

NAR MEYVE KABUĞU EKSTRESİNİN MCF-7 HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE İNHİBİTÖR ETKİLERİ

CYTOTOXIC AND INHIBITORY EFFECTS OF POMEGRANATE PEEL EXTRACT
ON PROLIFERATION OF MCF-7 CELLS

Miriş DİKMEN¹, Nilgün ÖZTÜRK², Yusuf ÖZTÜRK¹

¹ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, TÜRKİYE

² Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir, TÜRKİYE

ÖZET

Uzun yıllardır gıda olarak tüketilen nar (*Punica granatum* L), aynı zamanda halk arasında terapötik amaçlarla da kullanılan ve önemli fitokimyasal maddeler içeren değerli bir meyvedir. Bazı çalışmalarda narın, çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde antikanserojenik aktivite gösterdiği açıklanmıştır. Bu çalışmada, nar meyve kabuğu metanol ekstresinin (NKE) farklı konsantrasyonlarının (25, 50, 100, 200 ve 300 µgr/ml), MCF-7 insan meme kanser hücre dizisinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Ekstrenin sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ve nötral kırmızı yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Apoptotik aktivitesi ssDNA (tek zincirli DNA) apoptotik ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuç olarak NKE'nin, konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Apoptotik aktivite de, sitotoksik aktiviteye paralel olarak 48. saatte 100, 200 ve 300 µgr/ml NKE konsantrasyonlarında önemli artış göstermiştir. Bu çalışmada, NKE ekstresinin MCF-7 hücre dizisinde, konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkiler yaparak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlarımızı destekleyecek ve meme kanserinde narın kemopreventif ve kemoterapötik etkilerini açıklayacak ilave moleküler çalışmalara gerek vardır.

Anahtar kelimeler : *Punica granatum*, Apoptotik etki, Sitotoksik etki, MCF-7, Kanser

ABSTRACT

The Pomegranate (Punica granatum L.) is a wonderful fruit which contains a wide variety of precious phytochemical compounds applicable in the fields of therapeutics and health care. Previous studies have demonstrated the anticarcinogenic activity of pomegranate extracts in a series of human cancer cells. In the present study, we investigated cytotoxic and apoptotic effect of pomegranate peel methanol extract on MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. The methanol extract was obtained from pomegranate peel and, pomegranate peel methanol extract (PPE) was evaluated for cytotoxic and apoptotic effects at 25, 50, 100, 200 and 300 µgr/ml concentrations for on human breast cancer cells (MCF-7). Cytotoxic effects of pomegranate on MCF-7 cells were determined by MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) and neutral red uptake assays. The apoptotic activity was measured by ssDNA(single stranded DNA) apoptosis ELISA assay, based on the mAb to single-stranded DNA. PPE had significant (concentration- and time-dependent) cytotoxic and apoptotic effects on MCF-7 cancer cells. Cytotoxicity and apoptotic effects were concentration-time dependent. Specifically, apoptotic effect increased at 100, 200 and 300 µgr/ml concentrations by 48 hours. We found that pomegranate peel extract had antiproliferative and apoptotic effects on the human breast cancer cell lines MCF-7. However, further studies at molecular level are required to support our findings and to elucidate chemopreventive and chemotherapeutic effects of pomegranate on breast cancer.

Key Words : *Punica granatum, Apoptotic effect, Cytotoxic effect, MCF-7, Cancer*

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser tipi olup, tüm kanserlerin %18'ini oluşturmaktadır. Meme kanserinin tedavisi oldukça zordur, çünkü tedavide farklı cevaplar sergileyen, farklı tümör sınıfları vardır. Meme kanser gelişiminde, apoptoz ve hücre proliferasyonu arasında bir dengesizlik söz konusudur. Hücre siklusunun sorunsuz olarak çalışması, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu için önemlidir (1-4). Meme kanseri, kadınlar arasında kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri, semptom göstermeden metastaz yapabilir. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifen'in, meme kanser hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu açıklanmıştır (3). Bu nedenle, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda, tüm dikkat, kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesini temel alan, özellikle doğal ürün ya da bitkileri içeren terapötik etkili yiyecekler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu konuda yapılacak yeni çalışmalar, meyve ve sebzelerden oluşan diyet ile kronik hastalıklar arasındaki mekanizmalara yeni bir bakış açısı ve meme kanserinin tedavisinde potansiyel kanser ilaçlarının oluşumuna yeni yaklaşımlar sağlayacaktır.

Nar gibi polifenolik bileşiklerce zengin gıdaları tüketmenin, kanser riskini azalttığı bilinmektedir (5,6). Nar meyvesi (*Punica granatum L.*) (Punicaceae), sağlık alanında terapötik olarak kullanılabilir değerli fitokimyasal içerdiği için güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu, ayrıca *in vitro* ve *in vivo* olarak bazı kanser hücrelerinde anti-proliferatif, anti-anjiyogenik, anti-invaziv ve proapoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (5-7). Bu çalışmada kullanılan nar meyve kabuğunun da, ellajik asit ve gallik asit başta olmak üzere pek çok polifenolik madde içerdiği tesbit edilmiştir.

Bu çalışmada, nar meyve kabuğu metanol ekstresinin (NKE) farklı konsantrasyonlarının (25, 50, 100, 200 ve 300 µgr/ml), MCF-7 insan meme kanser hücre proliferasyonu üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etki, MTT(mitokondriyal aktivite) ve nötral red (lizozomal aktivite) yöntemleri kullanılarak, apoptotik etki ise ssDNA apoptotik ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitkisel materyal

Bu çalışmada Antalya civarından temin edilen sarı-tatlı nar meyve kabukları kullanılmıştır. Bu amaçla meyveler önce ikiye kesilerek önce suları alınmış, daha sonra kabuk ve iç kısımdaki albedo ayrılmıştır. Elde edilen meyve kabukları açık havada kurutulmuştur.

Ekstraksiyon

Kurutulmuş meyve kabukları kabaca parçalandıktan sonra petrol eteri (40-60°) ile Soxhlet cihazında devamlı ekstraksiyona tabi tutulmuş, bu şekilde apolar bileşiklerden arındırılan drog açık havada kurutulmuştur. Daha sonra elde edilen drog %70 lik MeOH ile 40 °C'de su banyosunda 30 dakika (4 kez) ekstre edilmiş ve süzüntüler rotavaporda 40°C'de yoğunlaştırıldıktan sonra kalan bakiye liyofilize edilmiştir (8,9).

Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (10).

Hücre Kültürü ve Ekstre Konsantrasyonlarının Uygulanması

MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) hücre dizisi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde görevli Doç.Dr.Yusuf Baran'dan temin edilmiştir. Hücreler, %10 FCS, %10 RPMI 1640, %1 penisillin/streptomisin solüsyonundan oluşan besiyeri ortamında, 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe

kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesi için, hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayım yapılmıştır. Yeterli sayıya ulaşan hücreler, 96'lık plakalara her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Nar kabuğu metanol ekstresi, dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözündürülerek, stok solüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok solüsyondan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak 25; 50; 100; 200; 300 µgr/ml ekstre konsantrasyonları hazırlanmıştır (En yüksek konsantrasyonunda DMSO oranı % 0,1). Daha sonra plakaların içindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara besiyeri içerisinde hazırlanan ekstreler uygulanmıştır. Çalışmada, hücrelerin besiyeri ortamında kültüre edildiği 'kontrol' ve besiyeri ortamı % 0,1 oranında DMSO içeren 'DMSO kontrol' grupları da oluşturulmuştur. Daha sonra plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Deneyle bir birinden bağımsız 3 tekrar ve her grup 8 örnek olarak çalışılmıştır.

Sitotoksite Belirleme Yöntemleri :

a. MTT Yöntemi: MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifiktir. Bu yöntemde, canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat-dehidrogenaz enzimi, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri artış göstermektedir (11,12).

MTT stok solüsyonundan, besiyeri ile çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. NKE'nın farklı kaonsantrasyonlarının uygulandığı plakaların inkübasyon süreleri sonunda, plakadaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa MTT çalışma solüsyonundan, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde ilave edilmiştir. Plaka 3-4 saat etüvde inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda plakadaki her bir kuyucuğa, çözücü olarak 100 µl DMSO ilave edilmiştir. Plakaların absorbans değerleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda, her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okutulmuştur. Deney 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

b. Nötral Kırmızısı (NR) Yöntemi: Nötral kırmızısı boyası noniyonik difüzyonla hücre membranından geçerek lizozomlarda birikir. Hücre yüzeyinde ve lizozomal membranda meydana gelen değişiklikler sonucu, nötral kırmızısı boyasının lizozomal matrikste bağlanma ve birikiminde azalmalar meydana gelir. Bu nedenle nötral kırmızısı yönteminin temeli, yaşayan-sağlıklı ve hasarlı-ölü hücrelerin boyayı almalarındaki farklılığa dayanır (13).

Nötral kırmızısı boyasının stok solusyonundan, çalışma solusyonu hazırlanmış ve inkübasyon süreleri sonunda hücrelerin bulunduğu 96'lık plakanın her bir kuyucuğuna; 100µl çalışma solusyonu ilave edilmiştir. Daha sonra plakalar tekrar 3-4 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda plakaların her bir kuyucuğuna okuma solusyonu olan asetik asit-etanol karışımından 150µl ilave edilmiştir. Plakaların absorbans değerleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda, her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okutulmuştur. Deney 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

ssDNA Apoptotik ELISA Yöntemi:

Bu yöntem, formamid ile apoptotik hücrelerdeki DNA'nın seçici denatürasyonuna ve denatüre olmuş tek zincirli DNA (ssDNA: single-stranded DNA) nın da spesifik monoklonal antikorla belirlenmesi temeline dayanır. Formamid sadece apoptotik hücrelerdeki DNA'yı denatüre eder, nekrotik hücrelerdeki DNA'yı denatüre etmez. Apoptotik hücrelerin formamide duyarlılığı, apoptoz olayındaki kromatin yapısındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu yöntemde hücreler 96 kuyucuklu plakaya ekilir, hücreler formamid ile muamele edilir, apoptotik hücrelerdeki ssDNA, primer (birincil) ve peroksidaz işaretli sekonder (ikincil) antikor karışımı ile boyanır. Bu antikor karışımı ile yüksek duyarlılıkta olan ve tek adımda immünoboyama yöntemi uygulanmaktadır (14,15).

Apoptotik etkiyi belirlemek için, ssDNA ELISA (Chemicon International, Germany) kiti kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri 96 gözlü bir plakanın her bir gözüne 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler 37°C de 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda besiyeri uzaklaştırılmıştır. MCF-7 hücreleri üzerinde nar kabuğu metanol ekstresinin 25, 50, 100, 200 ve 300 µgr/ml konsantrasyonları uygulanmıştır. Plakalar 24 ve 48 saat 37°C de %5 lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, tüm grupların besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler 200µl % 80'lik metanol ile 30 dakika fikse edilmiştir. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, plakanın hücre ekimi yapılmayan boş gözlerine pozitif kontrol amacıyla ssDNA içeren pozitif kontrol örnek solusyonundan 100µl konarak, plaka 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda plakanın her bir gözüne, 50 µl formamid ilave edilerek, 10 dakika oda ısısında, 20 dakika da 75°C lik etüvde inkübe edilmiştir. Plakalar buzdolabında soğutulduktan sonra formamid uzaklaştırılmış, 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuk 200µl %3 lük yağsız kuru süt ile 1 saat inkübe edilmiş, süt karışımı uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 100µl antikor karışımı ilave edilmiş ve plaka 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Plaka tekrar PBS ile yıkanmış ve 100µl ABTS (2,2'-AZINO-bis (3-etihylbenziazoline-6 -sulfonic acid) ile 15-60 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon 100 µl stop solusyonu ile durdurularak, mikrolaka okuyucuda, 405 nm'de absorbans değerleri okutulmuştur. Her bir grup 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

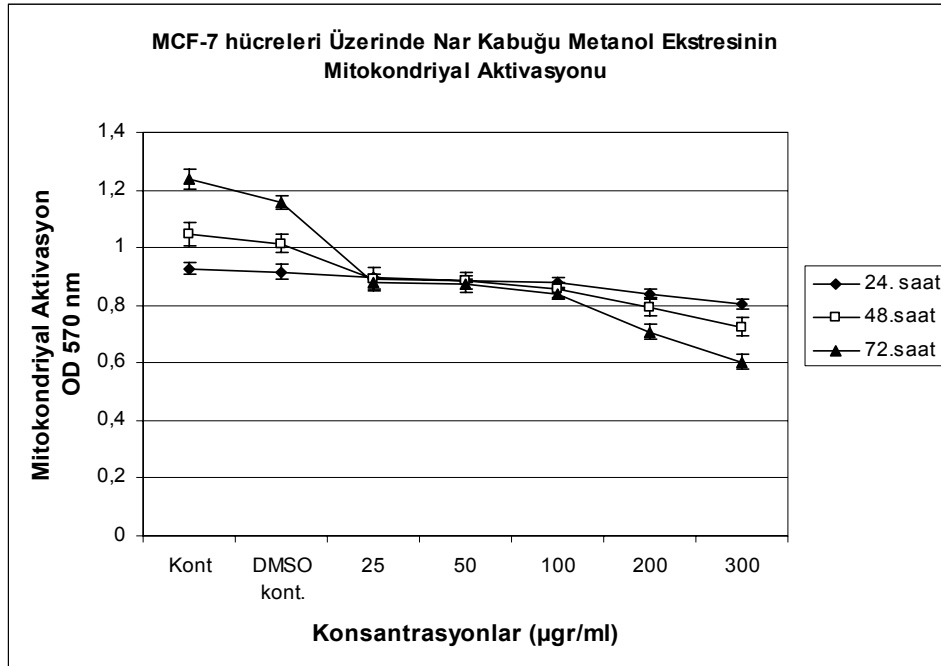
İstatistiksel Analiz

Tüm absorbans sonuçları, SPSS 11,5 (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında ‘ortalama \pm S.E (Standart hata)’ olarak hesaplanmıştır. MTT ve NR değerleri tek yönlü ANOVA ve post hoc olarak Tukey s’b testi, ssDNA ELISA değerleri ise student t testi ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0,05$ fark yok, $p<0,05^*$ fark var, $p<0,01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0,001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

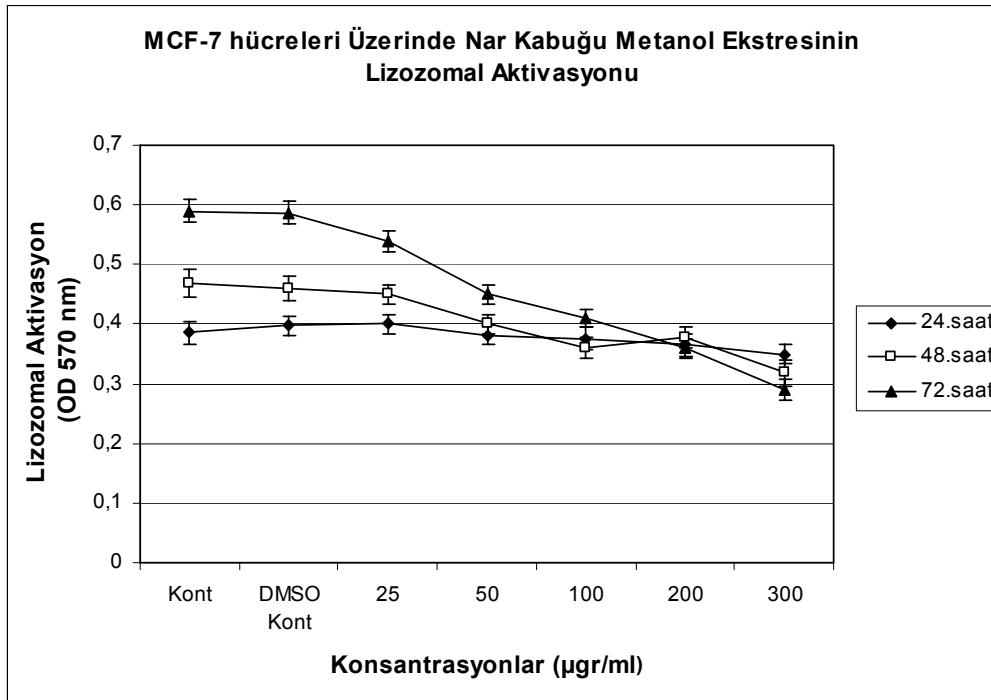
Nar meyve kabuğu metanol ekstresinde Folin Ciocalteu yöntemiyle tayin edilen gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarı 331.28 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Şekil 1’de görülen MTT sonuçlarına göre, nar kabuğu ekstresi MCF-7 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki göstermiştir. Sitotoksik etki, istatistiksel olarak kontrole göre, 24. saatte 25 $\mu\text{gr/ml}$ konsantrasyonda $p<0.01$ ve 50, 100, 200 ve 300 $\mu\text{gr/ml}$ konsantrasyonlarda da $p<0.001$; 48. saatte 25, 50, 100, 200 ve 300 $\mu\text{gr/ml}$ konsantrasyonlarda $p<0.001$; 72. saatte de 25, 50, 100, 200 ve 300 $\mu\text{gr/ml}$ konsantrasyonlarda $p<0.001$ olarak belirlenmiştir. Kontrol ve DMSO-kontrol arasındaki istatistiksel farklılık ise anlamsız ($p>0.05$) olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Nar meyve kabuğu metanol ekstresinin MCF-7 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Ortalama değerler \pm SE. (n:8).

Şekil 2’de görüldüğü gibi, nötral kırmızısı yöntemi ile lizozomal aktivasyon sonuçlarına göre, nar kabuğu ekstresi, MCF-7 hücreleri üzerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. Sitotoksik etkinin istatistiksel olarak kontrole göre, 24. saatte 50, 100 ve 200 µgr/ml konsantrasyonlarda $p<0.05$ ve 300 µgr/ml konsantrasyonda da $p<0.01$; 48. saatte 25 µgr/ml ekstre konsantrasyonunda $p<0.05$ ve 50, 100, 200 ve 300 µgr/ml konsantrasyonlarda $p<0.001$; 72. saatte de 25, 50, 100, 200 ve 300 µgr/ml konsantrasyonlarda $p<0.001$ olduğu belirlendi. Kontrol ve DMSO-kontrol apoptotik absorbans değerleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.



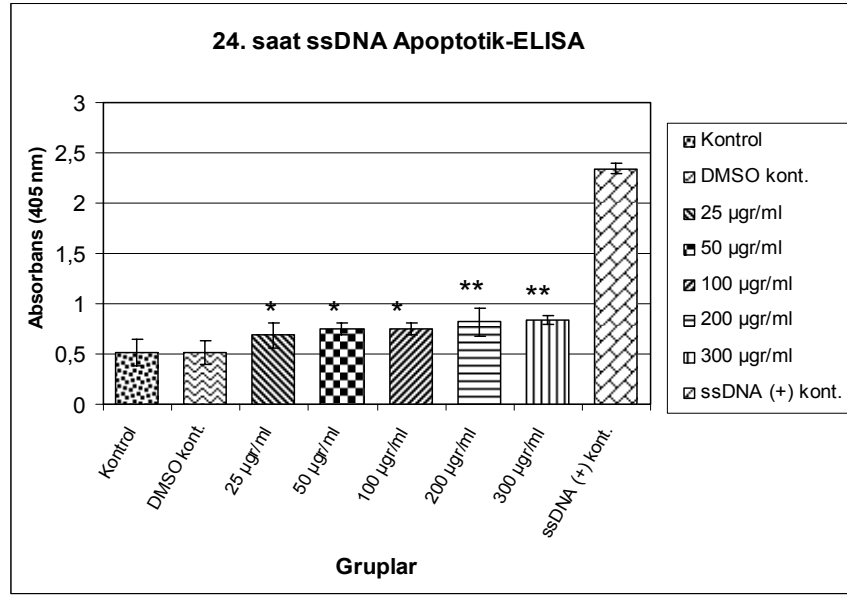
Şekil 2. Nar meyve kabuğu metanol ekstresinin MCF-7 hücre dizisinde sitotoksik etkisinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi .Ortalama değerler± SE. (n:8).

Şekil 3’de görüldüğü gibi, MCF-7 hücrelerinde apoptotik absorbans değerlerinde kontrol grubuna göre, 24. saatte 25, 50 ve 100 µgr/ml NKE konsantrasyonlarında $p<0.05$; 200 ve 300 µgr/ml konsantrasyonlarında da $p<0.01$ değerinde istatistiksel artış görülmüştür. Ancak bu absorbans artışı, ssDNA (+) kontrol değeri kadar belirlenmiştir. Kontrol ve DMSO-kontrol apoptotik absorbans değerleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Şekil 4’de görüldüğü gibi, ssDNA Apoptosis ELISA yöntemi ile MCF-7 hücreleri üzerinde 48. saatte, kontrol grubuna göre, 50 ve 300 µgr/ml ekstre konsantrasyonunda apoptotik absorbans bakımından istatistiksel anlamlılık $p<0.01$ iken, 100 ve 200 µgr/ml

konsantrasyonlarda $p<0.001$ olarak belirlenmiştir. 48. saatteki apoptotik etki değerlerinin, 24. saatteki değerlerden daha fazla olduğu görüldü. 25 $\mu\text{gr/ml}$ ekstre konsantrasyonunda ise apoptotik değer kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol ve DMSO-kontrol apoptotik absorbans değerleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamsız ($p>0.05$) olarak belirlenmiştir.

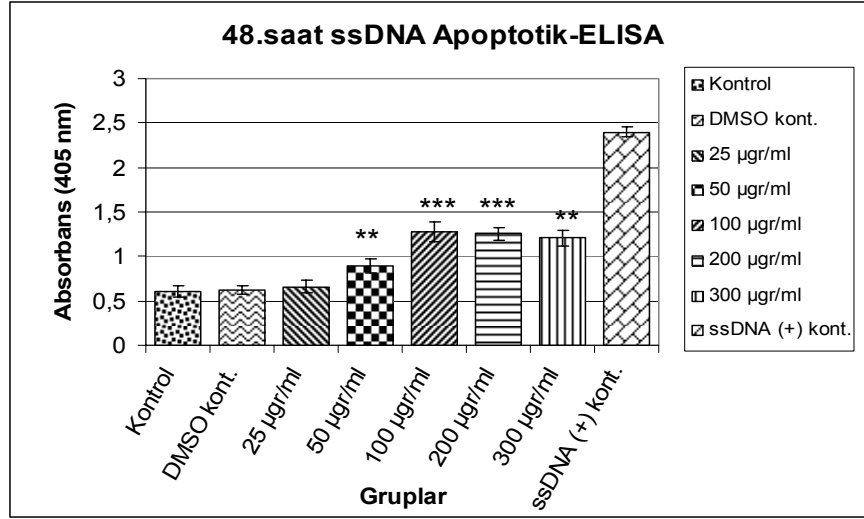
Gruplara ait 24 ve 48. saatlerdeki ssDNA apoptotik ELISA bulgularımız, MTT ve NR sitotoksisite sonuçlarımız ile paralellik göstermiştir.



Şekil 3. MCF-7 hücre dizisinde, nar kabuğu metanol ekstre konsantrasyonlarının 24 saatlik apoptotik etkisi.

Ortalama değerler \pm SE (n=3; $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$).

Çalışmamızın kontrol grubunda gözlenen ortalama apoptotik absorbans değerleri, hücre bölünme döngüsü sırasında beklenen spontan apoptozisi göstermektedir. Özellikle kontrol grubu MCF-7 hücrelerindeki 0.45 ± 0.07 ortalama apoptotik absorbans değerinin, %3-4 oranında spontan apoptozisi gösterdiği açıklanmıştır. Yöntemde kullanılan ssDNA (+) kontrol grubu ise absorbans değerine bakılarak yöntemin düzgün ve hassas çalıştığı bir göstergesi olarak kullanılmıştır (15,16).



Şekil 4. MCF-7 hücre dizisinde, nar kabuğu metanol ekstre konsantrasyonlarının 48 saatlik apoptotik etkisi.

Ortalama değerler± SE (n=3; p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***).

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Bu çalışma, insan MCF-7 meme kanser hücrelerinde nar meyve kabuğu metanol ekstresinin, sitotoksik ve apoptotik etkilerini değerlendirerek, terapötik özelliğinin olup olmadığını araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları, NKE'nin, MCF-7 kanser hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkili olduğunu göstermiştir. Mitokondrial ve lizozomal aktivasyon absorbans değerleri özellikle 48 ve 72. saatlerde, 100, 200 ve 300 µgr/ml ekstre konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde azalmıştır. Apoptotik etkideki en fazla artış ise, 48.saatte 100, 200 ve 300 µgr/ml NKE konsantrasyonlarında belirlenmiştir.

Nar meyve kabuğu, kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden, ellajik asit ve gallik asit gibi taninlerin önemli bir kısmını içermektedir (7,17,18). MCF7 ve MB-MDA-231 hücre dizilerinde, fermente olmuş nar meyve suyu polifenollerinin, taze meyve nar suyuna göre 2 kat daha fazla antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (18).

Nar ekstrelerinin, bazı kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etki yaptığını açıklayan çalışmalar mevcuttur (17-20). Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, bir çalışmada (5), nar ekstreleri ve genisteinin MCF-7 hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir. İnsan PC3 prostat kanser hücresi ile yapılan bir çalışmada (21), nar meyve suyu ekstresinin antiproliferatif ve proapoptotik özelliği olduğu açıklanmıştır. Nar meyve suyu ekstresinin özellikle, 10-100 µgr/ml konsantrasyon ve 48 saatlik inkübasyonu sonunda, doza bağımlı olarak PC3 hücrelerinde, hücre

canlılığı/hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu arttırdığı belirtilmiştir. Yine A549 akciğer kanser hücre dizisinde nar meyve ekstresinin, hücre büyümesi üzerinde inhibitör etkileri olduğu açıklanmıştır (19). Özellikle nar meyve ekstresinin 50-150 µgr/ml konsantrasyon aralığında ve 72 saatlik inkübasyonu sonucunda, MTT ve tripan mavisi yöntemleri kullanılarak, hücre canlılığının önemli oranda azaldığı ve sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Nar meyve ekstresinin A549 hücrelerini konsantrasyona bağımlı olarak hücre siklusunun G₁ fazında durdurduğu, bunu da CKI-siklin-cdk sistemini düzenleyerek, MAPK, NFκB ve PI3K/Akt sinyal iletimini inhibe ederek yaptığı açıklanmıştır (19).

Sonuçlarımız, nar meyve ekstresinin MCF-7 hücre dizisinde, konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkiler yaparak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarımızı destekleyecek, nar meyve kabuğu ekstresi ve içermiş olduğu polifenollerle ilgili olarak, meme kanserinde nar meyve kabuğunun kemopreventif ve kemoterapötik etkilerini açıklayacak ilave moleküler çalışmalara gerek vardır.

TEŞEKKÜR:

Bu çalışma, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (BAP No 060314). Projenin hücre kültürü çalışmaları Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) da gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre dizisinin temini için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Yusuf Baran'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Sun, J., Liu, R.H. “Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells” *Cancer letters*, **20**,1-11 (2005).
2. Lowe, S.W., Lin, A.W. “Apoptosis in cancer” *Carcinogenesis*, **21**(3),485-495 (2000).
3. Patron, M., Dowsett, M., Smith, L. “Studies of apoptosis in breast cancer” *BMJ.*, **322**,1528-15325 (2001).
4. Yu, Z., Zhang, L., Wu, D., Liu, F. “Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **62**,441-446 (2005).
5. Jeune, M.A., Kumi-Diaka, J., Brown, J. “Anticancer activities of pomegranate extracts and genistein in human breast cancer cells” *J Med Food.*, **8**(4),469-75 (2005).

6. **Kawaii, S., Lansky, E.P.** “Differentiation- promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic Leukemia cells” *Journal of Medicinal Food*, 7(1),13-18 (2004).
7. **Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena B.S.,** “Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts” *Food Chemistry*, **80**(3), 393-397 (2003).
8. **Öztürk, N., Tunçel, M., Potoğlu-Erkara, İ.** “Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of some *Hypericum* ssp.: A Comparative Study with *H. Perforatum*” *Pharm Biol* **47**(2), 120-127 (2009).
9. **Tsao, R., Den, Z.** “Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals” *J Chromat B*, **8**, 85–99 (2004).
10. **McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards, K.** “Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts” *Food Chemistry* **73**, 73-84, (2001).
11. **Fotakis, G., Timbrell, J.A.** “In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride” *Toxicology Letters*, **160**, 171–177 (2006).
12. **Van de Loosdrecht, A.A., Beelen, R.H., Ossenkoppele, G.J., Broekhoven, M.G., Langenhuijsen, M.M.** “A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia” *J. Immunol. Methods* , **174**, 311-320 (1994).
13. **Guillermo, R., Peso, A., Zurita, J.L.** “Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity” *Nature Protocols*, **3**, 1125 – 1131 (2008).
14. **Frankfurt, O.S., Krishan, A.** “Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin” *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 369-378 (2001).
15. **Frankfurt, O.S., Krishan, A.** “Apoptosis enzyme-linked immunosorbent assay distinguishes anticancer drugs from toxic chemicals and predicts drug synergism” *Chemico-Biological Interactions*, **145**, 89-99 (2003).
16. **Frankfurt, O.S., Seckinger, D., Sugarbaker, E.V.** “Pleiotropic drug resistance and survival advantage in leukemic cells with diminished apoptotic response” *Int. J. Cancer.*, **59**, 217-224 (1994).
17. **Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D.** “In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid

and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice” *J Nutr Biochem.*, **16**(6), 360-7 (2005).

18. **Kim, N.D, Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E.** “Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer” *Breast Cancer Res Treat.*, **71**(3), 203-17 (2002).
19. **Khan, N., Hadi, N., Afaq, F., Syed, D.N., Kweon, M.H., Mukhtar, H.** “Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice” *Carcinogenesis*, **28**(1), 163-73 (2007).
20. **Rettig, M.B., Heber, D., An, J., Seeram, N.P., Rao, J.Y., Liu, H., Klatte, T., Beldegrun, A., Moro, A., Henning, S. M., Mo, D., Aronson, W. J., Pantuck, A.** “Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism” *Mol Cancer Ther.* ,**7**(9), 2662-71 (2008).
21. **Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed, D.N., Mukhtar, H.** “Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer” *Proc Natl Acad Sci.*, **102**(41), 14813-8 (2005).

Received: 13.01.2010

Accepted: 16.02.2010