



Cytotoxic effects of *Satureja cuneifolia* extract in liver cancer cell line (HepG2)

Dilge YÜCEL *¹

¹ Eskişehir Fatih Fen Lisesi, Eskişehir, Turkey

Abstract

In this study, it was aimed to investigate the effects of extracts obtained from the seed of Rock thyme (*Satureja cuneifolia*) on the cytotoxic cell death in HepG2 human liver cancer cell lines. The plant samples collected from the vicinity of Kanlıpınar Village of Eskişehir were grounded after drying and then extracts were obtained. The liver cancer cells were replicated in a specially prepared medium. Plant extracts taken at doses of 1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 µg/µl were added to replicated liver cancer cells and the effects levels were examined at 24, 48 and 72 hour intervals.

In the study, the data obtained after 24 hours showed that the doses of 1, 5, 10, and 15 µg/µl inhibited the development of cancer cells while 20 µg/µl dose was not effective, the doses of 25 and 30 µg/µl were not effective on the development of cancerous cells. According to the results of 48 hours of experiments; a significant death was observed in cancer cells at all doses applied (1-30 µg/µl). According to the results of 72 hours of experiments; all doses applied (1-30 µg/µl) inhibited the development of cancer cells and caused significant death of cancer cells. As a result, it has been determined that *Satureja cuneifolia* extracts inhibit the development of liver cancer cells and that this plant may be used in the design of cancer medicines. Future studies are needed to determine the most effective dose/time applications and action of mechanisms of *Satureja cuneifolia* extracts.

Key words: liver cancer, HepG2, Rock thyme, *Satureja cuneifolia*.

----- * -----

Karaciğer kanser hücre dizilerinde (HepG2) *Satureja cuneifolia* ekstresinin sitotoksik etkileri

Özet

Bu çalışmada Kaya kekiği (*Satureja cuneifolia*) bitkisinden elde edilen ekstrelerin HepG2 insan karaciğer kanser hücrelerinde in vitro sitotoksik hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bitki örnekleri Eskişehir'in Kanlıpınar Köyü çevresinden toplanarak kurutulduktan sonra öğütülmüş ve ekstreleri elde edilmiştir. Karaciğer kanser hücreleri özel olarak hazırlanmış olan besi ortamında çoğaltılmıştır. 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30µg/µl'lik dozlarda alınan bitki ekstreleri, çoğaltılan karaciğer kanser hücrelerine verilmiştir ve etki düzeyleri 24, 48 ve 72 saat aralıklarla incelenmiştir. Kanser hücrelerinde canlılık testleri tripan mavisi ve MTT testi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışmada 24 saat sonunda elde edilen veriler, 1, 5, 10 ve 15µg/µl dozların kanser hücrelerinin gelişimini engellemesine karşın; 20, 25 ve 30µg/µl dozların ise kanserli hücrelerin gelişimi üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Deneylerin 48 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozlarda (1-30µg/µl) kanser hücrelerinde belirgin şekilde bir ölüm gözlenmiştir. Deneylerin 72 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozların (1-30µg/µl) kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve kanserli hücrelerin önemli oranda ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; *Satureja cuneifolia* ekstresinin karaciğer kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve kanser ilaçlarının tasarımında bu bitkinin kullanılabileceği belirlenmiştir. İleride yapılacak ayrıntılı çalışmalarla *Satureja cuneifolia* ekstresinin en etkin doz/süre uygulamaları ve etki mekanizmalarının belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: karaciğer kanseri, HepG2, Kaya kekiği, *Satureja cuneifolia*

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905319228818; Fax.: +905319228818; E-mail:dilgeyucel@gmail.com

1. Giriş

Hücrede DNA'nın hasarının olması halinde hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması kanser olarak adlandırılır. Kanserın esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşması olarak bildirilmektedir (Kuş, 2016). İnsan vücudunda çok sayıda mutasyona uğramış hücre olmasına karşın bunların büyük bir kısmı immün sistem tarafından yok edilmektedir. Normal sağlıklı vücut hücreleri bölünerek ölen hücrelerin yenilenmesini sağlar. Ancak normal hücrelerin bölünmeleri sonsuz olmayıp sınırlıdır. Sağlıklı bir hücrenin ne zaman, hangi sayıda bölünebileceği bilgisine sahiptir. Fakat kanser hücreleri, bu bilinci kaybederek, kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Çoğalan bu kanser hücreleri toplanarak tümörleri oluştururlar ve oluşturdukları bu tümörden ayrılarak dolaşım ile vücudun diğer bölgelerine giderlerse buralarda da tümör kolonileri oluştururlar. Karaciğerde bulunan hücrelerin ani, kontrolsüz ve aşırı biçimde çoğalması sonucu tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. Karaciğer kanseri, kanser türleri arasında ölümcül olarak bilinen kanserlerdendir (İsan ve Tonbuş, 2016).

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan Kaya kekiği-Dağ kekiği (*Satureja cuneifolia*) 20cm ye kadar boylanan, öbeler halinde bulunan, beyaz çiçekli, çok yıllık yarı odunsu bir bitki olup (Şekil 1); taşlık, kayalık, kurak ve açıklık alanları tercih eder (Kan ve ark. 2006). Temmuz-Ağustos aylarında çiçek açar. Ülkemizde oldukça geniş bir alanda doğal olarak yayılış gösterir (Yücel, 2014).



Şekil 1. Kaya kekiğinin genel görünüşü

Kaya kekiği halk arasında, zihin yorgunluğu giderici, kuvvet verici, cinsel isteği artırıcı, göğüs hastalıkları ve şeker hastalığı tedavisinde, mideyi güçlendirici, baharat ve gıda olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999; 2004; Kargioğlu ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar kaya kekiğinin antioksidan ve antimikrobial etkisinin yüksek olduğu (Çavar et al., 2008; Mihajilov-Krstev et al., 2010; Oke, et al., 2009; Skočibušić et al., 2006); ayrıca analjezik (ağrı kesici) etkisinin olduğu bildirilmiştir (Aydın ve ark.,1996). Bu bitki ile ilgili yapılmış değişik araştırmalar olmasına karşın; yapılan kaynak araştırmalarında karaciğer kanserine etkisi üzerine yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Bitki materyalinin toplanması ve ekstraksiyon hazırlama

Bitki örnekleri Eskişehir'in Akpınar Köyü çevresin tekniğine uygun olarak Temmuz ayında toplanmıştır. Analizler için gerekli örnekler, sağlıklı bireylerden, bitkiye fazla zarar vermeyecek şekilde, toprak üstünde bulunan dallar bir makasla kesilerek, steril torbalara konmuştur. Laboratuvara getirilen bitki örnekleri temizlenerek, steril bir ortamda kurutulmuştur. Kuruyan bitkilerin yaprakları ayrılarak değirmende öğütülmüş, daha sonra gözenek çapı 2 mm olan bir elekten elenmiştir. Bir erlene; 10 gram öğütülmüş bitki örneği üzerine 100mL saf su konarak, etüv içinde 60°C de 12 saat bekletildikten sonra Por açıklık çapı 110 mm olan whatman filtreden süzülerek ekstrakt elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen ekstrakt 0.22 µm por büyüklüğündeki mikrobiyolojik filtrelerden süzülerek steril edilmiştir.

Bitki örneklerinden ekstrelerin elde edilmesi Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Bitki Ekolojisi Laboratuvarında; sitotoksite deneyleri Moloküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

2.2. Hücre dizileri ve kültür aşaması

İnsan kanser hücre dizisi olarak “HepG2 insan karaciğer kanser” hücreleri kullanılmıştır. İnsan karaciğer kanseri hücre dizileri besiyeri (%10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 100 unite/mL penisilin/streptomisin, 2 mL-glutamin içeren ve %9,2 NaHCO₃ DMEM) içinde, 37°C de %0.5 karbondioksitli ortamda yetiştirilmiştir. Hücre dizisi 12-48-72 saat CO₂ inkübatöründe bekletildikten sonra ışık mikroskopunda yoğunluğuna bakılmıştır. Besiyeri çekilmiş flasklara 37°C su banyosunda ısıtılan 1X’lik Tripsin-EDTA (Etilendiamin Tetraasetik Asit)’dan 1-2 mL eklenmiştir. Hücreler ılık (%1) tripsin/EDTA ile kaldırılarak, tripan mavisi ile sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plakalara 10x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ile süspansiyon haline getirildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu aktararak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılıp, sonunda Kaya kekiği ekstralarının 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg/µL’lik dozlarını içeren besiyerlerinden 200 µL/kuyucuk konularak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Deneylerde herbir doz için dört kuyucuk kullanılmış, sonuçlarda bunların ortalama değerleri kullanılmıştır.

2.3. Hücre canlılığının tripan mavisi atılım testi ile belirlenmesi

Hücre dizisi için hücre sayımı yapılmış ve trypan blue atılım testi ile hücrelerin canlılığına bakılmıştır. Lam üzerine 10µL. hücre +10µL. trypan blue koyularak ışık mikroskopunda boya almayan hücreler sayılarak canlılık belirlenmiştir. Alanda 100 hücre sayılarak boya almayan hücrelerin yüzde (%) oranı hesaplanmıştır.

2.4. Hücre canlılığının MTT testi ile belirlenmesi

Yöntem sağlıklı hücrelerde, mitokondrideki dehidrogenaz enziminin MTT (Difeniltetrazolyum Bromür) boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise, boyanmamaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017). Oluşan formazan kristalleri; DMSO, izopropanol gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağlı olarak, spektrofotometrik yöntemle, görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorpsiyon verir ve bulunan miktar, direk olarak canlı hücrelerin oranını vermektedir.

MTT, PBS (5 mg/ml) içinde çözülerek, filtrasyon ile steril edilmiş ve -20°C’de saklanmıştır. Hücrelerin madde dozları ile muamelesinin ardından plakalardan medyum uzaklaştırılmış ve final konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde medyum ile hazırlanan MTT solüsyonu her kuyucuğa 125 µL ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra plakalardaki MTT –medyum solüsyonu uzaklaştırılmış ve canlı hücrelerin oluşturduğu formazan tuzların çözünmesi için plakalardaki kuyucuklara 100 µL DMSO ilave edilerek plakalar 10 dakika çalkalayıcıya bırakılmış, daha sonra ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Yukarıda belirtilen analizlerde, tüm deneyler üçer tekrarlı yapılmış ve deney sonuçları ortalama ± standart hata olarak verilerek ilgili grafikte topluca gösterilmiştir. Grafik çizimi Microsoft Excel programında yapılmıştır.

3. Bulgular

Deney sonuçları 24, 48 ve 72 saat aralıklarla kontrol edilerek hücre sayımları yapılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda sıra ile verilmiştir.

3.1. Bitki ekstralarının 24 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Yapılan deneylerde sonunda 24 saat sonunda 1, 5, 10 ve 15 µg/µL dozlarda canlı kanser hücrelerinde azalma gözlenmiş, 20 µg/µL dozda kontrol grubu ile aynı düzeyde bir gelişme izlenmiş, 25 ve 30 µg/µL dozlarda ise kontrol grubunda hücre sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Bu sonuca göre 20 µg/µL doz etkili olmazken 1, 5, 10 ve 15 µg/µL dozlar kanser hücrelerinin gelişimini engellerken, 25 ve 30 µg/µL dozlar kanserli hücrelerin gelişimini üzerine etkili olmamıştır. Ancak burada ilginç olan 1 µg/µL’lik dozun 24 saat sonunda uygulanan diğer dozlara göre hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi üzerine çok daha etkili olduğu gözlenmiştir.

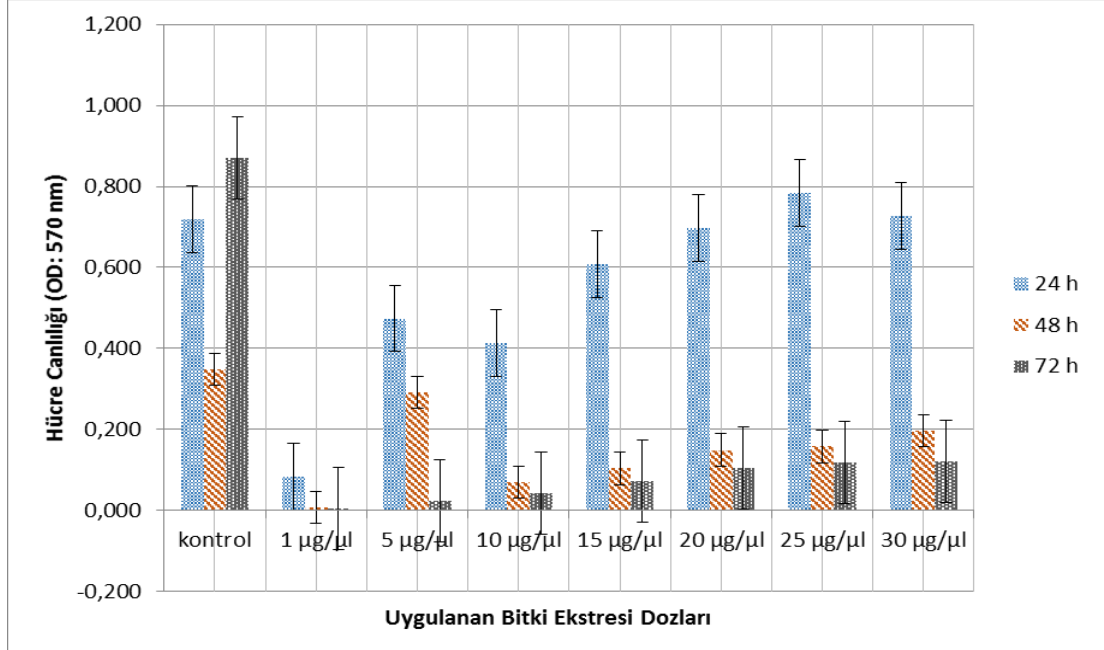
3.2. Bitki ekstralarının 48 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Deneylerin 48 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozlarda (1-30 µg/µL) kanser hücrelerinde belirgin şekilde bir ölüm gözlenmiştir (Şekil 3).

3.3. Bitki ekstralarının 72 saatlik süre sonunda kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Deneylerin 72 saat sonucuna göre; uygulanan tüm dozların (1-30 µg/µL) kanser hücrelerinin gelişimini

engellediği ve kanserli hücrelerin önemli oranda ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Özellikle, 1 µg/µL'lik ve 10 µg/µL'lik dozların kanserli hücreler üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. Kaya kekiği (*Satureja cuneifolia*) bitkisinden elde edilen ekstraların HepG2 Karaciğer kanser hücrelerine in vitro sitotoksik hücre ölümü üzerine etkileri

4. Sonuçlar ve tartışma

Satureja sp. cinsinin türleri ile yapılmış bazı çalışmaların bulunmamaktadır (Grosso, et al., 2009; Sadeghi, et al., 2013). *Satureja cuneifolia* türünün fitokimyasal özellikleri (Tümen et al., 1998; Kan vd., 2006) ile antioksidan (Ćavar et al., 2008) ve antimikrobiyal etkileri (Skočibušić and Bezić, 2004; Aydın et al. 1996; Koşar et al. 2008) üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmasına karşın, insan karaciğer kanseri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamıştır.

Kaya kekiğinden alınan örnekler üzerinde yapılan analizlere göre; Timol (42,5-45,2%), p-simen (19,4-24,3%) ve karvakrol (8,5-13,2%) ana bileşen olarak tespit edilmiştir (Koşar ve ark. 2008; Tümen et al., 1998; 2005). Kaya kakeğinde elde edilen ekstrelerin *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, bakterileri üzerinde 62.5 ve 250 mg/ml lik miktarların antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Koşar ve ark. 2008; Kan ve ark. 2006). Yapılan bir diğer çalışmada; Güney-Hırvatistanda bulunan dört *Satureja sp.* türünün uçucu yağ profillerinin nükleer ribozomal DNA yapıları karşılaştırılmış olup, filogenetik analiz sonucu *S. montana* ve *S. cuneifolia*, monoterpen hidrokarbon karvakrol açısından zengin benzer bir uçucu yağ kompozisyonuna sahip olduğu; *S. cuneifolia*'da bir uçucu yağ beta-cubebene (% 8.7), limonen (% 8.3), alfa-pinen (% 6.9), spathulenol ve beta-karyofilen olarak karakterize edildiği bulunmuştur (Bezić et al., 2009).

S. cuneifolia yağlarının antimikrobiyal etkisi sıvı mikrodistilasyon yöntemi ile birçok ilaca dirençli patojenlere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip olduğu, bu yağların *Pseudomonas aeruginosa* hariç olmak üzere, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve maya (*Candida albicans*) karşı maksimum aktiviteye sahip olduğu, ayrıca *S. aureus* ve *E. coli* gibi tıbbi açıdan önemli patojenlerinin büyümesini inhibe ettiği ve *C. albicans* ile *S. cerevisiae* karşı mantar öldürücü aktivitesi olduğu da gözlenmiştir (Skocibusic M and Bezić N. 2004).

Bu çalışmada yapılan deneyler sonunda; etki süresinin 24 saat olarak uygulandığı ve 1-15 µg/µl dozların kullanıldığı deney serilerinde karaciğer kanser hücrelerinin gelişiminin engellendiği, 20-30 µg/µl dozlarda ise bir engellenmenin olmadığı gözlenmiştir. Buna göre 1 µg/µl'lik dozun 24 saat sonunda uygulanan diğer dozlarla göre hücre ölümü üzerine çok daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu durum yapılacak ayrıntılı çalışmalarla açıklığa kavuşturulmalıdır.

Bitki ekstralarının etki süresinin 48 saat olarak uygulandığı deney serilerinde tüm dozların belirgin bir şekilde kanserli hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre sürenin 48 saate uzaması ile birlikte bitki ekstresinin karaciğer hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır.

Bitki ekstralarının etki süresinin 72 saat olduğu deneylerde uygulanan tüm Kaya kekiği ekstresinin dozları kanser hücrelerinin gelişimini engelleyerek önemli oranda ölümüne neden olmuştur. Bu sonuca göre bitki ekstresi, sürenin 72 saate uzaması ile birlikte etkisini daha belirgin bir şekilde göstererek karaciğer hücrelerinin gelişimini engellemiş ve ölmelerini sağlamıştır.

Sonuç olarak; Kaya kekiği ekstreleri HepG2 tip insan karaciğer kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve öldürdüğü belirlenmiş olup, gelecekte kanser tedavisi için gerekli ilaçların tasarımında bu bitkinin kullanılabileceği belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Aydın, S., Öztürk, Y., Beis, R., Hüsnü Can Başer, K. (1996). Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Research*, 10 (4), 342-344.
- Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Çavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.
- Grosso, C., Oliveira, A. C., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., Palavra, A. M. F. (2009). Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *Journal of food science*, 74 (9).
- İsan, H., Tonbuş, A. (2016). Karaciğer Kanseri Hücrelerinin Sitoplazmik Özellikleri ile Kültür Süreci İlişkisi: Konfokal Mikroskopik Karşılaştırmalı Kantitatif Bir Çalışma, *Maltepe Tıp Dergisi* 8 (3), 18-23
- Kan, Y., Uçan, U.S., Kartal, M., Altun, M.L., Aslan, S., Sayar, E., Ceyhan, T. (2006). GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. Essential Oil, *Turk J Chem*, 30, 253 – 259.
- Kargioğlu, M., Cenki, S., Serteser, A., Evliyaoglu, N., Konuk, M., Kök, M. Ş., Bağcı, Y. (2008). An ethnobotanical survey of inner-west Anatolia, Turkey. *Human Ecology*, 36 (5), 763-777.
- Koşar, M., Demirci, B., Demirci, F. H., Başer, K. H. C. (2008). Effect of maturation on the composition and biological activity of the essential oil of a commercially important *Satureja* species from Turkey: *Satureja cuneifolia* Ten.(Lamiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6), 2260-2265.
- Kuş, G., (2017). Hepatosellüler karsinom hücrelerinde karmofurun sitotoksik ve apoptotik etkileri, *Kocatepe Tıp Dergisi Kocatepe Medical Journal* (18) 55-60.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnovic, D., Kitic, D. (2010). Antimicrobial activity of *Satureja* L. essential oils against phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. *Biologica Nyssana*, 1, 95-8.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112(4), 874-879.
- Sadeghi, I., Yousefzadi, M., Behmanesh, M., Sharifi, M., Moradi, A. (2013). In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15 (1), 70.
- Skočibušić, M., Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(12), 967-970.
- Skočibušić, M., Bezić, N., Dunkić, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subs picata* Vis. growing in Croatia. *Food chemistry*, 96(1), 20-28.
- Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1) 112-118
- Tümen G., Kırmıner N., Ermin N., Başer, KH. (1998). The essential oil of *Satureja cuneifolia*. *Planta Med.*, 64 (1). 81-3.
- Yücel, E. (2014). Türkiye’de Yetişen Tıbbi Bitkiler Tanıma Klavuzu”, *Türmatsan, Eskişehir*.

(Received for publication 23 February 2017; The date of publication 15 August 2018)