Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi

Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering

AKU J. Sci. Eng. **18** (2018) **011002** (420-425)

AKÜ FEMÜBİD 18 (2018) 011002 (420-425)
DOİ: 10.5578/fmbd.66935

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Adaçayı Bitkisinin Osteosarkoma (U-2 OS) Hücre Hattındaki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Dilek Göktürk[1]

[1] *Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana.*

e-posta: dilekgokturk@gmail.com

Geliş Tarihi: 13.03.2017 ; Kabul Tarihi: 05.07.2018

Özet

Adaçayı; Lamiaceae ailesine ait, aromatik, akdeniz kökenli bir bitkidir. Tüm dünyada, adaçayı, çeşitli hastalıklara deva bulmak ve hastalıklardan korunmak amacıyla yüzyıllardır geleneksel tedavide kullanılmaktadır. Adaçayı; sineol,borneol,rozmarinik asit, karnasol ve karnosik asitte dahil olmak üzere bir çok aktif bileşen ve esansiyal yağ içerir. Bu içeriği sayesinde antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar, antitümör gibi bir çok yararlı özelliğe sahip olmakla birlikte Alzheimer ve diyabet gibi çeşitli hastalıklarda da etkilidir. Bunun yanı sıra, Adaçayı bitkisinin bir çok kanser hücre hattı üzerinde etkili olduğunu belirten birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada ise adaçayı bitkisinin, birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türü olan osteosarkoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla geleneksel tedaviden esinlenerek adaçayı infüzyon solüsyonu olarak hazırlanmış ve U-2 OS osteosarkoma hücre hattı 3 gün boyunca çeşitli hacim oranlarında (1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 ve 1/25 hacim/hacim) infüzyon solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücre canlılığı nötral kırmızısı canlılık testi ile ölçülmüştür. Nötral kırmızısı canlılık testine göre 1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 and 1/25 hacim oranlarında verilen infüzyon solüsyonu U-2 OS hücrelerinin canlılığını sırasıyla %3, %4, %26, %27 ve %29 oranında azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar, adaçayı bitkisinin osteosarkoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olduğunu desteklemektedir.

Anahtar kelimeler
U-2 OS; Adaçayı, Osteosarkoma; Nötral kırmızısı, Sitotoksisite.

Investigation of the Cytotoxic Effect of Sage on Osteosarcoma (U-2 OS) Cell Line

Abstract

Sage is an aromatic, Mediterranean plant which belongs to the Lamiaceae family. All over the world, sage has been used in the traditional medicine for many centuries as a therapeutic and also a preventing agent for several diseases. Common sage possess many active components and essential oils including cineole, borneol, rosemarinic acid, carnsole and carnosic acid. Due to these components and essential oils, Common sage has many properties such as antioxidation, antibacterial, anti-inflammation, anti-carcinogen and it is effective on various illnesses such as Alzheimer, diabetes etc. Furthermore, it was reported that common sage is effective for the killing of many type of cancer cells. In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effect of common sage on Osteosarcoma which is the most common and high grade malignant primary bone tumor. For this purpose inspired by the traditional medicine common sage was prepeared as infusion solution and U-2 OS osteosarcoma cells were exposed to infusion solution on various concentrations (1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 and 1/25 (v/v) for 3 days. At the end of this time cell viability was measured by neutral red cell viability assay. According to neutral red assay the 1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 and 1/25 (v/v) given infusion solutions were reduced the viability of U-2 OS cells by nearly %3, %4, %26, %27 and %29 respectively. The results indicate that, sage has cytotoxic effect on osteosarcoma cells.

Keywords
U-2 OS; Sage; Osteosarcoma; Neutral red, Cytotoxicity.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Adaçayı*;* akdeniz kökenli, yaprak dökmeyen aromatik bir bitkidir (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Behradmanesh, Derees and Rafieian, 2013). Lamiacae ailesine dâhildir ve bu ailedeki diğer bitkiler gibi faydalı bir çok esansiyel yağ (sineol, borneol, tüjon), terpenik ve fenolik bileşen (Karnasol, karnosik asit, rozmarinik asit vb.) içerir (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Tularat *et al.*, 2013; Vladimir-Knezevic *et al.*, 2014). Adaçayı genellikle mayıs ayından itibaren çiçeklenmeye başlar. Çok yıllık, yarı çalımsı bir bitkidir. Bitki çiçeklenmeye başladığında hasat edilebilir. Yaprakları tüylü, gri-gümüş renklerdedir ve uzunluğu genişliğinin yaklaşık iki katı kadardır (Yılmaz, D. Et al., 2015). Adaçayının bitkisel tedavideki yeri binlerce yıl öncesine dayanmaktadır ve ülkemizde de halk arasında sıkça kullanılır. Geleneksel tıpta boğaz enfeksiyonu, mide rahatsızlıkları, çeşitli inflamatuar hastalıklar ve diyabet gibi hastalıkları tedavi etmek amacıyla özellikle çay olarak sıklıkla tercih edilmiştir (Bauer *et al.*, 2012; Serakta *et al.*, 2013). Yapılan birçok yayında Adaçayı bitkisinin antiseptik, antioksidan, anti-inflamatuar, antispazmotik etkilere sahip olduğu ve diyabet ve Alzheimer gibi hastalıklarda da etkili olduğu gösterilmiştir (Stefanović, Stanojević and Čomić, 2012; Behradmanesh, Derees and Rafieian, 2013; Serakta *et al.*, 2013; Tularat *et al.*, 2013; Vladimir-Knezevic *et al.*, 2014). Bunun yanı sıra Adaçayı bitkisinin antikarsinojenik özelliğe sahip olduğu ve yassı hücreli karsinom (UMSCC1), hepatosellüler karsinom (HepG2), insan lenfoma ve lösemi, Hep-2, HeLa, HT-29, A-549 ve A-375 gibi kanser hücre hatlarında etkili olduğu rapor edilmiştir (Sertel *et al.*, 2011; Shahneh *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2016; Jiang, Zhang and Rupasinghe, 2017).

Ostesarkoma (OS) birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türüdür. Genellikle çocuk, ergen ve genç yetişkin bireylerde görülür (Ando *et al.*, 2013; Hirahata *et al.*, 2016). Birincil mezankimal kemik hücrelerinden köken alır ve genellikle uyluk kemiği, kaval kemiği ve kol kemiğinde görülür (Ru *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Shaikh *et al.*, 2016). Kötü prognozlu olan OS metastaz eğilimlidir. İleri derecedeki OS hastalarının çoğunluğunda akciğer metastazı görülür ve 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %20'dir (Ando *et al.*, 2013; Li and Wang, 2016; Li *et al.*, 2016; Kleinsimon *et al.*, 2017). Bu kötü prognozlu, agresif ve ölüm oranı yüksek kanser türüyle mücadele etmek adına varolan tedavilerin geliştirilmesi ve yeni yaklaşımlar türetilmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada da osteosarkoma tedavisi için türetilebilecek yeni yaklaşımlara bir adım olması umuduyla Adaçayı bitkisinin osteosarkoma hücre hattı (U-2 OS) üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre hattı ve kültür koşulları

Çalışmada U-2 OS, osteosarkoma hücre hattı (ATCC® Numarası: HTB-96™) kullanılmıştır. Hücre Hattı Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Devrim GÖZÜAÇIK'ın laboratuvarından temin edilmiştir. Hücreler 6 gözlü hücre plakalarına her bir gözde 75000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium Lonza, Belgium) besi yeri eklenerek, 37 °C deki %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

2.2. Adaçayı *infüzyonunun hazırlanması*

Adaçayı *(Salvia Officinalis)* bitkisi Türkiye, İzmir, Özdere (rakım: 172 m) bölgesinden kültür bitkisi olarak temin edilmiş ve geleneksel tedavi yöntemlerinden esinlenerek infüzyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için halk arasında kullanılan miktar göz önünde bulundurularak 1,5

gr taze bitki, 90°C' deki 50 ml ddH_2O içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Süzüldükten sonra hücrelere verilmek üzere 22 µM por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

2.3. Adaçayı *infüzyonunun sitotoksik etkisinin U-2 OS hücrelerinde araştırılması*

Optimum hücre ölümüne neden olabilecek dozun belirlenmesi için kültürün 2. gününde, kontrol grubu hariç tutularak, hücrelere 1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 ve 1/25 hacim/hacim oranlarında adaçayı infüzyonu verilmiş ve kontrol grubu da dâhil olmak üzere hacimler ddH_2O ile eşitlenmiştir. Hücreler adaçayı'na 3 gün boyunca maruz bırakılmış ve bu süre içerisinde besi ortamı her gün yenilenmiştir. Üç günlük inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki nötral kırmızısı canlılık testi ile ölçülmüştür.

2.4. Sitotoksisite testi

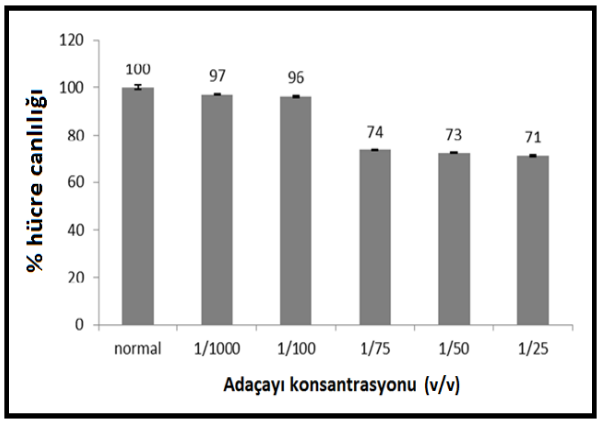
Sitotoksisitenin ölçülmesi için nötral kırmızı hücre canlılık testi kullanılmıştır. Nötral kırmızısı hücre canlılık testi bir kültürdeki canlı hücrelerin sayısının kantitatif olarak tahmin edilmesine olanak tanıyan ve sitotoksisite testlerinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Pek çok farklı orjinden gelen hücre hattı ve primer kültür için uygulanabilmektedir (Repetto *et al.,* 2008). Katyonik bir boya olan nötral kırmızısı, canlı hücreler tarafından aktif transportla hücre içine alınır ve lizozomda birikerek canlı hücrelerin miktarının ölçülebilmesini sağlar (Miller *et al.*, 2015; van Tonder *et al.*, 2015). Testin protokolüne göre, öncelikle besi yerleri uzaklaştırılarak 1'er ml nötral kırmızısı solüsyonu eklenmiş ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda kırmızı renkli çökeltilerin gözle görünür hale geldiği tespit edilmiştir. Nötral kırmızısı solüsyonu ortamdan uzaklaştırılarak çökeltilerin çözünmesi için 1'er ml nötral kırmızısı çözdürme çözeltisi (%50 etanol, %1 asetik asit, % 49 ddH_2O) eklenmiştir. Kırmızı çökeltilerin tamamen çözünmesi için yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Çözünme tamamlandıktan sonra 540 nM'deki absorbans değerleri spektrofotometre (Shimadzu UV-VIS, UVmini-1240, Japan) cihazında ölçülmüştür. Hücre canlılık yüzdeleri kontrol grubu baz alınarak hesaplanmıştır.

Çalışma ikiden fazla grup içerdiği için istatiksel analizi one way anova testi SPSS kullanılarak yapılmıştır. Deney grupları arasındaki anlamlı farkları belirlemek için post tukey testi gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

Nötral kırmızısı canlılık testine göre 1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 and 1/25 hacim oranlarında verilen adaçayı infüzyonu U-2 OS hücrelerinin canlılığını normale göre sırasıyla %3, %4, %26, %27 ve %29 oranılarında azaltmıştır (bknz Tablo 1). Hücre canlılğı 1/1000 oranında adaçayı infüzyonu eklenen grupta %97'ye, 1/100 oranında infüzyon eklenen grupta %96'ya, 1/75 oranında eklenen grupta %74'e, 1/50 oranında eklenen grupta %73'e, 1/25 oranında eklenen grupta ise %71'e düşmüştür. Optimum hücre ölümüne neden olan adaçayı infüzyonu oranın denenen konsantrasyonlar arasından 1/75 olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Çeşitli hacim oranlarında *Adaçayı* verilen U-2 OS hücrelerinin neutral red testi ile belirlenen canlılık yüzdeleri



İstatiksel olarak Anova testi sonuçlarına göre deney gruplarının kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklı olduğu görülmüştür (P değeri < 0.05). Deney grupları arasındaki anlamlı farkları belirlemek için post tukey testi yapılmıştır. Elde edilen P değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. P değerleri tablosu

(1: Kontrol grubu, 2: 1/1000 oranında adaçayı infüzyonu eklenen grup, 3:1/100 oranında adaçayı infüzyonu eklenen grup, 4: 1/75 oranında adaçayı infüzyonu eklenen grup, 5: 1/50 oranında adaçayı infüzyonu eklenen grup, 6: 1/25 oranında adaçayı infüzyonu eklenen gruptur.)

	1 (Kontrol)	2 (1/1000 dilüsyon	3 (1/100 dilüsyon oranı)	4 (1/75 dilüsyon oranı)	5 (1/50 dilüsyon oranı)	6 (1/25 dilüsyon
1 (Kontrol)	-	0	0	0	0	0
2 (1/1000 dilüsyon oranı	0	-	0,170	0	0	0
3 (1/100 dilüsyon	0	0,170	-	0	0	0
4 (1/75 dilüsyon	0	0	0	-	0,095	0
5 (1/50 dilüsyon	0	0	0	0,095	-	0,061
6 (1/25 dilüsyon	0	0	0	0	0,061	-

İstatiksel olarak 1 numaralı (kontrol) grup ile 2 3, 4, 5 ve 6 numaralı gruplar arasında hücre canlılığı açısından anlamlı derecede farklılık görülmüştür. Bunun yanı sıra yapılan post tukey testine göre 5 numaralı grup ile 4 numaralı ve 6 numaralı gruplar arasında ve 2 numaralı ile 3 numaralı gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmezken (P değeri >0,05), diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (P değeri<0.05). Sonuç olarak birbirine yakın konsantrasyonlar arasında fark bulunmazken konsantrasyonlar birbirinden uzaklaştıkça anlamlı fark görülmektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

Adaçayı flavonoidler, triterpenler, diterpenoidler ve sesterpenler gibi fitokimyasallar açısından zengin bir kaynaktır. Literatürde adaçayı ekstraktlarının kolon, karaciğer, meme, lösemi ve akciğer kanserlerinde anti kanserojen etkiye neden olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir. (Jantova et al., 2014). Ayrıca yassı hücreli karsinom (UMSCC1), hepatosellüler karsinom (HepG2), insan lenfoma, lösemi, Hep-2, HeLa, HT-29, A-549 ve A-375 gibi farklı hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda adaçayı bitkisinin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve anti-karsinojen özelliği olabileceği bildirilmiştir (Sertel et al., 2011; Shahneh et al., 2013; Garcıa et al., 2016; Jiang, Zhang and Rupasinghe, 2017).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, adaçayı *(Salvia Officinalis)* bitkisinin U-2 OS osteosarkoma hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışma adaçayı bitkisinin anti-karsinojen özelliğe sahip olduğu kanısını desteklemekte ve literatürde rapor edilen kanser türlerinden farklı bir kanser türü üzerinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuç osteosarkoma gibi kötü prognozlu, ölümcül bir kanser türüyle savaşta umut vaat edici olmakla

birlikte daha etkili sonuçlar elde etmek adına hücrelerin infüzyona daha uzun süreli ve daha yüksek konsantrasyonlarda maruz bırakılması denenebilir. Ayrıca adaçayının organik bir bileşen olması sebebiyle, bilinen kemoteröpatiklerin aksine sağlıklı hücrelere daha az zarar verebileceği ve hatta bir kemoterapi ajanıyla kullanıldığında koruyucu etki sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple ileriki çalışmalarda osteosarkoma tedavisinde başarı sağlamış ajanların etkisini arttırmaya ve yan etkilerini azaltmaya yönelik olarak adaçayının çeşitli kemoterapötiklerle denenmesi amaçlanmaktadır.

Teşekkür

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı yüksek lisans öğrencim Meryem Damla Özdemir'e (Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Mühendislik Bilimleri Anabilim Dalı) ve istatiksel analizdeki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Esra Göv'e (Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü) teşekkür ederim.

Kaynaklar

Abu-Darwish, M.S. et al., 2013. Essential Oil of Common Sage (Salvia officinalis L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. BioMed Research International, 2013, pp.1–9.

Ando, K. et al., 2013. Current Therapeutic Strategies and Novel Approaches in Osteosarcoma. Cancers, 5, pp.591–616..

Bauer, J. et al., 2012. Carnosol and carnosic acids from Salvia officinalis inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 342(1), pp.169–76..

Behradmanesh, S., Derees, F. & Rafieian, M., 2013. Effect of Salvia officinalis on diabetic patients. Journal of Renal Injury Prevention, 2(2), pp.51–4.

Garcıa, C.S.C. et al., 2016. Pharmacological perspectives from Brazilian Salvia officinalis (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88(1), pp.281–292.

Hirahata, M. et al., 2016. PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by upregulating MMP-13 expression of human osteosarcoma. Cancer Medicine, 5(5), pp.892–902.

Jantová , S. et al., 2014. Salvia officinalis L. extract and its new food antioxidant formulations induce apoptosis through mitochondrial/ caspase pathway in leukemia L1210 cells. Interdisciplinary Toxicology. 7(3), pp. 146–153.

Jiang, Y., Zhang, L. & Rupasinghe, H.P.V., 2017. Antiproliferative effects of extracts from Salvia officinalis L. and Saliva miltiorrhiza Bunge on hepatocellular carcinoma cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 85, pp.57–67.

Kleinsimon, S. et al., 2017. ViscumTT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. BMC complementary and alternative medicine, 17(1), p.26.

Li, L. et al., 2016. PLA2G16 promotes osteosarcoma metastasis and drug resistance via the MAPK pathway. Oncotarget, 7(14), pp.18021–18035.

Li, R.Z. & Wang, L.M., 2016. Decreased microRNA-452 expression and its prognostic significance in human osteosarcoma. World J Surg Oncol, 14(1), p.150.

Miller, M. A. et al., 2015. Neutral red cytotoxicity assays for assessing in vivo carbon nanotube ecotoxicity in mussels — Comparing microscope and microplate methods. Mar Pollut Bull, 101(2), pp. 903–907.

Repetto, G., del Peso, A. and Zurita, J. L., 2008 Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, Nat Prot, 3(7), pp. 1125–1131.

Ru, J.Y. et al., 2015. Polymorphisms in TP53 are associated with risk and survival of osteosarcoma in a Chinese population. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 8(3), pp.3198–3203.

Serakta, M. et al., 2013. Antileishmanial activity of some plants growing in algeria: Jugulans Regia, Lawsonia Inermis And Salvial Officinalis. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines, 10(3), pp.427–430.

Sertel, S. et al., 2011. Anticancer activity of Salvia officinalis essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1). HNO, 59(12), pp.1203–1208.

Shahneh, F.Z. et al., 2013. Inhibitory and cytotoxic activities of Salvia officinalis l. Extract on human

lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3(1), pp.51–55.

Shaikh, A.B. et al., 2016. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma. International Journal of Molecular Sciences, 17(4).

Stefanović, O.D., Stanojević, D.D. & Čomić, L.R., 2012. Synergistic antibacterial activity of Salvia officinalis and Cichorium intybus extracts and antibiotics. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 69(3), pp.457–463.

van Tonder, A., Joubert, A. M. and Cromarty, A., 2015 Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays, *BMC Res Notes*, 8(1), p. 47.

Tularat, S. et al., 2013. In vitro effects of Salvia officinalis L. essential oil on Candida albicans. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3(5), pp.376–80.

Vladimir-Knezevic, S. et al., 2014. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the lamiaceae family. Molecules, 19(1), pp.767–782.

Yılmaz, D. & Gökduman, M.E., 2015. Adaçayı (Salvia officinalis l.) Bitkisinin Farklı Nem Düzeylerinde Fiziko-Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 10 (1), pp.73-82.