

davalar

Hümik Asidin İnsan Üzerindeki Sitotoksik Etkileri Meme Kanseri Hücreleri †

Asli Aykac 1,* , Eda Becer 2,3, Tuğçe Balcı Okcanoğlu 4, Meryem Güvenir 4, Kaya Süer 5 and Seda Vatansever 3,6

¹ Biyofizik Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa 99010, Kıbrıs; Biyokimya Anabilim Dalı, Eczacılık

² Fakültesi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa 99010, Kıbrıs; eda.becer@neu.edu.tr ³ Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa 99010, Kıbrıs; seda.vatansever@neu.edu.tr

⁴ Sağlık Bilimleri Meslek Yüksekokulu, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa 99010, Kıbrıs;

tbalcii@gmail.com (TBO); meryemguvenir@hotmail.com (MG)

⁵ Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa 99010, Kıbrıs; kayasuer56@gmail.com Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

⁶

* Yazışma: asli.aykac@neu.edu.tr † 2. Uluslararası

Hücre Ölümü Araştırmaları Kongresi'nde sunulmuştur, İzmir, Türkiye, 1–4 Kasım 2018.

Yayın tarihi: 7 Aralık 2018

Özet: Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanserdir ve alternatif tedaviler oluşturmak için farklı in vivo ve in vitro çalışmalarda çeşitli bitki bazlı terapötik ajanlar kullanılmıştır. Hümik asit (HA), apoptozu indükler ve anti-enflamatuar ve anti-proliferatif etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Çalışmamızda, insan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hattında 24 ve 48 saat boyunca 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında HA'nın sitotoksik etkilerini inceledik. MTT yöntemi kullanılarak HA 100 µg/mL'nin insan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hattı üzerinde hem 24 hem de 48 saatte sitotoksik etkiye sahip olduğu; aynı zamanda (24 ve 48 saat) etkili HA dozunun 50 µg/mL olduğunu da bulmuşlardır. Çalışmamızın sonuçları, HA'nın sitotoksik etkisinin değerlendirilerek kanser tedavisinde alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: hümik asit; insan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hattı; MTT

1. Giriş

Son yıllarda bireylerin genel sağlığını korumak, hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla doğal ürünlerin ve şifalı bitkilerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Günümüzde serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif hasarı geciktirebilen veya önleyebilen antioksidan bileşiklere olan ilgi dünya çapında artmaktadır. Hümik asit (HA), humus adı verilen topraktaki organik maddelerin ana içeriğinin en aktif maddesidir. HA moleküllerindeki karboksil, fenol, kinon gibi reaktif gruplar asitlere mineral ve antioksidan özellikler verir [1]. Humus ve humustan elde edilen ürünler tarım ve biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır. HA maddelerinin en bilinen aktiviteleri arasında anti-viral, antiinflamatuar, anti-oksidan, anti-tümör, anti-toksin saymak mümkündür [2-6].

Birçok araştırmacı, HA'nın kanserlere ve kansere neden olan virüslere karşı koruma gücüne sahip olduğunu ileri sürmüştür. Bu, HA'nın kanser profilaksisi ve tedavisi gibi farklı biyolojik aktivitelerin yanı sıra azalmış hücre proliferasyonu ve azalmış anjiyogenez olduğunu düşündürmektedir [7]. DSÖ'nün meme kanserinin kadın prevalansı ve kansere bağlı ölümlerde ön sıralarda yer aldığına dair raporu nedeniyle, meme kanseri tedavisine yönelik araştırmalar halen devam etmektedir.

Bu çalışmada insan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre hattında HA'nın sitotoksik etkisi amaçlandı. MTT tahlili ile hücre canlılığını ölçerek çalışma.

2. Malzemeler ve Yöntemler

2.1. Humik Asitin Saflaştırılması

HA (Sigma-Aldrich Co. Darmstadt, Almanya) 100 mL NaOH solüsyonunda (pH > 10) çözüldü ve daha sonra çözünmeyen fraksiyon süzme ile ayrıldı. Çözelti, HA'yı çöktürmek ve HA'ya bağlanacak çözünür fraksiyonları elde etmek için 100 mL HCl ile pH < 2.0'a asitleştirildi. Oluşan herhangi bir çökelti, 3000 x g'de 30 dakika santrifüjleme ile toplandı ve 100 mL NaOH içerisinde yeniden çözüldü.

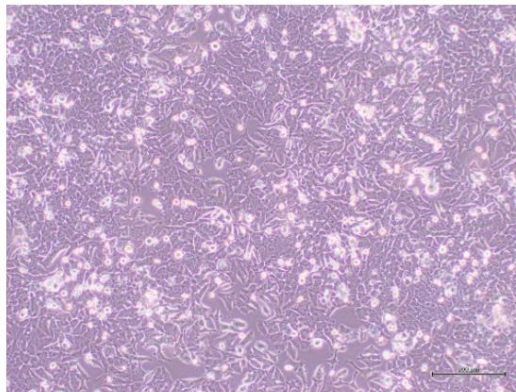
En saf HA'yı elde etmek için, alkali asit işlemi Schnitzers [8] tarafından tarif edildiği gibi üç kez tekrarlandı. Bundan sonra, saflaştırılmış HA, bir toz formuna dondurularak kurutuldu ve daha sonra deneylerden önce PBS (pH = 7.4) içinde çözülen kurutulmuş bir toz olarak saklandı [9]. Son olarak 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL filtrelerde stok çözeltiler hazırlandı.

2.2. Hücre Dizisi ve Hücre Kültürü

İnsan meme adenokarsinomu MCF-7 hücre dizisi (ATCC: HTB-22), %10 fetal sığır serumu (Capricorn Scientific, FBS-11B, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren RPMI-1640 ortamında (Biochrom, FG1215, Berlin, Almanya) kültürde muhafaza edildi, %1 L-glutamin (EMD Millipore, K0282, Darmstadt, Almanya) ve 100 ünite/mL % penisilin ve 100 ünite/mL streptomisin (Biochrom, A2213). Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'de nemlendirilmiş atmosferde kültürlendi ve ortam 2 günde bir değiştirildi. Hücreler %80 birleştiğinde, rutin olarak %0.25 tripsin-EDTA solüsyonu (Biochrom, L2143) kullanılarak alt kültürlendiler. Yeterli sayıda hücre üretildikten sonra, hücrelerin bir kısmı hücre dondurma ortamı ile -80 °C'de saklandı. Hücrelerin proliferasyonu, geçişleri ve takibi ters mikroskop kullanılarak düzenli olarak izlendi. Hücreler birleştiğinde, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak şişelerden çıkarıldı ve 96 gözlü tabaklara aktarıldı. MTT testi için beş farklı konsantrasyonda (5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL) kültür ortamında seyreltilmiş HA. Hücre süspansiyonları ilk olarak 96 oyuklu kültür tabaklarının her bir oyuğu için 3000 hücre yoğunluklarında hazırlandı ve her asit konsantrasyonu için üç kopya halinde kaplandı. Pozitif kontrol olarak HA içermeyen besiyeri (100 µL), negatif kontrol olarak sadece hücre ve HA içermeyen besiyeri kullanıldı. MCF-7 hücreleri, daha önce belirtilen konsantrasyonlarla 24 ve 48 saat süreyle işlendi. Hücreler 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. Bundan sonra, her bir oyuğa 100 µL DMSO ilave edildi ve absorbans, UV-görünür bir spektrofotometre çoklu plaka okuyucusunda (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, CA, ABD) hemen 540 nm'de belirlendi.

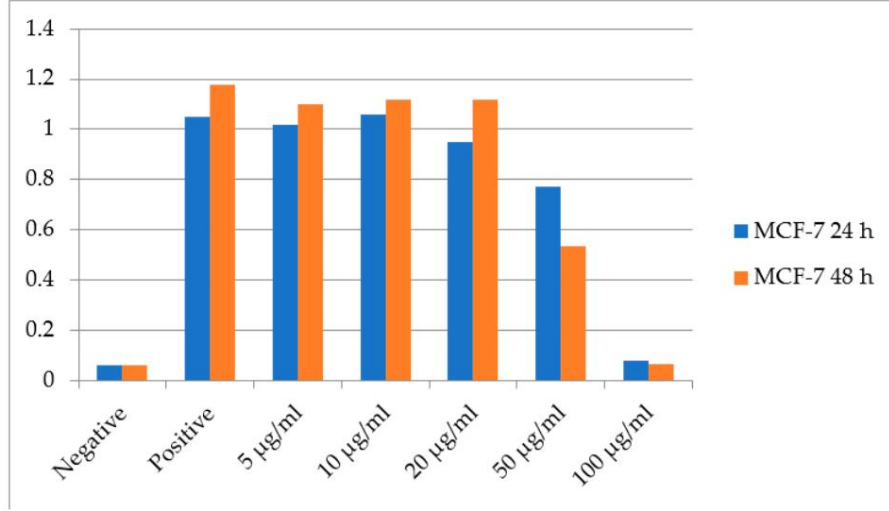
3. Sonuçlar ve tartışma

Standart kültür ortamında hücreler Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Ters bir mikroskop altında görüntülenen MCF-7 hücreleri, ölçek çubukları = 200 µm.

İnsan meme adenokarsinomu MCF-7 hücreleri, 24 ve 48 saat boyunca 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında HA ile muamele edildi. Hücre canlılığı, daha önce tarif edildiği gibi MTT tahlili ile belirlendi. Sonuçlarımız, 100 µg/mL dozunda hazırlanan HA'nın 24 ve 48. saatte sitotoksik etkiye sahip olduğunu ($p < 0.005$) gösterirken, 50 µg/mL HA'nın 24 ve 48. saatte MCF-7 hücre hatları üzerinde en etkili doz olduğu belirlendi. 48 saat (Şekil 2).



Şekil 2. 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda hümitik asitin insan meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerindeki etkilerini gösteren MTT testinin sonuçları.

HA'nın potansiyel bir karsinogenez nedeni olduğu bilinen oksidatif hasara neden olması nedeniyle, HA'nın kanserin etiyolojik bir faktörü olduğu öne sürülmüştür [10]. HA'nın kanserin etiyolojik bir faktörü olduğu öne sürülmüştür ve HA'nın neden olduğu oksidatif hasar karsinogenezin potansiyel bir nedensel mekanizmasıdır [10]. HA, insan meme adenokarsinomu hücreleri üzerindeki belirsizliğini koruyor ve bugüne kadar HA'nın göğüs kanseri üzerindeki etkisini in vitro veya in vivo çalışmalarda doğrudan inceleyen yayınlanmış bir rapor yok. HA'nın insan meme adenokarsinomu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ilk olarak bu çalışmada araştırıldı. Bir çalışmada HA'nın HeLa ve SiHa hücrelerinde 100-1000 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda kullanıldığını bildirmişler ve 500 µg/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda 48 saatte sitotoksik etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada yazarlar, 500 µg/mL ve 300 µg/mL HA'nın insan rahim ağzı kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkiyi artırdığını bildirmişlerdir [10]. Sonuçlarımız, 100 µg/mL dilüsyonda hazırlanan HA'nın MCF-7 hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik inkübasyonda sitotoksik etkiye sahip olduğunu destekledi. Ayrıca 50 µg/mL HA ile 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde etkili doz olarak bulunduk.

4. Sonuçlar

Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Doğal maddelerin alımının kanser riskini azaltabilme olasılığı, nihai kemo-önleyici veya kemo terapötik ajan olarak dikkat çekmiştir. Özellikle kanser hücrelerinin tedavisinde kullanılan bileşenlerin etkin dozu çok önemlidir. Çünkü kanser tedavisi politikasında sitotoksik doz yerine hasta tedavisi uygulanmadan önce etkili doz belirlenmelidir.

Teşekkür: Çalışmamız Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Yakın Doğu Üniversitesi, Kıbrıs tarafından desteklenmiştir [Hibe numarası SAG-2016-2-018].

Referanslar

1. Ay, F. Hümik asit ve hümik asit kaynaklarının jeolojik ve ekonomik önemi. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fak. Fen Bilim. Derg. 2015, 36, 28-51.
2. Klöcking, R.; Helbig, B. Hümik Maddelerin Tıbbi ve Uygulamaları, 1. baskı; Steinbüchel, A., Marchessault, RH, Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, Almanya, 2005; sayfa 3-16.
3. Efimova, I.; Khil'ko, S.; Smirnova, O. Radikal zincir oksidasyon süreçlerinde hümik asitlerin antioksidan aktivitesi. Rus. J. Uygulama kimya 2012, 85, 1351-1354.
4. Kodama, H.; Denso. Humus ekstraktının murin transplante edilebilir L1210 lösemi üzerindeki antitümör etkisi. Vet. Med. bilim 2007, 69, 1069-1071.
5. Joone, GK; van Rensburg, CEJ Potasyum humatın anti-inflamatuar özelliklerinin in vitro araştırılması. Enflamasyon 2004, 28, 169-174.
6. Krzemiński, TF; Nożyński, JK; Grzyb, J.; Porc, M. İn vivo deneysel miyokard enfarktüsünden sonra sıçan kalplerinde TNF- α Tolpa Turba Hazırlama tedavisinden sonra anjiyogenez ve kalp koruma. damar. Eczane. 2005, 43, 164-170.
7. Dizman, M.; Tutar, A.; Kahraman, M.R.; Turan, M.; Horuz, A. Hümik maddelerin ilaç olarak kullanılması ve insan sağlığına etkileri. SAÜ Fen Edebiyat Derg. 2012, 1.
8. Schnitzers, MT Organik madde karakterizasyonu. Toprak Analiz Yöntemlerinde . Bölüm 2. Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikler, Sayfa, AL, Ed.; Academic Press: New York, NY, ABD, 1982; s. 581-594.
9. Ting, HC; Cheng-Chieh Yenb, CC; Çend, WK; Wen-Huei Değişimi, WH; Choua, MC; Fung-Jou Lua, FJ Hümik asit, arsenik trioksitin insan rahim ağzı kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini artırır. çevre. Toksikol. Eczane. 2010, 29, 117-125.
10. Hseu, YC; Chen, SC; Chen, YL; Chen, JY; Lee, ML; Lu, FJ; Wu, FY; Lai, JS; Yang, HL Hümik asit, kuyruklu yıldız ve kardeş kromatid değişim testi kullanılarak insan periferik kan lenfositlerinde genotoksisiteye neden oldu. J. Hazard. Anne. 2008, 153, 784-791.



© 2018 yazarlar tarafından. Lisans Sahibi MDPI, Basel, İsviçre. Bu makale, Creative Commons Atfının hüküm ve koşulları altında dağıtılan açık erişimli bir makedir.

(CC BY) lisansı (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).