

Yüksek Oranda Seyreltilmiş Homeopatik İlaçlar, RPMI-8226 Multipl Myelom Hücrelerinde Apoptoza Neden Olur : Bir Pilot Çalışma

Buket Altinok Gunes^{1,2} Murat Kilic¹ Tulin Ozkan² Nurbanu Gonulkirmaz² Nurcihan Guven³ Asuman Sunguroglu²

Address for correspondence : Buket Altinok Gunes, PhD, Department of Medical Laboratory Techniques, Ankara University Vocational School of Health Services, Fatih St. No: 197/A Kecioren, Ankara 06290, Turkey (e-mail: baltinok@ankara.edu.tr).

ÖZET

Giriş: Multipl myelom (MM), hematolojik maligniteler arasında en yaygın ikinci kanser türüdür ve tedavisi zordur. Doğası gereği tartışmalı olmakla birlikte, homeopatinin etkileri hem klinik olarak hem de çeşitli kanser hücre tiplerinde in vitro olarak test edilmiştir. Ancak, homeopatik ilaçların MM hücreleri üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu ön çalışmada, insan MM hücre hattı üzerinde Arsenicum album, Hecla lava, Carcinosinum ve Carboneum sulphuratum 200C'nin etkilerini araştırdık.

Yöntemler: RPMI-8226 MM hücre hattı, in vitro olarak 96 saate kadar kültüre edildi ve dört farklı homeopatik preparat ile muamele edildi. Hücre canlılığını değerlendirmek için spektrofotometrik 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, apoptozu belirlemek için akım sitometrik Annexin V-PE/7-aktinomisin D (7-AAD) ve hücre döngüsünü incelemek için propidyum iyodür (PI) boyaması kullanıldı.

Sonuçlar: MTT testi, kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında, dört homeopatik preparatın da hücre canlılığını zamanla azalttığını gösterdi. Özellikle 72 ve 96 saatlik uygulamalarda hücrelerin yalnızca %50'si canlı kaldı. Benzer şekilde, 96 saatlik tedavi sonrasında, tüm homeopatik preparatlar için canlı hücre oranı önemli ölçüde azalırken, erken apoptozda olan hücrelerin (Annexin-V-PE+/7AAD-) oranı anlamlı derecede arttı. PI boyaması ile elde edilen hücre döngüsü verilerine göre, Hecla lava ve Carboneum sulphuratum ile muamele edilen hücrelerde, hücre döngüsünün sub-G0/G1 fazında istatistiksel olarak anlamlı bir birikim gözlemlendi ($p < 0,05$).

Değerlendirme: Bu çalışma, dört farklı homeopatik ilacın her birinin bir MM hücre hattında apoptoza neden olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Arsenicum album, Hecla lava, Carcinosinum ve Carboneum sulphuratum'un MM tedavisinde tamamlayıcı bir terapötik seçenek olarak potansiyelinin daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Homeopati, Sitotoksikite, Apoptoz, Hücre döngüsü durması, Multipl myelom

Giriş

Multipl myelom (MM), kemik iliği mikro çevresinde plazma hücrelerinin malign transformasyonu sonucunda kontrolsüz klonal proliferasyon ile karakterize edilen bir hematolojik kanser türüdür. MM, tüm malignitelerin %1,3'ünü ve hematolojik neoplazmların %15'ini oluşturmaktadır.¹ Son yıllarda farklı etki mekanizmalarına sahip yeni ilaçların keşfi, MM tedavi yaklaşımlarını değiştirmiş olsa da, sağkalım süresi hastanın yaşına bağlı olarak 6 ila 10 yıl ile sınırlı kalmıştır. Ne yazık ki, genetik anormallikler ve epigenetik farklılıklar nedeniyle bu yeni anti-kanser ilaçlara karşı direnç hala önemli bir sorun teşkil etmekte olup, bu kanser türü için yeni tedavi stratejilerine olan ihtiyaç devam etmektedir.²⁻⁴

Homeopati , güçlendirilmiş mikro ve hatta nano dozlarda doğal maddelerin yüksek oranda seyreltilerek kullanıldığı tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) tedavi yöntemlerinden biridir.⁵⁻⁶ Homeopati , 19. yüzyılda Samuel Hahnemann tarafından icat edilmiş olup, özellikle Fransa, Almanya, Hindistan, Güney Amerika, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olarak kullanılmaktadır.⁷ Homeopatik olarak hazırlanmış ilaçların birçok kanser türünde etkinliğini gösteren deneysel hayvan çalışmaları⁸⁻¹² ve insan çalışmaları^{6, 13-15} bulunmaktadır. Bu durum, yeni anti-kanser tedavilerin geliştirilmesi için zengin bir potansiyel olduğunu düşündürmektedir. Ancak, bazı çevrelerde bu tedavi yaklaşımının sadece plasebo etkisine bağlı olduğu öne sürülmektedir, çünkü genellikle yüksek oranda seyreltilerek kullanılır ve homeopatik preparatların etki mekanizması bilinmemektedir.¹⁶

Bununla birlikte, plasebo etkisinin bulunmadığı in vitro ortamda, homeopatik ilaçların kanser hücrelerini tedavi etme potansiyelini destekleyen deneysel kanıtlar mevcuttur. Örneğin, çeşitli çalışmalar, homeopatik ilaçların sitotoksik özelliklere sahip olduğunu^{2, 10, 17-19}, apoptozu indükleyebildiğini^{2, 5, 17-19} ve farklı kanser hücre tiplerinde hücre döngüsü evrelerini değiştirebildiğini^{5, 17-19} göstermiştir. Özetle, literatürdeki hem in vitro hem de in vivo çalışmalar, farklı potenslerdeki homeopatik ilaçların kanser türleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğunu, tümör boyutunu azalttığını ve sağkalım oranını artırdığını ortaya koymaktadır.

Bu kanıtlar dizisine rağmen, MM hastalarında homeopatik ilaçların potansiyel yararlılığı yalnızca Hecla lava'nın etkilerini bildiren bir kongre sunumunda ortaya konulmuştur.⁴ Ancak, in vitro ortamda MM hücrelerinde homeopatik ilaçların moleküler ve biyolojik etkinliği üzerine herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu pilot çalışmanın amacı, homeopatik ilaçların MM hücreleri üzerindeki moleküler düzeydeki anti-kanser aktiviteleri hakkında ilk bilgileri sağlamaktır. Bu çalışma için dört homeopatik ilaç 200C potensinde seçilmiştir : Arsenicum album ve Carcinosinum, daha önce in vitro olarak iyi çalışılmış ve karakterize edilmiştir.^{17, 20} Hecla lava , şimdiye kadar MM hastalarında test edilen tek ilaç olması nedeniyle seçilmiştir.⁴ Carboneum sulphuratum , daha önce moleküler düzeyde çalışılmamış ancak kanser tedavisinin olumsuz etkilerini azaltmada potansiyel olarak yararlı olduğu belirtilmiştir.²⁰

Yöntemler

Homeopatik İlaçların Hazırlanması

Türkiye'de homeopatik ilaçlar genellikle, su içinde çözdürülmüş ilaçlı nişasta tanecikleri şeklinde hastalara verilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, sıvı ilaçlar veya ilaçlandırılmış potensler yerine bu tür bir homeopatik preparat tercih edilmiştir.

Bu doğrultuda, deneysel kullanım için bir stok çözelti hazırlandı. Çözelti, daha önce Arsenicum album (200C), Hecla lava (200C), Carcinosinum (200C) ve Carboneum sulphuratum (200C) (Helios Homeopathy Ltd., İngiltere) homeopatik ilaçlarıyla püskürtülerek ilaçlanmış nişasta taneciklerinden oluşturuldu. Daha sonra bu tanecikler, 10 mg/100 µL oranında steril saf su içinde çözüldü. Bu stok çözelti, nişasta partiküllerini uzaklaştırmak için santrifüj edildi ve hemen kullanıldı. Tüm homeopatik ilaçlar, her deney için taze olarak hazırlandı.

Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

İnsan multipl myelom (MM) hücre hattı RPMI-8226 , American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, Amerika Birleşik Devletleri)'nden temin edilmiş ve tam ortamda (RPMI 1640 ortamı, L-glutamin (Bio-Ind, Amerika Birleşik Devletleri), %10 sıgır fetüsü serum (Bio-Ind, Amerika Birleşik Devletleri), 100 U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri)) 1×10^6 hücre/mL yoğunluğunda kültüre edilmiştir. Hücreler, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ortamında bir inkübatörde büyütülmüştür.²¹

Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT; Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemiyle belirlenmiştir, üreticinin talimatlarına göre uygulanmıştır. Kısaca, RPMI-8226 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta 1×10^4 hücre sayısı/ kuyucuk hücre yoğunluğunda ve tamamlayıcı ortamda eklenerek hacim 100 µL tamamlanmıştır. Hücreler, kültürün başlangıcında her bir homeopatik preparatın tek dozuyla veya kontrol ile muamele edilmiştir. Homeopatik preparatlar için çözücü olarak damıtılmış su kullanıldığından, aynı hacimde damıtılmış su da taşıyıcı (negatif) kontrol olarak kullanılmıştır. Her deneyde, her bir ilaç ve damıtılmış suyun en yüksek konsantrasyonu %0.5 'ten fazla olmamıştır.²¹

Uygun zaman diliminde (24, 48, 72 veya 96 saat), hücreler 5 mg/ mL MTT çözeltisi ile 37°C'de ek olarak 4 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında, formazanı çözmek için sodyum dodesilsülfat (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) içeren bir çözeltide tetrazolium tuzu çözülmüştür ve plakalar gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Her bir örneğin optik yoğunluğu (OD), Biotek (Amerika Birleşik Devletleri) spektrofotometrik plaka okuyucu ile 550 nm'de ve 690 nm referans dalga boyunda ölçülmüştür. Kontrol hücrelerinin OD 'si %100 canlılık olarak kabul edilmiş ve her tedavi grubundaki hücre canlılık yüzdesi buna göre hesaplanmıştır.

Apoptozun Akım Sitometrik Analizi

RPMI-8226 hücreleri (1×10^5 hücre/çukur), her bir homeopatik ilaç veya kontrol ile birlikte tam besiyeri içinde 24 kuyucuklu plaklara ekildi ve 96 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra yumuşak pipetleme ile hasat edilerek fosfat tamponlu salin (PBS; Merck, Almanya) ile iki kez yıkandı. Hücreler santrifüj edildikten sonra, üretici protokolüne göre (BioLegend, Amerika Birleşik Devletleri) Annexin V-PE ve 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) ile boyandı. Kısaca , hücreler 1×BB (Bağlanma Tamponu) içerisinde 100 µL hacminde tekrar süspanse edildi ve eşit miktarda Annexin V-PE (5 µL) ve 7-AAD (5 µL) eklendi. Hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler tekrar PBS ile yıkandı ve ek olarak 400 µL 1×BB eklendi.

Apoptoz, akım sitometrisi kullanılarak (Accuri C6; BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri) değerlendirildi ve ilk olarak tek hücrelerin tanımlanması için ileri saçılım (forward scatter) ve yan saçılım (side scatter) kullanıldı.²¹

Hücre Döngüsü Analizi

RPMI-8226 hücreleri (5×10^5 hücre/well) 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve her bir kuyucuğa homeopatik ilaçlar veya kontrol grubu eklenmiş tam besiyerinde 96 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler daha sonra yumuşak pipetleme ile hasat edilerek soğuk PBS ile bir kez yıkandı ve %75 buz soğukluğundaki etanol (Merck, Almanya) ile 4 °C'de 30 dakika boyunca sabitlendi. Sabitleme sonrası hücreler PBS ile iki kez yıkandı, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 50 µL RNaz (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri; 100 µg/mL) ile 37 °C'de 15 dakika süreyle muamele edildi. Ardından hücrelere propidyum iyodür (PI; Sigma, Amerika Birleşik Devletleri; 50 µg/ mL stoktan 200 µL) eklendi ve hücreler karanlıkta 4 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Hücrelerin DNA içeriği, yukarıda belirtilen yöntemle benzer şekilde akım sitometrisi kullanılarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üç kez tekrarlanmış olup, her biri üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm deneysel veriler için ortalama $\pm$ SD (standart sapma) kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 8 yazılımı (GraphPad Software Inc, CA, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır. Kontrol grubu ile tedavi edilen gruplar arasındaki farkların karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve ardından Dunnett'in post-hoc testi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

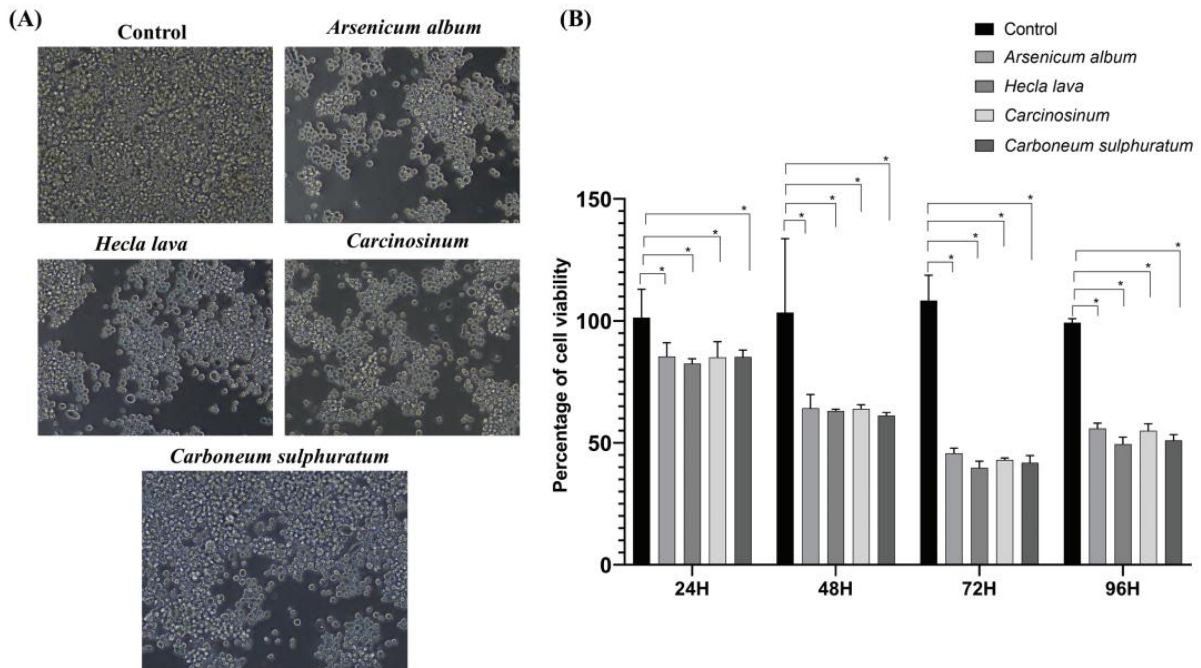


Fig. 1 (A) Phase contrast microscopy visualization of RPMI-8226 MM cell morphology treated with homeopathic medicines compared to control at 96 hours. (B) MTT assay analysis to determine the impact of *Arsenicum album*, *Hecla lava*, *Carcinosinum* and *Carboneum sulphuratum* (200C) on cell viability. Each homeopathic medicine was administered to RPMI8226 MM cells (1×10^4 /mL) for 24, 48, 72 and 96 hours. (* $p < 0.05$ shows significant differences from the control group).

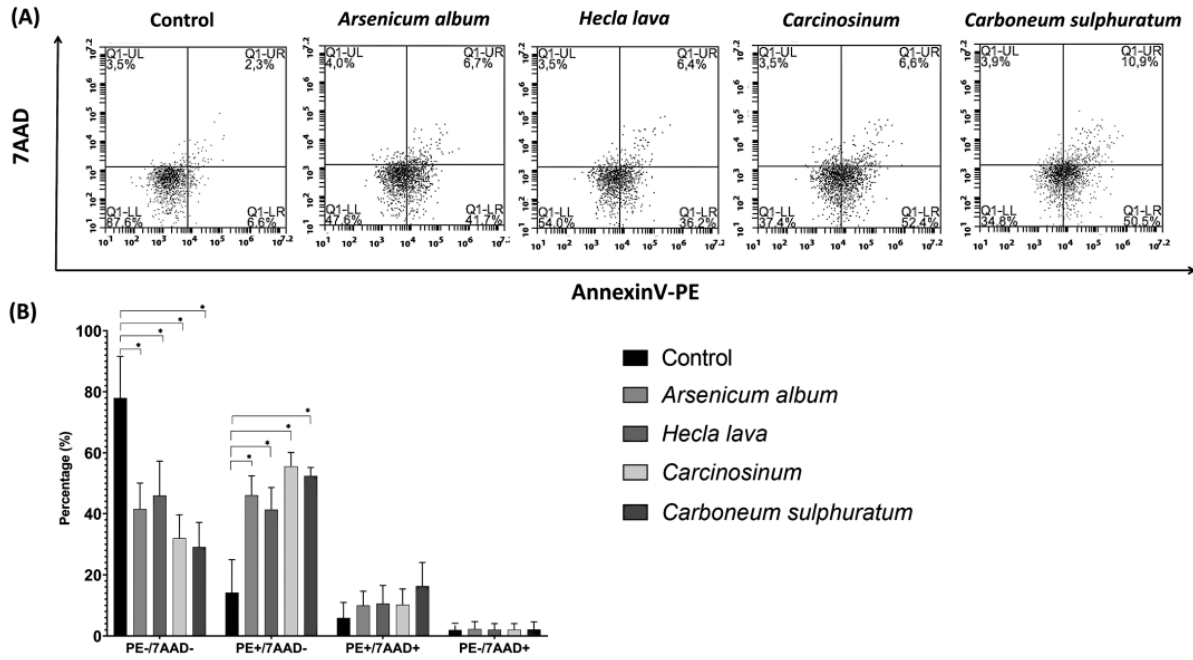


Fig. 2 (A) Representative flow cytometric dot plots showing the staining patterns for Annexin V-PE and 7-AAD markers of apoptosis and necrosis in MM cells treated with distilled water control or homeopathic medicines for 96 hours. On each dot plot the lower left quadrant shows viable cells (PE-/7AAD-); the lower right quadrant shows early apoptotic cells (PE+/7AAD-); the upper right quadrant shows late apoptotic cells (PE+/7AAD+); and the upper left quadrant shows necrotic cells (PE-/7AAD+). (B) Bar chart representation of percentage (%) MM cells with each PE/7-AAD staining pattern as assessed by flow cytometric dotplot (* $p < 0.05$ shows significant differences from the control within each staining pattern).

Sonuçlar

Homeopatik İlaçların Multipl Miyelom Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

Homeopatik ilaçların RPMI-8226 multipl miyelom (MM) hücre hattı üzerindeki canlılık üzerindeki etkisini değerlendirmek için MTT testi kullanıldı. İn vitro olarak kültüre edilen hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 200C homeopatik ilaçlarla muamele edildi.

Kontrol hücrelerinin (yalnızca distile su taşıyıcısına maruz kalan) canlılığı %100 olarak kabul edildi. Tüm homeopatik ilaçlar, test edilen her zaman noktasında hücre canlılığını azaltmış olup, bu azalma 24 ve 48 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı hale gelmiş ve 72 ve 96 saatlerde canlılık etkili bir şekilde yarıya düşmüştür ($p < 0,05$; Şekil 1A,B).

Homeopatik İlaçlar Multipl Miyelom Hücrelerinde Apoptozu İndükler

RPMI-8226 multipl miyelom (MM) hücreleri, indüklenen hücre ölümünün türünü (yani apoptoz veya nekroz) araştırmak amacıyla her bir homeopatik ilaç ile 96 saat süreyle muamele edildi. Sonuç olarak, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, canlı (PE-/7AAD-) hücrelerin oranı anlamlı derecede azalmış ($p < 0,05$), buna karşılık erken apoptotik (PE+/7AAD-) hücrelerin oranı her bir homeopatik ilaç tedavisinden sonra anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$; Şekil 2A,B).

Multipl Miyelom Hücrelerinde Hücre Döngüsü Durdurulması

RPMI-8226 multipl miyelom (MM) hücrelerinin homeopatik ilaçlara karşı gösterdiği sitotoksik yanıt temel alınarak, hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki eşzamanlı etkiler 96 saat sonunda akım sitometrisi ile değerlendirildi.

Sonuçlara göre, kontrol grubu hücrelerinin sub-G0/G1 fazındaki hücre döngüsü durdurulma oranı %37.55 (± 1.061) olarak belirlenirken, Arsenicum album, Hecla lava, Carcinosinum ve Carboneum sulphuratum ile tedavi edilen hücrelerin sub-G0/G1 fazındaki durdurulma oranları sırasıyla %40.1 (± 2.207), %49.2 (± 3.341), %40.667 (± 7.047) ve %48.3 (± 2.524) olarak artış göstermiştir (temsilci histogramlar Şekil 3A’da gösterilmiştir).

Ancak, sub-G0/G1 fazında istatistiksel olarak anlamlı hücre döngüsü durdurulması sadece Hecla lava ve Carboneum sulphuratum tedavileri için gözlemlenmiş olup ($p < 0.05$), Arsenicum album ve Carcinosinum tedavileri için anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 3B).

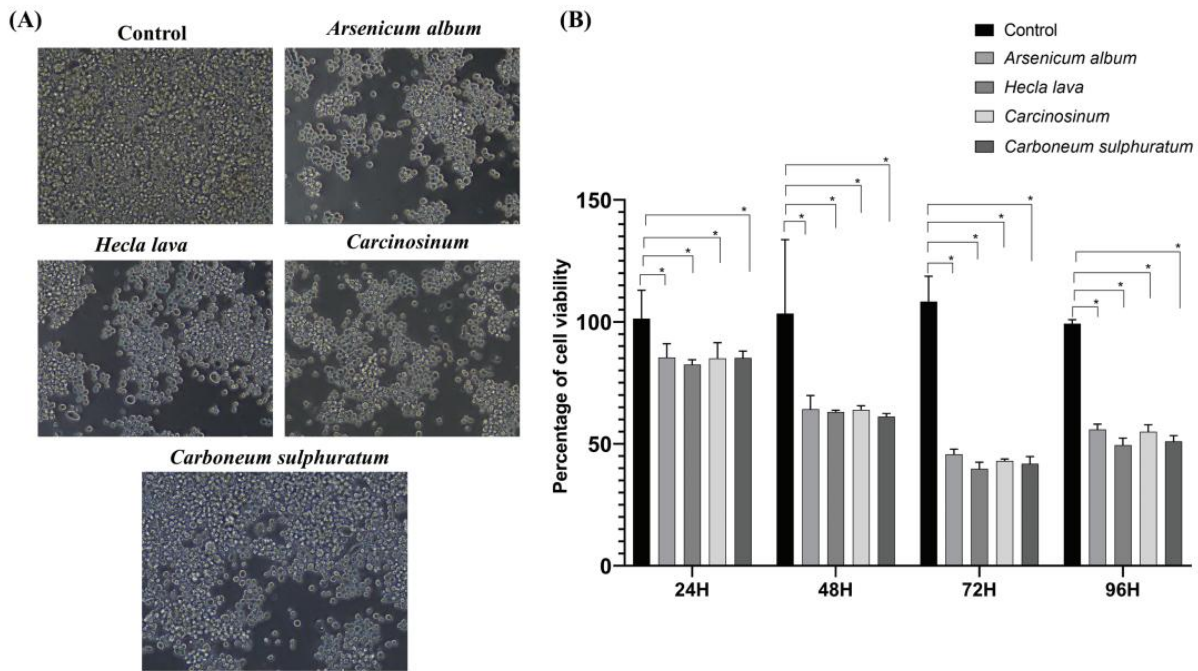


Fig. 1 (A) Phase contrast microscopy visualization of RPMI-8226 MM cell morphology treated with homeopathic medicines compared to control at 96 hours. (B) MTT assay analysis to determine the impact of Arsenicum album, Hecla lava, Carcinosinum and Carboneum sulphuratum (200C) on cell viability. Each homeopathic medicine was administered to RPMI8226 MM cells (1×10^4 /mL) for 24, 48, 72 and 96 hours. (* $p < 0.05$ shows significant differences from the control group).

Tartışma

Potansiyel bir tıbbi bileşiğin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi, onun kanser kemoterapisinde nasıl kullanılabileceğini anlamaya yönelik ilk adımdır.¹⁸ Kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek, özellikle kemoterapi ile gerçekleştirilen kanser tedavilerinin temel hedeflerinden biridir. Hücre döngüsünde yer alan anormal sinyal iletim yolunu ve/veya apoptoz mekanizmasını modüle ederek malign hücrelerin çoğalmasını seçici bir şekilde baskılayabilen herhangi bir madde veya ajan, anti-kanser çalışmalarda önemli bir kemoterapötik kaynak olarak değerlendirilir.²² Son yıllarda homeopati, kanser tedavisinde tamamlayıcı ve alternatif bir yöntem (CAM) olarak benimsenmiştir; ancak homeopatik ilaçların kanserli dokular üzerindeki etkilerine dair bilimsel verilerin yetersiz olduğu düşüncesi, bu tedavilere yönelik şüpheleri sürdürmektedir.²³ Bu nedenle, homeopatik preparatların malign hücrelerde apoptozu indüklediğinin gösterilmesi ve/veya apoptoz yoluyla

malign proliferasyonun baskılanması, tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) alanında son derece önemli bir konudur.

MacLaughlin ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında, Sabal serrulata homeopatik ilacının PC-3 ve DU-145 insan prostat kanseri hücre hatları ile MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmış ve Sabal serrulatanın insan prostat kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiğini, ancak meme kanseri üzerinde etkili olmadığını vurgulamıştır.¹⁰ Ayrıca, aynı çalışmada, homeopatik olarak hazırlanmış Thuja occidentalis ve Conium maculatumun prostat veya meme kanseri üzerindeki etkilerini, hem hayvan deneylerinde hem de sitotoksikite analizlerinde gözlemleyememişlerdir. Benzer şekilde, Arora ve arkadaşları 2013'te farklı potansiyel ve ana tentürleriyle hazırlanmış Sarsaparilla, Ruta graveolens ve Phytolacca decandranın böbrek, kolon ve meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini dozdan bağımsız olarak araştırmışlardır.² Çalışmalarında, ana tentüründeki homeopatik preparatların sitotoksik etkilerinin üç hücre hattında da maksimum olduğunu ve 30C'den 10M potansiyeline kadar olan potansiyel derecelerinde sitotoksikite oranlarının azaldığını göstermişlerdir. Bu veriler bir arada değerlendirildiğinde, her homeopatik ilacın her kanser türünde etkili olmayacağı sonucuna varılmaktadır. Bu nedenle, homeopatik ilaçların seçimi, özellikle kanser tedavisinde tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) tedavisi olarak değerlendirildiğinde, kanıt temelli olmalıdır.

Hecla lava ve Carboneum sulphuratum'ın potansiyel faydalılığını araştırmak ve daha önce diğer kanser hücre hatlarında test edilen Arsenicum album ve Carcininum için daha önce bildirilen bulguları doğrulamak amacıyla, özellikle MM hücrelerinde 200C potansiyelinde dikkatle seçilmiş dört homeopatik ilaç test ettik. Tüm dört ilacın MM hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve 96 saat sonunda apoptozu indüklediğini bulduk, ancak hücre döngüsü duraklaması açısından ilaçlar arasında farklı bir etki gözlemlendi: Sadece Hecla lava ve Carboneum sulphuratum anlamlı bir etki gösterdi, bu da MM hücrelerinde etki biçimlerinde belirli bir özgüllük olduğunu öne sürüyor ve yenilikçi bulguları ortaya koyuyor .

Arora ve Tandon, Ruta graveolens 30C ve ana tentürünün (MT) insan kolon kanseri hücre hatlarında (COLO-205) kanser öncesi etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, Ruta graveolens ana tentürünün hücre döngüsünü G2/M kontrol noktasında durdurduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle, bu duraklama ile hücrelerin intrinsik apoptoz yoluna girdiğini, proapoptotik genlerin yukarı regüle olduğunu ve anti-apoptotik genlerin aşağı regüle olduğunu düşünmüşlerdir. Arora ve arkadaşlarının, Sarsaparilla, Ruta graveolens ve Phytolacca decandra homeopatik ilaçlarının böbrek, kolon ve meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkilerini gösterdikleri çalışmada, aynı zamanda apoptoz etkilerinin morfolojik olarak gösterimini sunmuşlar ve farklı potansiyellerin, üç malign hücre hattında apoptoz kesecikleri, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonuna yol açtığını bildirmişlerdir. Bu durumda, hücre ölümü apoptoz yolları aracılığıyla gerçekleşmiştir.

2010 yılında, Frenkel ve arkadaşları, Carcininum ve Phytolacca ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinin, özellikle 72 ve 96 saat sonunda çoğunlukla sub-G0/G1 fazında durduğunu ve bu etkinin tedavi edilmemiş kontrol hücrelerinde gözlemlenmediğini göstermiştir.¹⁷ Araştırmacılar, bunun, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ifadesindeki değişikliklere, özellikle fosforile edilmiş Rb'nin aşağı regülasyonu, CDK inhibitörü p27'nin yukarı regülasyonu, caspase-7'nin aktivasyonu ve

apoptozla ilişkili proteinler olan poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)'ın bölünmesine bağlı olduğunu açıklamışlardır.

Çalışmamızda, MM hücre hattı üzerinde henüz gen ve/veya protein düzeyini araştırmamış olsak da, kullandığımız ilaçların apoptoz ve hücre döngüsü duraklama etkilerine dair akış sitometrisi kanıtları bulduk. Bulgularımız, Frenkel ve arkadaşlarının sonuçlarıyla tutarlıdır. ¹⁷ Çalışmamızda, kullandığımız dört homeopatik ilacın tamamının MM hücrelerinde apoptoz etkisi gösterdiğini ve bu ilaçlardan ikisinin hücre döngüsünü G2/M fazında değil, sub-G0/G1 fazında durdurduğunu gösterdik. Kromozomal DNA fragmentasyonu ve hücrelerin apoptoz yoluna girmesi, bir hücrenin hücre döngüsünün sub-G0/G1 fazına girdiğinin göstergeleridir. ²⁴ Bu nedenle, bulgularımız arasında, sub-G0/G1 fazında özel olarak duraklayan hücrelerin, DNA'larındaki fragmentasyon nedeniyle apoptoza uğradığını düşünüyoruz.

2014 yılında Sikdar ve arkadaşları tarafından yapılan, Condurango 6C ve 30C'nin insan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptoz etkilerini araştıran çalışmada, homeopatik ilacın 48 saat sonunda akciğer kanseri hücrelerinin %50'sinden fazlasını öldürdüğü, apoptozun caspase-3 aracılı sinyal iletimi yoluyla indüklendiği ve Condurango ile tedavi edilen hücrelerin hücre döngüsünün sub-G0/G1 fazında durakladığı bildirilmiştir. ⁵ Bizim çalışmamızda ise, MM hücrelerinin yarısından fazlasının öldüğü süre 72 ve 96 saat olarak bulundu. Bu farklar, kullanılan potansiyelin seçiminden kaynaklanabilir. Arora ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MT ve 30C'den 10M'ye kadar değişen potansiyellerle homeopatik ilaçların sitotoksik etkilerini göstermiş ve her bir potansiyelde ilaçların anlamlı sitotoksik etkiler gösterdiğini, ancak en yüksek etkinin MT için olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak, 30C'den 10M'ye kadar olan potansiyelerde sitotoksikliğin aynı hızda azaldığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, bizim çalışmamızda bulduğumuz sitotoksikliğin daha uzun süreli olmasının nedeni, Sikdar ve arkadaşları'nın 6C ve 30C ⁵ potansiyelleri ile çalışırken, bizim kullandığımız ilaçların 200C potansiyeline sahip olmamız olabilir.

Sonuç

Bu çalışmada, Arsenicum album, Hecla lava, Carcinosinum ve Carboneum sulphuratum homeopatik ilaçlarının 200C potansiyelinde MM hücreleri üzerinde sitotoksik, hücre döngüsü duraklaması ve apoptoz etkilerini literatürde ilk kez gösterdik. Ayrıca, Carboneum sulphuratum'un bir kanser hücre hattına karşı in vitro etkinliği de burada ilk kez gösterilmiştir. Bulgularımız, homeopatik ilaçların anti-kanser özelliklerini destekleyen diğer çalışmalarla uyumludur. Bu ilaçların, MM'nin geleneksel tedavisine yardımcı bir ajan olarak potansiyelinin daha fazla keşif gerektirdiği söylenebilir. Bizim tarafımızdan, bu ilaçların hücre döngüsü duraklaması ve apoptoz ile ilişkili gen ve protein ifadelerini nasıl etkileyebileceğini araştırmayı planlıyoruz.

Öne Çıkanlar

- Homeopatik ilaçlar, RPMI-8226 multiple myeloma hücrelerinin çoğalmasını engeller.
- Hecla lava ve Carboneum sulphuratum ile tedavi edilen RPMI-8226 multiple myeloma hücreleri, hücre döngüsünün sub-G0/G1 fazında duraklar.

- Homeopatik ilaçlar, RPMI-8226 multiple myeloma hücrelerinde apoptozu indukler.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerden herhangi bir özel hibe almadı.

Çıkar Çatışması

Beyan edilmemiştir.

Referanslar

- 1 Robak P, Drozd I, Szemraj J, Robak T. Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 2018;70:199–208
- 2 Arora S, Aggarwal A, Singla P, Jyoti S, Tandon S. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. *Homeopathy* 2013;102:274–282
- 3 Rajkumar SV. Myeloma today: disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 2016;91:90–100
- 4 Saunders PR. Cancer treatment: is there a role for homeopathy? *Planta Med Int Open* 2018;5:S7
- 5 Sikdar S, Kumar Saha S, Rahman Khuda-Bukhsh A. Relative apoptosis-inducing potential of homeopathic Condurango 6C and 30C in H460 lung cancer cells in vitro. *J Pharmacopuncture* 2014;17:59–69
- 6 Kassab S, Cummings M, Berkovitz S, van Haselen R, Fisher P. Homeopathic medicines for adverse effects of cancer treatments. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;2009:CD004845
- 7 Jonas WB, Gaddipati JP, Rajeshkumar NV, et al. Can homeopathic treatment slow prostate cancer growth? *Integr Cancer Ther* 2006; 5:343–349
- 8 Kumar KBH, Sunila ES, Kuttan G, Preethi KC, Venugopal CN, Kuttan R. Inhibition of chemically induced carcinogenesis by drugs used

in homeopathic medicine. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:98–102

9 Es S, Kuttan G, Kc P, Kuttan R. Effect of homeopathic medicines on transplanted tumors in mice. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007; 8:390–394

10 MacLaughlin BW, Gutschmuths B, Pretner E, et al. Effects of homeopathic preparations on human prostate cancer growth in cellular and animal models. *Integr Cancer Ther* 2006;5:362–372

11 Pathak S, Bhattacharjee N, Das JK, et al. Supportive evidence for the anticancerous potential of alternative medicine against hepatocarcinogenesis in mice. *Forsch Komplement Med* 2007; 14:148–156

12 Pathak S, Kumar Das J, Jyoti Biswas S, Khuda-Bukhsh AR. Protective potentials of a potentized homeopathic drug, *Lycopodium-30*, in ameliorating azo dye induced hepatocarcinogenesis in mice. *Mol Cell Biochem* 2006;285:121–131

13 Milazzo S, Russell N, Ernst E. Efficacy of homeopathic therapy in cancer treatment. *Eur J Cancer* 2006;42:282–289

14 Alonso-Juárez M, Hernández-Ruíza G, Bernal FO. Cáncer de páncreas, diagnóstico y tratamiento paliativo con terapia homeopática. *Rev Med Homeopat* 2014;7:17–23

15 Balzarini A, Felisi E, Martini A, De Conno F. Efficacy of homeopathic treatment of skin reactions during radiotherapy for breast cancer: a randomised, double-blind clinical trial. *Br Homeopath J* 2000;89:8–12

16 Shang A, Huwiler-Müntener K, Nartey L, et al. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy. *Lancet* 2005;366:726–732

17 Frenkel M, Mishra BM, Sen S, et al. Cytotoxic effects of ultradiluted remedies on breast cancer cells. *Int J Oncol* 2010; 36:395–403

- 18 Arora S, Tandon S. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by *Ruta graveolens* in human colon cancer cells. *Homeopathy* 2015;104:36–47
- 19 Basu N, Garg M, Tandon C, Das BC, Tandon S. *Arsenicum album* induces cell cycle arrest and apoptosis, and inhibits epithelial–mesenchymal transition in hormone-dependent MCF7 breast cancer cells. *Homeopathy* 2023;112:160–169
- 20 Bagot JL. How to prescribe *Thuja occidentalis* in oncology? Analysis of the literature, study of practices and personal experience. *Rev Homeopath* 2020;11:e26–e32
- 21 Ozkan T, Hekmatshoar Y, Karabay AZ, et al. Assessment of azithromycin as an anticancer agent for treatment of imatinib sensitive and resistant CML cells. *Leuk Res* 2021;102:106523
- 22 Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2003;3:745–755
- 23 Naser B, Bodinet C, Tegtmeier M, Lindequist U. *Thuja occidentalis* (*Arbor vitae*): a review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:69–78
- 24 Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005;19:2705–2714