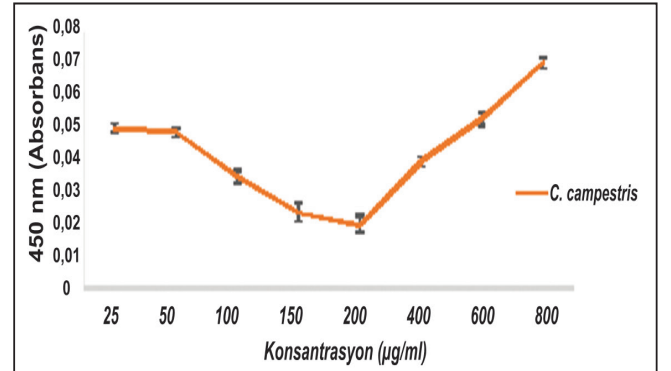
BULGULAR

C. campestris ekstraktının içerik özelliklerinin incelenmesi
C. campestris etanolik özütünün fenolik ve flavonoid

içeriğinin analitik verileri metotta belirtildiği gibi analizlenerek **Tablo 1**'de gösterildi. C. campestris etanolik özütünün on yedi farklı fenolik bileşik seviyesi LC-MS / MS yöntemi ile belirlendi ve ilgili veriler **Tablo 2**'de gösterildi. Örnekler üç tekrar şeklinde analiz edildi. C. campestris'in etanolik özütünün pro-oksidan aktivitesi incelendiğinde, daha düşük konsantrasyonları ($\leq 200 \mu\text{g/ml}$) anti-oksida-tif özellik gösterirken, pro-oksida-tif etkisi $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 'den sonra önemli ölçüde arttığı görüldü (**Şekil 1**). Bu sonuçlar ile ABTS radikal temizleyici aktivite sonuçları, C. campestris'in konsantrasyona bağlı olarak pro-oksidan görevi görebilen güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koydu.

Tablo 2 C.campestris'in LC-MS/MS analiz sonucuna ait kantitatif fenolik ve flavonoid bileşik analiz sonuçları

Bileşik adı	C. campestris (mg/L)
(-)-Epigallocatechin gallate	7.087
Caffeic acid	0.794
Elagic Acid	0.1
Fumaric Acid	16.01
Herniarin	0.105
Hispidulin	0.266
Hyperoside	266.098
Isosakuranetin	0.077
Kaempferol	0.95
Luteolin-7-rutinoside	18.99
Naringenin	0.268
Nepetin-7-glucoside	13.547
Quercitrin	18.845
RosmarinikAcid	0.235
Rutin	12.825
Dihydrokaempferol	0.011
Emodin	0.037



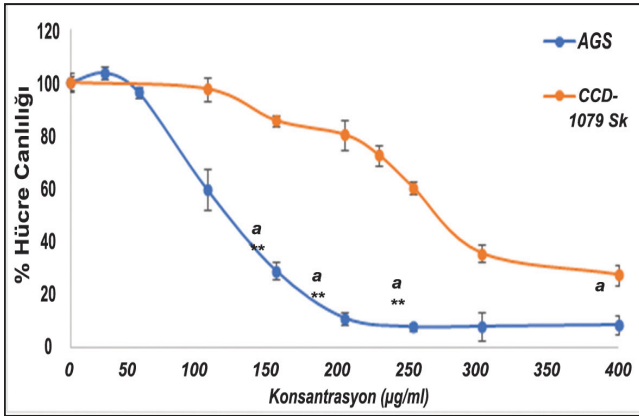
Şekil 1. C. campestris etanol ekstresinin pro-oksidan aktivitesi Apak ve ark.'ları tarafından geliştirilen prooksidan aktivite analizi ile gösterilmiştir. C. campestris 200 $\mu\text{g/ml}$ doza kadar anti-oksidan aktivite gösterirken, daha yüksek dozlarda pro-oksidan aktivite göstermiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Tablo 1 C.campestris etanol ekstresinin farklı parametrelere ait analiz sonuçları

Toplam Fenolik	Toplam Flavonoid	Total Antioksidan Kapasite
mg GAE/ g C. campestris	mg QE/ g C. campestris	(ABTS inhibisyon yüzdesi)
19 \pm 1.908	18 \pm 1.605	%42 \pm 3.29

AGC ve CCD-1079Sk hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

ATP testi, *C. campestris*'in AGC ve CCD-1079Sk hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisini değerlendirmede kullanıldı. *C. campestris*'in 24 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere olan etkileri ATP hücre canlılık testi ile belirlendi. Hücre canlılıkları, deneylerden önce %95'ten büyük olduğu tespit edildi. Tedavi uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak sayıldı. Kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. ATP testi sonucunda, AGC hücrelerinin canlılığının *C. campestris* uygulaması sonrası kademeli olarak azaldığı görüldü (Şekil 2). Bu azalmanın, CCD-1079Sk hücrelerinin canlılığına kıyasla daha anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Bunun sonucunda, *C. campestris*'in normal deri fibroblast hücrelerine göre mide kanseri hücrelerine karşı daha seçici sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varıldı.



Şekil 2. *C. campestris* etanol ekstresinin hücre canlılığı üzerine etkisi. AGS ve CCD-1079Sk hücreleri farklı konsantrasyonlarda *C. campestris* etanol ekstresi ile 24 saat inkübe edildi ve ATP sitotoksikite testi ile belirlenen yüzde canlılık verileri kontrol (%0,1 DMSO) göre relatif olarak hesaplanmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol göre anlamlı farklılıklar * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ ile AGS ve CCD-1079Sk arasındaki anlamlı farklar ise "a" ile ifade edilmiştir.

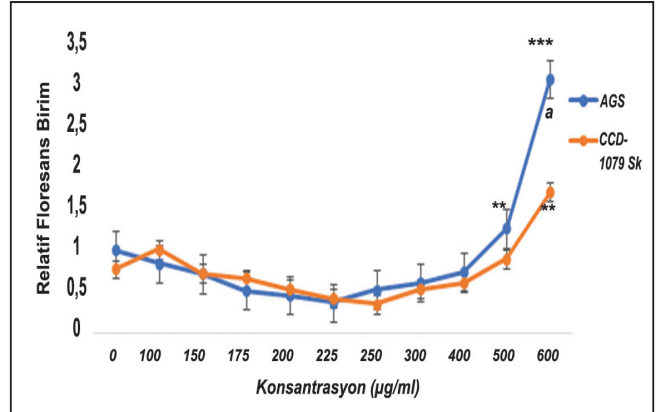
AGC ve CCD hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumunun incelenmesi

AGC ve CCD hücre hatlarında *C. campestris* uygulamasından sonra hücre içi ROS oluşumu floresans probu olarak kullanılan H2DCF-DA ile test edildi. Hücrelerin daha düşük dozlardaki *C. campestris* (100-400 µg / ml) ile 24 saat inkübe edildikten sonra, kanser ve normal hücrelerde hücre içi ROS üretimini azalttığı ($p < 0.001$) ancak, hücreler daha yüksek dozlardaki *C. campestris* (400-600 µg / ml) ile muamele edildiğinde hücre içi ROS üretimini arttırdığı gözlemlendi (Şekil 3). Sonuçlar, konsantrasyona bağlı olarak *C. campestris*'in normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde ROS üretimini artırdığını gösterdi.

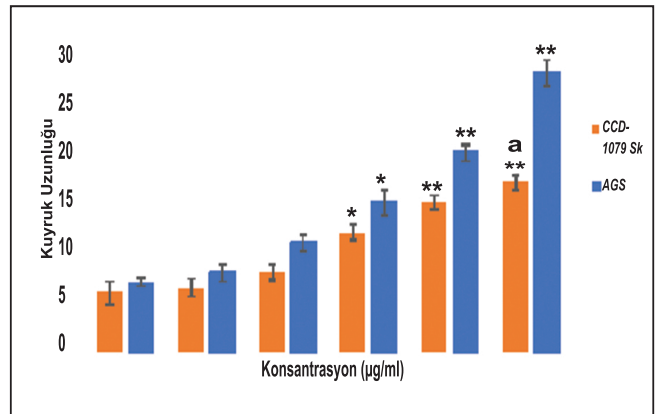
DNA kırığı analizi

Hücreler, farklı konsantrasyonlardaki *C. campestris* ile 24 saat inkübe edildikten sonra genotoksik aktivitelerinin gösteriminde kullanılan Comet analizi için kültür ortamlarından toplandı. Hasarlı DNA'ya sahip hücre

çekirdekleri, parlak başlı bir kuyruklu yıldız görünümüne sahipken, hasar görmemiş DNA'ya sahip çekirdekler kuyuksuz yuvarlak bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi. *C. campestris*'in doza bağımlı bir şekilde AGC hücrelerinde kontrol grubu hücrelere kıyasla DNA hasarını arttırdığı saptandı (Şekil 4-A). Daha yüksek *C. ampestris* dozlarında ise normal hücreler ve kanser hücreleri arasındaki DNA'nın kuyruk yüzdesinde anlamlı değişiklikler bulundu (Şekil 4-B).



Şekil 3. *C. campestris* etanol ekstresinin AGS ve CCD-1079Sk hücreleri üzerindeki hücre içi ROS düzeyine etkisi. *C. Campestris* düşük konsantrasyonlarda hem kanser hem de sağlıklı hücre hatlarının hücre içi ROS düzeyini düşürürken yüksek konsantrasyonlarda artırmıştır. Dozlar kontrol (%0,1 DMSO) göre relatif olarak hesaplanıp yüzde canlılık değerlerine göre normalize edilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol göre anlamlı farklılıklar * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ ile AGS ve CCD-1079Sk arasındaki anlamlı farklar ise "a" ile ifade edilmiştir.

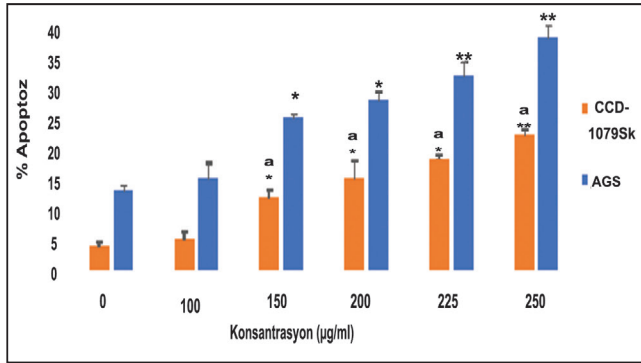


Şekil 4. *C. campestris* etanol ekstresinin AGS ve CCD-1079Sk hücrelerinin DNA hasarına olan etkisi tek hücre jel elektroforezi (Komet assay) ile değerlendirilmiştir. DNA hasarına bağlı olarak artan kuyruk uzunlukları her iki hücre hattında da doz arttıkça artmıştır (Şekil A1,A2). Grafikte sonuçlar yüzde % kuyruk yoğunluğu olarak verilip, ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (B). Kontrol göre anlamlı farklılıklar * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ ile AGS ve CCD-1079Sk arasındaki anlamlı farklar ise "a" ile ifade edilmiştir.

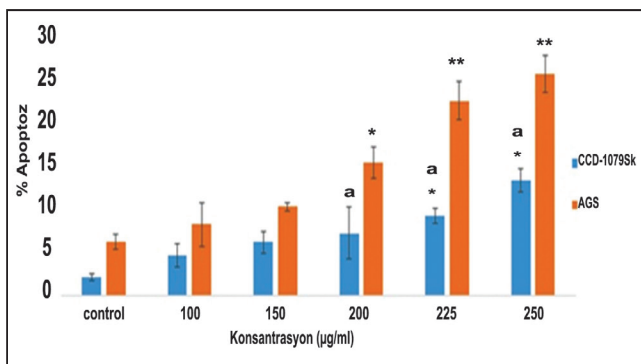
AGC ve CCD hücrelerinde Apoptoz Tayini

C. campestris'in AGC ve CCD-1079Sk hücrelerinin

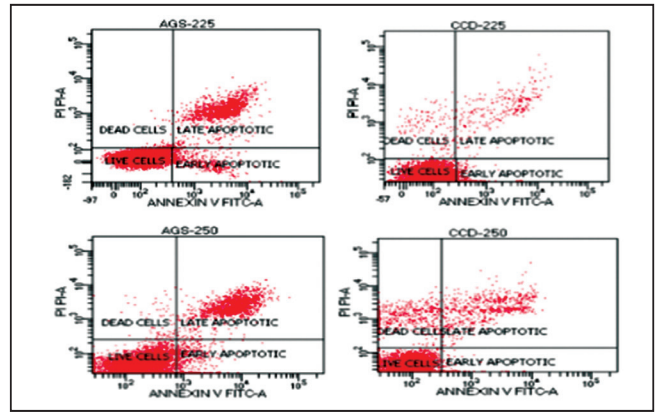
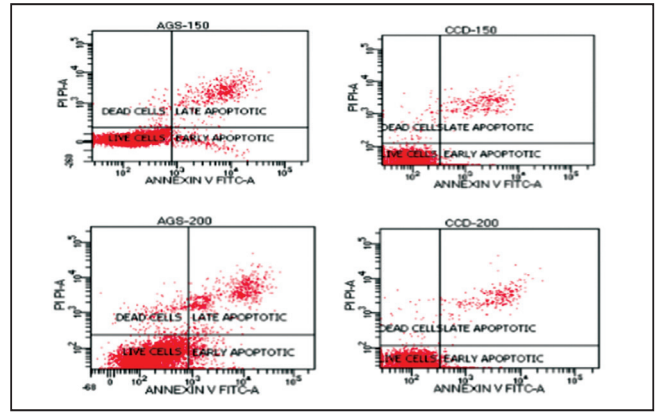
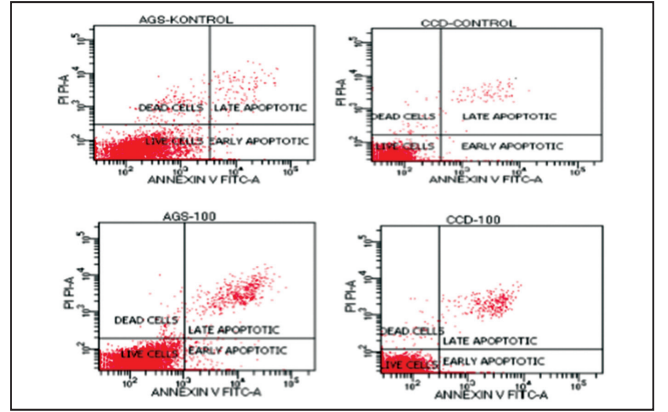
apoptoz üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla hücreler farklı *C. campestris* konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler akrinin oranj / etidyum bromür (AO / EB) ile boyandıktan sonra floresan mikroskopu altında incelendi. *C. Campestris* ekstraktının her iki hücre tipinde de apoptozu indüklediği ancak *C. campestris*'in AGC hücrelerindeki apoptotik etkisinin CCD-1079Sk hücrelerinden önemli ölçüde daha büyük olduğu bulundu (Şekil 5). *C. campestris*'in AGC hücrede apoptozu indüklemesinin tespiti sonrası daha hassas analiz için AGC ve CCD-1079Sk hücreleri Annexin V / PI çift boyama ile akım sitometrisinde incelendi. AGC hücrelerinin, *C. campestris* tedavisine daha duyarlı olduğu ve CCD-1079Sk hücrelerine kıyasla daha yüksek apoptoz seviyesine sahip olduğu akım sitometrisi çalışmaları ile de desteklenmiş oldu (Şekil-6).



Şekil 5. *C. Campestris* etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarının (0-250 µg/ml) 24 saat inkübasyon sonrasında AGS ve CCD-1079Sk hücreleri üzerine olan apoptotik etkisi AO/EB çift boyama metodu ile floresan mikroskop altında değerlendirilmiştir. Yarı kalitatif sayılan hücrelerdeki apoptoz yüzdeleri kontrole rölaf olarak hesaplanmıştır. Her iki hücre hattında da *C. Campestris*'in artan dozları apoptozu indüklemiştir. Veriler ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı farklılıklar *p < 0.05 ve **p < 0.01 ile AGS ve CCD-1079Sk arasındaki anlamlı farklar ise "a" ile gösterilmiştir.

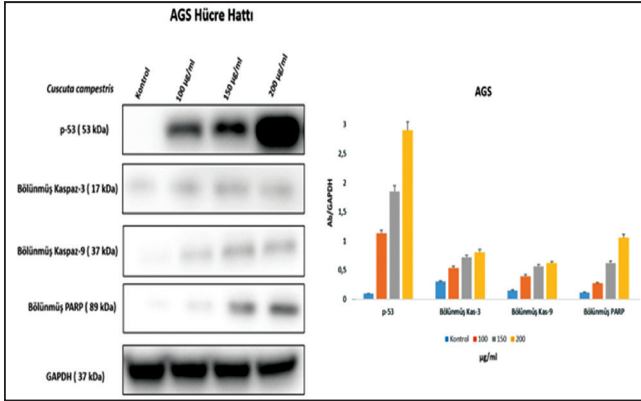


Şekil 6. *C. Campestris* etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarının (0-250 µg/ml) 24 saat inkübasyon sonrasında AGS ve CCD-1079Sk hücreleri üzerine olan apoptotik etkisi akış sitometrisi ile analiz edildi. Akış sitometri verileri değerlendirilip, % apoptoz değerleri kontrole (%1 DMSO) göre rölaf olarak hesaplandı. Her iki hücre hattında da *C. Campestris*'in artan dozları kantitatif olarak apoptozu indüklemiştir. Veriler ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrole göre anlamlı farklılıklar *p < 0.05 ve **p < 0.01 ile AGS ve CCD-1079Sk arasındaki anlamlı farklar ise "a" ile gösterilmiştir.



Western Blot analizi

C. campestris ekstraktı uygulamasıyla AGS hücre hattı üzerinde indüklenen apoptozun kullandığı yolağı anlayabilmek için SDS-PAGE sonrası western blot analize çeşitli apoptotik belirteçler incelendi. Artan konsantrasyonlardaki *C. campestris* uygulamasına bağlı olarak hücrelerdeki P-53, bölünmüş kaspaz-3, bölünmüş kaspaz-9 ve bölünmüş PARP'ın protein ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde artış tespit edildi. (Şekil 7). Kaspaz-3 ve kaspaz-9'un apoptotik aktivasyonundan sorumlu olan bölünmüş kaspaz-3 ve bölünmüş kaspaz-9'un artan doza bağımlı protein seviyeleri, *C. campestris*'in kaspaz 3 ve kaspaz 9 üzerinden apoptotik yolları aktive ettiğini gösterdi.



Şekil 7. *C. Campestris* etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat inkübasyon sonrasında AGS hücrelerinin apoptoz yollarında yer alan proteinlerin (p53, bölünmüş Kas-3, bölünmüş Kas-9, bölünmüş PARP) ekspresyonları üzerine olan etkisi immünoablomata ile gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak %1 DMSO kullanılmıştır. Referans değeri olarak GAPDH ile normalize eden veriler, artan *C. Campestris* konsantrasyonlarının mide kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediğini göstermiştir. Veriler \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

TARTIŞMA

Cuscuta campestris Yuncker (*C. campestris*) (tarla küskütü), (Convolvulaceae familyası), birçok ticari bitki mahsülün yapraksız parazitik bir bitkisidir. Bugüne kadar bu bitki türü, çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (8, 10). *Cuscuta* (*C.reflexa*, *C.chinensis*, *C.australis*, *C.europeaea*) bitkisinin fito-bileşen içeriğini aydınlatmak için yapılan analizler bu bitki türünün flavonoidler ve flavonoller dahil olmak üzere önemli miktarda fenoliklere sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır (8). Diğer *Cuscuta* türleri hakkında da geniş çaplı birkaç araştırma olmasına rağmen, *C. campestris* türü ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Şimdiye kadar Türkiye Anadolu Bölgesi'nden toplanan *C. campestris* bitkisinin fenolik içeriği ile antioksidan aktivitesini gösteren tek bir çalışma yapılmıştır (19). Bu çalışmada, *C. campestris* etanolik özütünün, yüksek oranda daha fazla fenolik ve flavonoid bileşik türü (epigallokateşin gallat, fumarik asit, hiperozid, luteolin-7-o-rutin, nepetin-7-glukozit, kuersetin, rutin) içerdiği gösterilmiştir. Fitokimyasal bileşenlerindeki bu farklılıklar, *Cuscuta* cinsi konakçı bitkilerin çeşitliliğinden ve farklı coğrafi bölgelerden toplanmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (20). Fitokimyasalların antioksidan aktivitesini ölçmek için yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik bir metod olan ABTS'e göre, etanolik özüt ABTS katyonuna karşı %42 temizleyici kapasite göstermiştir. Benzer şekilde literatürdeki birçok çalışma da *Cuscuta* türlerinin antioksidan kapasitesinin %8 ila %5 aralığında olduğunu göstermektedir (20, 21). Ayrıca fenolik bileşiklerin anti-proliferatif etki göstermesini sağlayan pro-oksidan aktivitesi (22) de bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir. Bitki kaynaklı polifenoller hücrelerin redoks durumunu değiştirmelerine rağmen, çalışmalar çoğunlukla pro-oksidan etkileri yerine anti-oksidan etkilerine odaklanmıştır. Kanser hücreleri oksidatif stres indüksiyonuna neden olan yüksek seviyede reaktif oksijen türleri (ROS) ürettikleri için polifenoller gibi hücrede ROS miktarını artıran ajanlara karşı daha du-

yarlıdırlar (23). Bu sayede, tümör hücrelerini seçici bir şekilde öldürmek için pro-oksidan ajanların kullanımı ilham verici bir strateji olarak kabul edilmektedir. *C. campestris* özütümüzün, pro-oksidan özellik gösterdiği konsantrasyonu yaklaşık olarak özütün sitotoksik dozu olan 200 µg / ml civarında bulunmuştur. Sonuç olarak, özütümüzün kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ile pro-oksidan aktivitesi arasında bir korelasyon bulunmuştur. Konya yöresinden elde edilen bu parazit bitkisi için yapılan fitokimyasal profil çalışmalarının sonuçları, yüksek farmakolojik aktivite potansiyeline sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır.

C. campestris'in etanolik özütünün insan mide adenokarsinom hücrelerine olan anti-proliferatif etkisini anlamak için ATP-Glo hücre canlılık deneyi gerçekleştirilmiştir. *C. campestris*'in hücreler ile 24 saatlik inkübasyonunun ardından hücrelerin %50' sini 154 µg/ml konsantrasyonunda inhibe ettiği bulunmuştur. *C.reflexa*, *C. chinensis* ve *C. epithimum* gibi iyi bilinen *Cuscuta* türleri de farklı kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilere sahiptir. Daha önceki yapılan bir çalışmada, *C. chinensis* ve *C. epithimum*'un çözücü tipine bağlı olarak HT-29, Hela ve MDA-MB-468 hücreleri üzerinde değişken bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (24). *C. reflexa* Roxb ise, EAC ve HEP3B karsinom hücreleri için etkili bir sitotoksik ajan olduğu gösterilmiştir (25). Çeşitli tipteki kanser hücreleri için farklı *Cuscuta* türlerinin IC50 konsantrasyonları, bahsedilen çalışmalarda 15-2000 µg / ml arasında bulunmuştur. Türkiye'nin Anadolu bölgesinden toplanan *C. campestris* ile yapılan sitotoksik analizleri de SNU-398 hepatoselüler karsinom hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir (19). Ancak bu sitotoksik etkinin altında yatan hücresel mekanizmalar aydınlatılmamıştır. Ortaya koyduğumuz bu çalışma, *Cuscuta* türlerinden herhangi birinin mide karsinom hücreleri üzerindeki etkisini araştıran ilk çalışmadır. Aynı zamanda bu çalışma *C. campestris*'in AGC hücre hatları üzerindeki yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon verilerini sunan ilk çalışmadır. Bu bulgulara ilaveten, çalışmamızda kullandığımız *C. Campestris* etanolik özütünün kanser hücreleri üzerinde herhangi bir seçiciliğe sahip olup olmadığını kontrol etmek amacıyla insan normal deri fibroblastik hücreleri (CCD-1079Sk) üzerinde de sitotoksik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, *C. campestris*'in normal hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin, mide karsinom hücrelerine nazaran önemli ölçüde hatta yarıdan daha az olduğunu açıkça göstermiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda *C. campestris*'in AGC mide adenokarsinom hücrelerine karşı seçici sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Selvi ve arkadaşları da hazırladıkları bitki özütlerinin kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ancak normal hücre hatlarında (hDF'ler) sitotoksik etki göstermediğini belirtmişlerdir (19).

C. campestris'in etanolik özütünün anti-proliferatif etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için, mide adenokarsinom hücrelerindeki ROS üretim aktivitesi incelenmiş-

tir. *C. campestris*'in 250 µg/ml konsantrasyonuna kadar AGC hücrelerinde ROS oluşumunu azalttığı ancak bu konsantrasyonun üzerinde doza bağlı olarak hücrelerdeki ROS seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. Toplam fenolik içeriklerinin anti-oksidatif etkide rol oynadığı iyi bilinmektedir (26). Ayrıca, bu tür bileşikler, konsantrasyona bağlı olarak pro-oksidan davranış sergilerler ve pH veya geçiş metallerinin varlığı gibi çeşitli çevresel faktörlerden de etkilenirler. Kanser hücreleri oksidatif strese daha duyarlı olduğundan, polifenoller seçici olarak kanser hücrelerini öldürebilir ve kansere özgü apoptozu ve DNA hasarını tetikleyebilmektedirler (27). Bu nedenle, kanser hücrelerinde ROS üretiminin arttırılması, tümör proliferasyonunu inhibe etmek için etkili bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Önceki bir çalışmada, *C. campestris*'in lösemik hücrelerde ROS oluşumunu arttırdığını ve apoptozu indüklediği ortaya koyulmuştur (10). Fakat, *C. campestris*'in kanser ve normal hücrelerde ROS seviyesini nasıl etkilediğini açıklayan başka bir çalışma literatürde mevcut değildir. Elde ettiğimiz sonuçlar, *C. campestris*'in etanolik özütünün doza bağlı bir şekilde kanser hücreleri üzerinde normal hücrelere nazaran daha fazla ROS üretimine ve sitotoksik oksidatif strese neden olduğunu, bu artışın da *C. campestris*'in kanser tedavisi için etkili bir doğal bileşik olabileceğini göstermiştir. Çoğu *Cuscuta* türleri birbiriyle karşılaştırıldığında, *C. campestris*'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin olası mekanizmaları hala ayrıntılı bir şekilde sunulmamıştır. Literatürdeki çalışmalarda, *C. campestris*'in kanser hücre DNA'sına nasıl ve hangi boyutta zarar verdiği araştırılmamıştır. Bu açığın giderilmesi için bu çalışmada, *C. campestris*'in tümör büyümesini nasıl engellediğini göstermek adına kanser hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi araştırılmıştır. Komet analizi olarak bilinen tek hücreli jel elektroforezinin sonuçlarına göre, 150 µg / ml'nin üzerindeki *C. campestris* seviyeleri mide karsinom hücrelerinde önemli ölçüde DNA hasarına neden olmuştur. Bu bulgunun yanı sıra kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla DNA hasarına neden olması sonuçların sadece kansere özgü olduğunu desteklemiştir.

Bugüne kadar, *Cuscuta* türlerinin kanser hücrelerindeki apoptotik etkisini açıklığa kavuşturacak çok az sayıda çalışma yapılmıştır ve henüz *C. campestris*'in kanser hücrelerindeki apoptotik mekanizmasını aydınlatacak herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Apoptoz sırasında hücrede kaspaz aktivasyonu gibi biyokimyasal olaylar, DNA ve protein parçalanması ve membran yapısında birtakım değişiklikler meydana gelir. Özellikle apoptoz aşamasında aktive olan bu kaspazlar birçok proteini, çekirdeği ve hücre iskeletini parçalamakta görev alır. Tüm bunların yanı sıra nükleer DNA'yı bozan DNAaz'ı da aktive ederler (28, 29). Kaspazlar apoptoz mekanizmasının merkezindedir ve kaspazların aktive edebileceği üç yol bulunmaktadır. Bunlar; içsel (mitokondriyal), dışsal (ölüm reseptörü) ve içsel endoplazmik retikulum yolu (30) olarak üç gruba ayrılır. Artmış mitokondriyal geçirgenlik ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınması, içsel yolu başlatır. Sitokrom

c, Apaf-1 ve kaspaz-9'dan oluşan sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3'ün proteolitik enzim aktivasyonu gereklidir, çünkü regüle edilmediği takdirde kaspaz aktivitesi hücreleri gelişigüzel öldürür. (31). DNA hasarına cevap olarak aktifleşen çekirdeğe ait bir enzim olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA iplik kırıklarını tespit eder ve baz kesip çıkarma mekanizmasında görev olarak DNA onarımında rol oynar (32). Literatürde, şimdiye kadar bazı *Cuscuta* türlerinin sinyal iletim yollarına olan etkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır fakat *C. campestris*'i baz alan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmalar esas olarak *C. chinensis* (33-37), *C. australis* (38) ve *C. Semen* 'i baz alarak gerçekleştirilmiştir (39). Bu çalışmada DNA hasarının tamir edilmediği bir durumu işaret eden bölünmüş kaspaz-3, bölünmüş kaspaz-9 ve apoptozu başlatan P53 proteininin ekspresyon seviyesi ile apoptoz sırasında bozulan DNA onarım fonksiyonunun en önemli belirteçleri olan bölünmüş PARP protein ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar, içsel yollar da önemli bir başlatıcı role sahip kaspaz 3 öncüsü olan bölünmüş-kaspaz 3'ün, doza bağlı olarak mide kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermiştir. Kaspaz 9'un öncüsü olan bölünmüş kaspaz-9 da buna benzer sonuçlar göstermiştir. Öte yandan, bilinen önemli bir apoptoz belirteci olan P53'ün ekspresyonu artarken, başka bir apoptoz markörü olan DNA iplik kırıklarını tespit edebilen PARP'in da ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda *C. campestris* özütünün mide kanseri hücreleri ve normal deri fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. *C. campestris*, mide kanseri hücrelerinin büyümesini ROS üretimini arttırması, apoptozu tetiklemesi ve DNA hasarına neden olmasıyla inhibe etmiştir. Ayrıca, kanser ile sağlıklı hücre hatlarının karşılaştırmalı olarak analiz edildiği in vitro çalışmalar, *C. campestris* etanolik özütünün insan mide kanseri hücreleri üzerinde seçici bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu veriler ışığında çalışmamız, *C. campestris* 'in kanser hücreleri üzerindeki etkisini en detaylı bir şekilde sunan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Çıkar çatışmaları: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Etik Beyannamesi: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Etik Kurullar Birimi'nin 30.03.2021 tarihli, 06 sayılı Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul yazısı ile çalışmanın Etik Kurul onayına gerek olmadığına karar verilmiştir.

Yazarların Katkıları

Çalışmanın planlanması: Huri Bulut, Ezgi Durmus, Abdürrahim Koçyiğit

Deneyisel sonuçların eldesi: Huri Bulut, Ezgi Durmus, Ebru Haciosmanoğlu, Kübra Bozali, Hilal Şentürk

Deneysel verilerin yorumlanması: Huri Bulut, Ezgi Durmus, Ebru Haciosmanoğlu, Abdürrahim Koçyiğit
Makale yazımı: Huri Bulut, Ezgi Durmus, Ebru Haciosmanoğlu, Abdürrahim Koçyiğit
Literatür taraması: Huri Bulut, Ezgi Durmus, Kübra Bozali, Hilal şentürk

KAYNAKLAR

- 1.) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:7-30.
- 2.) Herszenyi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010;14:249-58.
- 3.) Kotecha R, Takami A, Espinoza JL. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget.* 2016;7:52517-29.
- 4.) İlhan K, Nemli Y, Demir İ. Türkiye’de tarım ve tarım dışı alanlarda görülen küsküt türlerinin (*Cuscuta* spp.) taksonomik özellikleri, dağılışları ve konukçuları. *Türkiye Herboloji Dergisi.* 2018;21:1-7.
- 5.) Ahmad A, Tandon S, Xuan TD, et al. A Review on Phytoconstituents and Biological activities of *Cuscuta* species. *Biomed Pharmacother.* 2017;92:772-95.
- 6.) Othman MR. Corak taburan spatial serta potensi allelopati *Cuscuta campestris* Yuncker di Semenanjung Malaysia: University of Malaya, Faculty of Biology, Master of Science Thesis, Kuala Lumpur, Malaysia, 2013.
- 7.) Ferraz HO, Silva MG, Carvalho R, et al. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cuscuta racemosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2011;21:41-6.
- 8.) Agha AM, Sattar EA, Galal A. Pharmacological study of *Cuscuta campestris* Yuncker. *Phytotherapy Research.* 1996;10:117-20.
- 9.) Sepehr MF, Jameie SB, Hajijafari B. The *Cuscuta kotschyana* effects on breast cancer cells line MCF7. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2011;5:6344-51.
- 10.) Moradzadeh M, Hosseini A, Rakhshandeh H, et al. *Cuscuta campestris* induces apoptosis by increasing reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Avicenna J Phytomed.* 2018;8:237-45.
- 11.) Shahidi F, Nacz M, Griffiths W. Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications. *Trends in Food Science and Technology.* 1996;7:243.
- 12.) Eom SH, Park HJ, Jin CW, et al. Changes in antioxidant activity with temperature and time in *Chrysanthemum indicum* L.(Gamguk) teas during elution processes in hot water. *Food Science and Biotechnology.* 2008;17:408-12.
- 13.) Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
- 14.) McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol.* 1995;46:153-85.
- 15.) Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. In: Walker JM; eds. *The protein protocols handbook.* 3rd ed. New Jersey: Humana Press;2009.p.17-24.
- 16.) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research.* 1988;175:184-91.
- 17.) Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: JE Coligan, BE Bierer, DH Margulies, EM Shevach, and W. Strober; eds. *Current Protocols in Immunology.* New York: John Wiley & Sons; 2015.p. A3.B.1-A3.B.3
- 18.) Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis.* 2003;18:45-51.

- 19.) Selvi EK, Turumtay H, Demir A, ve ark. Phytochemical profiling and evaluation of the hepatoprotective effect of *Cuscuta campestris* by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Analytical Letters.* 2018;51:1464-78.
- 20.) Noreen S, Noreen S, Ghuman SA, et al. The genus *Cuscuta* (Convolvaceae): An updated review on indigenous uses, phytochemistry, and pharmacology. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22:1225-52.
- 21.) Jakovljevic VD, Vrvic MM, Vrbnicanin S, et al. Phytochemical, Free Radical Scavenging and Antifungal Profile of *Cuscuta campestris* Yunck. *Seeds. Chem Biodivers.* 2018;15:e1800174.
- 22.) Akyuz E, Baskan KS, Tutem E, ve ark. Novel Protein-Based Solid-Biosensor for Determining Pro-oxidant Activity of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* 2017;65:5821-30.
- 23.) Martin-Cordero C, Jose Leon-Gonzalez A, Manuel Calderon-Montano J, et al. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Current drug targets.* 2012;13:1006-28.
- 24.) Jafarian A, Ghannadi A, Mohebi B. Cytotoxic effects of chloroform and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Cuscuta chinensis* and *Cuscuta epithymum* on Hela, HT29 and MDA-MB-468 tumor cells. *Res Pharm Sci.* 2014;9:115-22.
- 25.) Suresh V, Sruthi V, Padmaja B, et al. In vitro anti-inflammatory and anti-cancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. *J Ethnopharmacol.* 2011;134:872-7.
- 26.) Foti MC. Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59:1673-85.
- 27.) Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys.* 2010;501:65-72.
- 28.) Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2665-72.
- 29.) Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237-43.
- 30.) O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.* 2008;18:572-85.
- 31.) Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87:99-163.
- 32.) Isabelle M, Morel X, Gagne JP, et al. Ethier C, Gagne P, et al. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci.* 2010;8:22.
- 33.) Ding JX, Li WL, Hu Y, et al. Characterization of estrogenic active ingredients in *Cuscuta chinensis* Lam. based on spectral characteristics and highperformance liquid chromatography/quadrupole timeofflight mass spectrometry. *Mol Med Rep.* 2019;19:1238-47.
- 34.) Wu HW, Feng YH, Wang DY, et al. Effect of Total Flavones from *Cuscuta Chinensis* on Anti-Abortion via the MAPK Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;18:6356190.
- 35.) Mo H, Zhang N, Li H, et al. Beneficial effects of *Cuscuta chinensis* extract on glucocorticoid-induced osteoporosis through modulation of RANKL/OPG signals. *Braz J Med Biol Res.* 2019;52:e8754.
- 36.) Pang SC, Peng L, Zhang JP, et al. Bushenkangshuai Tablet Reduces Atherosclerotic Lesion by Improving Blood Lipids Metabolism and Inhibiting Inflammatory Response via TLR4 and NFkB Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2018;2018:1758383.
- 37.) Bae WJ, Zhu GQ, Choi SW, et al. Antioxidant and Antifibrotic Effect of a Herbal Formulation in vitro and in the Experimental Andropause via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:6024839.
- 38.) Yang S, Xu X, Xu H, et al. Purification, characterization and biological effect of reversing the kidney-yang deficiency of polysaccharides from semen *cuscutae*. *Carbohydrate Polymers.*

2017;175:249-56.

Cuscutae target MMP9 and promote invasion of EVT cells via

39.) Gao F, Zhou C, Qiu W, et al. Total flavonoids from Semen

Notch/AKT/MAPK signaling pathways. Sci Rep. 2018;8:17342.

Ankara Eğt. Arş. Hast. Derg. (Med. J. Ankara Tr. Res. Hosp.), 2021 ; 54(2) : 271-280

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Etik Kurullar Birimi'nin 30.03.2021 tarihli, 06 sayılı Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul yazısı ile çalışmanın Etik Kurul onayına gerek olmadığına karar verilmiştir.