

Kitosan Katkılı Kızılçam (*Pinus brutia* Ten, Pinaceae) Kozalağı Ekstraktlarının Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Anti-Cancer Effects of Kitosan Added Red Pine (*Pinus
brutia* Ten, Pinaceae) Cone Extracts



ANTALYA
İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜĞÜ

Serap ÖZKAYA^{1*}

Beyzanur BALKİS¹

Dide Irmak ÖZÇELİK²

Cansu OLGUNER²

Ramazan ULUDAĞ³

Esra AYDEMİR¹

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

¹Akdeniz University, Faculty of Science, Department of Biology, Antalya, Türkiye

²Antalya Bahçeşehir Koleji, Fen ve Teknoloji Lisesi, Antalya, Türkiye

²Antalya Bahcesehir College, Science and Technology High School, Antalya, Türkiye

³Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretme ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, Türkiye

³Mediterranean Fisheries Research, Production and Training Institute, Antalya, Türkiye

*ozkaya_serap@hotmail.com
ORCID: 0000-0002-7071-4805

beyzanur.balkis@hotmail.com
ORCID: 0000-0003-3086-6836

dideirmak@hotmail.com
ORCID: 0000-0002-5468-081X

cbmoryell@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7744-9015

ramazanuludagvet@yahoo.com
ORCID: 0000-0002-4588-4597

esra@akdeniz.edu.tr
ORCID: 0000-0002-5206-7333

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFORMATION

Geliş Tarihi / Date Received

29.11.2021

Kabul Tarihi / Date Accepted

30.12.2022

Yayın Tarihi / Date Published

Aralık / October 2022

Yayın Sezonu / Pub Date Season

Aralık - Haziran / October - June

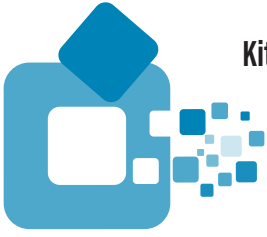
ATIF / CITE as

Özkaya, S., Balkis, B., Özçelik, D. I., Olguner, C., Uludağ, R., Aydemir, E. (2022). "Kitosan Katkılı Çam Kozalağı Ekstraktlarının Antikanser Etkilerinin Araştırılması" / "Investigation Of The Anti-Cancer Effects Of Kitosan Added Pine Cone Extracts". Bilar: Bilim Armonisi Dergisi, 5 (2): 58-65. doi: 10.37215/bilar.1030055

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/bilar>

Copyright © Published by Antalya İl Millî Eğitim Müdürlüğü Since 2018, Antalya, 07100 Turkey. All rights reserved.





Kitosan Katkılı Kızılcam (*Pinus brutia* Ten, Pinaceae) Kozalağı Ekstraktlarının Antikanser Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Anti-Cancer Effects of Kitosan Added Red Pine (*Pinus
brutia* Ten, Pinaceae) Cone Extracts



ANTALYA
İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜĞÜ

ÖZET

Kanser, genomdaki birçok mutasyonun birikimi ile ortaya çıkan sistemik bir hastalıktır. Kanser hastalarında uygulanan birçok farklı tedavi yöntemi bulunmaktadır. Tedavi süreci içerisinde zamanla artan toksisite ve ilaç direnci ortaya çıkmakta ve tedavi başarısını sınırlandırmaktadır. Kanser tedavisindeki bu sınırlandırmaları aşmak için bitkisel ürünler ve sentetik türevleri tercih edilebilmektedir. Bu noktada, geleneksel tıpta günümüze kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılan Kore çamı (*Pinus koraiensis*) ve uzun zincirli polimer türevi olan kitinin yaklaşık olarak yarısının deasetile edilmesiyle oluşturulan kitosan göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada kızılçam (*Pinus brutia* Ten) kozalağı ekstraktının MCF-7, VERO ve HeLa hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonundaki etkileri incelenmiştir. Ekstraktlar hücrelere 400, 200, 100, 50 ve 25 µg/mL dozlarında uygulanarak maruziyet süreleri sonunda WST-1 sitotoksosite testi analiz edilmiştir. Deney sonuçlarında kitosan katkılı yeşil kozalak ekstraktı 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerde sitotoksik etki yaratmazken, ekstrakt için 48 saat sonunda IC₅₀ değeri 252.3 µg/mL olarak hesaplanmıştır. 72 saat sonrasında ekstrakt için hesaplanan IC₅₀ değeri 195.5 µg/mL 'dir. Kitosan ilaveli yeşil çam kozalağı ekstraktının HeLa hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 200.5 µg/mL, 221.9 µg/mL ve 352.3 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Kitosan ilaveli siyah çam kozalağı ekstraktında HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda IC₅₀ değerleri sırasıyla 262.6 µg/mL ve 161.9 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: MCF-7, HeLa, Sitotoksosite, Kitosan, Çam Kozalağı Ekstraktı

ABSTRACT

Cancer is a systemic disease that occurs with the accumulation of many mutations in the genome. There are many different treatment methods applied to cancer patients. During the treatment process, increasing toxicity and drug resistance occur over time and limit the success of the treatment. In order to overcome these limitations in cancer treatment, herbal products and synthetic derivatives can be preferred. At this point, chitosan, which is formed by deacetylating approximately half of the Korean pine (*Pinus koraiensis*) and long-chain polymer derivative chitin, which has been used in the treatment of many diseases in traditional medicine until today, stands out.

In this study, the effects of red pine (*Pinus brutia* Ten) cone extract on MCF-7, VERO and HeLa cells after 24, 48 and 72 hours of incubation were investigated. The WST-1 cytotoxicity test was analyzed by applying the extracts to the cells at doses of 400, 200, 100, 50 and 25 µg/mL. In the experimental results, while chitosan added green cone extract did not cause cytotoxic effects on cells after 24 hours of incubation, the IC₅₀ value for the extract was calculated as 252.3 µg/mL at the end of 48 hours. The calculated IC₅₀ value for the extract after 72 hours is 195.5 µg/mL. IC₅₀ values of chitosan added green pinecone extract in HeLa cells at 24, 48 and 72 hours incubation times were calculated as 200.5 µg/mL, 221.9 µg/mL and 352.3 µg/ml, respectively. IC₅₀ values in HeLa cells in 24 and 48 hour incubations were calculated as 262.6 µg/mL and 161.9 µg/mL, respectively, in black pinecone extract with chitosan.

Keywords: MCF-7, HeLa, Cytotoxicity, Chitosan, Pinecone Extract

1. GİRİŞ

Kanser, genomdaki birçok mutasyonun birikimi ile ortaya çıkan sistemik bir hastalıktır (Loeb vd. 2003; Blagosklonny 2005). Kanser hastalarında tedavi amacıyla kullanılan klasik yöntemler kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyonlar olarak sınıflandırılır (Akbayrak 1998; Kızılcı 1999; Kvols 2005). Bu tedavi yöntemlerinden kemoterapi, biyolojik ve/veya kimyasal ajanların kullanılması sonucu çoğalmaya eğilimli hücrelerde seçici toksisite göstermektedir (Akyol 2004). Buna rağmen uygulama sonrası zaman içinde yüksek toksisite ve ilaç direnci oluşması sebebiyle tedavilerden elde edilen başarı azalmaktadır.

Kanser tedavisinde görülen bu olumsuzluklar, terapötik doğal ajanların ya da bunların sentetik türevlerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Zhong vd. 2015). Bu noktada, kitosan ve çam kozalağı ekstraktları taşıdıkları antikanser özellikleri ile dikkat çekmektedir. Glikozidik bağlarla bağlanan lineer bir omurgaya sahip olan kitosan, uzun zincirli polimer türevi olan kitinin yaklaşık olarak yarısının deasetile edilmesiyle oluşmaktadır (De la Fuente vd. 2008; Özkan vd. 2019; Wahba 2019). Asetillenmiş monomerlerinin miktarı ve lineer omurgadaki dağılımları, kitosanın pH'a duyarlı bir yapıya sahip olmasına sebep olmaktadır (Csaba vd. 2006; Özkan vd. 2019). Bu duyarlılık, kitosanın sağlıklı hücrelere kıyasla daha düşük pH'ya sahip olan tümör hücreleri üzerinde spesifik etki göstermesini sağlamaktadır. (Zhang vd. 2010; Özkan vd. 2019). Buna ek olarak, kitosanın hücre dışı matrisin önemli bileşeni olan glikozaminoglikana benzer bir yapıya sahip olması, biyoyumluluk seviyesi yüksek biyobozunur bir madde olması, antimikrobiyal ve antifungal aktivite göstermesi, kitosanın kanser tedavisinde alternatif bir aday yapmaktadır (Ullah vd. 2017; Wahba 2019).

Son yıllarda çam kozalaklarından elde edilen ekstraktlar, potansiyel antikanser etkileri ile dikkat çekmektedir. Bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan Kore çamı (*Pinus koraiensis*), Doğu Asya'da ılıman ve serin ormanlarda yayılış göstermektedir (Piao vd. 2011; Zhang vd. 2017). *P. koraiensis*'ten elde edilen ekstrakt; geleneksel tıpta balgam, astım, öksürük ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Kvols 2005). Yapılan çalışmalar ile *P. koraiensis* çam kozalaklarından saflaştırılan polifenollerin, çeşitli kanser hücrelerinin in vitro proliferasyonunu inhibe ettiği ve kaspaz aracılı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Lee vd. 2017). *P. koraiensis* çam kozalaklarından elde edilen sulu ekstraktlar ile yapılan bir çalışmada, ekstraktların A549, H1264, H1299 ve Calu-6 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı ve kaspaz3 aktivitesini indüklediği belirtilmiştir (Lee vd. 2017). *P. koraiensis*'ten elde edilen polifenol ekstraktının 7 farklı kanser hücresi üzerine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, ekstraktın her bir hücre hattına karşı farklı antiproliferatif etkiler sergilediği gösterilmiştir (Yi vd. 2015). Ayrıca, *P. koraiensis*'ten elde edilen essansiyel yağların gastrik kanseri olan MGC-803 hücrelerinde proliferasyonu ve hücre göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang vd. 2019).

Kitosan ve çam kozalağı ekstraktlarının

bağımsız antikanser özelliklerinin gösterildiği çalışmaları yanı sıra, iki maddenin kombine edildiği bazı çalışmalar kombinasyonun hücrelerde antiproliferatif etkiler sergilediğini işaret etmektedir. Kitosan katkılı *Pinus merkusii* kabuğu ekstraktı nanopartikülleri (Nano-PMBE) ile yapılan bir çalışmada, nanopartiküllerin HeLa hücrelerinde hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğu, hücrelerde apoptozun tetiklediği, p53 ve kaspaz-9 ifadelerinde de önemli ölçüde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Proboningrat vd. 2019).

Kızılcım, *Pinus* cinsi içinde yer almakta ve Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren çam türleri arasında yer almaktadır (Boydak 2005; Frankis 1993; Güner 2012). Türkiye'deki çam türleri içinde kızılçam, özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde en geniş yayılışa sahip olan çam türüdür (Sarıbaş ve Ekici 2004; İçgen vd. 2006). Elde edilen ekstraktlar; geleneksel tıpta diyabet, balgam, astım, öksürük, diş sağlığı ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Buna ek olarak, antioksidan aktiviteye sahip olan fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin olan çam kozalağı ekstraktları limonen ve a-pinen gibi uçucu yağlar içerdiği için anti bakteriyel ve antifungal etki göstermektedir (Kvols 2005; Öner 2020).

Bu çalışmada, geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan yeşil ve siyah çam kozaklarının kitosansız ve kitosanlı olarak hazırlanmış ekstraktlarının insan meme ve serviks kanser hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkileri incelenmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Bitki ekstraktlarının elde edilmesi:

Kızılcım (*Pinus brutia* Ten.) kozalakları, Antalya ili Döşemealtı ilçesinde bulunan çam ağaçlarından Ekim ayının ilk haftası toplandı. Toplanan yeşil ve siyah kozalaklar 1-1,5 yaşında olacak şekilde seçildi. Her iki kozalak çeşidi için 19 kozalak toplandı. Toplanan kozalaklar homojenizatörden geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen kozalaklar 500 g olacak şekilde tartıldı ve distile su ile 3 litreye tamamlandı. KOH ile pH 12'ye ayarlandıktan sonra termodinamik hassas ısı yöntemi ile 121 °C'de 30 dakika ısı işlem uygulandı. Oda sıcaklığına getirildikten sonra filtre kâğıdından geçirildi. +4 °C'de saklandı. %1'lik kitosan eklendi ve sprey kurutucu ile kurutuldu.

2.2. Hücre kültürü:

MCF-7 (ATCC® HTB-22, östrojen reseptör pozitif insan meme kanseri), HeLa (ATCC® CCL-2, serviks kanseri) ve VERO (ATCC® CCL-8, Maymun böbrek epiteli) hücre hatları %10 fetal bovin serum, penisilin/streptomisin ve antibiotik-antimikotik antibiyotikleri, non-essential aminoasit ve sodyum piruvat içeren RPMI 1640 besiyerinde çoğaltıldı. Hücreler 37 °C'de ve %5 CO₂'li etüde inkübe edildi ve % 0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp pasajlandı.

2.3. WST-1 hücre canlılığı testi:

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan WST-1 hücre proliferasyon kitinin (roche, 5015944001) talimatları göz önüne alınarak kullanıldı. Çoğaltılan MCF-7, HeLa ve VERO

hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. 24 saatlik süresi sonunda %1 serum içeren besiyerinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki kitosan katkıli çam kozalağı ekstraktı (25, 50, 100, 200, 250 ve 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 96 kuyucuklu steril plaklarda dört tekrarlı olarak yapıldı. Ekstraksiyonun uygulamasının hemen arkasından, başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı okuması yapıldı. Ekstraksiyon uygulamalarını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deney sonlandırılarak 10 μl WST-1 eklenip 3 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra plakların absorbans değerleri mikroploka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go), 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. Elde edilen okuma verileri ile uygulanan ekstraktların kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi belirlendi.

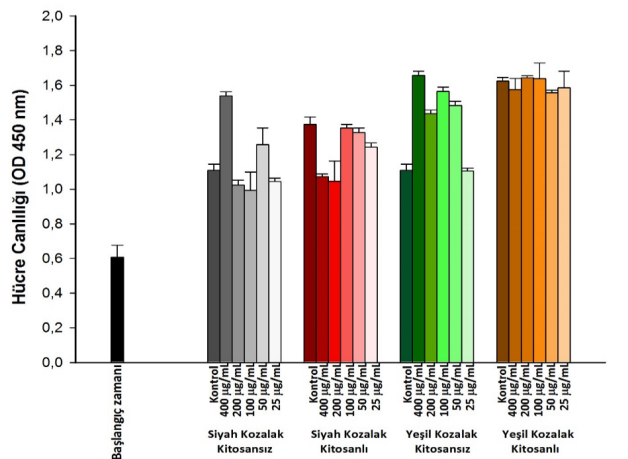
2.4. İstatistiksel Analiz: Sitotoksikite testlerinden elde edilen deney sonuçlarındaki kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılık Graph-Pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. Ekstraksiyonların IC_{50} değerleri Sigma Plot 10.0 istatistik programı kullanılarak belirlendi. Tüm veriler ortalama \pm SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

3. BULGULAR

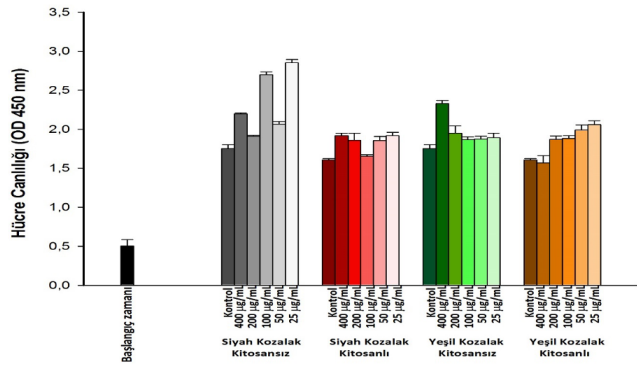
3.1. Kitosan Katkıli Olmayan ve Kitosan Katkıli Siyah ve Yeşil Çam Kozalağı Ekstraksiyonlarının VERO, Hela ve MCF-7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi

3.1.1. VERO Hücre Hattı

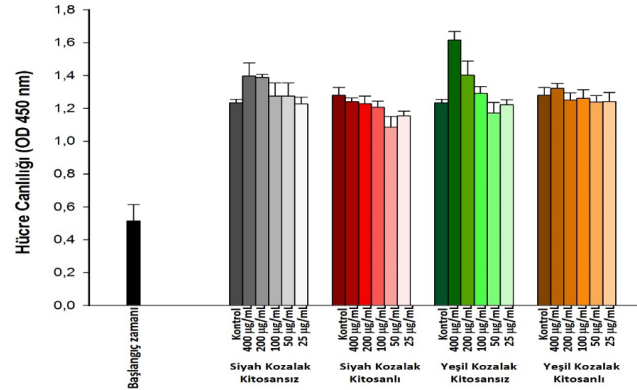
Kitosan katkıli olmayan ve kitosan katkıli çam kozalağı ekstraktları, Vero hücre hatlarında hiçbir doz ve inkübasyon süresinde sitotoksik etki yaratmamıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3.).



Şekil 1. Siyah ve yeşil çam kozalağı ve kitosan katkıli siyah ve yeşil çam kozalağı ekstraktlarının, VERO hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki sitotoksik etkileri



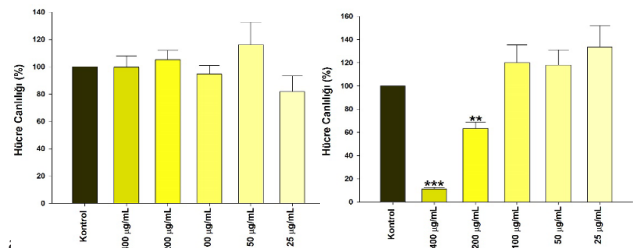
Şekil 2. Siyah ve yeşil çam kozalağı ve kitosan katkıli siyah ve yeşil çam kozalağı ekstraktlarının, VERO hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki sitotoksik etkileri



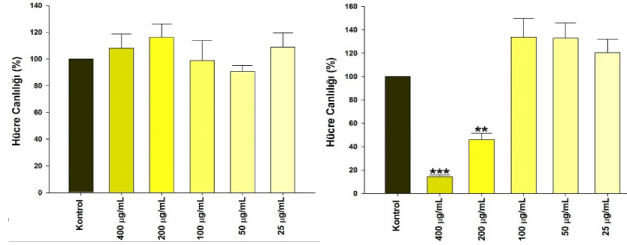
Şekil 3. Siyah ve yeşil çam kozalağı ve kitosan katkıli siyah ve yeşil çam kozalağı ekstraktlarının, VERO hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki sitotoksik etkileri

3.1.2. MCF-7 Hücre Hattı

Kitosan katkıli olmayan yeşil çam kozalağı ekstraktı, MCF-7 hücrelerinde hiçbir doz ve inkübasyon süresinde sitotoksik etki yaratmamıştır. Kitosan katkıli yeşil çam kozalağı ekstraktı ise 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerde sitotoksik etki yaratmazken, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etkiye sebep olmaktadır. Bu inkübasyon süresi sonunda kitosan katkıli yeşil çam kozalağı ekstraktı için IC_{50} değeri 252.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Şekil 4.4), 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında ise 195.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır (**, $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; Şekil 4.5).



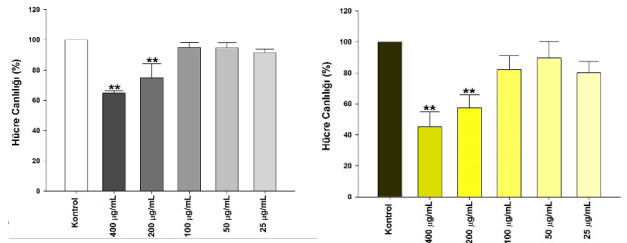
Şekil 4. a) MCF-7 hücrelerinde yeşil çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarda 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre canlılığına etkisi. b) MCF-7 hücrelerinde kitosan katkıli yeşil çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarda 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi.



Şekil 5. a) MCF-7 hücrelerinde yeşil çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarında 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre canlılığına etkisi. b) MCF-7 hücrelerinde kitosan katkılı yeşil çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarında 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi (**, **p<0.01).

Siyah çam kozalağı ekstraktı, 24 saatlik inkübasyon süresinde MCF7 hücrelerinde denenen hiçbir dozda sitotoksik etki göstermemiştir (Şekil gösterilmemiştir). Şekil 6. a'da gösterildiği gibi 48 saatlik inkübasyon süresinde siyah çam kozalağı ekstraktı MCF-7 hücrelerinde 400 µg/mL ve 200 µg/mL'lik konsantrasyonlarda sırasıyla % 35.2 ve % 25.2 ölüme neden olmuştur. Bu ekstraktın, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise MCF-7 hücrelerinde ki IC₅₀ değeri 324.5 µg/mL olarak hesaplanmıştır (**p<0.01; Şekil 6. b).

Kitosan katkılı siyah çam kozalağı ekstraktı MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sadece en yüksek doz olan 400 µg/mL'de % 16.7 oranında ölüme neden olurken, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ise hiçbir dozda istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki yaratmamıştır (Şekil gösterilmemiştir).



Şekil 6. a) MCF-7 hücrelerinde siyah çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarında 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre canlılığına etkisi. b) MCF-7 hücrelerinde siyah çam kozalağı ekstraktının farklı dozlarında 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi (**p<0.01).

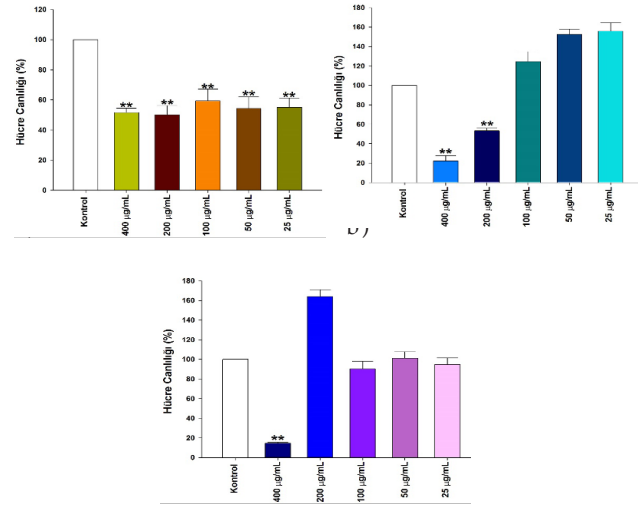
3.1.3. HeLa Hücre Hattı

HeLa hücrelerinde Yeşil çam kozalağı ekstraktı; 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hiçbir dozda sitotoksik etki yaratmamaktadır. Kitosan katkılı yeşil çam kozalağı ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda IC₅₀ değerleri sırasıyla; 200.5 µg/mL, 221.9 µg/mL ve 352.3 µg/ml olarak hesaplanmıştır (**p<0.01; Şekil 4.7.).

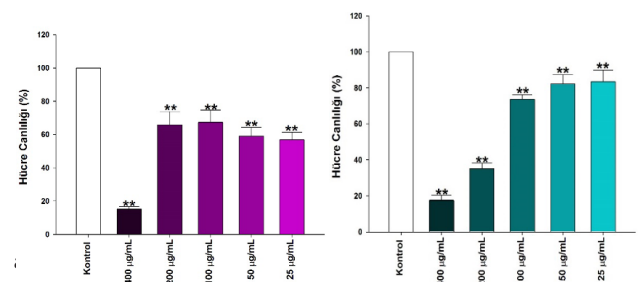
HeLa hücrelerinde siyah çam kozalağı ekstraktı 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda

hiçbir dozda sitotoksik etki yaratmamaktadır. Kitosan katkılı siyah çam kozalağı ekstraktının, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ki IC₅₀ değerleri sırasıyla; 262.6 µg/mL ve 161.9 µg/mL olarak hesaplanmıştır (**p<0.01; Şekil 4.8.).

Elde edilen bulgular sonucu HeLa hücrelerinde, yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktlarının uygulanan hiçbir dozda sitotoksik etki göstermediği, kitosan katkılı yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktlarının ise uygulanan farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kitosan katkılı yeşil çam kozalağı ekstraktı 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda uygulanan her dozda sitotoksik etki göstermektedir. Bu ekstraktın 48 saatlik inkübasyon süresinde 400 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla %80 ve %50 sitotoksik etki gösterdiği ve 72 saatlik inkübasyon süresinde en yüksek doz olan 400 µg/ml' de sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Kitosan katkılı siyah çam kozalağı ekstraktı ise HeLa hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulanan her dozda sitotoksik etkili göstermektedir. HeLa hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyon süresinde 400 µg/ml'de en yüksek sitotoksik etki, 48 saatlik inkübasyon süresinde ise doza bağlı etki görülmektedir.



Şekil 7. HeLa hücreleri üzerinde Kitosan katkılı yeşil çam kozalağı ekstraktının farklı dozlardaki hücre canlılığına etkileri a) 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi b) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi c) 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi (**p<0.01).



Şekil 8. a) HeLa hücre hatları üzerinde Kitosan katkılı siyah çam kozalağı ekstraktlarının farklı dozlardaki hücre canlılığına etkileri a) 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi b) 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi (**p<0.01).

Yeşil ve siyah çam kozalağı ve kitosan katkılı yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktları MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde hiçbir dozda sitotoksik etki göstermemektedir. Kitosan katkılı yeşil çam kozalağı ekstraktı, MCF-7 hücrelerinde 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde 400 µg/ml dozda hücre canlılığı üzerinde en yüksek (%80) ve 200 µg/ml'de (%40-50) sitotoksik etki göstermektedir.

Uygulanan yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktları ve kitosan katkılı yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktları, Vero maymun böbrek epitelinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hiçbir dozda sitotoksik etki göstermemektedir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser tedavisinde bazı olumsuzluklar meydana gelmekte ve bu durum terapötik doğal ajanların ya da sentetik türevlerinin önemini vurgulamaktadır (Zhong 2015). Diğer birçok bitkisel kaynaktan elde edildiği gibi Pinus türlerinden de elde edilen polifenoller; antioksidan, antitümör, antimikrobiyal özellikler göstermektedir (Li vd 2007; Lee vd 2008; Chen vd 2011; Yi vd 2015). Öte yandan doğada biyoyoumluluk ve biyobozunurluk özelliği bulunan kitosan (Choi vd 2015), antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antifungal ve antitümör etkileri gibi çeşitli biyoaktivitelere sahiptir (Ong vd 2008; Croisier ve Jérôme 2013; Zhang vd 2016).

İnsan mesane kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda kitosanın çeşitli mekanizmalar ile sitotoksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Hasegawa vd 2001; Takimoto vd 2004). Ayrıca kitosan, HepG2 hücrelerinde de sitotoksik etkiler göstermektedir (Qi vd 2007; Gibot vd 2015).

P. koraiensis çam kozalaklarının su ekstraktları insan akciğer kanseri hücrelerinde spesifik hücre ölüm mekanizmaları ile sitotoksik, antimetastatik ve antianjiogenik etkiler göstermektedir (Lee vd 2018).

Yeşil Çelikleş ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada farklı Pinus türlerinin ve standartlarının sitotoksik etkileri incelenmiş ve bu farklı Pinus türlerinden Pinus brutia ve Pinus sylvestris'in MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Yeşil Çelikleş vd 2009). Çam kozalağı ekstraktlarının yedi farklı hücre hattındaki (A375, A549, SH-SY5Y, MCF-7, HeLa ve T29) antiproliferatif etkileri incelenmiş olup en düşük antiproliferatif etkinin MCF-7 ve A-375

hücrelerinde, en yüksek etkinin ise Lovo ve HeLa hücrelerinde meydana geldiği belirtilmiştir (Yi vd 2015).

Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz bulgular sonucu, kitosan katkılı yeşil ve siyah çam kozalağı ekstraktlarının, Yi ve arkadaşlarının (2015) elde etmiş olduğu etkiye kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Yi ve arkadaşlarının (2015) yapmış olduğu çalışmada HeLa hücrelerine karşı 48 saatlik inkübasyon süresinde yaklaşık %60 oranında antiproliferatif etki saptanırken, yapmış olduğumuz çalışma sonucu ise kitosan katkılı her iki çam kozalağı ekstraktı 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını %80'e kadar düşürmektedir. Çam kozalaklarının hücreler üzerinde tek başına ya da kitosan katkılı, yeşil ya da siyah çam kozalağı gibi farklı ekstraktlar olarak kullanılması etkiyi değiştirmektedir.

Proboningrat ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kitosan katkılı Pinus merkusii kabuğu ekstraktı nanopartiküllerinin (Nano-PMBE) serviks kanseri olan HeLa hücrelerindeki etkileri araştırılmış ve 48 saat inkübasyon süresinde IC₅₀ değeri 384.1µg/ml olarak belirtilmiştir (Proboningrat vd 2019).

Yapmış olduğumuz çalışmada, kitosan katkılı Pinus brutia türünün çam kozalağı ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, HeLa hücrelerinde IC₅₀ değerinin sırasıyla 200.5µg/mL, 221.9µg/mL ve 352.3µg/ml olduğu saptanmış ve hücre canlılığı üzerinde daha etkili olduğu belirtilmiştir.

Elde edilen bulgular sonucu kızılçam kozalağının HeLa serviks kanseri hücrelerinde ve MCF-7 meme kanserinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etki belirlenmiştir. Kitosan katkılı çam kozalağı ekstraktları kitosan katkılı olmayan ekstraktlarla karşılaştırıldığında daha etkili sitotoksikite göstermektedir. Kitosan'ın, pH'a duyarlı bir özelliğe sahip olması sağlıklı hücrelerden daha düşük pH'ya sahip olan tümör hücrelerinde spesifik etki göstermesini sağlamaktadır.

Elde edilen bulgular, Kızılçam'ın (Pinus brutia Ten.), meme ve serviks kanserinin tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ajan olduğunu göstermektedir (Şefik 1964; Kantarcı 1991; Gürboy 2007; Karatepe vd 2014). Bu çalışma sayesinde hem kızılçam kozalağının sitotoksik etkisi belirlenmiş olup hem de kitosanın hücre ölümünde etkiyi arttırdığı görülmektedir. Literatürde bu alanda yapılan çalışmalar sınırlı olup daha fazla araştırma yapılmasının gelecekteki kanser tedavilerinde alternatif çözümler sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbayrak, N., et al. (1998). "İç Hastalıkları Hemşireliği El Kitabı", 24-30.
- Akyol, H. (2004). "Kemoterapinin temel ilkeleri, XIII." TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı, 159-163.
- Asmaz, H., (1993). Akdeniz peyzajında kızılçamın önemi. Uluslararası Kızılçam Sempozyumu, 18-23 Ekim, Marmaris-Muğla, Bildiriler Kitabı, s. 48-56.
- Blagosklonny, M. V. (2005). "Molecular theory of cancer." *Cancer biology & therapy*, 4(6): 621-627.
- Chen, X., Zhang, Y., Wang, Z. ve Zu, Y. (2011). "In vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* Nut oil obtained by optimised supercritical carbon dioxide extraction. *Natural product research*", 25(19): 1807-1816.
- Choi, C., Nam, JP ve Nah, JW (2016). "Kitosan ve kitosan türevlerinin biyomalzeme olarak uygulanması. *Endüstri ve Mühendislik Kimyası Dergisi*", 33: 1-10.
- Croisier, F. ve Jérôme, C. (2013). "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*", 49(4): 780-792.
- Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. (2006). "The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.*" 3:463-478.
- De la Fuente M, Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. (2008). "Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. *Nanomedicine (Lond.)*" 3: 845-857.
- Gibot, L., Chabaud, S., Bouhout, S., Bolduc, S., Auger, F. A., Moulin, V. J. (2015). "Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International journal of biological macromolecules*", 72: 370-379.
- Gürbo, B. (2007). "Kuzey Kıbrıs'ta doğal olarak yetişen kızılçam (*Pinus brutia* Ten.)'ın lif morfolojisi. *Türkiye Ormanlık Dergisi*", 8(2): 119-127.
- Hasegawa, M., Yagi, K., Iwakawa, S. ve Hirai, M. (2001). "Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells. *Japanese journal of cancer research*", 92(4): 459-466.
- Kantarci, M.D., (1991). "Akdeniz Bölgesi'nin yetişme ortamı bölgesel sınıflandırması." T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Yayını, Sıra No: 668, Seri No: 64, Ankara.
- Karatepe, Y., Özçelik, R., Gürlevik, N., Yavuz, H., Kırış, R. (2014). "Ecological evaluation of vegetation structure in Turkish red pine forests (*Pinus brutia* Ten.) in different sites of western Mediterranean region of Turkey." *Türkiye Ormanlık Dergisi*, 15(1): 1-8.
- Kızılcı, S. (1999). "Kemoterapi alan kanserli hastalar ve yakınlarının yaşam kalitesini etkileyen faktörler." *Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 3(2): 18-26.
- Kuruoğlu, A. (2017). "Karboplatinin etoposide dirençli A549 hücre hattında sitotoksik ve anti-metastatik özelliklerinin araştırılması". Yüksek lisans tezi, Akdeniz üniversitesi, Antalya- Türkiye, 72.
- Kvols, L. K. (2005). "Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets." *Journal of Nuclear Medicine*, 46(1): 187S.
- Larrayoz, I. M., Huang, J. D., Lee, J. W., Pascual, I., Rodríguez, I. R. (2010). "7-Ketocholesterol-induced inflammation: involvement of multiple kinase signaling pathways via NFκB but independently of reactive oxygen species formation." *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(10): 4942-4955.
- Lee, J. H., Yang, H. Y., Lee, H. S. ve Hong, S. K. (2008). "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*." *J Microbiol Biotechnol*, 18(3): 497-502.
- Lee, T. K., Park, J. Y., Yu, J. S., Jang, T. S., Oh, S. T., Pang, C., Kim, K. H. (2018). 7a, "15-Dihydroxydehydroabiatic acid from *Pinus koraiensis* inhibits the promotion of angiogenesis through downregulation of VEGF, p-Akt and p-ERK in HUVECs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*", 28(6): 1084-1089.
- Lee, T. K., Roh, H. S., Yu, J. S., Baek, J., Lee, S., Ra, M., Kim, K. H. (2017). "Pinecone of *Pinus koraiensis* Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Activating Caspase-3 and its Chemical Constituents. *Chemistry & biodiversity*", 14(4): e1600412.
- Li, K., Li, Q., Li, J., Zhang, T., Han, Z., Gao, D., Zheng, F. (2007). "Antitumor activity of the procyanidins from *Pinus koraiensis* bark on mice bearing U14 cervical cancer." *Yakugaku Zasshi*, 127(7): 1145-1151.
- Liu, J., Bai, J., Jiang, G., Li, X., Wang, J., Wu, D., Li, W. (2015). "Anti-tumor effect of *Pinus massoniana* bark proanthocyanidins on ovarian cancer through induction of cell apoptosis and inhibition of cell migration. *PloS one*", 10(11): e0142157.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R., Anderson, J. P. (2003). "Multiple mutations and cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3): 776-781.
- Ma, H., Lai, F., Xie, H., Wang, J., Wang, H. (2008). "Involvement of the Bcl-2 family members in *Pinus massoniana* bark extract induced apoptosis in HeLa cells. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*", 22(11): 1472-1476.
- Ma, H., Liu, B., Feng, D., Xie, H., Li, R., Yuchi, Y., Wang, J. (2010). "*Pinus massoniana* bark extract selectively induces apoptosis in human hepatoma cells, possibly through caspase-dependent pathways. *International journal of molecular medicine*", 25(5): 751-759.
- Narazaki, M., Segarra, M., Hou, X., Tanaka, T., Li, X., Tosato, G. (2010). "Oligoguanosine nucleotide induces neuropilin-1 internalization in endothelial cells and inhibits angiogenesis." *Blood*, 116(16): 3099-3107.
- Ong, S. Y., Wu, J., Moochhala, S. M., Tan, M. H., Lu, J. (2008). "Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties." *Biomaterials*, 29(32): 4323-4332.
- Öner, e. k. (2020). "Odon dışı bitkisel ürünler. *Research in medicinal and aromatic plants*", 95.
- Özkan, S. A., Dedeoğlu, A., Karadaş Bakırhan, N., Özkan, Y. (2019). "Nanocarriers Used Most in Drug Delivery and Drug Release: Nanohydrogel, Chitosan, Graphene, and Solid Lipid. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*", 16(4).
- Piao, Z. J., Tang, L. N., Swihart, R. K., Wang, S. X. (2011). "Human-wildlife competition for *Korean pine seeds*: vertebrate responses and implications for mixed forests on Changbai Mountain, China. *Annals of Forest Science*", 68: 911-919.
- Proboningrat, A., Fadholy, A., Iskandar, R. P. D., Achmad, A. B., Rantam, F. A., Sudjarwo, S. A. (2019). "The potency of chitosan-based *Pinus merkusii* bark extract nanoparticles as anti-cancer on HeLa cell lines. *Veterinary World*", 12(10): 1616.
- Qi, L., Xu, Z., Chen, M. (2007). "In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. *European journal of cancer*", 43(1): 184-193.
- Sakka, L., Delétage, N., Chalus, M., Aissouni, Y., Sylvain-Vidal, V., Gobron, S., Coll, G. (2017). "Assessment of citalopram and escitalopram on neuroblastoma cell lines: Cell toxicity and gene modulation." *Oncotarget*, 8(26): 42789.
- Şefik, Y. (1964). Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) "kozalak ve tohumu üzerine araştırmalar." *İÜ Orman Fakültesi Dergisi, Seri A*, 14(2): 35-70.
- Takimoto, H., Hasegawa, M., Yagi, K., Nakamura, T., Sakaeda, T., Hirai, M. (2004). "Proapoptotic effect of a dietary supplement: water soluble chitosan activates caspase-8 and modulating death receptor expression." *Drug metabolism and Pharmacokinetics*, 19(1): 76-82.
- Ullah S, Zainol I, Idrus RH. (2017). "Incorporation of zinc oxide nanoparticles into chitosan-collagen 3D porous scaffolds: effect on morphology, mechanical properties and cytocompatibility of 3D porous scaffolds." *Int J Biol Macromol*;104: 1020-1029.
- Wahba, M. I. (2019). "Enhancement of the mechanical properties of chitosan. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*", 1-26.
- Yesil-Celiktas, O., Ganzera, M., Akgun, I., Sevimli, C., Korkmaz, K. S., Bedir, E. (2009). "Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus species*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*", 89(8): 1339-1345.
- Yi, J., Wang, Z., Bai, H., Yu, X., Jing, J., Zuo, L. (2015). "Optimization of purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *pinus koraiensis* pinecones. *Molecules*", 20(6): 10450-10467.
- Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. (2010). "Tumor pH and its measurement." *J Nucl Med*. 51: 1167-1170.
- Zhang, H., Wu, F., Li, Y., Yang, X., Huang, J., Lv, T., Liu, G. (2016). "Chitosan-based nanoparticles for improved anticancer efficacy and bioavailability of mifepristone. *Beilstein journal of nanotechnology*", 7(1): 1861-1870.
- Zhang, H., Zhao, H., Yao, L., Yang, X., Shen, S., Wang, J., Geng, L. (2017). "Isolation, physicochemical properties, and in vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from different parts of *Pinus koraiensis*." *Journal of wood chemistry and technology*, 37(3): 225-240.
- Zhang, J. H., Feng, D. R., Ma, H. L., Liu, B., Wang, H. B., Xie, H., Wang, J. F. (2012). "Antitumor effects of *Pinus massoniana* bark extract in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo. *The American journal of Chinese medicine*, 40(04): 861-875.