

Ponatinib ve Türkiye’de yetişen bazı endemik bitki ekstraktlarının kombinasyonlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri

Combinational effects of ponatinib and some Turkish endemic plant extracts on breast cancer cells

Çağla Kayabaşı¹ Çığır Biray Avcı¹ Sunde Yılmaz Süslüer¹ Tuğçe Balcı Okcanoğlu²
Besra Özmen Yelken³ Cansu Çalışkan Kurt¹ Bakiye Göker Bağca⁴ Cenk Durmuşkahya⁵
Hüsniye Kayalar⁶ Ahmet Özbilgin⁷ Cumhuriyet Gündüz¹

¹ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Lefkoşa, KKTC

³ İzmir Bakırçay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

⁵ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁶ Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁷ Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

ÖZ

Amaç: Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en yaygın gözlenen malignansidir. Bu nedenle mevcut tedavilerin eksiklerini giderebilecek yeni stratejilerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızda meme kanseri hücrelerinin hedeflenmesinde kullanılabilecek yeni bitkisel kombinasyon terapileri tanımlamayı hedefledik. Bu amaçla, *Centaurea calolepis* (CCİ), *Origanum sipyleum* (OSM) ve *Phlomis lycia* (PLİ) bitki ekstraktlarının ponatinib ile kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik, anti-proliferatif ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: MCF-7 hücrelerinde OSM, CCİ, PLİ ve ponatinibin sitotoksik etkileri xCELLigence ile gerçek-zamanlı olarak ölçüldü. Ponatinib ile CCİ (p-CCİ), OSM (p-OSM), PLİ (p-PLİ) kombinasyonlarının analizleri için medyan-etki denklemini kullanıldı. Apoptoz, proliferasyon, hücre döngüsü düzenlenmesi akım sitometride değerlendirildi.

Bulgular: MCF-7 hücrelerinde CCİ, OSM ve PLİ ekstraktlarının IC₅₀ dozları sırasıyla 48. saatte 59,5, 57, 44,2 µg/ml ve 72. saatte 51,6, 54,21, 42,52 µg/ml olarak hesaplandı. Kombinasyon analizi sonuçlarına göre 48. saatte p-CCİ additif, p-OSM ve p-PLİ ılımlı sinerjistik etki sergilemekteydi. Ponatinib ile indüklenen apoptozun, CCİ ve PLİ kombinasyonlarıyla anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. CCİ ve PLİ uygulamaları MCF-7 hücreleri üzerinde ılımlı düzeyde anti-proliferatif etki sergilerken, proliferasyonu en belirgin düzeyde OSM ekstresinin baskıladığı saptandı. Proliferasyon sonuçları ile uyumlu olarak, en yüksek G₀/G₁ tutulumu OSM uygulaması ile gözlemlendi. Kombine p-CCİ ve p-PLİ uygulamalarının ponatinibin anti-proliferatif etkisini anlamlı düzeyde arttırdıkları ve daha yüksek düzeyde G₀/G₁ birikimine neden oldukları ortaya koyuldu.

Sonuç: Ponatinib ile CCİ, OSM, PLİ bitki ekstraktlarının kombinasyonları apoptozu indükleyerek, proliferasyonu baskılayarak ve hücre döngüsünün durdurarak meme kanserinde anti-kanser aktivitesi sergiledi. Belirlenen yüksek anti-kanser etkilerinin ışığında, Türkiye’de yetişen bu endemik bitki ekstraktları meme kanseri tedavisinde potansiyel strateji temsil edebilir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, ponatinib, bitki ekstresi, apoptoz, proliferasyon.

Araştırmaya ait verilerin bir kısmı 27-30 Ekim 2013 tarihinde Aydın’da düzenlenen 13. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi’nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Sorumlu yazar: Çağla Kayabaşı
Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye
E-posta: kayabasicagla@gmail.com
Başvuru tarihi: 25.09.2021 Kabul tarihi: 17.12.2021

ABSTRACT

Aim: Breast cancer is the most common malignancy in women worldwide. Therefore, there is a need to define new strategies that can overcome the deficiencies of existing treatments. In our study, we aimed to define new herbal combination therapies that can be used to target breast cancer cells. For this purpose, we investigated the cytotoxic, apoptotic, anti-proliferative and cell cycle regulatory effects of *Centaurea calolepis* (CCI), *Origanum sipyleum* (OSM) and *Phlomis lycia* (PLI) plant extracts in combination with ponatinib on MCF-7 cells.

Materials and Methods: The cytotoxic effects of OSM, CCI, PLI and ponatinib on MCF-7 cells were measured in real time by xCELLigence. The median-effect equation was used for the analysis of combinations of ponatinib with CCI (p-CCI), OSM (p-OSM), PLI (p-PLI). Apoptosis, proliferation and cell cycle regulation were evaluated by flow cytometry.

Results: The IC_{50} doses of CCI, OSM and PLI extracts in MCF-7 cells were calculated as 59.5, 57, 44.2 $\mu\text{g/ml}$ at 48 hours and 51.6, 54.21, 42.52 $\mu\text{g/ml}$ at 72 hours, respectively. Combination analyses revealed that p-CCI was additive, p-OSM and p-PLI showed a moderate synergistic effect at 48th hours. It was determined that apoptosis induced by ponatinib was significantly increased with the combinations of CCI and PLI. CCI and PLI treatments exhibited moderate anti-proliferative effects on MCF-7 cells, while OSM extract suppressed proliferation most significantly. Consistent with the proliferation results, the highest G_0/G_1 arrest was observed with OSM treatment. It was revealed that combined p-CCI and p-PLI treatments significantly increased the anti-proliferative effect of ponatinib and caused a higher level of G_0/G_1 accumulation.

Conclusion: Combinations of ponatinib and CCI, OSM, PLI plant extracts exhibited anti-cancer activity in breast cancer with induction of apoptosis, suppression of proliferation and cell cycle arrest. In light of the high anti-cancer effects identified, extracts of these Turkish endemic plants may represent a potential strategy in the treatment of breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer, ponatinib, plant extract, apoptosis, proliferation.

Some of the data belonging to the research were presented as a poster presentation at the 13th Medical Biology and Genetics Congress held in Aydın on 27-30 October 2013.

GİRİŞ

Meme kanseri bozulmuş hücre proliferasyonuyla ilişkili heterojen bir hastalıktır (1). Dünya genelinde kadınlarda en yaygın gözlenen malignansidir ve kanser ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (2). Östrojen reseptörü (ÖR) spesifik genlerin ekspresyonunu düzenleyerek meme kanseri progresyonunda önemli rol oynar. Meme kanseri olgularının büyük bir yüzdesinin ÖR pozitifdir (3). Genç kadınlarda yaşlılara kıyasla daha agresif seyrettiği bilinen meme kanserinin tedavi protokolü hormon tedavisi, cerrahi müdahale, radyoterapi, immünoterapi ve kemoterapi uygulamalarını içermektedir (1, 4). Mevcut ilaçların en büyük dezavantajları zamanla gelişen direnç, yüksek toksisite, düşük seçiciliktir (1).

Ponatinib, kronik myeloid lösemi tedavisinde T315I-mutant BCR-ABL1'e karşı direncin üstesinden gelmek için tasarlanmış bir tirozin kinaz inhibitörüdür (5, 6). Ek olarak Src ailesi kinazları, c-Kit, platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü alfa (PDGFR α), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2), fibroblast

büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) gibi kinazları da inhibe edebilmektedir (7). Disregüle FGFR, PDGFR, VEGFR meme kanseri için belirgin risk faktörleridir ve meme kanseri tedavisinde potansiyel hedef teşkil etmektedirler (8-10). Ponatinibin etkinliği meme, tiroid, yumurtalık, akciğer kanserleri dahil olmak üzere bu kinazların önemli rol oynadığı kanserler üzerinde değerlendirilmiştir (11). Ponatinibin meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapi olabileceği görüşü bildirilmiştir (12-14).

Tıbbi bitkiler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye'ye özgü bitkilerden, Asteraceae familyası üyesi *Centaurea calolepis* Boiss. linoleik asit ve palmitik asit içermektedir (15). Anti-leishmanial aktivitesinin (16) yanı sıra anti-inflamatuar, antioksidan özelliklere de sahiptir (17). Batı Anadolu'ya endemik olan Labiatae familyası üyesi *Origanum sipyleum* L., tıbbi çay, gıda katkı maddesi ve uçucu yağ üretimi için kullanılmaktadır. Orta Anadolu'da baharat olarak, Batı Anadolu'da mide-bağırsak rahatsızlıklarını ve öksürüğü tedavi etmek, İç batı Anadolu'da soğuk algınlığı

tedavisi için kullanılmaktadır (18-20). *Origanum sipyleum* L. bitkisinin anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip olduğu ortaya koyulmuştur (21). Labiatae familyası üyesi *Phlomis lycia* D. Don yapısında fenolik bileşikler bulundurmaktadır (22). Leishmania tedavisi (16) yanı sıra iştah açıcı olarak ve kabızlık, mide ağrısı, soğuk algınlığı, grip tedavilerinde kullanılmaktadır (23).

Meme kanserinin görülme sıklığının ve ölüm oranlarının yüksek seyretmesi nedeniyle hastalığın önlenmesinde kullanılabilecek veya mevcut tedavilerin eksiklerini giderebilecek yeni stratejilerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, meme kanseri olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan ÖR pozitif grubunun hedeflenmesinde kullanılabilecek yeni bitkisel kombinasyon terapileri tanımlamayı hedefledik. Çalışmamızda, ülkemizde yaygın olarak bilinen ve medikal amaçla kullanılan endemik bitkilerden yararlanıldı. Bu doğrultuda *Centaurea calolepis* Boiss., *Origanum sipyleum* L. ve *Phlomis lycia* D. Don bitki ekstraktlarının ponatinib ile kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik, anti-proliferatif ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar

Ponatinib (#S1490) Selleckchem (Houston, Teksas, ABD) firmasından satın alındı. Ponatinib final konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde dimetil sülfoksit ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Ara stoklar, deney sırasında uygun medyum ile seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

Bitkilerin Toplanması, Ekstrelerin Elde Edilmesi ve Fitokimyasal Analizler

Çalışmamızda kullanılan *Centaurea calolepis* Boiss. infüzyon şeklinde hazırlanan su ekstresi (CCİ), *Origanum sipyleum* L. metanol ekstresi (OSM) ve *Phlomis lycia* D. Don infüzyon şeklinde hazırlanan su ekstresi (PLİ) TÜBİTAK 110S289 no'lu projeden sağlandı (16). Bitkilerin toprak üstü kısımlarının toplanması, ekstraktların elde edilmesi ve fitokimyasal analizler önceden belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (16). Özetle, Asteraceae familyası üyesi *Centaurea calolepis* Boiss. Antalya Elmalı (1100 m), Labiatae familyası üyesi *Origanum sipyleum* L. Manisa Spil Dağı (1050 m) ve Labiatae familyası üyesi *Phlomis lycia* D. Don Antalya Korkuteli (550 m) bölgelerinden toplandı. Bitki türleri Prof. Dr. Cenk Durmuşkahya (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Orman Fakültesi,

Orman Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye) tarafından tanımlandı ve bitkilerin toplanan örnekler Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye'de saklandı. Bitki materyalleri, havada kurutulduktan sonra ince bir toz haline getirilmiştir. Metanol ekstraktları, çözücü/bitki materyali oranının 15:1 olduğu 24°C'de 48 saat boyunca karıştırılarak maserasyon yoluyla hazırlandı. Su ekstraktları %2'lik infüzyon şeklinde hazırlandı ve tüm ekstraksiyon çözümleri Whatman filtre kağıdı no.1'den süzüldü. Süzüntüler, 40°C'de bir döner buharlaştırıcıda alçak basınç altında kuruyana kadar buharlaştırıldı. Bakiyeler liyofilize edildi ve analiz edilene kadar vidalı kapaklı şişelerde -20°C'de saklandı. Ekstrelerde bulunan sekonder metabolitleri belirleyebilmek için (tanen, terpenoit, saponin, flavonoid, alkaloid, vb.) fitokimyasal tarama testleri gerçekleştirildi (16). Ekstreler final konsantrasyonları CCİ için 223 mg/ml, OSM için 43,4 mg/ml ve PLİ için 105,5 mg/ml olacak şekilde su ile sulandırıldı. Hücre kültürü çalışmaları öncesinde 0,2 µm por çaplı filtre kullanılarak sterilize edildi. Ara stoklar, deney sırasında uygun medyum ile seyreltilerek taze olarak hazırlandı.

Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında, ÖR pozitif insan meme kanseri modeli olarak MCF-7 hücre hattı (Katalog No:HTB-22, ATCC, Manassas, ABD) kullanıldı. Hücreler %10 Fetal Sığır Serum, 2mM L-glutamin, 100U/mL penisilin, 0,1 mg/mL streptomisin içeren RPMI-1640 medyum (Biological Industries, Beit-Haemek, İsrail) içinde kültüre edildi (24). Hücreler 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

Sitotoksikite Analizleri

Hücrelerin %50'sini öldüren (IC₅₀) sitotoksik dozları gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-xCELLigence, Roche, Berlin, Almanya) kullanılarak belirlendi. Sistem deneyler süresince her 15 dakika bir empedans kaydı gerçekleştirdi. Ponatinib ve bitki ekstraktlarının MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla hücreler, 96 kuyucuklu E-plaklara üç tekrarlı olarak ekildi (1×10⁵ hücre/kuyucuk). İnkübasyon sonrasında hücreler, seyreltme faktörü 1:2 olacak şekilde ponatinib (3,13–100 µM) ve bitki ekstraktlarının (3,13–100 µg/ml) artan dozları ile 72 saat süresince muamele edildi. Sitotoksikite, "xCELLigence RTCA yazılımı" analiz programında sigmoidal doz-yanıt eğrisi ile $[Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}})]$ hesaplandı (25).

Kombinasyon Analizleri

MCF-7 hücreleri, 96-kuyucuklu E-plaklara 1×10^5 hücre/kuyucuk olarak ekildi. Bitki ekstralarının IC_{50} değerleri doğrultusunda, ponatinib: CCl $1:10$, ponatinib:OSM $1:11$, ve ponatinib:PLI $1:10$ oranlarında ($\mu M:\mu g/ml$) kombine edildi. Oranlar sabit tutulacak şekilde, 2 kat artan dozlar hücrelere 3 tekrarlı olarak uygulandı. Madde uygulanmayan kuyucuklar kontrol olarak kabul edildi. Madde uygulamasını takiben 48 ve 72. saatlerde, xCELLigence RTCA sistemindeki hücre indeksleri (HI) kullanılarak $[\% \text{sitotoksosite} = 1 - (HI_{\text{doz}}/HI_{\text{kontrol}}) \times 100]$ formülüyle sitotoksosite yüzdeleri hesaplandı. Ponatinib ve bitki ekstraları arasındaki etkileşimler, medyan etki denkleminde dayanan Calcsyn (Biosoft) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Her etkilenen fraksiyonun (F_a) maruz kaldığı dozlar (ED) ve bu dozlara ait kombinasyon indeksi (CI) ve ponatinib doz azaltma indeksi (DRI) hesaplandı. Kombinasyonlar, CI değerlerine göre sinerjistik ($CI < 0.9$), additif ($CI = 0.9-1.1$) ve antagonistik ($CI > 1.1$) olarak tanımlandı (26).

Apoptoz Analizleri

Ponatinib ile bitki ekstralarının kombinasyonlarının apoptotik etkileri akım sitometride (Accuri C6, Becton Dickinson) araştırıldı. MCF-7 hücreleri 6-kuyucuklu plaklara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Sonrasında, hücreler 48 saat süresince ponatinib ($5 \mu M$), CCl ($50 \mu g/ml$), OSM ($50 \mu g/ml$), PLI ($50 \mu g/ml$), ponatinib ($5 \mu M$) ile CCl ($50 \mu g/ml$) kombinasyonu (p-CCl), ponatinib ($5 \mu M$) ile OSM ($50 \mu g/ml$) kombinasyonu (p-OSM) ve ponatinib ($5 \mu M$) ile PLI ($50 \mu g/ml$) kombinasyonu (p-PLI) ile muamele edildi. Madde uygulanmayan kuyucuklar kontrol olarak kabul edildi.

Fosfatidilserin Eksternalizasyonu ve Membran Bütünlüğü Ölçümü

Apoptotik hücrelerdeki fosfatidilserin eksternalizasyonu ve membran bütünlüğü "FITC Annexin V Apoptosis Detection" Kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Deney sonunda hücreler kit protokolüne uygun olarak Annexin V/PI ile boyanarak akım sitometride analiz edildi (27).

Apoptotik DNA Fragmentasyonu Ölçümü

Apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonu "APO-DIRECT" Kit (BD Pharmingen) kullanılarak ölçüldü. Belirtilen dozlara maruz bırakılan hücreler kit protokolüne uygun olarak, %1 paraformaldehit ile fikse edildi ve %70 soğuk etanolde inkübe edildi. Yıkama basamaklarından

sonra reaksiyon tamponu, TdT enzimi ve FITC-dUTP içeren solüsyonda süspanse edildi. Reaksiyonun durdurulması sonrasında PI/RNase boyama tamponunda inkübe edilerek 3 saat içinde akım sitometride analiz edildi (28).

Proliferasyon Analizi

MCF-7 hücrelerinin proliferasyon hızı karboksifloresan diasetat süksinimid ester (CFSE) boyama ile ölçüldü. MCF-7 hücreleri deney öncesinde $10 \mu M$ CFSE (BD Pharmingen) ile boyandı. CFSE ile boyanmış MCF-7 hücreleri 6-kuyucuklu plaklara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Sonrasında, hücreler 48 saat ponatinib, CCl, OSM, PLI, p-CCl, p-OSM ve p-PLI ile muamele edildi. Madde uygulanmayan kuyucuklar kontrol olarak kabul edildi. CFSE ile boyanmayan hücreler negatif kontrol, 100 ng/ml Colcemid (Biological Industries) ile muamele edilen hücreler pozitif kontrol olarak kabul edildi. Hücreler akım sitometriyle analiz edilerek yeşil floresan yoğunluğuna göre hücre proliferasyon hızı gösterildi (29).

Hücre Döngüsü Analizi

Ponatinib ile bitki ekstralarının kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerine etkileri akım sitometride araştırıldı. Bu amaçla MCF-7 hücreleri 6-kuyucuklu plaklara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Sonrasında, hücreler 48 saat ponatinib, CCl, OSM, PLI, p-CCl, p-OSM ve p-PLI ile muamele edildi. Madde uygulanmayan kuyucuklar kontrol olarak kabul edildi. Deney sonunda hücreler, "Cycletest Plus DNA Reagent" Kit (BD Pharmingen) protokolüne uygun olarak hazırlandı ve akım sitometride analiz edildi (27).

İstatistiksel Analizler

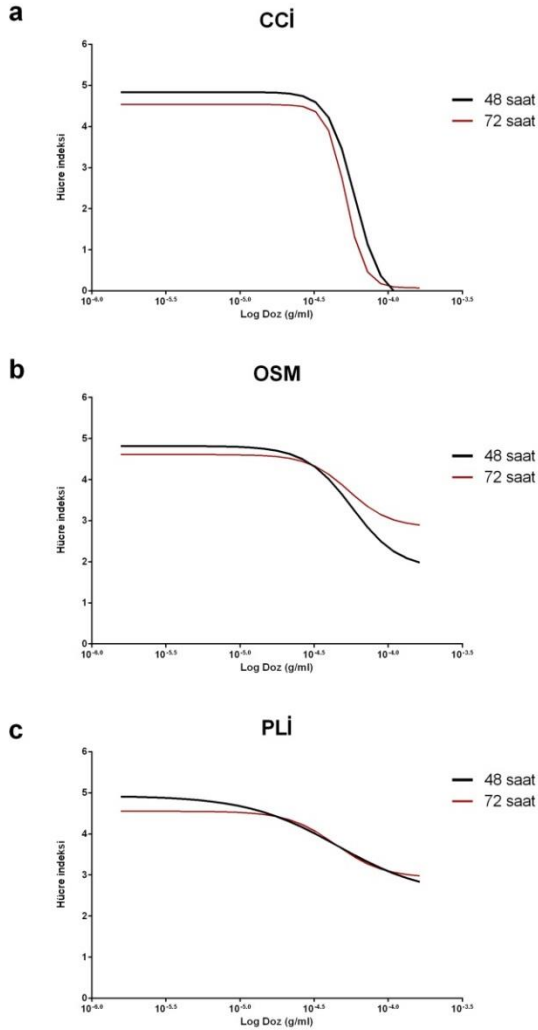
Hücre hatlarından ve kontrollerden elde ettiğimiz sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması "GraphPad Prism" programı ile gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA varyans analizi ardından Tukey's post-hoc analizi yapılarak belirlendi. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak alındı.

BULGULAR

Ponatinib ve Bitki Ekstrelerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

Ponatinib ve bitki ekstralarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence ile değerlendirildi. Önceki çalışmamızda belirttiği üzere, MCF-7 hücreleri için ponatinibin IC_{50}

dozları 48. saatte 9,51 μM , 72. saatte 4,59 μM olarak hesaplandı (24). Flavonoit, tanen, antrasen içerdiği belirlenen CCI (16) ekstresinin IC_{50} dozu 48. saatte 59,5 $\mu\text{g/ml}$, 72. saatte 51,6 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı (Şekil-1a). Terpenoit, flavonoit, tanen, antrasen içerdiği belirlenen OSM (16) ekstresinin IC_{50} dozu 48. saatte 57 $\mu\text{g/ml}$, 72. saatte 54,2 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı (Şekil-1b). Flavonoit, tanen, antrasen içerdiği belirlenen PLİ (16) ekstresinin IC_{50} dozu 48. saatte 44,2 $\mu\text{g/ml}$, 72. saatte 42,5 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplandı (Şekil-1c).



Şekil-1. Bitki ekstrelerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

(a) *Centaurea calolepis* Boiss. infüzyon (CCI), (b) *Origanum sipyleum* metanol (OSM) ve (c) *Phlomis lycia* infüzyon (PLİ) ekstrelerinin artan dozları hücreler ile 48 veya 72 saat boyunca kültüre edildi. Log(doz)-hücre indeksi eğrileri, xCELLigence ile hesaplandı. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalamalarıdır.

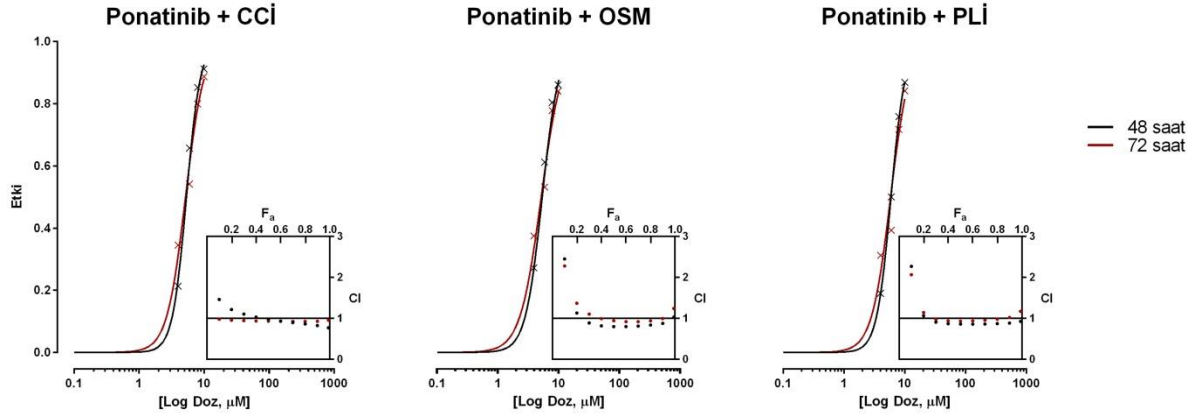
Ponatinib ve Bitki Ekstrelerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Kombinasyonel Etkileri

Ponatinib ve bitki ekstrelerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki kombinasyonel etkileri gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence ile değerlendirildi ve Calculus yazılımında analiz edildi. Üç kombinasyona ait, ponatinib ile CCI kombinasyonu (1:10, $\mu\text{M}:\mu\text{g/ml}$), ponatinib ile OSM kombinasyonu (1:11, $\mu\text{M}:\mu\text{g/ml}$), ve ponatinib ile PLİ kombinasyonu (1:10, $\mu\text{M}:\mu\text{g/ml}$), ED_{50} , ED_{70} ve ED_{90} dozları, bu dozlara ait CI ve ponatinib için DRI değerleri Tablo-1'de özetlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre 48. saatte ponatinib ile CCI kombinasyonunun ED_{50} dozu additif etkiliyken, ponatinib ile OSM ve PLİ kombinasyonlarının ED_{50} dozları ılımlı sinerjistik etki sergilemekteydi (Şekil-2, Tablo-1). Yetmiş iki saat uygulamalarında ise her kombinasyon grubuna ait ED_{50} dozları additif etkili olarak belirlendi. MCF-7 hücrelerinde %50 populasyonu hedeflemek için gerekli ponatinib dozunun, CCI kombinasyonu ile 1,312 kat, OSM kombinasyonu ile 1,319 kat ve PLİ kombinasyonu ile 1,184 kat azaldığı belirlendi (Tablo-1).

Ponatinib ve Bitki Ekstrelerinin Kombinasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Daha sonra, ılımlı sinerjistik/ additif etki gösterdiğini belirlenen kombinasyonların apoptotik etkileri değerlendirildi. MCF-7 hücrelerindeki erken/ geç apoptotik ve nekrotik hücreler Annexin V/PI boyama belirlendi. Tekli CCI, OSM ve PLİ (50 $\mu\text{g/ml}$) uygulamalarının MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla sırasıyla 2,7, 2,3 ve 2,8 kat apoptozu indüklediği saptandı. Ponatinib (5 μM) ile indüklenen 9,9 kat apoptoz, 50 $\mu\text{g/ml}$ CCI veya PLİ kombinasyonlarıyla anlamlı düzeyde artmaktadır (Şekil-3).

Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde indüklenen apoptoz DNA fragmentasyonu ölçümü ile incelendi. Tekli CCI, OSM ve PLİ (50 $\mu\text{g/ml}$) uygulamalarının MCF-7 hücrelerinde anlamlı düzeyde DNA fragmentasyonuna neden olamasa da, p-CCI, p-OSM ve p-PLİ kombinasyonlarının kontrole kıyasla sırasıyla 16,5, 92,5 ve 8,5 kat apoptozu indüklediği saptandı. Özellikle 50 $\mu\text{g/ml}$ CCI ile birlikte uygulaması, 5 μM ponatinib ile indüklenen apoptozu 5 kat arttırmaktadır (Şekil-4).



Şekil-2. Ponatinib ile *Centaurea calolepis* Boiss. İnfüzyon, *Origanum sipyleum* metanol ve *Phlomis lycia* infüzyon ekstralarının MCF-7 hücreleri üzerindeki kombinasyonel etkileri. Hücreler, 48 veya 72 saat boyunca artan kombinasyon konsantrasyonlarının varlığında kültürlendi. Log(doz)-etki eğrileri, xCELLigence ile elde edilen sonuçlar kullanılarak Calcsyn yazılımında hesaplandı. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalamalarıdır. İç grafikler, medyan etki analizi (Calcsyn) tarafından hesaplanan CI- F_a grafiklerini göstermektedir. $CI < 1$, $CI = 1$ ve $CI > 1$ değerleri sırası ile sinerjizm, additif ve antagonizmi ifade eder. CI, kombinasyon indeksi; F_a , etkilenen fraksiyon.

Tablo-1. Ponatinib ve bitki ekstralarının MCF-7 hücreleri üzerindeki kombinasyonel etkileri.

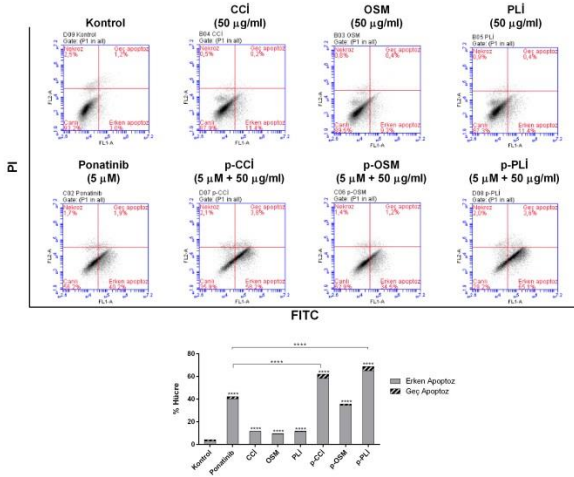
p:BE (µM:µg/ml)		Ponatinib inhibitör dozu (µM)			CI değerleri			Ponatinib DRI değerleri		
		%50	%70	%90	%50	%70	%90	%50	%70	%90
p:CCİ (1:10)	48 s	5,35	6,59	9,21	0,975	0,895	0,822	1,312	1,316	1,322
	72 s	5,18	6,84	10,67	0,929	0,923	0,925	1,250	1,220	1,175
p:OSM (1:11)	48 s	5,32	6,95	10,67	0,796	0,810	0,877	1,319	1,248	1,141
	72 s	5,12	7,17	12,28	0,938	0,917	0,993	1,265	1,164	1,021
p:PLİ (1:10)	48 s	5,92	7,45	10,73	0,855	0,860	0,881	1,184	1,165	1,135
	72 s	5,83	7,89	12,78	0,928	0,951	1,020	1,111	1,059	0,981

MCF-7 hücreleri p:CCİ (1:10, µM:µg/ml) , p:OSM (1:11, µM:µg/ml) ve p:PLİ (1:10, µM:µg/ml) kombinasyonlarına 48 ve 72 saat süresince maruz kaldılar. İnhibitör konsantrasyonları xCELLigence ile elde edilen sonuçlar kullanılarak Calcsyn yazılımında hesaplandı. $CI < 1$, $CI = 1$ ve $CI > 1$ değerleri sırası ile sinerjizm, additif ve antagonizmi göstermektedir. Etkilenen %50, %70 ve %90 fraksiyonlar için DRI değerleri, tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığında dozlar karşılaştırılarak ölçülmüştür. CI, kombinasyon indeksi; DRI, doz azaltma indeksi; p, ponatinib; BE, bitki ekstresi.

Ponatinib ve Bitki Ekstrelerinin Kombinasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Anti-proliferatif Etkileri

CCİ, OSM ve PLİ tekli uygulamalarının ve ponatinib ile kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri CFSE boyama ile akım sitometride değerlendirildi. Ponatinibin MCF-7 hücre proliferasyon hızını kontrole kıyasla

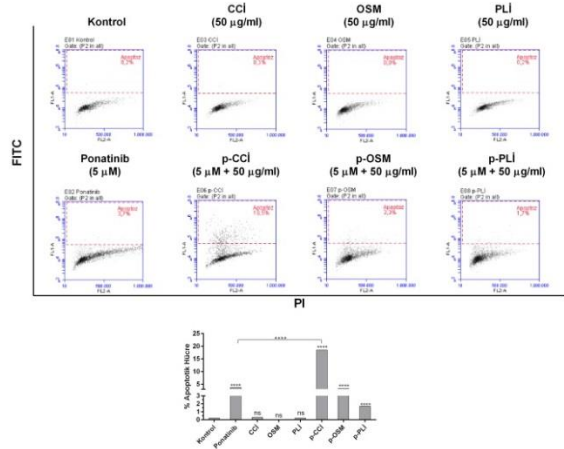
10 kat yavaşlattığı belirlendi. Tekli CCİ ve PLİ uygulamaları MCF-7 hücreleri üzerinde ılımlı düzeyde anti-proliferatif etki sergilerken, OSM uygulamasının en belirgin etkiyi göstererek proliferasyonu 4,8 kat baskıladığı saptandı (Şekil-5). Kombine p-CCİ ve p-PLİ uygulamalarının ponatinibin anti-proliferatif etkisini anlamlı düzeyde arttırdığı ortaya koyuldu (Şekil-5).



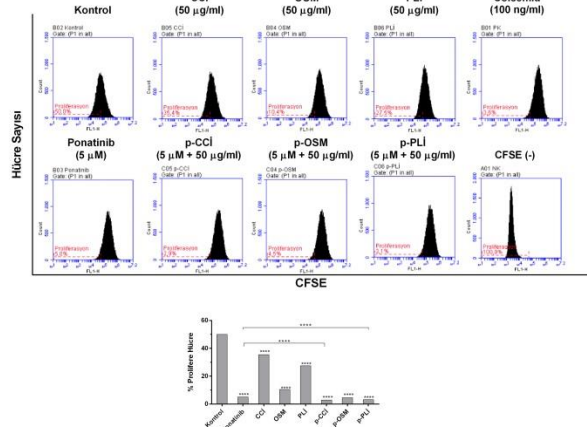
Şekil-3. Ponatinib, CCI, OSM, PLI ve kombinasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri. MCF-7 hücreleri, ponatinib (5 µM), CCI (50 µg/ml), OSM (50 µg/ml), PLI (50 µg/ml) ile tekli ve kombinasyon halinde (p-CCI, p-OSM ve p-PLI) 48 saat süresince kültüre edildi. Apoptoz indüksiyonu, akım sitometri kullanılarak Annexin V/PI boyaması yoluyla ölçüldü. Barların üzerindeki yıldızlar (*), kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olan farklılıkları göstermektedir (**** p<0,0001). Annexin V-/PI-fraksiyonu canlı hücreleri, Annexin V+/PI-fraksiyonu erken apoptotik hücreleri, Annexin V+/PI+ fraksiyonu geç apoptotik hücreleri ve Annexin V-/PI+ fraksiyonu nekrotik hücreleri temsil etmektedir. İstatistiksel analizler, toplam apoptotik hücre sayısı kullanılarak yapıldı.

Ponatinib ve Bitki Ekstrelerinin Kombinasyonlarının MCF-7 Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

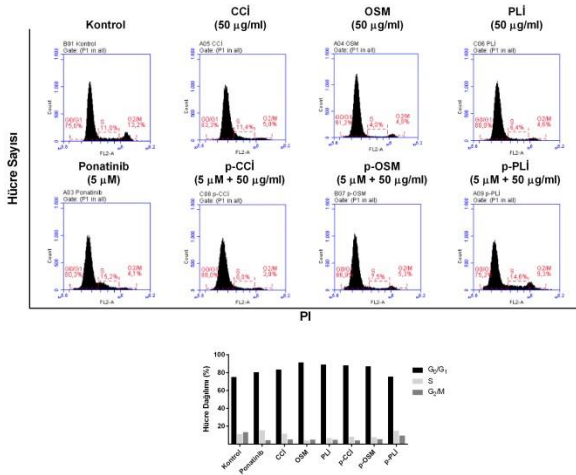
Hücre proliferasyonunu durdurduğunu belirlediğimiz CCI, OSM ve PLI tekli uygulamalarının ve ponatinib ile kombinasyonlarının MCF-7 hücre döngüsü düzenlenmesi üzerinde etkileri akım sitometride değerlendirildi. Ponatinibin anlamlı düzeyde G₀/G₁ ve S tutulumuna neden olduğu belirlendi. CCI, OSM ve PLI uygulamaları 48 saatte MCF-7 hücrelerinin G₁-S geçişini bloke etmekteydi. Anti-proliferasyon sonuçları ile uyumlu olarak, en belirgin G₀/G₁ tutulumu OSM uygulaması sonrasında gözlemlendi (Şekil-6). Kombine p-CCI ve p-OSM uygulamaları tekli ponatinib uygulamasından daha yüksek düzeyde G₀/G₁ birikimine neden olurken, bu birikime eşlik eden S ve G₂/M fazlarında azalmalarını indüklemiştir. Kombine p-PLI uygulaması sonrasında gözlenen S birikimi ise tekli ponatinib uygulamasına göre anlamlı farklılık göstermemektedir (Şekil-6).



Şekil-4. Ponatinib, CCI, OSM, PLI ve kombinasyonlarının MCF-7 hücrelerinde DNA fragmentasyonu üzerine etkileri. MCF-7 hücreleri, ponatinib (5 µM), CCI (50 µg/ml), OSM (50 µg/ml), PLI (50 µg/ml) ile tekli ve kombinasyon halinde (p-CCI, p-OSM ve p-PLI) 48 saat süresince kültüre edildi. DNA fragmentasyonu gözlenen apoptotik hücre yüzdesi, akım sitometride ölçüldü. Barların üzerindeki yıldızlar (*), kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olan farklılıkları göstermektedir (**** p<0,0001, ns p>0,05).



Şekil-5. Ponatinib, CCI, OSM, PLI ve kombinasyonlarının MCF-7 hücre proliferasyonu üzerine etkileri. CFSE boyamasından sonra ponatinib (5 µM), CCI (50 µg/ml), OSM (50 µg/ml), PLI (50 µg/ml) ile tekli ve kombinasyon halinde (p-CCI, p-OSM ve p-PLI) 48 saat süresince kültüre edilen MCF-7 hücrelerinin proliferasyon hızları akım sitometride ölçüldü. Colcemid ile muamele edilmiş hücreler pozitif kontrol olarak ve negatif kontrol olarak CFSE ile boyanmamış hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Barların üzerindeki yıldızlar (*), kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olan farklılıkları göstermektedir (**** p<0,0001).



Şekil-6. Ponatinib, CCI, OSM, PLI ve kombinasyonlarının MCF-7 hücre döngüsü üzerindeki etkileri. MCF-7 hücreleri, ponatinib (5 µM), CCI (50 µg/ml), OSM (50 µg/ml), PLI (50 µg/ml) ile tekli ve kombinasyon halinde (p-CCI, p-OSM ve p-PLI) 48 saat süresince kültüre edildi. Hücre döngüsü düzenlenmesi, akım sitometri kullanılarak DNA'nın PI ile boyaması yoluyla incelendi. Hücre döngüsünün G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarında biriken hücrelerin yüzdesi belirlendi.

TARTIŞMA

Meme kanserinin görülme sıklığının ve ölüm oranlarının yüksek seyretmesi nedeniyle (2), hastalığın önlenmesinde kullanılabilecek veya mevcut tedavilerin eksiklerini giderebilecek yeni stratejilerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Ponatinib meme kanseri tedavisinde potansiyel bir *in vitro* terapi olsa da (13, 14, 24), ponatinibin kanser hastalarında ciddi yan etkilere neden olabildiği rapor edilmiştir (30). Kombinasyon terapileri, yanıtı ve tolere edilebilirliği arttırmak ve direnci azaltmak için rasyonel stratejiler olduğundan malignitelerde tedavi standardı haline gelmişlerdir. Bitkisel bileşiklerin ve bitki ekstraktlarının meme kanseri üzerindeki anti-kanser etkinliği yaygın olarak araştırılmaktadır (31-33). Bitkilerden elde edilen doğal ürünler sağkalım, bağışıklık ve yaşam kalitesi üzerinde faydalı etkilere ve daha güvenli profile sahip olabilir (34). Bu nedenle çalışmamız kapsamında, meme kanseri olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan ÖR pozitif grubunun hedeflenmesinde gerekli ponatinib dozunu azaltabilecek, fitokimyasal ajanları içeren yeni *in vitro* kombinasyon terapileri tanımlamayı hedefledik.

Türkiye'de yetişen tıbbi bitkilerden *Centaurea calolepis* Boiss. anti-inflamatuar, antioksidan özelliklere sahiptir. *Centaurea calolepis*'in

sekonder metabolitlerinin meme kanseri dahil birçok solid tümör tipine karşı *in vitro* sitotoksikite sergilediği belirlenmiştir (17). Benzer şekilde çalışmamızda flavonoit, tanen, antrasen içeriğine sahip *Centaurea calolepis* infüzyon ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Ayrıca hücre döngüsünün G₁-S geçişini belirgin seviyede blokladığı, anti-proliferatif ve apoptotik etki sergilediği ortaya koyuldu. Çalışmamız *Centaurea calolepis* bitkisinin apoptotik ve anti-proliferatif etkinliğinin değerlendirildiği ilk araştırma olma niteliğindedir. Bununla birlikte, *Centaurea* cinsine ait farklı bitkilerle yapılan *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Meme kanseri hücrelerinde *Centaurea bruguierana* ekstresinin apoptoza ve G₁ hücre döngüsü tutulumuna neden olduğu (35), *Centaurea cyanus* ekstresinin apoptoza ve subG₁ ve G₁ hücre döngüsü tutulumuna neden olduğu gösterilmiştir (36). Ayrıca çalışmamızda, *Centaurea calolepis* su ekstresi uygulamasının meme kanseri hücre popülasyonunun %50'sini hedeflemek için gerekli ponatinib dozunu azalttığı (1,3 kat) belirlendi. Ponatinib tedavisinin yan etkilerinin (30) giderilmesinde uygulanan ponatinib dozunun azaltılmasının önemi büyüktür. Ponatinib ile kombinasyon halinde *Centaurea calolepis* ekstresi uygulanan hücrelerde, ponatinib ile indüklenen apoptozun, anti-proliferasyonun ve G₀/G₁ hücre döngüsü tutulumunun oldukça belirgin düzeyde yükseldiği de ortaya koyuldu. *Centaurea albonitens* ekstresinin kombinasyonel anti-kanser etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (37), farklı lösemi hücre modellerinde vinkristinin kemoterapötik duyarlılığını artırdığı belirlenmiştir. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, *Centaurea albonitens* ekstresinin vinkristin aracılı apoptozu hücre döngüsü duraklamasına neden olmadan arttırdığı rapor edilmiştir.

Batı Anadolu'ya endemik *Origanum sipyleum* L. bitkisi anti-inflamatuar, antioksidan özelliklere sahiptir. *Origanum sipyleum* bitkisinin kolon kanserinde anti-proliferatif etkinlik sergilediği ortaya konulmuştur (21). Çalışmamızda terpenoit, flavonoit, tanen, antrasen içeriğine sahip *Origanum sipyleum* metanol ekstresinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Sitotoksik etkilerine ek olarak, ılımlı seviyede apoptozu indüklediği, belirgin olarak proliferasyonu baskıladığı ve ponatinibden daha

güçlü düzeyde G₀/G₁ hücre döngüsü tutulumuna neden olduğu ortaya koyuldu. Literatürde *Origanum* cinsine ait farklı türlerle yapılan meme kanseri *in vitro* çalışmalar da mevcuttur. *Origanum majorana* etanol ekstresinin meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemesinin yanında düşük dozlarda hücre döngüsünü G₂/M fazında durdururken yüksek dozlarda sub-G₀ birikimine neden olduğu bildirilmiştir (38). Yine bizim sonuçlarımızla paralel olarak, *Origanum acutidens* ekstresinin meme kanserinde apoptozu indüklediği (39), liyofilize *Origanum vulgare* meme kanserinde apoptozu indüklediği ve sub-G₀/G₁ birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (40). Ayrıca *Origanum sipyleum* uygulamasının ponatinibin etkinliği üzerindeki etkilerini araştırdığımızda, MCF-7 hücre popülasyonunun %50'sini hedeflemek için gerekli ponatinib dozunu azalttığı (1,3 kat) belirlendi. *Origanum sipyleum* kombinasyonu aracılığıyla gerekli ponatinib dozunun azalması, ponatinib tedavisinin yan etkilerinin azaltılmasına katkısı olacaktır. *Origanum vulgare* etanol ekstresinin kolon kanseri hücrelerinde 5-Florourasil aracılı apoptozu arttırdığı ortaya koyulmuştur (41). *Origanum sipyleum* ekstresinin ponatinib ile indüklenen G₀/G₁ tutulumunu güçlendirdiği ancak ponatinibin indüklediği apoptozu arttırmadığı belirlendi. Sonuçlarımız, *Origanum sipyleum* MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser özelliğini sitostatik etkilerle gösteriyor olabileceğini görüşünü desteklemektedir.

Flavonoit, tanen ve antrasen yapısında bileşikler içerdiği belirlenen *Phlomis lycia* D. Don infüzyon ekstresinin, çalışma kapsamındaki diğer ekstrelerle kıyasla MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Çalışmamız Türkiye'de kullanılan tıbbi bitkilerden biri olan *Phlomis lycia* türünün anti-kanser etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bununla beraber literatürde *Phlomis* cinsine ait farklı türlerle yapılan meme kanseri *in vitro* çalışmalar da mevcuttur. Stojković ve ark. tarafından yapılan çalışmada *Phlomis fruticosa* L. metanol ekstresinin MCF-7 hücrelerinde zayıf anti-kanser etki (IC₅₀: 454 µg/ml) sergilediği ortaya koyulmuştur (42). Sitotoksiste

sonuçlarımız türler arasındaki farklılığı ortaya koyar nitelikte olup, çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde *Phlomis lycia* infüzyon ekstresi yüksek sitotoksik etkinliğe sahip olarak IC₅₀ dozu 42,5 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yarmolinsky ve ark. yaptıkları çalışmada, *Phlomis viscosa* etanol ekstresinin MCF-7 hücre canlılığını doksorubisinden bile daha belirgin seviyede azalttığını ortaya koyarak, güçlü anti-kanser etkinliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (43). Bu bilgiyle uyumlu olarak çalışmamızda da, *Phlomis lycia* ekstresinin MCF-7 hücre döngüsünün G₁-S geçişini belirgin seviyede blokladığı, anti-proliferatif ve apoptotik etki sergilediği ortaya koyuldu. *Phlomis* cinsi bitkilerden *Phlomis leucophracta* ile prostat kanserinde anti-kanser kombinasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve *Phlomis leucophracta* ekstresinin paklitaksel ile kombinasyonunun sinerjistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (25). Benzer şekilde çalışmamızda, *Phlomis Lycia*, ponatinib ile kombine uygulamasında, ponatinibin apoptotik etkisini en yüksek seviyede arttıran bitki ekstresi olarak belirlendi. Buna ek olarak ponatinibin anti-proliferatif etkisini de güçlendirdiği ortaya koyuldu.

SONUÇ

Ponatinib ile *Centaurea calolepis* Boiss., *Origanum sipyleum* L. ve *Phlomis lycia* D. Don bitki ekstrelerinin kombinasyonları, *in vitro* apoptozun indüklenmesi, proliferasyonunun baskılanması ve hücre döngüsünün bloklanması ile MCF-7 ÖR pozitif meme kanseri hücre modelinde anti-kanser aktivitesi sergiledi. Belirlenen yüksek anti-kanser etkilerinin ışığında, Türkiye'de yetişen bu endemik bitki ekstrelerinin meme kanseri hastalarının tedavisinde potansiyel strateji temsil edebileceği görüşündeyiz.

Açıklamalar

Çalışmaya ait proje bütçe desteği bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan bitki ekstreleri TÜBİTAK 110S289 no'lu projeden sağlanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu makale için çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Arya GC, Kaur K, Jaitak V. Isoxazole derivatives as anticancer agent: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur J Med Chem* 2021; 221: 113511.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69 (1): 7-34.
3. Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem* 2015; 6 (3): 231-9.
4. Eric I, Petek Eric A, Kristek J, Koprivicic I, Babic M. Breast Cancer in Young Women: Pathologic and Immunohistochemical Features. *Acta Clin Croat* 2018; 57 (3): 497-502.
5. Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, Wang Y, Zou D, Thomas RM, ve ark. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem* 2010; 53 (12): 4701-19.
6. Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Thomas M, Keats J, ve ark. Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des* 2011; 77 (1): 1-11.
7. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, ve ark. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 2009; 16 (5): 401-12.
8. Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, Fantl V. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: fibroblast growth factors and their receptors. *Breast Cancer Res* 2000; 2 (3): 191-6.
9. Jitarii AA, Raica M, Cimpean AM, Suciuc SC. The role of PDGF-B/PDGFR-BETA axis in the normal development and carcinogenesis of the breast. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 131: 46-52.
10. Singh DD, Yadav DK. TNBC: Potential Targeting of Multiple Receptors for a Therapeutic Breakthrough, Nanomedicine, and Immunotherapy. *Biomedicines* 2021; 9 (8): 876
11. Musumeci F, Greco C, Grossi G, Molinari A, Schenone S. Recent Studies on Ponatinib in Cancers Other Than Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* 2018; 10 (11): 430
12. Shao W, Li S, Li L, Lin K, Liu X, Wang H, ve ark. Chemical genomics reveals inhibition of breast cancer lung metastasis by Ponatinib via c-Jun. *Protein Cell* 2019; 10 (3): 161-77.
13. Kim S, You D, Jeong Y, Yoon SY, Kim SA, Lee JE. Inhibition of platelet-derived growth factor C and their receptors additionally increases doxorubicin effects in triple-negative breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2021; 895: 173868.
14. Kim S, You D, Jeong Y, Yoon SY, Kim SA, Lee JE. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor synergistically increases the pharmacological effect of tamoxifen in estrogen receptor alpha positive breast cancer. *Oncol Lett* 2021; 21 (4): 294.
15. Tekeli Y, Sezgin M, Aktumsek A, Ozmen Guler G, Aydin Sanda M. Fatty acid composition of six *Centaurea* species growing in Konya, Turkey. *Nat Prod Res* 2010; 24 (20): 1883-9.
16. Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ural IO, ve ark. Antileishmanial activity of selected Turkish medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2014;13(12):2047-55.
17. Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, ve ark. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharm Biol* 2011; 49 (8): 840-9.
18. Baser K, Özek T, Kürkçüoğlu M, Tümen G. Composition of the essential oil of *Origanum sipyleum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research* 1992; 4 (2): 139-42.
19. Durmuşkahya C, Alp H, Hortoğlu ZS, Toktas Ü, Kayalar H. X-ray fluorescence spectroscopic determination of heavy metals and trace elements in aerial parts of *Origanum sipyleum* L from Turkey. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2016; 15 (5): 1013-5.
20. Kargioğlu M, Cenkcı S, Serteser A, Evliyaoğlu N, Konuk M, Kök MŞ, ve ark. An ethnobotanical survey of inner-West Anatolia, Turkey. *Human Ecology* 2008; 36 (5): 763-77.

21. Zengin G, Ferrante C, Orlando G, Zheleva-Dimitrova D, Gevrenova R, Recinella L, ve ark. Chemical profiling and pharmaco-toxicological activity of *Origanum sipyleum* extracts: Exploring for novel sources for potential therapeutic agents. *J Food Biochem* 2019; 43 (11): e13003.
22. Saracoğlu İ, Harput ÜŞ, Çalış İ, Ogiara Y. Phenolic Constituents From *Phlomis Lycia*. *Turkish Journal Of Chemistry* 2002; 26 (1): 133-42.
23. Fakir H, Korkmaz M, Güller B. Medicinal Plant Diversity Of Western Mediterreanean Region In Turkey. *Journal Of Applied Biological Sciences* 2009; 3 (2): 33-43.
24. Okcanoğlu TB, Kayabaşı Ç, Süslüer SY, Gündüz C. The Relationship Between Long Non-Coding RNA Expressions and Ponatinib in Breast Cancer. *Cyprus Journal of Medical Sciences* 2019; 4 (2): 125-30.
25. Dogan Sigva ZO, Balcı Okcanoglu T, Biray Avcı C, Yılmaz Susluer S, Kayabasi C, Turna B, ve ark. Investigation of the synergistic effects of paclitaxel and herbal substances and endemic plant extracts on cell cycle and apoptosis signal pathways in prostate cancer cell lines. *Gene* 2019; 687: 261-71.
26. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010; 70 (2): 440-6.
27. Kayabasi C, Yelken BO, Asik A, Okcanoglu TB, Sogutlu F, Gasimli R, ve ark. PI3K/mTOR dual-inhibition with VS-5584 enhances anti-leukemic efficacy of ponatinib in blasts and Ph-negative LSCs of chronic myeloid leukemia. *Eur J Pharmacol* 2021; 910: 174446.
28. Gulla S, Lomada D, Araveti PB, Srivastava A, Murikinati MK, Reddy KR, ve ark. Titanium dioxide nanotubes conjugated with quercetin function as an effective anticancer agent by inducing apoptosis in melanoma cells. *Journal of Nanostructure in Chemistry* 2021: 1-14.
29. Mughees M, Wajid S, Samim M. Cytotoxic potential of *Artemisia absinthium* extract loaded polymeric nanoparticles against breast cancer cells: Insight into the protein targets. *Int J Pharm* 2020;586:119583.
30. Talbert DR, Doherty KR, Trusk PB, Moran DM, Shell SA, Bacus S. A multi-parameter in vitro screen in human stem cell-derived cardiomyocytes identifies ponatinib-induced structural and functional cardiac toxicity. *Toxicol Sci* 2015; 143 (1): 147-55.
31. Çelik Ta, Aslantürk Ös. *Carpobrotus acinaiformis* L. Metanol Ekstresinin Fitokimyasal Taraması ve Ekstrenin İnsan Metastatik Meme Kanseri (MCF-7) ve İnsan Kolon Kanseri (Caco-2) Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*; 30 (2): 163-75.
32. Çağlar HO, Süslüer SY, Kavaklı Ş, Gündüz C, Ertürk B, Özkinay F, ve ark. Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş miRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi* 2017; 56 (4): 183-92.
33. Altundag Em, Becer E, Gencalp D, Vatansever S. Kuersetin, Kurkumin Ve Kombinasyonlarının Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*; 44 (3): 424-36.
34. Yin SY, Wei WC, Jian FY, Yang NS. Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 302426.
35. Nasr FA, Shahat AA, Alqahtani AS, Ahmed MZ, Qamar W, Al-Mishari AA, ve ark. *Centaurea bruguierana* inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest, and induces apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Mol Biol Rep* 2020; 47 (8): 6043-51.
36. Keyvanloo Shahrestanaki M, Bagheri M, Ghanadian M, Aghaei M, Jafari SM. *Centaurea cyanus* extracted 13-O-acetylsolstitialin A decrease Bax/Bcl-2 ratio and expression of cyclin D1/Cdk-4 to induce apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2019; 120 (10): 18309-19.
37. Bahmani F, Esmaeili S, Bashash D, Dehghan-Nayeri N, Mashati P, Gharehbaghian A. *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2018; 99: 598-607.
38. Al Dhaheri Y, Eid A, AbuQamar S, Attoub S, Khasawneh M, Aiche G, ve ark. Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *Origanum majorana* extract: upregulation of TNF-alpha and downregulation of survivin and mutant p53. *PLoS One* 2013; 8 (2): e56649.
39. Tuncer E, Unver-Saraydin S, Tepe B, Karadayi S, Ozer H, Karadayi K, ve ark. Antitumor effects of *Origanum acutidens* extracts on human breast cancer. *J BUON* 2013; 18 (1): 77-85.

40. Kubatka P, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Vybohova D, Mojzis J, *ve ark*. Oregano demonstrates distinct tumour-suppressive effects in the breast carcinoma model. *Eur J Nutr* 2017; 56 (3): 1303-16.
41. Kamel KM, Khalil IA, Rateb ME, Elgendy H, Elhawary S. Chitosan-Coated Cinnamon/Oregano-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Augment 5-Fluorouracil Cytotoxicity for Colorectal Cancer: Extract Standardization, Nanoparticle Optimization, and Cytotoxicity Evaluation. *J Agric Food Chem* 2017; 65 (36): 7966-81.
42. Stojkovic D, Gasic U, Drakulic D, Zengin G, Stevanovic M, Rajcevic N, *ve ark*. Chemical profiling, antimicrobial, anti-enzymatic, and cytotoxic properties of *Phlomis fruticosa* L. *J Pharm Biomed Anal* 2021; 195: 113884.
43. Yarmolinsky L, Budovsky A, Ben-Shabat S, Khalfin B, Gorelick J, Bishitz Y, *ve ark*. Recent Updates on the Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Phlomis viscosa* Poiret. *Rejuvenation Res* 2019; 22 (4): 282-8.