


Keçiboynuzu ekstrelerinin insan servikal kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri

Antiproliferative and cytotoxic effects of carob extracts on human cervical cancer cells

Hatice GÜMÜŞHAN AKTAŞ¹ 

¹ Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

Öz.

Amaç: Leguminosae familyasının bir üyesi olan *Ceratonia siliqua* L., (keçiboynuzu, harnup)'nın antimikrobiyal, antifungal ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, keçiboynuzunun yaprak ve meyvelerinin etli kısımlarından metanol ve etanol ile hazırlanan ekstrelerin, HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca embriyonik fare fibroblast hücre soyu olan 3T3 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Materyal ve Metod: Bu amaçlarla 48 saat süreyle ve farklı konsantrasyonlarda (200-800µg/mL) ekstre uygulamasının ardından canlı hücre sayıları (proliferasyon, MTT yöntemi), mitotik indeks (mitotik aktivite) ve işaretlenme indeksleri (DNA sentezi) tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrelerde bulunan fenolik bileşen kompozisyonları da LC-MS/MS ile belirlenmiştir.

Bulgular: Elde edilen bulgulara göre keçiboynuzunun metanolik ve etanolik yaprak ekstreleri insan servikal kanser HeLa hücrelerinin DNA sentezini inhibe ederek mitotik aktivitesini ve proliferasyonunu baskılamıştır. Ancak bu ekstreler aynı zamanda normal fibroblast 3T3 hücrelerine karşı da sitotoksik etki göstermişlerdir. Etanolik meyve ekstresi HeLa hücrelerinin DNA sentezini azaltmıştır.

Sonuç: *C. siliqua* bitkisinden elde edilecek etken maddeler veya hazırlanacak preparasyonlar antikanser ajan olabilir potansiyeli taşıyabilir. Ancak normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkiler de göz ardı edilmemelidir.

Anahtar kelimeler: Keçiboynuzu, HeLa hücreleri, Sitotoksitesite, 3T3 hücreleri

Abstract

Background: *Ceratonia siliqua* L., a member of the family Leguminosae, has been reported to have antimicrobial, antifungal and cytotoxic activity (carob, kharnub). In this study, the antiproliferative and cytotoxic effects of extracts prepared with methanol and ethanol from the carob leaves and fruits on HeLa cells were investigated. Additionally, 3T3, embryonic mouse fibroblast cell line, was used as a control.

Material and Methods: For these purposes, after treatment of the extracts at different concentrations (200-800µg/mL) for 48 hours, viable cell counts (proliferation, MTT method), mitotic index (mitotic activity) and labeling index (DNA synthesis) were determined. In addition, the phenolic component compositions in the extracts were also determined by LC-MS / MS.

Results: According to the findings, the methanolic and ethanolic leaf extracts of carob bean suppressed mitotic activity and proliferation by inhibiting the DNA synthesis of human cervical cancer HeLa cells. However, these extracts also exhibited a cytotoxic effect against normal fibroblast 3T3 cells. Ethanolic fruit extract reduced the DNA synthesis of HeLa cells.

Conclusions: The active substances or preparations obtaining from the *C. siliqua* plant have the possibility of being an anticancer agent, whereas their cytotoxic effects on the normal cells should not be overlooked.

Keywords: Carob, HeLa cells, Cytotoxicity, 3T3 cells

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Hatice GÜMÜŞHAN AKTAŞ

Harran Üniversitesi, Fen – Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 63300,
Şanlıurfa, Türkiye

Tel: +90 414 318 30 00 / 1192

E-mail: haticeaktas@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 22.07.2018

Kabul tarihi / Accepted: 06.11.2018

Giriş

Epidemiyolojik çalışmalar, kanserin Dünya'da kalp hastalıklarından sonra ikinci sıradaki ölüm nedeni olmaya devam ettiğini göstermektedir (1). Son yıllardaki gelişmeler ışığında çeşitli koruyucu önlemler alarak riskin azaltılabilmesi, en azından hastalığın erken evrede teşhis edilerek etkili tedavi yöntemlerine başvurulması mümkün görünmektedir. Bu tedavi yöntemleri arasında kemoterapi halen önemli bir yer tutmaktadır (2). Neredeyse insanlık tarihi kadar eski zamanlardan beri kanser dahil pek çok hastalık için alternatif bir tedavi aracı olarak bitkiler ve onlardan hazırlanan preparasyonlar karşımıza çıkmaktadır. Etken maddesi saflaştırılarak over, meme, akciğer, testis gibi çeşitli kanserlere karşı günümüzde ticari ilaç olarak kullanılan bu bitkiler arasında *Taxus brevifolia* (taxol/paclitaxel) (3), *Podophyllum peltatum* (podophyllotoxin), *Vinca minor*, *Catharanthus roseus* (vincristine, vinblastine, vinorelbine) (4) ve benzerleri sayılabilir.

Leguminosae familyasının bir üyesi olan *Ceratonía siliqua* L., (keçiboynuzu, harnup) Akdeniz ülkelerinde yayılış göstermektedir. Boyu 10 m'ye kadar ulaşabilen; kışın yaprak dökmeyen; çok yıllık ağaç formundaki bitkinin yaprakları 3 – 5 çift yaprakçıklı imparipinnat diziliş gösterir. Meyve 20 cm kadar olabilen, esmer renkli, sarkık, çok tohumlu bir legümandır (Şekil 1). Ülkemizde Akdeniz bölgesinde yabani olarak yayılış gösteren keçiboynuzu ağacının kültürü de yapılmaktadır (5,6). Meyvelerinin bileşiminde karbohidratlar, şekerler, selüloz, azotlu bileşikler, tanen ve sabit yağ bulunduğu belirtilmiştir. Geleneksel tıpta taze meyvelerin diüretik ve müshil; kuru meyvelerin, yapraklarının ve dal kabuklarının ise antidiyareik etkileri nedeniyle kullanımı bildirilmiştir (6). *C. siliqua* yaprak ve meyvelerinden hazırlanan ekstraktlar ile yapılan çalışmalar sonucunda ekstraktın antimikrobiyal, antifungal ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu (7), ayrıca apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (8).

Bu çalışmada, keçiboynuzu yaprak ve meyvelerinin etli kısımlarından metanol ve etanol ile hazırlanan ekstrelerin, HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca kontrol amacıyla kullanılan 3T3 embriyonik fare fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterip göstermedikleri incelenmiştir.

Materyal ve Metod

Hücre kültürü

Deneilerimizde kullandığımız HeLa (insan servikal karsinoma, ATCC numarası CCL-2) ve 3T3 (embriyonik fare fibroblast) hücreleri İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilmiştir. Hücre kültürü için %10 ısıyla inaktifleştirilmiş fetal dana serumu, 4×10^5 IU/L penisilin ve 2×10^5 µg/L streptomisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibiyotikleri ilave edilmiş DMEM/F12 mediumu

(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) kullanılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşulları altında nemli inkübatörde yaşatılmıştır.

Ekstraktların hazırlanması

Bitki örnekleri (*Ceratonía siliqua*, L., Fam: Leguminosae) Türkiye, Akdeniz Bölgesi, Mersin ili Karayakup köyünden Ekim-Aralık periyodunda toplanmıştır. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Tuna Ekim tarafından tür tayini yapılmıştır. Bitki örnekleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariyumu'nda saklanmaktadır (ISTF Herbariyum numarası: 40075). Örnekler yıkanarak temizlenip kurulandıktan sonra 50°C sıcaklıktaki etüvde 24 saat süreyle tutularak kurutulmuştur. Mekanik olarak öğütülen örneklerle, 1:10 oranında etanol (> % 98, Riedel) veya metanol (>%99, Riedel) çözücülerini eklenerek, orbital çalkalayıcıda (GFL, Almanya), oda sıcaklığında, 24 saat tutulmak suretiyle ekstrakte edilmiştir. Belirtilen süre sonunda ekstraktlar -40°C'de, vakum altında (Edwards, İngiltere) liyofilize edilmiştir.



Şekil 1. *Ceratonía siliqua* (keçiboynuzu) bitkisi, yaprakları ve legümen tipi meyveleri.

Deney mediumlarının hazırlanması

Stok solüsyon (10 mg/mL) hazırlamak için, elde edilen liyofilizatlar ilaveli DMEM/F12 mediumu içerisinde çözülmüş ve 0.20µm por çaplı tek kullanımlık filtreden (Sartorius, Almanya) geçirilerek steril edilmiştir. Stok solüsyon, ilaveli DMEM/F12 içerisinde dilüe edilerek 200, 400, 600 ve 800 µg/mL konsantrasyonlarda deney mediumları hazırlanmıştır.

Proliferasyon analizi

Keçiboynuzu ekstraktlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi, MTT yöntemiyle belirlenmiştir (9). Kısaca, 96 kuyucuklu mikropalakaların her bir kuyucuğuna 3×10^4 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra başlayarak 2 gün boyunca, hergün aynı saatte kontrol ve deney mediumları değiştirilmiştir. Deneyin son günü canlı hücreler tarafından oluşturulan absorbans değerleri Eliza mikropalaka okuyucuda (Biotek, Winooski, VT, USA) 570 nm (absor-

bans) ve 690 nm (referans) dalgaboylarında ölçülmüştür. Elde edilen absorpsiyon değerlerinden, kontrol grubu 1 kabul edilerek, deney gruplarının normalize edilmiş hücre sayıları hesaplanmıştır. Deneylerde HeLa hücreleri için 200, 400, 600 ve 800 µg/mL; 3T3 hücreleri için 800 µg/mL konsantrasyonları kullanılmıştır.

Mitotik aktivitenin belirlenmesi

Ekstraktların HeLa hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için mitotik indeks tespit edilmiştir. Bu amaçla, 12 mm çaplı yuvarlak lameller üzerine 10^4 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra kontrol ve hücre proliferasyonunu inhibe eden veya en yüksek konsantrasyonlardaki deney mediyumları ile değişim yapılmıştır. Ekstrakt uygulamasından 48 saat sonra hücreler 3: 1 oranında etanol: glasiyel asetik asit ile fikse edilmiş ve Feulgen yöntemi ile boyanmıştır (10). Toplam 4000 - 6000 hücrede (C), geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini kapsayan mitoz safhasındaki hücrelerin sayısı (n) belirlenmiştir. Bu veriler kullanılarak mitotik indeks (%MI), aşağıdaki (1) numaralı formül ile hesaplanmıştır (11):

$$MI = (n/C) \times 100 \quad (1)$$

DNA sentezinin ölçülmesi

Ekstraktların HeLa hücrelerinin DNA sentezi üzerinde herhangi bir etki oluşturup oluşturmadığını bulmak için trityumlu timidin kullanılarak otordiyografi metodu uygulanmış ve işaretlenme indeksi (%LI) belirlenmiştir (11). Kısaca, lameller üzerine ekilmiş hücrelere kontrol ve hücre proliferasyonunu inhibe eden veya en yüksek konsantrasyonda deney mediyumları 48 saat süreyle uygulanmıştır. Deney süresinin sonunda, tüm gruplara 5 µCi/mL 3H-TdR (185 MBq / 5 mCi, Amersham, England) içeren medium eklenmiş ve 20 dk 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler Clarke solüsyonu ile fikse edilmiş ve Feulgen metoduyla boyanmıştır (10). DNA'ya bağlanmadan kalan radyoaktif materyali uzaklaştırmak için %2 perklorik asit uygulanmıştır. Otordiyografi işlemi için lameller üzerindeki hücreler autoradiographic Hypercoat EM-1 emulsion (Amersham, İngiltere) ile kaplanmıştır. 8 günlük ekspozisyon süresinin sonunda, preparatların banyo işlemi Kodak D19b developer ile gerçekleştirilmiştir. Her preparatta 1000 olmak üzere, toplamda 4000-6000 hücre (C) sayılarak damgalanmış (işaretlenmiş) hücrelerin sayısı (n) belirlenmiştir. İşaretlenme indeksi (%LI), aşağıdaki (2) numaralı formül ile hesaplanmıştır (11):

$$LI = (n/C) \times 100 \quad (2)$$

Fenolik bileşen kompozisyonunun belirlenmesi

Fenolik bileşenlerin analizi, Harran Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'na (HÜBTAM) yaptırılmış olup ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UHPLC; LC-MS/MS) cihazında (Nexera, Shimadzu, Japonya) gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların kromatografik ayrılması için C-18 (Inertsil ODS-4; 3.0mm x 100mm, 2µm; GL Sciences B.V., Japonya) analitik kolon kullanılmıştır. (A) %0.1 For-

mik asit ve bidistile su ile (B) %0.1 Formik asit ve metanolden oluşan mobil faz, 0 dk %95 (A) + %5 (B), 4 dk %5 (A) + %95 (B), 7 dk %5 (A) + %95 (B) ve 7.01 dk %95 (A) + %5 (B) gradient programı kullanılarak çalıştırılmıştır. Mobil fazın akış hızı 0.3 mL/dk ve her ekstrakt için enjeksiyon hacmi 2 µL olarak ayarlanmıştır.

İstatistiksel analiz

Deneylerden elde edilen veriler, her grubun aritmetik ortalaması ve her bir ortalama değer için standart hatası (\pm SH) olarak sunulmuştur. Verilerin istatistiksel bakımdan değerlendirilmesi için MS Office Excel ve SPSS 11.0 programları kullanılarak ANOVA tek yönlü varyans analizi, Student-t testi, yüzde oranların karşılaştırılması ile ilgili testler ve regresyon analizi yapılmıştır. 0.05'ten küçük P değerleri istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Proliferasyon üzerindeki etkiler

Bu çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan hem metanolik (600 µg/mL and 800 µg/mL) hem de etanolik (800 µg/mL) yaprak ekstrelerinin HeLa hücrelerinin proliferasyonunu istatistiksel bakımdan anlamlı şekilde baskıladığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 2A, 2C). Elde edilen verilere göre, metanolik yaprak ekstresinin 48 saat süreyle 200 µg/mL konsantrasyonda uygulanması sonucunda 0.92 ± 0.03 olarak tespit edilen normalize edilmiş hücre sayısının, konsantrasyonun artışıyla azalarak en yüksek konsantrasyonda (800 µg/mL) 0.51 ± 0.10 olduğu görülmüştür. Benzer şekilde etanolik yaprak ekstresinin uygulanmasıyla HeLa hücre sayısı azalmış ve 800 µg/mL'de 0.47 ± 0.09 olarak belirlenmiştir. Şekil 2B ve 2D'de izlendiği gibi, bu inhibisyonlar, konsantrasyon artışı ile uyumlu şekilde artmış olup hücre çoğalmasında %50 oranında inhibe eden konsantrasyonlar CLM için 763.8 µg/mL; CLE için 791.9 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ancak, metanolik ve etanolik yaprak ekstrelerinin servikal kanser HeLa hücreleri üzerinde sergiledikleri etkinin benzerini 3T3 normal fibroblast hücrelerinde de oluşturdukları gözlemlenmiştir. Ekstrelerin en yüksek konsantrasyonda uygulanması sonucunda 3T3 hücre sayısının azalarak 0.35 ± 0.07 (CLM) ve 0.57 ± 0.03 (CLE) olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Şekil 2A incelendiğinde CLM'nin 3T3 (normal) hücre proliferasyonunu HeLa (kanser) hücrelerinden daha fazla baskıladığı dikkati çekmektedir.

Keçiboynuzu meyvelerinin etli kısımlarından hazırlanmış olan metanolik meyve ekstresi (CFM) 48 saat süreyle uygulandığında HeLa hücre sayısının artarak en yüksek konsantrasyonda 1.39 ± 0.16 olduğu, 3T3 hücre sayısının ise azalarak 0.68 ± 0.14 'e gerilediği görülmüştür (Şekil 3A). Ancak her iki değişikliğin de istatistik bakımdan anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir. Etanolik meyve ekstresi (CFE) uygulaması sonucunda ise HeLa hücre sayısı (0.92 ± 0.04), kontrol (1 ± 0.00) ile benzer, 3T3 hücre sayısı ise 0.77 ± 0.10 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3B). Yapılan

istatistiksel değerlendirmede kontrol ile deney grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür.

Mitotik aktivite ve DNA sentezi üzerindeki etkiler

Çalışmanın bu kısmında, ekstrelerin HeLa hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin mekanizması hakkında bilgi sahibi olmak için mitotik indeks ve DNA sentez oranları incelenmiştir. Yaprak ekstrelerinin hücre proliferasyonunu baskılayan konsantrasyonlarında (CLM: 600 ve 800 $\mu\text{g/mL}$; CLE: 800 $\mu\text{g/mL}$) mitotik aktivitenin ve DNA sentez oranlarının da baskılandığı görülmüştür (Şekil 4 ve 5). Mitotik indeks, kontrol grubunda $\%5.84\pm1.42$ iken CLM uygulanması sonucunda azalarak $\%1.79\pm0.21$ ve $\%1.60\pm0.06$; CLE800 grubunda ise $\%2.63\pm0.19$ olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgulardan hareketle, yaprak ekstrelerinin hücre siklusunun hangi safhasında etkili olduğunu anlamak üzere DNA sentez oranlarını ifade eden işaretlenme indeksi belirlenmiştir. Kontrol grubunda $\%27.37\pm4.01$ olan işaretlenme indeksinin, yaprak ekstrelerinin uygulanması sonucunda belirgin şekilde azalarak 800 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda $\%1$ 'in altına düştüğü (CLM600: $\%1.38\pm0.39$; CLM800: $\%0.17\pm0.11$; CLE800: $\%0.33\pm0.10$) tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Metanol ile hazırlanan meyve ekstresinin 48 saat süreyle uygulanması sonucunda HeLa hücrelerinin mitotik indeksi

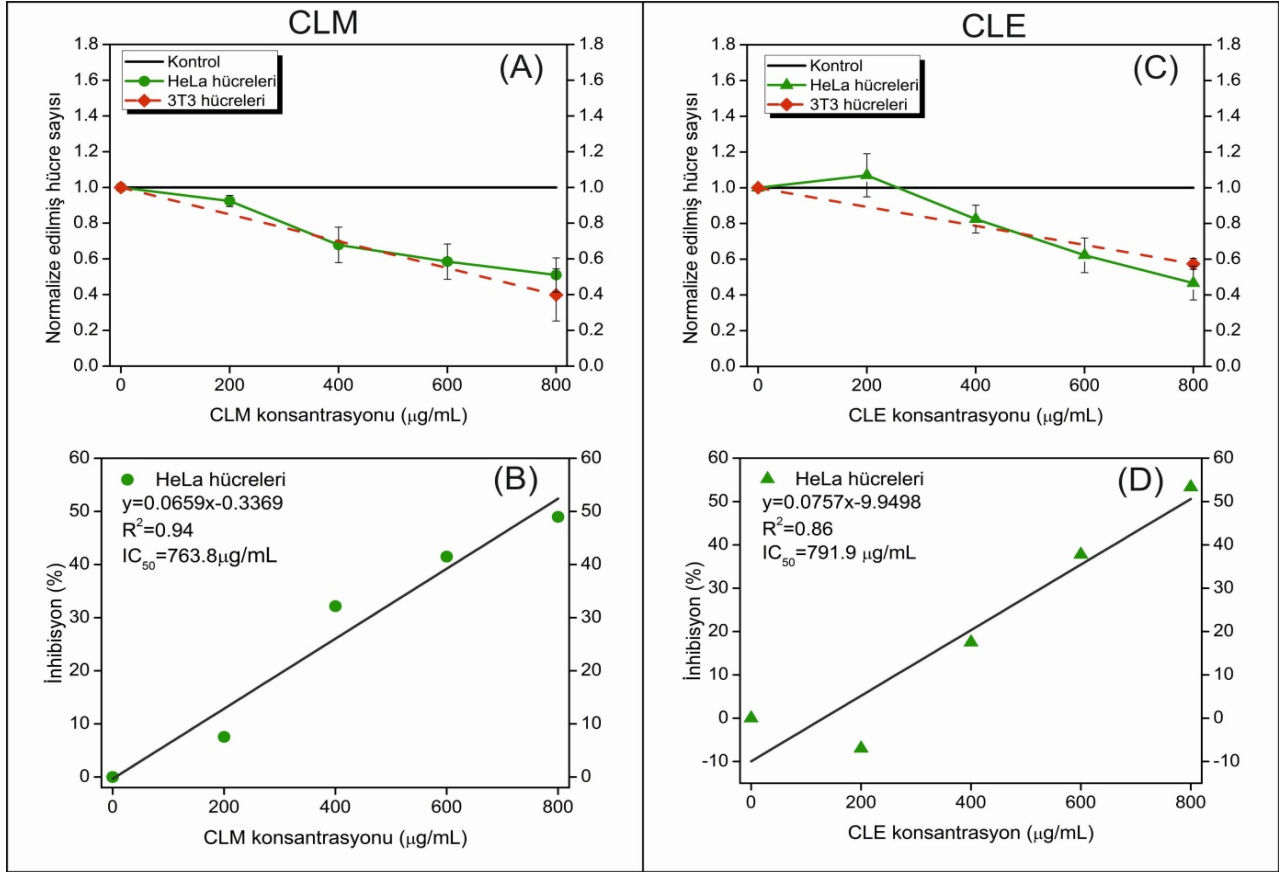
$\%5.60\pm0.42$; işaretlenme indeksi ise $\%25.53\pm0.36$ ile kontrol değerlerine benzer bulunmuştur (Şekil 4 ve 5). CFE800 grubunda, hücrelerin mitotik indeksi $\%4.98\pm0.56$ olarak belirlenirken ($p>0.05$), işaretlenme indeksinin $\%23.59\pm2.40$ oranıyla kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde baskılandığı saptanmıştır.

Fenolik bileşenler

Keçiboynuzu yaprak ve meyvelerinin metanol ve etanol ile hazırlanmış ekstraktları içerisindeki fenolik bileşen oranları (%) Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1 incelendiğinde bütün ekstraktlarda en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşenin vanilik asit olduğu görülmektedir. Yaprak ve meyve ekstraktları karşılaştırıldığında vanilik asitin meyve ekstraktlarında daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Kateşin hidrat, floridzin dihidrat, mirisetin, bütein, naringenin, luteolin, 4-hidroksibenzoik asit ve salisilik asit yaprak ekstraktlarında meyveye göre daha yüksek oranda tespit edilmiş olup; resveratrol, gallik asit, ellajik asit ve kurmin ise meyvede daha fazla miktarda bulunmuştur. Kaempferol, olöropein, hidroksisinnamik asit, silimarin, 2-hidroksi-1,4-naftokinon, kurmin ve timokinon sadece meyve ekstraktlarında saptanmıştır. Kuersetin miktarının ise meyve ve yaprakta benzer olduğu görülmüştür.

Tablo 1. Keçiboynuzu meyve ve yaprak ekstraktlarında tespit edilen fenolik bileşen miktarı (%). CFE: Keçiboynuzu etanolik meyve ekstresi; CFM: Keçiboynuzu metanolik meyve ekstresi; CLE: Keçiboynuzu etanolik yaprak ekstresi; CLM: Keçiboynuzu metanolik yaprak ekstresi

Fenolik Bileşen	CFE	CFM	CLE	CLM
Kateşin hidrat	6.9	0.9	11.2	10.2
Asetil hidroksamik asit	0.8	0.1	0.4	0.2
Vanilik asit	63.3	71.7	34.4	41.8
Resveratrol	0.3	2.4	0.9	0.8
Gallik asit	5.8	0.9	2.5	2.4
Kafeik asit	0	0	0	0
Floridzin dihidrat	0	1.8	2.2	2.4
Olöropein	0	0.9	0	0
Hidroksisinnamik asit	0	1.7	0	0
Ellajik asit	1.1	1.6	0.3	0
Mirisetin	0	1.8	3.0	0
Silimarin	0	1.5	0	0
2-hidroksi-1,4-naftokinon	0	1.5	0	0
Bütein	2.3	2.4	6.2	6.0
Naringenin	5.0	2.1	6.5	5.9
Luteolin	4.7	1.2	17.4	19.5
Kaempferol	0	1.6	0	0
Kurmin	0.4	3.1	0	0
Timokinon	0	1.2	0	0
4-Hidroksibenzoik asit	2.9	0.8	7.5	5.4
Salisilik asit	6.0	0.5	7.0	5.0
Kuersetin	0.6	0.1	0.5	0.5
Toplam	100.0	100.0	100.0	100.0



Şekil 2. HeLa ve 3T3 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda ve 48 saat süreyle yaprak ekstresi uygulaması sonucu tespit edilen (A): Normalize edilmiş hücre sayıları, (B) % inhibisyon oranları CLM: metanolik yaprak ekstresi (C) Normalize edilmiş hücre sayıları, (D) % inhibisyon oranları CLE: etanolik yaprak ekstresi

Tartışma

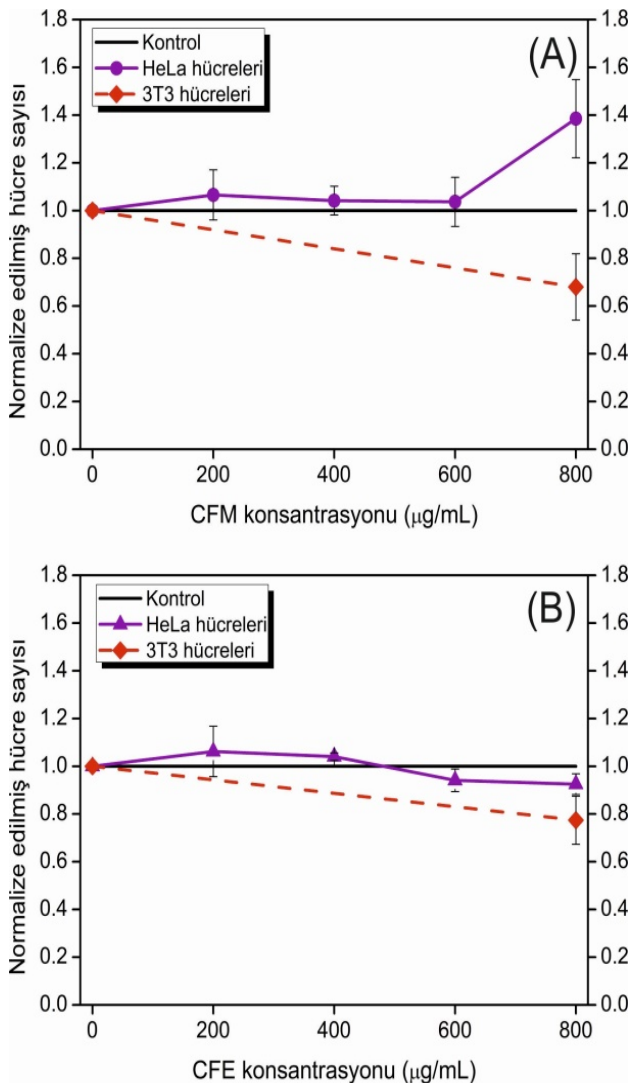
Deneylerden elde edilen verilere göre, *C. siliqua*'nın metanolik ve etanolik yaprak ekstrelerinin her ikisinin de HeLa hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve oluşan inhibisyonların, konsantrasyon ve uygulama süresinin artışı ile uyumlu olarak arttığı tespit edilmiştir. Hem metanolik hem de etanolik yaprak ekstrelerinin HeLa hücre proliferasyonunu inhibe eden konsantrasyonlarının hücrelerin mitotik aktiviteleri ve DNA sentezi üzerinde de inhibisyon meydana getirdiği görülmüştür. Elde edilen bu bulgular proliferasyon bulguları ile paralellik göstermektedir. İnhibisyon oranları ve IC₅₀ değerleri incelendiğinde etanolik yaprak ekstresinin HeLa hücrelerinin proliferasyonunu metanolik yaprak ekstresine oranla daha fazla inhibe ettiği görülmüştür. Hem metanolik hem de etanolik yaprak ekstrelerinin deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda (800 µg/ml) uygulandığında 3T3 embriyonik fare fibroblast hücre proliferasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. Üstelik metanolik yaprak ekstresinin oluşturduğu bu inhibisyon, normal hücrede kanser hücresinden daha yüksek bulunmuştur.

C. siliqua'nın meyvelerinden metanol ve etanol çözücülerini kullanarak hazırlanan ekstrelerin, HeLa ve 3T3 hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulandıklarında, her iki hücrede proliferasyon üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana

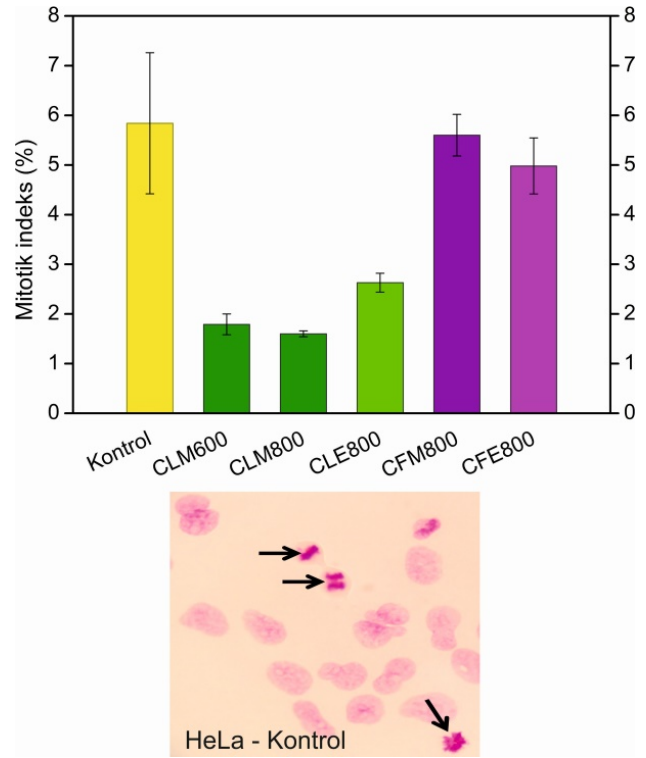
getirmedikleri tespit edilmiştir. Metanolik meyve ekstresinin, HeLa hücrelerinin proliferasyonu ile uyumlu şekilde mitoz aktivitesi ve DNA sentez oranları üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, 800 µg/ml konsantrasyondaki etanolik meyve ekstresinin DNA sentezini baskılayarak işaretlenme indeksini azalttığı tespit edilmiştir.

C. siliqua'nın yaprak ve meyvelerinden hazırlanan ekstreler ile yapılan çalışmalarda ekstraktın antimikrobiyal, antifungal ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (7). *C. siliqua*'nın yaprak ve meyvelerinde bulunan bileşenlerin periferik ve santral benzodiazepine reseptörlerine bağlanma özelliği sergilediği, bu nedenle bitkinin ekstresinin anksiyolitik – sedatif etkili potansiyel bir doğal ürün olabileceği bildirilmiştir; periferik benzodiazepine reseptörünün hücre çoğalması ve farklılaşmasında da önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (12). *C. siliqua*'nın yaprak ve meyvelerinden su ile hazırlanan ekstrelerin fare hepatosellüler karsinoma hücre soyu olan T1 hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir; yaprak ekstresinin meyve ekstresine oranla daha güçlü antiproliferatif aktivite sergilediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca ekstrelerin kaspaz 3 aktivitesini arttırdığı ve apoptozu indüklediği de belirtilmiştir (8). Klenow ve ark., ticari olarak satılan keçiboynuzu lifinden hücre mediyumu içerisinde hazırladıkları ekstraktların, DNA sentezini, hızlı çoğalan kolon kanseri HT29

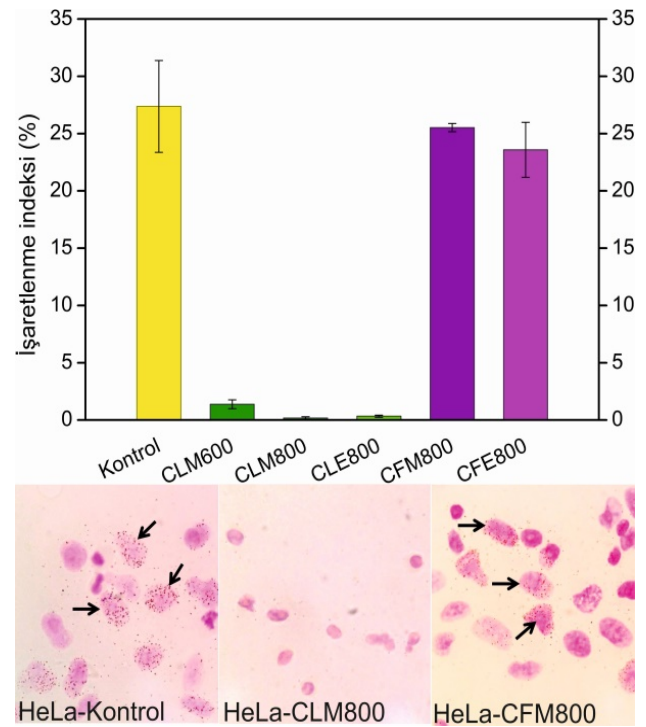
hücre hattında etkilemezken 72 saatlik uygulama sonucunda yavaş çoğalan kolon kanseri LT97 hücrelerinde baskılandığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, meyve ekstraktlarının hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlenmiştir (13). Ancak özellikle etanolik meyve ekstresinin DNA sentezini baskılaması, ekstre uygulamasına 72 ve 96 saat gibi daha uzun sürelerle devam edildiğinde mitotik aktivite ve hücre proliferasyonunda da azalmanın görülebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, Şekil 3 incelendiğinde meyve ekstraktlarının 3T3 hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı değişiklik oluşturamamakla birlikte ekstre uygulanmasıyla hücre sayısının azalma eğiliminde olabileceği dikkat çekmektedir. Bu durum, konsantrasyonun artışı veya uygulama süresinin uzamasıyla azalma eğiliminin artarak devam edebileceğini aklığa getirmektedir.



Şekil 3. HeLa ve 3T3 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda ve 48 saat süreyle meyve ekstresi uygulaması sonucu tespit edilen normalize edilmiş hücre sayıları (A) CFM: metanolik meyve ekstresi (B) CFE: etanolik meyve ekstresi



Şekil 4. HeLa hücre proliferasyonunu inhibe eden veya en yüksek konsantrasyonlarda keçiboynuzunun yaprak ve meyvelerinin metanol ve etanol ekstraktlarının uygulanması sonucu tespit edilen mitotik indeks (%MI) değerleri. Oklar mitoz safhasındaki hücreleri göstermektedir.



Şekil 5. HeLa hücre proliferasyonunu inhibe eden veya en yüksek konsantrasyonlarda keçiboynuzunun yaprak ve meyvelerinin metanol ve etanol ekstraktlarının uygulanması sonucu tespit edilen işaretlenme indeks (%LI) değerleri. Oklar damgalanmış (DNA sentezi yapan) hücreleri göstermektedir.

C. siliqua meyvelerinin gallik asit, gallotannin, metil gallat, kaempferol, kuersetin, mirisetin, sinamik asit, genistein, naringenin vb. fenolik antioksidanlarca zengin olduğu bildirilmiştir (14). Ancak bitkilerin bileşimlerinde bulunan maddelerin bitkinin çeşidine, yetiştirme yerine, mevsime göre değişiklik gösterebileceği bilinmektedir (15,16). Custodio ve ark., dişi, erkek ve hermafrodit ağaçlardan hazırladıkları ekstraktların total fenolik içerik miktarı ile gallik asit, mirisetin, metil gallat gibi bazı fenolik bileşenlerin miktarlarını karşılaştırmışlar; hermafrodit ağaçların en yüksek total fenolik içeriğe sahip olduğunu ve fenolik bileşen oranlarının da çeşitler arasında farklılık gösterdiğini bulmuşlardır (17,18). Çalışmamızda, araştırılan fenolik bileşenlerden vanilik asitin hem yaprak hem de meyvelerde en yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Yaprak ekstraktlarında daha fazla miktarda tespit ettiğimiz luteolin, mirisetin, naringenin ve salisilik asitin yanısıra meyvede daha yüksek oranda bulunan resveratrol, gallik asit ve ellajik asit; sadece meyve ekstraktlarında saptanan kaempferol, olöropein ve timokinon ile meyve ve yaprakta benzer miktarda olduğu belirlenen kuersetinin tek başına veya başka bileşiklerle kombine olarak uygulandığı ve antiproliferatif, apoptotik, antiemetastatik gibi çeşitli aktivitelere sahip olduklarını bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (19-25). Ancak deneylerimiz sonucunda ulaştığımız bulgulara bu bileşiklerden hangisi ya da hangilerinin katkı sağladığını belirleyebilmek için ek çalışmalar dizayn edilmelidir.

Çalışmamızda, keçiboynuzu yapraklarından hazırlanan metanol ve etanol ekstrelerinin HeLa hücrelerinde DNA sentezini baskılayarak mitotik aktiviteyi ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Custodio ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dişi, erkek ve hermafrodit olarak sınıflandırılan *C. siliqua* ağaçlarının yapraklarından metanol ile ayrı ayrı ekstraktlar hazırlanmış; ekstraktların antioksidan aktivite ve serbest radikal indirgeme kapasiteleri ile antitümöral etkileri incelenmiştir. Yüksek miktarda flavonoid ve fenolik bileşen içeren ekstraktların antioksidan kapasitelerinin de yüksek olduğu, ancak flavonoid ve tannin içerikleriyle serbest radikal indirgeme kapasiteleri arasında korelasyon bulunmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, ekstraktların HeLa hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucunda erkek ve hermafrodit ağaçların yapraklarından hazırlanan metanolik ekstraktların, HeLa hücre proliferasyonunu daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır (26).

Sonuçlarımız literatür ile uyumlu olmakla birlikte elde ettiğimiz verilere göre metanolik ve etanolik yaprak ekstraktları 3T3 normal fibroblast hücreleri üzerinde de sitotoksik aktivite sergilemiştir. Üstelik metanolik yaprak ekstraktının 3T3 hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi HeLa hücreleri üzerindeki kadarından daha yüksektir. Kemoterapide amaç hastanın normal dokularına zarar vermeden ya da minimum etki oluştururken, kanser hücrelerinin ortadan kaldı-

rılmasını sağlamaktır. Bu nedenle yaprak ekstrelerinin potansiyel antikanser ajan olarak değerlendirilebilmeleri için normal hücrelere zarar vermeyen etken maddenin tespit edilmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Başkanlığı tarafından İÜBAP572 nolu proje ile kısmen desteklenmiştir. Hücre kültürü deneyleri İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Yazar, laboratuvar kullanımı izni ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a ve teknik desteği nedeniyle Ayşe TOPUZ KALOĞLU'na teşekkür eder. Çalışmada verilen sonuçların bir kısmı (HeLa proliferasyonu, mitotik aktivite ve DNA sentezi) 23-27 Haziran 2014'te gerçekleştirilen 22. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Siegel RL, Miller KB, Jemal A. Cancer Statistic. CA Cancer J Clin 2017;67(1):7-30.
2. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık. 1996.
3. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol Cell 2014;25(18):2677-2681.
4. Thirumaran R, Prendergast GC., Gilman PB. Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer. In: Prendergast GC., Jaffee EM. eds. Cancer Immunotherapy. Academic Press. 2007:101-116.
5. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. Tohumlu Bitkiler Sistematiği, 4. Baskı, İzmir:Ege Üniversitesi Basımevi 1995.
6. Baytop, T. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi Geçmişte ve Bugün. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1999.
7. Kuvçak B, Mert T, Öztürk T. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. Turk J Biol 2002;26:197-200.
8. Corsi L, Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C, Baraldi M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. Fitoterapia 2002;73(7-8):674-684.
9. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55-63.
10. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd Edn. London: Elsevier, 1990.
11. Özalpan A. Temel Radyobioloji, 1. Baskı, İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları. 2001.
12. Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C, Baraldi M. Extraction and purification from *Ceratonia siliqua* of compounds acting on central and peripheral benzodiazepine receptors. Fitoterapia 2002;73(5):390-396.
13. Klenow S, Gleis M, Haber B, Owen R, Pool-Zobel BL. Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells, Food Chem Toxicol 2008;46(4):1389-1397.
14. Owen RW, Haubner R, Hull WE, ve ark. Isolation and structure elucidation of major individual polyphenols in carob fibre. Food Chem Toxicol 2003;41(12):1727-1738.
15. De Ancos B, Gonzalez EM, Cano MP. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit, J Agric Food Chem 2000;48(10):4565-4570.
16. Patel AV, Rojas-Vera J, Dacke CG. Therapeutic constituents

- and actions of Rubus species, *Curr Med Chem* 2004;11(11):1501-1512.
17. Custódio L, Escapa AL, Fernandes E, Fajardo A, Aligué R, Albericio F, Neng N, Nogueira JMF, Romano A. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant Foods Hum Nutr* 2011;66(1):78–84.
 18. Custódio L, Fernandes E, Escapa AL, Fajardo A, Aligué R, Albericio F, Neng N, Nogueira JMF, Romano A. Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar. *J Agric Food Chem* 2011;59(13):7005–7012.
 19. Paterson JR, Lawrence JR. Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer. *QJ Med* 2001;94(8):445-448.
 20. Yang J-H, Hsia T-C, Kuo H-M, Lee Chao P-D, Chou C-C, Wei Y-H, Chung J-G. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G2/M arrest and induction of apoptosis, *Drug Metab Dispos* 2006;34(2):296-304.
 21. Spitz GA, Furtado CM, Sola-Penna M, Zancan P. Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem Pharmacol* 2009;77(1):46–53.
 22. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. eds. *Polyphenols in Human Health and Disease*, USA:Elsevier, 2014.
 23. Cook MT. Mechanism of metastasis suppression by luteolin in breast cancer. *Breast Cancer* 2018;10:89–100.
 24. Han K, Lang T, Zhang Z, Zhang Y, Sun Y, Shen Z, Beuerman RW, Zhou L, Min D. Luteolin attenuates Wnt signaling via upregulation of FZD6 to suppress prostate cancer stemness revealed by comparative proteomics. *Sci Rep* 2018;8(1):8537.
 25. Chen P-Y, Tien H-J, Chen S-F, Horng C-T, Tang H-L, Jung H-L, Wu M-J, Yen J-H. Response of myeloid leukemia cells to luteolin is modulated by differentially expressed Pituitary Tumor-Transforming Gene 1 (PTTG1) oncoprotein. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1173.
 26. Custódio L, Fernandes E, Escapa AL, ve ark. Antioxidant activity and in vitro inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*), *Pharm Biol* 2009;47(8):721-728.