



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Ekstraktının Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Antioksidatif ve Antikarsinojenik Etkileri

 Güllü KAYMAK<sup>a,b\*</sup>,  Meliha Koldemir-Gündüz<sup>b,c</sup>,  Ertan Kanbur<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup> Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Simav Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kütahya, TÜRKİYE

<sup>b</sup> Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kütahya, TÜRKİYE

<sup>c</sup> Temel Bilimler Bölümü, Doğa Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kütahya, TÜRKİYE

<sup>d</sup> Nanothera Lab, İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERFARMA), Erciyes Üniversitesi, Kayseri, TÜRKİYE

<sup>e</sup> Klinik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (ERKAM), Erciyes Üniversitesi, Kayseri, TÜRKİYE

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: gullu.kaymak@ksbu.edu.tr

DOI: 10.29130/dubited.1162385

### ÖZ

Çağımızın en yüksek ölüm oranına sahip sağlık sorunlarından biri olan kanser vakalarının önlenmesi için yeni ve etkili tedavi stratejileri geliştirmeye yönelik araştırmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen özütler, uçucu yağlar ve biyoaktif bileşenler daha az yan etki ile etkin tedavi sunma potansiyelindedir. Bu çalışmanın amacı, menengiç meyvesinin ekstraktının hepatoselüler karsinom hücrelerinde (HepG2) oksidatif stres, sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemektir. Sağlıklı karaciğer epitel hücreleri (ZFL) ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak bu ekstraktın kanser hücrelerine spesifik olup olmadığı değerlendirilmiştir. Literatürde ilk kez yapılan çalışmamızda, soxhlet yöntemi ile menengiç meyvelerinden elde edilen ekstraktın IC<sub>50</sub> dozunu ve süresini belirlemek için iCELLigence sistemi, sitotoksiteyi belirlemek amacıyla MTT yöntemi, apoptoz profilini belirlemek için Annexin V yöntemi kullanılmıştır. Menengiç ekstraktının oluşturabileceği oksidatif hasarın belirlenmesinde; TAS, TOS, GSH ve lipid peroksidasyon seviyeleri ile NADP-IDH, katalaz, alkalen fosfatase ve asit fosfatase enzim aktivitesi analizleri spektrofotometrik yöntemlerle yapılmıştır. iCELLigence sistemi ile yapılan analiz sonucunda menengiç ekstraktının HepG2 hücrelerindeki 48 saatlik IC<sub>50</sub> dozu 419 µg/mL olarak bulunmuştur. Sitotoksikite analizi ile menengiç ekstraktının HepG2 hücrelerinde ZFL hücrelerine kıyasla daha öldürücü olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde HepG2 hücrelerinde 6 saatte gözlenen apoptotik ve ölü hücre sayısı ZFL hücrelerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Oksidatif hasarı belirlemek için yapılan analizlerde ZFL hücrelerinde gözlenen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, HepG2 hücrelerinde hem kontrol grubuyla hem de ZFL hücrelerine kıyasla belirgin oksidatif hasar gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, kanser tedavisinde yeni ajanlar geliştirilmesi yönündeki çalışmalara kaynak oluşturabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, Karaciğer, Sitotoksikite, Apoptoz, Oksidatif stres, Menengiç.

## Antioxidative and Anticarcinogenic Effects of Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) Extract on Hepatocellular Carcinoma Cells

### ABSTRACT

In recent years, cancer research; It is one of the most important health problems of our age with its high mortality rate and incidence. In addition to existing treatment systems, it is vital to develop effective treatment strategies for

the prevention of increasing cancer cases. Extracts from plants, essential oils, and bioactive components; Due to their natural origin, they have the potential to provide effective treatment with fewer side effects. The aim of this study was to examine the oxidative stress, cytotoxic and apoptotic effects of the extract of terebinth in hepatocellular carcinoma cells (HepG2). The results obtained with healthy liver epithelial cells (ZFL) were compared and it was evaluated whether this extract was specific to cancer cells. In our study, which was conducted for the first time in the literature, the iCELLigence system was used to determine the IC50 dose and duration of the extract obtained from terebinth by the soxhlet method, the MTT method to determine the cytotoxicity, and the Annexin V method to determine the apoptosis profile. In determining oxidative damage caused by terebinth extract; TAS, TOS, GSH, and lipid peroxidation levels and NADP-IDH, catalase, alkaline phosphatase, and acid phosphatase enzyme activities were analyzed by spectrophotometric methods. As a result of the analysis with the iCELLigence system, the 48-hour IC50 dose of terebinth extract in HepG2 cells was found to be 419 µg/mL. By cytotoxicity analysis, it was observed that the terebinth extract was more lethal in HepG2 cells compared to ZFL cells. Likewise, it was observed that the number of apoptotic and dead cells observed in HepG2 cells at 6 hours was higher than in ZFL cells. While the results observed in ZFL cells were not statistically significant in the analyzes performed to determine oxidative damage, significant oxidative damage was observed in HepG2 cells compared to both the control group and ZFL cells. The findings will be a source for studies on the development of new agents in cancer treatment.

**Keywords:** Cancer, Liver, Cytotoxicity, Apoptosis, Oxidative stress, Terebinth.

## **I. GİRİŞ**

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.), ülkemizin neredeyse tamamında doğal olarak yetişen sakız ağacıgiller ailesine ait bir ağaçtır [1]. Dünyanın bazı yerlerinde bu bitkinin çiçek, kök, yaprak, meyve ve kabuk gibi çeşitli kısımları, farklı amaçlar için, birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadır [2-5]. Güzel kokulu reçinesi parfümlerde sıklıkla kullanılmaktadır [6]. Menengiçin antioksidan özellikleri, sabit yağ miktarı ve yağ asidi bileşenleri, fenolik maddeleri, uçucu yağ miktarı ve bileşenleri ile tokoferol içeriğinin yanı sıra çeşitli hastalıklara etkileri birçok çalışma ile ele alınmıştır [7-11]. Antik çağlardan beri bitkilerden yapılan ilaçlar terapötik ajanlar olarak diyabetten kansere kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda kanser, insanoğlunun savaştığı en önemli hastalıklardan biri haline gelmiştir. Kanser tedavisinde ilaçların yan etkilerinin fazla olması nedeniyle, bitkisel ilaçlar kullanılarak bu yan etkilerin indirgenmesi ile ilgili son yıllarda artan sayıda araştırma yapılmıştır [12-14].

Karaciğerde gerek iyi gerek kötü huylu birincil tümörlere, kendini yenileme gücü yüksek bir organ olduğundan nadiren görülür. Buna karşılık metastaz ile gelişen tümörler sık görülür. Hepatoselüler karsinoma, karaciğerin fonksiyonel hücresi olan hepatositten kaynaklanır ve karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Karaciğer kanseri kemoterapiye dirençli bir kanser türüdür [15]. Karaciğer kanseri çoğunlukla erkeklerde görülen bir hastalıktır. Hepatit ve siroza sık rastlanılan bölgelerde daha çok görülen bir kanser türüdür. Hedefe yönelik tedavi ilaçları, bölgedeki damarlanmayı önleyip tümörün büyümesi ve yayılmasını engelleyerek etki göstermektedir. Ancak bu ilaçların yan etkileri yararlarından daha fazladır. Bu nedenle yan etkileri az, bitkisel kökenli, etkin, yeni ilaçların geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir.

Bu çalışmanın amacı, menengiç meyvesinin ekstraktının hepatoselüler karsinom hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve oksidatif strese olan etkilerini incelemektir. Sağlıklı karaciğer epitel hücreleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak bu ekstraktın kanser hücrelerine spesifik olup olmadığı değerlendirilmiştir.

## **II. MATERYAL VE METOD**

### **A. HÜCRE KÜLTÜRÜ**

Çalışmada kullanılan HepG2 (ATCC: HB-8065) hücreleri, EMEM +%10 Fetal Bovin Serum (FBS)+ penisilin ve streptomisin içeren steril besi yeri ile konvansiyonel hücre kültürü şartlarında (37°C'de %5 CO<sub>2</sub>) kültüre edildi. Sağlıklı karaciğer hücresi olarak kullanılan ZFL (ATCC: CRL-2643) hücreleri, %50

L-15, %35 DMEM-HG, %15 Ham's F12 medyumlarına ek olarak, 0.15 g/L sodyum bikarbonat, 15 mM HEPES, 0.01mg/ml bovin insülin, 50 ng/ml EGF, %5 ısıyla inaktive edilmiş FBS, %0.5 Trout serum eklenen besi yerinde 28°C'de çoğaltıldı.

## **B. MENENĞİÇ EKSTRAKSİYONU**

Çok sayıda sağlıklı yağ asidi bileşenlerine sahip menengiç meyveleri, yüzey sterilizasyonu için %0.05 NaOCl ile yıkandı. Daha sonra steril distile su ile yıkanarak NaOCl uzaklaştırıldı. Kurutma işleminden sonra aseptik koşullarda toz haline getirilen menengiç meyveleri 10 gr tartılarak 150 mL etanolde ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri Soxhlet cihazında gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sonrasında petrolere alınan çözeltiler çeker ocak altında tutularak etanol uçuruldu. Uzaklaştırma işleminin ardından petroler +4°C de muhafaza edildi. Deneyler için 10 mg menengiç ekstraktı 1 mL DMSO içinde çözülürülerek kullanıldı.

## **C. GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE IC<sub>50</sub> DOZU HESAPLAMA**

Hücre kültürü çalışmaları ile çoğaltılan HepG2 hücrelerine menengiç ekstraktının IC<sub>50</sub> dozunu belirlemek için yapılacak analizlerde kullanılacak hücre sayısının belirlenmesi işlemi Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi iCELLigence™ (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Hemositometre ile sayılan hücreler sırasıyla kuyucuklarda 100000, 50000, 25000, 12500, 6300, 3100 ve 1600 hücre/mL olacak şekilde ekildi. Her bir kuyucukta toplamda 300 µL besi yeri olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Ölçümler tamamlanınca, analiz grafiği değerlendirildi. Değerlendirme hücrelerin zamana bağlı çoğalma indeksine göre yapıldı. Sonuç olarak, çalışma için menengiç ekstraktının 48 saat uygulanmasına ve HepG2 hücrelerinin sayısının 50000 olmasına karar verildi. IC<sub>50</sub> değerini belirlemek için, her kuyucukta 50000 hücre iCELLigence E-platelere ekilerek ortama artan konsantrasyonlarda (50, 100, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL) ekstrakt eklenerek ve 96 saat boyunca ve 15 dk.'lık periyotlarda ölçümler alındı.

## **D. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ**

Belirlenen IC<sub>50</sub> değerinin HepG2 ve ZFL hücrelerindeki sitotoksitesitesi MTT [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak yapıldı [16]. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edildi. Veriler, GraphPad Prism 5.0 programı (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, ABD) ile analiz edilerek grafik oluşturuldu. Menengiç uygulaması sonucunda hücrelerin canlılık oranları, kontrol hücrelere kıyasla hesaplandı. Kontrol hücrelerin yaşamsallığı %100 kabul edildi ve hücrelerin canlılık yüzdeleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

% canlılık oranı: (Tedavi edilen hücre/ tedavi edilmemiş hücre)X100

## **E. OKSİDATİF STRES PARAMETRE ANALİZLERİ**

Deneyler her grupta 10 numune, her bir numunede 1.10<sup>6</sup> canlı hücre olacak şekilde yapıldı. Antioksidan enzim aktivite analizleri için hücreler homojenize edildikten sonra soğutmalı santrifüj ile pellet ve süpernatant ayrılarak analizlerde kullanılmak üzere süpernatant alındı. Total Antioksidan Seviyesi (TAS), Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve karaciğer hastalıklarında özellikle kanserde tanımlayıcı olan NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase (NADP-IDH) enzim aktivitesi Rel Assay marka ticari kitler (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü [17-19].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, H<sub>2</sub>O'ya dönüşüm reaksiyonunu Katalaz enzimi katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'deki absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk.'daki absorbanstaki azalma ile enzim aktivitesi belirlendi [20]. Alkalen fosfataz (ALP) enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenil fosfatı pH'sı 9.8 olan ortamda p-nitrofenol'a hidroliz etmektedir. Meydana gelen ürünün 405 nm de verdiği absorbans spektrofotometrik olarak değerlendirilerek enzim aktivitesi ölçüldü [21]. Asit fosfataz (ACP) enzim

aktivitesi ise p-nitrofenil fosfatı pH'sı 4.8 olan ortamda p-nitrofenol'a hidroliz ederken meydana gelen ürünün 405 nm de verdiği absorbans spektrofotometrik olarak değerlendirildi [21].

MDA, lipid peroksidasyonu ürünüdür. Analizi Ledwozyw ve ark., (1986) yöntemine göre, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonunda oluşan pembemsi rengin absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile yapıldı [22].

DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile glutatyonda bulunan sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürünün spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi ile Total glutasyon (GSH) seviyesi belirlendi [23].

## **F. APOPTOZ ANALİZİ**

HepG2 ve ZFL hücrelerinde apoptoz analizi, Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (cat. no: MCH100105, Luminex Corporation) ile Muse Cell Analyzer cihazında yapıldı. Hücreler, 6 well-plate'e, her bir kuyucukta 250000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra ekstrakt muamelesine başlandı. Apoptoz deneyinde hücreler, 200, 400, 600 ve 800 µg/mL menengiç ekstraktı ile 6 saat boyunca muamele edildi.

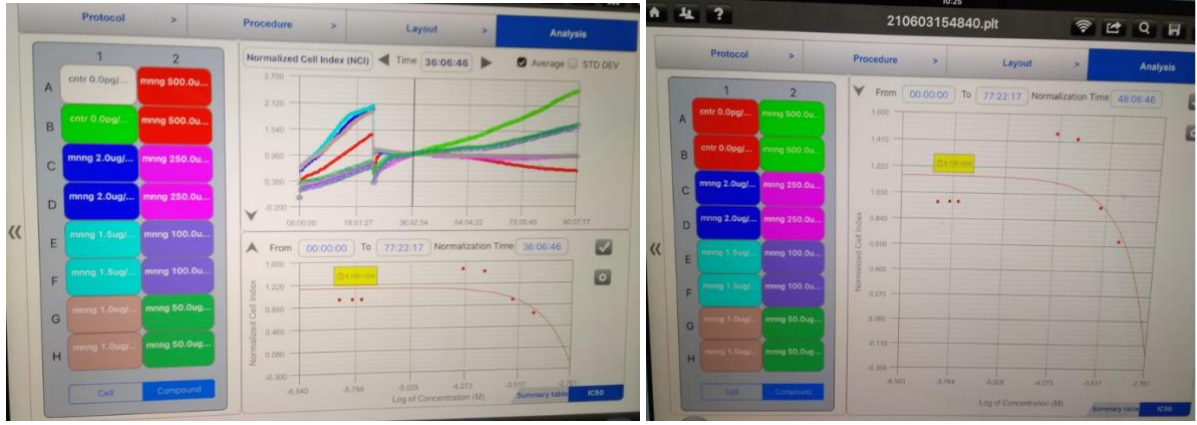
## **G. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistic 23 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Çalışma bulguları ortalama±standart hata (SH) şeklinde ifade edildi. İki grup karşılaştırmalar parametrik Student's t-testi ve eşit olmayan varyanslarda nonparametrik Mann-Whitney U testi ile ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar ise tek yönlü ANOVA; istatistiki olarak anlamlı sonuçlarda ANOVA'yı takiben gruplar arası anlamlı farkı karşılaştırmak için Tukey's post-hoc testi yapıldı.  $p < 0.05$  den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

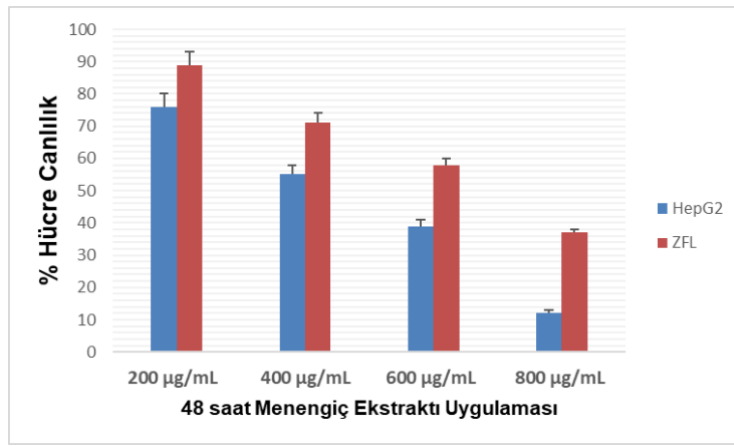
## **III. BULGULAR VE TARTIŞMA**

Hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan çok çeşitli kanser tipleri içinde karaciğer kanseri, en sık görülen beşinci kanser türü ve kanser kaynaklı ölümlerin ikinci nedenidir. Obezite ve obezite ilişkili diyabet, metabolik sendrom, alkol dışı nedenli karaciğer yağlanması gibi hastalıkların, karaciğer kanserinin temel etmenlerinden biri olduğu bilinmektedir. Bu hastalıkların gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda çoğalması, gelecekte karaciğer kanserinin oluşturacağı global sağlık tehdidini daha net ortaya çıkarmaktadır [15].

Farklı dozlarda menengiç ekstraktının 48 saat uygulanması sonucunda HepG2 hücrelerinin yarısını öldüren doz ( $IC_{50}$ ), kullanılan iCELLigence cihazının yazılımı ile otomatik olarak 419 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Elde edilen bu sonuç, menengiç ekstraktının hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bilgiden yola çıkarak hem HepG2 hemde ZFL hücrelerine 200, 400, 600 ve 800 µg/mL menengiç ekstraktı uygulanıp 48 saat sonunda MTT sitotoksisite testi gerçekleştirildi. Elde edilen kontrol değerleri ile kıyaslandığında hücre canlılığı; HepG2 hücrelerinde sırasıyla %76; %55; %39 ve %12, ZFL hücrelerinde ise %89, %71, %58 ve %37 olarak tespit edildi. (Şekil 2).

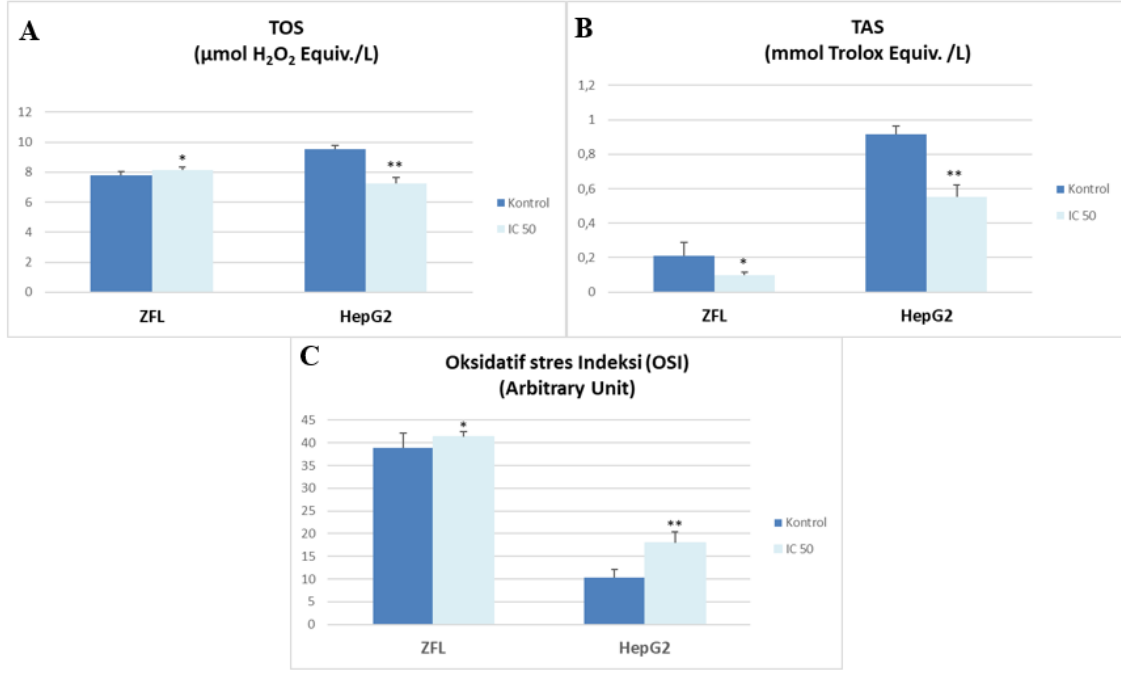


Şekil 1. iCELLigence sistemi ile menengiç ekstraktlarının hücrelerdeki IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi.



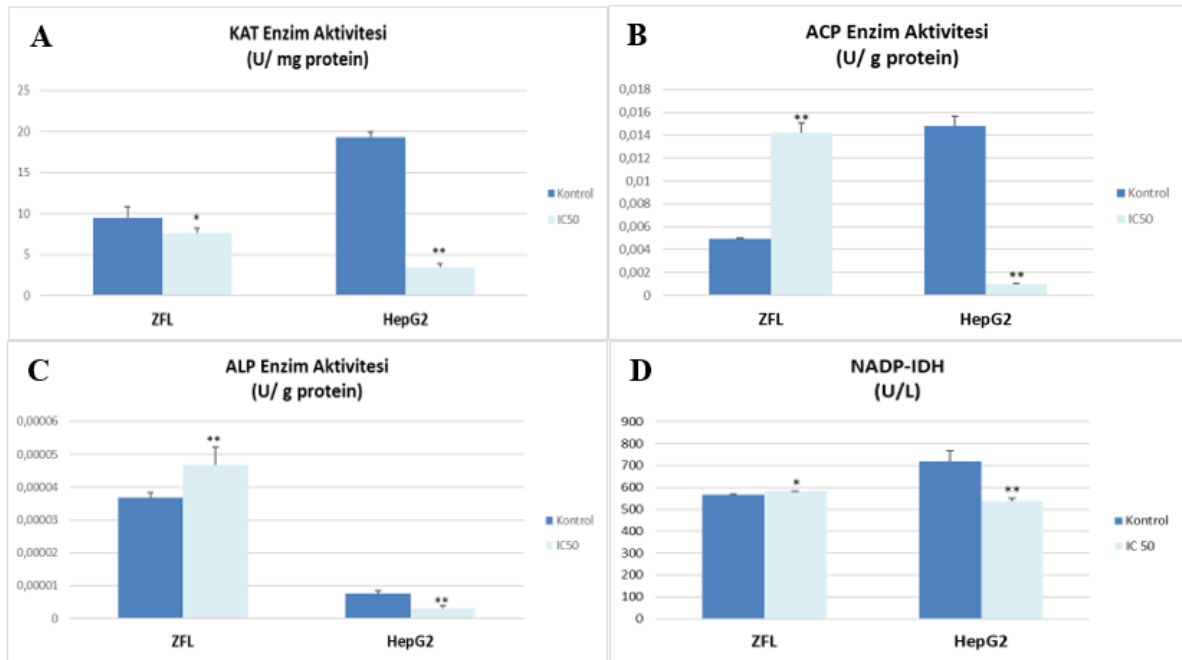
Şekil 2. 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL ve 800 µg/mL menengiç ekstraktı uygulamasının 48 saat sonunda HepG2 ve ZFL hücrelerine sitotoksik etkileri.

Belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin HepG2 ve ZFL hücrelerindeki oksidatif stres parametrelerine etkisini değerlendirmek için Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Total antioksidan seviyesi (TAS) analizleri yapıldı. Menengiç ekstraktına 48 saat maruziyet sonucunda ZFL hücrelerinde TOS değerinde gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p>0,05$ ) (Şekil 3A). HepG2 hücrelerinde ise kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p<0,05$ ). TAS değerlerinde gözlenen düşüş ise ZFL hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ( $p<0,05$ ), HepG2 hücrelerinde anlamlıdır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3B). Elde edilen TOS ve TAS analiz değerlerinin oranlanmasıyla elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSI) sonuçlarına göre HepG2 hücrelerinde oldukça fazla artış görüldü ( $p<0,05$ ) (Şekil 3C).



**Şekil 3.** HepG2 ve ZFL hücrelerine 48 saat IC50 menengiç ekstraktının uygulanması sonrası, **A**) Total Oksidan Seviyesi (TOS), **B**) Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve **C**) Oksidatif Stres İndeksi (OSI) değerleri. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar \*( $p > 0,05$ ) ve \*\*( $p < 0,05$ ) ile gösterilmiştir.

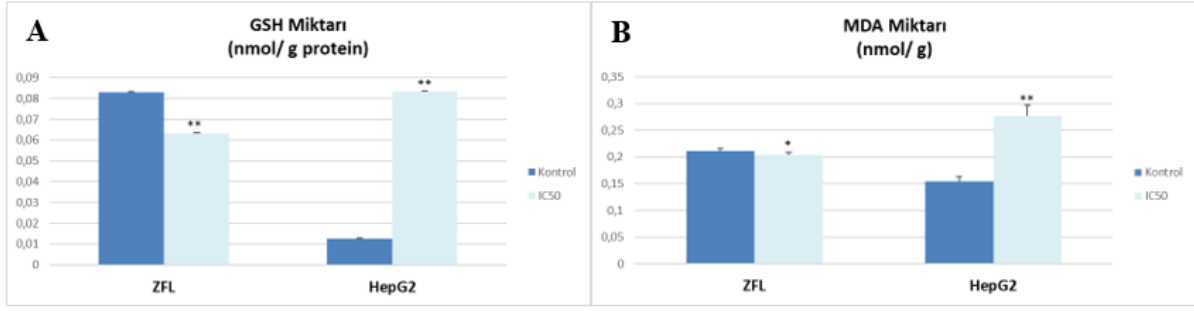
Antioksidan savunma mekanizmasında yer alan önemli enzimlerden biri olan katalaz, hidrojen peroksiti substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalayan peroksidazlardan biridir. Aşırı serbest oksijen radikali. üretiminin KAT aktivitesini inhibe edebildiği bilinmektedir. KAT enzim aktivitesi HepG2 hücrelerinde önemli miktarda azalma gösterdi ( $p < 0,05$ ). Buna karşın ZFL hücrelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4A). ACP ve ALP enzim aktivitesi analizleri sonucu ZFL hücrelerinde her iki enzim aktivitesinin arttığı, ancak HepG2 hücrelerinde azaldığı belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4B ve Şekil 4C). NADP-IDH enzim aktivitesinde HepG2 hücrelerinde anlamlı düşüş gözlenirken ( $p < 0,05$ ), ZFL hücrelerinde gözlenen artış istatistiksel olarak önemli değildir ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4D).



**Şekil 4.** HepG2 ve ZFL hücrelerine 48 saat IC<sub>50</sub> menengiç ekstraktının uygulanması sonrası, **A)** Katalaz (KAT), **B)** Asit fosfataz (ACP), **C)** Alkalen fosfataz (ALP) ve **D)** NADP-IDH enzim aktivitesi analizleri. . Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar \*( $p>0,05$ ) ve \*\*( $p<0,05$ ) ile gösterilmiştir.

Bitkilerdeki sekonder metabolitlerin en önemli sınıflarından biri olan polifenolik bileşikler, kuvvetli antioksidan özelliğe sahiptirler [24]. Bu bileşiklerin antioksidan etkileri; reaktif oksijen türlerini elektron vererek indirmek, ağır metal iyonlarını şelatlamak, antioksidan olarak görev yapan ve detoksifikasyonda görev alan enzimleri uyarmak olarak bilinmektedir. Polifenollerin bu özelliklerinden dolayı antimutajenik, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve anti-aterosklerotik etkileri olduğu bildirilmektedir [25]. Menengiç meyvesi ve reçinesinin içerdiği fenolik bileşikler ve flavonoidler ile antioksidan aktiviteler arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir [26]. Durak ve Uçak (2015) menengiç özütünün güçlü biyoaktif ve antimikrobiyal özelliklerini doğrulamış ve çeşitli uygulamalar için potansiyellerini gösteren yağ asidi profillerini belirlemişlerdir [27]. Menengiç ekstraktı uygulaması sonrası HepG2 hücrelerinde enzim aktivitelerinin inhibe olduğu gözlenmiştir.

Glutasyon (GSH), serbest oksijen radikallerine bağlanarak zararını indirgeyen antioksidan savunmada görevli önemli bir aminoasittir. Hücre içindeki GSH miktarı hücre metabolizmasının korunmasında önemlidir. Canlının detoksifikasyon kabiliyetini belirlemede önemli bir indikatör olarak GSH miktarları analiz edilir. Serbest radikallerin artmasına bağlı stres durumlarında GSH miktarı azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda ise adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere GSH miktarının arttığı belirlenmiştir [28]. Özellikle hücre zarı gibi lipid tabakalarının bulunduğu hücre bölümlerinde, serbest radikallerin oksidatif hasarı sonucu lipid peroksidasyonu oluşabilir. Yüksek MDA miktarı, lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Antioksidanların koruyucu etkisine bağlı olarak lipid peroksidasyonu miktarı değişebilmektedir. Yapılan analizler sonucu HepG2 hücrelerinde menengiç uygulaması sonrasında enzim aktivitelerinde ve GSH miktarındaki azalmaya karşın MDA miktarındaki artış hücrelerdeki oksidatif hasarı göstermektedir. 48 saat süre ile menengiç ekstraktı uygulanan HepG2 hücrelerinde GSH miktarı kontrole oranla önemli miktarda artarken ( $p<0,05$ ); ZFL hücrelerinde azalmıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 5A). Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olan MDA miktarı HepG2 hücrelerinde artış gösterirken ( $p<0,05$ ), ZFL hücrelerinde gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0,05$ ) (Şekil 5B).

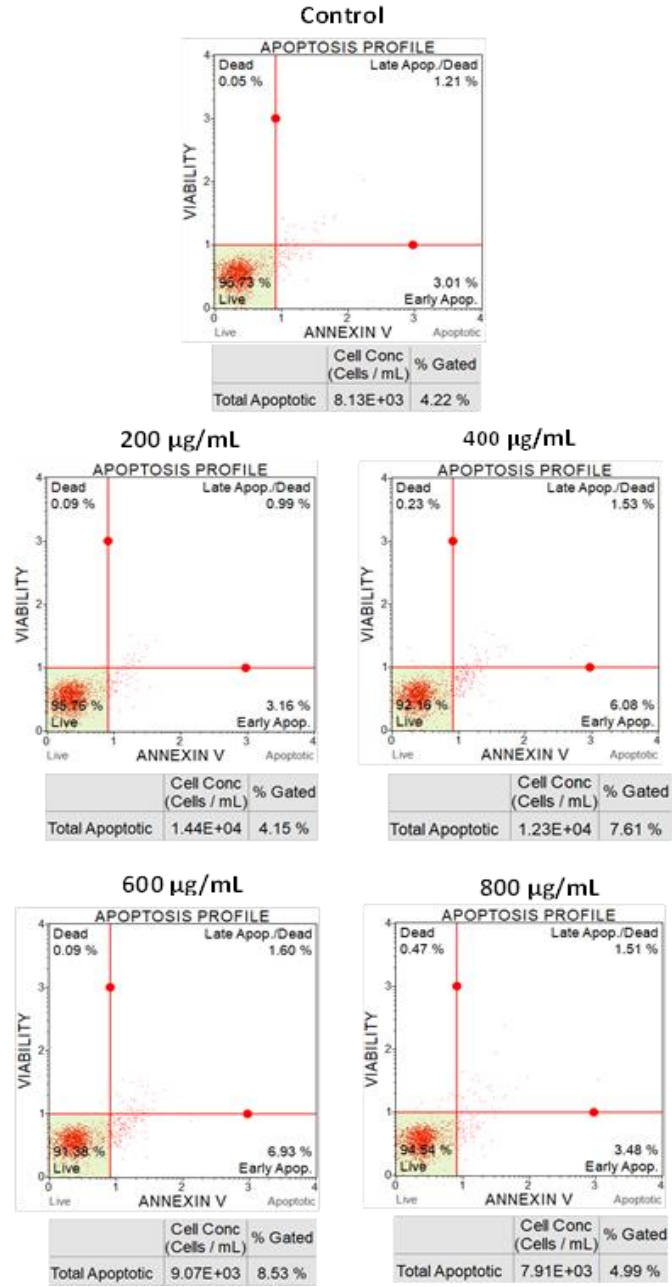


**Şekil 5.** HepG2 ve ZFL hücrelerine 48 saat IC50 menengiç ekstraktının uygulanması sonrası, (A) Total Glutasyon (GSH) ve (B) Malondialdehit (MDA) miktarı değerleri. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar \*( $p>0,05$ ) ve \*\*( $p<0,05$ ) ile gösterilmiştir.

Menengiç ekstraktı'nın apoptotik potansiyeli, canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin tanımlanmasına izin veren akış sitometrisi ile ölçüldü. Apoptotik etkiyi göstermek için hücreler, 200, 400, 600 ve 800 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edildi. 6 saat boyunca menengiç ekstraktı uygulanan ZFL hücreleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, canlı hücrelerin yüzdesinde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bununla birlikte, 400 µg/mL ve 600 µg/mL menengiç uygulaması toplam apoptozu yaklaşık 1.5-2 kat arttırmıştır. 6 saatlik 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL ve 800 µg/mL menengiç uygulaması ile erken apoptoz sırasıyla %3.16, %6.08, %6.93 ve %3.48 iken, kontrol hücrelerinde %3.01 gözlemlendi (Şekil 6). Aynı şekilde 6 saat süre ile 200, 400, 600 ve 800 µg/mL menengiç ekstraktı konsantrasyonuna maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde erken apoptoz oranları sırasıyla %1.19, %2.12, %3.13, %2.2 iken, kontrol hücrelerinde %1.29 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 7). Ancak HepG2 hücrelerinde geç apoptoz ve ölü hücrelerin oranı, ZFL hücrelerinde belirlenenlere kıyasla oldukça fazladır. Bu sonuçlar, menengiç ekstraktının hepatoselüler karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir.

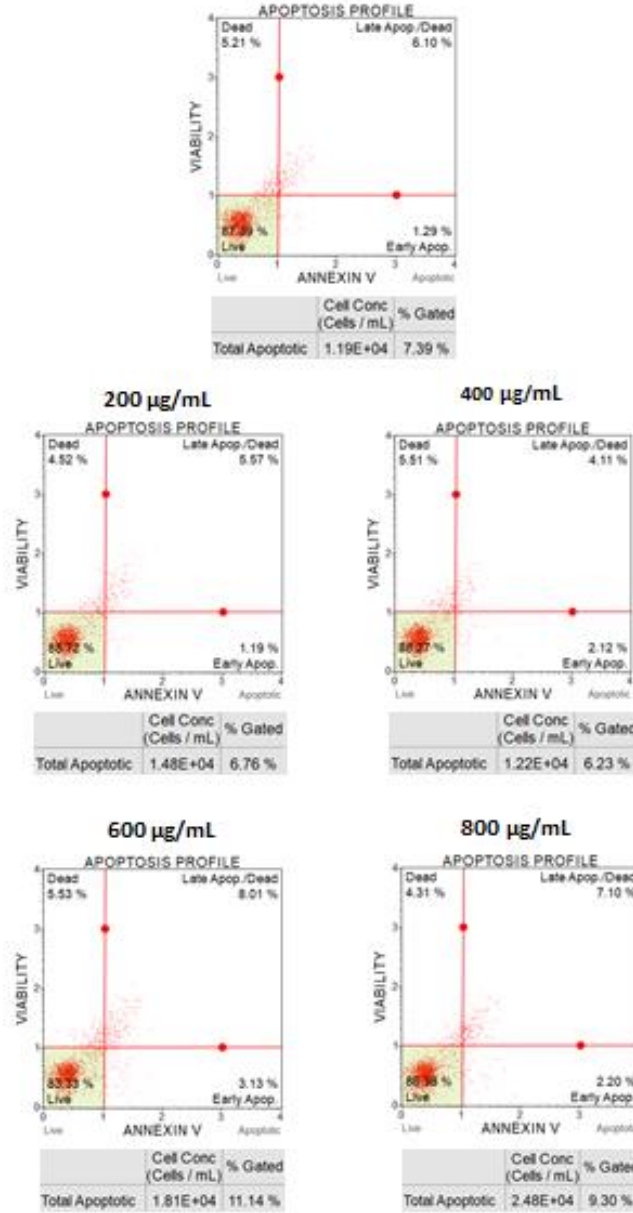
Polifenolik bileşiklerin antikanser etkinliklerinin ise, gen ekspresyon seviyelerini değiştirebilme, hücre döngüsünü durdurabilme, çeşitli hücre çoğalma sinyal yollarını inhibe edebilme, karsinojen metabolizmasını modüle edebilme ve apoptozu indükleyebilme özelliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir [29]. HepG2 hücrelerinde 6 saat maruziyet sonrası gözlenen geç apoptoz ve ölü hücrelerin oranı, ZFL hücrelerinde belirlenenlere kıyasla oldukça fazla olması menengiç ekstraktının hepatoselüler karsinoma hücrelerinde apoptozu daha erken indüklediğini göstermektedir. Ding ve ark. (2013), HepG2 hücrelerinde Dianthus superbus bitkisinden izole edilen 2-[(2,4 dihidroksibenzoil) amino]-4- metoksi-benzoik asit'in güçlü bir sitotoksik etkisi olduğunu, buna karşın; kaempferol, kuersetin, 3,5,7-trihidroksi3',5'-dimetoksil-flavon ve 1-monopalmitin'in sitotoksik etkisinin daha az olduğunu bildirmişlerdir [30].





*Şekil 6. ZFL hücrelerine 6 saat 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL ve 800 µg/mL menengiç ekstraktının uygulaması sonrası apoptoz miktarı.*

## Control



**Şekil 7.** HepG2 hücrelerine 6 saat 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL ve 800 µg/mL menengiç ekstraktının uygulaması sonrası apoptoz miktarı.

## IV. SONUÇ

Kanser tedavisinde; kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi gibi mevcut tedaviler, apoptosis olarak bilinen bir yöntemle dayanır ve bu yöntemde, kaspaz adı verilen proteinler aktive edilerek kanser hücreleri öldürülür. Ancak bu tedavi yöntemleri vücudun kendi sağlıklı hücrelerini de öldürerek çok fazla yan etki yaratır. Bu bilgiler ışığında, sağlıklı karaciğer epitel hücrelerinde Menengiç ekstraktının sitotoksik etkileri de incelenerek, hepatokarsinom hücreleri ile birlikte programlı hücre ölümüne yönlendirilip yönlendirilmedikleri araştırılmıştır. Yapılan tüm analizler sonucunda sağlıklı karaciğer epitel hücrelerinde oksidatif stresin daha az indüklendiği söylenebilir. Elde edilen veriler, menengiç ekstraktının hepatokarsinoma hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin oksidatif stresi indükleyerek gerçekleştirdiğini gösterebilir. Bu çalışmanın sonuçları karaciğer kanserinin tedavisinde menengiç ekstraktının umut verici yeni bir antikanser ajan olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışma Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje no: TSA-2020-46).

## **V. KAYNAKLAR**

- [1] I.T. Agar, N. Kaska and S. Kafkas, "Characterization of lipids in *Pistacia* species grown in Turkey," *In Acta Horticulturae*, pp. 417-422, 1995.
- [2] E. Ayrancı and A.C. Dalgıç, "Preparation of protein isolates from *Pistacia terebinthus* L. and examination of some functional properties," *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, vol. 25, no. 5, pp. 442-444, 1992a.
- [3] E. Ayrancı and A.C. Dalgıç, "Moisture sorption isotherms of *Pistacia terebinthus* L. and protein isolate," *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, vol. 25, no. 5, pp. 482-483, 1992b.
- [4] L. Bonsignore, F. Cottiglia and G. Loy, "Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. aerial parts," *Fitoterapia*, vol. 69, no. 6, pp. 537-538, 1998.
- [5] T. Baytop, *Türkiye' deki Tıbbi Bitkiler İle Terapi*, Birinci Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1999, 12. Bölüm, 111-117.
- [6] E. Yeşilada, G. Honda and E. Sezik, "Traditional medicine in Turkey V. Folk Medicine in The Inner Taurus Mountains," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 46, pp. 133-155, 1995.
- [7] M. Couladis, M. Özcan, O. Tzakou and A. Akgül, "Comparative essential oil composition of various parts of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L.) growing wild in Turkey," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 83, pp. 136-138, 2003.
- [8] M.M. Özcan, O. Tzakou and M. Couladis, "Essential oil composition of the turpentine tree (*Pistacia terebinthus* L.) fruits growing wild in Turkey," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 1, pp 282-285, 2009.
- [9] L. Dalgıç, S.O. Sermet ve G. Özkan, "Farklı kavurma sıcaklıklarının menengiç yağ kalite parametreleri üzerine etkisi," *Akademik Gıda*, c. 9, s. 3, ss. 26-36, 2011.
- [10] E.M. Giner-Larza, S. Ma´nez, M.C. Recio, R.M. Giner, J.M. Prieto and M. Cerda´-Nicola´s, "Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity," *Eur. J. Pharmacol*, vol. 428, pp. 137-143, 2001.
- [11] T. Bakirel, S. Sener, U. Bakirel, O. Keles, G. Sennazli and A. Gurel, "The investigation of the effects of *P. terebinthus* L. upon experimentally induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits," *Turkish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 27, pp. 1283-1292, 2003.
- [12] F. Tetik, S. Civelek and U. Cakilcioglu, "Traditional Uses of Some Medicinal Plants in Malatya (Turkey)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 1, pp. 331-346, 2013.
- [13] K. Canli, A. Yetgin, I. Akata and E.M. Altuner, "Antimicrobial Activity and Chemical Composition Screening of *Epilobium montanum* Root," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 51, no. 3, pp. 239-243, 2017.
- [14] M.E. Bozyel, M. Şenturan, A. Benek, E. Merdamert Bozyel, K. Canli and E.M Altuner, "In Vitro Antimicrobial Activity Screening of *Heliotropium europaeum* Against Wide Range of Microorganisms and Multi Drug Resistant (Mdr) Bacteria," *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, no. 3, pp. 113-117, 2019.

- [15] H.B. El-Serag, "Epidemiology of hepatocellular carcinoma," *The Liver: Biology and Pathobiology*, pp. 758-772, 2020.
- [16] A. Yerlikaya, E. Erdoğan, E. Okur, Ş. Yerlikaya and B. Savran, "A novel combination treatment for breast cancer cells involving BAPTA-AM and proteasome inhibitor bortezomib," *Oncology Letters*, vol. 12, no. 1, pp. 323-330, 2016.
- [17] O. Erel, "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation," *Clinical biochemistry*, vol. 37, no. 4, pp. 277-285, 2004.
- [18] O. Erel, "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status," *Clinical Biochemistry*, vol. 38, no. 12, pp. 1103-1111, 2005.
- [19] M. Koldemir Gündüz, "BGM a Newly Synthesised Boron Compound, Induces Apoptosis and Reduces Oxidative Stress by Inhibiting Lipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes via PPAR $\gamma$  and CTRP3," *Biol Trace Elem Res*, 2022, in press.
- [20] H. Aebi, "Catalase In vitro. In: Methods of Enzymatic Analysis," Ed: Bergmeyer HU, FL, 2nd ed, pp. 121- 126, 1974.
- [21] K. Walter and C. Schutt, "Acid and alkaline phosphatase in serum," *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, pp. 856-860, 1974.
- [22] A. Ledwozyw, D. Michalak, A. Stepien and A. Kadziolka, "The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis," *Clin Chim Acta*, vol. 155, no. 3, pp. 275-283, 1986.
- [23] E. Beutler, "Glutathione in red cell metabolism: a manual of biochemical methods", 2nd ed., Grune and Stratton, NY, pp. 112-114, 1975.
- [24] Z. Selamoğlu, "Polyphenolic Compounds in Human Health with Pharmacological Properties", *Journal of Traditional Medicine Clinical Naturopathy*, vol. 6, no. 4, pp.137, 2017.
- [25] Z. Selamoğlu, "Biotechnological Approaches on Anticancer Activity of Flavonoids", *Modern Approaches in Drug Designing*, vol. 1, no. 2, pp. 510, 2017.
- [26] G. Topçu, M. Ay, A. Bilici, C. Sarıkürkçü, M. Öztürk and A. Ulubelen, "A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*," *Food Chemistry*, vol. 103, no. 3, pp. 816-822, 2006.
- [27] M.Z. Durak ve G. Uçak, "Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus* L. Extracts," *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 39, no. 1, pp. 10-19, 2015.
- [28] H. Zhang, H.J. Forman ve J. Choi, " $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis," *Methods in Enzymology*, vol. 401, pp. 468-483, 2005.
- [29] S. Gezici and N. Sekeroglu, "Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents," *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 1, pp. 101-111, 2019.
- [30] C. Ding, W. Zhang, J. Li, J. Lei and J. Yu, "Cytotoxic constituents of ethyl acetate fraction from *Dianthus superbus*," *Natural Product Research*, vol. 27, no. 18, pp. 1691-1694, 2013.