www.biodicon.com Biological Diversity and Conservation

ISSN 1308-8084 Online; ISSN 1308-5301 Print 12/1 (2019) 27-38

Research article/Araştırma makalesi
DOI: 10.5505/biodicon.2019.57441

Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with *Pistacia eurycarpa* Extracts on human colorectal cancer cells

Mehmet Kadir ERDOĞAN [*1], Can Ali AĞCA [2], Hakan AŞKIN [3]
Orcid : 0000000215795737; 0000000202443767; 000000033248759X

[1] Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Bingol University, 12000, Bingol, Turkey
[2] Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Bingol University, 12000, Bingol, Turkey
[3] Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Sciences, Ataturk University, 25000, Erzurum, Turkey

Abstract

Colorectal adenocarcinoma is a common type of cancer that affects the colon and rectum. It usually develops by spreading polyps in the colon. In cases of colorectal cancer, 5-Fluorouracil (5-FU) constitutes the basic step of clinical treatment. However, the fact that 5-FU has serious side effects necessitates the development of new therapies based on 5-FU. *Pistacia eurycarpa* is a plant with different medical effects. In this study, the antiproliferative and apoptotic effects of *P.eurycarpa* extracts alone or combined with 5-FU on HT-29 human colorectal cancer cells were investigated. Cell viability was determined by MTT analysis. Isobologram analysis was performed to determine the synergism between plant extracts and 5-FU. CDDE method was used to determine apoptosis. VEGF was quantitatively measured by human VEGF Elisa method. Moreover, when cells were treated with extracts and combinations at determined IC_{50} values for 24 hours, changes in expression levels of some apoptotic and anti-apoptotic genes and proteins (p53, Bax, Bcl-2, p38 MAPK, mTOR, PTEN and Akt) were evaluated by real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot analysis. In combined treatment at IC_{50} doses of *P. eurycarpa* hexane, chloroform and methanol extracts with 5-FU, cell viability was determined as 23.5%, 21.2% and 11.9%, respectively ($p < 0.0001$). Compared to the control, *P. eurycarpa* hexane, chloroform and methanol extracts in combination with 5-FU, increased the apoptosis 8.6, 9.2 and 11.8 fold and reduced the amount of VEGF to 76.2, 75.1 and 64.7 pg/ml, respectively. Changes in expression levels of apoptotic and anti-apoptotic genes and proteins were found to be statistically significant in almost all therapies. All these results had showed that, the *P.eurycarpa* extracts and combination of these extracts with 5-FU dramatically reduced the viability of colorectal cancer cells and directed the cells to apoptosis.

Key words: *Pistacia eurycarpa*, cancer, 5-Fluorouracil, apoptosis, p53

---------- * ----------

İnsan kolorektal kanser hücrelerinde *Pistacia eurycarpa* ekstraktlarıyla kombine 5-florourasilin artırılmış antiproliferatif ve apoptotik etkileri

Özet

Kolorektal adenokarsinoma, kolon ve rektumu etkileyen yaygın bir kanser türüdür. Genellikle kolonda oluşan poliplerin yayılması ile gelişir. Kolorektal kanser vakalarında, 5-Florourasil (5-FU) klinik tedavinin temel basamağını oluşturur. Ancak 5-FU'nun ciddi yan etkilere sahip olması, 5-FU temelli yeni tedavilerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. *Pistacia eurycarpa* farklı tıbbi etkilere sahip bir bitkidir. Burada sunulan çalışmada, *P.eurycarpa* ekstraktlarının tek ve 5-FU ile kombine olarak uygulandığında, HT-29 insan kolorektal kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri incelendi. Hücre canlılığı MTT analizi ile belirlendi. Bitki ekstraktları ile 5-FU arasındaki sinerjizmi belirlemek için izobologram analizi yapıldı. Apoptozun belirlenmesinde CDDE yöntemi kullanıldı. İnsan VEGF Elisa yöntemi ile VEGF miktarı kantitatif olarak ölçüldü. Ayrıca, hücreler 24 saat boyunca, belirlenen IC_{50}

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904262160015-2316; Fax: +904262150877; E-mail: mkerdogan@bingol.edu.tr
© 2008 All rights reserved / Tüm hakları saklıdır BioDiCon. 802-0119
Bu makaleye lütfen şu şekilde atıf yapnız: Erdoğan et al., Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with *Pistacia eurycarpa* Extracts on human colorectal cancer cells, Biological Diversity and Conservation, 12(1), 27-38.
http://dx.doi.org/10.5505/biodicon.2019.57441

değerlerinde ekstraktlar ve kombinasyonlar ile tedavi edildiğinde, bazı apoptotik ve anti-apoptotik gen ve proteinlerin (p53, Bax, Bcl-2, p38 MAPK, mTOR, PTEN ve Akt) ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve western blot analizleri ile değerlendirildi. *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile 5-FU'nun IC_{50} dozlarının kombine tedavisinde hücre canlılıkları sırasıyla % 23.5, % 21.2 ve % 11.9 olarak belirlendi ($p<0.0001$). *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri, 5-FU ile kombinasyon halinde apoptozu 8.6, 9.2 ve 11.8 kat arttırdı ve kontrol grubuna kıyasla VEGF miktarını 76.2, 75.1 ve 64.7 pg/ml'ye düşürdü. Apoptotik ve anti-apoptotik genlerdeki ve proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler hemen hemen tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tüm bu sonuçlar, *P. eurycarpa* ekstraktlarınının ve bu ekstraktların 5-FU ile kombinasyonunun, kolorektal kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve hücreleri apoptoza yönlendirdiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Pistacia eurycarpa*, kanser, 5-Florourasil, apoptoz, p53

1. Giriş

Kolorektal kanser, dünya çapında en sık görülen ve insidansı her geçen yıl artan kanser türlerinden birisidir [1]. Hastalığın tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Ancak, özellikle gelişmekte olan ülkelerde hem bu tedavilerin sınırlı olması hem de kanser ilaçlarının kolay temin edilememesi ve ciddi yan etkilere sahip olması, dünya nüfusunun büyük bir kısmını tamamlayıcı ve alternatif tıbba yöneltmektedir [2]. 5-Florourasil (5-FU), hücre döngüsünün S fazını inhibe ederek DNA sentezi engelleyen ve hücre ölümünü tetikleyen, fluoropirimidin formda bir antimetabolit kemoterapi ilacıdır. 5-FU tek başına veya kemoterapötik ajanlarla kombine olarak kolon, karaciğer, pankreas, yumurtalık, meme ve beyin gibi pek çok kanser türüne karşı yaygın olarak kullanılmaktadır [3]. 5-FU, kolorektal kanser tedavisinin temel kemoterapötik ajanıdır, ancak toplam sağkalım oranı kemoterapi alanlarda yaklaşık % 20 civarındadır. Bununla birlikte, 5-FU'nun tümöre karşı seçiciliği zayıftır ve terapötik dozda kullanıldığında özellikle kemik iliği, gastrointestinal sistem ve deri için oldukça toksiktir [4]. Kanserin tüm evrelerinde tedaviye destek olmaları, çok hedefli olmaları, toksik olmamaları, kolay kullanılabilir ve ulaşılabilir olmaları ve genellikle ilaçlarla sinerjik etki göstermeleri, doğal terapötikleri çok önemli kılmaktadır [5]. Bu yüzden, 5-FU ile birlikte bitkisel kaynaklı bileşenlerin kombinasyonu, toksisite ve yan etkilerin azaltılmasına ve sağkalımı arttırmaya katkıda bulunabilir [6, 7].

Apoptozis, homeostatik olarak hücrelerde meydana gelen programlı bir ölümdür. Anti-kanser ilaçlar, farklı sinyal yolaklarına etki ederek kanserli hücreleri apoptozis ile ölüme yönlendirirler. Apoptozisten kaçınma, kanser hücreleri için karakteristik bir özelliktir ve bu da yeni anti-kanser teröpatiklerinin merkezinde apoptozisin olmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır [8]. Çoğu kanser türünde programlı hücre ölümünden kaçınmak için farklı yolaklar işlevseldir. Bu yüzden birkaç sinyal iletim yolağının birlikte hedeflenmesi yeni anti-kanser teröpatiklerinin geliştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Pistacia cinsi, Anacardiaceae familyasının küçük ağaç ve çalılardan oluşan bir üyesidir. Pistacia türleri Akdeniz ve Kuzey Afrika ülkeleri için çok değerli ve kuraklığa dayanıklı bitkilerdir. Türkiye, yaklaşık 66 milyon yabani fıstık ağacını da içeren çok büyük bir Pistacia L. germplasm kaynağına sahiptir [9]. Pistacia türlerinin menengiç meyvelerinden elde edilen uçucu yağların antiproliferatif, antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir. Bazı Pistacia türleri antienflamatuvar, antimutajenik, hipoglisemik ve antikanser aktivitelere sahiptir [10, 11, 12]. *Pistacia eurycarpa* (Şekil 1), ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleri civarlarında yetişmektedir. *P. eurycarpa*'nın yağ asitleri bakımından zengin içeriğe sahip olduğu ve ekstraktlarının antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir [13, 14].



Şekil 1. *Pistacia eurycarpa* Yalt

Bu çalışmada, polaritesi farklı çözücüler olan hekzan, kloroform ve metanol ile hazırlanmış *Pistacia eurycarpa* ekstraktlarının tek başına ve 5-Florourasil ile kombine tedavilerinin HT-29 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Kimyasal ve reaktifler

Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri (DMEM), penisilin/streptomisin, fetal sığır serumu (FBS) ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) Lonza firmasından; tripan mavisi, tris HCI, tripsin-EDTA, dimetil sülfoksit (DMSO), tetrametilendiamin (TEMED), kommasi mavi boyası (G250), sodyum azit (NaN_3), luminol, yağsız süt tozu, ponceau S, fosforik asit (H_3PO_4), p-kumarik asit, fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 5-FU (5-florourasil), benzamidin, hekzan, kloroform, metanol, etanol, gliserin, gliserol, sodyum dodesil sülfat, bovin serum albümin (BSA) Sigma Aldrich firmasından; hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hidroksit (NaOH), glisin, Tween-20, bromfenol mavisi, β-merkaptoetanol, NP-40, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), egtazik asit (EGTA), β-gliserofosfat Merck firmasından temin edildi. Forward ve reverse primerler Invitrogen firmasından; primer ve sekonder antikorlar Cell Signaling Technology firmasından satın alındı. Hücre proliferasyon kiti I (MTT) ve cell death detection Elisa (CDDE) kiti Roche firmasından, Hu-VEGF Elisa kiti Invitrogen firmasından, pure link RNA mini kiti Life Technologies firmasından, 2xqPCRBIO SyGreen mix Lo-ROX kiti PCR Biosystems firmasından, yüksek kapasiteli cDNA ters transkriptaz kiti ise Thermo Fisher firmasından temin edildi ve kitlerle yapılan analizler, üreticilerin protokollerine göre gerçekleştirildi.

2.2. Bitki ekstrasksiyonu

Pistacia eurycarpa, 2014 yılının Temmuz ayında, Bingöl ili Ilıcalar ilçesinin güneybatısında, 1300 metre yükseklikten toplandı. Bitki numuneleri, nemsiz ve güneşe maruz olmayan bir ortamda kurutuldu. Ekstraksiyon için bitkinin meyveleri kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri ardışık fraksiyonasyon yöntemi ile farklı polariteye sahip çözücüler olan olan hekzan, kloroform ve metanol kullanılarak gerçekleştirildi [15]. Kısaca, 20 gram kuru bitki numunesi filtre kağıdıyla iyice sarıldı. Daha sonra bu filtre kağıdı Sohlet cihazının aparatına yerleştirildi. Çözeltinin 400 ml'si (sırasıyla hekzan, kloroform ve metanol) 1000 ml'lik bir şişeye konuldu. Sıcaklık ile buharlaşan çözücü, cihazın soğutma kısmı tarafından yoğunlaştırılır ve tekrar şişeye dökülür. Daha sonra, şişede toplanan karışımdaki çözücüler vakumlu buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Elde edilen toz halindeki ekstraktlar çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışmalarda kullanılmak üzere toz ekstraktlar DMSO ile çözülerek konsantrasyonları ayarlandı.

2.3. Hücre kültürü

HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM besiyeri kullanılarak 37 °C,% 95 nem ve % 5-6 CO_2'de kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler günlük olarak kontrol edildi ve besiyerleri yenilendi. Hücreler, %80'lik yoğunluğa eriştiğinde tripsin ile kaldırıldı. Hücre kültürü çalışmalarında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri artan konsantrasyonlarda *P. eurycarpa* ekstraktları, 5-FU ve bitki ekstraktlarının 5-FU ile kombinasyonları ile 24 saat süreyle tedavi edildi. Kontrol gruplarına sadece besiyeri ve DMSO karışımı uygulandı.

2.4. Hücre canlılığı

HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlendi [16]. Özetle, her bir kuyucukta $1x10^4$ hücre içeren 96 kuyucuklu mikroplaka, artan konsantrasyonlarda (50-1000 µg/ml) 5-FU ve bitki ekstraktları ile 37 °C, % 95 nem ve %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, her kuyucuğa 10 µl MTT reaktifi eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Ardından 100 µl solubilizasyon çözeltisi kuyucuklara eklendi ve gece boyunca inkübe edildi. Formazan ürünü ile ilişkili renk değişimleri, Elisa mikroplaka okuyucusu (SpectraMax 384 Plus) kullanılarak 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Konsantrasyona bağlı hücre canlılığı absorbans değerlerine göre hesaplandı. Her bir numunenin IC_{50} değeri hesaplandı ve bu değerler çalışmanın sonraki basamaklarında etken dozlar olarak kullanıldı.

2.5. İzobologram analizi ile sinerjizmin belirlenmesi

İzobologram analizi, herhangi bir ilaç, bileşik veya ekstraktın etken dozlarının kantitatif olarak belirlenmesini ve birlikte tedavi edildiklerinde bunların arasındaki sinerjizmin ortaya konmasını sağlar. Ekstraktlar ve 5-FU arasındaki sinerji, bir kombinasyon indeksi (Kİ) ile değerlendirildi. Kİ<1, =1 ve >1, sırasıyla sinerjizmi, additif etkiyi ve antagonizmi göstermektedir [17]. *P. eurycarpa* ekstraktları ve 5-FU arasındaki etkileşim, izobologram ve medyan etki eşitliği yöntemiyle değerlendirildi [18].

2.6. Apoptotik hücre ölümünün değerlendirilmesi

Cell death detection Elisa (CDDE) metodu, hücre ölümüne bağlı DNA fragmantasyonunun bir sonucu olarak açığa çıkan sitoplazmik histonun *in vitro* kalitatif ve kantitatif analizini sağlar. 96 kuyucuklu plakalara $1x10^5$ hücre/ kuyucuk ekildi ve bir gece inkübasyonun ardından, 24 saat boyunca uygun tedavi uygulandı. İşlemden sonra, hücrelerin tripsinizasyonu sağlandı, üreticinin protokolüne göre lizis işlemi gerçekleştirildi ve bir anti-histon antikoru ile anti-DNA peroksidaz (POD) antikoru kullanılarak süpernatantlar muamele edildi [19]. Kuyucukların absorbansı 405 nm dalga boyunda, referans dalga boyu 490 nm olacak şekilde, mikroplaka okuyucuda ölçüldü. Tedavi uygulanan gruplarda, kontrol hücrelerine kıyasla yoğun bir renk oluşumu, apoptozisin DNA fragmantasyon karakteristiğini gösterir. Bu grupların absorbansları, kontrolün absorbansına bölündü ve apoptozun kolorometrik bir göstergesi olan zenginleştirme faktörleri hesaplandı.

2.7. İnsan VEGF Elisa yöntemi

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kanser oluşumunda anjiyogenezin önemli bir düzenleyicisidir. İnsan VEGF (Hu VEGF) Elisa yöntemi, VEGF miktarını kantitatif olarak belirlemek için kullanıldı. 96 kuyucuklu mikroplakanın herbir kuyucuğuna $5x10^4$ hücre ekildi ve standart koşullar altında bir gece inkübe edildi. Daha sonra hücreler, bitki ekstraktları, 5-FU ve kombinasyonların IC_{50} dozları ile 24 saat tedavi edildi. Besiyerleri uzaklaştırıldı, hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve bir kazıyıcı yardımıyla toplanarak 50 µl taze besiyeri içeren tüplere aktarıldı. 50 ul inkübasyon tamponu, 5x104 ile işleme tabi tutulmuş hücreleri içeren 50 ul ortam ve 50 ul standart seyreltici tamponu, 8 kuyucuklu şeritlerin oyuklarına eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklar 4 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Kuyucuklara 100 µl Hu-VEGF biyotin konjugat çözeltisi ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra çözeltiler uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 4 kez daha yıkama tamponuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µl streptavidin-HRP eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Çözeltiler kuyucuklardan aspire edildi ve kuyucuklar 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra kuyucuklara 100 µl stabilize kromojen eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Çözeltiler uzaklaştırıldı kuyucuklara 100 µl durdurma çözeltisi eklendi. Homojenizasyon sağlandıktan sonra, kuyucuklardaki çözeltinin rengi maviden sarıya dönüştü. 2 saat sonra absorbanslar 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu ile ölçüldü. Her çalışma için standart eğri grafiği çizildi, sonuçlar standart eğri ile karşılaştırıldı ve her örnek için VEGF miktarı pg/ml olarak hesaplandı.

2.8. Kantitatif gerçek zamanlı PCR

Ekstraktlar, 5-FU ve kombinasyonlar ile tedavi edilmiş $1x10^6$ hücre içeren 6 kuyucuklu mikroplakaların kuyucuklarına 1'er ml soğuk PBS ilave edildi ve daha sonra hücreler bir kazıyıcı yardımıyla toplandı. Bu hücrelerin total RNA izolasyonu, Pure Link RNA Mini kiti (İnvitrogen-Life Technologies) kullanılarak yapıldı. Total RNA'dan komplamenter DNA (cDNA) sentezi, üreticilerin protokollerine göre random primerler ve Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkriptaz Kiti (Thermo Fisher) kullanılarak gerçekleştirildi. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), bir PCR cihazı (Rotor-Gene Q, Qiagen) ve SYBR Green içeren bir master mix (2xqPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX Kiti, PCR Biosystems) kullanılarak başlatıldı. QRT-PCR reaksiyon koşulları, 95 °C'de 2 dakika boyunca inkübasyon, ardından 40'ar döngü 95 °C'de 5 sn, 64 °C'de 20 sn, 72 °C 2 dakika ve en son 72 °C'de 5 dakika 1 döngü olacak şekilde ayarlandı. Forward ve reverse primerler NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, ABD) veritabanı kullanılarak manuel olarak tasarlandı ve üreticiden satın alındı. Forward ve reverse primer dizileri şu şekildedir: *β*-aktin, forward 5 'ctcttccagccttccttcct 3', reverse 5 'agcactgtgttggcgtacag 3'; p53, forward 5 'gtccaacaacaccagctcct 3', reverse 5 'cctcattcagctctcggaac 3'; Akt, 5 forward 'cacaccacctgaccaagatg 3', reverse 5 'ctggccgagtaggagaactg 3'; mTOR, forward 5 'tgtcctgctggtctgaactg 3', reverse 5 'ttcagcgatgtcttgtgagg 3'; PTEN, forward 5 'ggtgatgtggcaggactctt-3', reverse 5 'cagcttccgagaggagagaa-3'; p38-MAPK, forward 5 'tggatgcattacaaccagaca-3', reverse 5 'gtcaacagctcggccattat-3'; Bcl-2, forward 5 'gtgaactgggggaggattgt-3', reverse 5 'ggagaaatcaaacagaggcc-3'; Bax, forward 5 'cccgagaggtctttttccgag-3', reverse 5 'ccagcccatgatggttctgat-3'. mRNA ekspresyon oranları, karşılaştırmalı eşik döngüsü (Ct) metodu ile belirlendi [20]. Ct değerleri, *β*-aktin mRNA ekspresyon oranları ile normalize edildi.

2.9. Western blot analizi

Hücrelerdeki p53, Bax, Bcl-2, p38 MAPK, mTOR, PTEN ve Akt proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin gösterilebilmesi için total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri western blot ile belirlenmiştir. Kazıyıcı yardımı ile toplanan hücreler, parçalama tamponu ile steril enjektör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından hücreler buz üzerinde 60dk süre ile inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 14000 rpm'de 4°C'de 10dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Total protein içerikleri Bradford metodu [21] ile belirlenen örnekler Laemmli Sample Buffer ile karıştırıldıktan sonra 5 dk süre ile 96°C'de kaynatılmıştır. Örnekler, denatüre şartlar altında SDS-PAGE (%8-12) (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi) jeli kullanılarak ayrılmıştır. Ardından, Jelde ayrılan proteinlerin PVDF (Polivinilidin

diflorid) membrana taransferi sağlanmıştır. Transfer sonrasında 1X TBS-T solüsyonunda çözünmüş % 5'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile 60dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membran ilgili primer antikor ile gece boyunca +4°C'de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır (p53, Bcl-2 ve anti-mouse antikorları Santa Cruz firmasından, Bax ve Anti-rabbit antikorları Abcam firmasından, ve p38 MAPK, mTOR, PTEN ve Akt antikorları Cell Signaling firmasından temin edilmiştir). Ertesi gün, membran 1X TBS-T ile 5dk/5 kez yıkandıktan sonra sekonder antikor ile 60 dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membran 1X TBS-T ile 5dk/5 kez yıkandıktan sonra kemiluminesans yöntemi ile görüntüler elde edilmiştir. Bant yoğunlukları Image-j programı kullanılarak dansitometrik olarak değerlendirilmiştir (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD).

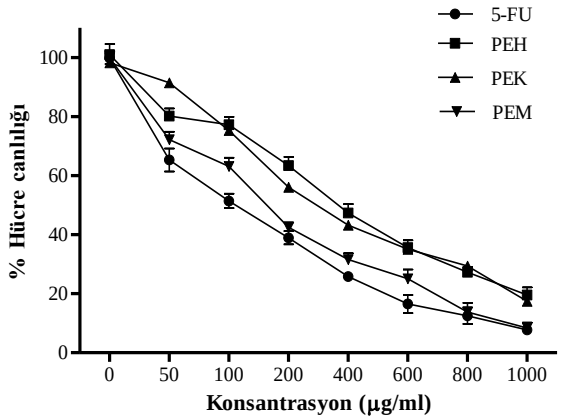
2.10. İstatistiksel analiz

Tüm deneyler birbirinden bağımsız üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Bulguların istatistiksel analizi, GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak t-testi ve One Way Anova testi ile değerlendirildi. CompuSyn 1.0 programı [18], 5-FU ve bitki ekstrelerinin kombine dozlarının izobologram analizi için kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

3.1. Hücre canlılığı bulguları

Çalışma kapsamında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücreleri, farklı polariteli çözücülerle (hekzan, kloroform ve metanol) hazırlanan *Pistacia eurycarpa* ekstraktları ve DMSO ile hazırlanan 5-Florourasil ile artan konsantrasyonlarda (50-1000 µg/ml) 24 saat tedavi edildi. 24 saatlik tedaviden sonra, hücrelerin canlılığı MTT testi ile belirlendi. Tüm tedavi gruplarında hücre canlılığının artan konsantrasyon ile azaldığı gözlendi. 100 ve 1000 µg/ml 5-FU ile tedavi edilen hücrelerin canlılıkları sırasıyla % 51.4 ve % 7.7 olarak saptandı (Şekil 2). *P. eurycarpa* bitkisine ait farklı polariteli çözücülerle hazırlanmış olan ekstrelerin özellikle yüksek dozlarda, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu görüldü. 200 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı oranı *P. eurycarpa* hekzan ekstresi için % 63.4, kloroform ekstresi için %56 ve metanol ekstresi için %42.5 olarak bulundu. 1000 µg/ml konsantrasyonda ise hücre canlılığını, hekzan ekstresi %19.6'ya, kloroform ekstresi %17.5'e ve metanol ekstresi %8.4'e düşürdü (Şekil 2).



Şekil 2. *P. eurycarpa* bitkisine ait hekzan, kloroform ve metanol ekstraktları ile 5-FU'nun HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin canlılığı üzerine doz bağımlı etkileri (5-FU; 5-Florourasil, PEH; *P. eurycarpa* hekzan ekstraktı, PEK; *P. eurycarpa* kloroform ekstraktı, PEM; *P. eurycarpa* metanol ekstraktı)

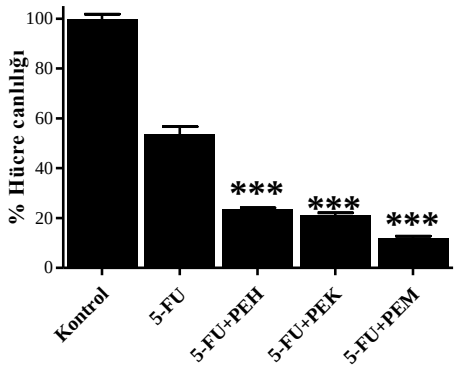
3.2. IC_{50} değerleri

IC_{50} değeri, hücrelerin yarısının çoğalmasını inhibe eden dozun sayısal değeridir. MTT canlılık testi sonucunda elde edilen konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri kullanılarak uygulanan maddelerin her birine ait IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu değer 5-FU için 107.4 µg/ml, *P. eurycarpa* metanol ekstraktı için ise 158.7 µg/ml olarak belirlendi. Yine *P. eurycarpa* kloroform ve hekzan ekstraktları için IC_{50} değerleri sırasıyla 314.9 ve 362.5 µg/ml olarak bulundu.

P. eurycarpa ekstraktlarının ve 5-FU'nun IC_{50} değerlerine karşılık gelen dozlar kullanılarak çalışmanın bundan sonraki basamakları gerçekleştirildi.

HT-29 kolorektal kanser hücreleri, bitki ekstraktlarının ve 5-FU'nun IC_{50} dozları ile kombine olarak 24 saat tedavi edildi. Bu kombine gruplar için tekrar MTT testi uygulandı ve bu gruplara ait % canlılık oranları belirlendi (Şekil 3).

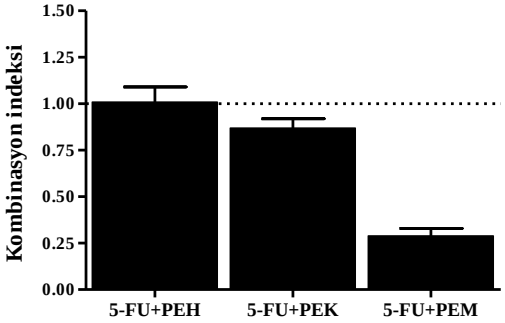
5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresi kombinasyonu hücre canlılığını %11.97'ye düşürdüğütespit edildi. Bu kombinasyon ile tedavi edilen hücrelerin canlılığının, sadece 5-FU'nun yüksek dozu ile (800 µg/ml) tedavi edilen gruba göre daha düşük seviyede olduğu belirlendi. 5-FU ile *P.eurycarpa* hekzan ve kloroform ekstrelerinin hücrelere birlikte uygulanması ile 24 saat süre sonunda hücre canlılıkları sırasıyla %23.5 ve %21.2 olarak belirlendi. Tek başına 5-FU (400 µg/ml) uygulanan hücrelere göre,ekstreler ile kombine,edilen gruplarda, hücre canlılığı üzerinde daha etkili sonuçlar elde edildiği gözlendi.. Her üç sonuç, yalnız 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$) (Şekil 3).



Şekil 3. *P.eurycarpa* ekstraktlarının ve 5-FU'nun IC_{50} dozlarının kombinasyonlarıyla tedavi edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği (5-FU; 5-Florourasil, PEH; *P. eurycarpa* hekzan ekstraktı, PEK; *P. eurycarpa* kloroform ekstraktı, PEM; *P. eurycarpa* metanol ekstraktı) (***5-FU'ya göre $p<0.0001$)

3.3. Kombinasyon indeksleri

HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan maddelere ait konsantrasyon-% canlılık değerleri kullanılarak CompuSyn (version 1.0) programı ile doz-etki ve medyan-etki değerleri hesaplandı. Daha sonra kombine tedavilere ait % canlılık değerleri programa eklendi. Kombine tedaviler ile maddelerin tek uygulanmaları sonucu elde edilen bulgular kıyaslanıp kombinasyon gruplarına ait kombinasyon indeksi (Kİ) değerleri elde edildi (Şekil 4). Sonuçlar medyan-etki yöntemi ile analiz edildi (Chou, 2011).



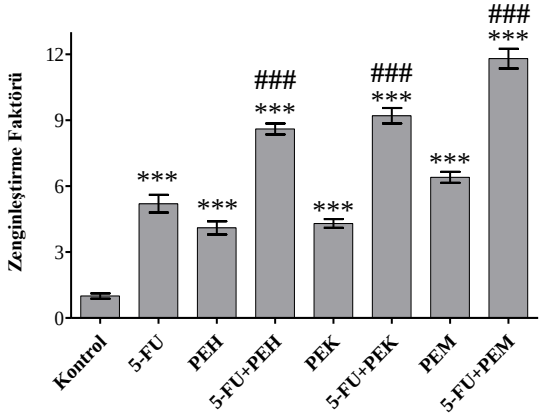
Şekil 4. *P. eurycarpa* ekstraktları ve 5-FU'nun IC_{50} dozlarıyla kombine olarak tedavi edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde hesaplanan kombinasyon indeksleri (Kİ).

5-FU+*P. eurycarpa* metanol ekstresi ile tedavi edilen hücrelerde kombinasyon indeksi değeri 0.29 olarak bulundu. Bu değere dayanarak bu kombinasyonun güçlü sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlendi. Yine 5-FU+*P. eurycarpa* kloroform ekstraktı ve 5-FU+*P. eurycarpa* hekzan ekstraktı tedavilerinde kombinasyon indeksleri sırasıyla 0.87 (hafif sinerjizm) ve 1.01 (aditif etki) olarak bulundu (Şekil 4).

3.4. Apoptoza ait bulgular

Hücrede meydana gelen apoptoz sonucunda DNA'da internükleozomal kırılmalar meydana gelir. CDDE yönteminde DNA'daki bu kırılmalar sonucunda oluşan mono- ve oligo-nükleozomların oranındaki artış zenginleştirme faktörü olarak ifade edilir. Kontrol grubu için bu değer 1.0 olarak kabul edildi ve uygulanan tedaviler sonucunda hücrelerdeki apoptoz artışı kolorimetrik olarak belirlendi. 5-FU uygulanan grupta kontrole göre apoptozda 5.2 kat yükseliş gösterdiği belirlendi ($p<0.0001$). *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri ile tedavi edilen hücrelerde apoptoz kontrole göre sırasıyla 4.1, 4.3 ve 6.4 kat artış göstermiştir ($p<0.0001$). Apoptozun 5-FU+PEH, 5-FU+PEK ve

5-FU+PEM uygulanan gruplarda ise kontrole göre 8.6, 9.2 ve 11.8 kat yükseldiği belirlendi ($p<0.0001$). Kombine tedaviler uygulanan her üç grup ile sadece 5-FU ile muamele edilen hücreler kıyaslandığında aradaki değişim istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p<0.0001$). Tüm tedavi grupları içerisinde apoptozdaki en büyük artış 5-FU+PEM uygulanan hücrelerde görüldü (Şekil 5).

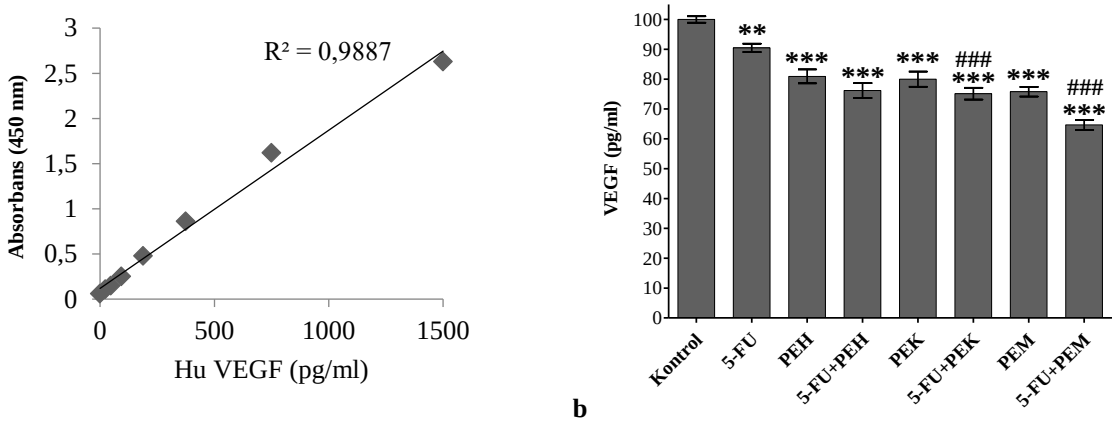


Şekil 5. *P.eurycarpa* ekstraktlarının ve kombinasyonların HT-29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (5-FU; 5-Florourasil, PEH; *P. eurycarpa* hekzan ekstraktı, PEK; *P. eurycarpa* kloroform ekstraktı, PEM; *P. eurycarpa* metanol ekstraktı) (***Kontrole göre $p<0.0001$; ### 5-FU'ya göre $p<0.0001$)

P.eurycarpa hekzan, kloroform ve metanol ekstrelerinin hücrelerde apoptozu kontrol grubuna göre önemli oranda arttırdıkları görüldü. 5-FU+PEH ve 5-FU+PEK kombinasyonları ise hücrelerin apoptoza yönelme oranlarını önemli miktarda yükselttiler. Tüm tedavi grupları içerisinde kontrol grubuna göre apoptozdaki en büyük artış 5-FU+*P.eurycarpa* metanol ekstresi uygulanan hücrelerde görüldü.

3.5. İnsan VEGF Elisa bulguları

İnsan VEGF Elisa kitinde bulunan VEGF standartı çeşitli oranlarda seyreltildi ve 450 nm dalga boyunda absorbanslar okutularak standart grafik çizildi (Şekil 6a). Bu grafiğe göre pg/ml cinsinden VEGF miktarları belirlendi.



a **b**

Şekil 6. a. VEGF standart grafiği. **b.** *P. eurycarpa* ekstraktları, 5-FU ve kombinasyonlarla tedavi edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerindeki VEGF miktarları (5-FU; 5-Florourasil, PEH; *P. eurycarpa* hekzan ekstraktı, PEK; *P. eurycarpa* kloroform ekstraktı, PEM; *P. eurycarpa* metanol ekstraktı) (**Kontrole göre $p<0.01$; ***Kontrole göre $p<0.0001$; ###5-FU'ya göre $p<0.0001$).

Standart grafik kullanılarak Hu VEGF miktarı kontrol için 100±1.1 pg/ml olarak normalize edildi. *P. eurycarpa* hekzan, kloroform ve metanol ekstreleri uygulanan hücrelerde VEGF miktarı sırasıyla 80.9±2.3 pg/ml, 80±0.25 pg/ml ve 75.8±1.6 pg/ml olarak bulundu. Bu sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki farklar istatistiki olarak anlamlı görüldü ($p<0.0001$). VEGF miktarı, 5-FU+PEH kombinasyonu uygulanan hücrelerde 76.2±2.5 pg/ml, 5-FU+PEK kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerde 75.1±2.0 pg/ml ve 5-FU+PEM kombinasyonu uygulanan grupta ise 64.7±1.7 pg/ml olarak belirlendi. *P. eurycarpa* kombinasyonları ile tedavi edilen gruplar, sadece 5-FU uygulanan hücrelerle kıyaslandığında aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 6b).

3.6. mRNAekspresyon düzeyleri

P. eurycarpa ekstraktları, 5-FU ve kombinasyonlar ile tedavi edilen HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerindeki p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon seviyelerini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanıldı [20]. Sonuçlar *β*-aktin mRNA ekspresyon düzeyi kullanılarak normalize edildi.

Kontrol grubuna göre, tüm tedavi gruplarındaki p53 mRNA seviyesi artışı anlamlı bulundu ($p<0.0001$). *P. eurycarpa* metanol ekstraktı uygulanan gruptaki p53 mRNA seviyesindeki artış, 5-FU tedavisi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ($p<0.0001$). p53 mRNA seviyesindeki en fazla artış, 5-FU ile *P. eurycarpa* metanol ekstraktının kombine olarak uygulandığı grupta görüldü. 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında, 5-FU+*P.eurycarpa* kloroform ekstraktı kombinasyonu ile tedavi edilen hücrelerin p53 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0.01$) (Tablo 1).

Bcl-2 mRNA ekspresyon oranları tüm tedavi gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0.0001$). Kombinasyonların uygulandığı gruplar 5-FU ile karşılaştırıldığında, 5-FU+PEK ($p<0.0001$) uygulanan gruplarda Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyon düzeylerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, diğer kombinasyon gruplarındaki değişim anlamlı bulunmadı (Tablo 1).

Tablo 1. *P. eurycarpa* ekstraktları, 5-FU ve kombinasyonlar ile tedavi edilen HT-29 hücrelerindeki p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerinin mRNA ifade oranları (Ortalama değerler ± standart sapma).

	p53	Bcl-2	Bax	mTOR	Akt	PTEN	p38 MAPK
Kontrol	1,00±0,02	1,00±0,02	1,00±0,03	1,00±0,03	1,00±0,01	1,00±0,02	1,00±0,03
5-FU	5,68±0,19[a]	0,41±0,03[a]	1,35±0,03[a]	0,24±0,03[a]	0,76±0,02[a]	1,01±0,03	1,69±0,04[a]
PEH	4,49±0,37 [a]	0,41±0,02[a]	2,78±0,09[a]	0,71±0,03[a]	0,34±0,04[a]	2,90±0,09[a]	2,71±0,10[a]
5-FU+PEH	5,45±0,33 [a]	0,47±0,04[a]	2,39±0,07[a,b]	0,62±0,04[a]	0,47±0,03[a,b]	3,53±0,13[a,b]	3,56±0,09[a,b]
PEK	5,92±0,25 [a]	0,43±0,02[a]	1,71±0,08[a]	0,37±0,03[a]	0,33±0,04[a]	2,79±0,08[a]	0,95±0,06
5-FU+PEK	7,20±0,20 [a,c]	0,26±0,04[a,b]	1,09±0,05	0,45±0,04[a]	0,48±0,05[a,b]	5,03±0,10[a,b]	1,62±0,06[a]
PEM	5,24±0,33 [a]	0,45±0,03[a]	1,19±0,04	0,55±0,03[a]	0,30±0,03[a]	1,40±0,06[a]	0,79±0,08
5-FU+PEM	20,05±1,15 [a,b]	0,47±0,03[a]	1,79±0,12 [a,b]	0,55±0,04[a]	0,70±0,03[a]	4,83±0,12[a,b]	5,34±0,13[a,b]

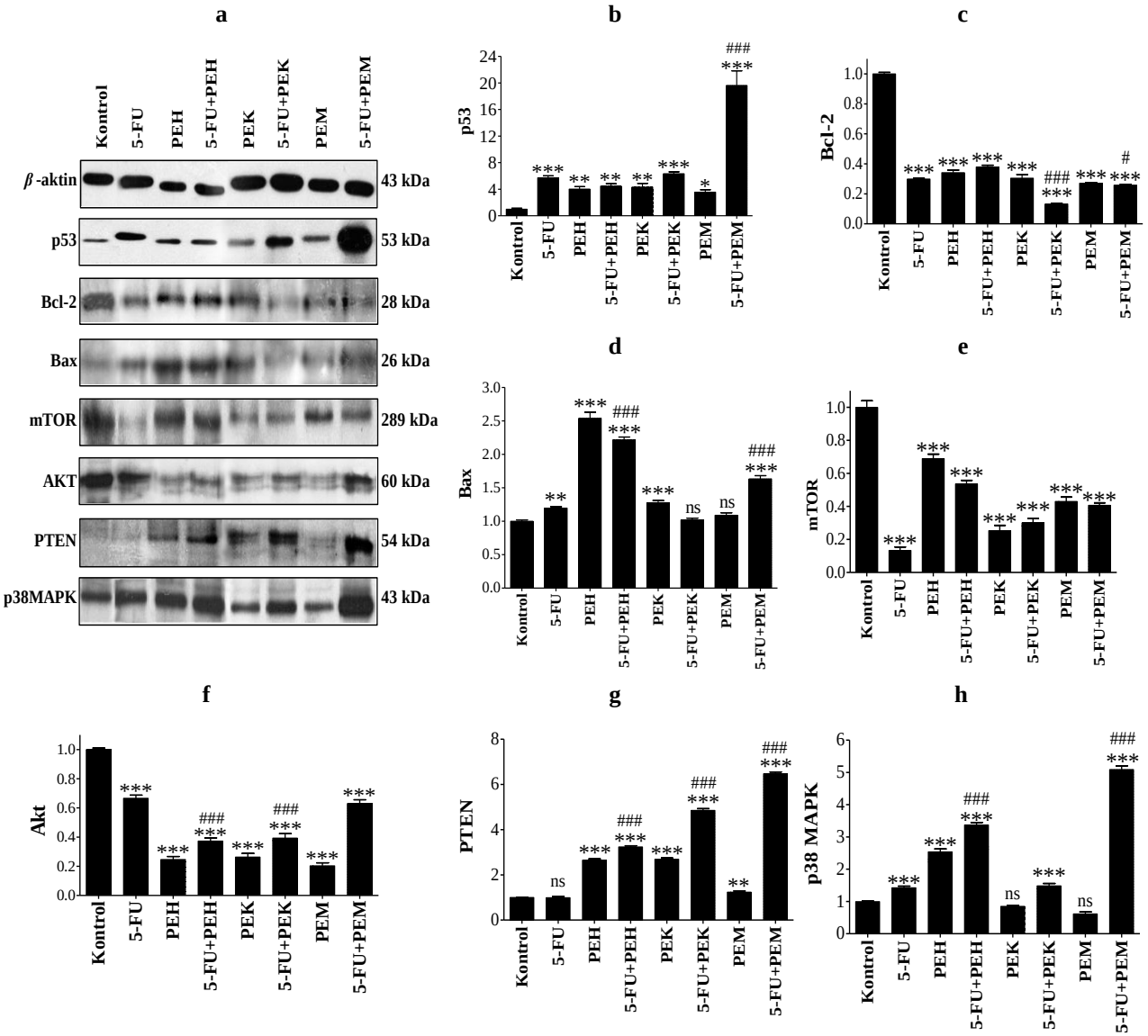
[a]Kontrole göre $p<0.0001$, [b]5-FU'ya göre $p<0.0001$, [c]5-FU'ya göre $p<0.01$

Bax mRNA ekspresyon oranlarındaki artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5-FU+PEK ve PEM ile tedavi edilen gruplar dışındaki tüm örneklerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.0001$). 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında ise, 5-FU+PEH ve 5-FU+PEM tedavisi uygulanan gruplardaki Bax mRNA oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.0001$), 5-FU+PEK tedavisi uygulanan gruptaki değişim anlamlı bulunmadı. Bax mRNA seviyesindeki en fazla artış *P. eurycarpa* hekzan ekstraktının uygulandığı grupta görüldü. mTOR genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri, uygulanan tüm tedavilerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0.0001$). 5-FU ile kombine olarak uygulanan tedavi grupları, yalnız 5-FU uygulanan grupla karşılaştırıldığında mTOR mRNA seviyelerinde herhangi bir azalış görülmedi. mTOR mRNA seviyesindeki en fazla düşüş, 5-FU ile tedavi edilen grupta belirlendi. Akt mRNA seviyesi, tüm tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0.0001$). Akt mRNA seviyesindeki en fazla düşüş, *P. eurycarpa* metanol ekstraktı ile tedavi edilen grupta görüldü. Kombinasyon grupları, yalnız 5-FU ile tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında, 5-FU+PEM uygulanan hücreler dışındaki gruplarda Akt mRNA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,0001$). Kontrole göre, 5-FU dışındaki tüm tedavi grupları PTEN mRNA seviyelerini anlamlı oranda arttırdı ($p<0,0001$). 5-FU ile kıyaslandığında, tüm kombinasyon tedavileri sonucunda PTEN mRNA seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Tedavi grupları kontrol ile karşılaştırıldığında, PEK ve PEM uygulanan hücreler dışındaki tüm gruplarda p38 MAPK genine ait mRNA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0.0001$). 5-FU+PEH ve 5-FU+PEM ile tedavi edilen gruplar, yalnız 5-FU uygulanan gruba göre p38 MAPK mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p<0.0001$), 5-FU+PEK grubunda anlamlı bir değişim gözlenmedi. p38 MAPK mRNA seviyesindeki en yüksek artış 5-FU+PEM ile tedavi edilen hücrelerde görüldü (Tablo 1).

3.7. Western blot bulguları

Tedavi gruplarına bağlı olarak p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK protein ekspresyonlarındaki değişimler Western blot yöntemiyle değerlendirildi. Tedavi uygulanan HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin Western blot analizleri sonucunda elde edilen membran görüntüleri Image J programı kullanılarak değerlendirildi. *β*-aktin protein ekspresyon düzeyi referans olarak kullanıldı (Şekil 7.a).

p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK genlerine ait mRNA ekspresyon oranları ile bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri arasında paralel bir ilişki görüldü (Tablo 1-Şekil 7).



Şekil 7. *P. eurycarpa* ekstraktları, 5-FU ve kombinasyonlar ile 24 saat tedavi uygulanan HT-29 kolorektal kanser hücrelerindeki p53, Bcl-2, Bax, mTOR, Akt, PTEN ve p38 MAPK proteinlerine ait Western blot bulguları. Protein ekspresyonlarındaki değişiklikler, membran görüntülerinin Image J programı ile analiz edilmesiyle, ekspresyon kat artışı veya azalışı cinsinden grafiklerle ifade edildi. Sonuçlar, *β*-aktin protein ekspresyon oranları kullanılarak normalize edildi (5-FU; 5-Florourasil, PEH; *P. eurycarpa* hekzan ekstraktı, PEK; *P. eurycarpa* kloroform ekstraktı, PEM; *P. eurycarpa* metanol ekstraktı) (*Kontrole göre p<0.05, **Kontrole göre p<0.01, ***Kontrole göre p<0.0001, #5-FU'ya göre p<0.05, ###5-FU'ya göre p<0.0001, ns-kontrole göre anlamlı değil).

Kontrol ile kıyaslandığında tüm gruplardaki p53 protein ekspresyonu mRNA düzeylerinde olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergiledi ($p<0.05$). Kombinasyon grupları 5-FU ile karşılaştırıldığında 5-FU+PEM tedavisi uygulanan hücrelerdeki p53 proteini ekspresyon seviyelerinin artışı anlamlı olurken ($p<0.0001$), diğer kombinasyon tedavilerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. En yüksek p53 protein seviyesi, 5-FU+PEM ile muamele edilen hücrelerde görüldü (Şekil 7.b).

Bcl-2 protein ekspresyonu seviyeleri kontrol ile kıyaslandığında tüm tedavi gruplarında anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0.0001$). En düşük Bcl-2 seviyesi 5-FU+PEK uygulanan hücrelerde belirlendi. 5-FU ile karşılaştırıldığında, 5-FU+PEH ile tedavi edilen hücreler dışındaki tüm kombinasyon gruplarında, Bcl-2 protein düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 7.c).

Bax protein seviyesindeki en fazla artış PEH uygulanan hücrelerde görülürken, 5-FU+PEK ve PEM ile tedavi edilen gruplarda kontrole göre anlamlı bir yükseliş görülmedi. Diğer tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir artış gözlendi ($p<0.01$) (Şekil 7.d). Sadece 5-FU uygulanan hücrelerle karşılaştırıldığında, 5-FU+PEH ve 5-FU+PEM uygulanan kombinasyon gruplarında Bax proteini seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülürken ($p<0.0001$), 5-FU+PEK kombine tedavisinde anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Tüm tedavi gruplarının mTOR protein seviyeleri, kontrole göre anlamlı bir düşüş sergiledi ($p<0.0001$). En düşük mTOR düzeyine 5-FU uygulanan hücrelerde rastlandı. 5-FU'ya göre, hiçbir kombinasyon tedavisi mTOR protein seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olmadı (Şekil 7.e). Akt protein seviyeleri tedavi gruplarının tamamında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi ($p<0.0001$). 5-FU+PEM dışındaki diğer kombinasyon tedavilerinde, Akt protein düzeyleri 5-FU'ya göre anlamlı bir şekilde azaldı ($p<0.0001$) (Şekil 7.f). 5-FU uygulanan hücreler dışındaki tüm grupların PTEN protein seviyelerinde kontrole göre anlamlı bir artış gözlendi ($p<0.01$). PTEN protein düzeyindeki en fazla yükseliş 5-FU+PEM uygulanan hücrelerde görüldü. 5-FU ile kıyaslandığında tüm kombinasyon tedavilerinin PTEN seviyelerinde anlamlı yükselişler görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 7.g). p38 MAPK protein seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında PEK ve PEM ile tedavi edilen hücreler dışındaki tüm tedavi gruplarında anlamlı artışlar görüldü ($p<0.0001$) (Şekil 7.h). p38 MAPK protein seviyesini en fazla arttıran tedavinin 5-FU+PEM olduğu belirlendi. 5-FU+PEH ve 5-FU+PEM ile tedavi edilen hücrelerde p38 MAPK protein seviyeleri 5-FU'ya göre istatistiki olarak anlamlı artışlar sergilerken ($p<0.0001$), 5-FU+PEK kombinasyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmedi..

4. Sonuçlar ve tartışma

Günümüzün en tehlikeli ve hızlı yayılan sağlık problemlerinden birisi olan kanser, tedavisi için büyük emek ve para harcanmasına rağmen yüksek ölüm oranlarının engellenemediği bir hastalıktır. Kemoterapi ve radyasyon terapisinin ciddi yan etkilere sahip olması kanser tedavisinde alternatif tamamlayıcı yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çerçevede, güvenilir ve kolay elde edilebilir kaynaklar olan bitkiler, kanser tedavisinde önemli materyaller olarak görülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan 3.000'den fazla bitki rapor edilmiştir [22]. Onaylı kanser ilaçlarının yaklaşık %75'i doğal kaynaklı ajanlardan köken alınarak geliştirilmiştir [23]. Ancak, tıbbi amaçlar için tüm bitki türlerinin sadece %30'u kullanılmaktadır [24].

Kanser, bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalması ve bu anormal hücrelerin diğer organlara yayılması ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kanser hücrelerindeki anormallikler genellikle, hücre bölünmesini düzenleyen proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Zaman içinde daha çok gen mutasyona uğrar. Bunun sebebi normalde hücre proliferasyonunu düzenleyen, apoptozu kontrol eden veya DNA hasarını tamir eden proteinleri kodlayan genlerin asıl işlevlerini tam olarak yerine getirememesidir.

Kolorektal kanserin önlenmesinde çeşitli doğal ve sentetik ilaçların kullanımı özellikle son yıllarda büyük ilgi çekmektedir. Bitkiler ve bitkisel kaynaklı etken maddeler kanser gibi bazı hastalıklara karşı kemopreventif ve kemoterapötik etkiye sahiptirler [25]. Epidemiyolojik çalışmalar, bazı tıbbi bitkilerin hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü etkileyerek kolorektal kanser riskini önemli oranda azalttığını ortaya koymaktadır [26].

Çeşitli *Pistacia* türlerinin antikanser etkiler gösterdiği belirlenmiştir [10, 12]. *Pistacia lentiscus* var. *chia.* bitkisinden elde edilen reçineyle hazırlanan hekzan ekstresinin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik ve antikanser etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [10]. Metastatik kolorektal kanser hastalarında setuksimab kullanımının oluşturduğu toksik etkinin *Pistacia terebinthus* ile ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir [27].

Kolorektal kanser PTEN/Akt/mTOR ve MAPK gibi pek çok sinyal iletim yolağıyla ve bu yolaklarla etkileşimi olan p53, Bax ve Bcl-2 gibi proteinlerle ilişkilidir [28, 29, 26]. 5-FU, 8 farklı kolorektal kanser hücre hattında p53 ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeylerini yükseltmiş, Bcl-2 seviyesini ise düşürmüştür [30].

Akt/mTOR yolağı aynı zamanda tümörogenez için de önemli olan hücre proliferasyonu, hücre metabolizması, anjiyogenez, hücre döngüsü, apoptozis ve otofaji gibi birçok hücresel fonksiyonu düzenler [31]. AKT, üç izoformu olan, hücre proliferasyonunun artması, hayatta kalım ve mitokondriyal biyogeneziste önemli rol oynayan ve protein kinaz B olarak da bilinen bir serin/treonin kinazdır [32]. mTOR (memelilerde rapamisinin hedefi) ise sinyal iletimi ile hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenleyen bir serin/treonin kinazdır [33].

PTEN (fosfat ve tensin homologu) genindeki mutasyonlar, pek çok kanser türünün gelişmesinde önemli bir basamağı temsil eder. PTEN tümör supresör fonksiyona sahiptir ve yolağı negatif yönlü düzenler. PTEN kaybı, AKT'nin aşırı aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda kontrolsüz hücre çoğalması, apoptozdan kaçınma ve tümör anjiyogenezi meydana gelir [34].

p38 MAPK, mitojen-aktiviteli protein kinazların bir üyesidir. Apoptozisin düzenlenmesinde, hücre döngüsünün durdurulmasında, büyüme inhibisyonu ve farklılaşmada önemli rol oynar. p38MAPK ve p53 birlikte hareket eder. p53, ya PTEN'i etkileyip AKT'yi baskılayarak ya da ölüm reseptörü ile pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 gibi mitokondriyal yolak bileşenlerini etkileyerek apoptozisin düzenlenmesinde rol alır [35].

In vitro çalışmalar p53 fonksiyon kaybının, 5-FU'ya olan hücresel duyarlılığı azalttığını, kolon kanseri hücre hattında TP53 veya Bax'ın her iki allelinin dizilim bozukluğu olduğu durumda 5-FU tarafından indüklenen apoptoza karşı hücrelerin çarpıcı şekilde dirençli olduğunu göstermiştir [3].

Sonuç olarak, bu çalışma ile kolorektal kanser tedavisinde 5-FU'nun etkinliğinin arttırılması ve toksik etkisinin azaltılmasına katkı sağlayabilecek yeni kombine tedaviler ve bu tedavilerin moleküler mekanizmaları ortaya konmuştur. HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığının azalması ve apoptoza yönelmesinde, 5-FU ile birlikte *Pistacia eurycarpa* kombinasyonu, 5-FU'nun tek başına uygulanmasına göre daha etkili olmuştur. Ayrıca, çalışmada kullanılan bitki ekstraktları tek başlarına uygulandıklarında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığı ve apoptoza yönelmesinde çok önemli etkilere sahip oldukları belirlenmiştir. Uygulanan kombine tedavilerde 5-FU'nun düşük

dozlarda bile etkinliğinin arttığı ve böylece ilacın yüksek sitotoksik etkilerinin minimuma indirilebileceği saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulguların ileri dönemlerde yapılacak *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, uygulanan tedavilerin moleküler etki mekanizmalarının ve antikanser etkinliklerinin daha iyi aydınlatılmasına ve düşük toksisite oranı ile daha az yan etkiye sahip yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

.

Teşekkür

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: AUBAP 2013-292).

Kaynaklar

[1] Stewart, B. W., Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization*, 505, Lyon.

[2] Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A. (2014). Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*, 19 (2): 2497-2522. https://doi.org/10.3390/molecules19022497

[3] Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5): 330-338. https://doi.org/10.1038/nrc1074

[4] Gusella, M., Frigo, A. C., Bolzonella, C., Marinelli, R., Barile, C., Bononi, A., Pasini, F. (2009). Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *British journal of cancer*, 100(10): 1549. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605052

[5] Wani, Z. A., Guru, S. K., Rao, A. S., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A., Kumar, A., Sharma, P. R., Kamal, A., Bhushan, S., Mondhe, D. M. (2016). A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 87: 1-11. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.016

[6] Sun, M., Estrov, Z., Ji, Y., Coombes, K. R., Harris, D. H., Kurzrock, R. (2008). Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*,7(3): 464-473. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2272

[7] Srimuangwong, K., Tocharus, C., Tocharus, J., Suksamrarn, A., Chintana, P. Y. (2012). Effects of hexahydrocurcumin in combination with 5-fluorouracil on dimethylhydrazineinduced colon cancer in rats. *World J. Gastroenterol*, 18 (47): 6951-6959. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i47.6951

[8] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35 (4): 495-516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

[9] Kuru, C., Özsabuncuoğlu, İ. H. (1990). Yabani Pistacia türlerinin aşılanmasında sorunlar ve çözüm yolları. Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu, Gaziantep.

[10] Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wychea, J. H., Sitaras, N. M., Pantazis, P. (2007). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from Pistacia lentiscus L. var. chia. *Phytomedicine*, 14 (4): 263-272. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.03.009

[11] Derwich, E., Manar, A., Benziane, Z., Boukir, A. (2010). GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocoo. *World Applied Sciences Journal*, 8 (10): 1267-1276.

[12] Giaginis, C., Theocharis, S. (2011). Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. *Nutrition and cancer*, 63 (8): 1174-1184. https://doi.org/10.1080/01635581.2011.607546

[13] Demirci, F., Başer, K. H. C., Çalış, I., Gökhan, E. (2001). Essential oil and antimicrobial evaluation of the *Pistacia eurycarpa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (4): 332-335. https://doi.org/10.1023/A:1013766400932

[14] Kafkas, S., Kafkas, E., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C. (2007). Analysis of the fatty oil of *Pistacia eurycarpa* nuts by gas chromatography/mass spectrofotometry. *Chemistry Of Natural Compounds*, 43 (3): 313-314. https://doi.org/10.1007/s10600-007-0114-1

[15] Aizpurua, O. O., Ormazabal, M., Vallejo, A., Olivares, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2015). Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Journal of Food Science*, 80 (1): 101-107. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12715

[16] Yücel, D. (2018). Cytotoxic effects of Satureja cuneifolia extract in liver cancer cell line (HepG2). *Biological Diversity and Conservation*, 11 (2): 42-46.

[17] Chou, T. C. (2011). The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3 (5): 548-559. https://doi.org/10.1039/c0ib00130a

[18] Chou, T. C. and Martin, N. (2007). CompuSyn software for drug combinations and for general dose effect analysis, and user's guide. *ComboSyn, Inc. Paramus*, NJ, USA.

[19] Holdenrieder, S. S., Bodenmüller, P., Busch, M., Fertig, G., Fürst, H., Schalhorn, H., Schmeller, M., Untch, M., Seidl, D. (2002). Quantification of nucleosoms in serum by cell death detection ELISA, *Biochemica*, 1.

[20] Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25 (4): 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

[21] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2): 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

[22] Cragg, G. M., Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100 (1): 72-79. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011

[23] Newman, D. J., Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75 (3): 311-335. https://doi.org/10.1021/np200906s

[24] Pathania, A. S., Guru, S. K., Verma, M. K., Sharma, C., Abdullah, S. T., Malik, F., Chandra, S., Katoch, M., Bhushan, S. (2013). Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. *Food and chemical toxicology*, 62: 246-254. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.037

[25] Jaganathan, S. K., Mandal, M. (2009). Honey constituents and its apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of Apiproduct and Apimedical Science*,1 (2): 29-36. https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.02

[26] Xavier, C. P., Pereira-Wilson, C. (2016). Medicinal plants of the genuses Salvia and Hypericum are sources of anticolon cancer compounds: Effects on PI3K/Akt and MAP kinases pathways. *Pharma Nutrition*, 4 (2): 112-122. https://doi.org/10.1016/j.phanu.2015.11.002

[27] Tastekin, D., Tambas, M., Kilic, K., Erturk, K., Arslan, D. (2014). The efficacy of *Pistacia terebinthus* soap in the treatment of cetuximab-induced skin toxicity. *Investigational new drugs*, 32 (6): 1295-1300. https://doi.org/10.1007/s10637-014-0128-z

[28] Millimouno, F. M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X. (2014). Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Research*, 7 (11): 1081-1107. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0136

[29] Pabla, B., Bissonnette, M., Konda, V. J. (2015). Colon cancer and the epidermal growth factor receptor: Current treatment paradigms, the importance of diet, and the role of chemoprevention. *World journal of clinical oncology*, 6 (5): 133. https://doi.org/10.5306/wjco.v6.i5.133

[30] Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Chambaz, J., Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. *International Journal of Cancer*, 98 (4): 498-504. https://doi.org/10.1002/ijc.10146

[31] Courtney, K. D., Corcoran, R. B., Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28 (6): 1075-1083. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.3641

[32] Wright, G. L., Maroulakou, I. G., Eldridge, J., Liby, T. L., Sridharan, V., Tsichlis, P. N., Muise-Helmericks, R. C. (2008). VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *The FASEB Journal*, 22 (9): 3264-3275. https://doi.org/10.1096/fj.08-106468

[33] Tsang, C. K., Zheng, X. F. (2007). TOR-in(g) the nucleus. *Cell Cycle*, 6 (1): 25-29. https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3675

[34] Phin, S., Moore, M., Cotter, P. D. (2013). Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer. *Frontiers in oncology*, 3: 240. https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00240

[35] Brady, C.A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M., Kenzelmann Broz, D., Basak, S., Park, E. J., McLaughlin, M. E., Karnezis, A. N., Attardi, L. D. (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*, 145 (4): 571-583. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.035

(Received for publication 22 January 2019; The date of publication 15 April 2019)