

# Carpobrotus Acinaciformis L. Metanol Ekstresinin Fitokimyasal Taraması ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

## Phytochemical Screening of *Carpobrotus Acinaciformis* L. Methanol Extract and Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effect of the Extract on the Human Metastatic Breast Cancer (MCF-7) and Human Colon Cancer (Caco-2) Cells

Tülay AŞKIN ÇELİK<sup>1</sup>, Özlem Sultan ASLANTÜRK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Merkez Kampüs, 09010, Aydın-TÜRKİYE

### Öz

Bu çalışmanın amacı, *C. acinaciformis* L. (makas otu) bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinde (ME) fitokimyasal madde taramasının yapılması, ekstrenin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktivitesi ve *in vitro* sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Ekstrede bulunan fitokimyasallar standart metod ve HPLC analizi kullanılarak belirlenmiştir. *C. acinaciformis* ME, antioksidan aktivitesi (DPPH radikalini süpürme, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürme ve metal şelatlama assay), metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi MTT assay ile apoptotik etkisi ise DNA difüzyon assay ile belirlenmiştir.

Yapılan kalitatif fitokimyasal tarama test sonuçlarına göre; *C. acinaciformis* ME’de fenoller, taninler, flavonoidler ve antrakınon’ların bulunduğu, alkaloid ve saponinlerin ise bulunmadığı belirlenmiştir. Ekstrede bulunan toplam fenolik madde miktarı 61.26 ± 0,110 mg GAE/g ekstre olarak hesaplanmıştır. ME’nin denenen bütün konsantrasyonlarda (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml) yüksek seviyede DPPH radikalini süpürme aktivitesine sahip olduğu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürme aktivitesinin çok düşük olduğu, metal şelatlama aktivitesinin ise bulunmadığı belirlenmiştir.

ME, MCF-7 hücreleri üzerinde oldukça yüksek oranda sitotoksik etki göstermiş (p<0.05), Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ise daha düşük oranda olmuştur. ME’nin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptotik etki de sitotoksik etkiye benzerlik göstermiştir. Metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, Caco-2 hücrelerine nazaran daha fazla olmuş ve aradaki farkın istatistik açıdan da önemli olduğu bulunmuştur (p<0.05).

**Anahtar Kelimeler:** *Carpobrotus acinaciformis*, antioksidan aktivite, sitotoksik etki, apoptotik etki, fitokimyasal tarama

### Abstract

Medicinal plants constitute an integral part of traditional healing customs in traditional culture. Many plants synthesize substances that are useful to the maintenance of health in humans and other animals. The demand for medicinal plants is currently increasing in both developed and developing countries for various reasons. For some it would be the growing recognition that natural products have fewer or even no side effects; for others it would be their accessibility and affordable costs that would tip the scales. A large number of extracts of plants, as well as some pure compounds isolated from these plants, have been screened for cytotoxicity against a wide range of cell lines. Such studies are necessary to determine whether biological activity is a specific phenomenon or whether it should be merely attributed to nonspecific toxicity. However, scientific data on biological effects and mechanisms of action of extracts from medicinal plants are still insufficient.

Cytotoxicity is a complicated process in human and animal systems, potentially involving direct cellular damage (e.g., with a cytotoxic anticancer agent, plant extracts) and other systemic effects. As it is difficult to measure cytotoxic effects *in vitro*, most assays investigate effects at the cellular level. Cells may die by necrosis, apoptosis, or autophagy (self-digestion), or they may cease proliferating (cytostasis) or become terminally differentiated. Cytotoxicity tests are therefore still useful, and new drugs, cosmetics, and food additives must be subjected to extensive cytotoxicity testing. *In vitro* tests are carried out widely in current ethnopharmacological research. The choice of assay to use when investigating cytotoxicity depends on the nature of the test substance, the expected response, and the target cell.

Cell growth or survival, the traditional measure of cytotoxicity, can be measured in various ways, including evaluating the net change in population size, a change in cell mass (total protein or DNA) or metabolic activity (e.g., DNA, RNA, or protein synthesis, MTT reduction). General viability criteria for cell cultures can also be divided in terms of the indicator and method of evaluation used.

Identification of medicinal plants with significant cytotoxic potential useful for the development of cancer therapeutics has gained increasing importance in the last decade, and research in this field is still expanding. Cancer is a public health problem all over the world. Herbal medicines have a vital role in the prevention and treatment of cancer and large numbers of plants and their isolated constituents have shown potential anticancer activity.

*Carpobrotus acinaciformis* (Aizoaceae) is a succulent plant, commonly found in the Mediterranean, living in salty soils, known for its resistance to cold, cold and thirst. It is known among the people as "makas otu" and "kaz ayağı" in our country. Extracts from *C. acinaciformis* plants are common in various countries including sinusitis, diarrhea, eczema in children and tuberculosis treatment; fresh leaves are used externally for mouthwashes, mouthwashes, lotions and antiseptic water.

In this study, qualitative phytochemicals were extracted from methanol extracts obtained from the aerial part of the *C. acinaciformis* plant, which is very uncommon in our country and very little information about secondary minerals. The phytochemicals present in the methanol extract (ME) were determined used standard methods and HPLC. ME of *C. acinaciformis* were tested for antioxidant activity by using DPPH radical scavenging, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and metal chelating assays. In vitro cytotoxic, apoptotic and necrotic effects of ME of *C. acinaciformis* on MCA-7 (human metastatic breast cancer) and Caco-2 (human colon cancer) cancer cell lines by using MTT assay, and apoptotic effect by using DNA diffusion assay.

As a result of qualitative phytochemical screening of ME of *C. acinaciformis* phenols, tannins, flavonoids and anthraquinones were detected but, alkaloids and saponins were not present. The total phenolic substance amount in the ME was calculated as 61.26 ± 0.110 mg GAE/g extract. ME was found to have high DPPH radical scavenging activity at all tested concentrations (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml and 1000 µg/ml), but very low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity and no metal chelating activity.

ME showed significantly high cytotoxic effect in MCF-7 cells (p < 0.05), while the cytotoxic effect on Caco-2 cells was lower. The apoptotic effect of ME on MCF-7 and Caco-2 cells was similar to the cytotoxic effect. The apoptotic effect of ME on MCF-7 cells was higher than that of Caco-2 cells and the difference was statistically significant (p < 0.05).

In vitro findings suggest that *C. acinaciformis* methanol extract may be used as a potential cytotoxic agent for DNA damage to breast cancer due to its strong cytotoxic and apoptotic effect on MCF-7 cells, and that it is a good candidate for herbal sources for breast cancer treatment and cancer therapy. However, it is necessary to study compounds in more detail, especially in the methanol extract.

**Keywords:** *Carpobrotus acinaciformis*, antioxidant activity, cytotoxic effect, apoptotic effect, phytochemical screening

## I. GİRİŞ

Tıbbi bitkiler ve tıbbi bitkilerden elde edilen ekstre, drog gibi ürünler tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler, özellikle antioksidan moleküller açısından zenginliği nedeniyle birçok çalışmanın odak noktası olmuş ve doğal antioksidanların araştırılmasına karşı gösterilen ilgi artmıştır. Ancak, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraların biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilimsel veriler hala yetersizdir. Ülkemiz çok zengin bir bitki örtüsüne sahip olmasına rağmen bu kaynakların çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmadığı, buna bağlı olarak da büyük bir parasal kaynağın yurtdışına aktarıldığı bilinmektedir.

Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan ve sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere fitokimyasallar (bitki kimyasalları) adı verilir [1]. Fitokimyasallar insan vücudunda barsak florasını, safra asitlerini ve pH'yı düzenledikleri gibi, intrasellüler matrikslerin bütünlüğünün sağlanmasına yardımcı olarak, hücrenin dış etkenlere karşı korunmasını da sağlarlar. Ayrıca enzimlerin aktivitesini arttırarak tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rol oynayan serbest radikallerin ve nitrozaminin oluşumunu engelleyici etkileri de bulunmaktadır [2].

Meyve, sebze ve bitkilerde bulunan doğal biyoaktif maddelerin kullanımı dünya çapında bir önemli hale gelmiştir [3-5]. Biyoaktif maddelerden bazılarının kanser önleyici ya da terapötik ajan olarak işlevleri olduğu [6-8], apoptotik hücre ölümünü başlatarak ve hücre siklusunun ilerlemesini engelleyerek kemoterapötik aktiviteye sahip oldukları ve biyoaktif maddelerin tümör hücrelerinde ortaya çıkardığı apoptozis indüksiyonunun, tümör tedavi yeteneğinin bir göstergesi olarak kabul edildiği belirtilmektedir [9-11].

*Carpobrotus acinaciformis* (Aizoaceae) Akdeniz Ülkeleri'nde yaygın olarak bulunan, tuzlu topraklarda yaşayan, sıcağa, soğuğa ve susuzluğa karşı dayanıklılığı ile bilinen, sukulent bir bitkidir. Ülkemizde halk arasında "makas otu" ve "kazayağı" olarak bilinmektedir. *C. acinaciformis* bitkisinden elde edilen ekstralar çeşitli ülkelerde geleneksel tıpta sinüzit, diyare, çocuklardaki egzama ile tüberküloz tedavisinde dahilen; taze yapraklarının suyu gargara, losyon ve antiseptik olarak ağız sağlığı için de haricen kullanılmaktadır [12].

*Carpobrotus* türlerinin flavonoidler, tanenler, alkaloidler, fitosteroller ve aromatik asitler gibi fitokimyasallar

(rutin, neohesperidin, hyperoside kateşin ve ferulik asit gibi flavonoidler) içerdiği ve bu kimyasalların antimikrobiyal, antioksidan, anti-enflamatuar aktivite gibi biyolojik özelliklere sahip oldukları daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir [13, 14].

Bu çalışmada, ülkemizde kullanımı pek yaygın olmayan ve sekonder metabolitleri hakkında çok az bilgi mevcut olan *C. acinaciformis* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinde kalitatif fitokimyasal madde taraması yapılmış ve metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikalini süpürme ile hidrojen peroksit süpürme ve metal şelatlama aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca, bitkiden elde edilen metanol ekstresinin MCF-7 (insan metastatik meme kanseri) ve Caco-2 (insan kolon kanseri) kanser hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

## II. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. C. acinaciformis'in Toplanması ve Metanol Ekstresinin Elde Edilmesi

*C. acinaciformis* bitkisi toprak üstü kısımları Adnan Menderes Üniversitesi, Merkez Kampüsü'nden 2011 yılı haziran ayında toplanmış, temizlenerek oda sıcaklığında ve gölgede kurutulmuştur. 50 g kuru bitki örneğinden metanol ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen ekstre filtre kağıdından süzülerek, evaporatörde 68 °C'de metanolü uçurulmuştur. Elde edilen stok ekstre denemelerde kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### 2.2. Fitokimyasal Madde Miktarının Belirlenmesi

Metanol ekstresinde bulunması muhtemel başlıca fitokimyasal grupları belirleyebilmek için, fitokimyasal madde (fenoller, taninler, steroidler ve terpenoidler, alkaloidler, saponinler ve flavonoidler) miktarının belirlenmesi için, Ravishankara et al (2002) ve Dominiquez (1974)'in belirlediği yöntemler kullanılmıştır [15, 16].

### 2.3. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

*C. acinaciformis* metanol ekstresinin fenolik madde miktarının analizi, fenolik bileşiklerin FolinCiocalteu's çözeltisinde bulunan fosfotungustik ve fosfomolibdik asitlerin kompleks polimerik iyonları ile oksidasyonu sonucu oluşan mavi renkli molibden-tungsten kompleksinin konsantrasyonunun 760 nm dalga boyunda ölçülmesi ilkesine dayanan, Folin-Ciocalteu's spektrofotometrik yöntemine göre, kolorimetrik olarak tayin edilmiştir.[17]. Çalışmada standart fenolik bileşik olarak gallik asit

kullanılmıştır. Ekstrenin absorbansları UV Spektrofotometresi'nde 760 nm'de okunarak toplam fenol miktarları; gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite(mg GAE/g ekstrakt) eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

### 2.4. Metanol Ekstresinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC ile Analizi

*C. acinaciformis* metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenmesi için yapılan analizler, Ege Üniversitesi EBİLTEM Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi Agilent 110 series, DAD detektörü (diode array detection) ve, EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-10 C-18 tipi kolon kullanılarak 25 °C'de yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 0.5 ml'dir. Deteksiyon ise 282 ve 350 nm'de yapılmıştır. 0.1 % formik asit, su ve 0.1 % formik asit, asetonitril çözücü olarak kullanılmış ve analiz izokritik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde standart olarak, neohesperidin, uvaol, rutin ve β-sitosterol kullanılmıştır.

### 2.5. Serbest Radikal Süpürme Aktivitesinin DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ile Belirlenmesi

Metanol ekstresinin serbest radikal süpürme aktivitesi, DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) Brand-Williams ve ark. (1995)'na göre belirlenmiş [18] ve ekstrenin absorbans değeri 517 nm'de okunmuştur. Düşük absorbans değeri, yüksek orandaki serbest radikal süpürme aktivitesini göstermektedir. Çalışmada standart (kıyaslama maddesi) olarak bir flavonoid olan "rutin" kullanılmıştır. Ekstrenin denenen konsantrasyonlarının % DPPH radikal süpürme aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ DPPH Radikal Süpürme Aktivitesi} = \left[ \frac{\text{Kontrolün absorbansı} - \text{Örneğin absorbansı}}{\text{Kontrolün absorbansı}} \right] \times 100$$

DPPH'nin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstre konsantrasyonu IC<sub>50</sub> olarak tanımlanır. Çalışmamızda bu değer, denemede kullanılan ekstre konsantrasyonlarına karşı % serbest radikal süpürme aktivite değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplanmış ve sonuç IC<sub>50</sub> = µg/mL olarak ifade edilmiştir.

### 2.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Metanol ekstresinin hidrojen peroksit süpürme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemine göre belirlenmiştir [19]. Çalışmada standart antioksidan olarak askorbik asit kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 3 ml metanol ekstresi ve askorbik asit çözeltisi üzerine fosfat tamponunda (0,1 M pH 7,4) hazırlanmış 1 ml 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi eklenmiştir. Kontrol ise, 3 ml fosfat tamponu ve 1 ml 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır. İçerisinde çözelti bulunan tüpler vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 230 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ekstre konsantrasyonlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürme aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak belirlenmiştir:

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ süpürme aktivitesi} = 1 - \left[ \frac{\text{Örneğin absorbanı}}{\text{Kontrolün absorbanı}} \times 100 \right]$$

### 2.7. Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda (100, 250, 500 ve 1000 µg/ml) hazırlanan metanol ekstresinin demir (Fe<sup>2+</sup>) iyonlarını şelatlama aktivitesi Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemle yapılmıştır [20]. 3 ml metanol ekstresi içerisine 150 µg 2 mM FeCl<sub>2</sub> çözeltisi eklenmiş, oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyondan sonra, çözeltiye 5 mM 200 µg ferrozin çözeltisi eklenerek, karışım vortekslenmiştir. Karışım 10 dakika daha oda sıcaklığında bekletildikten sonra, sonuçlar 562 nm'deki absorbanı ferrozin hariç geriye kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedilmiştir. Kontrol olarak metanol ekstresi yerine 3 ml distile su, standart şelatlayıcı ajan olarak da Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) kullanılmıştır. Ferrozin-Fe<sup>2+</sup> kompleksinin metanol ekstresi tarafından inhibe edilme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şelatlama Aktivitesi (\%)} = 1 - \left[ \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Kontrolün Absorbansı}} \times 100 \right]$$

### 2.8. MCF-7 ve Caco-2 Kanser Hücrelerinin Çoğaltılması

Bu çalışmada kullanılan insan meme kanseri (MCF-7, ATCC® HTB-22) ve insan kolon kolorektal kanser hücre hatları (Caco-2, ATCC® HTB-37), Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ADÜ-BLTEM)'inden temin edilmiştir. Bu hücre hatlarının seçilme nedeni, meme ve kolon kanserlerinin ülkemizde de sık görülen kanser türleri arasında olması ve çok sayıda hastanın tedavisi için yeni ajanlara gereksinim duyulmasıdır.

Hücreler kendilerine özgü besi ortamlarında (MCF-7 için; 200 mM L-Glutamin, 10 mM essensiyel olmayan amino asit, 100 mM sodyum pruvat ve % 10 FBS içeren DMEM; Caco-2 için; 200 mM L-Glutamin, 10 mM essensiyel olmayan amino

asit, 100 mM sodyum pyruvate ve % 20 FBS içeren DMEM) 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesi için, hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayım yapılmıştır. Yeterli sayıya ulaşan hücreler, 24'lük kuyucuklu plakalara besiyeri ortamında ekilmiştir.

### 2.8.1. Metanol Ekstresinin Kanser Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

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 menekşe renkli formazan tuzlarını oluşturur. MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri artış göstermektedir [21].

MCF-7 ve Caco-2 hücreleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml) metanol ekstresi ile ön çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak, 72 saat süreyle muamele edilmiş ve muamelelerden sonra hücrelerin bulunduğu ortama, besiyerinin 1/10'u kadar MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ilave edilerek 4 saat süreyle inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda ortama MTT solubilization çözeltisi (HCl/izopropanol) ilave edilerek, kristallerin çözünmesi için 1 saat süreyle oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda, çözünmeyen formazan kristalleri pipetaj yapılarak çözdürülmüş ve Eliza Plate Reader Spektrofotometre'de (Thermo Labsystems, Multiscan Spectrum) 570 nm'de absorbanslar belirlenmiştir. Çalışmada çözücü kontrol olarak % 0,1'lik DMSO ve pozitif kontrol olarak da 40 µg/ml Farmorubicin kullanılmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak sitotoksikite oranı hesaplanmıştır. Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 2.8.2. Metanol Ekstresinin Kanser Hücreleri Üzerindeki in vitro Apoptotik Etkisinin DNA Diffusion Yöntemi ile Değerlendirilmesi

C. acinaciformis metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro apoptotik etkisi, DNA Diffusion Yöntemi ile belirlenmiştir [22]. Yöntem, erken, tipik ve

geç apoptotik hücrelerin belirlenmesine olanak sağlamanın yanı sıra apoptozisi nekrozisten ayırt etmek için de kullanılabilir.

Denemede kullanılan olan MCF-7 ve Caco-2 hücreleri 24 kuyucuklu plaklara ekilmiş, 24 saat inkübasyondan sonra ön denemelerden elde edilen sonuçlara dayanarak, 72 saat süreyle, hücre medyumu ile seyreltilerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstresi ile muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda hücreler tripsinlenerek toplanmış ve santrifüjledikten sonra süpernatant kısmı atılmış ve hücreler % 0,6'lık 3:1 yüksek çözünürlüklü agaroz (Agarose 3:1 HRB™, High Resolution Blend) ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler, %1'lik agarozla kaplanmış olan lamaların üzerine yayılarak preparat lamelle kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek agarozun katılması sağlanmış, katılan agaroz üzerinden lamel dikkatlice uzaklaştırılmış ve preparat %2'lik SFR agaroz ile kaplanarak 3. bir tabaka oluşturulmuş ve preparat tekrar lamelle kapatılarak agarozun katılması için oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Preparatlar, taze hazırlanmış lysing (parçalama) ve DNA'yı denatüre edici özelliği olan çözültide (1,25 M NaCl, 1 mM tetrasodium EDTA, % 0,01 sodium lauroyl sarcosine, 5 mM Tris, % 0,2 DMSO, 0,3 N NaOH, pH>13,5) 10 dakika süreyle oda sıcaklığında kurutulmuş ve preparatlar, 30 dakika süreyle oda sıcaklığında nötralizasyon ve DNA'yı çöktürme çözültisinde (40 mM Tris-HCl, 50 ml saf etanol; final konsantrasyonu %50 + 100 mg spermine, final konsantrasyonu 1 mg/ml) bekletilmiştir (bu basamak tuzların, deterjanın ve hücresel makromoleküllerin uzaklaştırılması için tekrar edilmiştir). Preparatlar açık havada kurutulmuş ve 10 µM YOYO-1 boyası ile boyanmıştır.

Mikroskopik değerlendirmeler için, preparatlar 100 veya 400x büyütme, mavi filtreli (FITC uyarımı 490 nm, emisyon 510 nm ve dikroik 500 nm'de kullanılan) Olympus BX51 floresan mikroskopunda analiz edilmiştir. Her bir preparatta 1000 hücrede sayım yapılarak, apoptotik hücre yüzdesi hesaplanmıştır. Denemeler, uygulama grupları ve her bir kontrol grubu için 3'er tekrarlı olarak yapılmıştır.

## 2.9. İstatistiksel Analiz

Üç tekrarlı denemelerden elde edilen tüm absorbansların sonuçları SPSS 13.00 (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında ortalama ± SD (Standart hata) olarak hesaplanmıştır. Kontroller ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar, One Way ANOVA varyans analizi yapılarak değerlendirilmiştir (p<0,05).

## III. BULGULAR

### 3.1. C. acinaciformis Metanol Ekstresinde Fitokimyasal Madde Taraması

*C. acinaciformis* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinde yapılan kalitatif fitokimyasal tarama testlerine ait sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre, metanol ekstresinde en fazla fenollerin ve taninlerin olduğu belirlenmiş, flavonoid ve antrakinin'un az miktarda da olsa bulunduğu tespit edilmiş, alkaloid ve saponin'in varlığı ise gözlenememiştir.

**Tablo 1.** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin fitokimyasal tarama bulguları

Aranan Fitokimyasal Madde	Test	Sonuç (Var/Yok*)
Fenoller	Phosphomolybdic acid test	++
Tanninler	Braemer's test	++
Alkaloidler	Dragondroff's test	-
Flavonoidler	Shinoda's test	+
Antrakininonlar	Bornträger test	+
Saponinler	Frothing test	-

+ : Varlığı az miktarda belirlenmiş

++ : Varlığı belirlenmiş

- : Varlığı belirlenememiş

### 3.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

*C. acinaciformis* metanol ekstresinin toplam fenolik madde analizi, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Analizde standart olarak gallik asit kullanılarak grafik oluşturulmuş ve bu grafik kullanılarak ekstredeki fenolik madde miktarı mg gallik asit (mg GAE/g ekstre) olarak hesaplanmıştır. Yapılan fenolik madde analizi sonucunda  $61.26 \pm 0,110$  mg GAE/g ekstre olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarına ait sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği (mg GAE/g ekstre)

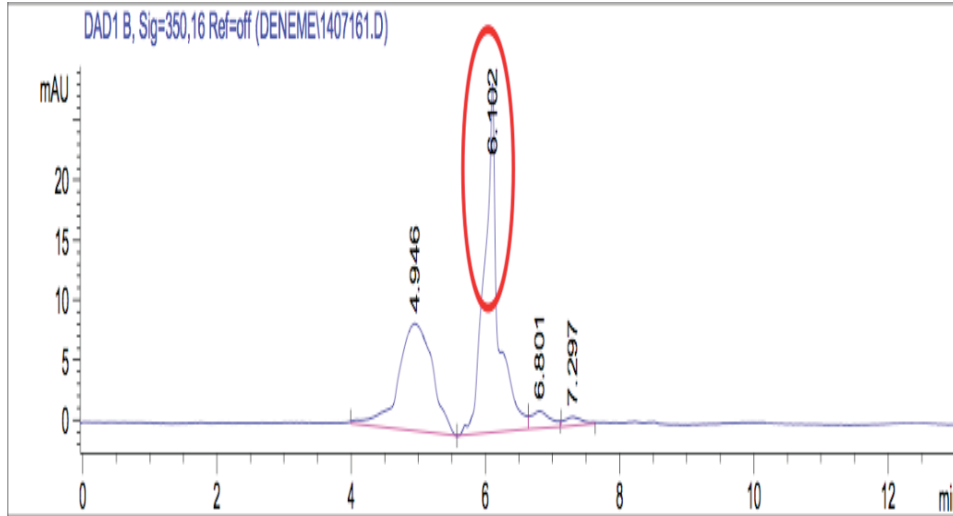
Ekstre tipi	Toplam fenolik içerik (mg GAE/g ekstre)
Metanol ekstresi (CME)	$61.26 \pm 0,110$

CME: *C. acinaciformis* metanol ekstresi

Toplam fenolik içerik değeri, üç tekrarlı analizin ortalaması ± standart sapma değeridir.

### 3.3. HPLC Analizi sonuçları

*C. acinaciformis* metanol ekstresinin HPLC analiz sonuçları Şekil 1'de yer almaktadır. Analiz sonuçlarına göre, 1 ml metanol ekstresinde 753.4 ppm rutin bulunduğu tespit edilirken, neohesperidin, uvaol ve  $\beta$ -sitosterol varlığının ise bulunmadığı belirlenmiştir.



Şekil 1. *Carpobrotus acinaciformis* metanol ekstresi HPLC spektrumu

### 3.4. C. acinaciformis Metanol Ekstresinin DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Süpürme Aktivitesi

*C. acinaciformis*'den elde edilen farklı konsantrasyonlardaki (100, 250, 500 ve 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) metanol ekstresinin antioksidan aktivitesine ilişkin elde edilen veriler Tablo 3'de yer almaktadır. Metanol ekstresi konsantrasyon artışına paralel olarak, oldukça yüksek seviyede DPPH radikalini süpürme aktivitesi göstermiştir. DPPH radikalini süpürme aktivitesi, en düşük konsantrasyon olan 100  $\mu\text{g/ml}$ 'de % 50 seviyesinin üzerine çıkmış, en yüksek konsantrasyon olan 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'de ise, % 98.85 değerine ulaşmıştır. Bu değer, denemede standart olarak kullanılan rutin'den (% 95.80) bile daha yüksektir. Ekstrenin DPPH'ın %50'sini süpürdüğü konsantrasyon değeri ( $\text{IC}_{50}$ ) ise, 15.23  $\mu\text{g/ml}$  olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3: *C. acinaciformis* metanol ekstresinin DPPH süpürme,  $\text{H}_2\text{O}_2$  süpürme ve metal şelatlama aktivitesi

Konsantrasyonlar	DPPH süpürme aktivitesi (% $\pm$ SD)	DPPH süpürme için $\text{IC}_{50}$ Değeri ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ süpürme aktivitesi (% $\pm$ SD)	Metal şelatlama aktivitesi (% $\pm$ SD)
100 $\mu\text{g/ml}$ CME	82.38 $\pm$ 0.000*	15.23 $\pm$ 0,057	0	0
250 $\mu\text{g/ml}$ CME	82.38 $\pm$ 0.001*		0	1.67 $\pm$ 0.003
500 $\mu\text{g/ml}$ CME	85.06 $\pm$ 0.002*		0	2.28 $\pm$ 0.002
1000 $\mu\text{g/ml}$ CME	98.85 $\pm$ 0.002*		0	5.13 $\pm$ 0.004
Rutin (10 $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>x</sup>	95.80 $\pm$ 0.000*		---	---
Askorbik asit (10 $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>xx</sup>	---		43,90 $\pm$ 0,005*	---
EDTA (50 $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>xxx</sup>	---		---	77.56 $\pm$ 0.330*

CME: *C. acinaciformis* metanol ekstresi, \* $p < 0.05$

<sup>x</sup> DPPH süpürme aktivitesi ölçümünde standart olarak kullanılmıştır.

<sup>xx</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  süpürme aktivitesi ölçümünde standart olarak kullanılmıştır.

<sup>xxx</sup> Metal şelatlama aktivitesi ölçümünde standart olarak kullanılmıştır.

### 3.5. C. acinaciformis Metanol Ekstresinin $\text{H}_2\text{O}_2$ Süpürme Aktivitesi

Metanol ekstresinin hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) süpürme aktivitesine ilişkin elde edilen veriler Tablo 3'de yer almaktadır. Elde edilen veriler incelendiğinde, metanol ekstresi denenen konsantrasyon aralığı içerisinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  süpürme aktivitesi göstermemiştir (Tablo 3).

### 3.6. C. acinaciformis Metanol Ekstresinin Metal Şelatlama Aktivitesi

Metanol ekstresinin denenen konsantrasyonlar aralığı içerisinde çok düşük oranda metal şelatlama aktivitesi göstermiştir (Tablo 3).

### 3.7. C. acinaciformis Metanol Ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 Kanser Hücre Hatları Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisi

C. acinaciformis metanol ekstresinin 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 72 saat süreyle muamele edilen MCF-7 ve Caco-2 kanseri hücre hatlarında ortaya çıkan *in vitro* sitotoksik etkiye ilişkin veriler Tablo 4 ve Şekil 2'de yer almaktadır. Metanol ekstresi MCF-7 hücrelerinde üzerinde denenen en düşük konsantrasyondan (250 µg/ml) başlayarak sitotoksik etki göstermeye başlamış (% 72.08) ve

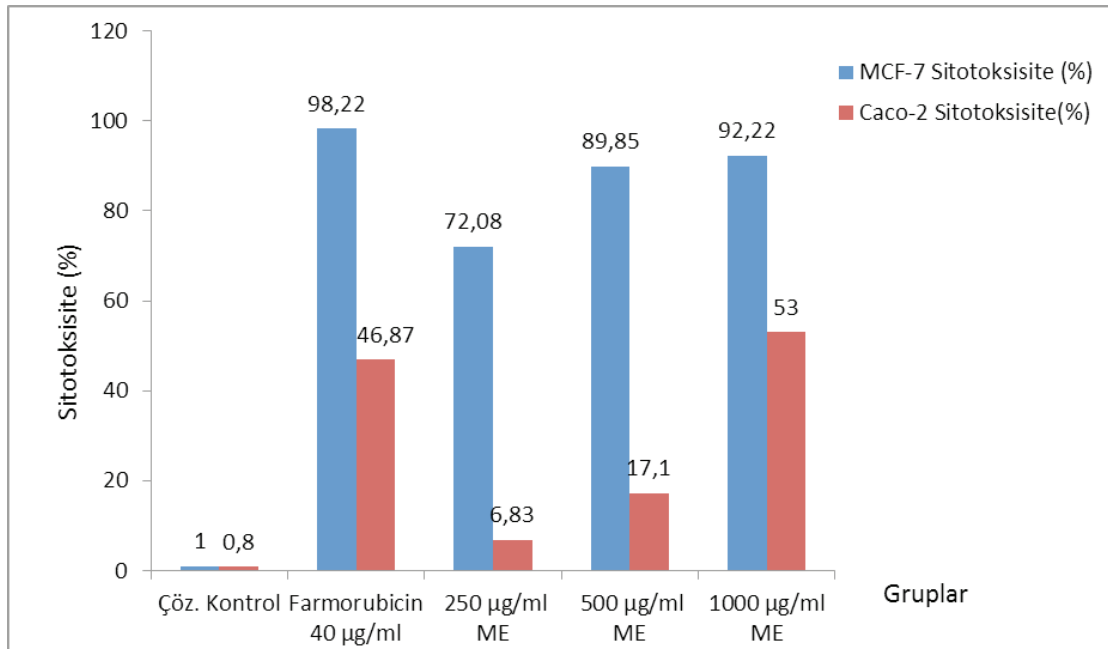
ekstre konsantrasyonunun artışı ile sitotoksik etki de artış göstermiştir. Denenen en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/ml'lik ekstre uygulaması sonucunda sitotoksik etki, % 92.22 değerine ulaşmıştır. Bu etki, meme kanseri tedavisinde kullanılan Farmorubicin'in gösterdiği sitotoksik etkiye (% 98.48) yaklaşmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan da önemli bulunmuştur. ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4).

Metanol ekstresi en yüksek uygulama konsantrasyonu olan 1000 µg/ml ekstre uygulaması hariç (% 53.00), Caco-2 hücreleri üzerinde kayda değer bir sitotoksik etki göstermemiştir. En yüksek ekstre konsantrasyonu uygulamasından elde edilen sonuç, çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiki açıdan önemli ( $p < 0.05$ ) olup, Farmorubicin ile karşılaştırıldığında ise aradaki fark önemsizdir (Tablo 4 ve Şekil 2).

**Tablo 4.** C. acinaciformis bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi

Gruplar	Konsantrasyon (µg/ml)	<i>in vitro</i> Sitotoksik Etki (%±sd) (MCF-7)	<i>in vitro</i> Sitotoksik Etki (%±sd) (Caco-2)
Çözücü Kontrol (DMSO)	% 0,1	1.00±0.001	0,80±0.001
Farmorubicin	40 µg/ml	98.22±0.003*	46.87±0.064*
CME	250 µg/ml	72.08±0.018*	6.83±0.124
	500 µg/ml	89.85±0.008*	17.10±0.193
	1000 µg/ml	92.22±0.105*	53.00±0.023*

CME: C. acinaciformis metanol ekstresi, \*  $p < 0.05$



**Şekil 2:** C. acinaciformis bitkisinden elde edilen metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi

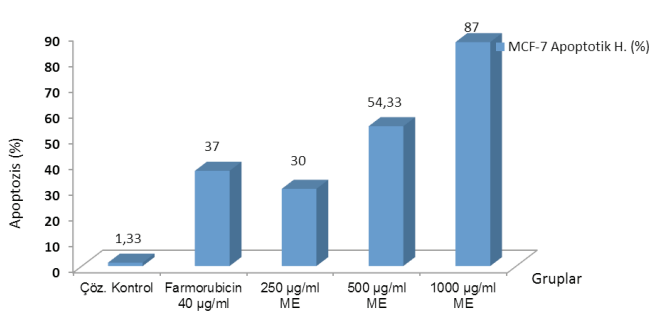
**Tablo 5.** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 kanser hücreleri üzerindeki *in vitro* apoptotik ve nekrotik etkisi

Gruplar	Konsantrasyon	Sayılan Toplam Hücre	Hücreler			
			MCF-7		Caco-2	
			Apoptotik Hücre (%±SD)	Nekrotik Hücre (%±SD)	Apoptotik Hücre (%±SD)	Nekrotik Hücre (%±SD)
Çözücü Kontrol (DMSO)	% 0.1	3000	1.33±0.57	0.33±0.57	1.00±0.00	1.00±1.00
Farmorubicin	40 µg/ml	3000	37.00±2.00*	9.33±0.57	25.00±2.00*	2.00±1.00
CME	250 µg/ml	3000	30.00±1.00*	4.33±0.57	32.33±1.15*	5.33±0.57
	500 µg/ml	3000	54.33±2.08*	7.00±1.73	43.00±1.00*	6.67±1.00
	1000 µg/ml	3000	87.00±2.00*	2.33±0.57	49.00±1.00*	7.33±1.15

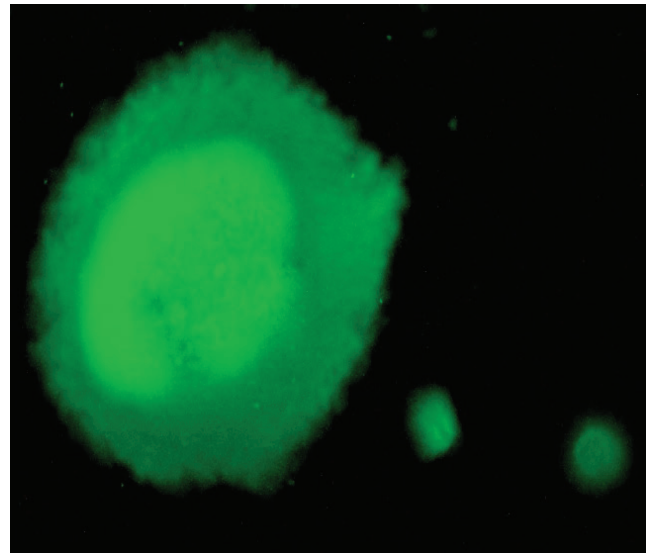
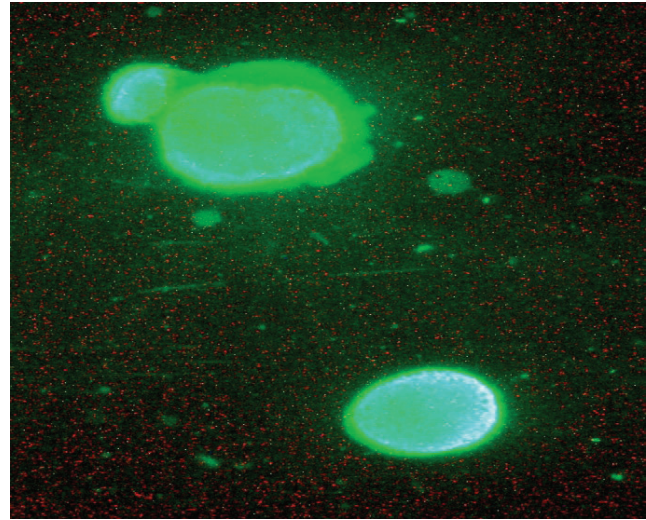
CME: *C. acinaciformis* metanol ekstresi, \* p<0.05

### 3.7. *C. acinaciformis* Metanol Ekstresinin Kanser Hücreleri Üzerindeki *in vitro* Apoptotik Etkisi

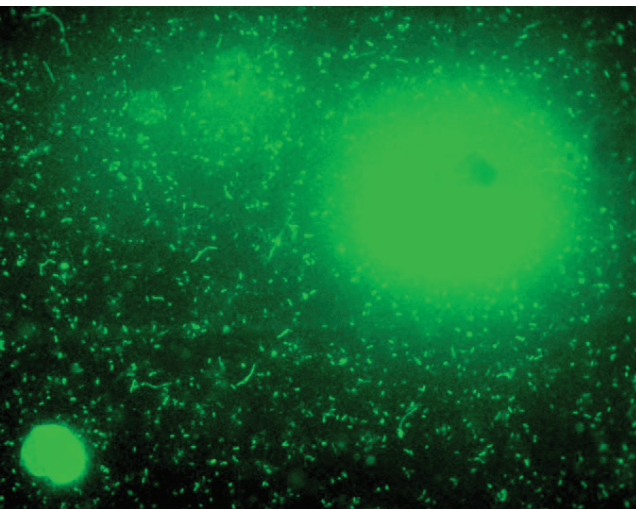
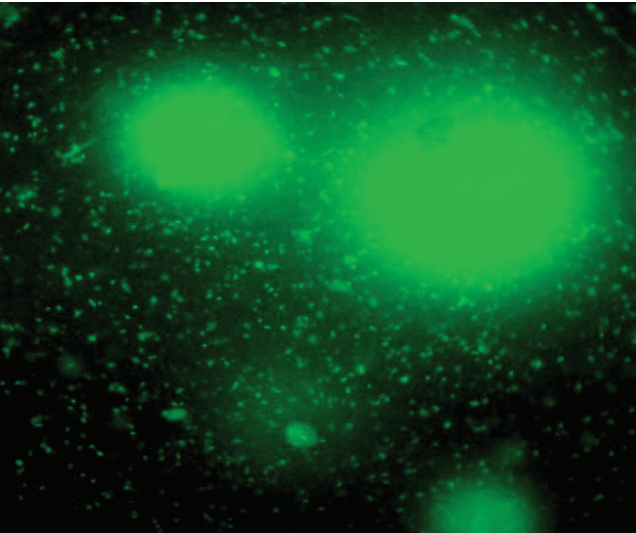
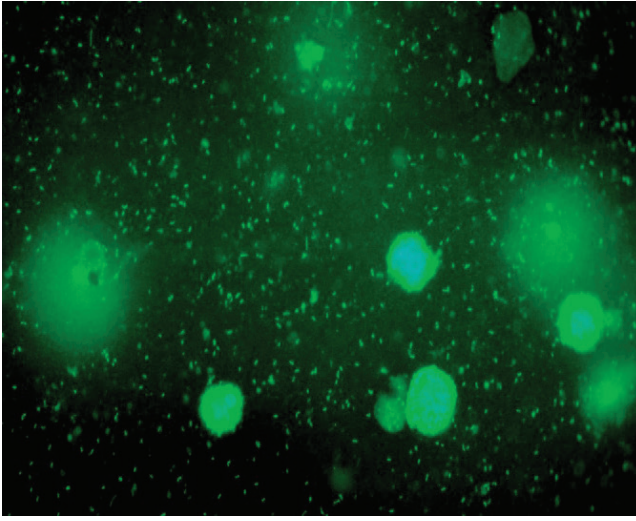
Farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstresi ile 72 saat süreyle muamele edilen MCF-7 ve Caco-2 kanser hücrelerinde ortaya çıkan apoptotik ve nekrotik etkilere ilişkin veriler değerlendirildiğinde, metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerinde ekstre konsantrasyonu artışına bağlı olarak artan bir apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5). En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 1000 µg/ml de gözlenen apoptotik etki % 87.00 olarak belirlenmiştir ki, bu antikanser ilaç olan Farmorubicin'nin gösterdiği etkiden (% 37.00) çok daha yüksektir: Bu sonuç kontrol grupları (pozitif kontrol ve çözücü kontrol) ile karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan da önemlidir (Tablo 5, Şekil 3, Şekil 4). Gerek metanol ekstresi gerekse Farmorubicin MCF-7 hücreleri üzerinde önemli bir nekrotik etkide bulunmamıştır (Tablo 5 ve Şekil 3).



**Şekil 3:** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki *in vitro* apoptotik ve nekrotik etkisi

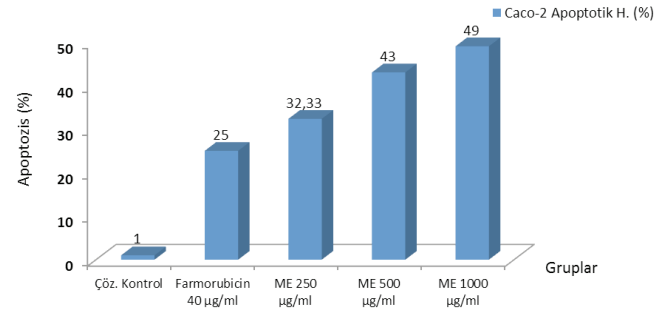




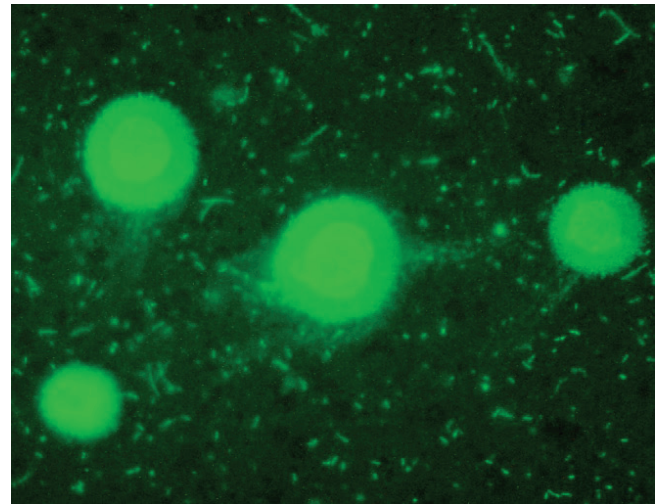


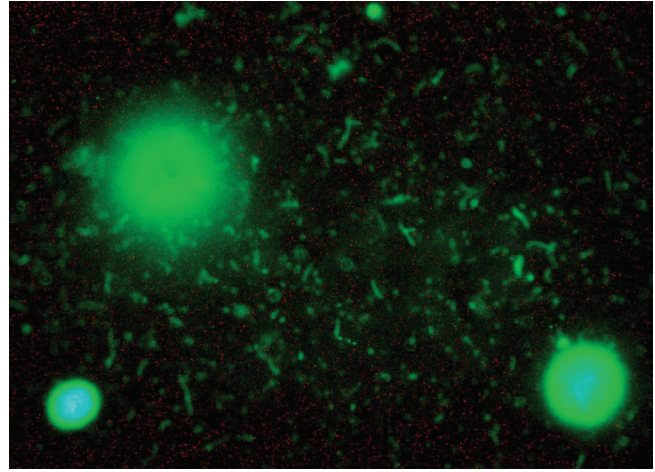
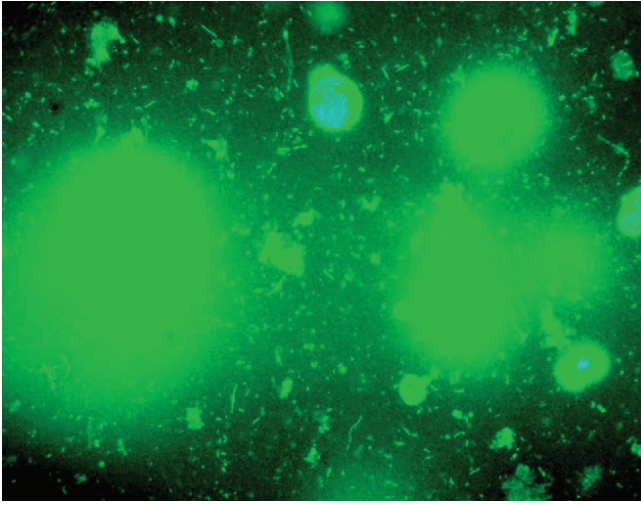
**Şekil 4.** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerindeki *in vitro* apoptotik ve nekrotik etkisi A: Çözücü kontrol; B: Farmorubicin; C: 250 µg/ml metanol ekstresi; D: 500 µg/ml metanol ekstresi; E: 1000 µg/ml metanol ekstresi (\* normal hücre; apoptotik hücre)

Metanol ekstresinin Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ise konsantrasyon artışına bağlı olarak artmakla birlikte, MCF-7 hücrelerinde gözlenen apoptotik etkiye nazaran daha düşük olmuştur. 1000 µg/ml'lik en yüksek ekstre uygulamasında gözlenen etki ancak % 49.00'a ulaşabilmiştir (Tablo 5). Metanol ekstresinin Caco-2 hücreleri üzerindeki nekrotik etkisi de yine önemsiz olmakla birlikte, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha fazla nekrotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 5, Şekil 5, Şekil 6). Caco-2 hücrelerinde metanol ekstresi uygulaması sonrasında gözlenen nekrotik etki ile Farmorubicin'in nekrotik etkisi karşılaştırıldığında bu etki istatistiki açıdan önemsizdir (Tablo 5).

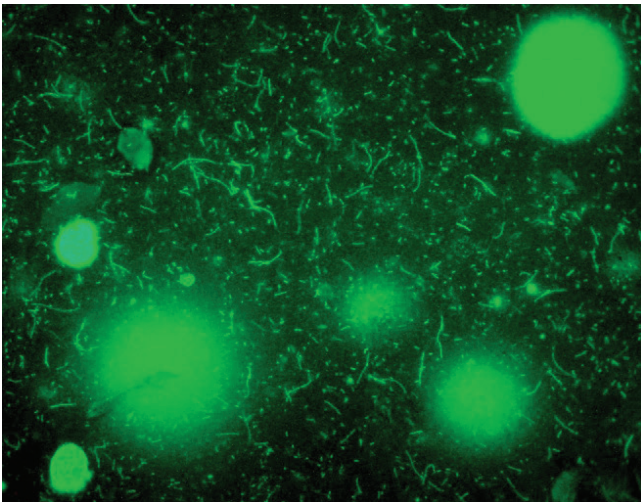
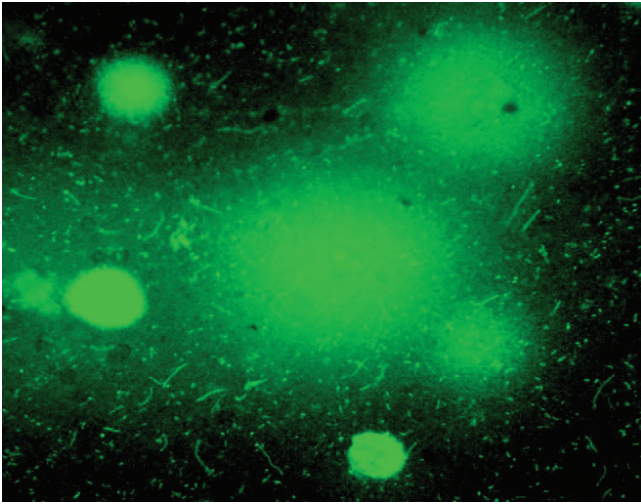


**Şekil 5:** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin Caco-2 kolon kanseri hücreleri üzerindeki *in vitro* apoptotik ve nekrotik etkisi





**Şekil 6:** *C. acinaciformis* metanol ekstresinin Caco-2 hücreleri üzerindeki *in vitro* apoptotik ve nekrotik etkisi A: Çözücü kontrol Caco-2; B: Farmorubicin Caco-2; C: 250 µg/ml metanol ekstresi Caco-2; D: 500 µg/ml metanol ekstresi Caco-2; E: 1000 µg/ml metanol ekstresi Caco-2 (\* normal hücre; apoptotik hücre; X nekrotik hücre).



#### IV. TARTIŞMA

Kalitatif fitokimyasal tarama testleri *C. acinaciformis* toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinde ağırlıklı olarak fenol ve taninlerin ve az miktarda da flavonoid ve antrakinon bulunduğunu, alkaloid ve saponinin ise olmadığını ortaya koymuştur (Tablo1). Ancak bu çalışmada sadece metanol ekstresi ile çalışıldığı için, değişik polaritelere sahip farklı ekstrelerde de bu taramanın yapılması sonucunda, farklı fitokimyasalların varlığının da belirlenebileceği düşünülmektedir.

Çalışmada metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı, gallik asit eşdeğerliğine göre  $61.26 \pm 0.110$  mg GA-E/g ekstre olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Fenolik maddece zengin olduğu gözlemlenen ekstrelerin serbest radikalleri süpürme aktivitesi de yüksek olmaktadır. Fenolik madde ve flavonoid miktarları ile antioksidan kapasitesi tayin yöntemleri arasında da bir ilişki mevcut olabileceği gibi, özellikle radikal süpürme temeline dayalı DPPH gibi metotların toplam fenolik madde ve flavonoid miktarları ile ilişkisi de önemli olabilir [23].

DPPH radikali biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür [24, 25]. Metanol ekstresinin DPPH radikalini süpürme aktivitesinin konsantrasyon artışına bağlı olarak rutinden (% 95.80) bile oldukça yüksek (% 98.85) değerlere ulaştığı bulunmuştur (Tablo 2). Faleh ve arkadaşlarının [26] *Mesembryanthemum edule* L. (Aizoaceae) bitkisinin toprak üstü kısımları ile kökünden elde ettikleri

metanol ekstresinin antioksidan özelliklerini ve fenolik bileşiklerini belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, bitkinin çalışılan bütün organlar pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye kıyasla yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. En yüksek antioksidan aktiviteyi bitkinin gövde ve yaprakların (sırasıyla, 86.5 ve 68.7 mg GAE g-1 DW) gösterdiği bulunmuştur. Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarda, bu çalışmanın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, metanol ekstresinde bulunan fenolik madde içeriğinin, ekstrenin gösterdiği antioksidan aktiviteyi de etkilediği söylenebilir. Bitkilerden farklı yöntemlerle elde edilen ekstraların çözücü özelliklerine göre farklı bileşikler içermesi, ekstraların DPPH üzerinden serbest radikali süpürücü aktivitelerinin birbirinden farklı olmasına ve polar çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraların, polar olmayan çözücüler kullanılarak elde edilen ekstralardan çok daha yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite göstermesine neden olabilmektedir [27-30]. Tek bir yöntemle antioksidan aktivitesi hakkında karar vermenin doğru bir yaklaşım olmadığı, antioksidan aktivitesi belirlenirken, farklı yöntemler kullanılması ve elde edilen aktivite sonuçlarının, her bir özelliğe göre verilmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı da düşünülmektedir.

Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat birçok hücre tipinde 20- 50 mg'ın üzerinde olduğunda serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan, toksik etkiye neden olabilir. Hidrojen peroksit, hücre kültürüne ilave edildiğinde de geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasına sebep olur. Bütün bunlardan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksidi uzaklaştırmak oldukça önemlidir [31]. Denemelerde standart olarak kullanılan askorbik asidin  $H_2O_2$  süpürme aktivitesi % 43.90 iken; *C. acinaciformis* metanol ekstresinin  $H_2O_2$  süpürme aktivitesinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Tablo 3).

Çalışmamızda metal iyonu şelatlama aktivitesi; bitki ekstraktlarının çözeltideki  $Fe^{2+}$  iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirilmiştir. Kıyaslama maddesi olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçilmiştir. *C. acinaciformis* toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin metal şelatlama aktivitesinin neredeyse yok denecek kadar düşük olduğu belirlenmiş (sırası ile; % 0.00, % 1.67, % 2.28 ve % 5.13) ve standart olarak kullanılan EDTA'nın metal şelatlama aktivitesi karşısında (% 77.56) etkisiz olduğu daha belirgin olmuştur (Tablo 3). Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun elektron transfer edebilmesiyle ilişkilidir ve potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Geçiş

metalleri arasından  $Fe^{2+}$ , lipid oksidasyonunda prooksidan olarak bilinir. Fenton reaksiyonu ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$ ) vasıtasıyla reaktif oksijen türlerini oluşturur ve lipid oksidasyonunu hızlandırır [32]. Bitki ekstraları, geçiş metal iyonlarını bağlayarak ortamdaki konsantrasyonlarını azaltır ve  $Fe^{2+}$  katalizli lipid peroksidasyonunu geciktirirler.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, *C. acinaciformis* bitkisi toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği ile DPPH radikalini süpürme aktivitesi arasında pozitif doğrusal bir ilişki olduğunu ve *C. acinaciformis* bitkisinde bulunan fenolik bileşiklerin (fenoller, taninler ve antrakınonlar)  $H_2O_2$  süpürme aktivitesi çok düşük olmasına ve metal şelatlama aktivitesinin ise olmasına rağmen, iyi bir radikal süpürücü antioksidan kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Sitotoksitenin belirlenmesi, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlarla birlikte, bitkisel ekstraların potansiyel antineoplastik özelliklerinin belirlenmesine de yardımcı olmaktadır [33]. Kanser, proliferasyon dengesizliği ve apoptozis engeli ile karakterize edilen bir hastalık durumudur. Kontrolsüz hücre büyümesi ve proliferasyonu, karsinogenezisin en önemli özelliğidir [34]. Hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin teşvik edilmesi tümör tedavisinde kullanılan etkili yöntemlerdendir [35, 36].

Araştırmanın sonuçları, *C. acinaciformis* toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin MCF-7 hücrelerinde oldukça yüksek oranda sitotoksik etkiye neden olduğunu, Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin ise MCF-7'den daha düşük oranda olduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). *C. acinaciformis* toprak üstü kısımları metanol ekstresi artan konsantrasyonlarda MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerinde farklı derecelerde sitotoksik etki göstermiştir (Tablo 4, Şekil 2). MCF-7 hücreleri 1000  $\mu\text{g/ml}$  metanol ekstresi ile muamele edildiğinde, ortaya çıkan sitotoksik etki % 92.22 olurken, aynı konsantrasyondaki metanol ekstresi muamelesi ile Caco-2 hücrelerinde gözlenen sitotoksik etki, ancak % 53.00 gibi bir değere ulaşabilmiştir. Metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi pozitif kontrol olarak kullanılan ve antikanser ilaç olan Farmorubicin'in gösterdiği sitotoksik etkiye (% 98.22) yakın bulunmuştur (Tablo 4, Şekil 1).

Martins ve arkadaşları [37] *C. edulis*'in taze yapraklarını kullanarak elde ettikleri metanol ekstresinden saflaştırılan bileşiklerin ( $\beta$ -Amyrin, Oleanolic acid, Uvaol, Monogalactosyldiacylglycerol, Catechin, Epicatechin ve Procyanidin B5) fare lenfoma parental hücreleri ile insan MDR1 ile transfekte edilmiş fare lenfoma hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçları, *C. edulis* metanol ekstresinden elde edilen bileşikler ile muamele

edilen hem fare parental hem de MDR1 ile transfekte edilmiş hücrelerin çoğalmasının azaldığını göstermiştir. Oleanolik asit, uvaol ve kateşinin antiproliferatif aktivitesi ebeveyn hücre dizisinde daha belirgin olurken,  $\beta$ -Amyrin ve epikateşinin antiproliferatif etkisi ise her iki hücre dizisi için önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. Araştırmacılar, Uvaol ve  $\beta$ -amirin veya oleanolik asit arasındaki yapısal farkın, C-29 pozisyonundaki metil grubundan kaynaklandığını ve bunun da bileşiklerin antiproliferatif aktivitesinde önemli bir rol oynadığını düşünmektedirler. Ayrıca, fare parental hücrelerinin de kanser hücreleri olmasından dolayı, metanol ekstresinde bulunan bileşiklerin bu hücrelerde de replikasyonu azalttığının gözden kaçırılmaması gerektiğini de belirtmişlerdir.

*C. acinaciformis* toprak üstü kısımları metanol ekstresinin MCF-7 ve Caco-2 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptotik etki de sitotoksik etkiye benzerlik göstermiştir (Tablo 5, Şekil 3, Şekil 4). Metanol ekstresi uygulaması ile MCF-7 hücreleri üzerinde Caco-2 hücrelerine nazaran daha fazla apoptotik etki ortaya çıkmış ve aradaki farkın istatistiki açıdan da önemli olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerinde gösterdiği etki, antikanser ilaç olan Farmarubicin'in apoptotik etkisinden bile (% 37.00) çok daha yüksek olmuştur (sırası ile; % 30.00, % 54.33 ve % 87.00). Özellikle MCF-7 hücrelerinde ortaya çıkan güçlü sitotoksik ve apoptotik etki, metanol ekstresinde bulunan fenolik bileşikler (fenoller, taninler ve antrakınonlar) ile ilişkilendirilebilir. Çünkü fenolik bileşikler antioksidan aktivitenin yanı sıra, karsinojen metabolizmasının modülasyonu, hücre çoğalması ve farklılaşmasında onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde gen ifadesinin düzenlenmesi, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozisin teşvik edilmesi, çeşitli sinyal akış yollarının inhibe edilmesi gibi çok sayıda tamamlayıcı ve bir arada çalışabilen etki mekanizmasına sahiptirler [28-42]. Ayrıca, fenolik bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak DNA'yı inhibe etmek suretiyle sitotoksik etki gösterdikleri de bilinmektedir [43].

Çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; *in vitro* bulgular, *C. acinaciformis* metanol ekstresinin MCF-7 hücreleri üzerinde gösterdiği güçlü sitotoksik ve apoptotik etki nedeni ile meme kanserine karşı DNA hasarına neden olabilecek potansiyel bir sitotoksik ajan olarak kullanılabilirliğini ve meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek bitkisel kaynaklar açısından kanser tedavisi için değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, özellikle metanol ekstresinde bulunan bileşiklerin izole edilerek daha ayrıntılı olarak çalışılması gerekmektedir. Ayrıca, bitkisel kökenli bileşiklerin *in vitro* ortamda farklı kanser hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik ve apoptotik etkilerin, özellikle insan sağlığı açısından *in vivo* koşullarda nasıl bir etki oluşturacağına dair, daha ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu da açıktır.

## TEŞEKKÜR

*C. acinaciformis* bitkisinin sistematik tayinini yapan Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi, Doç. Dr. Özkan Eren'e, *C. acinaciformis* metanol ekstresinin HPLC analizini Ege Üniversitesi EBİLTEM Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştiren Uzman Biyolog Fatih KARABEY'e ve bu çalışmayı FEF- 15034 No'lu proje ile destekleyen Adnan Menderes Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- [1] Visioli, F., Borsani, L. ve Gali, C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.*, 47, 149-425.
- [2] Güney, O., Canbilen, A., Konak, A. ve Acar, O. (2003). The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos. *Spine*, 28(5), 442-445.
- [3] Farr, D. R. (1997). Functional foods. *Cancer Letters*, 114, 59- 63.
- [4] Kitts, D.D., Wijewickreme, A.N. ve Hu, C. (2000). Antioxidant properties of a North American ginseng extract. *Molecular Cell Biochemistry*, 203, 1- 10.
- [5] Lee, J. C. ve Lim, K. T. (2001). Inhibitory effects of the ethanol extract of *Ulmus davidiana* on apoptosis induced by glucose- glucose oxidase and cytokine production in cultured mouse primary immune cells. *Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 34, 463- 471.
- [6] Pezutto, J. M. (1997). Plant-derived anticancer agents. *Bioc-hemecial Pharmacology*, 53, 121-133.
- [7] Christou, L., Hatzimichael E., Chaidos, A., Tsiara, S. ve Bourantas, K. L. (2001). Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. *European Journal of Hematology*, 67, 51- 53.
- [8] Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N. ve Ghosh, A. C. (2001). Advances in cancer therapy with plant-based natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 1467- 1486.
- [9] Smets, L. A. (1994). Programmed cell death (apoptosis) and response to anticancer Drugs. *Anticancer Drugs*, 5, 3-9.
- [10] Paschka, A. G., Butler, R. ve Young, C. Y. F. (1998). Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, Epigallocatechin-3- Gallate. *Cancer Letters*, 130, 1-7.
- [11] Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 569-590.
- [12] Wisura, W. ve Glen, H. F. (1993). The South African species of *Carpobrotus* (Mesembryanthema-Aizoaceae). *Contribution Bolus Herbal*, 15, 76-107.
- [13] Van der Watt, E. ve Pretorius, J. C. (2001). Short communication: Purification and identification of active antibacterial

- components in *Carpobrotus edulis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 87-91.
- [14] Springfield, E. P., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W. Ve Jhonson, Q. (2003). An assesment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine*, 10, 434-439.
- [15] Ravishankara M. N. Neeta, S., Harish, P. ve Rajani, M. (2002). Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indicus* R. Br. (Anantmul). *Phytomedicine*, 9, 153-160.
- [16] Dominguez, X. A. 1973. Metodos de investigacion fitoquimica. In: Bolivar, P., Cruz-Peredes, C., Kernandez, L. R., Juarez, Z. N., Sanchez-Arreola, E., Av-Gay, Y. ve Bach, H. (2011). Antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 141-147.
- [17] Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [18] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. ve Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- [19] Ruch R. J., Cheng, S. J. ve Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cyto-toxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- [20] Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almedia, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169.
- [21] Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- [22] Singh, N. P. (2005). Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay. *Methods in Molecular Medicine*, 111, 55-67.
- [23] Arıdur, R. ve Arabacı, G. (2013). Ciğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 17(2), 241-246.
- [24] Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105, 940-949.
- [25] Chen, T., Mei, N. ve Fu, P. P. (2010). Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 183-196.
- [26] Falleh, H., Ksouri, R., Medini, F., Guyot, S., Abdelly, C., Christian, M. (2011). Antioxidant activity phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products*. 34. 1066-1071
- [27] Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. ve Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- [28] Vundać, V. B., Brantner, A. H. ve Plazibat, M. (2007). Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, 104, 1277-1281.
- [29] Aslantürk, Ö. S. (2010). Aydın Yöresinde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidan ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- [30] Aslantürk, Ö.S. ve Aşkın Çelik, T. A. (2013). Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells. *Caryologia*, 66(3), 257-267.
- [31] Doğmuş, D. ve Durucasu, İ. (2013). Keten tohumu çeşitlerinin N-Bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 47 - 56.
- [32] Halliwell, B. ve Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- [33] Arunporn, I., Peter, J., Houghton, E. ve Amooquaye, E. (2004). *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.*, 90, 33-38.
- [34] Bartek, J., Lukas, C. ve Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 792-804.
- [35] Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- [36] Kinloch, R. A., Trekerne, J. M., Furness, L. M. ve Hajimohamadreza, I. (1999). The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharmacology Science*, 20, 35-42.
- [37] Martins, A., Vasas, A., Schelz, M., Viveiros, M., Molnár, J., Hohman, J., Amaral, L. (2010). Constituents of *Carpobrotus edulis* inhibit P-glycoprotein of MDR-1 transfected Mouse lymphoma cells. *Anticancer Research*. 30.829-836.
- [38] Kwon, K. H., Barve, A., Yu, S., Huang, M.T. ve Kong, A.N.T. (2007). Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers, and animal models. *Acta Pharmacol. Sin.*, 28, 1409-1421.
- [39] Han, X. Z., Shen, T. ve Lou, H. X. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 950-988.
- [40] Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. ve Marques, M.P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med. Res. Rev.*, 26, 747-766.
- [41] Garuti, L., Roberti, M. ve Pizzirani, D. (2005). Nitrogen-containing heterocyclic quinones: a class of potential selective anti-tumor agents. *Mini-Review Medicinal Chemistry*, 7, 481-489.
- [42] Demirezer, L. O., Kuruüzüm-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H. J. ve Zeeck, A. (2001). The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, 58, 1213-1217.
- [43] Chang, Y. C., Tai, K. W., Huang, F. M., Huang, M. F. 2003. Cytotoxic and nongenotoxic effects of phenolic compounds in human pulp cell cultures. *J. Endodontics*, 26(8): 440-443.