Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science
http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tdfd/

Astragalus gummifer çiçeklerinin etanol özütünün PC-3 ve HUVECs üzerindeki biyolojik aktivitesi

Ekrem Darendelioğlu [1], Musa Tartık [1], Gürkan Aykutoğlu [1], Gıyasettin Baydaş*[2]

Özet

Astragalus (Fabaceae) türleri dünyada yaklaşık 3000 taksonla karakterize edilirken, Türkiye'de 210`u endemik olan 463 taksonla ifade edilir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi zengin floraya sahiptir ve bu bölgedeki yerel halkın çoğu doğal bitkileri beslenme ve tedavi amaçlı kullanmaktadır.

Astragalus bitkisi çok önemli fitokimyasallar olan flavonoidler, fenolik asitler, steroitler, amino asitler ve inorganik bileşiklere sahiptir. Bu fitokimyasal bileşikler anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-bakteriyel ve anti-oksidan özellikler taşımaktadır. Bu çalışmamızda *Astragalus gummifer* (*A. gummifer*) çiçeğinin etanol özütünün hücre sitotoksititesi ve anti-mikrobiyal aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *A. gummifer* çiçeği özütünün normal ve kanserli hücrelerde oksidatif hasar ve apoptoz üzerindeki karşılaştırmalı etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda, *A. gummifer* çiçeğinin etanol özütü anti-mikrobiyal ve anti-oksidan etki göstermiştir. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ile indüklenen İnsan Umblikal Ven Endotel Hücrelerinde (HUVECs) Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumu ve Lipit Peroksidasyonda (LPO) artış olurken, *A. gummifer* çiçeği özütünün bunu düşürdüğü görülmüştür. Diğer taraftan ise *A. gummifer* çiçeği özütü Prostat Kanseri Hücrelerinde (PC-3) ROS oluşumu ve LPO seviyesini arttırmıştır. Ayrıca, *A. gummifer* PC-3 hücrelerinde apoptozla ilgili olarak DNA fragmentasyonuna neden olmuştur. Sonuç olarak *A. gummifer* normal hücrelerde anti-oksidan etki gösterirken, kanser hücrelerinde pro-oksidan etki göstererek bu yolla bu hücrelerde apoptoza neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus gummifer*; PC-3; HUVECs; LPO; ROS; Anti-mikrobiyal

The biologic activity of ethanol extract of *Astragalus gummifer* on PC-3 and HUVECs

Abstract

Astragalus (Fabaceae) species are characterised by around 3000 taxa in the world whereas they are represented by 463 taxa, 210 of them are endemic in Turkey. Eastern Anatolia has a rich flora; plurality of the folks living in country regions usually takes advantages of plants for nourishment and medical purposes.

Astragalus species have significant phytochemicals such as flavonoids, phenolic acids, steroids, amino acids and inorganic compounds. These phytochemical compounds are responsible for the several biologic effects such as anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant. The ethanol extract of *A. gummifer* was investigated for cell cytotoxicity and anti-microbial effects.

The aim of this study was to investigate comparative effects of *A. gummifer* flower extract on oxidative damage and apoptosis in normal and cancer cells. In the present study, the ethanol extract of *A. gummifer* flower demonstrated anti-microbial and anti-oxidant activities. Our results also showed that the ethanol extract of *A. gummifer* flower led to decrease Reactive Oxygen Species (ROS) creation and Lipid Peroxidation (LPO) levels in Hydrogen Peroxide (H_2O_2) induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). However, this extract activity led to increase ROS generation and LPO levels in Prostate Cancer cells (PC-3). Additioanally, the ethanol extract of *A. gummifer* flower caused DNA fragmentation as known a hallmark of apoptosis in PC-3 cells. As a result, *A. gummifer* showed anti-oxidant activity in normal cells, whereas its pro-oxidant activity led to apoptosis in cancer cells.

Keywords: *Astragalus gummifer*; PC-3; HUVECs; LPO; ROS; Anti-microbial

Kısaltmalar: Hidrojen Peroksit (H_2O_2); İnsan Umblikal Ven Endotel Hücreleri (HUVECs); Kafeik Asit Fenil Ester (CAPE); Lipit Peroksit (LPO); Luria Broth (LB); Malondialdehyde (MDA); Maya ekstrakt peptone dekstroz (YPD); Mikrogram/mililitre (µg/ ml); Mikromolar (µM); Nitrik Oksit (NO); Prostat Kanseri Hücreleri (PC-3); Reaktif Oksijen Türleri (ROS); Suda Çözülebilir Tetrazolium-1 (WST-1); Thiobarbiturik Asit Reaktif Substances (TBARS); Yüksek Basınçlı Likit Kromotoğrafi/Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre (HPLC/MS/MS).

[1] Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

[2] Yuksek Ogretim Kurumu, Denetleme Kurulu, Ankara, Türkiye

*Sorumlu yazar e-posta: baydas@hotmail.com

1. Giriş

Dünyada yaklaşık 3000 taksonla karakterize edilen *Astragalus* (Fabaceae) türleri Türkiye'de 210 tanesi endemik olan 463 taksonla ifade edilmektedir. *Astragalus gummifer* (*A. gummifer*) Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika`da geniş dağılım gösteren çalı şeklinde bitkidir [1].

Astragalus türleri anti-bakteriyel, anti-kanser ve anti-oksidan özellikteki flavonoidler, fenolik asitler, steroitler, amino asitler ve inorganik bileşikler içerir [2,3]. Bu yüzden çeşitli *Astragalus* türleri kanser, diyabet ve viral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [4,5].

Astragalus türlerinin kullanıldığı tedavilerdeki etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir [6,7]. Ionkova` ya göre [8, 9], *Astragalus* türleri biyolojik olarak oldukça etkili bileşikler olan polisakkaritler, saponinler ve flavonoidlere sahiptirler. Örneğin, Türkiye'deki *Astragalus* türleri 5 farklı aglikon içeren yaklaşık 70 sikloarten tipinde saponin içerir [10-13]. *Astragalus* saponinlerinin immun sistem reaksiyonlarındaki rolleri hakkında az sayıda makale bulunmaktadır. Farklı *Astragalus* türlerinden elde edilen bazı saponinlerin interlokin-2 (IL-2) aktivitesini indükleyerek immun sistemi düzenlediği ve anti-kanser etki gösterdiği düşünülmektedir [14]. Son yapılan çalışmalarda, *Astragalus'*un içerdiği saponinlerinin apoptozu tetiklediği ve *Astragalus'*taki polisakkaritlerin nitrik oksit sentaz (NOS) gen ekspresyonunu etkileyerek makrofajları düzenlediği gösterilmiştir [5]. *Astragalus'* ta bulunan flavonoid bileşiklerden quercetin ve naringenin çoklu hidroksil gruplarıyla peroksiradikallere karşı oldukça yüksek anti-oksidan aktivite göstermektedir [15,16].

Astragalus köklerinden elde edilen flavonoidler, saponinler ve polisakkaritler membranlarda meydana gelen serbest radikal hasarlarını azaltmaktadır [8,9]. *Astragalus membranaceus* türünden elde edilen saponinler, süperoksit anyonlar ve hidroksil radikallere karşı anti-oksidan özelliğe sahiptir. Bu saponinlerin, oksidatif stres kaynaklı prematüre diyabetik nefropati'ye karşı olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir [17]. *Astragalus mongholicus* türünde ise anti-oksidan aktivite gösteren; formononetin, calycosin ve calycosin-7-O-β-D-glucosidenin varlığı bilinmektedir [18, 19]. Bunların yanısıra, *Astragalus* türlerinden elde edilen astragolosid'in *in vivo* çalışmalarla oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir [20].

Astragalus türlerinin anti-mikrobiyal etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına karşın *Astragalus alexandrinus*, *verrucocus* ve *trigonus* türlerinden izole edilen Astragaluquinone, 8-methoxyvestitol, 7-hydroxy-2',3',4'-trimethoxyisoflava ve astraverrucins I-VI saf saponinlerin anti-mikrobiyal özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [21,22]. Ayrıca, Çin'in belli bölgelerinde tedavi amacı ile kullanılan *Astragalus membranaceus*, *siculus* ve *melanophrurius* türlerinde de anti-mikrobiyal özellik gösteren polisakkaritlerin varlığına rastlanılmıştır [23-25].

Bu çalışmanın amacı, *A. gummifer* çiçeği özütünün normal ve kanserli hücrelerde oksidatif hasar ve apoptoz üzerindeki karşılaştırmalı etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda *A. gummifer* çiçeklerinin etanol özütü elde edilerek anti-mikrobiyal aktivitesinin incelenmesi ve aynı zamanda hem prostat kanser hücrelerinde (PC-3) hem de İnsan Umblikal Ven Endotel Hücrelerinde (HUVECs), *A. gummifer* çiçeğinin reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipit peroksidasyonu (LPO) üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca hem hücre canlılığı hem de apoptozun bir göstergesi olan DNA fragmentasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve metot

2.1. *A. gummifer*`e ait etanol özütünün hazırlanışı

A. gummifer türüne ait örnekler Türkiye'de Bingöl ili kırsalından toplandı. Bitkiye ait çiçeklerden 10 gr tartılarak 200 ml etanol içerisinde oda sıcaklığında 24 saat 90 rpm' de çalkalanarak süspansiyon elde edildi. Daha sonra özüt Whatman No. 1 filtre kâğıdıyla süzülerek alındı. En sonunda etanolün vakumlu inkübatör yardımıyla buharlaştırılmasıyla saf özüt elde edildi. Bu özüt kuru ve karanlık stok koşulları altında saklandı.

2.2. Hücre kültürü

PC-3 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1435) firmasından temin edildi. PC-3 hücreleri %10 fetal sığır serum ve %1 oranında penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu içeren RPMI 1640 hücre besiyerinde 37 ^{o}C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 8-10 pasaj aralığında kullanıldı. HUVECs hücreleri ise Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezinden temin edildi. HUVECs hücreleri fetal sığır serum, insan fibroblast büyüme faktörü (hFGF), insan epitel büyüme faktörü (hEGF), hidrokortison, gentamisin-amfoterisin-B, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve askorbik asit içeren özel hazırlanmış endotel hücre büyüme besiyerinde (Lonza, USA) 37^{o} C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 5-10 pasaj aralığında kullanıldı.

2.2.1. Deneysel hücre grupları

PC-3 hücreleri üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir ajan uygulanmayarak hücrelerin sadece besiyerinde 24 saat büyümesi sağlandı. A. *gummifer* gruplarında (Suda Çözülebilir Tetrazolium-1) WST-1 sonuçlarına göre elde edilen en iyi iki doz (250 ve 500 µg/ml) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. HUVECs hücreleri ise dört gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir ajan uygulanmadı. 400 µM Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (oksidatif hasar arttırıcı ajan) [26] pozitif kontrol olarak 24 saat uygulandı. *A. gummifer* gruplarında 400 µM H_2O_2 ile birlikte 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarda *A. gummifer* çiçek özütü 24 saat boyunca uygulandı.

2.3. Hücre canlılık analizi

A. gummifer çiçek özütünün değişik dozlarda PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için WST-1 hücre canlılık analiz kiti (ClonTECH Laboratories) kullanıldı. PC-3 hücreleri 96 kuyucuklu-platelere ekildi (5 x 10^3 hücre/kuyucuk). *A. gummifer* çiçek özütü 60, 120, 250, 500 ve 1000 µg/ml dozlarında hücrelere uygulandı. Ayrıca negatif kontrol olarak *A. gummifer* çiçeği özütünün yukarıdaki dozlarda besiyerine eklendiği ancak hücrelerin bulunmadığı grupta blank olarak kullanıldı. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 5 µl WST-1 eklenerek 37^{o} C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbanı mikro-plaka okuyucu (Molecular Devices, USA) kullanılarak ölçüldü (referans dalgaboyu: 630 nm).

2.4. İntrasellüler ROS miktarlarının belirlenmesi

PC-3 ve HUVECs hücrelerinde ROS ölçümü bir floresan belirteç olan 2', 7'-dichlorodihydrofluorescin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak yapıldı. Hücreler deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği şekilde

gruplandırılarak hazırlandı. Daha sonra hücreler toplanarak her bir gruba 1 x 10^6 hücre için 5 µl DCFH-DA eklendi. Hücreler karanlık ortamda 37^o C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Her bir grubun floresan şiddeti spektroflorometre (Perkin Elmar, USA) kullanılarak ölçüldü (eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 485 ve 525 nm) [27].

2.5. Lipit peroksidasyon analizi

Lipid peroksidasyon analizi malondialdehitten (MDA) oluşan tiobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) ölçümüne göre yapıldı. PC-3 ve HUVECs hücreleri deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği gibi inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler toplanarak 3000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Hücrelere 250 µl trikloroasetik asit (%70 w/v) ve 1 mL tiobarbitürik asit (%0,8 w/v) eklendi. Ardından hücreler 100^o C'de kaynayan suda 30 dk bekletildi. Hücreler buzda 5 dk tutularak soğutuldu. Daha sonra 15000 rpm'de 10 dk boyunca santifürüj edilerek süpernatantlar elde edildi ve süpernatantların absorbansı 532 nm'de mikro-plaka okuyucuda (Molecular Devices, USA) ölçüldü. Malondialdehid bis standart olarak kullanıldı. Ölçümler µM olarak ifade edildi [28].

2.6. *A. gummifer* anti-mikrobiyal test hazırlanışı

A. gummifer çiçeği etanol özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi *S. cerevisiae* ile zararlı mikroorganizmalar olarak kabul edilen *E. coli, S. aureus* ve *E. aerogenes* üzerinde test edildi. Mikroorganizmaların sayısı 600 nm absorbans altında Spectra MaxPlus384 Mikro plaka okuyucu (Molecular Devices, USA) ile ölçüldü. Bakteri ve maya kültürleri sıvı besiyerlerinde hazırlandı. Luria broth (LB) besiyeri bakteriler için, maya ekstrakt peptone dekstroz (YPD) besiyeri ise maya için kullanıldı ve mikroorganizmalar 32 ºC, 100 rpm şartlarında gece boyu çalkalayıcıda inkübe edildi. Her kuyusunda 8,0 x 10^6 mikroorganizma bulunan 96 kuyucuklu-plateler anti-mikrobiyal test için kullanıldı. Örnekler 3 gruba ayrıldı: birinci grup negatif kontrol, *A. gummifer* çiçeği özütünün çeşitli dozlarda besiyerine eklendiği ancak mikroorganizmaların bulunmadığı; ikinci grup pozitif kontrol, besiyerine mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bilinen antibiyotiklerin eklendiği; üçüncü grup ise mikroorganizmalara karşı çeşitli dozlarda *A. gummifer* çiçeği özütünün eklendiği gruplar olacak şekilde tasarlandı. Daha sonra, tüm plateler 32 ºC`de ve 100 rpm şartlarında 12 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.

2.7. HPLC/MS/MS prosedürü

Birer fenolik olan quercetin, naringenin, chrysin ve Kafeik Asit Fenil Estere (CAPE) ait kromatoğrafik ayrım işlemi HPLC metodu ile hypersigold kolon (50×4,6 mm, 1,9 µm partikül boyutu, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Mobil fazlar A: ultra saf su ve %1 formik asit; B: asetonitril ve %1 formik asit olacak şekilde ayarlandı. Çoklu konsantrasyon programı 0-1 dk %65-70 B; 1-3 dk %70-85 B; 3-5 dk %85-90 B; 5-8 dk %85-90 B ve 8-10 dk %95 B olacak şekilde tasarlandı. Her örnekten injeksiyon miktarı 20 µL ve akış hızı 300 µL/dk olacak şekilde ayarlandı ve pozitif iyon metodu ile kütle spektrometresi çalıştırıldı. İyon kaynak değerleri olarak; sprey voltajı 3,50 kV, kapiller sıcaklığı 320 ^{o}C`de, sheat gaz akışı 40, auxiliary gaz akışı 10 birim/ünite olacak şekilde ayarlandı. Kütle spektrometre 250-310 m/z aralığında olacak şekilde belirlendi. Fenolik ve flavonoidler uygun spektral özelliklerinin ölçümü ile kütle aralığı, kesin kütle, spesifik parçalanma ve bulunma zamanlarına göre tanımlandı. Xcalibur yazılımı kullanılarak veri analizi yapıldı ve "www.mzcloud.org" sitesi örnek içerikleri için referans veri bankası olarak kullanıldı. Miktar tayinleri örneklerin spesifik bulunma zamanı ve standartların kesin kütlesi ile kıyaslanarak, tam kütle araştırma tekniğine (±5 ppm) göre yapıldı [29].

2.8. DNA fragmentasyon analizi

Apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu deneyi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gerçekleştirildi. PC-3 ve HUVECs hücreleri deneysel gruplar bölümünde açıklandığı gibi hazırlandı. Daha sonra hücrelerden DNA izolasyonu mevcut kit protokolüne (G-Dex, Belgium) göre gerçekleştirildi. İzole edilen DNA'lar %1,5 lik Etidium Bromit içeren agaroz jelde Tris Asetat-EDTA tamponunda koşturuldu. DNA bantları ve fragmentleri GelDoc EZ (Bio Rad, USA) cihazıyla gözlemlendi.

2.9. İstatistiksel analizler

İstatistiksel sonuçlar one-way ANOVA metodunda Newman-Keuls çoklu karşılaştırma *Post-Hoc* Testlerine göre GraphPad Prism 5.01 programında analiz edildi. $p<0,05$ önemli olarak kabul edildi.

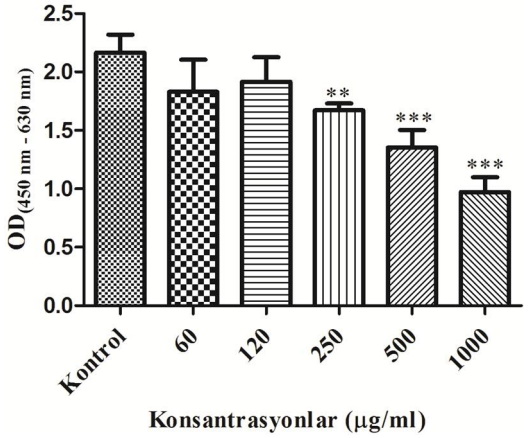
3. Bulgular

3.1. *A. gummifer*'e ait bazı fenolik bileşikler

A. gummifer çiçeğinin etanol özütünde bulunan fenoliklerin miktar tayinlerini tespit etmek üzere öncelikle bazı standartların HPLC/MS/MS cihazında analizleri yapıldı. Tablo 1` de görüldüğü gibi CAPE, Naringenin, Quercetin ve Chrysin fenoliklerine ait denklemler, tespit edilen moleküler ağırlıkları, hesaplanan miktarlar ve bulunma zamanları (RT) belirtilmektedir. CAPE bileşiği miktar ölçümünde diğer bileşiklere göre oldukça fazla gözlenirken, chrysin bileşiği az miktarda tespit edildi.

3.2. *A. gummifer*' in PC-3 hücre canlılığı üzerine etkileri

Değişik dozlarda uygulanan A. *gummifer* çiçek özütünün PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkileri gözlemlendi. Şekil 1'de görüldüğü gibi kontrol grubundaki hücrelere göre 250, 500 ve 1000 µg/ml dozları uygulanan hücrelerde önemli ölçüde sitotoksik etki gözlemlenmektedir. 60 ve 120 µg/ml dozları ise istatistiksel olarak önemli bir etki göstermemektedir.



Şekil 1. Belirli dozlarda 24 saat boyunca uygulanan *A. gummifer*'in hücre canlılığı üzerine etkileri (Data ortalama ± SEM olarak ifade edildi. ** $p<0,01$ kontrole göre, *** $p<0,001$ kontrole göre, n=4).

Tablo 1. *A. gummifer* çiçeğinin etanol özütünde tespit edilen fenolik bileşikler

Bileşiğin Adı	Denklem	Moleküler Ağırlığı [M+H]	Hesaplanan Miktar (µg/mg)	RT
Quercetin	y = -3,68311e+006+222867*x R^2 = 0,9990	303,0499	**45,164**	2,20
Naringenin	y = -1,52771e+007+149240*x R^2 = 0,9895	272,0757	**114,428**	2,09
CAPE	y = 3,39873e+006+15839,2*x R^2 = 0,9993	285,1109	**131,084**	2,09
Chrysin	y = 769815+1,30064e+006*x R^2 = 0,9997	255,0651	**4,382**	2,34

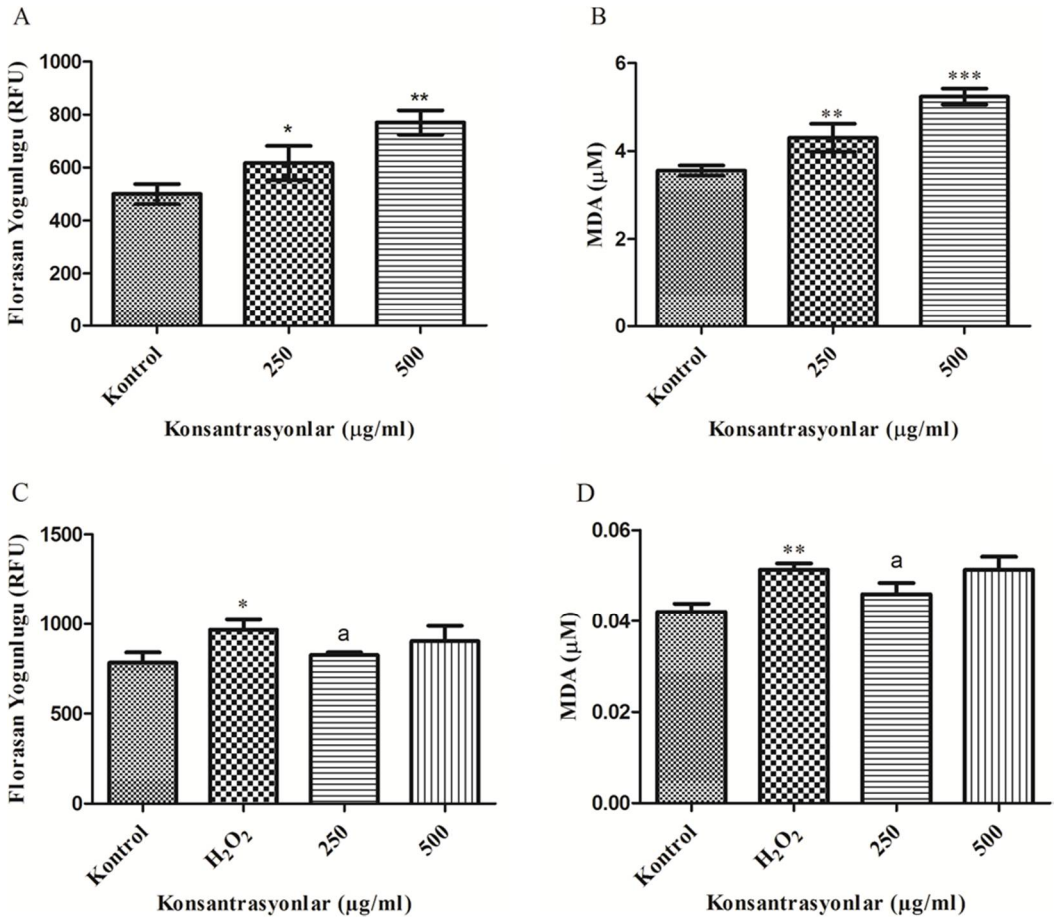
3.3. PC-3 ve HUVECs hücrelerinde ROS ve LPO oluşumu

A. gummifer çiçek özütünün belirlenen en iyi iki dozunun hücrelerde ROS oluşumuna etkisini gözlemlemek için her bir grubun floresan şiddeti ölçümü yapıldı. Şekil 2A'da görüldüğü üzere uygulanan her iki dozdaki özüt, PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre ROS oluşumunu önemli ölçüde arttırmaktadır ($p<0,05$ ve $p<0,01$). Diğer taraftan H_2O_2, HUVECs hücrelerinde ROS üretimini arttırıcı ajan olarak uygulanmış ve şekil 2C'de görüldüğü gibi H_2O_2, HUVECs hücrelerinde ROS miktarını kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırmaktadır ($p<0,05$). Ancak, 250 µg/ml *A. gummifer* çiçeği özütü H_2O_2 ile indüklenen hücrelere uygulandığı zaman ROS oluşumunun H_2O_2 grubuna göre önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmektedir ($p<0,05$).

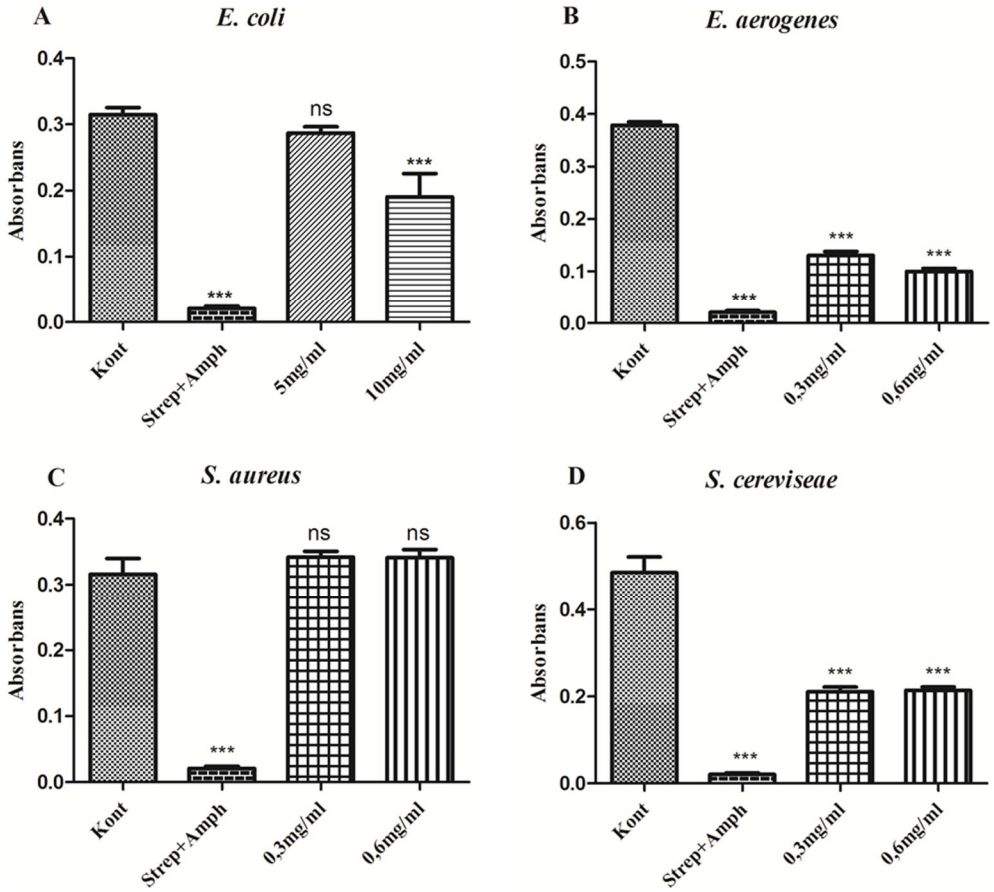
Diğer bir parametre olarak MDA oluşumu LPO miktarının arttığının göstergesidir. ROS oluşumu LPO oluşumunu indüklemektedir. Şekil 2B'de görülüğü gibi özütün uygulanan iki farklı dozu da PC-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre MDA oluşumunu arttırmaktadır ($p<0,01$ ve $p<0,001$). Ayrıca şekil 2D'de gösterilen sonuçlara göre, HUVECs hücrelerinin H_2O_2 ile muamele edilmesi bu hücrelerde kontrol grubuna göre LPO seviyesini önemli ölçüde arttırmaktadır ($p<0,01$). Ancak, 250 µg/ml *A. gummifer* çiçeği özütü H_2O_2 ile indüklenen hücrelere uygulandığında LPO seviyesini H_2O_2 grubuna göre önemli oranda düşürmektedir ($p<0,05$).

3.4. *A. gummifer*'e ait anti-mikrobiyal aktivite

A. gummifer çiçeğinin etanol özütünün anti-mikrobiyal etkilerini gözlemlemek üzere ikisi Gram negatif, biri Gram pozitif ve diğeri bir maya olan mikroorganizmalar üzerinde gerekli testler yapıldı. Şekil 3A-B ve D'de görüldüğü üzere *A. gummifer* özütünün iki farklı Gram negatif bakteri (*E. coli, E. aerogenes*) ile bir maya (*S. cerevisiae*) türüne karşı aktivite gösterirken, bir Gram pozitif bakteriye (*S. aureus*) karşı inaktif olduğu gözlemlendi (Şekil 3C).



Şekil 2. *A. gummifer* çiçek özütünün belirli iki dozunun ROS (A: PC-3 – C: HUVECs) ve LPO (B: PC-3 – D: HUVECs) üzerindeki etkileri. Hücreler deneysel hücre grupları bölümünde belirtildiği gibi ajanlar uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. (Data ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ kontrole göre, ** $p<0,01$ kontrole göre ve *** $p<0,001$ kontrole göre, [a]$p<0,05$ H_2O_2 e göre, n=3).



Şekil 3. *A. gummifer* çiçek özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi. Anti-mikrobiyal aktivite testleri özütün ve seçilen antibiyotiklerin mikroorganizmalara karşı çeşitli dozlarda uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Grafikler, **(A)** *E. coli*; **(B)** *E. aerogenes* Gram-negatif bakterilerini **(C)** *S. aureus* Gram-pozitif bakterisini; **(D)** *S. cereviseae* mayasını göstermektedir. (Data ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. *** p<0,001 kontrole göre, ns kontrole göre önemsiz, n=3). Kont: Kontrol; Strep+Amph: Streptomisin and Ampisillin antibiyotik karışımı ve çeşitli dozlardaki *A. gummifer* çiçek dozları görülmektedir.

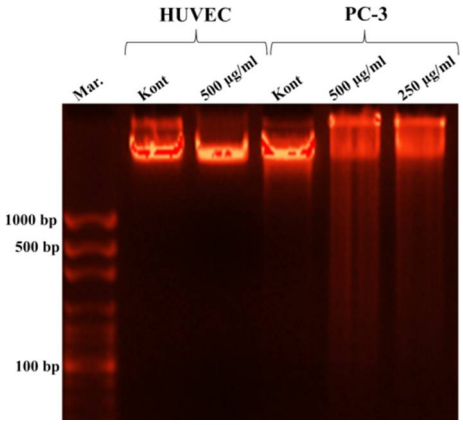
3.5. *A. gummifer*'in HUVECs ve PC-3 genomik DNA'ları üzerine etkileri

A. gummifer bitki özütünün apoptoza etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla yapılan deneylerde apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu gözlemlendi. HUVECs hücrelerinde DNA fragmentasyonu hiç bir grupta gerçekleşmezken, PC-3 hücrelerinde *A. gummifer* bitki özütünün uygulandığı gruplarda oldukça yoğun bir şekilde fragmentasyon gözlemlenmektedir.

2. Tartışma ve sonuç

Önceki çalışmalarda *A. gummifer* türüne ait çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak PC-3 ve HUVECs hücrelerindeki direkt etkisi henüz tespit edilmemiştir. Bu çalışmamızda *A. gummifer* bitkisinin etanol özütünden kaynaklı hücre sitotoksititesi ve anti-mikrobiyal etkisi üzerine deneyler yürütülmüştür.

Diğer araştırmalarda oksidan miktarlarındaki artışın dokularda oksidatif strese ve oksidan savunma mekanizmasında hasara neden olduğu gözlemlenmiştir [30,31]. Oksidatif stresin apoptoz ve nekrozda hayati role sahip olduğu bilinmektedir. ROS ve LPO seviyelerinin oksidatif hasar vasıtasıyla değişerek hücre canlılığını ve apoptoz yolaklarını etkilediği tespit edilmiştir [30,31]. Aşırı şekilde artmış olan ROS miktarı oksidatif stresi indükleyerek apoptozun düzenlenmesinde rol almaktadır [30,31]. Ayrıca önceki çalışmaların sonuçları da, *A. gummifer*'e ait fitokimyasal bileşiklerin anti-oksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin yakalanmasında ve ROS üretiminin baskılanmasında etkili olduğunu göstermektedir [8,9]. Bu çalışmamızda *A. gummifer'* in HUVECs hücrelerinde H_2O_2' nin neden olduğu oksidatif etkileri azalttığını gözlemledik. Ancak PC-3 hücrelerinde pro-oksidan özellik göstererek ROS ve LPO seviyelerinde artışa neden olmuştur. Bu da bu hücrelerde canlılığı azaltarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemiştir.



Şekil 4. *A. gummifer* çiçek özütünün HUVECs ve PC-3 hücrelerinde genomik DNA üzerine etkisi. DNA'lar %1,5 lik Etidium Bromit içeren agaroz jelde Tris Asetat-EDTA tamponunda koşturuldu. DNA bantları ve Fragmentleri GelDoc EZ (Bio Rad, USA) cihazıyla gözlemlendi. (Kont= Kontrol; Mar= bilinen moleküler ağırlık ölçüleri ve çeşitli dozlardaki *A. gummifer* çiçek dozları görülmektedir).

Astragalus türlerinin çeşitli hastalıklar üzerinde biyolojik aktivitelerinin olduğu ve bu aktivitelerinin içerisindeki fitokimyasalların çeşitliliğine bağlı olarak değiştiği söylenmektedir [8,9,21,22]. Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi *Astragalus* türlerinin quercetin ve naringenin gibi bazı önemli flavonoidlere sahip olduğu belirtilmektedir [15,16]. Bu çalışmamızda ise bunlarla birlikte güçlü anti-kanserojen etkiye sahip CAPE ve chrysin flavonoidlerinin [32] varlığı ve miktarları da tespit edildi.

Bu çalışmada aynı zamanda apoptozun doğal bir sonucu olan DNA fragmentasyonu da belirlenmiştir. *A. gummifer* bitki özütünün uygulandığı PC-3 hücre gruplarında oldukça yoğun bir şekilde fragmentasyon görülürken HUVECs hücrelerinde DNA fragmentasyonu gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara istinaden *A. gummifer* bitkisinin kanser hücrelerinde DNA`nın parçalanmasını indüklediği söylenebilir.

Önceki anti-mikrobiyal aktivite çalışmaların sonuçlarında çeşitli *Astragalus* türlerinin farklı polaritedeki özütlerinin Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı anti-bakteriyel etkilerinin olduğu gösterilmektedir [21]. Bunun aksine, bir diğer çalışmada ise yine çeşitli *Astragalus* türlerinin metanol ve hegzan özütlerinin anti-bakteriyel ve anti-fungal etkilerinin olmadığı ileri sürülmektedir [22]. Bu çalışmada *A. gummifer* çiçeği etanol özütünün iki farklı Gram negatif bakteri (*E. coli, E. aerogenes*) ile bir maya (*S. cerevisiae*) türüne karşı anti-mikrobiyal aktivite gösterirken, bir Gram pozitif bakteriye (*S. aureus*) karşı inaktif olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *A. gummifer* çiçeklerinin etanol özütünün anti-mikrobiyal aktivitesi olduğu görüldü. Aynı zamanda, HUVECs hücrelerinde anti-oksidan özellik gösterirken PC-3 hücrelerinde pro-oksidan özellik gösterdiği tespit edildi. Bunlara ilaveten, PC-3 hücrelerinde apoptozla ilgili olarak DNA fragmentasyonu gözlemlendi. Bu nedenle *A. gummifer* çiçeğinin kanser hücrelerinde pro-oksidan etkiyle apoptozu artırmak suretiyle anti-kanser etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Teşekkür

A. gummifer türünün teşhis edilmesinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Lütfi BEHÇET`e teşekkürlerimizi sunarız.

Referanslar

[1] Dinc M., Aytac Z., Dogu S. A new species of Astragalus (Fabaceae) from Turkey, Turk. J. Bot., 37, 841-846, 2013.

[2] Keskin C., Kaçar S. Fatty acid composition of root and shoot samples of some Astragalus L. (Fabaceae) taxa growing in the east and southeast of Turkey, Turk J Biol, 37, 122-128, 2013.

[3] Wang D., Zhuang Y., Tian Y., Thomas G.N., Ying M., Tomlinson B. Study of the Effects of Total Flavonoids of Astragalus on Atherosclerosis Formation and Potential Mechanisms, Oxid Med Cell Longev, 1-10, 2012.

[4] Cakilcioglu U., Turkoglu I. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig-Turkey), J Ethnopharmacol., 132, 165–175, 2010.

[5] Yusufoglu H.S., Alam A., Zaghloul A.M., Al-salkini M.A., Alam P. Comparative anti-inflammatory and hepatoprotective activities of Astragalus gummifer labill herb and roots in rats, Afr J Tradit Complement Altern Med., 11(3), 268-274, 2014.

[6] Auyeung K.K., Cho C.H., Ko J.K. A novel anticancer effect of Astragalus saponins: Transcriptional activation of NSAID-activated gene, Int. J. Cancer, 125, 1082–1091, 2009.

[7] Yejin W., Yanqun W. Inhibition of Astragalus membranaceus polysaccharides against liver cancer cell HepG2, Afr. J. Microbiol. Res., 4, 2181-2183, 2010.

[8] Ionkova I. Biotechnological approaches for the production of lignans, Pharmacognosy reviews, 1(1), 57-68, 2007.

[9] Ionkova I., Momekov G., Proksch P. Effects of cycloartane saponins from hairy roots of Astragalus membranaceus Bge., cultivated in bioreactor with respect to human tumor cell targets, Fitoterapia, 81, 447-451, 2010.

[10] Linnek J., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Paululat C.T., Avunduk S., Alankus-Caliskan O., Lacaille-Dubois M.A. Cycloartane Glycosides from Three Species of Astragalus (Fabaceae). Helv Chim Acta., 94, 230-237, 2011.

[11] Polat E., Bedir E., Perrone A., Piacente S., Alankus-Caliskan O. Triterpenoid saponins from Astragalus wiedemannianus, Fischer. Phytochem., 71, 658–662, 2010.

[12] Horo I., Bedir E., Perrone A., Ozgökçe F., Piacente S. Triterpene glycosides from Astragalus icmadophilus, Phytochem., 71, 956–963, 2010.

[13] Sevimli-Gür C., Onbaşılar I., Atilla P., Genç R., Cakar N., Deliloğlu-Gürhan I., Bedir E. In vitro growth stimulatory and in vivo wound healing studies on cycloartane-type saponins of Astragalus genus, J. Ethnopharmacol., 134, 844-850, 2011.

[14] Nalbantsoy A., Nesil T., Erden S., Çalış İ., Bedir, E. Adjuvant Effects of Astragalus Saponins Macrophyllosaponin B and Astragaloside VII, J. Ethnopharmacol., 134, 897-903, 2011.

[15] Jun Y.M., Kim E.H., Lim J.J., Kim S.H., et al. Variation of Phenolic Compounds Contents in Cultivated Astragalus membranaceus, Korean J. Medicinal Crop Sci., 20(6), 447−453, 2012.

[16] Krasteva I., Nikolov S. Flavonoids in Astragalus corniculatus, Quim. Nova, 31(1), 59-60, 2008.

[17] Adiguzel A., Sokmen M., Ozkan H., Agar G., Gulluce M., Şahin F. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Methanol and Hexane Extract of Astragalus Species Growing in the Eastern Anatolia Region of Turkey, Turk J Biol, 33, 65-71, 2009.

[18] Yu D.H., Bao Y.M., Wei C.L., et al. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from Astragalus mongholicus Bunge, Biomed Environ Sci, 18, 297-301, 2005a.

[19] Yu D.H., Duan Y.L., Bao Y.M., et al. Isoflavonoids from Astragalus mongholicus protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate, J Ethnopharmacol, 98, 89-94, 2005b.

[20] Li X., He D.L., Zhang L., et al. A novel antioxidant agent, Astragalosides, prevents shock wave-induced renal oxidative injury in rabbits, Urology Res, 34, 277-282, 2006.

[21] El Sebakhy N.A., Asaad A.M., Abdallah R.M., et al. Antimicrobial Isoflavans from Astragalus species, Phytochemistry, 36, 1387-1389, 1994.

[22] Pistelli L., Bertoli A., Lepori E., et al. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from Astragalus verrucosus, Fitoterapia, 73, 336-339, 2002.

[23] Tan B.K.H., Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs, Curr Med Chem., 11, 1423-1430, 2004.

[24] Bisignano G., Iauk L., Kirjavainen S., et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antibacterial activity of Astragalus siculus Biv., Int J Pharmacog, 32, 400-405, 1994.

[25] Calis I., Yuruker A., Tasdemir D., et al. Cycloartane Triterpene Glycosides from the Roots of Astragalus melanophrurius, Planta Med, 63, 183-1186, 1997.

[26] Hou X., Tong Q., Wang W., Xiong W., Shi C., Fang C. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. Life Sciences, 130, 38-46, 2015.

[27] Shen H.M., Shi C.Y., Shen Y., Ong C.N. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1, Free Radic Biol Med., 21(2), 139-146, 1996.

[28] Smith M.T., Thor H., Hartzell P., Orrenius S. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes, Biochemical Pharmacology, 31(1), 19–26, 1982.

[29] Kečkeš S., Gašić U., Veličković T.C., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Z. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. Food Chem., 138, 32–40, 2013.

[30] Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Etem E., Nedzvetsky V.S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. J Pineal Res., 43, 225-31, 2007.

[31] Upchurch G.R.Jr., Welch G.N., Fabian J.A., Freedman J.E., Johnson J.L., Keaney J.F.Jr., et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem., 272,17012-17, 1997.

[32] Vit P., Huq F., Barth O. M., Campo M., Pérez-Pérez E. M.,Tomás-Barberán F. A., Santos E. L. Use of Propolis in Cancer Research, BJMMR, 8(2), 88-109, 2015.