



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

Kekik (Thymus Vulgaris) Bitkisinin İnsan Promiyelositik Lösemi Hücre Hattında (HL-60) Antiproliferatif Etkilerinin Araştır

Yazarlar : Öğretim Görevlisi Ebru TEMİZ - Yrd.Doç.Dr Khandakar A.S.M. SAADAT - Araştırma Görevlisi Hasan DAĞLI - Prof. Mehmet YILMAZ

Kurum : Tıp Fakültesi-Temel Tıp Bilimleri

GİRİŞ - AMAÇ

Doğa, terapötik bileşiklerle dolu sınırsız bir kaynaktır ve sentetik ilaçlarla kıyaslandığında, doğal bileşikler daha az yan etkiye sahiptir. Anadolu'da birçok kullanım şekli olan Dağ Kekliği bu bileşiklerden biri olup, HL-60 hücre hattında antineoplastik aktivitesi üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Kekik ekstresinin HL-60 hücre hattında apoptotik ve otofajik hücre ölüm yolları ile etkileşimi çalışılarak, antiproliferatif etkileri değerlendirildi.

METOD

Bitkinin gövde ve yaprakları Soxhlet ekstraksiyon metodu kullanılarak, polar çözücü (su) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstre, farklı konsantrasyonlarda (25-150 mikrogram/ml) HL-60 hücre hattında 24 saat inkübe edildi ve ileri moleküler testler yardımıyla antiproliferatif etkileri değerlendirildi. Bu kapsamda, çalışmamızda yapılan testler: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ve Nitrik oksit(NO); prolidaz aktivitesi; Annexin-V; ve qPCR'da apoptoz ve otofaji ile ilişkili genler (Bcl-2, Caspase 3,8,9, ve 12, NF-kB, p27, p53, PTEN, Beclin-1, LC3, ve GAPDH)'in ifade seviyeleri çalışıldı.

BULGULAR

MTT verilerinde yapılan IC50 analizine göre, 24 saatlik kekik ekstresi inkübasyonu (100 µg/ml) HL-60 hücre canlılığını %73 oranında azaltırken, NO düzeyinde % 5,8 oranında bir azalmaya neden oldu. Söz konusu hücre canlılığındaki farklılığın terapötik anlamlılığı, İdarubisin grubu ile kıyaslanarak test edildi, ve kekik ekstresinin, terapötik dozda (0.04 µM) İdarubicin (Neoplastik ajan)'e göre hücre canlılığını %46 oranında daha fazla azalttığı görüldü. Buna ek olarak, Prolidaz aktivitesinde kaydedilen dramatik azalma da apoptozis yolağında artan aktiviteyi göstermektedir. Annexin-V sonuçlarına göre, kekik ekstresi % 64,07 oranında HL-60 hücrelerini apoptoza götürürken, idarubicin %31,59 oranında HL-60 hücrelerinde apoptozu tetikledi. Kekik ekstresinin antiproliferatif etki yolağını aydınlatmak için yapılan qPCR çalışmalarında apoptoz, ve otofaji ile ilişkili genler hedeflendi. Kekik intrensek apoptoz yolağında rol olan genlerin ifade seviyelerinde (Bcl, Caspase12, Caspase9 ve Caspase3) anlamlı artışlara neden olurken, ekstrensek yolak kaspazlarından Caspase8'in ifadesini anlamlı olarak azalttı. Ayrıca, tümör baskılayıcı faktör PTEN'in ifade seviyesinde üç kat artış gözlemlendi. Apoptoz'a ek olarak, otofaji belirteçleri ve düzenleyicilerinden, LC3 ve Beclin1'in gen ifade seviyeleri çalışıldı, ve yapılan kat değişimi analizlerinde, bu genlerde anlamlı artışlar gözlemlendi.



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

SONUC

Hücre canlılığı testi sonucuna göre, etkin doz Kekik ekstratı'nın (100 µg/ml) HL-60 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve hücre sayısını %73 azalttığı görüldü. Söz konusu sitotoksitenin etki yolağını aydınlatmak için yürütülen ileri moleküler testlerde; Kekik ekstraktının apoptoz intrensek yolağı modülatörlerinden Caspase3, Caspase9, Caspase12 ve Bcl, ve bilinen apoptoz belirteçlerinden PTEN'in ifade seviyelerinde anlamlı artışlara yol açtığı kaydedildi. Artmış intrensek gen ifadelerinin ve PTEN'in işaret ettiği apoptoz aktivasyonunu doğrulamak için apoptoz ve nekroz belirteçleri, Annexin- V ve 7-Add çalışıldı. Sonuç olarak, kekik ekstraktı bütün HL-60 hücrelerinden % 64,07'inde apoptoz'u tetikledi (idarubicin %31,59). Apoptoza ek olarak, Kekik flavonoidleriyle uyarılan antiproliferatif hücre ölüm yollarından bir diğeri de otofaji'dir. Otofaji belirteci ve otofagozom düzenleyicisi olan LC3 ve Beclin1 ifadelerinde gözlenen aşırı artışlar, kekik ekstratı'nın hücrelerde her iki tip ölüm yolağını (Tip-I, II) aktive ettiğini göstermektedir. Ancak, Tip-II hücre ölüm yolağındaki aktivasyonun hücre sağ kalımı üzerine etkisinin ileri moleküler ve görüntüleme çalışmaları ile doğrulanması gerekmektedir. Sonuç olarak, kekik, doğadaki önemli flavonoid depolarından biri olup Anadolu'da oldukça fazla tüketim alanına sahiptir. Flavonoidlerin oldukça güçlü antitümöral etkiye sahip olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmada, flavonoid içeren kekik bitkisinin ekstraktı ilk kez HL-60 hücre hattına uygulanmış ve bilinen apoptoz belirteçleriyle test edildiğinde, kekiğin apoptoz'u tetiklediği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELE

Kekik, HL-60, Kanser, Apoptoz, Otofaji.