

# APIUM GRAVEOLENS EKSTRAKTLARININ LNCaP HÜCRELERİNDE KASPAZ-3, -8, -9 ve APAF-1 ÜZERİNE ETKİSİ

## EFFECT OF APIUM GRAVEOLENS EXTRACTS ON CASPASE-3, -8, -9 AND APAF-1 IN LNCaP CELLS

Halit Buğra KOCA<sup>1</sup>, Tülay KÖKEN<sup>1</sup>, Tülay AKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı

<sup>2</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

### ÖZET

**AMAÇ:** Bu çalışmada, prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücrelerinde, *apium graveolens* (kereviz) bitkisinin etanolik ekstraktlarının hücre canlılığı ve apoptoziste rol alan kaspazlar ve apoptoz proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) üzerine indükleyici/baskılayıcı olarak anti-kanser etkisinin araştırılması amaçlandı.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmamızda LNCaP hücre hattı kullanıldı. LNCaP hücreleri; 0, 1500, 2000, 2500 µg/mL arasında değişen ve artan konsantrasyonlarda *apium graveolens*'in etanolik ekstraktları ile muamele edilen 4 gruba ayrıldı. Belirtilen ekstrakt konsantrasyonları LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat ayrı ayrı uygulandı. Uygulama bitiminde hazırlanan hücre lizatından ELISA yöntemiyle; Kaspaz-3, -8, -9 ve Apaf-1 ölçümü yapıldı. Sonuçlar canlı hücre sayılarıyla oranlanarak ng/ml olarak verildi.

**BULGULAR:** LNCaP prostat kanser hücrelerinin *apium graveolens* ekstraktları ile 24 ve 48 saatliğine muamelesi kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinde anlamlı bir farklılığa neden olmadı. Bununla birlikte; 24 ve 48 saatlik uygulamada, 2000 ve 2500 µg/ml ekstrakt konsantrasyonlarında kaspaz-8 değerleri kontrol gruplarına göre ve 2500 µg/ml ekstrakt konsantrasyonunda ise Apaf-1 düzeyi kontrol gruplarına göre doza ve zamana bağımlı olarak istatistiksel bakımdan anlamlı artış gösterdi.

**SONUÇ:** Bu çalışmanın sonuçları, *apium graveolens* bitkisinin etanolik ekstraktlarının uygulandığı LNCaP prostat kanser hücre hattında kaspaz-8 ve Apaf-1 düzeylerini artırarak antikanser ve apoptotik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bulgularımızı desteklemek için daha ileri in-vitro ve in-vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Prostat kanseri, Kaspazlar, Bitki ekstraktları, Hücre kültürü.

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** In this study it was aimed to investigate the anti-cancer effect of ethanolic extracts of *apium graveolens* (celery) plant on cell viability, caspases involved in apoptosis and apoptosis protease activation factor-1 (Apaf-1) as inducer/suppressor in prostate cancer cell line LNCaP cells.

**MATERIAL AND METHODS:** LNCaP cell line was used in our study. LNCaP cells were divided into 4 groups treated with ethanolic extracts of *apium graveolens* at increasing concentrations ranging from 0, 1500, 2000, 2500 µg/mL. The indicated extract concentrations were applied to LNCaP cells separately for 24 and 48 hours. Caspase-3, -8, -9 and Apaf-1 were measured by ELISA method from the cell lysate prepared at the end of the treatment. The results were expressed as ng/ml in proportion to the number of viable cells.

**RESULTS:** Treatment of LNCaP prostate cancer cells with *apium graveolens* extracts for 24 and 48 hours did not cause a significant difference in caspase-3 and caspase-9 levels. However, caspase-8 levels were significantly increased at 2000 and 2500 µg/ml extract concentrations and Apaf-1 levels were significantly increased at 2500 µg/ml extract concentration in a dose- and time-dependent manner compared to the control groups at 24 and 48 hours.

**CONCLUSIONS:** The results of this study show that ethanolic extracts of *apium graveolens* plant have anticancer and apoptotic properties by increasing caspase-8 and Apaf-1 levels in LNCaP prostate cancer cell line. Further in-vitro and in-vivo studies are needed to support our findings.

**KEYWORDS:** Prostate Cancer, Caspases, Plant extracts, Cell culture

**Geliş Tarihi / Received:** 09.08.2023

**Kabul Tarihi / Accepted:** 08.11.2023

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Doç. Dr. Halit Buğra KOCA

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı

**E-mail:** bugrakoca@yahoo.com

**Orcid No (Sirasıyla):** 0000-0002-5353-3228, 0000-0001-5510-9415, 0000-0002-6222-315X

## GİRİŞ

Prostat kanseri, 45 ila 60 yaşları arasındaki orta yaşlı erkekleri etkileyen, dünya çapında erkeklerde en sık teşhis edilen ikinci kanser ve beşinci önde gelen kanser ölüm nedenidir (1, 2). Prostat kanseri için tedavi seçenekleri sınırlıdır. Ayrıca etkin bir tedavisi olmadığı için metastatik hastalık her zaman tekrar eder. Kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavinin, antikanser tedavisinde gerilemeye neden olan ilaç direnci de dahil olmak üzere olumsuz yan etkileri vardır (2). Bu nedenle, etkili ve yeni anti-prostat kanseri ajanlarının geliştirilmesine önemle ihtiyaç duyulmaktadır. Geleneksel tıpta doğal bitki ürünlerinin, dirençli tümör hücrelerinde kemosenitiviteyi geri kazandırmanın yanı sıra yan etkileri azalttığı kanıtlanmıştır. Tıbbi bitki fraksiyonları ve bileşikleri ile genetik materyal ve hücresel yollara dayalı hedefli tedaviler, minimal yan etkilerle birçok farmakolojik etkiye sahip oldukları için prostat kanseri tedavisi için umut verici alternatifler gibi görünmektedir (2, 3). Bitkilerde bulunan birçok fitokimyasalın, apoptozun aktivasyonu, hücre döngüsünün durdurulması, proinflamatuar sinyalleme ve/veya anjiyogenezin inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla prostat kanseri gelişimini engellediği gösterilmiştir (1, 4). *Apium graveolens* (kereviz) apiaceae ailesinin üyesidir ve çok eski zamanlardan beri birçok ulusun geleneksel tıbbında baharat olarak kullanılan yenilebilir bir bitkidir. *Apium graveolens*, içerdiği glikozitler, tanenler, saponinler, flavonoidler, steroidler, terpenoidler, alkaloidler gibi kimyasallar ile anti-kanser, anti-obezite, anti-hepatotoksik ve antihipertansif ajanlar gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. *Apium graveolens*'in ham ekstraktlarının yüksek fenolik asit ve flavonoid içeriğe sahip olması kanser hücresi ölümüne ve hücre büyümesi inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir (4).

Kanser hücrelerinde apoptoz düzgün bir şekilde oluşmazsa, hücreler süresiz olarak çoğalır, diğer dokuları istila ederek metastaz yapar ve kötü bir prognoz gösterir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde apoptoz gerekli kabul edilir. İki apoptotik yol vardır. İntrinsik yolda, Bcl-2 ailesi tarafından mitokondriden salınan sitokrom-c, ATP, Apaf-1 ve pro-kaspaz-9 ile birleşerek apop-

totik bir kompleks oluşturur. Daha sonra kaspaz-9, kaspaz-3, -6 ve -7 aktive edilerek apoptoza neden olur. Ek olarak, PI3K/AKT gibi sinyal yolları ve P53 gibi çeşitli apoptoz düzenleyici proteinler, pro-apoptotik proteinleri (Bax, Bak, Bim, NoxaA) indükler ve anti-apoptotik proteinleri inhibe eder. Ekstrinsik yol ise ölüm reseptörleri tarafından indüklenir. Tümör nekroz faktör reseptörü (TNF), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü (TRAIL) ve Fas reseptörü gibi ölüm reseptörleri, ölüme neden olan bir sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak için TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi ölüm alanlarına bağlanır ve kaspaz-8 ile kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu başlatır (5). Mevcut bilgilerimize göre diyebiliriz ki, intrinsik/ekstrinsik apoptotik yolları tetikleyen bitkisel kaynaklı ajanlar kanser tedavisi için umut vadeci niteliktedir. *Apium graveolens*, ftalid adı verilen kansere, kolesterole ve hipertansiyona karşı koruma gösteren aktif bileşikler içerir. Sahip olduğu sedanolid gibi çeşitli etken bileşikler kerevizin, kanser hücreleri üzerine antioksidan, antimutajenik, pro-apoptotik, antikanser etkilerine aracılık etmektedir. Özellikle son zamanlarda, potansiyel antitümör etkileri nedeniyle büyük ilgi görmesine rağmen, prostat kanserine karşı antitümör etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir (6, 7). LNCaP hücre hattında, *apium graveolens* ekstraktının antikanser etkisini araştırdığımız bir başka çalışmada; ekstraktın zamana ve doza bağlı olarak, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) indüksiyonu ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ifadesini engellemesi yoluyla proliferasyonu sağladığını ve apoptozu indüklediği görülmüştür (8). Bu çalışmada ise, bir önceki çalışmada bulduğumuz sonuçları desteklemek için *apium graveolens*'in hücre canlılığı ve apoptozisteki rol alan kaspaz-3, -8 -9 ve Apaf-1 üzerine indükleyici/baskılayıcı olarak pro-apoptotik ve anti-kanser etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### LNCaP Hücre Hattı Kültürü

Çalışmamızda insan prostat kanser hücre dizisi LNCaP kullanıldı. Hücreler, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. %10 fetal sığır serumu, 100 U/

mL penisilin G ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium'da kültürlendi. %5 karbondioksit ve %95 havadan oluşan atmosferik koşullar altında 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde tutuldu.

#### ***Apium Graveolens*'in Etanolik Ekstraktının Hazırlanması**

*Apium graveolens* bitkisinin etanolik ekstraktları Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (AÜBİBAM) hazırlandı. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş *apium graveolens* bitkisi, %70'lik etanol ile 12 saat ekstrakte edildi. Ekstraktlardaki etanol vakum altında uzaklaştırılarak kalan sulu ekstraktlar liyofilizasyon yöntemi ile kurutuldu. *Apium graveolens* bitkisinin etanol ekstresinin verimi %44.45 olarak bulundu.

#### **Kaspaz-3, -8, -9 ve Apaf-1 Ölçümü**

Kaspaz-3, -8, -9 ölçümü için Invitrogen marka Human Kaspaz-3, -8 ve -9 Elisa Kitleri (Thermo Fisher Scientific 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451), Apaf-1 ölçümü için Sunred marka Human Apaf-1 Elisa kiti (Jufengyuan Road, Baoshan District, Shanghai, China) kullanıldı. Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi ile boyama yöntemi uygulandı ve her bir kuyucuğa  $1 \times 10^5$  hücre gelecek şekilde 24 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra apoptotik etkileri belirlemek için LNCaP hücreleri, 24 ve 48 saat ayrı ayrı olarak 0, 1500, 2000, 2500 µg/ml *apium graveolens* ekstrakt dozları ile muamele edildi. Uygulamadan sonra, medium uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı. Lizis işlemi için, 0.5 ml soğuk 1 mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF) eklendi ve hücreler 5 dk buz üzerinde bekletildi. Lizise uğramış hücreler başka bir tüpe alındı ve buz üzerinde sonike edildi. 10 dk +4 °C'de santrifüj edildikten sonra hücre lizatı bulunan süpernatant başka bir tüpe alınarak -80 °C'de çalışılincaya kadar (3 gün) saklandı. ELISA plakasının her oyuğunda yüz mikrolitre çözünür fraksiyon kullanıldı. Üretici firma talimatları doğrultusunda ELISA ölçümleri gerçekleştirildi. Absorbans, bir mikropilaka okuyucu ile 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar canlı hücre sayılarıyla oranlanarak ng/ml olarak verildi.

#### **Deney Grupları**

Daha önceki çalışmamızda 6 farklı doz kullanılarak (0, 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg/ml) 48 saat sonra XTT ölçümü yapılmış, IC50 değeri olarak 2840 µg/ml konsantrasyonunun hesaplanmasının ardından etanolik ekstraktların hücredeki kaspazlar üzerine etkilerinin belirlenmesi için deneylerde kullanılmak üzere üç konsantrasyon (1500, 2000 ve 2500 µg/ml) kullanıldı (8). Etanolik ekstraktın apoptotik belirteçler üzerindeki etkilerini belirlemek için belirtilen ekstrakt konsantrasyonları LNCaP hücrelerine ayrı ayrı 24 ve 48 saat uygulanarak gruplar oluşturuldu. 1. Grup: Kontrol grubu, sadece besiyeri uygulandı. 2. Grup: 1500 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3); 3. Grup: 2000 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3); 4. Grup: 2500 µg/ml ekstrakt, 24 ve 48 saat (n=3).

#### **İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Program for Social and Science) programı ile gerçekleştirildi. Çalışmada yapılan bütün ölçümler üç kez tekrar edildi ve sonuçlar ortalaması ± standart sapma olarak verildi. Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Normal dağılıma uyan değişkenler parametrik testlerden ANOVA ve Tukey post-testi ile, normal dağılıma uymayan değişkenler ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

#### **BULGULAR**

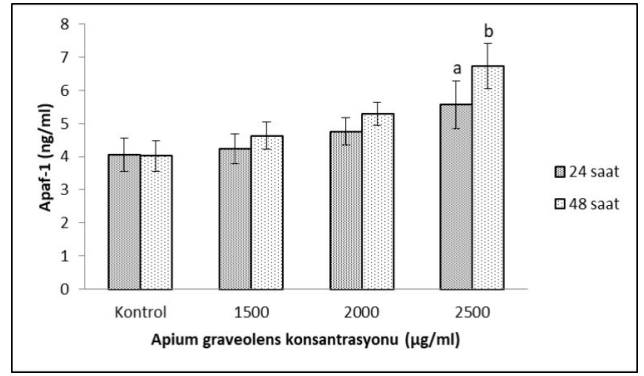
LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat sonrası 0, 1500, 2000, 2500 µg/ml *apium graveolens* ekstraktı uygulaması sonucunda ölçülen kaspaz-3, -8, -9 ve Apaf-1 düzeyleri ile deney grupları arasındaki karşılaştırmalar **Tablo 1**'de gösterilmiştir. LNCaP prostat kanser hücrelerinin *apium graveolens* ekstraktları ile 24 ve 48 saatliğine muamelesi kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmamıştır (**Şekil 1 ve Şekil 2**). 2000 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlardaki *apium graveolens* ekstrakt uygulamasının, 24 ve 48. saatlerde kaspaz-8 düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselttiği gözlenmiştir (24 saatte  $p=0,002$ ,  $p=0,001$ ; 48 saatte  $p=0,001$ ,  $p=0,001$ , sırasıyla), (**Şekil 3**). Apaf-1 düzeylerinde ise kaspaz -3 ve -9 düzeyine benzer şekilde 24 ve 48. saatte 1500 ve 2000 µg/ml *apium graveolens* ekstraktı uygulaması sonucunda gruplar arasında an-

lamalı farklılık gözlenmezken, 2500 µg/ml konsantrasyonda hem 24 hem de 48. saatte kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,037, p=0,001, sırasıyla) (Şekil 4).

**Tablo 1:** *Apium graveolens* ekstraktları uygulaması sonucunda ölçülen kaspaz-3, -8, -9 ve Apaf-1 düzeyleri

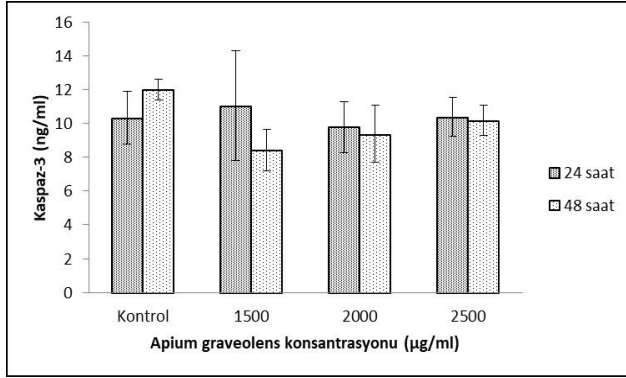
		Kaspaz-3 (ng/ml±SD)	Kaspaz-8 (ng/ml±SD)	Kaspaz-9 (ng/ml±SD)	Apaf-1 (ng/ml±SD)
Kontrol	24 saat	10,33 ± 1,54	2,47 ± 0,18	26,76 ± 1,95	4,04 ± 0,50
	48 saat	11,99 ± 0,62	2,34 ± 0,09	26,30 ± 2,13	4,01 ± 0,47
1500 µg/ml	24 saat	11,04 ± 3,23	2,91 ± 0,05	25,39 ± 5,99	4,23 ± 0,45
	48 saat	8,41 ± 1,22	2,59 ± 0,06	20,85 ± 3,64	4,62 ± 0,41
2000 µg/ml	24 saat	9,79 ± 1,51	2,97 ± 0,21 <sup>a</sup>	23,92 ± 1,43	4,75 ± 0,41
	48 saat	9,38 ± 1,68	3,37 ± 0,09 <sup>b</sup>	21,44 ± 2,44	5,28 ± 0,35
2500 µg/ml	24 saat	10,39 ± 1,16	2,99 ± 0,02 <sup>c</sup>	20,08 ± 1,99	5,56 ± 0,72 <sup>d</sup>
	48 saat	10,18 ± 0,88	4,06 ± 0,11 <sup>b</sup>	19,24 ± 2,14	6,72 ± 0,69 <sup>b</sup>

a: p=0,002; c: p=0,001; d: p=0,037, 24 saat kontrol grubuna göre; b: p=0,001 48 saat kontrol grubuna göre.

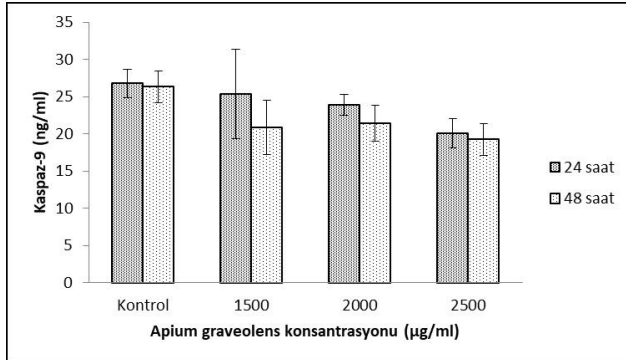


**Şekil 4:** *Apium graveolens* ekstraktının LNCaP hücrelerinde Apaf-1 üzerine etkisi.

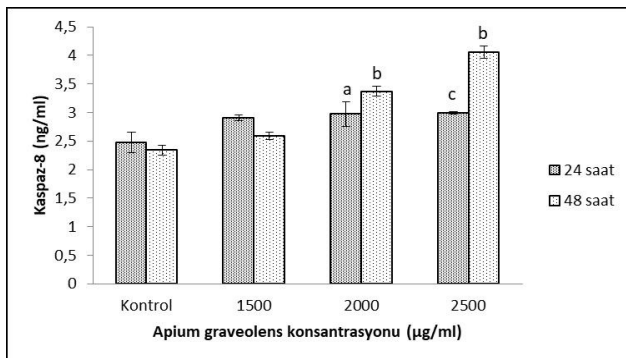
**a:** p=0,037, 24 saat kontrol grubuna göre; **b:** p=0,001 48 saat kontrol grubuna göre



**Şekil 1:** *Apium graveolens* ekstraktının LNCaP hücrelerinde Kaspaz-3 üzerine etkisi



**Şekil 2:** *Apium graveolens* ekstraktının LNCaP hücrelerinde Kaspaz-9 üzerine etkisi



**Şekil 3:** *Apium graveolens* ekstraktının LNCaP hücrelerinde Kaspaz-8 üzerine etkisi

a: p=0,002; c: p=0,001; 24 saat kontrol grubuna göre; b: p=0,001 48 saat kontrol grubuna göre

## TARTIŞMA

Her yıl 8.8 milyon insanın ölmesiyle kanser, dünyanın en büyük ikinci ölüm nedenidir. Dünyaya çapında artan kanser yükü, alternatif bir tedavi çözümü gerektirmektedir. Fito bileşenler, kanser önleyici tedavilerin geliştirilmesinde; birçok moleküler yolu, bileşeni ve hedefi düzenledikleri için, sıklıkla kemopreventif etkilere sahiptir (9). Çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar, bitkilerin kanser ile mücadelede vazgeçilmez bir rol oynadığını ortaya koymuştur. İn-vitro çalışmalar, DNA hasarı yoluyla kanser hücresi inhibisyonunu ve bitki özlerindeki sekonder metabolitler tarafından apoptozu indükleyen enzimlerin aktivasyonunu göstermiştir. Bu bitkilerin in-vivo aktivitelerini bildiren çalışmalar ile hayvan modellerinde kanserin inhibisyonunda dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenlerle daha fazla bitkinin aktif bileşenlerinin antikanser etkilerinin mekanizmasının keşfedilmesi ve standart bitkisel ilaç olarak kullanımı için daha ileri çalışmalar yapılması gerekliliği bildirilmektedir (10). *Apium graveolens* bitkisinin etanolik ekstraktının prostat kanseri LNCaP hücreleri üzerindeki antikanser etkilerini araştırdığımız çalışmamızda bitkinin apoptotik yolda önemli role sahip olan kaspaz-8 ve Apaf-1 üzerinden zamana ve doza bağımlı olarak pro-apoptotik etkiye sahip olduğu görüldü. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, normal homeostaz için gerekli olan karmaşık ve iyi düzenlenmiş bir biyolojik süreçtir. Ölüm reseptörü veya ekstrinsik yol, mitokondriyal veya intrinsik yol olmak üzere iki sinyal yolundan birinin tetiklenmesiyle başlar ve aktif proteolitik enzimler

tarafından hücrel organellerin organize bozunması ile hücre ölümü gerçekleşir. Apoptoz, kanseri hem önleyen hem de tedavi eden bir hücre ölüm süreci olarak kabul edilir. Bu nedenle, prostat kanserinin ilerlemesini ve tedavi direncini önlemek için kanser hücrelerinde, doğrudan intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yolları hedefleyen yeni ajanlar ile apoptotik etkileri arttırmak gereklidir (11). Bu bağlamda, prostat kanseri tedavisi için apoptotik yolun bitki ekstraktları ile manipülasyonu yararlı olabilir.

Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılması ve düzenlenmesinde ayrılmaz roller oynar. Memeli kaspazları, cellat kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılan üç geniş kategoriye ayrılır. Cellat kaspazlar, kaspaz-3, -6 ve -7'yi içerir. Kaspaz-3, birçok hedef hücrel proteinin proteolitik bölünmesinde doğrudan yer alan ana apoptoz düzenleyici bileşenlerinden biridir ve başlatıcı kaspazlardan biri ile aktive edilir. Kaspaz-2, -8, -9 ve -10, başlatıcı kaspazlardır. DISC, ekstrinsik yolda rol alan pro-kaspaz-8'i aktive eder ve sonuçta reseptör aracılı apoptozise neden olur. Kaspaz-9'un aktivatör proteini Apaf-1 ve p53'dür. İntrinsik yolda rol alan, kaspaz-9 – Apaf-1 apoptozomu, kaspaz-3'ü aktive eder. Hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolda ortak son, kaspaz-3 veya -7'nin aktive olmasıdır. Üçüncü bir kaspaz grubu olan inflamatuvar kaspazlar ise kaspaz-1, -4, -5 ve 12'den oluşur, özellikle inflamasyon kaynaklı hücrel ölümde rol alırlar (12).

*Apium graveolens* ekstraktlarının LNCaP hücrelerinin güçlü bir şekilde apoptotik ölümüne neden olduğunu gösteren bulgularımıza dayanarak, bu çalışmada ekstraktların kaspaz yollarını aktive edip etmediğini değerlendirdik. Çalışmamızda, hücrelerin *apium graveolens* ekstraktı ile muamelesi kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinde anlamlı artışa yol açmazken; kaspaz-8 ve Apaf-1'in doza ve zamana bağımlı olarak artışına neden olmuştur. Kaspazlar aktif hale getirildiğinde, LNCaP hücrelerinde apoptozun meydana geldiği gözlemi, bu kaspazların aktivasyonunun apoptozisi teşvik etmek için potansiyel terapötik hedefler olduğu anlamına gelmektedir.

Prostat kanseri LNCaP hücreleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar; timol tedavisinin (7), polimetoksisflavonoidlerin (1), polygodial'in sente-

tik bir analogu olan DRP-27'nin (3) kaspaz-3'ü indükleyerek apoptozu neden olduğunu göstermiştir. Hepatosellüler karsinom hücrelerinde kereviz tohumu yağının (13), küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde berberinin ve daidzeinin (14, 15 ), fare modelinde ise kerevizin metanolik ekstraktlarının kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (16). Zhou ve ark. ise, CRISPR teknolojisi ile oluşturulan kaspaz-3 nakavt kolon kanseri hücre dizilerinde, kaspaz-3 inhibisyonunun, kanser hücresinin kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığını artırmakla kalma- yı, aynı zamanda kanser hücresi istilasını ve metastazını da inhibe ettiğini bulmuşlardır (17).

Biz çalışmamızda *apium graveolens*'in farklı dozlardaki ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik. Elde ettiğimiz bu sonuç ve son raporlar bize; kaspaz-3'ün ayrıca tümör nüksetmesi ve tümör anjiyogenezinin teşviki gibi apoptotik olmayan rollere sahip olabileceğini göstermektedir. Kaspaz-3 aktivasyonu, konakçı hücrede hücre ölümüne neden olsa da, apoptotik olmayan komşu hücrelerde hücre çoğalmasını uyarmaktadır. Bu nedenle, kaspaz-3'ün tümör ilerlemesinin durdurulmasındaki rolleri net bir şekilde tanımlanmayı beklemektedir. Ayrıca, kaspaz-7 de kaspaz-3 ile benzer işlevlere sahiptir (17). LNCaP hücre hattında *apium graveolens*, apoptotik etkisini çalışmamızda değerlendirmedimiz kaspaz-7 üzerinden gerçekleştirmiş olabilir.

Kaspaz-8, hücre ölümü ve hayatta kalmasında ikili bir role sahip olan kaspazların eşsiz bir üyesidir. Örneğin, hepatosellüler karsinom ve pankreas karsinomu dahil olmak üzere bazı kanserlerde kaspaz-8'in normal dokulara kıyasla yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (18). Tarçın bitkisinde yer alan monofenol bileşikler ile prostat kanseri hücrelerinde, kaspaz-8 aracılı proteazom inhibisyonun, proliferasyonu inhibe ettiği ve otofajiye bağımlı apoptozu yol açtığı belirlenmiştir (19). Mavi-yeşil alglerden elde edilen C-fikosiyanin ise, topotecan ile birlikte LNCaP hücrelerinde, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gibi anahtar apoptotik proteazların aktivasyonu ile birlikte Bax (Bcl-2 ile ilişkili X proteini) ve Apaf-1 (pro-apoptotik proteinler) düzeylerinde artışa neden olarak antitümör etkiler göstermiştir (20). *Salvia miltiorrhiza* bitkisinden gümüş na-

nopartiküllerin biyosentezinin, LNCaP hücreleri üzerindeki terapötik etkisinin değerlendirildiği araştırmada ise; partiküllerin, Bcl-2 (B-hücre lenfoma gen2) ve Bcl-xl'in (B hücreli lenfoma-ekstra büyük) ekspresyonunda azalmaya, Bax, kaspaz-8, 9 ve 3 gibi apoptozu düzenleyen proteinlerin ekspresyonlarında artışa neden olarak apoptozu indüklediği görülmüştür (21). Safavi ve ark., dikloroflavanonların, LNCaP hücrelerinde kaspaz-8 ve -9'u aktive ederek apoptozu tetiklediğini ve böylece kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlarla yok edilmesinin normal olarak apoptoz yoluyla sağlandığını ortaya koymuşlardır (22). Apigenin, *apium graveolens* bitkisinde yer alan antikanser etkilere sahip bir flavonoiddir. Çeşitli kanser hücrelerinde kaspaz-3 ve -8'i aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (23). Mevcut çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, *apium graveolens* ekstraktları, LNCaP hücrelerinde kaspaz-8 seviyelerinin artışı yoluyla antikanser etkinlik sergilemektedir.

Mitokondriden salınan sitokrom-c, apoptozu yürütmek ve kaspaz kademesini başlatan heptamerik apoptozomu oluşturmak için Apaf-1 ve ATP ile etkileşime girer. ATP ayrıca kaspaz-9'a bağlanır ve apoptozom aracılı kaspaz aktivasyonunu düzenler (24). LNCaP hücrelerinin C-fikosiyanin ve topotecan ile birlikte muamelesi, Apaf-1 düzeyinde ve kaspaz-3 ile kaspaz-9 aktivitesinde artışı takiben PARP bölünmesinin artışına neden olmuştur. Sonuç olarak Bcl-2 düzeyindeki değişiklikler mitokondriyal apoptotik yolun tetiklenmesiyle Apaf-1/sitokrom-c kompleksi oluşmuş, komplekse ATP/dATP ile bağlandıktan sonra, Apaf-1 kompleksi kaspaz-9 ve -3 üzerinden apoptoza yol açmıştır (20). Bir başka çalışmada, çeşitli bitkilerde glikozid şeklinde bulunan ursolik asitin, sitokrom-c ve Apaf-1 aracılı kaspaz-3 ve -9'da artışa neden olarak apoptozu indüklediği belirlenmiştir (25). Mevcut çalışmamızın Apaf-1 ölçüm sonuçlarına göre *apium graveolens* ekstraktlarının 2500 µg/ml konsantrasyonda Apaf-1 düzeylerini artırdığı bulunmuştur. Kaspaz-8 ve Apaf-1 bulgularımız literatürle uyumludur.

Kaspaz-9, fizyolojik hücre ölümünü ve patolojik doku dejenerasyonunun düzenlenmesinde yer alan başlatıcı kaspazlardan biridir. Hücreler farklılaşma/olgunlaşma, doğal bağışıklık,

mitokondriyal homeostaz ve otofajinin düzenlenmesi dahil olmak üzere apoptotik olmayan işlevleri, sağlık ve hastalıkta kaspaz-9 fonksiyonlarının çok yönlü olduğunu ortaya koymaktadır (26). LNCaP hücrelerinde çeşitli ajanların etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda (20, 21, 22, 25), kaspaz-9 aktivasyonunun apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Ancak, bizim çalışmamızda, LNCaP hücrelerinin *apium graveolens* ekstraktları ile 24 ve 48 saatliğine muamelesi kaspaz-9 düzeylerinde anlamlı bir farklılığa ve kaspaz-9 üzerinden apoptotik bir etkinliğe neden olmamıştır. Elde edilen farklı sonuçlar, deneysel prosedür, koşul ve planlamanın, ayrıca kullanılan ajanın ve doz ayarının farklılığından ya da kanser hücrelerinin doğasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak çalışmamız, doz ve zamana bağlı olarak *apium graveolens* bitkisinin etanolik ekstraktlarının LNCaP prostat kanser hücre dizilerinde apoptotik ve antikanser etkilerinin araştırıldığı az sayıdaki çalışmadan biridir. Bulgularımızı güçlendirmek için *apium graveolens* gibi bitki ekstraktlarının, LNCaP hücre hatlarında ve farklı prostat kanseri hücre hatlarında çeşitli apoptotik belirteçler üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi yararlı olacaktır. Ek olarak, yiyecek olarak kullanılabilen doğal bitkiler ve bu bitkilerden izole edilen çeşitli bileşiklerin uygulanmalarının kanser hücreleri üzerine pro-apoptotik ve antikanser etkilerini gösterecek daha fazla in-vivo ve in-vitro çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tip çalışmaların artması kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması umut vadecidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16.KARİYER.188 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Wei GJ, Chao YH, Tung YC, et al. tangeretin derivative inhibits the growth of human prostate cancer LNCaP cells by epigenetically restoring p21 gene expression and inhibiting cancer stem-like cell proliferation. The AAPS Journal. 2023;25(4):59.
2. Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, et al. Prostate cancer review: Genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches. Molecules. 2022;27(17):5730.

3. Dasari S, Samy ALPA, Narvekar P, et al. Polygodial analog induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2018;828:154-62.
4. AlAboody MS. Cytotoxic, antioxidant, and antimicrobial activities of Celery (*Apium graveolens* L.). *Bioinformation*. 2021;17(1):147.
5. Jeong SH, Kim HH, Park MY, et al. Flavones: The Apoptosis in Prostate Cancer of Three Flavones Selected as Therapeutic Candidate Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(11):9240.
6. Khairullah AR, Solikhah TI, Ansori ANM, et al. Review on the Pharmacological and Health Aspects of *Apium Graveolens* or Celery: An Update. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2021;12(1):606-12.
7. Singhal B, Pandey P, Khan F, et al. In vitro elucidation of antiproliferative and apoptotic effects of thymol against prostate cancer LNCaP cells. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2022;12(1):1279-89.
8. Köken T, Koca B, Özkurt M, et al. *Apium graveolens* extract inhibits cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor and induces apoptosis in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Journal of Medicinal Food*. 2016;19(12):1166-71.
9. Asati V. Perspectives of anti-cancer phytoconstituents in pharmacotherapy. *Int. J. Med. Pharm. Sci*. 2022;12:1.
10. Khan T, Ali M, Khan A, et al. Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. *Biomolecules*. 2019;10(1):47.
11. Zielinski RR, Eigl BJ, Chi KN. Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *The Cancer Journal*. 2013;19(1):79-89.
12. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2020;1867(6):118688.
13. Ahmady O. Study of the anticancer potential of celery seed oil against chemically induced hepatocellular carcinoma in rats: a mechanistic approach. *Al-azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;53(1):14-28.
14. Becit-Kizilkaya M, Oncu S, Sen S, Celik S. Berberine synergizes with cisplatin via inducing apoptosis on A549 non-small cell lung cancer cells. *European Journal of Therapeutics*. 2023; 29(3):488-496.
15. Oncu S, Becit-Kizilkaya M, Sen S, Ugur-Kaplan AB, Cetin M, Celik S. Daidzein nanosuspension in combination with cisplatin to enhance therapeutic efficacy against A549 non-small lung cancer cells: an in vitro evaluation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023: 38159158.
16. Lyngdoh A, Baruah TJ, Sharan RN, Kma L. Inhibitory Potential of *Apium graveolens* L. Extract on Inflammation in Diethylnitrosamine-induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Pharmacognosy Magazine*. 2023;09731296231170931.
17. Zhou M, Liu X, Li Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2018;143(4):921-30.
18. Xia J, Zhang J, Wang L, et al. Non-apoptotic function of caspase-8 confers prostate cancer enzalutamide resistance via NF- $\kappa$ B activation. *Cell Death & Disease*. 2021;12(9):833.
19. Gopalakrishnan S, Ismail A. Aromatic monophenols from cinnamon bark act as proteasome inhibitors by upregulating ER stress, suppressing FoxM1 expression, and inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Phytotherapy Research*. 2021;35(10):5781-94.
20. Kaur P, Dhandayuthapani S, Venkatesan T, et al. Molecular mechanism of C-phycoyanin induced apoptosis in LNCaP cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2020;28(3):115272.
21. Zhang K, Liu X, Samuel Ravi SOA, et al. Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* and its anticancer potential in human prostate cancer LNCaP cell lines. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019;47(1):2846-54.
22. Safavi M, Shakeri R, Ardestani SK, et al. Caspase-dependent apoptosis induced by two synthetic halogenated flavanones, 3', 7-dichloroflavanone and 3', 6-dichloroflavanone, on human breast and prostate cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2018;54:136-46.
23. Javid H, Ahmadi S, Mohamadian E. Therapeutic applications of apigenin and its derivatives: micro and nano aspects. *Micro Nano Bio Aspects*. 2023;2(1):30-8.
24. Yadav N, Gogada R, O'Malley J, et al. Molecular insights on cytochrome c and nucleotide regulation of apoptosome function and its implication in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2020;1867(1):118573.
25. Mu D, Zhou G, Li J, et al. Ursolic acid activates the apoptosis of prostate cancer via ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1. *Oncology Letters*. 2018;15(3):3202-6.
26. Avrutsky MI, Troy CM. Caspase-9: a multimodal therapeutic target with diverse cellular expression in human disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:701301.