

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine *Verbascum inulifolium*'un antiproliferatif ve apoptoz indüklenme aktivitelerinin değerlendirilmesi*

Antiproliferative and apoptosis inducing effect of *Verbascum inulifolium* on MCF-7 breast cancer cell line

Yusuf Özayⁱ, Atila Yıldızⁱⁱ, Celal Guvenⁱⁱⁱ, Isil Albeniz^{iv}, Leyla Türker Şener^v, Mufide Aydoğan Ahabab^{vi}, İbrahim Bozgeyik^{vii}, Sevda Güzel^{viii}, Haydar Bağış^{ix}, Önder Yumrutaş^x

ⁱAdıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0003-3855-6197>

ⁱⁱAnkara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, <https://orcid.org/0000-0003-3940-9199>

ⁱⁱⁱNiğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0003-0499-7787>

^{iv}İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0002-6005-5164>

^vİstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0002-7317-9086>

^{vi}Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, <https://orcid.org/0000-0003-2578-3737>

^{vii}Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0003-1483-2580>

^{viii}Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0002-6642-5824>

^{ix}Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0002-1140-8058>

^xAdıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, <https://orcid.org/0000-0001-9657-8306>

ÖZ

Verbascum cinsi halk tıbbında geleneksel olarak kullanılan ve anti-enflamatuvar, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri bilinen bir cinstir. *Verbascum inulifolium* türü Türkiye'de yetişen endemik bir türdür. Bu çalışmanın amacı *V. inulifolium* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin insan meme kanseri hücre hattı (MCF7) üzerine antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesidir. Ekstrenin farklı konsantrasyonlarının (1, 5, 25 ve 125µg/ml) hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi MTT ve Xcellange yöntemi ile test edilmiştir. Daha sonra hücreler Annexine V/propidium iodür (PI) ile boyanmış ve apoptozun safhaları FACS cell counter metodu ile belirlenmiştir. Ayrıca apoptotik ve anti-apoptotik protein ekspresyon düzeyleri western blot metodu ile belirlenmiştir. Son olarak phalloidine boyama metodu ile hücrelerde aktin filamentleri boyanmış ve floresan mikroskopunda incelenmiştir. MCF-7 hücre canlılığı ve proliferasyonun doz artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ancak apoptozun erken veya geç dönemlerinde MCF-7 hücre sayılarında bir değişim gözlenmemiştir. P53, Bcl-2 ve kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca aktin filamentlerinin yoğunluğu sadece 125 mg/ml dozda hafif azalmıştır. Sonuç olarak *V. inulifolium* türünün metanol ekstresi MCF-7 hücreleri üzerine anti-proliferatif etki göstermiştir, fakat sonuçlar bu etkinin apoptotik yolakla ilişkili olmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Verbascum inulifolium*, meme kanseri, antiproliferatif, apoptoz, MCF-7 hücre hattı

ABSTRACT

The genus *Verbascum* traditionally used in folk medicine is known with some activities including anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial. *Verbascum inulifolium* is an endemic species growing in Turkey. The aim of the present study was to evaluate anti-proliferative and apoptotic effects of methanol extract obtained from aerial parts of *V. inulifolium* on human breast cancer cell line (MCF). Effects of different concentration of the extract (1, 5, 25 and 125µg/ml) were tested on cell viability and proliferation using MTT and Xcelligence assays. Then cells stained with Annexine V/propidium iodür (PI) and apoptosis phases were determined using FACS cell counter method. Moreover, western-blot method was performed to determine apoptotic and anti-apoptotic protein expression levels. Finally, cell actin filaments stained using phalloidine stain method and examined with fluorescence microscope. Cell viability and proliferation levels were reduced according to increasing concentrations of the extract. However, there were no differences observed in number of MC-7 cell during early and late phases of apoptosis. There were no significantly differences observed in P53, Bcl-2, and caspase-3 protein expression levels. Actin filament density was slightly reduced only at the concentration of 125 mg/ml. As a result, methanol extract of *V. inulifolium* showed anti-proliferative effect, but results indicated that this effect was not related to apoptotic pathway.

Keywords: *Verbascum inulifolium*, breast cancer, antiproliferation, apoptozis, MCF-7 Cell Line

*Lokman Hekim Dergisi, 2019; 9 (2): 203-210

DOI: 10.31020/mutftd.532710

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 26 Şubat 2019; Kabul Tarihi - Accepted: 15 Nisan 2019

İletişim - Correspondence Author: Yusuf Ozay <yusufozay33@hotmail.com>

GİRİŞ

Apoptoz programlı hücre ölümü olarak kabul edilmektedir.¹ Bu sistemde en önemli enzimlerden birisi p53'dür. P53 hasar görmüş DNA'nın tamirinin düzenlenmesinde görev alan bir proteindir. Hücre DNA'sı tamir edilemediğinde hücrede apoptoz indüklenmektedir.² Bu aşamada apoptotik proteinlerin (Bax ve Bid gibi) seviyeleri antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 proteinin seviyesine baskın gelir ve apoptoz indüklenir. Buna ek olarak kaspaz-3 ise apoptozun son aşamalarında aktifleşen enzimdir ve aktif kaspaz-3 CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı aktifleştirir.¹ Daha sonra CAD DNA'nın 50-200 bp uzunluğunda fragmentlere ayrılmasına neden olur. Kanser hücrelerinde apoptoz genellikle baskılanmış durumdadır.

Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser türlerinden biridir.³ Alt türlere ayrılan meme kanserinin akciğer kanserinden sonra ikinci sırada ölüme neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, meme kanserinin tedavisi için kemoterapötik etki gösterebilecek doğal ve sentetik maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bitkilerden elde edilen ve kanserin tedavisi için kullanılan bileşikler ve türevleri içeren pek çok çalışma literatüre girmiştir.⁴

Türkiye mevcut bitki türleri göz önünde bulundurulduğunda antikanser çalışmalarında kullanılacak bitki çeşitliliği açısından oldukça dikkat çekicidir. *Verbascum* cinsi hem Asya hem de Avrupa'da yayılış gösterir. Türkiye'de 233 türü bulunmakla birlikte bunların 185'i endemiktir. *Verbascum* cinsine ait türler üzerine yapılan çalışmalarda bu türlerin yara iyileşmesi⁵, antioksidan⁶, antihelmintik⁷ ve antiinflamatuvar⁸ aktiviteleri bildirilmiştir. Tür sayısı ve endemizm oranı düşünüldüğünde bu türlerin biyolojik aktiviteleri hakkında bilgimiz oldukça sınırlıdır. Özellikle kanser hücreleri üzerine *Verbascum* cinsine ait türlerin etkilerini gösteren çalışmalar hakkında aydınlatılması gereken pek çok önemli nokta bulunmaktadır. Bu türlerden biri de *Verbascum inulifolium* Hub.-Mor.'dur. Literatürde yapılan taramalarımız sonucunda, *V. inulifolium*'a ait antikanser etkiler gösteren herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada *V. inulifolium* türünün metanol ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine antikanser aktivitesinin detaylı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında proliferasyon ve hücre canlılığının belirlenmesi, intrinsik apoptoz yolağında rol alan Bcl-2, P53 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları, hücre iskelet elemanlarının yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bitki materyali ve ekstraksiyon prosedürü

Bitki materyali doğal habitatından C4-Silifke, Mersin, Türkiye'den toplanmıştır ve Dr. Sevda Güzel tarafından teşhis edilmiştir. Gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları öğütülmüş ve 2 g bitki materyali, 250 mL metanol ile Soxhlet cihazında ekstre edilmiştir. Sonrasında 35-40 °C de vacuum evaporatörde (Heidolph-Rotar TLR 1000, Germany) çözücü uçurulmuş ve elde edilen ekstre 4 °C ileri çalışmalar için karanlıkta saklanmıştır.

Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Kanser hücre hatları 12 kuyucuklu plâtelere %70-80 oranında konfluansa hazır hale geldiklerinde SF ortamında 24 saat tutulduktan sonra bitki ekstresinin farklı seyreltmeleri (1, 5, 25, 125µg/ml) ile 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak %10 FCS içinde bekletilen hücreler kullanılmış ve hücrelerin canlılığı MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kültür vasatı 1 mg/ml MTT (Sigma) içeren SF vasatı ile değiştirilerek 37°C de 4 saat süre ile inkübe edilmiş, daha sonra MTT solüsyonu dökülerek hücrelerin üzerine dimetil sulfoksit (DMSO, Sigma) eklenmiştir. Renkteki değişim kolorometrik bir okuyucu ile (spektrofotometre) 595 nm'de okunmuştur. Bitki özütlerinin hücrelere göre en uygun proliferatif ve inhibe edici dozları tespit edilmiştir. Böylece bitki özütlerinin kültür hücrelerinin canlılığı üzerinde etkisi ve etkin dozun etkinlik süresi belirlenmiştir.

Flow Sitometre İle Hücre Döngüsü ve Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi için 75 cm²lik flâskalara 5000 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücre canlılık testlerinde kullanılan en düşük ve en yüksek dozlar hücrelere uygulanmıştır. Daha sonra Annexin V ve PI içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda deney gerçekleştirilmiştir. Kısaca, hücreler (100.000 hücre/numune başına) soğuk PBS ile iki kez yıkanmış ve FITC ile konjüge annexin V (10 µg/ml) ve PI (10 µg/ml) içeren bağlayıcı tampon çözelti içine konulmuştur. Hücre

süspansiyonları karanlıkta buz üstünde 15 dk inkübe edilmiş, daha sonra FACSort tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirilmiştir.

MCF-7 Hücrelerinin İmmüno Floresan Yöntemi ile İşaretlenerek Boyanması

Floresans mikroskopunda aktin filament yapısının görüntülenmesi, F-aktine bağlanan Alexa flor 595 falloidin "Alexa fluor 595 phalloidin" kullanılarak yapılmıştır. Kültür ortamında bulunan hücreler pastör pipeti ile çözülmüş ve santrifüj tüpü içine alınarak 5 dakika 3000x g de santrifüj edilmiştir. Hücreler falloidin-PBS içinde bir saat etüvde bekletilmiş ve ardından hücre içine girmeyen falloidini uzaklaştırmak için 5 dakika 3000x g de santrifüj edilerek üst sıvı atılmıştır. Hücre peleti Triton-X-100 içine alınarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından PBS'li falloidin ile bir saat boyunca işaretlenmiş ve 7 dakika 3500x g de santrifüj edilmiştir. İşlem sürecinde her bir basamaktan sonra hücreler PBS ile son aşamada ise BSA'lı PBS ile yıkanmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenerek boyanmıştır. Daha sonra floresan mikroskopta F-aktin yoğunlukları belirlenmiştir.

Apoptotik yolakta görev alan bazı protein ekspresyon seviyelerinin Western Blot ile belirlenmesi

Protein analiz kiti (Pierce mikroplate BCA) kullanılarak protein miktarı belirlenen MCF-7 meme kanser hücre soyundan elde edilen hücre lizatı oranları 4x örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dakika denatüre edilmiştir.

Örnekler, % 12' lik poliakrilamid içeren gel ile elektroforez düzeneğine yüklenerek 120 dakika yürütülmüştür. Jelden nitroseluloz membrana aktarım 125 mA'de 90 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir. Membranlar TBS - % 0.1 Tween 20 ve % 3' lük BSA içeren tamponla 1 saat süresince +4 °C' de doyurulmuştur. Doyurma işleminin ardından membranlar 1. antikorlarla (p53, kaspaz-3 ve bcl-2) 14 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her inkübasyondan sonra membranlar 3 defa 15 dakika TBS - % 0.1 Tween 20 içeren tamponla yıkandıktan sonra alkalen fosfotaz içeren tavşan monoklonal anti keçi IgG içeren ikincil antikor ile 1 saat inkübe edilmiştir. İkinci antikor inkübasyonundan sonra membranlar yine 3 defa 15 dakika TBS- % 0.1 Tween 20 içeren tamponla yıkandıktan sonra NBT/BCIP renk geliştirici solüsyonu kullanılarak membran üzerinde oluşan özgün bantlar gözlenmiştir.

İstatistik

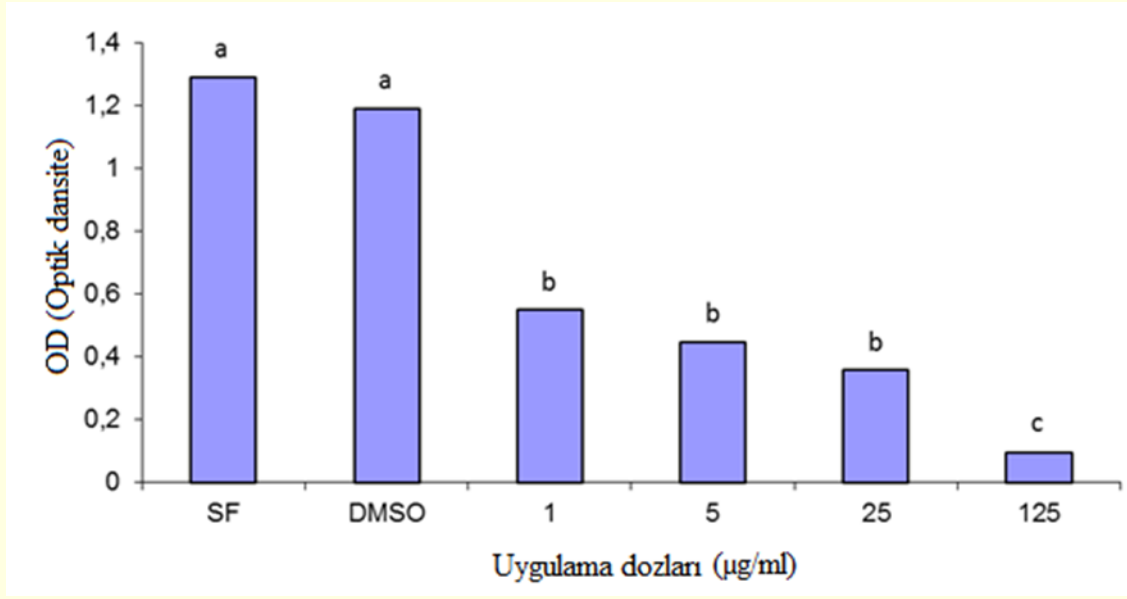
Çalışmanın sonuçları istatistiksel olarak GraphPad Prism (v6.02) ve SPSS (v20) paket programları yardımı ile değerlendirilmiştir. Yapılan tüm analizler iki uçlu (two-tailed)'dur ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

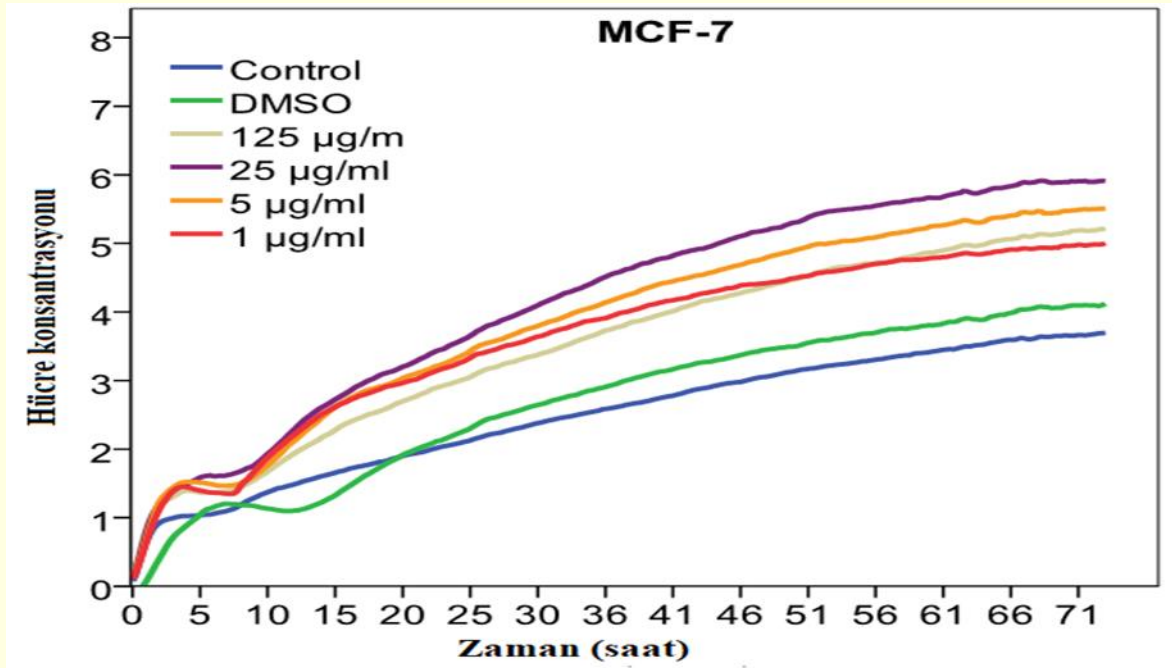
Hücre canlılığı ve Antiproliferatif aktivite

V. inulifolium metanol ekstresi doz artışına (1, 5, 25 ve 125 µg/ml) bağlı olarak MCF-7 hücre canlılığını ve proliferasyonunu azaltmıştır (**Şekil 1**).

Farklı yoğunluktaki MCF-7 hücreleri (100,000, 50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125 ve 1,562 hücre/kuyucuk) 16 kuyucuklu mikrolakalarda yetiştirilmiştir. Ekstre uygulaması sonucunda MCF-7 hücrelerinde kontrolle kıyaslandığında doz bağımlı olarak (1, 5, 25 ve 125 µg/ml) hücre proliferasyon yoğunluğunun azaldığı en yüksek etkinin ise MTT testinde sonuçlara benzer olarak 125 µg/ml dozda olduğu belirlenmiştir (**Şekil 2**) (**Tablo 1**).



Şekil 1. *V. inulifolium* ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerine doz bağımlı antiproliferatif etkileri



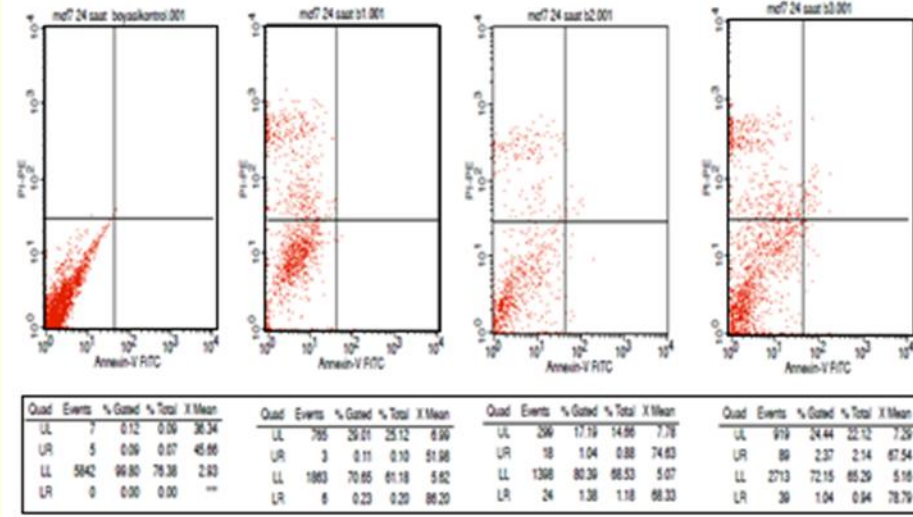
Şekil 2. Xcellinge aracılığıyla hücre poliferasyonunun dinamik olarak gözlenmesi

Tablo 1. Doz bağımlı hücre yoğunlukları üzerine *V. inulifolium* ekstresinin etkileri

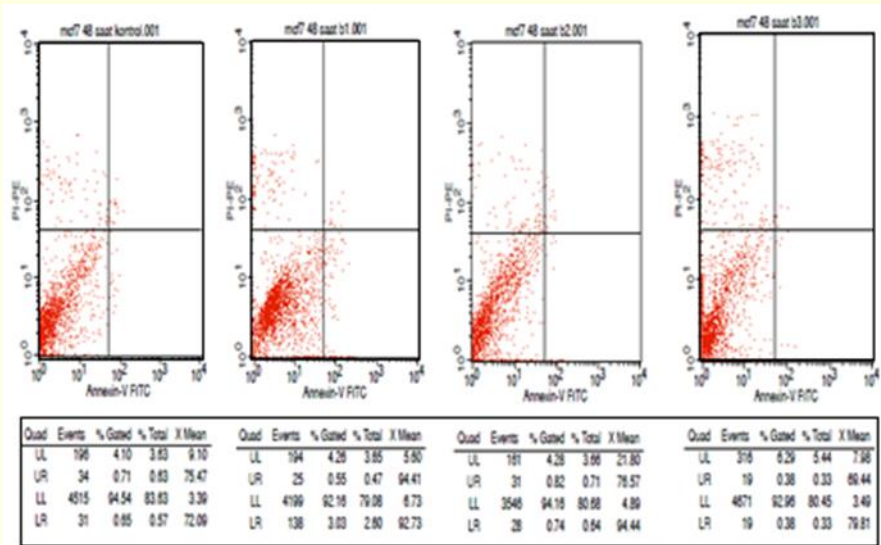
Gruplar	Hücre konsantrasyonları
SF	1.176 ^a ±0.00
DMSO	1.064 ^a ±0.016
1 µg/ml	1.109 ^a ±0.009
5 µg/ml	1.051 ^a ±0.118
25 µg/ml	0.781 ^b ±0.048
125 µg/ml	0.100 ^c ±0.007

Apoptozun belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi için 24 ve 48 saat süresince *V. inulifolium* ekstresinin en düşük ve en yüksek dozlarına maruz bırakılan hücreler AnnexineV/PI ile boyanmış ve daha sonra erken ve geç apoptotik safhadaki MCF-7 hücrelerinin taranması ve yüzdelerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde hem 24 hem de 48 saat boyunca farklı dozlarda ekstre uygulanan MCF-7 hücrelerinin çok azının erken apoptotik safhaya girdiği ve bazı hücrelerin ise doğrudan nekrotik safhaya geçtiği belirlenmiştir. FACS sonuçları **Şekil 3 ve 4'**de verilmiştir.



Şekil 3. 24 saatlik ekstre uygulamaları sonucunda hücrelerin apoptotik ve nekrotik dağılımları. UL:yukarı sol kare (Nekrotik hücrelerin bulunduğu kısım), UR: yukarı sağ kare (Geç apoptotik fazdaki hücrelerin bulunduğu kısım), LL: aşağı sol kare (Etkilenmeyen hücrelerin bulunduğu kısım), LR: aşağı sağ kare (Erken apoptotik fazdaki hücrelerin bulunduğu kısım)'yi ifade etmektedir.

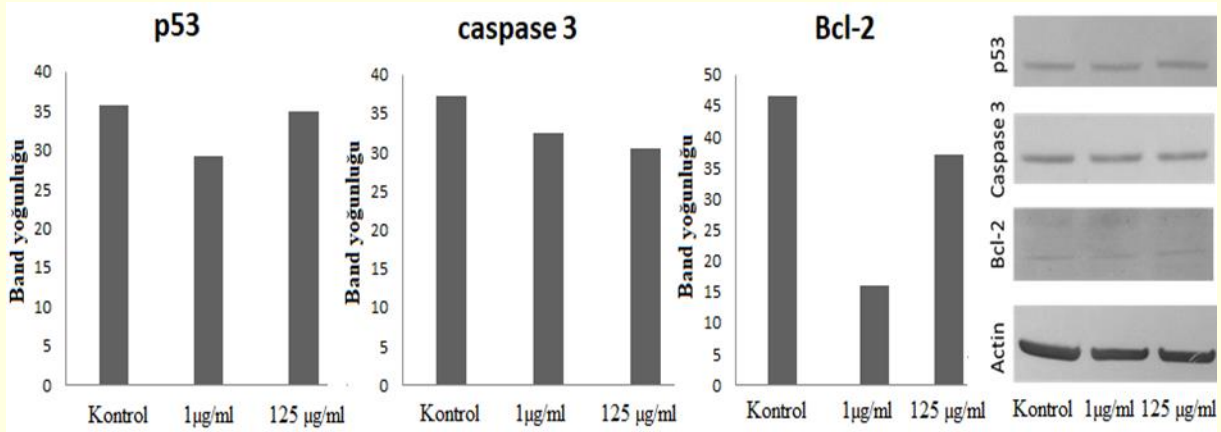


Şekil 4. 48 saatlik ekstre uygulamaları sonucunda hücrelerin apoptotik ve nekrotik dağılımları. UL:yukarı sol kare (Nekrotik hücrelerin bulunduğu kısım), UR: yukarı sağ kare (Geç apoptotik fazdaki hücrelerin bulunduğu kısım), LL: aşağı sol kare (Etkilenmeyen hücrelerin bulunduğu kısım), LR: aşağı sağ kare (Erken apoptotik fazdaki hücrelerin bulunduğu kısım)'yi ifade etmektedir.

Western Blot ile apoptotik ve antiapoptotik protein seviyelerinin belirlenmesi

Şekil 5'de, ekstre uygulaması sonrası MCF-7 hücrelerinde p53, kaspaz-3 ve Bcl-2 protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde düşük (1 mg/ml) ve yüksek (125 mg/ml) doz uygulamaları sonucunda p53 ve kaspaz-3 protein seviyelerinde anlamlı bir değişiklik

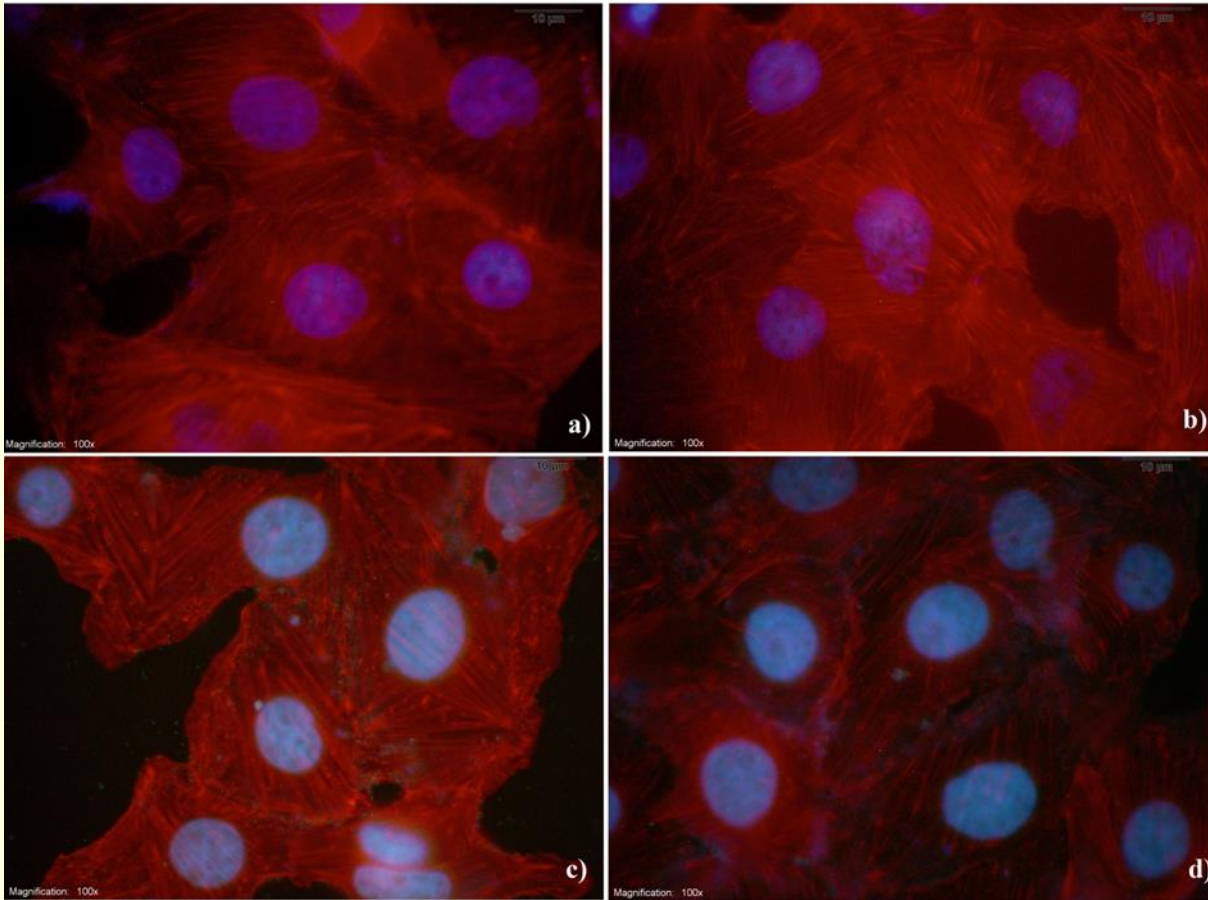
gözlenmemiştir. Bununla birlikte Bcl-2 seviyesi düşük doz uygulaması sonrasında kontrole göre azalmış ve yüksek doz uygulanan gruplarda ise kontrole yakın değerler sergilemiştir.



Şekil 5. *V. inulifolium* ekstresinin apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi.

İmmünofloresan görüntüleme

Elde edilen görüntüler incelendiğinde sadece *V. inulifolium* ekstresinin 125 mg/ml doz uygulandığı hücrelerde aktin filamentlerinin yoğunluğunda düşük bir azalma görülmektedir. Bununla birlikte 1 mg/ml ekstre uygulanan grupta SF kontrol ya da DMSO grubuna göre aktin filamentlerinde azalma görülmemektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Ekstre uygulamaları sonrası aktin filamentlerinin immünofloresan görüntüleri: a) SF, b) DMSO, c) 1 mg/ml, d) 125 mg/ml.

TARTIŞMA

Eski çağlardan günümüze kadar kanser tedavisi için bitkiler kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen fitokimyasal bileşiklerin önemli antikanser aktiviteler gösterdiği bilinmektedir.⁹ Önceki çalışmalarda kamptotesin, topotekan, irinotekan, paklitaksel, dosetaksel, vinbilastin, vinkristin, podofillotoksin, etopozit, tenipozit, elliptinium, homoharringtonin vs. gibi bitkilerden elde edilen ve antikanser etki gösteren bileşikler rapor edilmiştir¹⁰ ve bu maddelere her geçen gün yenileri eklenmektedir.⁹ Türkiye bulunduğu coğrafik konumundan dolayı pek çok bitki türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu bağlamda antikanser ajan olarak kullanılacak maddelerin bulunması açısından düşünüldüğünde önemli bir kaynak olabileceği söylenebilmektedir.

Verbascum cinsine ait türlerin yara iyileşmesi¹¹, antimikrobiyal¹², antiinflamatuvar¹³, antiülserojenik¹⁴ aktiviteleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda *Verbascum* sp. türlerinin kanser hücreleri üzerine etkilerini gösteren çalışmalarda mevcuttur. Talib ve ark. (2010) *Verbascum sinaiticum* çiçeklerinin kloroform ve metanol ekstraktlarının MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu önemli derecede engellediği bildirilmiştir.¹⁵ *Verbascum nobile* den elde edilen iridoit, fenilethanoit ve saponinlerin T-hücre hattının proliferasyonunu engellediği belirlenmiştir.¹⁶ Diğer bir çalışmada *Verbascum thapsus*'un A549 akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir.¹⁷ Çalışmamızda, endemik bir tür olan *V. inulifolium*'un antikanser özelliklerinin belirlenmesi için öncelikli olarak MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine hücre canlılığı ve antiproliferasyon aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre metanol ekstresinin MCF-7 hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca Xcelligence dinamik hücre monitörleme metodu ile hücrelerin proliferasyonu ve uygun hücre yoğunlukları belirlenmiştir. Her iki testin sonucuna göre proliferasyon ve canlılığın doz artışına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda *V. inulifolium* MCF-7 hücreleri üzerine antiproliferatif bir etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir.

Bitkilerin antikanser etkilerinin belirlenmesinde apoptozun indüklenmesi önemli bir kriterdir. Önceki çalışmalarda bazı *Verbascum* sp. türlerinin apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. *Verbascum thapsus*'dan elde edilen fitokimyasalların A549 kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir.¹⁷ Talib ve Mahasneh (2010). *Verbascum sinaiticum*'a ait farklı polaritedeki ekstraktların MCF-7 ve Hep-2 hücrelerinde antiproliferatif etkileri belirlemiş ancak apoptozun indüksiyonu belirlenememiştir.¹⁵ Çalışmamızda hücre canlılığının azalması ile apoptoz arasındaki ilişkinin belirlenmesi için Annexine V/PI boyaması yapılarak erken ve geç apoptozdaki hücre sayılarının belirlenmesi sağlanmıştır. Uygulama gruplarında erken apoptotik safhadaki hücre sayılarının çok az olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, *V. inulifolium* metanol ekstresinin MCF-7 hücrelerinde apoptozun indüklenmesi üzerine etkili olmadığı söylenebilmektedir. Çalışmamızda paralel olarak apoptotik (p53 ve kaspaz-3) ve antiapoptotik (Bcl-2) proteinlerin ekspresyon seviyeleri de belirlenmiştir. Uygulama gruplarında p53, kaspaz-3 ve Bcl-2 protein seviyelerinin kontrole yakın sevide olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda Annexin V/PI boyaması sonrasında hücrelerin apoptoza girmediği ve ayrıca western blot yöntemi ile apoptozda rol alan protein seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemesinden dolayı *V. inulifolium*'un MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği düşünülmektedir.

Ayrıca f-aktin yoğunluğunun *V. inulifolium* ekstresinin düşük doz uygulandığı gruplarda kontrole göre herhangi bir fark olmadığı ama yüksek dozun aktin filamentlerinin yoğunluğunu zayıfta olsa azalttığı görülmektedir. Hücre iskeletinin yoğunluğunun azalması ve deformasyonu ile karakterize olan hücre büzülmesi morfolojik olarak apoptotik hücre belirteçlerinden birisidir.¹⁸ Apoptotik hücre belirteçlerinden biri olan hücre büzülmesinin görülmemesinden dolayı *V. inulifolium*'un MCF-7 hücrelerinde f-aktin'in yoğunluğu üzerine etkili olmadığı söylenilebilmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda *V. inulifolium*'un metanol ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine olası antikanser etkileri test edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, metanol ekstresinin MCF-7 hücre canlılığını azalttığını ancak bu azalmanın apoptozla ilgili olmadığı p53, kaspaz-3 ve Bcl-2 proteinlerin ekspresyon seviyelerine bakılarak anlaşılabilmektedir. Ayrıca bu yargı hücrelere ekstre uygulanması sonrasında Annexin V boyaması ile yapılan analizde hücrelerde apoptozun indüklenmediğinin belirlenmesi ile desteklenmiştir. Bu bağlamda, *V. inulifolium*'un metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerine apoptoz indüklenmiş antikanser aktivitesinin olmadığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death Toxicol Pathol 2007; 35:495-516.
2. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to p53. Nat Rev Cancer 2002;2:594- 604.
3. Ju J, Zhu AJ, Yuan, P. Progress in targeted therapy for breast cancer. Chron Dis Transl Med 2018;4:164-175.
4. Kintzios SE. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. Crit rev plant sci 2006; 25:79-113.
5. Kayır S, et al. The in vivo effects of *Verbascum speciosum* on wound healing. S Afr J Bot 2018; 119:226-229.
6. Mihailović V, et al. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. Ind Crop Prod 2016; 89:141-151.
7. Kozan E, et al. The in vivo anthelmintic efficacy of some *Verbascum* species growing in Turkey. Exp parasitol 2011;129:211-214.
8. Dalar A, Guo Y, Konczak I. Phenolic composition and potential anti-inflammatory properties of *Verbascum cheiranthifolium* var. *cheiranthifolium* leaf. J of Herb Med 2014; 4:195-200.
9. Iqbal J, et al.. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. Asian Pac J Trop Biomed 2017;7:1129-1150.
10. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J ethnopharmacol 2005;100:72-79.
11. Sutar I, et al. An ethnopharmacological study on *Verbascum* species: from conventional wound healing to scientific verification. J ethnopharmacol 2010;132:408-413.
12. Dülger B, et al. Antimicrobial activity of three endemic *Verbascum* species. Pharm biol 2002; 40:587-589.
13. Grigore A, et al. Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of *Verbascum phlomoides* (mullein). Pharm biol 2013; 51:925-929.
14. Gürbüz I, et al. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). J ethnopharmacol 2005;101: 313-318.
15. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. Sci pharm 2010; 78: 33.
16. Dimitrova P, et al. New iridoids from *Verbascum nobile* and their effect on lectin-induced T cell activation and proliferation. Food Chem Toxicol 2018; 111:605-615.
17. Zhao YL, et al. Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities. Arch of pharm res 2011;34:703-707.
18. Chuang HC, et al. Cytotoxic effects of incense particles in relation to oxidative stress, the cell cycle and F-actin assembly. Toxicol lett 2013; 220: 229-237.