

Rize ve Çevresinde Yetişen Yaban Meyvelerinden Elde Edilen Özütlerin Anti-Proliferatif Etkilerinin Araştırılması

Investigation of Anti-Proliferative Activities of Extracts Derived From Wild Fruits That Grow in Rize Vicinity

Saliha Ekşi¹, Sena Şahin Aktura¹, Nebahat Ejder¹, Kazım Şahin¹

ÖZ

Amaç: Doğu Karadeniz bölgesi, farklı tıbbi ve aromatik bitkileri barındıran zengin bir floraya sahiptir. Rize ve çevresinde başta *Arbutus unedo* (Kocayemiş), *Aronia melanocarpa* (Rus yaban mersini), *Fragaria vesca* L. (Yabani çilek), *Frangula alnus* (Barut ağacı), *Ribes rubrum* (Frenk üzümü) ve *Solanum nigrum* (Köpek üzümü) olmak üzere çeşitli meyveler doğal olarak yetişmektedir. Bu çalışmada, adı geçen meyvelerden elde edilen metanol özütlünün insan retina pigment epitel hücreleri (ARPE-19) ve insan serviks adenokarsinoma hücreleri (HeLa) üzerindeki antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Araçlar ve Yöntem: Meyvelerin metanol özütleri elde edilerek, çeşitli konsantrasyonlarda ARPE-19 ve HeLa hücre kültür ortamlarına eklendi. Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla, Taksol ve DMSO kullanıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrası özütlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler bağımsız örneklem t-testi kullanılarak gerçekleştirildi. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: *R. rubrum* ve *S. nigrum* özütleri iki hücre hattında da doza bağımlı sitotoksik aktivite göstermişler, buna ek olarak *A. melanocarpa* ve *F. vesca* özütleri yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermişlerdir. *A. unedo* ve *F. alnus* metanol özütlünün sadece HeLa üzerinde doza bağımlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Sonuç: *A. unedo*, *A. melanocarpa*, *F. vesca*, *F. alnus*, *R. rubrum* ve *S. nigrum*'un hem ARPE-19 hem de HeLa üzerindeki sitotoksik etkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmıştır. *A. unedo* ve *F. alnus* bitki ekstraktlarının antiproliferatif ve sekonder bileşenlerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Arbutus unedo*, *Frangula alnus*, metiltiazol difenil tetrazolyum, serviks kanseri, sitotoksisite

ABSTRACT

Purpose: Eastern Black Sea region has a rich flora with different medicinal and aromatic plants. In particular, *Arbutus unedo* (Strawberry tree), *Aronia melanocarpa* (Russian bilberry), *Fragaria vesca* L. (Wild strawberry), *Frangula alnus* (Alder dogwood), *Ribes rubrum* (Red currant) and *Solanum nigrum* (Nightshade), various fruits grow indigenous to Rize and its vicinity. The aim of the study was to evaluate the anti-proliferative activity of these fruits on human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) and human cervix adenocarcinoma cells (HeLa).

Materials and Methods: Methanol extracts of the fruits were obtained and added to ARPE-19 and HeLa culture medias at various concentrations. Taxol and DMSO were used as positive and negative controls, respectively. After 48 hours of cell incubation, the cytotoxic effect of the extracts was assessed by MTT. Cell viability values were calculated for each group. The statistical analysis of the data was performed using unpaired t-test. p values less than 0.05 were considered significant.

Results: The extracts of *R. rubrum* and *S. nigrum* showed dose dependent cytotoxic activity against both cell lines. In additions, *A. melanocarpa* and *F. vesca* extracts exhibited cytotoxic effect on both cell lines at higher concentrations. Methanol extracts obtained from *A. unedo* and *F. alnus* were found to decrease cell viability in a dose-dependent manner only in HeLa cells.

Conclusion: The cytotoxic effects of *A. unedo*, *A. melanocarpa*, *F. vesca*, *F. alnus*, *R. rubrum* and *S. nigrum*'un on both ARPE-19 and HeLa were firstly investigated in this study. To underline the antiproliferative effects of *A. unedo* and *F. alnus* extracts as well as their seconder components further studies are needed.

Key Words: *Arbutus unedo*, cervical cancer, cytotoxicity, *Frangula alnus*, methylthiazole diphenyl tetrazolium

Gönderilme tarihi: 12.07.2019; Kabul edilme tarihi: 09.11.2019

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize

Sorumlu Yazar: Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ekşi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Rize, E-posta: saliha.eksi@erdogan.edu.tr

Bu çalışma 22-25 Mart 2018 tarihinde Antalya/Belek'te yapılan Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası Kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

Makaleye atıf için: Ekşi S, Aktura ŞS, Ejder N, Şahin K. Rize ve Çevresinde Yetişen Yaban Meyvelerinden Elde Edilen Özütlerin Anti-Proliferatif Etkilerinin Araştırılması. Ahi Evran Med J. 2019;3(3):104-111.

GİRİŞ

Kontrol edilemeyen hücre bölünmesi olarak tanımlanan kanser, günümüzde dünya çapında bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 yılında dünyada toplam 18.1 milyon yeni kanser vakası ve buna bağlı olarak 9.6 milyon ölüm gerçekleşeceğini rapor etmiştir.¹

Rahim ağzı kanseri (Serviks kanseri), rahmin serviks adı verilen kısmında görülen ve insan papilloma virüsü (HPV)'nün varlığı ile ilişkili olan bir kanser türüdür.² Globocan' nın istatistik verileri, 2018'de serviks kanserine bağlı olarak dünya genelinde 570.000 yeni vaka ve 311.000 ölümün gerçekleşeceğini göstermiştir.³ Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlara neden olan HPV, cinsel açıdan aktif olan kadınlarda daha sık görülür. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türü olarak dünya genelinde her 2 dakikada bir kadının ölümüne neden olmaktadır.^{4,5} Dünyada genellikle 50-59 yaşları arasında görülen serviks kanseri, ülkemizde 40-60 yaş grubunda daha sıklıkla görülmektedir.⁶ Serviks kanseri erken tanı durumunda tamamen tedavi edilebilen bir kanser türü olup, rahim ağzı tarama testi PAP veya son yıllarda önerilen HPV DNA testi uygulanarak kolaylıkla tanısı yapılabilmektedir.⁵

Bitkilerin kanser dahil çeşitli hastalıklarda koruyucu olarak kullanımları insanlık tarihi kadar eskidir.⁷ Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan ilaçların %60'ının bitki kökenli doğal ürünler ve türevleri olduğu bildirilmiştir.⁸ Bundan dolayı literatürde birçok araştırmacı, bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin antikarsinojenik ajan olabileme potansiyellerini araştırmıştır.^{9,10} Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2003 yılı raporunda minimum 400g meyve ve sebze tüketen bireylerin bazı ciddi hastalıklardan korunabileceğini rapor etmiştir.¹¹ Buna ilaveten, literatür kaynakları bitkilerden elde edilen bazı sekonder bileşenlerin serviks kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstererek çoğalmalarını inhibe ettiği saptanmıştır.¹²

Bu çalışmada, Rize ve çevresinde yetişen beş aromatik bitkinin meyveleri toplandı. Bunlardan biri olan *Arbutus* cinsi *Ericaceae* familyasına ait, dört mevsim yeşil kalan, kısa boylu ve meyvesi yenebilen bir çalı türüdür. Buzlanma ve yaz kuraklığının yaşanmadığı Güney, Orta ve Batı Avrupa, Batı Asya ve Kuzeybatı Afrika'da yaygındır.¹³ Bitki ülkemizde ise kıyılarda ormanlık alanlarda doğal olarak yetişmektedir.¹⁴

Bu tür geleneksel olarak halk tarafından kullanılmakta olup meyvelerinin antiseptik, laksatif ve diüretik, yine yapraklarının

vasokonstriktör, üriner antiseptik, antidiyaretik, diüretik, ve depüratif etkilerinin olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.^{15,16} Yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonuçları incelendiğinde kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklara karşı korunma yollarından birinin ağırlıklı olarak sebze ve meyve tüketmek olduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni, bitkisel gıdaların C ve E vitamini gibi antioksidanlar ve fenolik bileşikler bakımından zengin içeriğe sahip olmasıdır.^{16,17}

Arbutus cinsine ait bazı türlerin çeşitli fitokimyasallar, özellikle de polifenol bileşikler bakımından zengin olduğu, bu bileşiklerin kanser riskini azalttığı çeşitli araştırmalarla da rapor edilmiştir.¹⁸

Rosaceae familyasının *Aronia* cinsi Kuzey Amerika'nın doğusu, Florida ve Hindistan'da dağılım göstermektedir. Bu meyvenin en önemli özelliği antosiyaninler, şekerler (glukoz, fruktoz, sükröz), organik asitler, pektinler, fenolik bileşikler, tanen, selüloz ve vitaminler (C, karoten, E, K, PP, B2, B9, folik asit) gibi bileşiklerce zengin olmasıdır.¹⁹ Klorojenik asit, kesretin ve siyanidin serbest radikal temizleyici ve demir şelatörleri olarak etki göstermektedir.²⁰ Meyveler fenolik bileşikler bakımından zengin olup yüksek antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu literatürde bildirilmiştir.²¹ Bunlara ek olarak bazı in vitro çalışmalarda, *Aronida*'dan elde edilen özütlerin antikanser etkili olabileceğini saptamışlardır.²²

Rosaceae familyasının bir diğer üyesi olan *Fragaria* cinsinin anavatanı Kuzey ve Güney Amerika'dır. Doğu Karadeniz bölgesi gibi ılıman ve subtropikal iklime sahip bölgelerde de doğal olarak yetişmektedirler.²³ En çok gıda alanında kullanılmakta olup ayrıca iştah açıcı, antidiyaretik, idrar yolları antiseptiği, açık yaraların kapatılması, derideki sivilce ve lekelere karşı etkilerinden dolayı geleneksel tedavide de kullanılmaktadır.²⁴ İlaç yapımında sıkça kullanılan yapraklarının tanen ve flavanoit türevleri, karbonik ve anorganik asitlerce, meyvelerinin de vitamin, mineral ve uçucu yağ bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Serviks ve kolon kanseri hücre kültürleri üzerinde meyve özütlerinin etkisi incelendiğinde özütün kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve tümörün başlangıç aşamasını durdurduğu bildirilmiştir.²⁵

Rhamnaceae familyasına ait *Frangula* en sık Kuzey Anadolu bölgesinde görülmektedir. Özellikle *Rhamnus frangula pontica* türü yalnızca Doğu Karadeniz bölgesinde Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin illerinde yetişmektedir.²⁶ Kabuk, yaprak ve meyve gibi birçok organı zehirlidir. Yapısında %2 oranlarında antrasen türevi bileşikler içerir. Düşük doz verildiğinde laksatif olarak etki ederken, yüksek

doz verildiğinde antagonist etki oluşturmaktadır. Kabuklarındaki yüksek miktardaki antrakınon bileşeni sayesinde güçlü antioksidan etkinlik gösterir. Avrupa ve Amerika'da bazı türleri; diüretik, laksatif, mide düzenleyici ve spazmolitik etkilerinden faydalanılarak ilaç yapımında kullanılmaktadır.²⁷

Grossulariaceae familyasından *Ribes* cinsinin dünyada 200, Türkiye'de 7 türü bulunmaktadır.²⁸ Çoğunlukla kuzeydoğu Anadolu'da yetişen bu bitkinin yaprakları diüretik ve antiromatizmal, meyveleri ise laksatif olarak, ayrıca mide ve üst solunum yolları rahatsızlıklarında halk tarafından kullanılmaktadır.^{29,30} Vitamin, mineral, fenolik bileşiklerce oldukça zengin olan *R. rubrum* iyi bir antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle halk arasında birçok hastalıkta özellikle de idrar yolları enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır.^{31,32}

Solanaceae familyasının dünya genelinde 85 cins ve 2200' den fazla türü, Türkiye'de ise sadece 9 cins ve 31 türü bulunmaktadır. Bu familyadaki bitkilerden tropan alkaloitleri taşıyan türleri zehirlidir ve ilaç sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır.³³ Bu familyada yer alan *S. nigrum* yaprak ve meyvelerinde solanin alkaloidine sahiptir ve yatıştırıcı/uyuşturucu etki oluşturur. Bu nedenle ağrı kesici olarak astım, epilepsi ve romatizma hastalıklarında kullanılmaktadır. *Solanaceae* familyasındaki bitkilerin temel bileşenlerinin oleik asit, linoleik asit ve palmitik asit olduğu bildirilmiştir.³⁴

Yaban meyvelerinin halk hekimliğinde yoğun olarak kullanılmasından dolayı, biyolojik özelliklerinin tespiti oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada; *A.unedo*, *A.melanocarpa*, *F.vesca*, *F.alnus*, *R.rubrum* ve *S.nigrum*'dan elde edilen metanol özütlerinin kanser (HeLa) ve normal (ARPE-19) hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırıldı.

ARAÇLAR VE YÖNTEM

Bitkisel özütlerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Arbutus spp.* ve *Ribes spp.* halk pazarından satın alınmıştır. Geriye kalan meyve türleri Rize'nin İkizdere ilçesinde, yüksek kesimli ve hava kirliliği oranının az olduğu düşünülen bölgelerden toplanılmıştır. *Aronia spp.*, *Fragaria spp.*, *Frangula spp.* ve *Solanum spp.* cinslerinin meyveleri yaz ve sonbahar aylarında toplanarak özüt yapılıncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir. Donmuş meyveler havanda ezilerek homojen hale getirilmiştir. Meyvelerin metanol özütü, 15-20 gr. homojen meyve materyali ve 100 ml çözücü ile oda sıcaklığında 24 saat karıştırılmış, sonra filtre kağıdından süzülen özütlerin çözücüsü

rotary-evaporator (LabTech EV311) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen özütlerin stok solüsyonları 50 veya 200 mg/ml olacak şekilde dimetil sülfoksitde (DMSO/Santa Cruz Biotechnology) hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır. Özütler ve kontrol DMSO farklı konsantrasyonlarda hücreler üzerine ilave edilerek, 48 saat süre ile 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Hücre Kültürü ve Ekstre Konsantrasyonlarının Uygulanması

ARPE-19 (insan retina pigment epitel hücreleri) Turgut Özal Üniversitesi'nden, HeLa (serviks epitelyum adenokarsinoma) ise Yeditepe Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

Hücre hatları, RPMI (Roswell Park Memorial Institute)/(Biowest), %10 FBS (Fetal bovine serumu)/(Gibco), 100 µg/ml streptomisin/penisilin solüsyonundan oluşan besiyeri ortamında, 37°C'de %5 CO₂ destekli inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesi için, hücreler tripan mavisi (Sigma) ile boyanarak sayım yapılmıştır. Kanser hücre hatlarının (HeLa) hücre yoğunluğu 1x10³/100 µl ve diploid hücre hattı (ARPE-19) 2x10³/100µl hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplytler ekimleri yapılmış ve 24 saat sonra inverted mikroskop ile gözlenerek adere olup olmadıkları gözlemlenmiştir. Adere olmuş sağlıklı kültürlerle test maddelerinin istenilen başlangıç konsantrasyonları ve kontrol maddesi olarak DMSO (%0,4) mikroplytlerin ilk kuyucuklarına eklenerek seri dilüsyonları yapılmıştır (800; 400; 200; 100; 50 µg/ml). Pozitif kontrol olarak tek bir kuyucuğa taksol konularak, mikroplytler %5 CO₂' li inkübatörde, 37°C'de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız üçer kez çalışılmıştır.

MTT Testi

Sitotoksik aktivite 1983'te Mosmann tarafından yayınlanan protokole göre test edilmiştir.³⁵ MTT testi; kolorimetrik bir yöntem olup, hücrelerin canlılığını ve proliferasyonu ölçmede kullanılmaktadır. Yöntem canlı hücrelerdeki mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT/Sigma) boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır.

Meyve özütlerinin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı plakların inkübasyon süreleri sonunda, her bir kuyucuğa daha önce suda çözüldürülmüş ve -20°C'de saklanan MTT stok solüsyonundan (5mg/ml) 10 µl eklenmiştir. Plaklar 4 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda 500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra

kuyucuklardaki vasat çekilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa insoluble formazan kristallerinin çözünmesini sağlayacak 100 µl DMSO ilave edilmiş ve 37°C'deki inkübatörde 10 dakika bekletilmiştir. Absorbans ölçümü öncesinde plaklar çözünmenin tamamen gerçekleşmesi için 150 rpm'de 1-2 dk. plak çalkalayıcısında çalkalanmıştır. Oluşan renk reaksiyonu ELISA cihazında (BioTek ELX800) 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri (O.D) olarak okutulmuştur. Yüzde çoğalma inhibisyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ çoğalma inhibisyonu} = [(Kontrol \text{ O.D} - \text{Örnek O.D}) / Kontrol \text{ O.D} \times 100]$$

Mikroskopik Analizler

Morfolojik analizler 2016'da Ekşi ve ark. tarafından yayınlanmış protokole göre yapılmıştır.³⁶ Kısaca, 500 µg/ml meyve özütleri, vasat, 5 nM taksol ve %0.4 DMSO (kontrol) ile 24 saat 37°C'de inkübe edilen non-transformed (ARPE-19) ve transformed (HeLa) hücreler üzerindeki morfolojik değişiklikler inverted mikroskop (Olympus inverted mikroskobu CKX41, 10X) ile incelenmiş ve sonuçlar fotoğraflanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Deney grupları arasındaki istatistiki önem değeri bağımsız örneklem t-testi kullanılarak belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

MTT bulguları

Şekil 1: Meyvelerden elde edilen metanol özütlerinin non-transformed (ARPE-19) ve transformed (HeLa) hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerini göstermektedir. *Ribes spp.* ve *Solanum spp.* özütlerinin bütün konsantrasyonlarda ARPE-19 ve HeLa hücre hatları üzerinde doza bağlı olarak sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir. *Aronia spp.* ve *Fragaria spp.* özütlerinin ise yüksek konsantrasyonlarda her iki hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki gösterirken, azalan konsantrasyonlarda bu etkinin her iki hücre hattı üzerinde de tamamen kaybolduğu saptanmıştır. *Aronia spp.* metanol özütü 400 µg/ml'de ARPE-19'da %35.64, HeLa'da ise %54.22 çoğalma inhibisyonuna neden olmuştur (Şekil 1, Tablo 1). Bu konsantrasyondaki p=0.0032 hesaplanmış olup, ARPE-19 ve HeLa hücre hatları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Buna ek olarak, *Arbutus spp.* meyve özütü sonuçları değerlendirildiğinde, 800 µg/ml ve 400 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda diploid hücre hattı (ARPE-19) ve serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerinde hafif anti-proliferatif etki gösterdiği ve ARPE-19'da sırasıyla %26.37 ve %14.86; HeLa'da sırasıyla %46.70 ve %37.51 büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Özütün seri dilüsyonlarla konsantrasyonu düşürüldüğünde (200 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml) ARPE-19 hücreleri üzerindeki etkinin tamamen yok olduğu fakat HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin az da olsa devam ettiği tespit edilmiştir. *Frangula spp.* meyve özütü 800 µg/ml dozda HeLa hücrelerinin %63.53'ü inhibe ederken, ARPE-19 hücrelerinin sadece %35.88'inde etkili olduğu bulunmuştur. 400 µg/ml ve alt konsantrasyonlarda diploid hücre hattı (ARPE-19) üzerindeki özüt etkisi yok olurken, serviks kanser hücresi (HeLa) üzerinde ki antiproliferatif etkinin doza bağlı olarak devam ettiği saptanmıştır (Şekil 1, Tablo 1). ARPE ve HeLa hücre hatları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). 400 µg/ml konsantrasyondaki p değeri hesaplanmış ve sonuç 0.0107 olarak bulunmuştur. IC₅₀ değerleri ARPE için hesaplanamazken HeLa hücreleri için bu değer 476 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Morfolojik Değişimlere Ait Bulgular

Bitki özütleri ve kontrollerin non-transformed (ARPE-19) ve transformed (HeLa) hücreler üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler Şekil 2'de sunulmuştur. Pozitif kontrol taksol sadece HeLa hücreleri üzerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu görülmektedir. Sonuçlar ayrıca HeLa hücrelerinin ARPE-19'a oranla *Arbutus spp.*, *Aronia spp.* ve *Frangula spp.* özütlerine karşı daha hassas olabileceğini göstermektedir. *Ribes spp.* ve *Solanum spp.* özütlerinin ise her iki hücre hattı üzerinde de morfolojik etkileri saptanamamıştır.

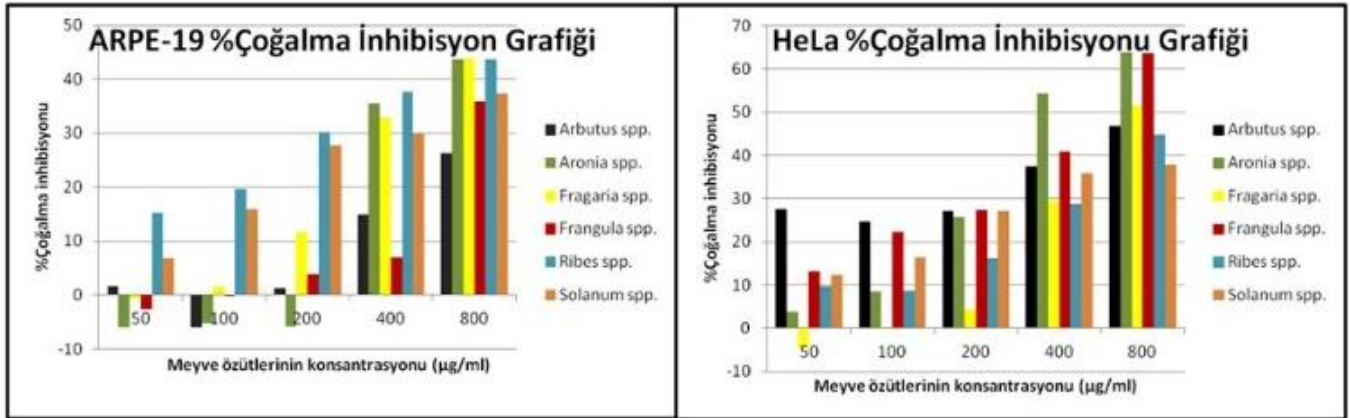
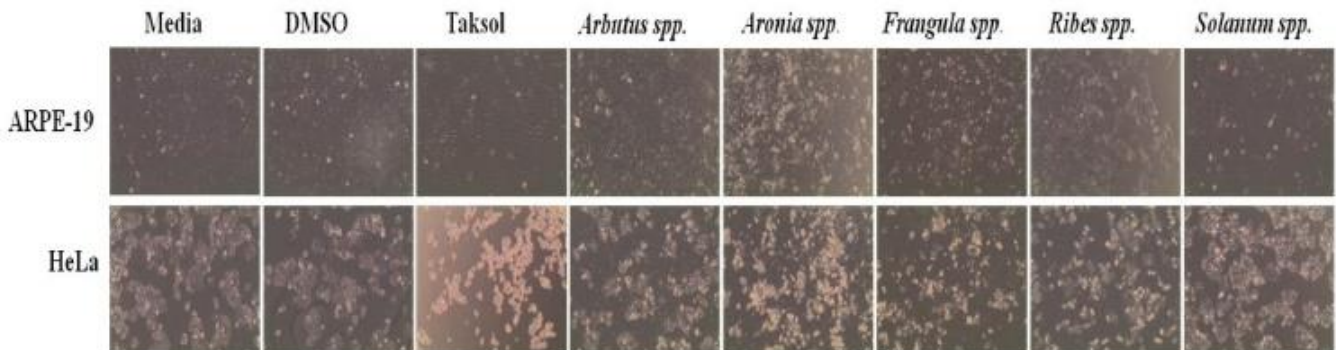
TARTIŞMA

Son yıllarda bitki kökenli moleküller, antineoplastik özelliği olan birçok ilacın hammaddesini oluştursa da daha fazla bitki kaynaklı yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok hastalığın tedavisinde adjuvant etki oluşturmak için kullanılan tıbbi aromatik bitkiler kanser tedavisinde destekleyici olarkten kullanılmaktadır.⁸ Bu bağlamda, çalışmamızda insan ARPE-19 epitel hücreleri ve HeLa serviks kanser hücre hatlarında *Arbutus spp.*, *Aronia spp.*, *Fragaria spp.*, *Frangula spp.*, *Ribes spp.*, ve *Solanum spp.* 'nın meyvelerinden elde edilen metanol özütlerinin sitotoksik etkileri araştırılarak terapötik özelliklerinin olup olmadığını test edilmiştir.

Tablo1. Metanol Özütlерinin Hücreler Üzerindeki % Büyüme İnhibisyonu

HÜCRELER	MEYVE METANOL ÖZÜTLERİ											
	Arbutus		Aronia		Fragaria		Frangula		Solanum		Ribes	
Konsantrason/ $\mu\text{g/ml}$	ARPE	HeLa	ARPE	HeLa	ARPE	HeLa	ARPE	HeLa	ARPE	HeLa	ARPE	HeLa
800	26.37	46.7	43.75	63.74	43.91	51.44	35.88	63.53	37.27	37.83	43.69	44.84
400	14.86	37.51	35.64	54.22	32.92	29.52	7.00	40.90	29.99	35.85	37.75	28.78
200	1.23	27.10	-5.85	25.67	11.62	4.33	3.90	27.28	27.83	27.12	30.28	16.10
100	-5.99	24.58	-5.25	8.47	1.55	-0.20	-0.14	22.23	15.90	16.46	19.57	8.72
50	1.67	27.48	-6.07	3.79	-0.61	-4.62	-2.69	13.07	6.78	12.32	15.20	9.75
IC ₅₀ $\mu\text{g/ml}$	HE	HE	HE	343.4	HE	≥ 800	HE	476.5	HE	HE	HE	HE

HE: hesap edilmedi. Not: (-) hücre çoğalmasının devam ettiğini göstermektedir. IC₅₀ $\mu\text{g/ml}$: Hücrelerin %50'sini öldüren $\mu\text{g/ml}$ 'deki özütl miktarı.

**Şekil 1.** Metanol Özütlерinin Hücreler Üzerindeki % Büyüme İnhibisyonu**Şekil 2.** Metanol Özütlü ve Kontrollerin (Media, DMSO, taksol) Hücreler Üzerinde Oluşturduğu Morfolojik Değişiklikler

Serviks kanseri tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir kısmı bitki kökenli olup, taksol, kamptotesin ve combretatin bunlardan birkaçıdır. Joseph ve ark. (2018) bitkilerden elde edilen özüt veya bileşiklerin serviks kanser hücre hatlarını (HeLa, SiHa, C-33A) apoptozis yolağını indükleyerek bu hücrelerin büyümesini inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir.¹²

Çalışmamızda toplam altı adet bitki kullanılıp non-transformed ve transformed hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bunlardan ikisinin, (*Arbutus spp.* ve *Frangula spp.*) metanol özütlerin HeLa hücrelerindeki mitokondriyal aktivasyon absorbans değerlerini özellikle 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde azalttığı gözlenmiştir. Antiproliferatif etki en fazla 800 µg/ml özüt konsantrasyonunda belirlense de düşük dozlarda non-transformed ARPE-19 hücreleri ile transformed HeLa hücreleri arasındaki büyümeyi engelleyici aktivite farklılığı HeLa hücrelerinde daha belirgin hale gelmiştir (Şekil 1, Tablo 1). Yapılan istatistik analiz sonucunda, transformed ve non-transformed hücreler arasında gözlenen farklılıklar p<0.05 seviyesinde anlamlı bulunmuştur.

Arbutus unedo ile yapılan bazı çalışmalar bu bitkinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili olabileceği gösterilmiştir. Bunlardan bir tanesinde *A.unedo* elde edilen fenolik bileşiklerin kolon kanser hücre hatlarında (HTC-116, LoVo) ROS oluşumunu indükleyerek bu hücrelerin büyümesini inhibe ettiği fakat normal hücre hattı HDF (human dermal fibroblast) üzerinde etkinin daha minimal düzeyde olduğunu göstermişlerdir.³⁷ Olivera ve ark. 2019'da yaptıkları bir çalışmada, bitkinin yapraklarından elde ettikleri bazı spesifik lektinlerin kolon kanser hücre hattı HT29 yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak anti-tümör aktivite gösterdiğini saptanmışlardır.³⁸ Literatürde, lektinlerin hücre yüzeylerindeki glikozillenmiş reseptörlere bağlanarak apoptoz yolağını tetiklediği ve bunun sonucunda anti-tümör etki gösterebildikleri bildirilmiştir.³⁹ Sonuçlarımız literatür bulguları ile paralellik göstermiş olup, *A.unedo*'nun metanol özütünün kanser hücre hattı HeLa hücrelerinde antiproliferatif etkiyi sahip olduğu saptanmıştır.

Çalışmada kapsamında araştırılan değer bir bitki olan *Frangula spp.*, yapısında antranoid denilen aktif bileşenleri bulundurur. Bu madde bitkinin laksatif karakter göstermesinde rol oynar. Kronik kabızlık çeken hastaların uzun süreli antranoid içeren laksatif ilaç kullanmalarının kolorektal kanser riskini arttırdığı keşfedilmiştir.⁴⁰ Buna karşın, tohumlarından elde edilen özütün lenfositik lösemiye (P-388) karşı belirgin anti-lösemik etkisi olduğu açıklanmıştır.⁴¹ Yine 2016 yılında yapılan in vitro bir çalışmada *Frangula spp.*

özütlerinin meme kanseri MCF7 hücre hattın üzerinde sitotoksik etkili olduğunu bulmuşlardır.⁴²

Çalışmamızda *Arbutus spp.* ve *Frangula spp.*'nin ham özütleri kullanılmıştır olup fito-kimyasal içerikleri bilinmemektedir. Dolayısı ile bitki özütlerinin içeriğindeki hangi madde veya maddelerin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkiyi oluşturduğu hakkında değerlendirme yapılamamaktadır.

Çalışmada kullanılan bu iki meyve özütünün HeLa ve ARPE-19 hücrelerinde oluşturduğu büyüme inhibisyonu farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı bulunması, özütlerin anti-tümör ajan potansiyelinin olabileceği düşünülmekte ise de bunun ortaya çıkarılması için daha detaylı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Çalışmada kullandığımız diğer bir bitki olan *Aronia melanocarpa* özütünün pankreas kanseri üzerinde etkili olup kanser hücrelerini apoptoz yolağını tetiklediği ve bu nedenle de *A.melanocarpa*'nın kemoterapi ilaçlarında takviye olarak kullanılabilceği bildirilmiştir.⁴³ Ayrıca kandaki total kolesterolü azalttığı ve insan karaciğer kanser hücresi (HepG2), kolon kanser hücresi (Caco-2) ve serviks kanser hücre hatları (HeLa) üzerinde yüksek anti-proliferatif etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.^{44,45} Çalışmamızda, *Aronia*'nın özellikle yüksek konsantrasyonda HeLa hücrelerinde büyüme inhibisyonuna neden olduğu saptanmış olup, bulgular literatürle uygunluk göstermiştir. Yukarıdaki çalışmalar *A.melanocarpa*'nın polifenol içeriğinin yüksek olduğu ve antiproliferatif etkinin bundan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Ribes sp. ve *Solanum sp.* Özütlerinin bütün konsantrasyonlarında ARPE-19 ve HeLa hücrelerinde doza bağlı olarak canlılığı önemli oranda azalttıkları ve sitotoksik etki gösterdikleri saptanmış olup transformed ve non-transformed hücreler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, çalışmada kapsamında seçilen bitkiler sitotoksik aktivite bakımından araştırılmıştır ve özellikle *A.unedo*, *F.alnus* özütlerinin serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerinde antiproliferatif etkinlikleri saptanmıştır. Çalışmada bitkilerin ham özütleri kullanılmıştır olup fito-kimyasal içerikleri bilinmemektedir. Özütlerin anti-kanser potansiyellerinin olup olmadığının belirlenebilmesi için özüt içeriğindeki etken madde/maddelerin belirlenerek, bunların HeLa veya farklı orjinli hücreler üzerinde test edilerek, hücre içindeki etkin mekanizma/ mekanizmaların ortaya konması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi BAP-2015.53001.106.01.04 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmada kullanılan HeLa hücre hattını bize temin eden Prof. Dr. Muradiye Acar'a ve ARPE-19 hücre hattını sağlayan Prof. Dr. Fikretin Şahin'e teşekkür ederiz.

ÇIKAR BEYANNAMESİ

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKÇA

- WHO: World Health Organization Global cancer. International Agency for Research on Cancer. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf> Erişim tarihi 14 Ekim 2019.
- Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinou A, Kostrikis LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses*. 2018;10(12):729.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
- Ceyhan M. İnsan papilloma virusu (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. *ANKEM Derg*. 2007;21(2):102–104.
- Aydogdu SGM, Özsoy Ü. Serviks kanseri ve HPV. *Androl Bul*. 2018;20(1):25–29.
- T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2015. Yayın No:1054. Ankara: Sistem Ofset Basım Yayın; 2016:36–37.
- Wang H, Khor TO, Shu L, et al. Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(10):1281–1305.
- Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*. 2007;9(12):767–76.
- Uysal A, Zengin G, Durak Y, Aktümsek A. Centaurea pterocaula özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi. *Marmara Pharm J*. 2016;20(3):232–242.
- Uysal A, Gunes E, Sarikurku C, Celik H, Durak Y, Uren MC. New Prospective Materials for Chemoprevention: Tree Phlomis. *Brit J Pharm Res*. 2016;10(3):1–13.
- Baby B, Antony P, Vijayan R. Antioxidant and anticancer properties of berries. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(15):2491–2507.
- Joseph A, Dhanraj K, Ramalingam S, Saravanan R. Treating Cervical Cancer with Herbs: A Review. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(7):4–10.
- Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. Arbutus unedo L.: Chemical and Biological Properties. *Molecules*. 2014;19(10):15799–15823.
- Şeker M, Yücel Z, Nurdan E. Çanakkale Yöresi Doğal Florasında Bulunan Kocayemiş (Arbutus unedo L.) Populasyonunun Morfolojik ve Pomolojik Özelliklerinin incelenmesi. *Tar. Bil. Der*. 2004;10(4):422–427.
- Morgado S, Morgado M, Plácido AI, Roquec F, Duarte AP. Arbutus unedo L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *J Ethnopharmacol*. 2018;225:90–102.
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA. Arbutus unedo L. and its benefits on human health. *J Food Nutr Res*. 2011;50(2):73–85.
- Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira ICFR. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem*. 2010;120(1):247–254.
- Fortalezas S, Tavares L, Pimpão R ve ark. Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (Arbutus unedo). *Nutrients*. 2010;2(2):214–229.
- Rajić JR, Antioksidativnost Bezalkoholnih Pića Na Bazi Voćnih Sokova I Ekstrakta Lekovitog I Aromatičnog Bilja. *Doktorska disertacij, Univerzitet U Beogradu Poljoprivredni Fakultet, Belgrade*, 2018.
- Ciocoiu M, Badescu L, Miron A, Badescu M. The involvement of a polyphenol-rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013(2013):1–8.
- Deneva P, Čižb M, Kratchanovaa M, Blazhevad D. Black chokeberry (Aronia melanocarpa) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chem*. 2019;284:108–117.
- Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S ve ark. Fruits of Black Chokeberry Aronia melanocarpa in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*. 2017;22(6):944.
- Turhan E, Kargı SP. Strawberry Production in Turkey. *Chron Horticult*. 2007;47(2):18–20.
- Doğanoğlu Ö, Gezer A, Yücedağ C. Göller Bölgesi-Yenişarbademli Yöresi'nin Önemli Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Taksonları Üzerine Araştırmalar. *SDÜ Fen Bil Enst Der*. 2006;10(1):66–73.
- McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro. *J Agric Food Chem*. 2008;56(9):3016–3023.
- Dara R. Vefalı Dostların Şifalı Otlarım. 4. Baskı. Türkiye: Alfa Yayınları; 2006.
- Kremer D, Kosalec I, Locatelli M ve ark. Anthraquinone profiles, antioxidant and antimicrobial properties of Frangula rupestris (Scop.) Schur and Frangula alnus Mill. *Bark. Food Chem*. 2012;131(4):1714–1180.
- Heywood VH, Brummitt RK, Culham A, Seberg O. Flowering Plant Families of The World. 2. Edition. Canada: Firefly Books pres; 2007:160.
- Singh A, Lal M, Samant SS. Diversity, indigenous uses and conservation prioritization of medicinal plants in Lahaul valley, proposed cold desert biosphere reserve, India. *Int J Biodivers Sci Ecosyst Serv Manag*. 2009;5(3):132–154.
- Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, South and west Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(1):33–55.
- Güvenç A, Houghton PJ, Duman H, Coşkun M, Şahin P. Antioxidant activity studies on selected Sideritis species native to Turkey. *Pharm. Biol*. 2005;43(2):173–177.
- Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am. J. Med*. 2002;113(1A):14–19.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Solanaceae, Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara; 2007:296–301.
- Dhelli JR, Matouba E, Maloumbi MG. Extraction and Nutritional Properties of Solanum nigrum L. Seed Oil, *Afr. J. Biotechnol*. 2006;5(10):987–991.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
- Eksi S, Ejder N, Yılmaz F, Ertürk A, Sandalli C. PaCaHa inhibits proliferation of human cancer cells in vitro. *Turk J Med Sci*. 2016;46(3):1–5.
- Afrin S, Forbes-Hernandez TY, Gasparini M ve ark. Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(3):613.
- Oliveria I, Nunes A, Lima A, et al. New Lectins from Mediterranean Flora. Activity against HT29 Colon Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(12):3059.

39. Shi Z, Sun R, Yu T ve ark. Identification of Novel Pathways in Plant Lectin-Induced Cancer Cell Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(2):228.
40. Siegers CP, von Hertzberg-Lottin E, Otte M, Schneider B. Anthranoid laxative abuse a risk for colorectal cancer. *Gut.* 1993;34(8):1099-1101.
41. Kupchan SM, Karim A. Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: antileukemic principle isolated from *Rhamnus frangula* L. *Lloydia.* 1976;39(4):223-224.
42. Ahmadi R, Hatami F, Molseghi M. The Effects of Co-administration of *Frangula alnus* and *Rhamnus frangula* Extract on Breast Cancer Cells in Cell Culture. *BIOES-16.* 2016;78-80.
43. Thani NA, Keshavarz S, Lwaleed BA, Cooper AJ, Rooprai HK. Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line AsPC-1. *J Clin Pathol.* 2014;67(11):949.
44. Li B, Gao N, Wang Y, Jiao X, Chou S, Li E. Preparative Purification of Polyphenols from *Aronia melanocarpa* (Chokeberry) with Cellular Antioxidant and Antiproliferative Activity. *Molecules.* 2018;23(1):139.
45. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S ve ark. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules.* 2017;22(6):944.