Sdü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi / Cilt 8 Sayı 2 / 2017

Silibinin'in Vitro Ortamda CCL-228-SW 480 Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması

Investigation of Appoptotic Effect of Silibinin on CCL-228-SW 480 Column Cancer Cell Line: An In Vitro Study

Dilek Bayram[1]

[1]Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.

Özet

Amaç: Kolon kanseri, dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Kolon kanseri, kansere bağlı ölümlerde erkeklerde akciğer ve prostat kanseri; kadınlarda meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Silibin, devedikeni (silybum marianum) bitkisinden elde edilen bir ekstraktır. Yapılan çalışmalarda silibinin deri, mide kanserlerinde kanser kemoprotektif ajan olduğu ve antikarsinojenik etki gösterdiği tespit edilmiş ayrıca meme, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında hücre siklusunu durdurduğu ve apopitozisi tetiklediği akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, gösterilmiştir. Çalışmamızda silibinin CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücre soyu üzerine etkisini monolayer kültür ortamında incelemeyi amaçladık.

Materyal-Method: Çalışmamızda silibinin CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücre soyu üzerine etkisini incelemek amacıyla 100 µM/ml doz silibin (ID_{50} inhibisyon dozu belirlenen) hücrelere uygulandı. Silibin (100 µM/ml) uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72 saat süreler sonunda BRDU işaretleme indeksi ve aktif kaspaz-3 tayinine immünohistokimyasal yöntemle bakıldı.

Bulgular: CCL-228- SW 480 kolon karsinoma hücrelerinde silibinin ID50 inhibisyon dozu 100 µM/ml olarak belirlendi. Silibinin iki boyutlu kültür ortamında BRDU ile işaretlenen hücrelerin sayısını azalttığı, kaspaz-3 ile boyanan hücrelerin sayısını ise arttırdığı görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak silibin CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücre soyunda hücre proliferasyonunu inhibe edici ve apoptozisi tetikleyici etki göstermiştir. Buradan yola çıkarak yapmış olduğumuz iki boyutlu kültür sonuçlarımızın daha sonra yapılacak silibin ve kanser çalışmalarına ışık tutacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler: CCL-228-SW 480 Hücre Soyu, Apopitozis, Silibin

Abstract

Objective: Colon cancer is a major cause of morbidity and mortality in the world. It is third of cancer-related deaths after breast and lung cancer in women, lung cancer and prostate cancer in males. Silibin is an extract obtained from the plant of the thistle (silybum marianum). Studies have shown that silibin is a cancer chemoprotective agent in skin, stomach cancers, and shows anticarcinogenic effect. At the same time it's known that it suppresses cell cycle in breast, colon, bladder cancer cell lines and suppresses apoptosis-induced lung tumor growth. In our study, we aimed to investigate the effect of silibin on CCL-228-SW 480 colon carcinoma cell line in monolayer culture medium.

Material-Method: ID_{50} inhibition was determined on the dose for silibin and after it was found 100 µM/ml was applied to the cells to examine the effect of silibin on CCL-228-SW 480 colon carcinoma cell line. Silibin (100 µM/ml) was administered and after 24, 48 and 72 hours the BRDU marking index and active caspase-3 assay were determined by immunohistochemistry.

Results: The ID50 inhibition dose of silibinin CCL-228-SW 480 colon carcinoma cells was determined to be 100 µM/ml. Silibin decreased the number of cells marked with BRDU and increased the number of cells stained with caspase-3 in the two-dimensional culture.

Conclusion: As a result, silibin CCL-228-SW 480 inhibited cell proliferation and apoptosis in colon cancer cell line. We believe that the results of our two-dimensional culture, which we have made here, will shed light on silibin and cancer studies to be done later.

Keywords: CCL-228-SW 480 Cell Line, Apoptosis, Silibin

Giriş

Kanser, çeşitli faktörler nedeniyle değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan bir hastalıktır. Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon insanda kanser teşhis edilmekte ve kolorektal kansere bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir (1). Epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanserin yüksek yağ ve düşük lif içeren diyetle beslenen toplumlarda daha sık görüldüğünü göstermiştir (2).

Kolorektal kanserde hastalığın ortaya çıkış yaşında herediter özellikler önem taşımaktadır. Kansere bağlı sendromları olan

DOI: 10.22312/sdusbed.287465
Müracaat tarihi: 23.01.2017
Kabul tarihi: 11.04.2017

Yazışma Adresi / Corresponding: Dilek Bayram,
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.
Tel: 0 505 231 2665/3244
Fax: 0246 237 1165
E-mail: dilekbayram@sdu.edu.tr

hastalarda kolorektal kanser genellikle 40 yaş sonrasında gözlemlenir. Kolon tümörlerinin çok büyük bir kısmı adenokanserlerdir (2, 3). Kolon tümörlerinin yaklaşık 1/3'ü rektumda yerleşirken kalan 2/3'lük bölümü kolonun diğer kısımlarında ve özellikle sol kolonda yerleşim gösterir (rektum %20-30, sigmoid %25, inen kolon %5-10, transvers kolon %10-15, cıkan kolon-cekum %25) (3). Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %25'inde hastalık süresinde kanserin farklı organlara yayılmasından kaynaklı ölümler gerçekleşmiştir. Günümüzde hala kolrektal kanserin metaztazı, bu hastalığın getirdiği en büyük problemlerdendir (2).

Kanser tedavisinde daha çok; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tedavilerin yan etkilerinin hastada oluşturduğu sıkıntılardan ve iyileşme sürecine olumsuz etkilerinden dolayı günden güne kansere yönelik farklı tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Gelişen bu tedavilerin başında; tamamen doğal olmaları, eşirim acısından daha kolay ve daha ucuz olmaları nedeniyle bitkisel yöntemler gelmektedir (4) .

Silybum marianum (=carduus marianus) meryemana dikeni bitkisi asteraceae (=compositae) familyasına ait bir bitkidir. Ülkemizde doğal olarak yetişenleri ve kültürü yapılanları tek yıllıktır (5). Bitki, karaciğer ve safra hastalıkları, toksin ve mantar zehirlenmeleri, böcek ısırıklarının tedavisinde yaklaşık 2000 yıldır kullanılmaktadır (6, 7). Meryemana dikeni tohumları %1–6 oranında silimarin içermektedir. Günümüzde Amerika ve Avrupa'da üretilen yoğunlaştırılmış meryemana dikeni ekstreleri %70–80 oranında silimarin içermektedir. Silimarin, meryemana dikeni bitkisinin tohumlarında bulunan farmakolojik olarak aktif, silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin, taksifolin ve dehidrosilibinin gibi flavonolignanlardan meydana gelmektedir. Silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni silibindir (8, 9).

Silibinin viral hepatit, toksik hepatit, karaciğer yağlanması, siroz, iskemik hasar ve radyasyon toksisitesinde güçlü antioksidan özelliği kanıtlanmıştır (10). Ayrıca hücre kültürlerinde farklılaşmayı baskıladığı ve oksidatif stresin tetiklediği apoptozise karşı primer hippokampal nöronları koruduğu; glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin pankreatik aktivitesini uyardığı, makrofaj ve T-lenfositlerdeki interlökin 1β, interferon-γ, interferon-α gibi inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ederek pankreastaki β hücrelerini de koruduğu gösterilmiştir (11-14).

Silibinin koruyucu etkisi sayesinde birçok kimyasalın karsinojenik etkisini baskılar (19). Silibin, belirgin bir şekilde N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozaminin yol açtığı mesane hasarlarını önemli ölçüde azaltmıştır (15). Ayrıca; silibin, sıçanlarda azoksimetan ile oluşturulan kalın bağırsak karsinogenezini önemli ölçüde azaltmıştır (16). Silimarin bezoil peroksit veya 12-O-tetradekanoilformol–13-asetat ile oluşturulmuş deri kanserini de baskılamıştır. Yine, silibinin karsinogenez ya da kanser hücrelerinin çoğalma aşamasında görev alan reseptörler üzerinde etkisi vardır. Silibinin, hücre uyarı ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynadığı gözlemlenmiştir (17-19). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstraktın akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, meme, mesane kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir.(18, 20-23).

Çalışmamızda CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücre hatları üzerine silybum marianum (devedikeni) bitkisinin ekstraktı olan silibinin apoptotik etkisini proliferasyon, canlılık ve tutunma deneyi, imünohistokimyasal olarak; 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BRDU) işaretleme indeksi, kaspaz–3 tayini yapılarak incelemeyi amaçladık.

Materyal-Method

Hücre Kültürü

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında, araştırma laboratuvarı ve hücre kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada DSMZ'den (Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu) alınan CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücre hatları kullanıldı. CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS (Fetal Calf Serum) (Biological Industries, Israel), 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 (Biological Industries, Israel) medyumu kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO_2, %95 hava karışımı ve nem içeren ve 37ºC olan inkübatör (heal force) içinde tutularak ve haftada 3 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Deney planı

Doz belirleme deneyi için 5 ml RPMI 1640 medyumu ilave edilen 6 kuyucuklu platelerin her birine canlı olarak 500.000 SW 480 hücresi ekimi yapıldı. Silibinin, 1, 10, 50, 100, 200 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde steril dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmış taze çözeltileri 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi. Her bir doz için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar için 24. 48. ve 72. saatler için ekildi ve 37ºC'de %5 CO_2 hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi. Her bir sürenin bitiminde hücreler santrifüj tekniğiyle toplanarak %0,1'lik tripan mavisi boyasıyla, hücre solüsyonu 1/1 oranında hazırlandı ve sayma kamarasında sayıldı ve hücre sayıları kaydedildi. Böylece silibinin ID_{50} (inhibisyon dozu) saptandı. Daha sonra kontrol grubu ve silibin grubu (ID_{50} inhibisyon dozu belirlenen) olmak üzere iki grup oluşturuldu. İki boyutlu kültür ortamında (lamelli ekim) BRDU işaretleme indeksi ve aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yapılarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

İki Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin (BRDU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına lamelli ekim yapıldı. Silibinin doz belirleme deneyinde hesaplanan 100 µM/ml dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BRDU ile 37ºC'de inkübe edildi. Üst medyum çekilip

atıldıktan sonra Phosphate Buffered Salinede (PBS) 37ºC etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 4°C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi.

İmmünohistokimyasal boyama için örnekler PBS'de 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0,5 hidrojen peroksitte (H_2O_2) 10 dk tutulup 3 kez 2'şer dk distile su ile yıkandı. Daha sonra BRDU Staining Kit Streptavidin-Biotin System adı verilen BRDU boyama kiti (Invitrogen Co. Canada) kullanılarak boyama yapıldı. Bunun için kitin içerisinde bulunan denatürasyon solüsyonunda 30 dk bekletildikten sonra PBS ile 3 kez 2'şer dk yıkandı. 10 dk blocking solüsyonunun ardından 1 saat primer antikorda, (Biyotinli Mouse Anti-BRDU monoclonal) (Invitrogen Co. Canada) nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 2'şer dk yıkandıktan sonra streptavidin peroksidazda 10 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende Diaminobenzidine (DAB) 5 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı ve kapatıcı (ultramount) ile kapatılarak, ışık mikroskobunda sayım yapılıp işaretlenme oranları belirlendi.

İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 ile İmmünohistokimyasal Boyama

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi. Silibinin yine doz belirleme deneyinde hesaplanan 100 µM/ml dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'de 37ºC etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 4°C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi.

İmmünohistokimyasal boyama için lameller PBS'de 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0,5 H_2O_2'de 10 dk tutularak 3 kez 5 dk distile su ile yıkandı. Daha sonra 30 dk 4 N HCl'de bekletilip PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. 20 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda (aktif kaspaz-3) (Invitrogen Co. Canada), nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorda (biotinylated goat anti-mouse) 20 dk, tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda yine 20 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende 5 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskobunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 17.0 paket istatistik programı ile yapıldı. Elde edilen veriler üzerinde çok yönlü istatistik değerlendirmeler yapılmıştır. Ölçüm değerleri homojen dağılım göstermediği için non-parametrik testlerle çalışıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analiz testi kullanıldı. Sürekli değişken değerlerden oluşan iki bağımsız grup arasında farklılığın olup olmadığı ise Mann-Whitney U Testi ile belirlendi. Anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edildi.

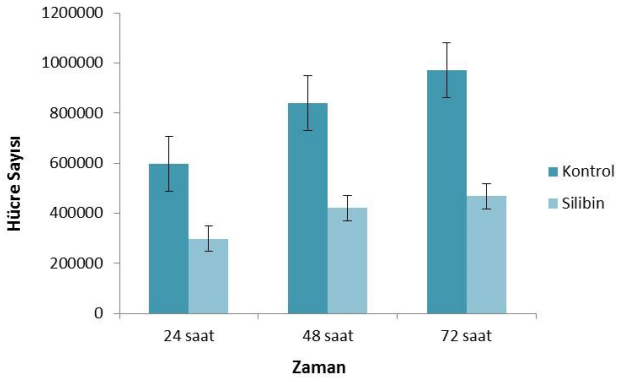
Bulgular

Doz Belirleme Deneyi Bulguları

24, 48 ve 72. saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler %0,5 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamarasıyla (hemasitometri) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedilerek silibin için ID_{50} (İnhibisyon dozu %50) dozu 100 µM olarak saptandı.

Proliferasyon Deneyi Bulguları

6 kuyucuklu plateler kontrol ve silibin grubu olarak ayrılarak sayım işlemi yapıldı. Kontrol grubuna ait kuyucuklardaki hücre sayılarında zamanla orantılı olarak artma gözlendi. Deney grubunda doz belirleme deneyinde her üç saat için ayrı ayrı bulunulan IC50 dozuna uygun olarak ekstrakt verilerek sayım yapıldı ve silibinin verilmesiyle hücre sayılarında anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0,05$), (Grafik 1).

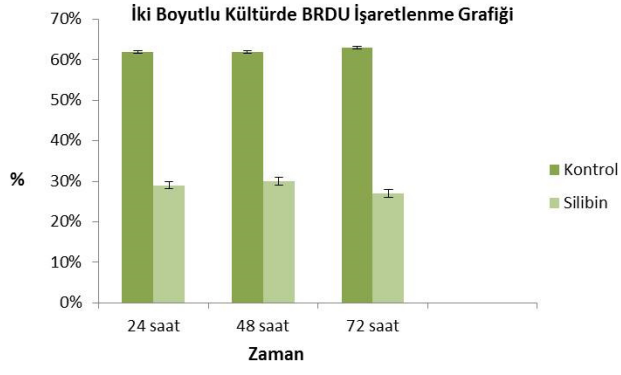


Grafik 1. Zamana göre hücre çoğalma verileri

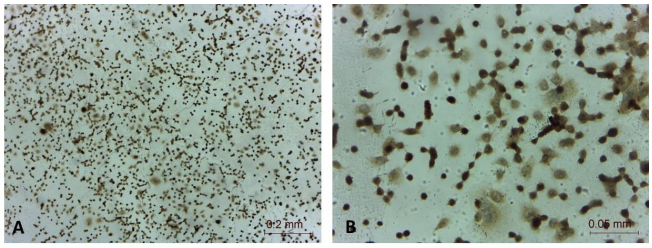
İki Boyutlu Kültürlerde BRDU İşaretlenme Değerleri

24 kuyucuklu platelere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan BRDU işaretlemesi; her bir saat için (24, 48, 72) ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde sentez fazında çok sayıda BRDU ile işaretlenmiş hücreler gözlemlendi (Şekil1, 2, 3).

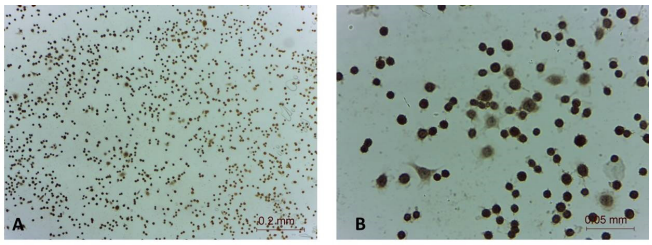
24-48-72 saatleri için verilen silibinin gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla BRDU işaretleme indeksinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$), (Grafik 2, Şekil 4, 5, 6).



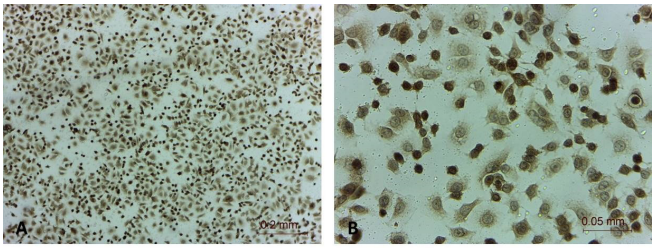
Grafik 2. İki boyutlu kültürlerde BRDU İle işaretlenme grafiği



Şekil 1. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama. 24. saat kontrol grubu. BRDU ile yoğun boyanma gözlendi (AX10, BX40)



Şekil 2. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama. 48. saat kontrol grubu. BRDU ile yoğun boyanma gözlendi (AX10, BX40)

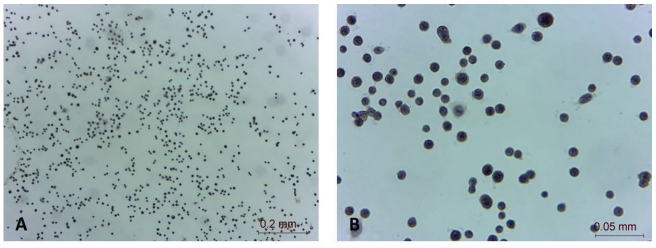


Şekil 3. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama.72. saat kontrol grubu. BRDU ile yoğun boyanma gözlendi (AX10, BX40)

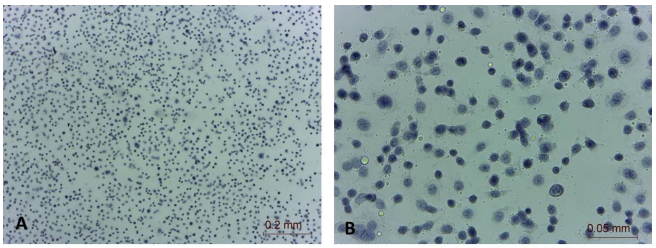
İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 ile İşaretlenme Değerleri

24 kuyucuklu platelere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan Kaspaz-3 işaretlemesi; her bir saat için ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde çok az sayıda apopitotik hücre gözlemlendi (Şekil 7, 8, 9) (24, 48, 72).

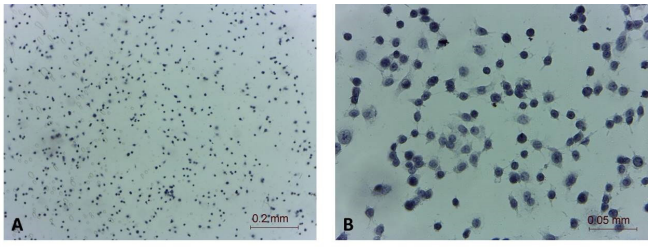
24-48-72 saatleri için verilen silibin gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda apopitotik hücre gözlemlendi ($p<0,05$), (Grafik 3, Şekil 10, 11, 12).



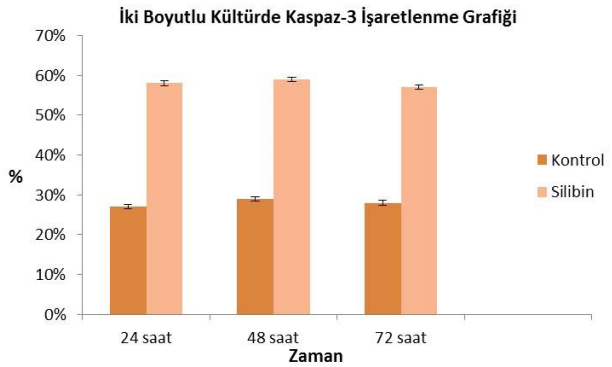
Şekil 4. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama. 24. saat silibin grubu BRDU ile işaretlenen hücreler (AX10, BX40)



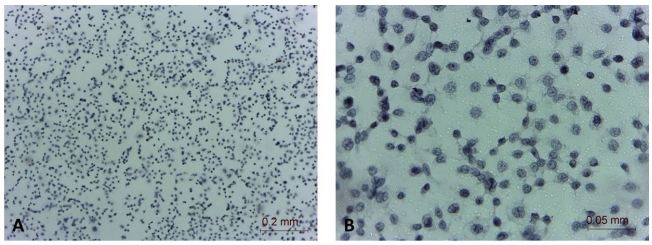
Şekil 5. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama. 48. saat silibin grubu BRDU ile işaretlenen hücreler (AX10, BX40)



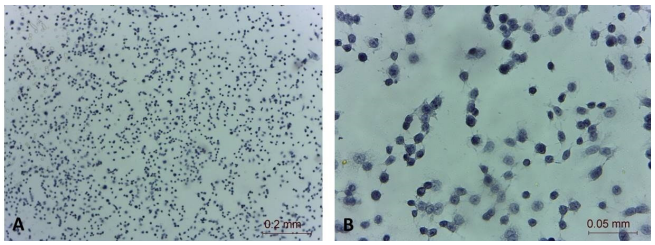
Şekil 6. İki boyutlu kültürde BRDU ile immünohistokimyasal boyama. 72. saat silibin grubu BRDU ile işaretlenen hücreler (AX10, BX40)



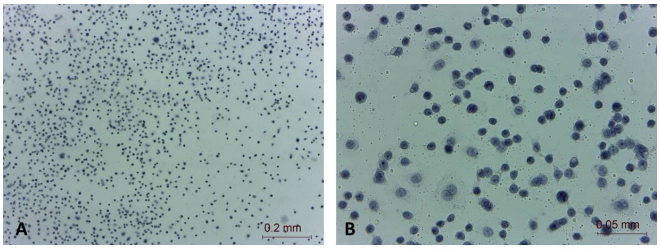
Grafik 3. İki boyutlu kültürde kaspaz-3 ile işaretlenme grafiği



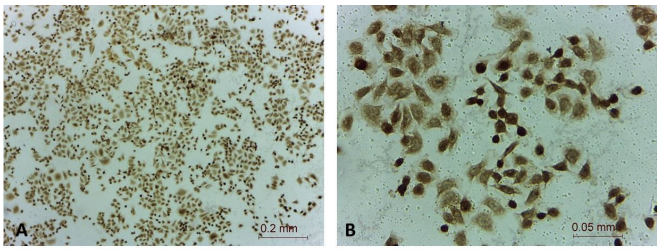
Şekil 7. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 24. saat kontrol grubu. Kaspaz-3 ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



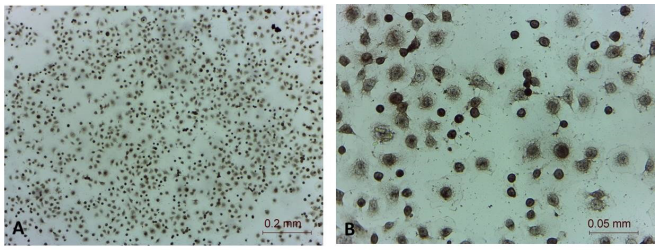
Şekil 8. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 48. Saat kontrol grubu. Kaspaz-3 ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



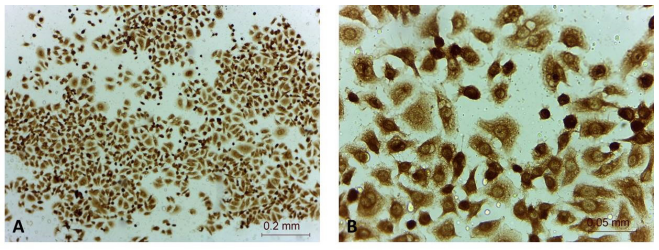
Şekil 9. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 72. Saat kontrol grubu. Kaspaz-3 ile işaretlenen hücreler (Ax20, Bx40)



Şekil 10. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 24. saat silibin grubu; kaspaz-3 ile yoğun boyanma gözlendi (Ax20, Bx40)



Şekil 11. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 48. saat silibin grubu; kaspaz-3 ile yoğun boyanma gözlendi (Ax20, Bx40)



Şekil 12. Monolayer kültürde kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama. 72. saat silibin grubu; kaspaz-3 ile yoğun boyanma gözlendi (Ax20, Bx40)

Tartışma

Kolon kanseri gastrointestinal sistemde meydana gelen, kanserin neden olduğu ölümlerde akciğer kanserinden sonra gelen ve etiyolojisi hala net olarak anlaşılamayan kompleks bir kanser türüdür. Kötü beslenme, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara kullanımı gibi farklı çevresel etkenlerle tetiklendiği düşünülmektedir. Beslenme şekliyle yakından alakalı bulunan kolon kanserinin özellikle yağlı besinler tüketme ve tüketim miktarının fazlalığıyla paralel oranda arttığı bilinmektedir. Risk faktörü olarak bunların yanı sıra genetik etmenler de rol oynamaktadır (26, 27).

Epidomiyolojik çalışmalar göstermiştir ki, vejeteryan beslenme şekline sahip olan ve lignan içeren bitki yetiştiriciliği bakımından zengin olan ülkelerde yaşayan insanların kansere yakalanma riskleri daha azdır. Bu da lignanların birçok faydası olduğu düşüncesine özellikle kanser önleyici olduğu konusuna insanları daha da yakınlaştırmıştır (28, 29).

Lignanların etki mekanizmaları ve kullandıkları yolaklar konusunda bilinmeyen birçok nokta olmasından dolayı yeni çalışmalar daha çok bu yönde ilerlemektedir (30). Bitkilerden izole edilen lignanlarla yapılan bir çalışmada da, lignanların bağirsak florosında metabolize edilerek NF-kB sinyal yolağı ile antiinflamatuar etki gösterdiği gözlemlenmiştir (31). Lignanların antimikrobiyal, antiinflamatuar ve serbest radikallerden temizleyici işlevleri sahip oldukları fitoöstrojenik özelliklerine dayandırılmaktadır (32). Epidemiyolojik çalışmalarda lignanların hormona bağlı; meme, prostat gibi birçok kanser türlerinde koruyucu etki gösterdikleri bulunmuştur (33, 34).

Gerek insan sağlığı, gerekse doğa ve çevre sağlığı fitoterapinin gerekliliğini güçlendirmektedir. Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en tercih edilen ilaç kaynaklarındandır. Büyük farmasötik firmalar yeni lider yapılar için bir kaynak olarak bitkilere yeniden ilgi göstermektedirler. Fitoterapinin var olan kimyasal ilaçlarla tedavinin yerine geçmesi söz konusu olmasa da tedavide kimyasal ilaçlara destek vermekte aynı zamanda da tedavi süresince yaşanan sıkıntıları hafifletmektedir (35).

Silybum marianum (devedikeni), Asteraceae familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Devekengeli, meryemana dikeni, sütlü kengel olarak da bilinir. Meyveleri yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıklarına karşı kullanılan bitki ile ilgili ilk araştırmalar 1958'de başlamıştır (5). Devedikeni tohumları %1–6 oranında silimarin içermesine karşın günümüzde Amerika ve Avrupa'da yoğunlaştırılmış meryemana dikeni ekstreleri %70–80 oranında silimarin içermektedir. Silimarin, devedikeni bitkisinin tohumlarında bulunan, silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin, taksifolin ve dehidrosilibinin gibi flavonolignanlardan meydana gelmektedir (8). Bitkiden elde edilen silibin ekstraktının karaciğer, akciğer, mide, deri ve ince bağırsak kanserlerinde güçlü bir kanser kemoprotektif ajan olduğu ve antikarsinojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (36).

Lee ve ark., silibinin insan meme karsinoma hücrelerinde MAPK sinyal yolunda AP-1 (metastaz, tümörogenezis, inflamasyon olaylarında genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü) aktivasyonunu bloke ederek MMP-9 (matriks mettalloproteinaz 9-kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonunda önemli rol oynar) ekspresyonunu baskıladığını gözlemlemişlerdir (37). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada silibinin TCC-SUB insan mesane kanseri hücrelerinde CDKI-CDK-cyclin kaskadını modüle ettiğini ve kazpaz 3'ün aktive olması ile kanser hücrelerinde büyüme inhibisyonuna ve apopitotik hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür (23). Yapılan diğer bir çalışmada çeşitli hepatosellüler hücre hatlarında (HepG2, HuH7, PLC/PRF/5, Hep3B hücre hatları) silibinin doza bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği, apopitotoik etkisinin olduğu ve kanser hücrelerinin metastaz

ve invazyonunda önemli rol oynayan MMP 2 ve 9'un ekspresyonunu azatlığı görülmüştür (38).

Çalışmamızda silybum marianum bitkisinden elde edilen silibin ekstraktının iki boyutlu kültür ortamında, hücre çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için hücre kültürü deneylerinde CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücre soyu kullanılmıştır.

İki boyutlu kültürde doz belirleme deneyi sonuçlarımıza göre elde ettiğimiz silibinin 100 µM ID_{50} dozu lamelli ekim yapıldıktan sonra hücrelere uygulanmış, 24, 48 ve 72 saat sürelerle beklendikten sonra DNA sentezi yapan hücreleri işaretlemek amacıyla timidin analoğu olan BRDU ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Buna göre BRDU'yu alarak işaretlenmiş sentez fazındaki hücreler sayılarak yüzdeleri alınmış ve böylece BRDU işaretleme indeksi hesaplanmıştır.

Yapılan değerlendirmeye göre silibin (100 µM/ml) uygulanan gruptaki hücrelerde 24, 48, 72 saat süreler sonunda işaretleme indeksinin kontrol grubu işaretleme indeksine oranla anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca tripan blue ile yapılan canlılık testinde de silibin verilen grupta hücre sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).

Lamelli ekim deneylerinde apopitotik hücreleri belirlemek amacıyla immünohistokimyasal olarak aktif kaspaz-3 tayini yapılmıştır. Sonuçta kaspaz-3 ile boyanan hücre sayısında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu da bize silibinin hücrelerde (CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücre soyunda) apoptozisi tetiklediğini göstermektedir. Konuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda silibinin kolon karsinoma hücre hatları üzerine etkisi ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. Ayrıca kullandığımız yöntemlerle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamız bir ilki oluşturmaktadır.

Sonuç olarak silybum marianum bitkisinden elde edilen silibin ekstraktının CCL-228-SW 480 kolon kanseri hücrelerinde yapılan in vitro deneylerde verdiği sonuçlardan yola çıkarak bu bitkinin hücre populasyonundaki artışı azaltmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Pfister DG, Rubin DM, Elkin EB, Neill US, Duck E, Radzyner M, et al. Risk adjusting survival outcomes in hospitals that treat patients with cancer without information on cancer stage. JAMA oncology. 2015; 1(9): 1303-10.

2. Tomida C, Aibara K, Yamagishi N, Yano C, Nagano H, Abe T, et al. The malignant progression effects of regorafenib in human colon cancer cells. The Journal of Medical Investigation. 2015; 62(3.4): 195-8.

3. ttp://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/ (Erişim tarihi: Aralık 2017)

4. Webb AL, McCullough ML. Dietary lignans: potential role in cancer prevention. Nutrition and cancer. 2005; 51(2): 117-31.

5. Acartürk R, Şifalı Bitkiler, Flora ve Sağlığımız. Ovak Yayınları, No: 1 Karşıyaka, İzmir, 1996.

6. Ding T, Tian S, Zhang Z, et al. Dtermination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. J. Pharmacol. Biomed. Anal 2001; 26: 155-61

7. Kocaman N, Dabak DÖ. Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. Firat Med J 2015; 20(3): 128-132.

8. Sanchez-Sampedro MA, Pelaez R, Corchete P. An Arabinogalactan Protein Isolated from Medium of Cell Suspensions Cultures of Silybum marianum Gaernt. Carbohydrate Polymers, 2008; 71: 634-638.

9. Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum marianum (Carduus marianus). Fitoterapia, 1995; 64: 3–42.

10. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. Clinical Drug Investigation 2002; 22: 51-65.

11. Kren V, Walterova D. Silybin and Silymarin-new effects and applications. Biomed Papers 2005;149: 29-41.

12. Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. Biochem Pharmacol 2004; 67: 175- 81.

13. Nencini C, Giorgi G, Michelli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. Phytomedicine 2007; 14: 129-35

14. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. Comp Biochem Physiol 2003; 136: 205-12.

15. Vinh PQ, Sugie S, Tanaka T, Hara A, Yamada Y, Katayama M, et al. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamineinduced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. Jpn J Cancer Res. 2002; 93: 42–49.

16. Kohno H, Tanaka T, Kawabata K, Hirose Y, Sugie S, Tsuda H, et al. A Naturally Occurring Polyphenolic Antioxidant Flavonoid, Inhibits Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. Int. J. Cancer, 2002; 101: 461–468.

17. Ahmad N, Gali H, Javed S, Agarwal R. Skin cancer chemoprotective effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression, Biochem Biophys Res Commun. 1998; 248: 294–301.

18. Singh RP, Tyangi AK, Zhao J, Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis, Carcinogenesis, 2002; 23: 499–510.

19. Dorai T, Aggarwal B. Role of Chemopreventive Agants in Cancer Therapy. Cancer Lett. 2004; 215: 129–140.

20. Zi X, GrassoAW, Kung H-J, Agarwal R. A flavonoid antioxidant Silibinin inhibits activation of erbB1 signaling, and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1arrest and anti-carcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. Cancer Res. 1998; 58: 1920-9.

21. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anti-carcinogenic effect of a flavonoid antioxidant silymarin in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21concomitant with a decrease in kinase activity of CDKs and associated cyclins. Clin Cancer Res. 1998; 4: 1055-64.

22. Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshm IS, et al.Silibinin up-regulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. Oncogene 2003; 22: 8271-82.

23. Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis inhuman bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. Carcinogenesis 2004; 25: 1711-20.

24. Erarslan E, Yüksel İ, Haznedaroğlu S. Kolorektal Karsinogenez ve Metabolik Sendrom İlişkisi. Cumhuriyet Med J. 2012; 34: 380-5.

25. Erarslan E, Yüksel İ. Obezite ve Gastrointestinal Kanser İlişkisi. Yeni Tıp Dergisi. 2011; 28(4): 203-6.

26. Bernacchia R, Preti R, Vinci G. Chemical Composition and Health Benefits of Flaxseed. Austin J Nutri Food Sci. 2014; 2(8): 1045.

27. Borlu M. Lavaş Ekmeğine Farklı Seviyelerde Keten (linum usitatissimum) Tohumu Unu Katkılanmasının Hamur ve Ekmek Özellikleri Üzerine Etkisi, Omega 3, Omega 6 Yağ Asitleri ve Lignan Açısından Değişimin Belirlenmesi, (Yüksek Lisans tezi), Pamukkale Üniversitesi: 2009.

28. Hausott B, Greger H, Marian B. Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. Journal of cancer research and clinical oncology. 2003;129(10):569-76.

29. Sezgin C. Kanserde Bitkilerle Tedavide Örnek Uygulamalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu. Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği s:73, 5-6 Haziran 2010.

30. Fuentealba C, Figuerola F, Estévez AM, Bastías JM, Muñoz O. Bioaccessibility of lignans from flaxseed (linum usitatissimum) determined by singlebatch in vitro simulation of the digestive process. Journal of the science of food and agriculture. 2014; 94(9): 1729-38.

31. During A, Debouche C, Raas T, Larondelle Y. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells. The Journal of Nutrition. 2012; 142(10): 1798-805.

32. Bernacchia R, Preti R, Vinci G. Chemical composition and health benefits of flaxseed. Austin J Nutri Food Sci. 2014; 2(8): 1045.

33. Danbara N, Yurı T, Tsujıta-Kyutoku M, Tsukamoto R, Uehara N, Tsubura A. Enterolactone induces apoptosis and inhibits growth of Colo 201 human colon cancer cells both in vitro and in vivo. Anticancer research. 2005; May-Jun;25(3B):2269-76.

34. Nesbitt PD. Mammalian lignan production from flaxseed, studies in vitro and in humans. Graduate Department of Nutritional Sciences University of Toronto, Master of Science, 1997.

35. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçimişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevleri, 1999; 142-44.

36. ZhaoJ, Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implations in cancer chemoprevention. Carcinogenesis; 1999; 20 (11): 2101-2108.

37. Syng-Ook L, Yun-Jeong J, Hyo Gwon I, Cheorl-Ho K, Young-Chae C, In-Seon L. Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007; 354: 165–171

38. John J L, Wei C, Ke-Qin H. 'Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines' World Journal of Gastroenterology, 2007; 13(40): 5299-5305.