

Condurango 6C ve 30C'nin H460 Akciğer Kanseri Hücrelerinde İn Vitro Göreceli Apoptoz İndüklenme Potansiyeli

— Homeopatik Condurango'nun H460 hücrelerinde apoptozu indüklemesi

Yazarlar: Sourav Sikdar, Santu Kumar Saha, Anisur Rahman Khuda-Bukhsh

Sitogenetik ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Zooloji Bölümü, Kalyani Üniversitesi, Kalyani-741235, Hindistan

Anahtar Kelimeler

Apoptoz, Condurango 6C ve 30C, Kaspaz-3, homeopati, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (H460), reaktif oksijen türleri

Özet

Çalışmanın Amacı : Homeopatide, homeopatik olarak fazla seyreltilmiş potenslerin herhangi bir hastalık durumuna karşı daha fazla koruyucu/iyileştirici etki sağladığı iddia edilmektedir. Condurango'nun potansize edilmiş formları, sindirim problemlerinin yanı sıra özofagus ve mide kanserlerinin tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Ancak, biri Avogadro sınırının altında (6C) ve diğeri bu sınırın üzerinde (30C, orijinal ilaç molekülü içermeyen) seyreltilmiş olan Condurango formlarının, *in vitro* akciğer kanseri hücrelerine karşı hücre öldürme (apoptoz) etkinlikleri ve sinyal yolları daha önce eleştirel olarak analiz edilmemiştir. Bu nedenle mevcut çalışma gerçekleştirilmiştir.

Yöntemler : Homeopatik preparatın veya test edilen maddenin H460 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücreleri üzerindeki etkisini MTT testiyle incelenmiştir. Kontrol grubu olarak ise yalnızca süksiyon uygulanmış etil alkol (plasebo taşıyıcı) kullanılmıştır. Hücre morfolojisi, hücre döngüsü düzenlemesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) değişiklikler ve DNA hasarı üzerine çalışmalar yapıldı ve ilgili sinyal belirteçlerinin ekspresyonları incelendi. Gözlemler "körleme" yöntemiyle gerçekleştirildi.

Bulgular : Hem Condurango 6C hem de Condurango 30C, H460 hücrelerinde subG0/G1 fazında hücre döngüsü arresti yoluyla apoptozu indüklemiş ve belirli apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarında anlamlı değişikliklere neden olmuştur. İlaçlar, 18–24 saat içerisinde ROS düzeyindeki artış ve MMP depolarizasyonu aracılığıyla oksidatif stres oluşturmuştur. Bu olayların, geç fazda (48 saat) hücrelerin apoptoza yönlendirildiğinin RT-PCR (ters

transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu), Western blot ve immüno Floresans çalışmalarıyla gösterildiği üzere, kaspaz-3 aracılı bir sinyal kaskadını aktive ettiği düşünülmektedir.

Sonuç : Homeopatik doktrinde ileri sürüldüğü üzere, Condurango 30C'nin apoptotik etkisinin Condurango 6C'ye kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

1. GİRİŞ

Bazı konvansiyonel ilaçların yan etkilerine ilişkin artan farkındalık doğrultusunda, insanlar daha az ve daha düşük toksik yan etkiye sahip alternatif tıbbi yaklaşımlara yönelmektedir [1] ve homeopati günümüzde birçok ülkede önemli bir tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) yöntemi haline gelmiştir. Homeopatide, daha güçlü ve daha uzun süreli etki elde etmek amacıyla genellikle ana tentürler (ham ekstreler) yerine doğal maddelerin çok yüksek dilüsyonlarla elde edilen mikrodozları (potensize edilmiş formlar) tercih edilmektedir [2-4]. Başlangıç ilaç maddesi genellikle sulu bir etanol çözeltisinde (çoğunlukla %70) çözündürülür ve çalkalama veya sarsma (süküsyon) ile gerçekleştirilen kademeli seyreltme basamakları aracılığıyla potensize edilir. Centesimal ölçeğe göre, 1 mL ana tentürün 99 mL etanolün sulu çözeltisi (ilaç taşıyıcısı) ile seyreltilmesi ve 10 kez mekanik çalkalama (süküsyon) uygulanması sonucu 1C potensi elde edilir. Elde edilen 1C çözeltisinden 1 mL alınarak tekrar 99 mL etanolün sulu çözeltisi ile seyreltilip 10 kez çalkalanmasıyla 2C potensi oluşturulur ve bu işlem aynı şekilde ardışık olarak devam ettirilir. Bu nedenle ilaç 12C potense ulaştığında, yaklaşık 10^{-24} oranında seyreltilmiş olur (Avogadro sınırının ötesinde) ve orijinal ilaç maddesine ait tek bir molekülün dahi varlığı son derece düşük bir olasılık haline gelir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar bu tür ultra yüksek dilüsyonlu homeopatik preparatlarda orijinal ilaca ait nanopartiküllerin varlığını göstermiştir [5, 6]; ancak etki mekanizması henüz kesin olarak ortaya konulamadığı için etkinlik konusu rasyonalist araştırmacılar tarafından sıklıkla sorgulanmaktadır. Bu nedenle, Avogadro sınırının altında kalan dilüsyonlar (6C, 10^{12} kez seyreltilmiş) ile Avogadro sınırının üzerinde yer alan dilüsyonlar (30C, 10^{60} kez seyreltilmiş) arasında canlı hücreler üzerinde in vitro koşullarda gözlemlenebilir etkisel farklılıklar olup olmadığını incelemeye ilgi duyduk ve bu etkilerin olası sinyal yollarını anlamaya çalıştık. Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir [7]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %80'ini oluşturarak en yaygın alt tiptir. Ayrıca, benzo[a]piren sigara dumanında bulunan başlıca polisiklik aromatik hidrokarbonlardan biridir ve sigara içenlerde akciğer tümörlerinin indüklenmesinden sorumludur [8]. Akciğer kanseri hastaları genellikle kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavi yöntemleriyle tedavi edilmektedir; ancak bu yöntemler normal hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle, homeopati ve akupunktur gibi tamamlayıcı ve alternatif tıp (CAM) yaklaşımları, kanser dahil olmak üzere tedavisi güç birçok hastalığın tedavisinde veya semptomlarının hafifletilmesinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

Bu araştırma kapsamında iki soruya yanıt aranmıştır. Birincisi, potensize edilmiş homeopatik ilaçlar olan Condurango 6C ve Condurango 30C'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) apoptozu indüklemeye yeteneğine sahip olup olmadığı ve bu etkinin reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile mitokondriyal membran potansiyeli (MMP)

depolarizasyonu yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediğidir. İkinci olarak ise, Condurango 30C'nin, Condurango 6C'ye kıyasla daha yüksek apoptoz indükleyici etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hattı olan H460 (NCI-H460) hücreleri, Hindistan Pune'daki National Centre for Cell Science kurumundan temin edilmiş ve %10 fetal bovin serum (FBS) ile %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon ilave edilmiş RPMI-1640 besiyerinde kültüre edilmiştir. Homeopatik potensize ilaçlar olan Condurango 6C ve Condurango 30C, [Schwabe India Pvt. Ltd.](http://www.schwabeindia.com), Kolkata'dan temin edilmiştir.

H460 hücreleri (1×10^4 /hücre kuyucuğu), farklı konsantrasyonlarda Condurango 6C ve Condurango 30C (100 μ L besiyeri başına 0,5–5 μ L) ile ve kontrol grubu olarak plasebo [ilaç taşıyıcısı olan süksiyon uygulanmış %70 alkol] ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Her iki ilacın yaklaşık %50 hücre ölümüne neden olduğu konsantrasyonlar, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizleri kullanılarak belirlenmiştir [9].

H460 hücreleri ayrıca Condurango 6C ve Condurango 30C'nin *yarı maksimal inhibitör konsantrasyon* (IC50) dozları ile muamele edilmiş ve plasebo uygulanmış ya da uygulanmamış hücrelerle karşılaştırılmıştır. Tedavinin 24. ve 48. saatlerinde hücreler inverted faz-kontrast mikroskobu (Axiscope Plus 2, Zeiss, Almanya) altında gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir. Olası morfolojik değişikliklerin daha ileri düzeyde doğrulanması amacıyla, S530-Hitachi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak taramalı elektron mikroskopisi (SEM) çalışması gerçekleştirilmiştir [10].

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminin genellikle apoptozun erken evrelerinde meydana geldiği bilinmektedir [11]. Hücreler, maksimum ROS birikiminin gerçekleştiği ölçüm zamanını belirlemek amacıyla, Condurango 6C ve Condurango 30C'nin IC50 dozları ile ve bunlara karşılık gelen plasebo preparatlarıyla 2, 6, 12, 18 ve 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Tedavi sonrasında hücreler, 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H2DCFDA) (5 mM) ile inkübe edilmiş ve ROS düzeyleri florimetri yöntemi (PerkinElmer, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. ROS oluşumunun en yüksek düzeye ulaştığı ölçüm zamanlarında floresan mikroskopi incelemeleri gerçekleştirilmiştir.

Her iki ilacın IC50 dozları ile gerçekleştirilen tedavinin 2., 6., 12., 18. ve 24. saatlerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) değişiklikler kaydedilmiş ve bu değişiklikler, Rhodamine-123 kullanılarak ilaç uygulanmamış hücrelerle karşılaştırılmıştır. Hücreler floresan mikroskobu (Leica, DMLS) kullanılarak analiz edilmiştir [12]. MMP'de meydana gelen değişiklikler ayrıca, MMP azalmasının en belirgin olduğu ölçüm zamanlarında akım sitometrisi (FACS Aria III, BD Bioscience) yöntemiyle de değerlendirilmiştir.

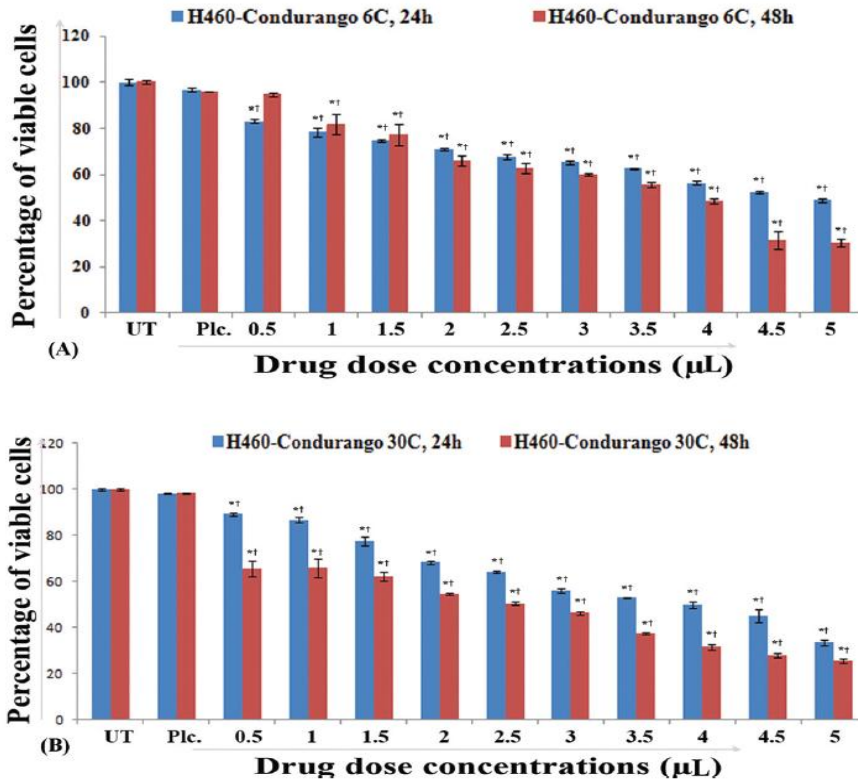
Nükleer morfolojideki değişiklikleri görüntülemek amacıyla hücreler ayrı ayrı 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (10 μ g/mL) ve Akridin Oranj/Etidyum Bromür (AO/EB) (1 mg/mL) ile boyanmıştır [13]. Tedavinin 48. saatinden sonra boyanmış hücreler floresan mikroskobu (Leica, DMLS) altında gözlemlenmiş ve görüntülenmiştir.

DNA parçalanması, konvansiyonel fenol/kloroform yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş [14] ve UV translüminatör (Ultracam Digital Imaging, Genei, Hindistan) altında görüntülenmiştir. DNA hasarı ayrıca bromo-2'-deoksiuridin 5'-trifosfat (Br-dUTP) [15] kullanılarak BD FACS Verse™ sistemi ile analiz edilmiştir.

Fikse edilmiş hücreler, propidyum iyodür (50 µg/mL) ile inkübe edilmiştir [16]. Hücrelerin her fazdaki yüzdesi [subG0/G1, G0/G1, S ve G2/M], BD FACS Verse™ kullanılarak akım sitometrik yöntemle nicel olarak değerlendirilmiştir. RT-PCR analizleri, Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3 ve GAPDH primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir [17]. Primer dizileri Tablo 1’de verilmiştir. Bant yoğunlukları, “Image J” yazılımı kullanılarak densitometrik olarak ölçülmüştür.

Table 1 Primer sequences of the respective genes

Primers	Primer sequences
Bax	Fwd 5'-AGTAACATGGAGCTGCAGAGG-3' Rev 5'-ATGGTCTGATCAGTTCCGG-3'
Bcl-2	Fwd 5'-GTGACTTCCGATCAGGAAGG-3' Rev 5'-CTCCAGACATTCGGAGACC-3'
Cytochrome c	Fwd 5'-CGTGTGCACCTAATATGGGTGATGTTGAAAAGG-3' Rev 5'-ACAGATCTTCTCATTAGTAGCCTTTTAAAG-3'
Caspase-3	Fwd 5'-AGGGGTCAATTATGGGACA-3' Rev 5'-TACACGGGATCTGTTTCTTTG-3'
GAPDH	Fwd 5'-CCATGTCGTCATGGGTGTGAACCA-3' Rev 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3'

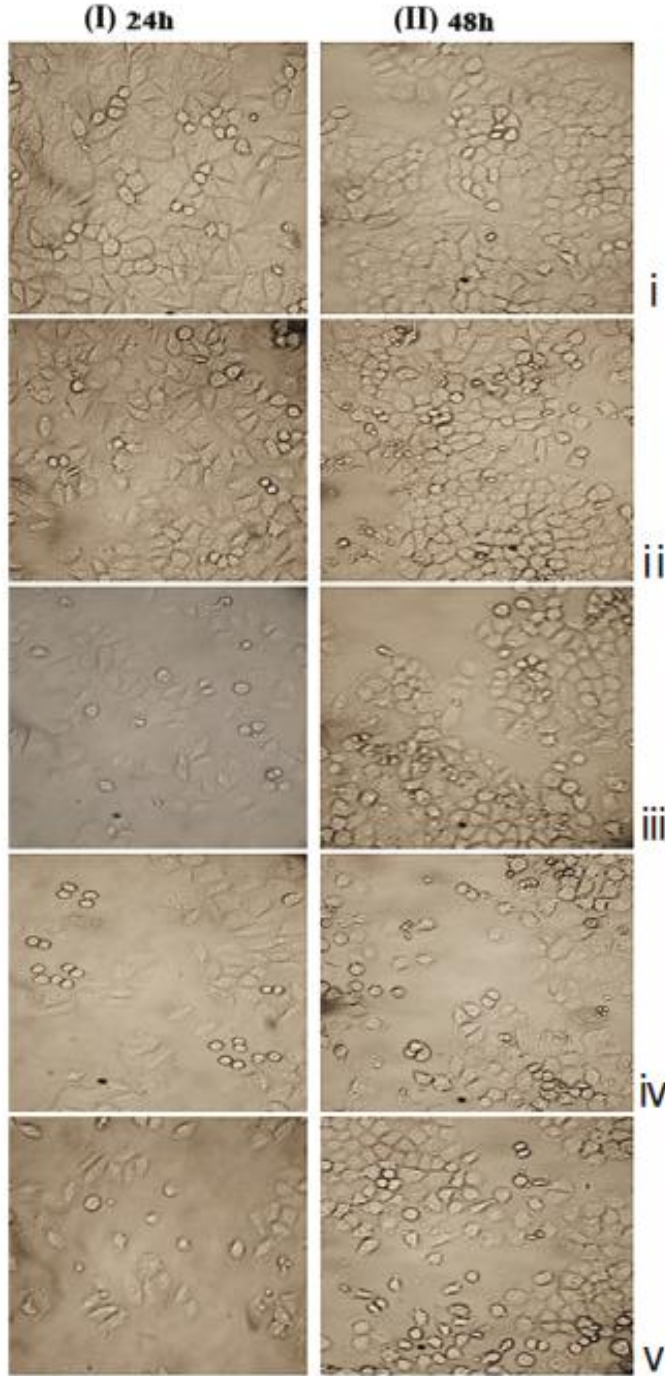


Şekil 1. Condurango 6C'nin (A) ve Condurango 30C'nin (B), MTT analizi ile belirlenen H460 hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Hücreler, ilgili plasebolarla birlikte (5 µL/100 µL) Condurango 6C ve Condurango 30C'ye 24 ve 48 saat süreyle (0,5 µL/100 µL–5 µL/100 µL doz aralığında) maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, ortalama hücre canlılığı yüzdesi ± standart sapma (SD, N = 6) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde gösterilmiştir: *P < 0,05, tedavi uygulanmamış hücrelere kıyasla; †P < 0,05, her iki plasebo uygulanmış hücre grubuna kıyasla.

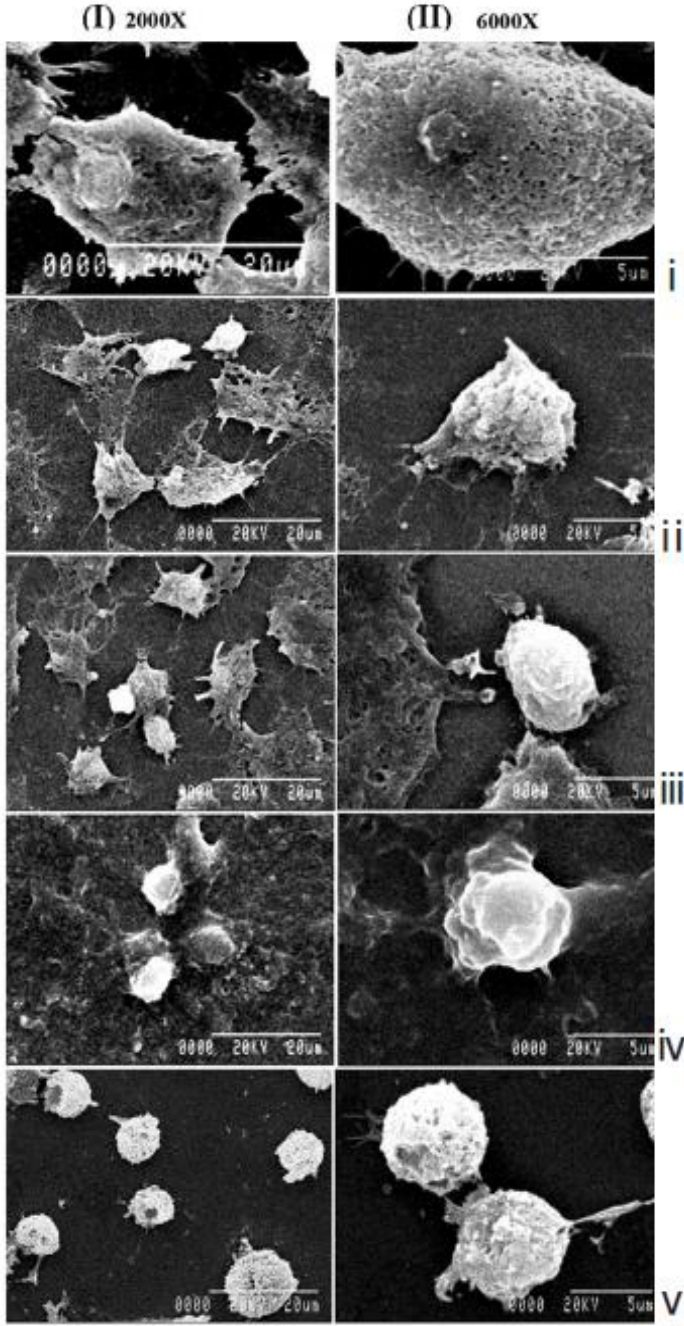
Hücreler, Bax-Bcl-2 analizi için 18 saat, sitokrom-c için 24 saat ve kaspaz-3 ile poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) için 48 saat süreyle her iki ilacın IC50 dozları ile muamele edilmiştir. Protein aktiviteleri, indirekt enzim bağlı immünosorbent assay (ELISA) ve Western blot analizleri kullanılarak ölçülmüştür [18]. Western blot analizleri sonucunda elde edilen protein bantlarının kantitatif analizleri , ImageJ yazılımı kullanılarak densitometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

Kaspaz-3'ün lokalizasyonu immünofloresans yöntemi ile değerlendirilmiş [19] ve floresan mikroskobu altında görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

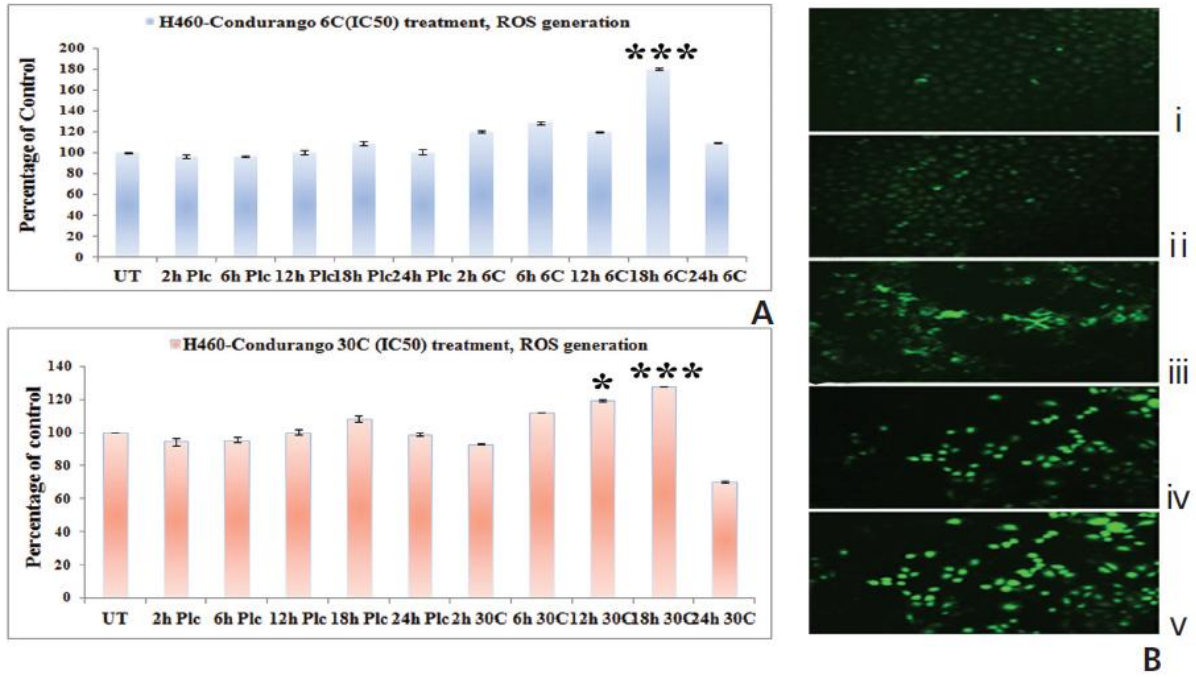
Gözlemciler, kontrol ve/veya ilaçla muamele edilmiş materyalleri incelediklerini bilmeyecek şekilde körleme yöntemiyle çalıştırılmıştır. Veriler analiz edilmiş ve ortalama değerler arasındaki farkların anlamlılığı, SPSS 14 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Fisher'in en küçük anlamlı fark (LSD) post hoc testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ ve $P < 0,001$ olarak kabul edilmiştir.



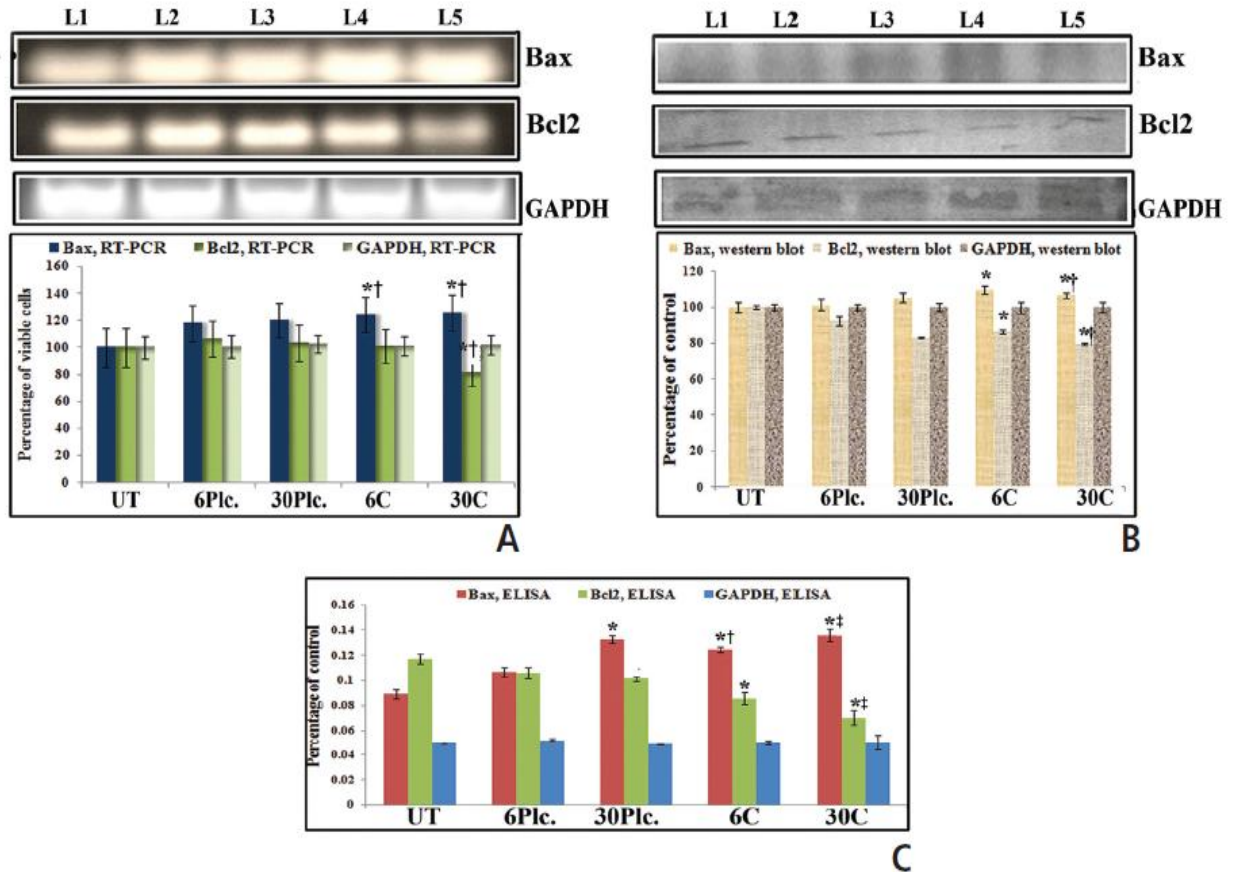
Şekil 2. Hüresel morfolojinin ışık mikroskopisi ile analizi: tedavinin 24. saatinde (I) ve 48. saatinde (II) (40x). (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler.



Şekil 3. Hüresel morfolojinin taramalı elektron mikroskobisi ile analizi:
(I) 2000x ve (II) 6000x büyütmelede;
(i) tedavi uygulanmamış,
(ii) 6C plasebo uygulanmış,
(iii) 30C plasebo uygulanmış,
(iv) Condurango 6C uygulanmış ve
(v) Condurango 30C uygulanmış hücreler.



Şekil 4. Hücre içi ROS birikiminin (A) florimetri ve (B) floresan mikroskopisi ile ölçümü: (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler. Anlamlılık düzeyleri, tedavi uygulanmamış hücreler ile Condurango 6C ve 30C uygulanmış hücreler arasındaki ve ayrıca tedavi uygulanmamış hücreler ile plasebo uygulanmış hücreler arasındaki karşılaştırmalar için *P < 0.05 ve ***P < 0.001 olarak gösterilmiştir.



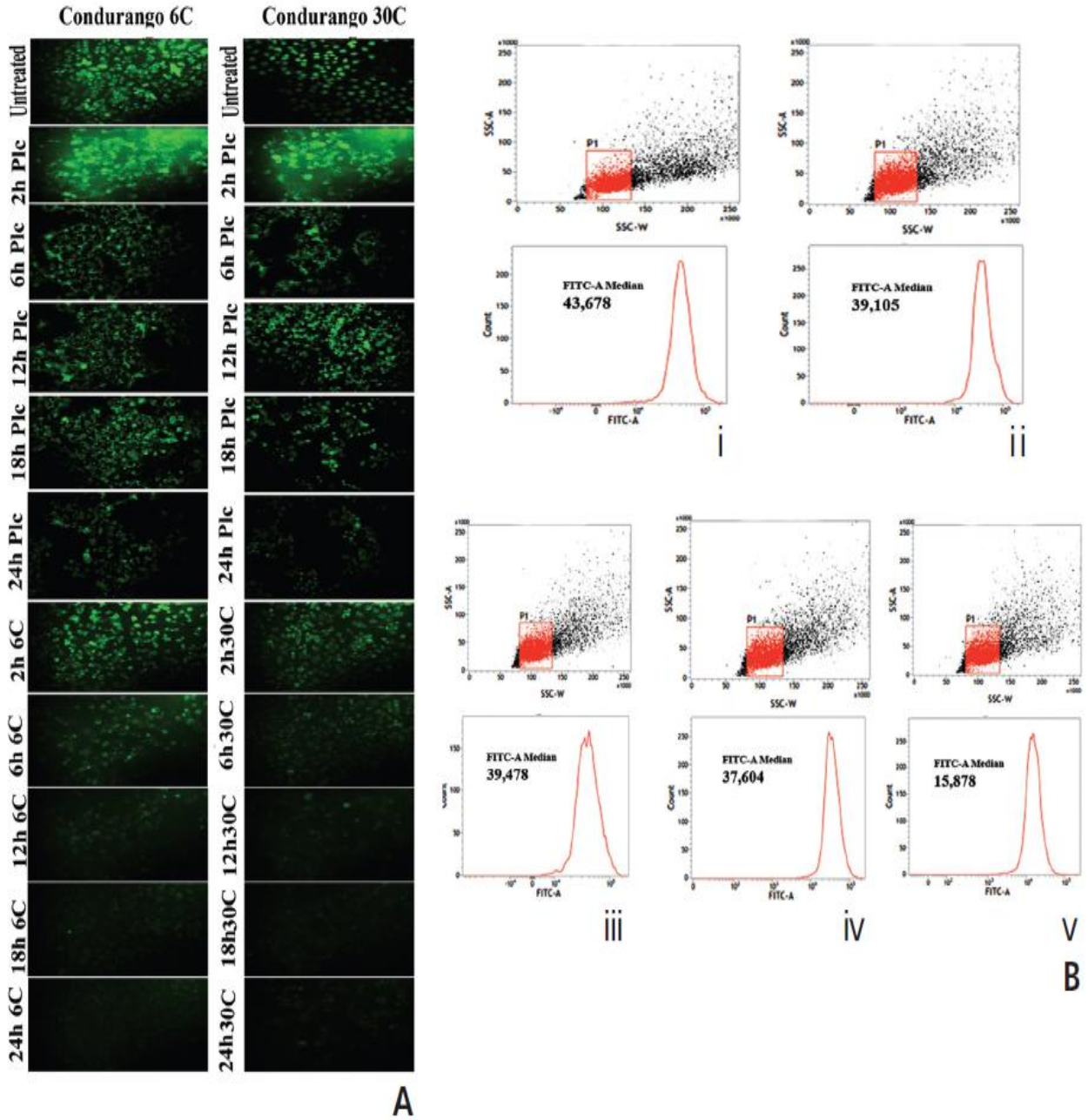
Şekil 5. Condurango 6C ve 30C uygulanmış hücrelerde, tedavinin 18. saatinde Bax-Bcl2 düzeylerinin (C) RT-PCR, (D) Western blot ve (E) ELISA yöntemleri ile analizi; tedavi uygulanmamış ve plasebo uygulanmış kontrol grupları korunmuştur. L1: tedavi uygulanmamış, L2: 6C plasebo, L3: 30C plasebo, L4: Condurango 6C ve L5: Condurango 30C.

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri:

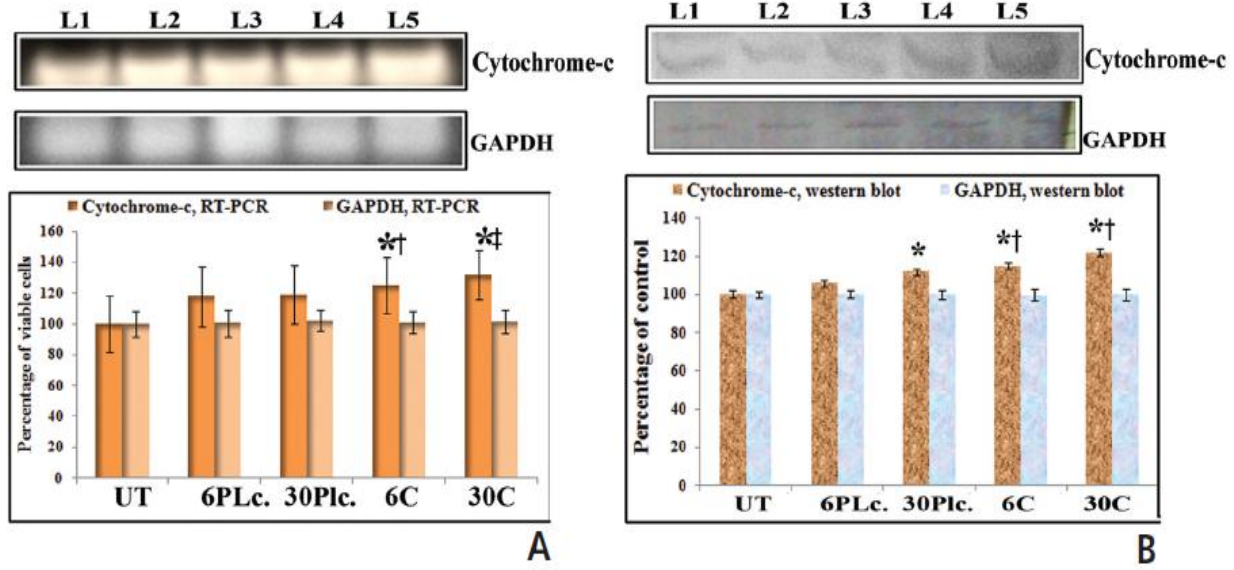
* $P < 0.05$ \rightarrow tedavi uygulanmamış (UT) grup ile Condurango 6C ve 30C grupları arasında,

† $P < 0.05$ \rightarrow 6C plasebo grubu ile Condurango 6C grubu arasında ve

‡ $P < 0.05$ \rightarrow 30C plasebo grubu ile Condurango 30C grubu arasında gösterilmiştir.



Şekil 6. Mitochondriyal membran potansiyeli (MMP) değişimlerinin, Condurango 6C ve 30C uygulanmış hücrelerde tedavi uygulanmamış hücelere karşılaştırmalı olarak; (A) floresan mikroskopisi ve (B) akım sitometrisi ile analizi. (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler.



Şekil 7. Sitokrom-c translokasyonunun doz bağımlılığının (A) RT-PCR ve (B) Western blot yöntemleri kullanılarak analizi. **L1:** tedavi uygulanmamış, **L2:** 6C plasebo, **L3:** 30C plasebo, **L4:** Condurango 6C ve **L5:** Condurango 30C. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *P < 0.05 → tedavi uygulanmamış (UT) grup ile Condurango 6C ve 30C grupları arasında, #P < 0.05 → 6C plasebo grubu ile Condurango 6C grubu arasında ve †P < 0.05 → 30C plasebo grubu ile Condurango 30C grubu arasında gösterilmiştir.

3. Sonuçlar

H460 hücre hattına karşı Condurango 6C (3.57 µL/100 µL) ve Condurango 30C (2.43 µL/100 µL) ile 48 saatlik tedavi sonucunda elde edilen IC50 değerleri, çalışma boyunca referans dozlar olarak seçilmiştir (Şekil 1). Maksimum dozda (5 µL/100 µL) uygulanan her iki plasebo grubunda hücre canlılığının, tedavi uygulanmamış (kontrol) hücelere oldukça yakın olduğu belirlenmiştir.

Işık mikroskopisi (Şekil 2) ve SEM (Şekil 3) çalışmaları, tedavi uygulanmamış ve plasebo uygulanmış hücrelerde hücre membranının bütünlüğünü koruduğunu ve hücre uzantılarının (cellular extensions) varlığını sürdürdüğünü, hücre morfolojisinin ise değişmeden kaldığını göstermiştir.

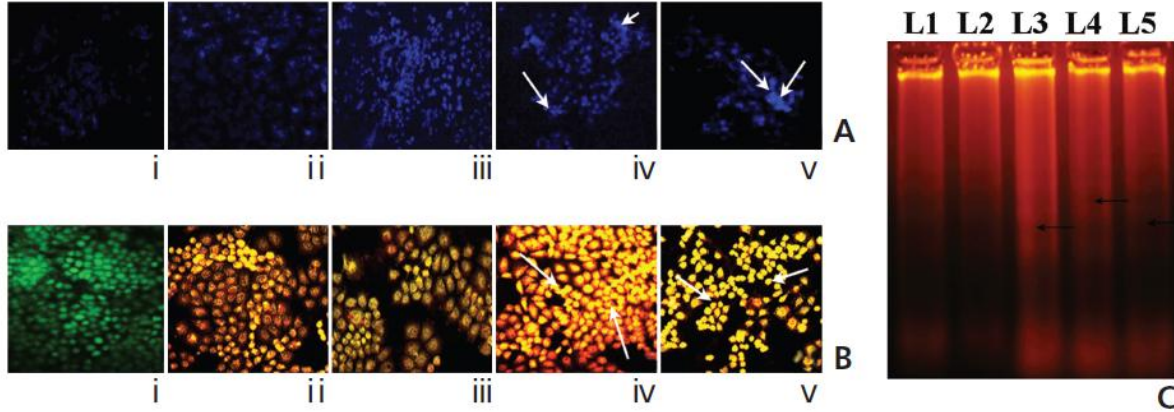
Buna karşılık, Condurango 6C ile tedavi edilen hücrelerde kademeli bir deformasyon ve hücresel büzüşme (shrinkage) gözlenmiştir. Condurango 30C ile muamele edilen hücrelerde ise hücrelerin giderek küçüldüğü ve yuvarlaklaştığı, çekirdek morfolojisinin bozulduğu ve hücre uzantılarının hasar gördüğü tespit edilmiştir. Bu bulgular, Condurango 30C'nin yüksek düzeyde apoptoz indükleyici potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Tedavi uygulanmamış ve plasebo uygulanmış hücrelerde, farklı saat aralıklarında floresans yoğunluğunun optik dansite (OD) değerlerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık, Condurango 6C ve 30C ile tedavi edilen hücrelerde 18. saatte floresans yoğunluğunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 4A). Floresan mikroskopisi bulguları da, 18. saatte ilaçla tedavi edilen hücrelerde H2DCFDA yoğunluğunun, tedavi uygulanmamış hücelere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4B).

Elde edilen sonuçlar, 18. saatte ilaç uygulanmamış hücrelere kıyasla her iki tedavi grubunda Bax ekspresyonunun arttığını ve Bcl2 ekspresyonunun ise azaldığını ortaya koymuştur (Şekil 5). Condurango 30C ile tedavi edilen örneklerde, Condurango 6C ve plasebo gruplarına kıyasla Bax ekspresyonunda daha belirgin bir artış ve Bcl2 ekspresyonunda daha belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Şekil 6A, ilaç uygulanmamış hücrelerde ve farklı zaman noktalarında parlak yeşil floresans varlığını göstermektedir. Buna karşılık, Condurango 6C ve 30C ile tedavi edilen hücrelerde zamanla floresans yoğunluğunda kademeli bir azalma izlenmiş, ancak en belirgin düşüş 24. saatte meydana gelmiştir. Bu durum, mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) en yüksek düzeyde depolarizasyonunun 24. saatte gerçekleştiğini ve bunun mitokondriden sitokrom-c salınımını tetiklediğini düşündürmektedir. Akım sitometrisi analizleri de bu bulguları desteklemiştir (Şekil 6B).

24 saatlik tedavi sonunda, ilaç uygulamasına yanıt olarak sitokrom-c ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Şekil 7). Condurango 30C ile tedavi edilen hücrelerde, Condurango 6C ile tedavi edilenlere kıyasla sitokrom-c ekspresyonunda daha belirgin bir artış saptanmıştır.

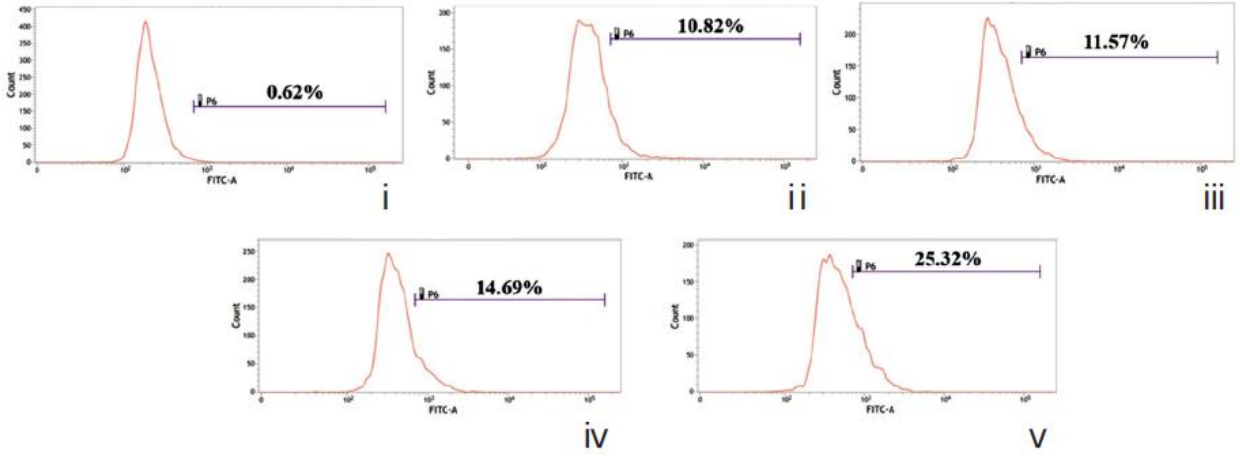


Şekil 8. Hem ilaçla tedavi edilen hem de tedavi uygulanmamış hücrelerde (A) DAPI ve (B) AO-EB boyaması kullanılarak nükleer morfolojideki değişimlerin analizi. (C) DNA fragmentasyon analizi; 48 saatlik zaman aralığında, ilaç uygulamasının ardından özellikle Condurango 30C ile tedavi edilen örnekte, tedavi uygulanmamış DNA'ya kıyasla DNA laddering (merdivenleşme) oluşumunu göstermektedir.

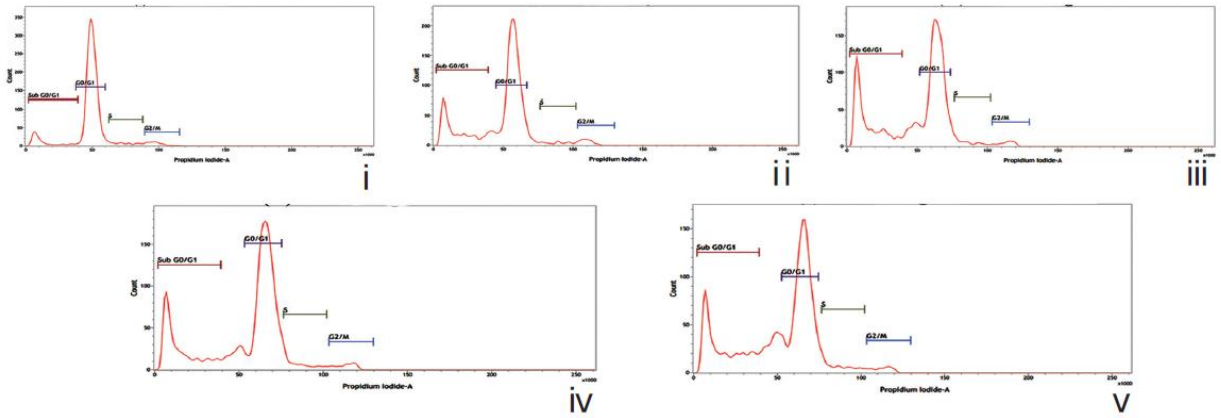
48 saatlik uygulama sonrasında, Condurango 6C ve 30C ile tedavi edilen hücrelerde DAPI floresans şiddetinde kademeli bir artış gözlenmiştir (Şekil 8A). Ayrıca, AO/EB boyaması; floresans paterninde yeşilden (normal hücresel DNA) turuncuya (kesintiye uğramış/nicked hücresel DNA) doğru bir değişim olduğunu ve ilaçla tedavi edilen hücrelerde EB floresansında artış meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 8B). Şekil 8C, özellikle Condurango 30C ile tedavi edilen örneklerde belirgin olmak üzere, ilaç uygulanmamış gruplardaki DNA ile karşılaştırıldığında her iki ilaç uygulanmış örnekte de DNA laddering (DNA parçalanma paterni) oluşumunu göstermektedir.

İlaçla tedavi edilen hücrelerde, tedavi uygulanmayan hücrelere kıyasla dUTP-nick sayısında kademeli bir artış saptanmıştır (Şekil 9). Bu bulgu, her iki ilacın da apoptozu indükleyen DNA kırıkları/nickleri oluşturabilme kapasitesine güçlü biçimde işaret etmektedir. Kantitatif değerlendirme, TUNEL-pozitif çekirdek yüzdesinin Condurango 30C ile tedavi edilen hücrelerde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. SubG0/G1 fazındaki sub-diploid hücre

popülasyonu, Condurango 6C ve 30C ile tedavi edilen hücrelerde; plasebo uygulanmış ve uygulanmamış hücelere kıyasla daha belirgin şekilde artmıştır (Şekil 10).

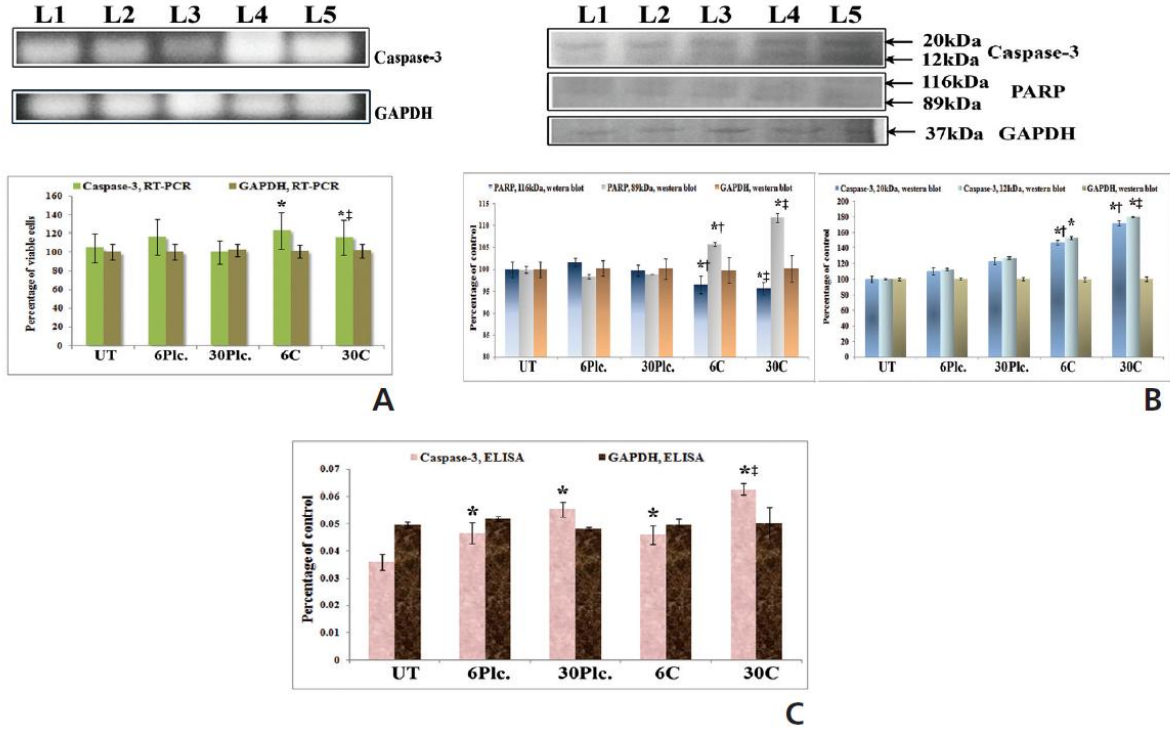


Şekil 9. TUNEL testi kullanılarak dUTP-nick oluşumunun incelenmesi. TUNEL-pozitiflik yüzdesel (%) olarak gösterilmiştir. (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler.



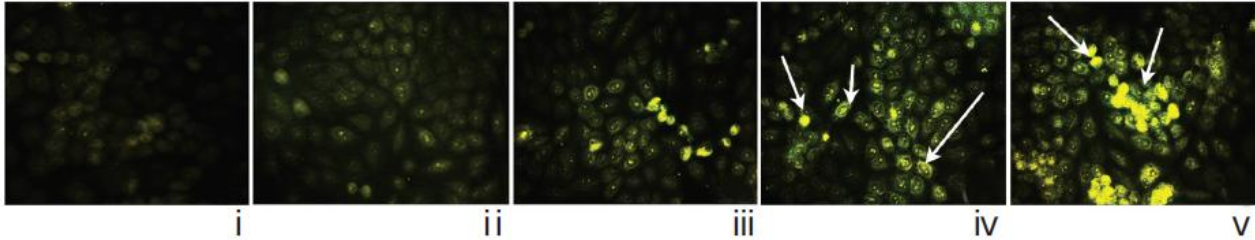
Samples	Sub G0/G1 (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Untreated(i)	9.78	23.37	5.56	0.73
6Plc.(ii)	23.89	59.19	2.91	3.26
30Plc.(iii)	25.00	56.99	5.18	2.96
Con6C(iv)	26.69	54.13	3.62	2.42
Con 30C(v)	27.28	51.53	5.15	2.48

Şekil 10. PI (propidium iyodür) boyaması ve akım sitometrik analiz kullanılarak hücre döngüsü dağılımının incelenmesi. (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler. Hücre döngüsünün her fazındaki hücre yüzdeleri tabloda sunulmuştur.



Şekil 11. Caspase-3 aktivasyonunun (A) RT-PCR, (B) ELISA ve (C) Western blot yöntemleri kullanılarak analizi ve PARP kesilmesinin (cleavage) Western blot analizi ile değerlendirilmesi. L1: tedavi uygulanmamış, L2: 6C plasebo, L3: 30C plasebo, L4: Condurango 6C ve L5: Condurango 30C. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri:

*P < 0.05 \rightarrow tedavi uygulanmamış (UT) grup ile Condurango 6C ve 30C grupları arasında,
†P < 0.05 \rightarrow 6C plasebo grubu ile Condurango 6C grubu arasında ve
‡P < 0.05 \rightarrow 30C plasebo grubu ile Condurango 30C grubu arasında gösterilmiştir.



Şekil 12. Tedavinin 48. saatinde immünfloresan yöntem kullanılarak caspase-3 lokalizasyonunun incelenmesi. (i) tedavi uygulanmamış, (ii) 6C plasebo uygulanmış, (iii) 30C plasebo uygulanmış, (iv) Condurango 6C uygulanmış ve (v) Condurango 30C uygulanmış hücreler.

RT-PCR ve ELISA verileri, Condurango 6C ve 30C uygulaması sonrasında tedavi uygulanmamış örneklerle karşılaştırıldığında kaspaz-3 ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir (Şekil 11). Western blot analizi, Condurango 30C'nin, parçalanmış (cleaved) 20 kDa ve 12 kDa fragmanlarını oluşturarak kaspaz-3 ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırma kapasitesinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. İmmünfloresans çalışması, ilaçla tedavi edilen hücrelerde, özellikle Condurango 30C uygulanan hücrelerde, hücre sitozolü içerisinde kaspaz-3 lokalizasyonunda kademeli bir artış olduğunu göstermiştir (Şekil 12). Kaspaz-3 aracılı yolun son basamağı olan PARP aktivasyonu, 116 kDa (inaktif) ve 89 kDa (aktif) olmak üzere iki parçalanmış fragmanın oluşumu ile karakterizedir.

Western blot analizi, 48 saatlik tedavi sonrasında Condurango 6C ve 30C uygulanan hücrelerde bu iki fragmanın oluştuğunu, buna karşın ilaç uygulanmamış örneklerde bu oluşumun neredeyse hiç bulunmadığını göstermiştir (Şekil 11B).

Bant yoğunlukları, özellikle Condurango 30C ile tedavi edilen hücrelerde, 116 kDa'lık fragmanın kademeli olarak aşağı regüle olduğunu ve 89 kDa'lık fragmanın ise anlamlı biçimde yukarı regüle olduğunu doğrulamıştır.

4. Tartışma

Sunulan bulgular, NSCLC-H460 hücrelerinin 48 saat boyunca Condurango 6C ve 30C'nin IC50 dozlarına maruz bırakılmasının apoptotik hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, oldukça yüksek derecede dilüe edilmiş olan Condurango 30C'nin, bu çalışmadaki tüm parametreler üzerinde Condurango 6C'ye kıyasla daha belirgin değişikliklere neden olduğu görülmüştür. Bu durum, bir ilacın etkisinin konsantrasyonla doğrusal olarak arttığını öne süren genel farmakolojik kuralla uyumlu değildir; bununla birlikte, homeopatik doktrinde yer alan "dilüsyon arttıkça etkinin arttığı" iddiasıyla uyumludur.

Bununla birlikte, Avogadro sınırının altında ve üstünde iki farklı dilüsyonun ölçülebilir etkiler oluşturduğuna dair gözlemler, fizik bilimlerinin ve farmakolojinin kabul edilmiş yasalarına inanan birçok rasyonalist için bir paradoks olarak değerlendirilmektedir. Ancak homeopatik potansların Avogadro sınırının ötesinde dahi farklı hastalıklara, kanser dahil olmak üzere, karşı ölçülebilir terapötik etkiler gösterebildiğine dair artan sayıda çalışma bulunmaktadır [20–22]. Daha önce benzo[a]piren ile indüklenen akciğer kanseri sıçan modelinde elde ettiğimiz in vivo bulgular da Condurango 30C'nin belirgin iyileştirici etkisini ortaya koymuştur [17]. Bu nedenle, bu çalışmada potentize edilmiş ilacın NSCLC hücrelerinde anti-kanser potansiyelini doğrulamak amacıyla apoptotik sinyal yollarına ilişkin mekanizmaların araştırılmasına yönelik bir yaklaşım benimsenmiştir.

Kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi, kanser kemoterapisinde sıklıkla hedeflenen temel mekanizmalardan biridir. Bu nedenle, yaklaşımlardan biri reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu incelemek ve bunun apoptoz indüksiyonundaki spesifik rolünü ortaya koymaktır. Zamansal analiz çalışmaları, tedavinin 18 ila 24. saatleri arasında ROS düzeylerinde artış, mitokondriyal membran potansiyelinde (MMP) depolarizasyon ve sitokrom c salınımında yükselme olduğunu göstermiştir; bu durum, söz konusu olayların 48. saatte gözlenen apoptotik hücre ölümünden daha erken gerçekleştiğini göstermektedir. 24 saatlik tedavi sonunda gözlenen sitokrom c salınımına ilişkin bulgularımız, bu olayların mitokondriyal yapıda meydana gelen bir değişiklik sonucu ortaya çıktığını ve bunun apoptozu tetikleyebileceğini ileri sürmektedir.

Mitokondriyal disfonksiyonlara ek olarak, ROS üretimi ilaca maruz kalmanın erken saatlerinde Bax–Bcl-2 modülasyonu yoluyla da başlatılabilmektedir [11]. Bu çalışmada, tedavi uygulanan seride 18. saatte Bax ekspresyonunda artış ve Bcl-2 ekspresyonunda azalış tespit edilmiştir. Ancak şaşırtıcı bir şekilde, Bax–Bcl-2 ekspresyon değişikliklerinin Condurango 30C ile tedavi edilen örneklerde daha belirgin olduğu görülmüştür; bu durum, daha yüksek dilüsyona sahip homeopatik ilacın daha yüksek etkinliğine işaret eden bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

....

Apoptozun bir diğer göstergesi, internükleozomal DNA parçalanmasıdır. DAPI ve AO/EB boyama sonuçları, DNA'da "nicks" (tek zincir kırıkları) oluşumunu düşündürmektedir; bu durum, ilaçla muamele edilmiş hücrelerde DNA bantlaşması (DNA laddering) ile daha da doğrulanmıştır. Her iki ilaçla muamele edilmiş hücrede plasebo grubuna kıyasla gözlenen TUNEL-pozitifliği, ROS'a bağlı DNA hasarı aracılı apoptotik olayları daha da desteklemektedir.

İlginç olarak, Condurango 30C ile tedavi edilen hücrelerde, Condurango 6C'ye kıyasla daha fazla DNA hasarı tespit edilmiştir.

Kaspaz-3 aktivasyonu, apoptoz aracılı hücre ölümünün temel belirteçlerinden biridir. Bax/Bcl-2 oranındaki artışın, mitokondriden sitokrom c salınımını uyararak kaspaz-9 aktivasyonuna yol açtığı; bunun da Apaf-1 ile kompleks oluşturarak kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve PARP'ın kesilmesine neden olduğu bilinmektedir [7]. Sonuçlar, ilaçla muamele edilmiş hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonuna açık bir şekilde işaret etmektedir. İlaç maruziyetinden sonra kaspaz-3 ve PARP proteinlerinin artmış ekspresyonu ile birlikte kesilmiş formlarının oluşması, intrinsik yolak üzerinden kaspaz-3 aracılı apoptoz indüksiyonunu doğrulamaktadır. Bununla birlikte, dikkat çekici şekilde Condurango 30C ile tedavi edilen hücrelerde, kaspaz-3 ve PARP kesilmesi Condurango 6C'ye kıyasla daha belirgin modülasyon göstermiştir. Bu bulgular, daha yüksek potenzasyona sahip Condurango 30C'nin NSCLC-H460 hücrelerinde apoptozu indüklemeye kapasitesinin daha yüksek olduğunu yeniden desteklemektedir.

Benzer sonuçlar dikkate alındığında, olası bir sonuç olarak homeopatik ilaçların, spesifik genlerin ekspresyonunu düzenleyen belirli yüksek afinite reseptörleri ile etkileşerek etkilerini gösterebileceği öne sürülebilir [23]; ancak bu mekanizmada eksik olan bağlantıların ortaya konulabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma, zaman zaman sindirim problemleri ve mide kanserinin tedavisinde kullanılan [22, 24], Avogadro sınırının altında (6C) ve üstünde (30C) yer alan potentize Condurango formlarının, in vitro koşullarda akciğer kanseri progresyonunu inhibe etme kapasitesini değerlendirmeye çalışması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada gözlenen çeşitli değişikliklerin ancak belirli genlerin aktivitesi ve epigenetik modifikasyonlar yoluyla ortaya çıkabileceği düşünülmektedir; bu durum, ultra yüksek derecede dilüe edilmiş ilaçların, kanser hücrelerinde regülasyonu bozulmuş olan ilgili gen ekspresyonlarını bir şekilde düzeltebileceği hipotezini desteklemektedir [3, 23]. Nanopartiküllerin varlığı [5,25] ile kap materyalleri (örneğin camdan kaynaklanan silika ya da polimer yapılar) ve ilaç molekülleri arasındaki etkileşimler günümüzde araştırılmaktadır. Bu çalışmalar, homeopatik remedinin hazırlama süreci sırasında içinde bulunduğu ortamın yapısal organizasyonunu ve fizikokimyasal özelliklerini değiştirebileceğini; böylece başlangıçtaki orijinal molekül artık bulunmasa bile [6,26], ortaya çıkan homeopatik preparatın farklı özellikler kazanabileceğini düşündürmektedir.

5. Sonuç

Bu çalışmanın genel bulguları, Condurango 30C'nin Condurango 6C'ye kıyasla daha yüksek apoptoz indüklemeye kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, homeopatik doktrinde ileri sürülen "daha yüksek dilüsyonun daha güçlü etki gösterebileceği" görüşüyle uyumludur.

Teşekkür

Bu çalışma, Fransa'nın Lyon kentindeki Boiron Laboratory tarafından, University of Kalyani Zooloji Bölümü'nden Prof. A. R. Khuda-Bukhsh'a sağlanan araştırma desteği ile yürütülmüştür. Yazarlar, SEM ölçümleri sırasındaki katkılarından dolayı University of Burdwan bünyesinden Dr. Srikanta Chakraborty'ye ve FACS ölçümleri sırasında sağladığı rehberlik için University of Calcutta Uygulama Bilimcisi Dr. Sanjaya Mallick'e teşekkür etmektedir. Tüm yazarlar herhangi bir çıkar çatışmasının bulunmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

1. Jonas WB. The homeopathy debate. *J Altern Complement Med.* 2000;6(3):213-5.
2. Geddes N, Lockie A. The complete guide to homeopathy: the principles & practice of treatment. 2nd ed. DK ADULT; 2000. 240p.
3. Khuda-Bukhsh AR. Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003;253(1-2):339-45.
4. Boericke W. New manual of homoeopathic materia medica & repertory (with relationship of remedies). 3rd ed. B Jain Pub Pvt Ltd; 2007. 1196 p.
5. Chikramane PS, Suresh AK, Bellare JR, Kane SG. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. *Homeopathy.* 2010;99(4):231-42.
6. Bell IR, Koithan M. A model for homeopathic remedy effects: low dose nanoparticles, allostatic cross-adaptation, and time-dependent sensitization in a complex adaptive system. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:191.
7. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem.* 2009;57(16):7596-604.
8. Dreij K, Rhrissorrakrai K, Gunsalus KC, Geacintov NE, Scicchitano DA. Benzo[a]pyrene diol epoxide stimulates an inflammatory response in normal human lung fibroblasts through a p53 and JNK mediated pathway. *Carcinogenesis.* 2010;31(6):1149-57.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
10. Morales J, Alpaugh ML. Gain in cellular organization of inflammatory breast cancer: A 3D in vitro model that mimics the in vivo metastasis. *BMC Cancer.* 2009;9:462.
11. Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem.* 2003;278(36):33714-23.
12. Denning MF, Wang Y, Tibudan S, Alkan S, Nickoloff BJ, Qin JZ. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ.* 2002;9(1):40-52.
13. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 23):4155-66.

14. Sikdar S, Mukherjee A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. Ethanolic extract of Condurango (*Marsdenia condurango*) used in traditional systems of medicine including homeopathy against cancer can induce DNA damage and apoptosis in non small lung cancer cells, A549 and H522, in vitro. *TANG*. 2013;3(1):43-52.
15. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008;44(3):250-4.
16. Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(2):C281-91.
17. Sikdar S, Mukherjee A, Bishayee K, Paul A, Saha SK, Ghosh S, et al. Post-cancer treatment with Condurango 30C shows amelioration of benzo[a]pyrene-induced lung cancer of rats through caspase-3 mediated apoptosis induction. *Pharmacopuncture*. 2013;16(3):11-22.
18. Hsu HF, Huang KH, Lu KJ, Chiou SJ, Yen JH, Chang CC, et al. Typhonium blumei extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Ethnopharmacol*. 2011;135(2):492-500.
19. Wang Y, Yang H, Liu H, Huang J, Song X. Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC Cancer*. 2009;9:174.
20. Jonas WB, Gaddipati JP, Rajeshkumar NV, Sharma A, Thangapazham RL, Warren J, et al. Can homeopathic treatment slow prostate cancer growth? *Integr Cancer Ther*. 2006;5(4):343-9.
21. Khuda-Bukhsh AR. Laboratory research in homeopathy: pro. *Integr Cancer Ther*. 2006;5(4):320-32.
22. Banerji P, Campbell DR, Banerji P. Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homoeopathic medicine: A best case series program of the National Cancer Institute USA. *Oncol Rep*. 2008;20(1):69-74.
23. Khuda-Bukhsh AR. Potentized homeopathic drugs act through regulation of gene expression: a hypothesis to explain their mechanism and pathways of action in vivo. *Complement Ther Med*. 1997;5(1):43-6.
24. Berger S, Junior P, Kopanski L. Structural revision of pregnane ester glycosides from Condurango cortex and new compounds. *Phytochemistry*. 1988;27(5):1451-8.
25. Chikramane PS, Kalita D, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation. *Langmuir*. 2012;28(45):15864-75.
26. Bhattacharyya SS, Paul S, Khuda-Bukhsh AR. Encapsulated plant extract (Gelsemium semipervirens) poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles enhance cellular uptake and increases bioactivity in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(6):678-88.