

Evaluation of the Effect of Panax Ginseng Administration on YKG1 Glioblastoma Cells Before Cisplatin Treatment in Terms of Apoptotic Cell Death and Cell Vitality

Fatma FIRAT*

*Afyonkarahisar Health Science University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

In alternative medicine, natural remedies of herbal origin are often used in addition to chemotherapy-like treatments. Panax ginseng one of them and it's preferred diseases originating from nervous system. The aim of our study, to evaluate Panax ginseng, which was used before cisplatin, in terms of cell death and viability YKG1 cells. Commercially, purchased YKG1 cells were incubated DMEM F12 medium in 5% CO₂ incubator divided into 4 groups. Group-1; control, group-2; 48 hours 50 mg/ml Panax ginseng, group-3; 48 hours 50 mg/ml Panax ginseng followed by Cisplatin treatment and group-4; was determined as the only cisplatin-treated group. Cell viability assessed by MTT. Bax/Bcl-2 and Caspase-3 primary antibodies, were used for immunocytochemical evaluation. In addition, cells were evaluated by PCR technique with using primers Bcl-2 and Caspase-3. According to the immunocytochemistry, while Bax immunoreactivity didn't change into the groups, Bcl-2 decreased in groups 3-4, and Caspase-3 increased in groups 3-4, and PCR results were also supportive with our immunohistochemical results. According to MTT results, cell viability rates decreased in groups 3-4. In our study, it was observed that the use of Panax ginseng, which used as a therapeutic and prophylactic in alternative medicine, didn't change the Bax/Bcl-2 ratio in YKG1 cells, but it could trigger apoptosis increasing Caspase-3 activity together Cisplatin.

Keywords: Bax/Bcl, Caspase 3, Glioblastoma, Panax ginseng, Cisplatin.

Sisplatin Tedavisi Öncesi Panax Ginseng Uygulamasının YKG1 Glioblastoma Hücrelerine Olan Etkisinin Apoptotik Hücre Ölümü Ve Hücre Canlılığı Açısından Değerlendirilmesi

ÖZ

Alternatif tıpta kemoterapi benzeri tedavi yöntemlerine ek olarak sıklıkla bitkisel kökenli doğal ilaçlar kullanılmaktadır. Panax ginseng bunlardan biridir ve sinir sistemi kaynaklı hastalıklarda tercih edilmektedir. Çalışmamızda amaç, sisplatinde önce kullanılan Panax ginseng'in YKG1 glioblastoma hücrelerinde hücre ölümü ve hücre canlılığı bakımından değerlendirilmesidir. Ticari olarak satın alınan YKG1 hücreleri, % 5 CO₂ inkübatörde DMEM F12 besi yerinde inkübe edildi ve 4 gruba ayrıldı. Grup 1; kontrol, grup 2; 48 saat 50 mg/ml Panax ginseng, grup 3; 48 saat 50 mg/ml Panax ginseng ve ardından Sisplatin tedavisi ve grup 4; sadece Sisplatin uygulanan grup olarak belirlendi. Hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede apoptotik belirteçlerden Bax/Bcl-2 ve Caspase-3 primer antikorları kullanıldı. Ek olarak, hücreler PCR tekniği ile Bcl-2 ve Caspase-3 primerleriyle değerlendirildi. İmmünohistokimyasal sonuçlara göre Bax immünoaktivitesi gruplar arasında değişiklik göstermezken, Bcl-2'nin grup 3 ve 4'te azaldığı ve Caspase-3'ün ise grup 3 ve 4'te arttığı görüldü ve PCR sonuçları da destekleyici yönde idi. MTT sonuçlarına göre grup 3 ve 4'te hücre canlılık oranlarının azaldığı görüldü. Alternatif tıpta tedavi edici ve koruyucu olarak kullanılan Panax ginseng'in çalışmamızda, Sisplatin tedavisinden önce kullanılmasının YKG1 hücrelerinde Bax/Bcl 2 oranını değiştirmediği fakat Sisplatinle birlikte Caspase-3 aktivitesini artırarak apoptozu tetikleyebileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Bax/Bcl, Caspase-3, Glioblastoma, Panax ginseng, Sisplatin.

To cite this article: Firat F. Evaluation of the Effect of Panax Ginseng Administration on YKG1 Glioblastoma Cells Before Cisplatin Treatment in Terms of Apoptotic Cell Death and Cell Vitality. Kocatepe Vet J. (2021) 14(4):422-429

Submission: 28.05.2021 Accepted: 29.09.2021 Published Online: 19.11.2021

ORCID ID; FF: 0000-0003-0027-5138

*Corresponding author e-mail: fatmaozturk87@gmail.com

GİRİŞ

Glioblastoma (GBM), yüksek morbidite ve mortalite oranlarına neden olan en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür (Coluccia et al. 2018). Tanımlanan başlıca histopatolojik özellikleri, nekroz ve endotelial proliferasyon olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) beyin tümörleri sınıflandırmasında en yüksek derece olan derece IV içinde yer almaktadır (Erkin Özgiray 2021). Standart glioblastoma tedavisi ameliyat, radyoterapi ve alkilleyici kemoterapiyi içerir. Maksimum rezeksiyon, radyasyon tedavisi ve kemoterapiyi takiben bile, ortalama sağ kalım sadece 15 aydır (Komotar, R. J., et al. 2005). Güncel tedavi gelişmeleri, değiştirilmiş sinyal transdüksiyonu, anjiyogenezi baskılama, çeşitli immünoterapi yaklaşımları, kişiye özel alternatif tıp tedavileri de dahil olmak üzere, kötü huylu fenotipi yönlendiren moleküler düzenlemeleri hedeflemeye odaklanmaktadır (Wirsching et al. 2016). Sisplatin (Cis), sitotoksik etkileri iyi tanımlanmış, yaygın kullanılan etkili anti-kanser ilaçlarından biridir ve radyo duyarlılaştırıcıdır (Boeckman et al. 2005, Mjos and Orvig 2014). Bununla birlikte, kan beyin bariyerinden geçmek için yüksek dozlarda Cis kullanımı gereklidir ve genellikle tolere edilemeyen sistemik yan etkileri sebep olmaktadır. Ek olarak, Cis' in yaklaşık %90-%95'i geri dönüşümsüz şekilde plazma proteinlerine bağlanır ve ilaç fraksiyonunun yalnızca serbest kalan % 5-10'unu anti-tümör etkileri gösterecek şekilde uygulanır (Coluccia et al. 2018). Geleneksel Çin tıbbında kullanılan birçok bileşenin tümör oluşumunu önleyebilir, ilaç etkinliği artırabilir ve toksisiteyi azaltabilir, tümör nüksünü ve metastazı azaltabilir, hayatta kalma süresini uzatabilir ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilir özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Paklitaksel-brucea yağı, örneğinde olduğu gibi pazara sunulmuş doğal anti-tümör etkili pek çok aktif bileşen de vardır. Bununla birlikte, şu anda, GBM için geleneksel tıp üzerine nispeten az çalışma bulunmaktadır. (Wang et al. 2019).

Panax ginseng, doğu tıbbında hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılır ve bitkilerin kralı olarak bilinir. Bitki kökünden kurutulmuş elde edilen kırmızı ginseng ekstresinde ginsenoidler, polisakkaritler, alkaloidler, glukozitler, fenolik asit ve benzeri birçok aktif bileşenin bulunduğu bildirilmektedir (Wang et al. 2019). Modern farmakolojik çalışmalar, ginsengin anti-adheziv, anti-tümör, anti-diyabetik, yaşlanma karşıtı, nöro-regülasyon, immünomodülasyon gibi bir çok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Ru et al. 2015). Kırmızı ginsengin endotelial hücre invazyonunu ve tüp formasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği, NF- κ B'yi düzenleyerek apoptoza etki ettiği gösterilmiştir (Dai et al. 2017). Tian ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada Panax ginseng uygulamasının MNK45 gastrik kanser

hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını değiştirerek hücreleri apoptoza sürüklediğini göstermiştir.

Literatür bilgileri tarandığında glioblastoma tümörlerinin tedavisinde Panax ginseng'in apoptotik etkilerini araştıran az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, YKG1 hücre hattını kullanarak Sisplatin tedavisinden önce uygulanan Panax ginseng'in hücre canlılığı ve apoptozuna etkilerini immunohistokimyasal olarak ve rtPCR yöntemleriyle incelemeyi amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Kimyasalların Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan Panax ginseng ekstresi 50 μ g/ml besi yeri içerisinde hazırlanarak çalışma gruplarına 48 saat boyunca uygulandı. IC50 değeri uygulama dozu daha önce yapılmış uluslararası makalelerde belirlendiği oranda kullanıldı (Shin et al. 2012). Ticari olarak satın alınan Sisplatin (Sigma-PHR1624) Satıcının talimatlarına göre 1.55 μ g/ml hazırlandı ve çalışma gruplarına uygulandı (Nakagawa et al. 2007).

Hücre Kültürü

Ticari olarak ATCC'den temin edilen YKG1 hücre hattı kullanıldı. Hücreler, %1 L-glutamin, %1 penicilin-streptomisin, %10 fetal bovine serum içeren DMEM F12 besi yeri içerisinde %70 hücre yoğunluğu elde edilene kadar çoğaltıldı. Dört çalışma grubu belirlendi. Grup 1; kontrol grubu, grup 2, 48 saat boyunca yalnızca Panax ginseng uygulaması, grup 3, 48 saat boyunca Panax+Sisplatin uygulaması ve dördüncü grup 48 saat yalnızca Sisplatin uygulaması yapılacak şekilde tasarlandı. Tüm gruplar için temel besi yeri içerisine Panax ginseng ve sisplatin belirtilen dozlarda ilave edilerek uygulanmıştır.

MTT ile Hücre Canlılığı Tayini

YKG-1 hücreleri 96 gözlü kuyucuklara 1 \times 10⁵ hücre olarak ekildi. Her grupta 8 kuyucuk bulunacak şekilde, serum içermeyen besi yerleri uygulama dozlarıyla birlikte 200 μ L inkübe edildi. Ardından besi yerleri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara üreticinin talimatlarına göre hazırlanmış MTT (A3338, BIOMATİK) içeren 110 μ L besi yeri eklendi 37 °C de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bittiğinde besi yeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 200 μ L DMSO ilavesi yapıldı. Yatay karıştırıcıda karanlık ortamda 10 dk inkübe edildi ve 550/650 nm dalga boyu aralığında spektrofotometrede okutuldu (SHIMADZU UV-1601).

İndirekt İmmunositokimyasal Yöntem

%4'lük paraformaldehit ile 30 dk. boyunca hücreler fikse edildi. 3x5 defa PBS (Phosphate Buffered Saline- Fosfat Tampon solüsyonu) ile yıkandı. Permeabilizasyon için %0,1'lik Triton-X 100 15 dk muamele edildi. Ardından %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması ile endojen peroksidaz aktivitesi

inhibe edildi. 3x5 defa PBS ile yıkandı. 1 saat bloking uygulamasından sonra Anti-Caspase 3 (SC-5603, SANTA CRUZ), anti-Bax (SC-526, SANTA CRUZ) ve anti-Bcl-2 (SC- 7283, SANTA CRUZ) antikoları 1:100 oranında dilüe edilerek 1 gece inkübe edildi. 3x5 defa PBS ile yıkama yapıldı. İlk olarak Biotin (30 dk.) ardından Streptavidin (30 dk.) uygulandı ve AEC (TA-125-HA, THERMO) kromojeni ile immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. Kapatma medyumunu ile kaplanarak kapatıldı ve fotoğrafları ışık mikroskobu ile çekildi. Gruplardaki hücrelerin immunreaktivite sonuçları boyanma şiddetine göre az, orta ve kuvvetli olacak şekilde sırasıyla (+), (++) ve (+++) şeklinde değerlendirildi ve H-score analizi yapıldı (Numata et al. 2012).

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistik olarak medyan, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır (Tablo 1). Grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi, farkı yaratan grup veya grupları belirlemek için çoklu karşılaştırma testlerinden biri olan Dunn's testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır. Değerlendirmeler SPSS20.0 paket programında yapılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hücreler, kültür ortamından pasajlama yöntemiyle kaldırıldı ve RNA izolasyonları yapıldı. Toplanan RNA'lerden cDNA elde edildi. Üreticinin talimatları doğrultusunda SYBR Green Master Mix kit kullanılarak BCL-2, CASPASE-3 ve β -ACTIN genlerinin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR yöntemi ile analiz edildi (Biorad CFX 96). CASPASE-3 ve BCL-2 genlerinin ifadenmesinin normalizasyonunu göstermek için β -ACTIN mRNA düzeyleri referans olarak alındı. BCL-2, CASPASE-3 ve β -ACTIN mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı.

BULGULAR VE SONUÇ

Uygulama Sonrası Hücre Canlılık Oranları

Hücre canlılığının tayini için, daha önce literatür bilgilerinden elde edilen IC50 dozları belirlenerek gruplara uygun olarak uygulandı ve MTT yöntemi kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu, ikinci gruba 48 saat boyunca yalnızca panax uygulaması, üçüncü gruba 48 saat boyunca panax+Sisplatin ve dördüncü gruba 48 saat boyunca Sisplatin uygulaması yapıldı. Çalışma üç kez tekrarlandı ve her tekrarda her gruba ait sekizer adet kuyucuk ortalamaya alındı. Spektrofotometrik sonuçlar değerlendirildiğinde hücre canlılık oranının en yüksek birinci grupta (%81) olduğu görüldü (Tablo 2). Grup 2 de %72 olan canlılık oranı, Grup 3 te % 53, grup 4'te ise %64 tayin edildi (Tablo 2).

İndirek İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Avidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılarak yaptığımız immunohistokimyasal boyama sonuçları H-score yöntemiyle yöntemiyle immunreaktivite bakımından değerlendirildi. Caspase-3 immunreaktivitesi için anti-Caspase-3 antikorunu kullanıldı. İmmunreaktivite şiddetleri grup 1 de az (+) iken ve grup 2 de orta (++) seviyede görüldü ve grup 3 ve 4'te ise kuvvetli (+++) olduğu görüldü (Figür 1- A, B, C, D).

Sonuçlarımıza göre, anti-Bax antikorunun immunreaktivite seviyesi grup 1, 2, 3 ve grup 4 için az (+) şiddetindeydi (Figür 1- E, F, G, H). Anti-Bcl-2 için gruplardaki immunreaktivite şiddetleri grup 1 ve 2 de şiddetli (+++) seviyede iken, grup 3 ve 4'te ise az (+) seviyesinde kaydedildi (Figür 1- J, K, L, M).

BCL-2, CASPASE-3 Genlerinin Real Time PCR ile Analizi

Panax ginseng, Panax+Sisplatin ve Sisplatin maruz bırakılan YKG1 glioblastoma hücre hattında ifade edilen BCL-2, CASPASE-3 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler kontrol grubu hücrelerine göre belirlendi. Normalizasyon için housekeeping bir gen olan β -ACTIN kullanıldı. YKG1 hücreleri Panax ginseng, Panax+Sisplatin ve Sisplatin ile maruz bıraktıktan sonra BCL-2 geni ekspresyon seviyelerinde kontrole göre up-regülasyon belirlendi (sırasıyla; 34,5, 2,5, 1,9 kat). YKG1 hücrelerini Panax ginseng, Panax+Sisplatin ve Sisplatin ile maruz bıraktıktan sonra CASPASE-3 geni ekspresyon seviyelerinde uygulamalarda yine kontrole göre upregülasyon belirlendi (sırasıyla; 5,1, 10, 10 kat) (Tablo 3).

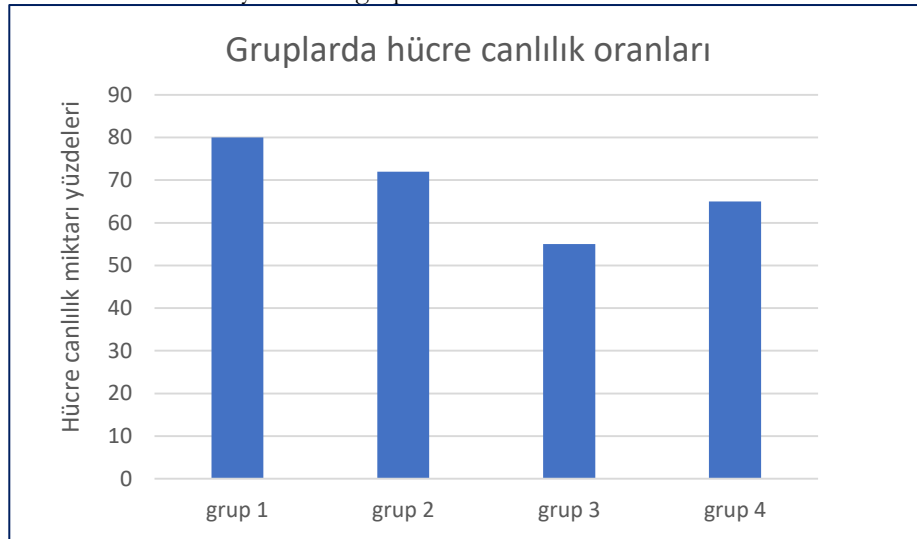
Table 1. The mean, standard deviation and median values of the groups according to the H-score results.

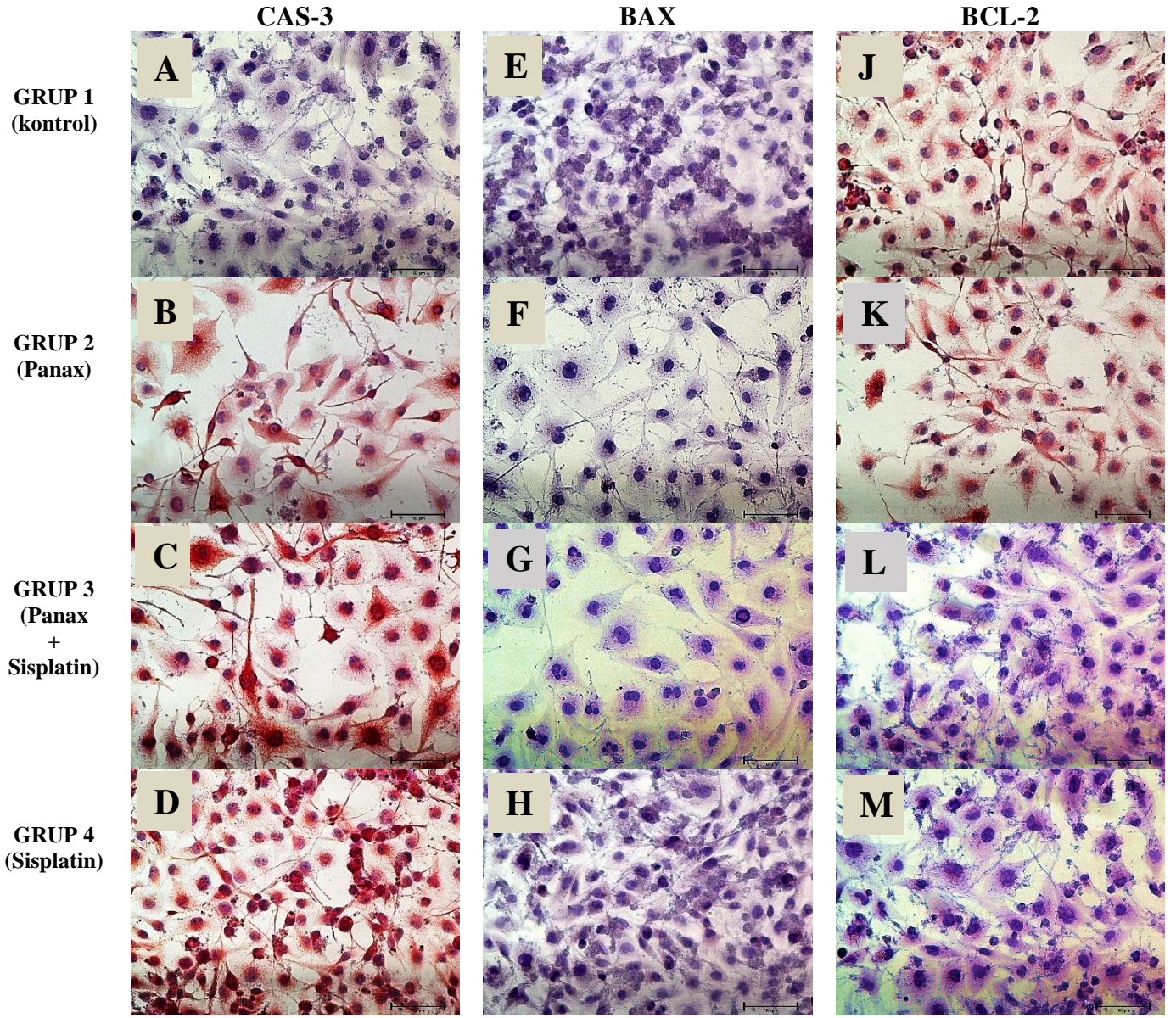
Tablo 1. H-score sonuçlarına göre grupların orta, standart sapma ve ortanca değerleri.

H_Skor değerleri	Grup	Orta	Std. sapma	Medyan
Caspase-3	Grup 1	106,67	7,572	110,00
	Grup 2	202,00	2,646	201,00
	Grup 3	484,67	4,509	485,00
	Grup 4	486,33	4,726	488,00
Bax	Grup 1	116,00	4,000	116,00
	Grup 2	114,33	5,859	112,00
	Grup 3	116,00	3,606	115,00
	Grup 4	118,00	3,606	119,00
BCL-2	Grup 1	489,00	1,000	489,00
	Grup 2	486,00	5,000	486,00
	Grup 3	110,33	10,693	116,00
	Grup 4	107,33	8,021	108,00

Table 2. Cell viability rates of the groups after MTT experiment.

Tablo 2. MTT deneyi sonucu grupların hücre canlılık oranları.

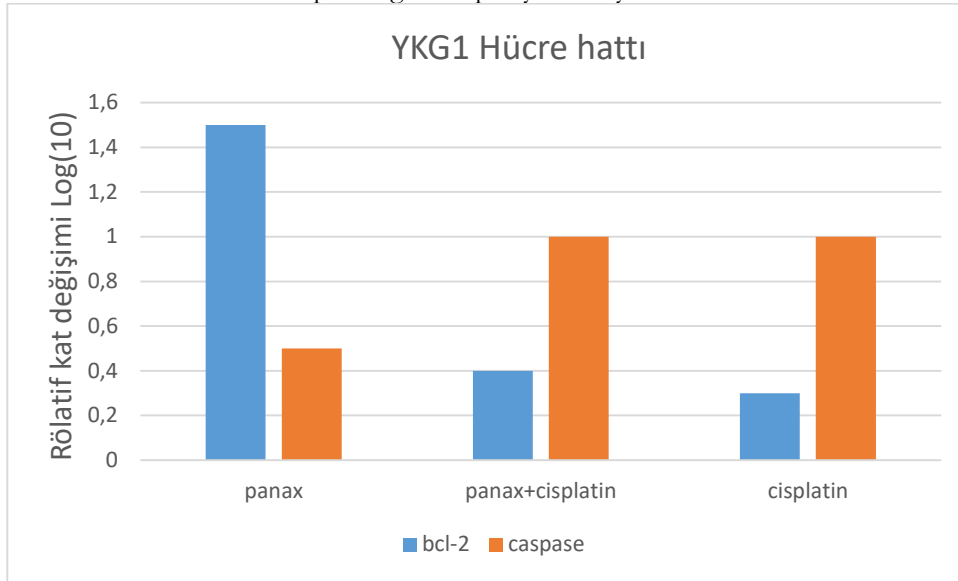




Şekil 1: İndirek immunohistokimyasal boyama sonucu grupların immunreaktiviteleri. Scale bar-100µm.
 Figure 1: Immunreactivities of groups as a result of indirect immunohistochemical staining. Scale bar-100µm.

Table 3. PCR result Gene expression levels in groups.

Tablo 3. PCR sonucu Gruplarda gen ekspresyon seviyeleri.



hücre apoptozunun indüksiyonundan, Bcl-2 proteinleri ise sitokrom C nin sitozole salınmasına

TARTIŞMA

Glioblastoma (GBM), yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip, tam tedavi sonrası bile 12-15 ay sağ kalım oranı olan ve dünya sağlık örgütüne göre VI dereceden bir kanser türüdür. Düşük sağ kalım oranları ve kanserli hücrelerin tedavi direncinden dolayı adjuvan tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Panax ginseng'deki saponin bileşeni olan ginsenosidler, kırmızı ginsengin kan akışının iyileştirilmesi, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, anti-enflamatuar etkileri, yorgunluğun hafifletilmesi ve antioksidan özellikleri gibi biyolojik aktivitelerinden sorumludur (Ham et al. 2019). Ayrıca yapılan pek çok çalışmada Panax ginseng'in kanser hücrelerinin çoğalma hızını ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (Oh et al. 2019, Yang et al. 2016). Sisplatin halihazırda tedavide kullanılan antikanser bir ilaçtır. Çalışmamızda, YKG-1 insan glioblastoma hücrelerine Sisplatin uygulamasından önce Panax ginseng maruziyetinin hücre canlılığı ve apoptotik sürece olan etkilerini araştırmayı amaçladık. Hürelere kültüre ortamında 48 saat boyunca Panax ginseng uygulamasının ardından yine 48 saat boyunca Sisplatin tedavisi yapıldı. Uygulamaların ardından hücre canlılığı ve apoptozuna etkileri, MTT, IHC (immunohistokimya) ve rtPCR yöntemleri kullanılarak incelendi.

Apoptoz programlı hücre ölümüdür ve kanserli hücrelerde bu mekanizmayı düzenleyici genlerinde disregülasyon olduğu bilinmektedir. Apoptozu düzenleyici olduğunu bilinen genler ve proteinler arasında Caspase-3, Bax ve Bcl-2 başta gelmektedir. Bax proteinlerinin hücrede, porlar oluşturulması ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin artırılması ve

katkı sağlayarak hücrenin yaşam yönünde ilerlemesinden sorumludur. Bax/Bcl-2 oranındaki değişimler mitokondriyal yolak üzerinden hücrelerin apoptozunu direk olarak kontrol eder (Elmore 2007). Çalışmamızda YKG 1 oluşturulan gruplarda uygulama sonrası hücrelerindeki Bax, Bcl-2 ve Caspase-3 proteinlerinin ifadesini immunohistokimyasal yöntem ile ve Bcl-2 ve Caspase-3 gen ekspresyonu değişim oranlarını araştırdık. İmmunohistokimyasal sonuçlarımıza göre Bax immunreaktivite şiddetlerinde, gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılıkların olmadığı görüldü ($p=0,758$). Ayrıca Zou ve arkadaşları ve Zhang ve arkadaşları Panax saponinlerinin Bax ifadesini arttırdığını göstermiş (Zou et al. 2019), Tian ve arkadaşları da 2020 yılında yaptıkları çalışmada, Panax ginseng uygulamasının MNK45 gastrik kanser hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını Bax yönünde değiştirerek hücreleri apoptoza sürüklediğini söylemişlerdir (Tian et al. 2020). Çalışmamızda Bax ifadesinde immunohistokimyasal olarak anlamlı ($p=0,758$) bir artış görülmemiştir. Bu farklılığın Zou ve Tian arkadaşlarının kullandıkları hücre tipinin farklı olmasından ya da Western Blot yöntemini kullanarak Bax ifadesindeki artışı göstermelerinden kaynaklanmış olabileceğini, uygulamalarımızın daha uzun süreli yapılmasıyla bu artışın görülebileceğini düşünmekteyiz. Gruplardaki Bcl-2 değişimleri immunohistokimyasal olarak ve rtPCR ile değerlendirildi. IHC Sonuçlarımıza göre; Bcl-2 proteinlerinin immunoreaktivitesi grup 1 ve grup 2 de şiddetli olarak kaydedilirken uygulama sonrası grup 3 ve grup 4'te az seviyelerinde görüldü ve bu immunoreaktivitedeki azalış kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında anlamlıydı ($p=0,036$) (Figür 1-J, K, L, M). Bcl-2 immunoreaktivitesinde grup 3 ve 4 arasında ise anlamlı bir farklılık görülmedi. Bcl-2 immunoreaktivitesinde grup 3 ve 4 teki anlamlı bir azalış olması panax+Sisplatin uygulamasının ve Sisplatin uygulamasının hücrelerde Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını gösterirken yalnızca Panax ginseng uygulanan grup 2'de kontrole göre anlamlı bir değişimin olmaması, Panax ginseng'in Bcl-2 seviyesine tek başına etkisinin olmadığını düşündürmektedir. PCR sonuçları da bu bulgularımızı destekler nitelikteydi ve Bcl-2 ekspresyon seviyesi en düşük grup 3'te kaydedildi. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde hücredeki yaşam proteinlerinden biri olan Bcl-2 de ki azalışın Sisplatin gruplarında olması ve Panax ginseng grubunda olmaması panax'ın YKG 1 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranına etkisi olmadığını göstermektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, 48 saat boyunca YKG1 glioblastoma hücrelerinde Panax ginseng ile uygulama yapılması mitokondriyal yolak üzerinden yani Bax/Bcl-2 oranının değişiminden kaynaklı olarak apoptotik süreci etkilememektedir. Jia D.ve arkadaşları ise 2014 yılında Panax saponinlerinin iskemik rat beyinde nöronlar üzerine anti-apoptotik bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (Jia et al. 2014). Sonuçlarımızdaki farklılık Panax ginseng'in sağlıklı hücrelerde anti-apoptotik bir aktiviteye katkı sağlarken kanserli hücrelerde böyle bir etkisi olmama ihtimalini düşündürmektedir.

MTT sonuçlarımıza göre en yüksek hücre canlılığı oranı grup 1 %81 de iken, grup 2'de de %72 olarak tayin edildi. MTT sonuçlarına göre 48 saat yalnız Panax ginseng uygulamasının hücre canlılığını bir miktar düşürdüğü ancak bu oranın glioblastoma hücrelerinde Panax ginseng'in uygulanan doz ve sürede tek başına öldürücü etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Ham ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada Panax ginseng ekstresinin glioblastoma hastalarından elde edilen glioblastoma kök hücrelerinde öldürücü etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Ham et al. 2019). Çalışmamızda benzeri etki görülmemesinin nedeni olarak kullanılan dozun Ham ve arkadaşlarının uygulama dozlarından daha düşük olması ya da kullandığımız hücrelerin glioblastoma kanser hücreleri olması, Ham ve arkadaşlarının ise kanser kök hücresi üzerinde bu etkileri görmüş olmalarından kaynaklı olabileceği düşünülebilir. Grup 3'te ve 4'te canlı hücre sayısının büyük oranda azalmış olması Panax ginseng uygulamasının tek başına Caspase-3 aktivitesini etkilemediği fakat Sisplatin ile birlikte agonist bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür. MTT hücre canlılığı deneyine ilaveten yapılan Caspase-3 immunohistokimyası ve PCR sonuçları da MTT bulgularını destekler niteliktedir. Gruplar arasında Caspase-3 immunohistokimya sonuçları değerlendirildiğinde grup 3 ve 4'te anlamlı bir artış ($p=0,024$) olduğu görülürken grup 1 ve 2 de ise boyanma şiddetinin aynı olduğu kaydedilmiştir. IHC

bulgularında grup 3 ve 4'te Caspase-3 şiddeti artarken, Grup 2 de bir artışın olmamıştır. Bu bulgu, 48 saat Panax ginseng uygulamasının, YKG1 hücrelerinde apoptozu Caspase-3 üzerinden tetiklemediğini göstermiştir. Grup 3 ve 4 kendi arasında değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılığın bulunmaması Panax ginseng'in Sisplatin tedavisinden önce ve birlikte uygulanmasının Caspase-3 proteininin varlığı ve ekspresyon seviyesine bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Elde ettiğimiz PCR sonuçlarımız da değerlendirildiğinde IHC ve MTT sonuçlarıyla uyumlu olması Panax ginseng'in YKG1 hücrelerinin apoptozuna, uygulanan doz ve sürelerde, katkısı olmadığı sonucunu güçlendirmektedir.

Kırmızı ginseng'in endotelial hücre invazyonunu ve tüp formasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği, NF- κ B'yi düzenleyerek apoptozu etki ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Dai et al. 2017). Literatür bilgisi değerlendirildiğinde Panax ginseng'in YKG 1 hücrelerinde apoptozu, NF- κ B ya da diğer apoptotik sinyal yolları üzerinden doz bağımlı olarak ya da uzun süreli uygulama sonucu düzenleyebileceği görülmektedir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da Bax/Bcl-2 oranları sabit iken Caspase-3'ün artmış olması Panax ginseng uygulamasının tek başına ve Sisplatin tedavisi ile kombine olarak kullanılmasının mitokondriyal hücre ölüm yolağını etkilemediğini fakat ölüm reseptörleri sinyali üzerinden hücre ölümüne etkisi olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak alternatif tıpta tedavi edici ve koruyucu olarak kullanılan Panax ginseng'in çalışmamızda kullanılan doz ve sürede YKG1 hücrelerinin apoptozuna etki etmediği görülmüştür. Sisplatin uygulaması öncesinde kullanıldığında ise Sisplatin'in apoptotik etkilerini değiştirmedeği görülmüştür. Farklı doz ve süreli uygulamalar ile yapılacak ileri çalışmalarda Panax ginseng' in glioblastoma tedavisinde koruyucu ve tedaviye destek olarak kullanılmasının etkileri detaylı şekilde araştırılmalıdır.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma etik standartlarına uygun biçimde hazırlanmıştır ve herhangi bir etik onay gerektirmemektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Boeckman HJ, Trego KS, Turchi JJ.** Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining. *Molecular Cancer Research*. 2005;3(5): 277–85.
- Coluccia D, Figueiredo CA, Wu MYJ, Riemenschneider AN, Diaz R, Luck A, Smith C, Das S, Ackerley C, O'Reilly M, Hynynen K, Rutka JT.** Enhancing glioblastoma treatment using cisplatin-gold-nanoparticle conjugates and targeted delivery with magnetic resonance-guided focused ultrasound. *Nanomedicine*:

- Nanotechnology, Biology, and Medicine [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;14(4): 1137–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.01.021>
- Dai D, Zhang CF, Williams S, Yuan CS, Wang CZ.** Ginseng on Cancer: Potential Role in Modulating Inflammation-Mediated Angiogenesis. *American Journal of Chinese Medicine.* 2017;45(1): 13–22.
- Elmore S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology.* 2007;35(4): 495–516.
- Erkin Özgiray.** GLİOBLASTOMDA MOLEKÜLER MEKANİZMALAR, TANI VE GÜNCEL TEDAVİ YAKLAŞIMLARI [Internet]. 2021. Available from: <https://yayinevi.ege.edu.tr/files/yayinevi/icerik/143.pdf>
- Ham SW, Kim JK, Jeon HY, Kim EJ, Jin X, Eun K, Park CG, Lee SY, Seo S, Kim JY, Choi SH, Hong N, Lee YY, Kim H.** Korean Red ginseng extract inhibits glioblastoma propagation by blocking the Wnt signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2019;236(December 2018): 393–400. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.031>
- Jia D, Deng Y, Gao J, Liu X, Chu J, Shu Y.** Neuroprotective effect of Panax notoginseng polysaccharides against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;63: 177–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.034>
- KOMOTAR, R. J., WILSON, D. A., & CONNOLLY ES.** IN THE Clone Wars: Advance of the Koreans. *Neurosurgery.* 2005;57(1).
- Mjos KD, Orvig C.** Metalodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Reviews.* 2014;114(8): 4540–63.
- Nakagawa T, Kubota T, Ido K, Sakuma T, Matsuda K.** The combined effects of multiple chemotherapeutic agents for malignant glioma cells. 2007; 31–7.
- Numata M, Cross JR, Hospital H, Watanabe T, Yamamoto N.** The clinical significance of SWI / SNF complex in pancreatic cancer. 2012;(November).
- Oh J, Yoon HJ, Jang JH, Kim DH, Surh YJ.** The standardized Korean Red Ginseng extract and its ingredient ginsenoside Rg3 inhibit manifestation of breast cancer stem cell-like properties through modulation of self-renewal signaling. *Journal of Ginseng Research* [Internet]. Elsevier Ltd; 2019;43(3): 421–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.05.004>
- Ru W, Wang D, Xu Y, He X, Sun Y, Qian L, Zhou X, Qin Y.** Chemical constituents and bioactivities of. 2015;9(1): 23–32.
- Shin JY, Lee JM, Shin HS, Park SY, Yang JE, Cho SK, Yi TH.** Anti-cancer effect of ginsenoside F2 against glioblastoma multiforme in xenograft model in SD rats. *Journal of Ginseng Research.* 2012;36(1): 86–92.
- Tian YZ, Liu YP, Tian SC, Ge SY, Wu YJ, Zhang BL.** Antitumor activity of ginsenoside Rd in gastric cancer via up-regulation of Caspase-3 and Caspase-9. *Pharmazie.* 2020;75(4): 147–50.
- Wang J, Qi F, Wang Z, Zhang Z, Pan N, Huai L, Qu S, Zhao L.** Review A review of traditional Chinese medicine for treatment of glioblastoma. 2019;13(6): 476–87.
- Wirsching HG, Galanis E, Weller M.** Glioblastoma. *Handbook of Clinical Neurology.* 2016;134: 381–97.
- Yang Z, Zhao T, Liu H, Zhang L.** Ginsenoside Rh2 inhibits hepatocellular carcinoma through β -catenin and autophagy. *Scientific Reports* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6: 1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19383>
- Zou W, Niu C, Fu Z, Gong C.** PNS-R1 inhibits Dex-induced bronchial epithelial cells apoptosis in asthma through mitochondrial apoptotic pathway. *Cell and Bioscience* [Internet]. BioMed Central; 2019;9(1): 1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0279-x>