


Urfa fıstığından (*Pistacia Vera L.*) elde edilen çeşitli ekstraktların antikanser özelliklerinin incelenmesi

Examination of anticancer properties of the various extracts of obtained from Urfa pistachio (*Pistacia Vera L.*)

İsmail KOYUNCU¹ 

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Öz.

Amaç: Urfa Fıstığı (*Pistacia vera L.*) son yıllarda yapılan çalışmalarda; zengin fenolik bileşikler kaynağı olup, antioksidan potansiyeli en yüksek gıda ürünleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, antosiyanin, isoflavonlar, gallik asit, kateşin ve epikateşin gibi antikanser potansiyeline sahip yüksek antioksidan etki gösteren bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, çeşitli bitki kısımları kullanılarak ekstrakte edilen *Pistacia vera L.*'nin antikanser potansiyelinin incelenmesidir.

Materyal ve Metod: P.vera L'nin meyve sapı, kırmızı dış kabuk örtüsü ve reçinesinden elde edilen metanol ekstraktlarının insan prostat (PC3, DU-145), meme (MDA-MB-231, MCF-7) kanser hücreleri ve normal hücreler (PNT1-A ve CRL-4010) üzerinde sitotoksik etkisi MTT metodu ile incelendi.

Bulgular: Çalışma sonucunda tüm bitki ekstraktlarının düşük dozlarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken normal hücreler üzerinde ise yüksek dozlarda etkili olduğu tespit edildi. En güçlü sitotoksik etkiyi ise reçine kısmının prostat kanseri (PC3) üzerinde gösterdiği (IC50: 6,092 µg/ml) belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma kanser tedavisinde kullanılabilecek aktif bileşiklerin tespiti için yeni bir kaynak oluşturup, sonraki yapılacak çalışmalar için teşvik edici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Urfa fıstığı, *Pistacia vera*, Antikanser

Abstract

Background: Studying for years, Urfa pistachio (*Pistacia vera L.*) has rich phenolic compounds and is classified among the highest antioxidant food products. Anthocyanins in its structure contain highly antioxidant compounds such as isoflavones, gallic acid, catechin and epicatechin, with anticancer potency. The purpose of this study is to examine the anticancer potential of the extracts of the various parts of *Pistacia vera L.*

Material and Methods: The cytotoxic effects of methanol extracts obtaining from fruit stem, red outer shell cover and resin of P.vera on the human prostate (PC3, DU-145), breast cancer (MDA-MB-231, MCF-7) and normal cells (PNT1-A and CRL-4010) were examined by MTT method.

Results: All plant extracts showed cytotoxic effects on cancer cells at allow dose; on the other hand, hardly have indicated the high dose of *Pistacia vera L.* a cytotoxic effect on the normal cells. The resin fraction was the part that was recorded as showing the strongest cytotoxicity on prostate cancer (PC3).

Conclusion: This work will create a new resource for the detection of active compounds that can be used in cancer treatment and will be an incentive for future work.

Keywords: Urfa pistachio, *Pistacia vera*, Anticancer

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. İsmail KOYUNCU

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Bölümü Anabilim
Dalı, Osmanbey Kampüsü 63300
Haliliye, Şanlıurfa

Tel: +90 (0414) 344 44 44,

Fax : +90 (414) 318 3209

E-mail: ismailkoyuncu1@gmail.com

Geliş tarihi / Received: 15/07/2018

Kabul tarihi / Accepted: 24/07/2018

Giriş

Son yıllarda konvansiyonel kanser terapilerine destek olarak bitkisel kökenli maddeler kullanılmaktadır. Gücünü bitkilerden alan bu alternatif tedavilerin uygulanması sonucunda kanser türlerinde tedavi başarı oranının artması, bilim dünyasını kanserin yaşama olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için doğal kaynaklara yönelmiştir. Bu doğal kaynakların büyük çoğunluğunu ise biyolojik yönden aktif bileşikler içeren bitkiler oluşturmaktadır (1-3). Bu nedenle kanser hücrelerinin üremesini durduran uygun bitkisel kaynakların değerlendirilebilmesine yönelik etkin stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu yollardan biri ise bitki ekstralarının hızlı kimyasal ve biyolojik taramalarının bir arada yapılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda yapmış olduğumuz literatür taraması sonucunda, *P. vera L.*'nin, zengin bir fenolik bileşikler kaynağı olduğundan dolayı benzersiz fonksiyonel gıda olarak kabul edilip, son zamanlarda antioksidan potansiyeli en yüksek ilk elli gıda ürünü arasında yer aldığı tespit edilmiştir (4,5).

P. vera L.'nin dahil olduğu *Pistacia* cinsinin bazı türleri (*P.lentiscus*, *P. terebinthus*, *P.atlantica* ve *P. Khinjuk*) halk arasında diş, gastrointestinal, karaciğer, idrar yolu ve solunum yolu bozuklukları, afrodisyak, antiseptik antihipertansif gibi çeşitli amaçlar için tonik gibi yöntemlerle kullanılmaktadır (6,7). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *Pistacia* türlerinin (*P.lentiscus*, *P. terebinthus*, *P.vera*) yaprak, meyve, sakız ve reçinelerinden elde edilen esansiyel yağların ve lipofilik ekstraların içerdikleri terpenler ve fenolik bileşikler sayesinde antioksidan, antitümör, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, insektisidal, antinositif gibi etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (1,2,6,8-13).

P.vera L.; *pistacia* türleri arasında gıda ürünü olarak kullanılan ve tarımı yapılan tek türdür. Bundan dolayı *P.vera L.* ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğunu gıda içerik analizleri, deneysel klinik çalışmalar ve son zamanlarda da kimyasal ortamda antioksidan analizler oluşturmaktadır. Bu çalışmada ise ilk kez endüstriyel üretim sırasında atık olarak atılan fakat yüksek fenolik içeriğinden dolayı (2,3), kanser tedavisinde alternatif tedavi potansiyeline sahip olduğunu düşündüğümüz, urfa fıstığı (*P. vera L.*) bitkisinin reçine, meyve sapı ve kırmızı dış kabuk örtüsünden elde edilen metanol ekstralarının; meme ve prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırarak kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyeli incelendi.

Materyal ve Metod

Bitki ekstralarının hazırlanması: Çalışmada kullanılan Urfa fıstığı (*P.vera L.*) bitkisinin meyve sapı ve kırmızı kabuk örtüsü kısımları Temmuz –Ağustos döneminde toplandıktan sonra kurutuldu. Bitki gövdesinden reçine kısmı ise toplandıktan sonra herhangi bir işleme tabi tutulmadan ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Kuruyan bitki örnekleri toz haline getirildikten sonra, 250 g alınarak 1:1

oranda hazırlanan metanol: su, reçine ise metanol içerisinde 40 °C'de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra, küçük porsiyonlar haline getirilip 15 dk ultrasonikatör ile iyice homojenize edildikten sonra, whatman filtre ile süzülüp, 40 °C sıcaklığı geçmeyecek şekilde Rotary Evaporatörler (Döner Buharlaştırıcı) yardımıyla alkol solventleri uçurulup, liyofilizatörde toz haline getirilip ham MeOH (metanol) ekstraları elde edildi.

Hücreler ve Kültür Koşulları: Çalışmada ATCC'den temin edilip stokladığımız; İnsan prostat (PC3, DU-145), meme (MDA-MB 231, MCF-7) kanser hücreleri ile normal insan prostat (PNT-1A) ve meme (CRL-4010) hücreleri kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM:F12 ve RPMI-1640 besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80 °C'lik derin dondurucuda kısa süreli veya uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

MTT metodu ile bitki ekstralarının sitotoksik etkinliğinin saptanması: MTT metodu kullanılarak bitki ekstralarının sitotoksik etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flaklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve her bir ekstre için 5-1000 µg/ml olacak şekilde uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. Bitki ekstraları her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 48 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 20 µl serumuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılıp, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. Hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hücre-siz kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alındı ve formüle uygulanarak yüzde canlılık hesaplandı. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden kültürün %50'sini öldüren eden doz (IC₅₀) hesaplandı.

İstatistik: Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Tanımlayıcı istatistikler, gruplar arasındaki

ortalama, standart sapma, varyasyon ve istatistiksel önem düzeyini analiz etmek için kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar Tek Yönlü ANOVA kullanılarak test edildi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

MTT metodu kullanılarak yapılan analiz sonucunda; kullanılan bitki ekstralarının kanser ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri Tablo-1'de verilmiştir.

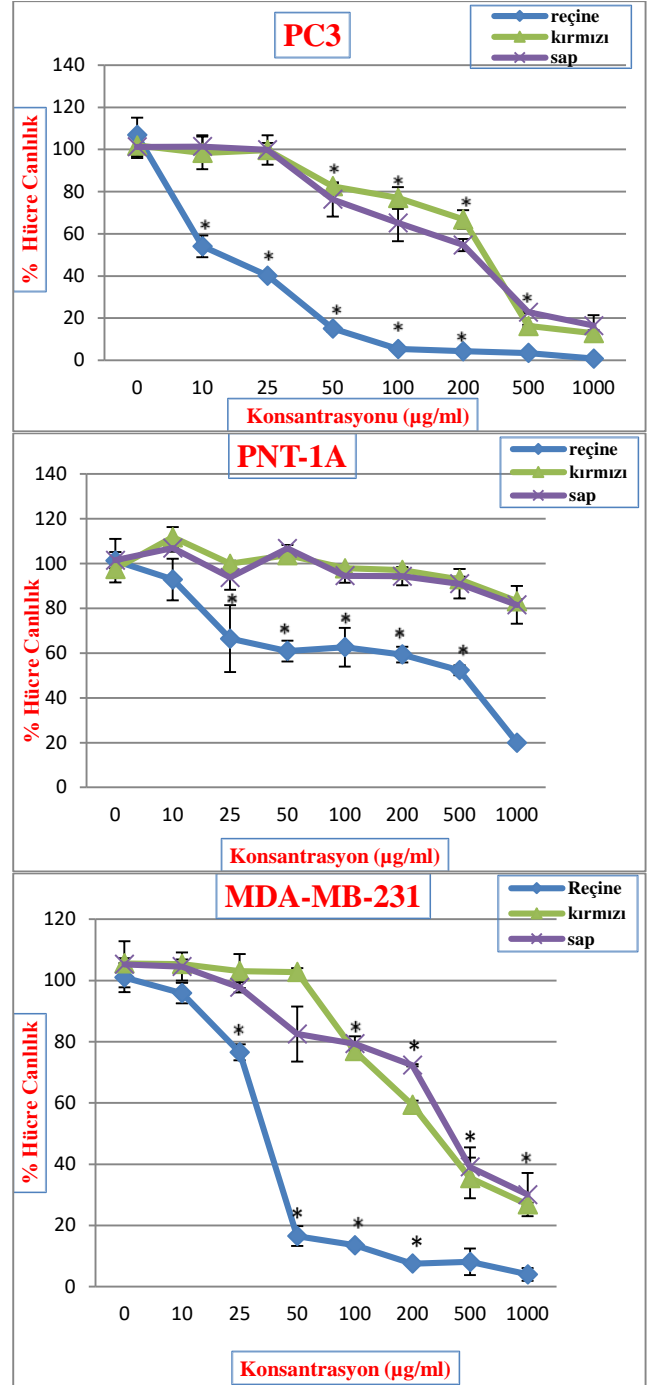
Tablo 1. *P.vera L.*'dan elde edilen bitki ekstralarının IC₅₀ değerleri

Hücre Serisi	Reçine	Kırmızı Kabuk	Sap
PC3	6,092	210,39	188,67
DU-145	55,44	320,2	230,3
MDA-MB-231	40,968	330,08	393,82
MCF-7	80,33	378,33	197,3
PNT-1A	235,2	500,2	345,3
CRL-4010	145,3	287,3	450,3

Çalışma sonucunda; kullanılan bitki ekstralarının doza artışına bağlı olarak, kanser hücreleri üzerinde farklı oranlarda sitotoksik etki gösterdiği ve bitki ekstraları arasında reçinenin daha güçlü bir etkiye (IC₅₀: 6,092 µg/ml) sahip olduğu tespit edildi. IC₅₀ değerleri dikkate alındığında; sitotoksik etki açısından urfa fıstığı (*P.vera L.*) reçinesinin diğer ekstralara göre çok düşük dozlarda etki gösterdiği, dolayısıyla antikanser potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca reçine ve diğer bitki ekstralarının normal hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerlerinin kanser hücrelerine göre çok yüksek olması da bu bitki ekstralarının kanser tedavisinde kullanılabilir potansiyel bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

Tartışma

Günümüzde bitkisel ekstralar farklı kullanım amacı için dünya çapında pek çok laboratuvarında araştırılmaktadır. En önemli araştırma alanlarını antioksidan etki ve kanser tedavisinde kullanılabilirlik oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Pistacia* türlerinin fenolik ve flavonoid bileşenlerinden dolayı, antimutajenik, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antikanser ve antioksidan potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir (7,14). *Pistacia* türleri arasında en çok *P. lentiscus* 'un antikanser özelliği araştırılmış ve bu türün sakızından elde edilen ekstraların çeşitli kanser türlerini apoptozise yönlendirerek güçlü bir sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (15-17).



(% Ortalama \pm SD). İstatistiksel anlamlılık kontrol grubuna kıyasla tek yönlü olarak değerlendirildi * ($p < 0,05$).

Şekil 1. Urfa fıstığı (*P.vera L.*) bitkisinin farklı ekstralarının sitotoksik etkinliğinin MTT yöntemiyle incelenmesi.

Yapılan bazı çalışmalarda *P. lentiscus*'un sakızından elde edilen ekstranın in vitro ortamda insan kolorektal tümör hücrelerini apoptozise yönlendirdiği ve proliferasyonunu engellediği (15), farelerde geliştirilen kolorektal tümörlerin büyümesinin geciktirilmesi ile antitümör etki gösterdiği (16), reçinesinin promiyelositik lösemiye karşı sitotoksik etki gösterdiği (18), prostat kanseri hücre çoğalmasını inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ettiği (17) ve

bazı ekstrelerinin antikanser özelliği olduğu tespit edilmiştir. Son zamanlarda ise *P. atlantica* türünün meyvelerinden elde edilen ekstrenin, insan kolon karsinoma hücrelerinde doxorubisine benzer bir büyüme inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir (19).

P. vera L.; *pistacia* türleri arasında gıda ürünü olarak kullanılan ve tarımı yapılan tek türdür. Bundan dolayı *P. vera* L. ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğunu gıda içerik analizleri, deneysel klinik çalışmalar ve son zamanlarda da kimyasal ortamda antioksidan analizler oluşturmaktadır. Antikanser aktivitesi ilgili ise çok az çalışmanın yapıldığı ve bu çalışmalarda *P. vera* L. reçinesinin meme kanseri, hepatoselüler karsinom, rahim ağzı kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (20).

Bu çalışma ile ilk defa bölge ekonomisi için oldukça önemli bir değere sahip olan ve yüksek miktarda üretimi yapılan urfa fıstık bitkisinin endüstriyel üretim sırasında atık ürün olarak atılan çeşitli kısımlarının (meyve sapı, kırmızı kabuk ve reçine) antikanser, özelliklerinin incelenmesi ile fitoterapide kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışma sonucunda *P. vera*'dan elde edilen bitki ekstrelerinin, kanser hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki (IC50:6,092-393,82 µg/ml) gösterirken, normal hücreler üzerinde düşük seviyede sitotoksik etki (IC50:145,3-500,2µg/ml) gösterdiği gözlemlendi. Çalışmada kaba metanol bitki ekstreleri kullanıldığından dolayı IC50 değerlerinin yüksek olduğunu düşünüyoruz. Çünkü kaba ekstrenin çok fazla sayıda çeşitli bileşik içerdiği ve bu bileşikler içerisinde sitotoksik etki gösteren bileşiğin oranından dolayı sitotoksik etkinliğinde az olduğunu düşünmekteyiz. Şayet bu kaba metanol ekstrelerin farklı solventler (hekzan, diklorometan ve bütanol) kullanılarak fraksiyonları kullanılırsa, sitotoksik etki gösteren bileşikler daha konsantrale hale geleceğinden, gösterecekleri sitotoksik etkinin artacağını tahmin ediyoruz. Bu çalışmada elde edilen veriler neticesinde başta kanser olmak üzere oksidatif stres sonucu meydana gelen hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni aktif bileşiklerin tespiti için yeni bir kaynak oluşturup, sonrasında yeni çalışmaların yapılması için teşvik edici olacaktır. Ayrıca bölge ekonomisi için önemli bir etkiye sahip olan Urfa fıstığının fitoterapideki kullanılabilirliğinin artmasına ve buna bağlı olarak ekonomik değerinin artmasını sağlayarak ülke ekonomisine önemli bir destek sağlayacaktır.

Bu çalışma Harran Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimi (HUBAK-15057) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70(3):461-77.
2. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. Extract. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(3):25-34.

3. Koyuncu I, Gönel A, Akdağ A, Yılmaz MA. Identification of phenolic compounds, antioxidant activity and anti-cancer effects of the extract obtained from the shoots of *Ornithogalum narbonense* L. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(1):75-83.
4. Gentile C, Tesoriere L, Butera D, Fazzari M, Monastero M, Allegra M, Livrea MA. Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *J Agric Food Chem*. 2007;55(3):643-8.
5. Tomaino A, Martorana M, Arcoraci T, Monteleone D, Giovinazzo C, Saija A. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*. 2010;92(9):1115-22.
6. Alma MH, Nitz S, Kollmannsberger H, Digrak M, Efe FT, Yılmaz N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *J Agric Food Chem*. 2004;52(12):3911-4.
7. Bozorgi M, Memariani Z, Mobli M, Salehi Surmaghi MH, Shams-Ardekani MR, Rahimi R. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Scientific-WorldJournal*. 2013;2013:219815.
8. Giner-Larza EM, Máñez S, Giner RM, Recio MC, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebinthus* galls. *Planta Med*. 2002;68(4):311-5.
9. Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner RM, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Oleonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol*. 2001;428(1):137-43.
10. Duru ME, Cakir A, Kordali S, Zengin H, Harmandar M, Izumi S, Hirata T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*. 2003;74(1-2):170-6.
11. Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *J Agric Food Chem*. 2005 ;53(20):7681-5.
12. Özçelik B, Aslan M, Orhan I, Karaoglu T. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiol Res*. 2005;160(2):159-64.
13. Orhan I, Küpeli E, Aslan M, Kartal M, Yesilada E. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. *J Ethnopharmacol*. 2006;105(1-2):235-40.
14. Koyuncu I, Kocyigit A, Gönel A, Arslan E, Durgun M. The Protective Effect of Naringenin-Oxime on Cisplatin-Induced Toxicity in Rats. *Biochem Res Int*. 2017;2017:9478958.
15. Sakagami H, Kishino K, Kobayashi M, Hashimoto K, Iida S, Shimetani A, et al. Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic. *In Vivo*. 2009;23(2):215-23.
16. Dimas K, Hatziantoniou S, Wyche JH, Pantazis P. A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. *In Vivo*. 2009;23(1):63-8.
17. Giaginis C, Theocharis S. Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. *Nutr Cancer*. 2011;63(8):1174-84.
18. Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, et al. 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*. 2007;14(4):263-72.
19. Rezaei PF, Fouladdel S, Hassani S, Yousefbeyk F, Ghaffari SM, Amin G, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(3-4):1054-9.
20. Almhedar H, Abdallah HM, Osman AM, Abdel-Sattar EA. In vitro cytotoxic screening of selected Saudi medicinal plants. *J Nat Med*. 2012;66(2):406-12.