ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2017; 31 (1): 27 - 32
http://www.fusabil.org

Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis'in Terapötik Potansiyelinin Değerlendirilmesi *

Ceren ANLAŞ
Fulya ÜSTÜN ALKAN
Ataman Bilge SARI
Oya ÜSTÜNER
Tülay BAKIREL

İstanbul Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı,
İstanbul, TÜRKİYE

Kanser tedavisinde kemoterapötik ve kemopreventif amaçla kullanılan bileşiklerin hedef hücrelerin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etkilere sebep olduklarının belirlenmesi, araştırmacıları tedaviye bağlı toksisitenin azaltılmasına yönelik çalışmalara yönlendirmiş ve bu doğrultuda kanser sağaltımında bitkisel kaynakların etkinliğine yönelik araştırmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmada Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisine ait su ekstraktı ve esansiyel yağın köpek meme tümör hücre serileri (CMT-U27 ve CMT-U309) ve Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücre serisi üzerine sitotoksik etkileri, MTT testi ile belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktın ve esansiyel yağın antioksidan aktivitesinin ve fenolik içeriklerinin belirlenmesinde sırasıyla DPPH serbest radikal süpürme aktivite testi ve Folin-Ciocalteu ayıracı kullanılmıştır. Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinden elde edilen esansiyel yağın köpek meme tümör hücre serileri üzerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde (%86.67-%7.51 ve %74.45-%2.42) sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Buna karşın, sağlıklı hücre serisi olan Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücrelerinde ise esansiyel yağın sadece en yüksek konsantrasyonda (200 µg/ml) sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü etki tayininde esansiyel yağ ile ekstraktın serbest radikal süpürücü etki düzeylerinin birbirine yakın olduğu, toplam fenolik içerin yönünden ise esansiyel yağın daha fazla fenolik madde içerdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinden ekstrakte edilen esansiyel yağın köpek meme tümör hücrelerinde seçici toksik etki gösterdiğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Origanum minutiflorum, sitotoksisite, DPPH, Folin-Ciocalteu, köpek meme tümör*

Evaluation of the Therapeutic Potential of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis

The determination of the cytotoxic effects of compounds which are used in cancer treatment for chemotherapeutic and chemopreventive purposes on target cells as well as on healthy cells have oriented the researchers to the studies aiming to reduce the treatment-induced toxicity. Therefore, the studies about the effectiveness of plant sources in cancer treatment have gained importance. In this study, cytotoxic effects of aqueous extract and essential oil of Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis on canine mammary tumor cell lines and Swiss 3T3 albino mouse fibroblast cell line were determined by MTT assay. Also, for the determination of antioxidant activity and total phenolic content of extract and essential oil 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu reagent were used, respectively. Cytotoxic effects of essential oil obtained from the Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P.H. Davis were observed on canine mammary tumor cell lines in a concentration dependent manner (86.67-7.51% and 74.45-2.42%). Despite this, cytotoxic effect of the essential oil was observed only at the highest concentration (200 µg/ml) on Swiss 3T3 albino mouse fibroblast cells, a healthy cell line. It has been determined that DPPH free radical scavenging activity of the essential oil and extract were close to each other, while total phenolic content of the essential oil was higher than the extract. The results have indicated that the essential oil extracted from Origanum minutiflorum O. Schwarz et. P. H. Davis has shown selective toxic effect on canine mammary tumor cells.

Key Words: *Origanum minutiflorum, cytotoxicity, DPPH, Folin- Ciocalteu, canine mammary tumor*

Geliş Tarihi : 30.12.2016
Kabul Tarihi : 17.02.2017

Yazışma Adresi
Correspondence

Ceren ANLAŞ
İstanbul Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı,
İstanbul - TÜRKİYE

cerenis@istanbul.edu.tr

Giriş

Kanser tedavisinde kemoterapötik ve kemopreventif amaçla kullanılan bileşiklerin istenmeyen etkilere sahip olmalarının yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etki gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda, kanser profilaksisi ve sağaltımında yeni stratejilerin geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda tedavinin etkinliğinin arttırılmasının yanı sıra tedaviye bağlı toksisitenin azaltılmasına yönelik yaklaşımlar da ön plana çıkmıştır. Antikanserojenik ilaçların %63'ünün bitkisel kaynaklı olması (1) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli bitkisel ekstraktların antikanserojenik etkilerinin saptanması kanser tedavisinde alternatif/destekleyici ajan olarak bitkisel kaynakların kullanımını gündeme getirmiştir. Amerikan Ulusal Kanser

* Bu araştırma projesi İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı'nın VET-KÖ-16-13 sayılı onayı ile yürütülmüştür.

Enstitüsü (NCI) yaklaşık 35.000 bitki türünün potansiyel antikanser aktivitelerini değerlendirerek, bunların arasından 3.000 bitki türünün kanser sağaltımında etkili olabileceğini bildirmiştir (2).

Coğrafi konumu, iklim ve jeolojik özellikleri nedeniyle zengin bir bitki çeşitliliğine sahip olan ülkemizde, Origanum türleri başta tarım, kozmetik ve ilaç endüstrisi olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır (3). Uçucu yağlar açısından oldukça zengin bir içeriğe sahip olan Origanum türleri, karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenolleri yüksek oranda içermektedirler (4). Bitkilerde bulunan fitokimyasallardan özellikle fenolik bileşiklerin antikanser veya antitümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Buradan hareketle, çeşitli kanser hücre serileri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, Origanum türlerinin temel bileşenlerinden olan karvakrolün apoptozu indükleyerek hücre çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (5, 6). Bu durum, özellikle karvakrol içeriği yüksek olan bitkisel ekstraktların tek başına ya da kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımının kanser profilaksisi ve sağaltımında etkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmış ve bu doğrultuda farklı Origanum türlerinin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin incelendiği çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (7-10). Türkiye florasının endemik bitkilerinden biri olan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis, ülkemizde Isparta ilinin dağlık bölgelerinde dağılım göstermekte olan ve yüksek ekonomik öneme sahip bir türdür (11). Kontrolsüz toplamalar nedeniyle miktarı her geçen yıl azalmaya başlayan bu tür Türkiye'de geleceği tehdit altında olan ve acil koruma altına alınması gereken en önemli 10 bitki türü arasında gösterilmektedir (12). *Origanum minutiflorum*, diğer Origanum türleri içerisinde karvakrol içeriği en yüksek olan tür olarak bildirilmiş (13) ve esansiyel yağındaki karvakrol oranı %90 düzeyinde saptanmıştır (14). Yapılan çalışmalarda yüksek antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter etkinliğe sahip olduğu bildirilen (15-17) *Origanum minutiflorum* türünün kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

İlgili araştırma, Türkiye florasının endemik bitkilerinden biri olan *O. minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinden elde edilen ekstraktın ve esansiyel yağın köpek meme tümör hücre serileri (CMT-U27 ve CMT-U309) üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Kanser hücreleri için toksik etkiye sahip olan bitkisel ekstraktların, sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etkiye neden olabileceği (18, 19) göz önüne alınarak, söz konusu bitki ekstraktının ve esansiyel yağın Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etki potansiyeli de değerlendirilmiştir. Ayrıca, fenolik içerik yönünden zengin ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bitkisel kaynakların, hücreleri oksidatif hasardan koruyarak serbest radikallerin sebep olduğu kanser gibi hastalıkların tedavisindeki öneminin açıkça ortaya konması nedeniyle (20), çalışmada *O. minutiflorum* ekstraktı ile esansiyel yağının antioksidan aktiviteleri ile toplam fenolik içerik miktarları da belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bitkinin Toplanması : *O. minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinin toprak üstü kısımları Isparta ili, Sütçüler ve Kesme ilçesi çevresinden, 37.433683/31.115605 ve 37.433751/31.117901 koordinatlarından kök üstünden kesilerek toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri, Gül Herbaryumu'na (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta) 94.28.16.04.01 herbaryum numarası ile kaydedilmiştir.

Sıcak Su Maserasyon Yöntemi: Kurutularak toz haline getirilmiş bitki örneği (50 g), 100°C su içerisinde (1 L) 3 saat süresince karıştırılarak bekletilmiş ve elde edilen ekstrakt liyofilizatörde (Christ Alpha 2-4 LD plus, Almanya) toz haline getirilmiştir (21).

Hidrodistilasyon Yöntemi: Bitki örneklerinde uçucu yağ miktarını belirlemek amacıyla, bitki örnekleri (100 g) distile su içerisinde (1 L) 3 saat süresince clevenger düzeneğinde hidrodistilasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yoğunlaşan esansiyel yağ ve su karışımı beherde toplandıktan sonra suyun üstünde kalan esansiyel yağ fazı ayrılmıştır. Yağ içerisinde kalan su kısmı, santrifüj edilip anhidröz sodyum sülfattan geçirilerek tamamen uzaklaştırıldıktan sonra volumetrik olarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir (14).

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini: Bitki ekstraktlarının serbest radikal süpürücü etki düzeyleri DPPH'ın indirgenmesi esasına dayanan yöntemle belirlenmiştir (22). Ekstrakt ve esansiyel yağın metanolde hazırlanan farklı konsantrasyonlarından (25, 50, 100 ve 200 μg/mL) 200 μL alınarak, 50 μL 1 mM DPPH metanolik çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. Karışımlar oda ısısında inkübe edilerek (30 dakika) absorbans değerleri 520 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (FilterMax F5, Molecular Devices, USA) ile ölçülmüştür (23). Pozitif kontrol amacıyla L-askorbik asit kullanılmıştır. Bitki ekstraktının ve esansiyel yağın serbest radikal süpürücü aktivite düzeyleri hesaplanarak, DPPH'nin %50 oranında inhibisyonunu sağlayan ekstrakt ve standart madde konsantrasyonu olarak tanımlanan (24) inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerleri çizilen kalibrasyon grafikleri aracılığıyla belirlenmiştir.

Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi: Bitki ekstraktı ve esansiyel yağın içerdiği fenolik bileşiklerin miktarı Folin-Ciocalteu ayıracı ile belirlenmiştir (25). Bu amaçla, ekstrakt ve esansiyel yağın (10 μL) üzerine 150 μL Folin-Ciocalteu ayıracı ilave edilmiş ve karışım oda ısısında 3 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ardından tüm örneklere 50 μL sodyum karbonat solüsyonu eklenmiş ve oda ısısında gerçekleştirilen 2 saatlik inkübasyon periyodu sonrası absorbans değerleri mikroplaka okuyucuda 725 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit standartından (50-400 μg/mL) hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Buna göre toplam fenol düzeyleri; gallik asidin kalibrasyon eğrisi esas alınarak eş

değer gallik asit miktarı mg (gallik asit)/g (kuru ağırlık) olarak belirlenmiştir.

Hücre Kültürü: Prof.Dr. Eva Hellmen'den (Uppsala Üniversitesi Patoloji ve Genetik Bölümü, İsveç) temin edilen köpek meme tümör hücre serileri (CMT-U27 ve CMT-U309) ve Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücre serisi (ATCC-CCL-92) çoğalması amacıyla 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ve 2.5 µg/mL amfoterisin B, %10 fötal sığır serumu içeren Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle Medyum, besleyici karışım Ham F12 medyumunda (DMEM-F12) 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında %1'lik tripsin-EDTA solüsyonuyla pasajlanarak çoğaltılmaya devam edilmiştir. Test öncesinde tripan mavisi ile boyanan hücrelerin canlılık düzeyleri hücre sayım cihazı (Cedex XS, Innovatis) ile belirlenmiştir. Sitotoksik etkisi değerlendirilecek olan ekstrakt ve esansiyel yağ dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülmüş ve DMSO'nun final konsantrasyonu %0.2'den küçük olacak şekilde ayarlanmıştır.

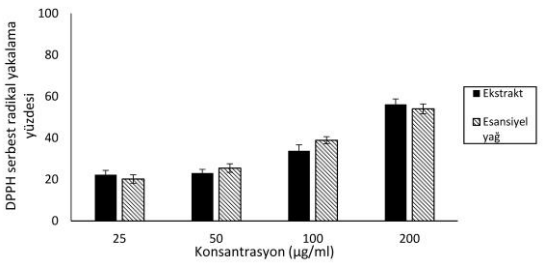
MTT (3-(4,5- Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) Testi Bulguları: Bitki ekstraktının ve esansiyel yağın CMT-U27 ve CMT-U309 köpek meme tümör hücreleri ve Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksisitesinin belirlenmesinde MTT testi uygulanmıştır. Bu test, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, sarı renkteki MTT canlı hücreler tarafından absorbe edilip mitokondriyal süksinat dehidrojenaz tarafından katalize edilerek mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşür. Formazan kristallerinin miktarı ile canlı hücrelerin miktarı kantitatif olarak hesaplanabilmektedir (26, 27). Bu amaçla, süspansiyon halindeki hücreler, her bir kuyucukta $5x10^3$ hücre (n=3) olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve 37ºC, %5 karbondioksitli etüvde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücreler farklı konsantrasyonlarda (25-200 µg/mL) bitki ekstraktları ile 72 saat süresince inkübe edilmiştir. Bu periyodun sonunda kuyucuklara 10 µL MTT solüsyonu ilave edilerek 4 saat süresince 37ºC ve %5 karbondioksitli etüvde tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Şekillenen formazan kristallerinin çözündürülmesi amacıyla kuyucuklara 100 µL 0.01 M HCl içerisinde hazırlanmış %10 SDS çözündürme solüsyonu ilave edilmiş ve çözeltilerin absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda (FilterMax F5, Molecular Devices, USA) ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan ekstraktların sitotoksik etkileri, ölçülen relatif hücre sayılarına göre yüzde değer olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilerin ortalaması alınarak, bileşiklerin IC_{50} değerleri Biosoft Calcusyn Programı kullanılarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler: Verilerin analizinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (15.0) programı kullanılmıştır. MTT testinden elde edilen hücre canlılığı ve sitotoksisite yüzde değerleri student t-testi kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart hata olarak belirlenmiş ve $P<0.05$ olanlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

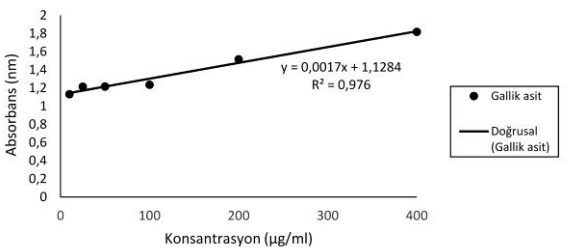
Bulgular

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Serbest Radikal Süpürücü Etkisi: Ekstrakt ile esansiyel yağın uygulanan tüm konsantrasyonlardaki serbest radikal süpürücü etki düzeylerinin birbirine çok yakın olduğu saptanmış, IC_{50} değerleri sırasıyla 173.76±3.58 ve 173.09±4.6 µg/mL olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol bileşiği olarak kullanılan askorbik asidin IC_{50} değeri ise 27.6±1.39 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ekstrakt ve esansiyel yağın DPPH serbest radikal süpürme yüzdeleri ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bitki Ekstraktı Ve Esansiyel Yağın Toplam Fenol İçerikleri: Toplam fenolik madde miktarları gallik asit standartından hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır (Şekil 2). Bitki ekstraktı ve esansiyel yağın içerdikleri toplam fenolik madde miktarları karşılaştırıldığında, fenolik bileşenler yönünden esansiyel yağın (318±2.32 mg gallik asit/g kuru ağırlık) ekstrakta (36.59±1.89 mg gallik asit/g kuru ağırlık) göre daha zengin bir içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir.



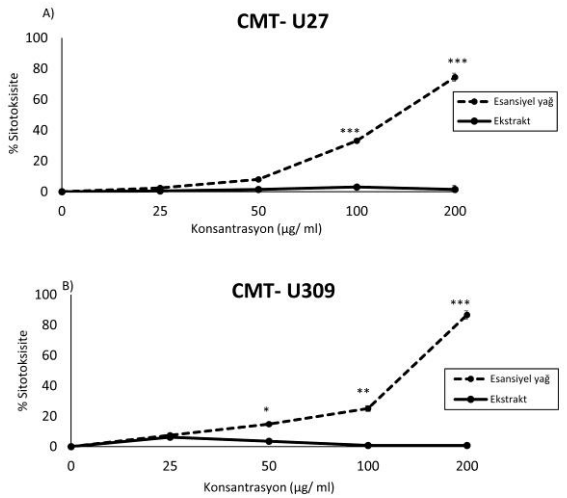
Şekil 1. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis bitkisinden elde edilen su ekstraktı ve esansiyel yağın DPPH serbest radikal yakalama yüzdeleri (Ortalama ± SE)



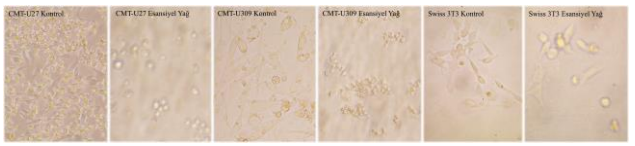
Şekil 2. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

MTT (3-(4,5- Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) Testi: Ekstrakt ve esansiyel yağın farklı konsantrasyonlarının (25-200 µg/ml) köpek meme tümör hücre serileri (CMT-U27 ve CMT-U309) üzerindeki sitotoksik etkileri Şekil 3'de gösterilmiştir. Esansiyel yağın

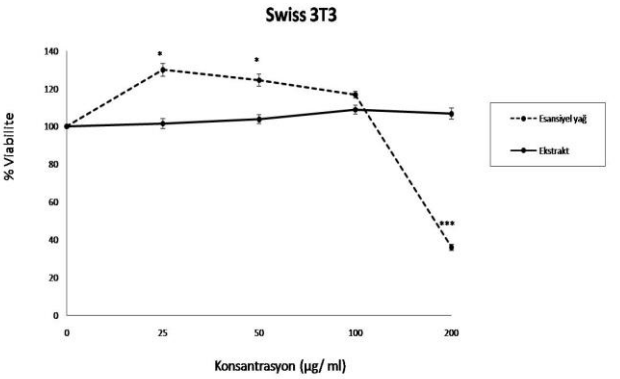
CMT-U27 ve CMT-U309 hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak değişen derecelerde sitotoksik etkinlik gösterdiği saptanırken, bitkisel ekstraktın uygulanan konsantrasyonlarda hücreler üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Esansiyel yağın CMT-U27 ve CMT-U309 hücreleri üzerindeki en yüksek sitotoksik etkisi 200 µg/ml konsantrasyonda saptanırken (sırasıyla %74.45±2.56 ve %86.67±2.74), 25 µg/mL konsantrasyonda bu etkinin azaldığı (sırasıyla %2.42±0.4 ve %7.51±1.01) belirlenmiştir. Esansiyel yağın CMT-U27, CMT-U309 ve Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücrelerinin morfolojisi üzerine etkileri Şekil 4'te gösterilmiştir. Esansiyel yağ için IC_{50} değerleri CMT-U27 ve CMT-U309 hücrelerinde sırasıyla 131.95±2.32 ve 109.52±4.44 µg/mL olarak saptanmıştır. Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücre serisinde ise gerek ekstraktın gerekse esansiyel yağın 25-100 µg/mL konsantrasyon aralığında, sitotoksik etki göstermediği, aksine hücre üremesini prolifere ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Esansiyel yağın en yüksek konsantrasyonda (200 µg/mL) sağlıklı hücrelerin viabilitesinde düşüşe neden olduğu (%35.92±1.72) belirlenirken, ekstraktın bu yönde bir etkisi saptanmamıştır (%106.63±2.95) (Şekil 5).



Şekil 3. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinden elde edilen su ekstraktı ve esansiyel yağın CMT-U27 (A) ve CMT-U309 (B) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. Değerler, ortalama ± SE ve *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)



Şekil 4. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis bitkisinden elde edilen esansiyel yağ (200 µg/ml) uygulanan CMT-U27, CMT-U309 ve Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücrelerinin 72 Saat inkübasyon sonrası invert mikroskobik görüntüleri. (40X)



Şekil 5. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis bitkisinden elde edilen su ekstraktı ve esansiyel yağ uygulanan Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücrelerinin canlılık düzeyleri. Değerler, ortalama ± SE ve *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

Tartışma

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin, membran lipitlerinin oksidasyonuna, enzimlerin inaktivasyonuna ve kanser oluşumuna sebep olan genetik mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir (28). Bitkisel kaynaklar içerisinde bulunan antioksidan özellikli maddelerin serbest radikalleri yakalama ve normal hücre metabolizmasında açığa çıkan reaktif türlerin oluşumunu engelleme veya inaktive etme gibi fonksiyonları söz konusudur (29). Bunun yanı sıra bitkilerin içerdiği kemopreventif bileşiklerin hücre savunması ve hücre ölümü mekanizmalarını düzenleyerek karsinojenezis sürecini engellediği yapılan birçok çalışmayla desteklenmiştir (30-33).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, Türkiye'nin endemik bitkilerinden biri olan *O. minutiflorum* O. Schwarz et. P.H. Davis bitkisinden elde edilen ekstrakt ve esansiyel yağın köpek meme tümör hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerindeki olası toksisitesi ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Esansiyel yağın köpek meme tümör hücre serileri (CMT-U27 ve CMT-U309) üzerinde konsantrasyona bağlı olarak değişen derecelerde sitotoksik etki gösterdiği saptanırken, Swiss 3T3 albino fare fibroblast hücre serisi üzerinde ise 25-100 µg/mL konsantrasyon aralığında, sitotoksik etki göstermediği, aksine hücre üremesini prolifere ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen bu sonucun farklı Origanum türlerinden elde edilen esansiyel yağların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin incelendiği çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. *Origanum onites* bitkisinden elde edilen esansiyel yağın karaciğer kanser hücreleri (HepG2) üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmada, araştırmacılar Origanum bitkisinin uçucu yağına maruz bırakılan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, stoplazmik keselerin oluşumu,

hücre büzülmesi gibi karakteristik apoptoz morfolojisinin gözlemlendiğini ve uçucu yağın söz konusu hücrelerde apoptotik ve sitotoksik etkiye sebep olduğunu bildirmişlerdir (34). *O. syriacum* bitkisinin insan meme kanser hücre serisi (MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise, söz konusu bitkiye ait uçucu yağın IC_{50} değerinin 130.4±52.2 µg/mL olarak saptandığı (9) ve bu değerin çalışmamızda CMT-U27 ve CMT-U309 hücreleri için elde edilen IC_{50} değerlerine (131.95±2.32 ve 109.52±4.44 µg/mL) oldukça yakın olduğu görülmüştür. Origanum türlerinden elde edilen esansiyel yağların insan meme tümörü ile köpek meme tümörü hücrelerindeki sitotoksik etki sonuçlarının benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca, esansiyel yağın yüksek konsantrasyonda (200 µg/mL), hem kanser hücrelerinde hem de sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiş, ancak CMT-U27 ve CMT-U309 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkiden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bitkisel kökenli bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin tümör hücrelerine kıyasla daha düşük olması, bitkinin kanser sağaltımında tıbbi öneme sahip olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilmektedir (35). Çalışmamızda da *O. minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis'den elde edilen esansiyel yağın, yüksek konsantrasyonda (200 µg/mL) sağlıklı hücreler üzerinde kanser hücrelerine göre daha az sitotoksik etki göstermesi, daha düşük konsantrasyonlarda ise (25-100 µg/mL) tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken sağlıklı hücreler üzerinde bu etkinin saptanmamış olması bu görüşü destekler niteliktedir.

O. minutiflorum O. Schwarz et. P. H. Davis bitkisinden sıcak su maserasyon yolu ile elde ettiğimiz ekstraktın ise hem sağlıklı hem de kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi saptanmamıştır. Farklı Origanum türlerinden elde edilen ekstraktların kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin değerlendirildiği çalışmalardan elde edilen sonuçların birbiriyle benzerlik göstermediği görülmektedir. *O. syriacum* ekstraktının MCF-7 ve U266 myelom kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği (36), *Origanum majorana* bitkisinden elde edilen ekstraktların insan lenfoblastik lösemi hücrelerinin viabilitesini, doza bağlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir (10). Origanum ekstraktlarının kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğini destekleyen bu çalışmaların aksine, *Origanum vulgare* bitkisinden elde edilen etanolik ve sulu ekstraktın insan meme kanser (MCF-7) hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (9). Çalışmada da benzer şekilde *O. minutiflorum* bitkisinin sulu ekstraktının köpek meme tümör hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Origanum türlerinden elde edilen ekstraktların antiproliferatif etkinlikleri arasında görülen bu farklılıkların, bitkinin kullanılan kısmına veya ekstraksiyonda kullanılan solventin kimyasal özelliklerine bağlı olabileceği, aynı zamanda kullanılan hücre serilerinin aynı bitkinin ekstraktlarına karşı duyarlılıklarının farklı olabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda, doğal antioksidan kaynaklarının bulunmasına yönelik çalışmalarda bitkisel ekstraktların sentetik antioksidanlara karşı alternatif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda fenolik içerik yönünden zengin ve antioksidan aktivitesi yüksek olan bitki ekstraktlarının, serbest radikallerin neden olduğu rekasiyonları durdurarak kanser gibi hastalıkların önlenmesinde önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (20). Çalışmada *Origanum minutiflorum* ekstraktı ile esansiyel yağının antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde, ekstraktın ve esansiyel yağın serbest radikal süpürücü etki düzeylerinin birbirine oldukça yakın olduğu, buna karşın esansiyel yağın fenolik içeriğinin ekstrakta göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin antikanserojenik etkilerinin bildirildiği çok sayıda çalışma olduğu göz önüne alındığında (37, 38), esansiyel yağın kanser hücreleri üzerinde ekstrakta göre daha yüksek sitotoksik etki göstermesinin içerdiği yüksek düzeyde fenolik bileşenle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bitkisel tedavinin öneminin giderek arttığı günümüzde etnofarmakolojik nitelikteki bu araştırmadan elde edilen sonuçların kanser sağaltımında faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ekstrakt içeriğinin, aktif bileşenlerinin belirlenerek biyolojik etkilerinin araştırılmasının gerek beşeri gerekse veteriner onkoloji alanındaki bilimsel gelişmelere katkı sağlayacağı ümit edilmektedir.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan köpek meme tümör hücre serilerinin (CMT-U27 ve CMT-U309) temininde yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Eva Hellmen'e (Uppsala Üniversitesi, İsveç) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Rostami S. Yaygın veya Endemik Olan Bazı Bitki Türlerinin Antiproliferatif ve Antiinflamatuvar Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
2. Desai AG, Ghulam NQ, Ramesh KG, et al. Medicinal plants and cancer chemoprevention. Curr Drug Metab 2008; 9: 581-591.
3. Polat R, Çakılcıoğlu U, Ertuğ F, Satıl F. An evaluation of ethnobotanical studies in Eastern Anatolia. Biological Diversity and Conservation 2012; 5: 23-40.
4. Başer KHC, Özek T, Kürkçüoğlu M, Tümen G. The essential oil of Origanum vulgare subsp. hirtum of Turkish origin. J Essent Oil Res 1994; 6: 31-36.
5. Arunasree KM. Antiproliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. Phytomedicine 2010; 17: 581-588.
6. Yin Q, Yan F, Zu XY, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. Cytotechnology 2012; 64: 43-51.

7. Begnini KR, Nedel F, Lund RG, et al. Composition and antiproliferative effect of essential oil of Origanum vulgare against tumor cell lines. J Med Food 2014; 17: 1129-1133.
8. Fathy SA, Emam MA, Abo Agwa SH, et al. The antiproliferative effect of Origanum majorana on human hepatocarcinoma cell line: Supression of NF- κB. Cell Mol Biol 2016; 62: 80-84.
9. Al-Kalaldeh JZ, Abu-Dahab R, Afifi FU. Volatile oil composition and antiproliferative activity of Laurus nobilis, Origanum syriacum, Origanum vulgare, and Salvia triloba against human breast adenocarcinoma cells. Nutr Res 2010; 30: 271-278.
10. Abdel Massih RM, Fares R, Bazzi S, El-Chami N, Baydoun E. The apoptotic and anti-proliferative activity of Origanum majorana extracts on human leukemic cell line. Leuk Res 2010; 34: 1052-1056.
11. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2. Baskı, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi, 1999.
12. Özhatay N, Koyuncu M, Atay S, Byfield A. Türkiye'nin doğal tıbbi bitkilerinin ticareti hakkında bir çalışma. İstanbul: Doğal Hayatı Koruma Derneği Yayınları, 1997.
13. Başer KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Curr Pharm Des 2008; 14: 3106-3119.
14. Şarer E, Pançalı S, Yıldız S. *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et p.H. Davis uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 1996; 25: 29-38.
15. Aslım B, Yücel N. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. Food Chem 2008; 107: 602-606.
16. Aşkun T, Tümen G, Satil F, Kılıç T. Effects of some lamiaceae species methanol extracts on potential mycotoxin producer fungi. Pharm Biol 2008; 46: 688-694.
17. Ayvaz A, Karabörklü S, Sağdıç O. Fumigant toxicity of five essential oils against the eggs of ephestia kuehniella zeller and plodia interpunctella (hübner) (lepidoptera: Pyralidae). Asian J Chem 2009; 21: 596-604.
18. Bannazadeh AM, Rashtchizadeh N, Nazemieh H, et al. Cytotoxic effects of alchololic extract of Dorema Glabrum seed on cancerous cells viability. Adv Pharm Bull 2013; 3: 403-408
19. Tantengco OA, Jacinto SD. Cytotoxic activity of crude extracts and fractions from Premma odorata (Blanco), Artocarpus camansi (Blanco) and Gliricidia sepium (Jacq.) against selected human cancer cell lines. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5: 1037-1041.
20. Zakaria ZA, Mohamed AM, Jamil NS, et al. In vitro antiproliferative and antioxidant activities of Muntingia calabura leaves. Am J Chin Med 2011; 39: 183-200.
21. Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (origanum vulgare) extracts and essential oil. J Sci Food Agr 2013; 93: 2707-2714.
22. Brand- Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol 1995; 28: 25-30.
23. Genç Y, Yüzbaşıoğlu M, Harput Ş, Uz-Kuruüzüm A. Antioxidant activity and total phenolic content of *Quercus coccifera* L. FABAD J Pharm Sci 2012; 37: 17-22.
24. Chen Z, Bertin R, Froldi G. EC_{50} estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. Food Chem 2013; 138: 414-420.
25. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela- Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol 1999; 299: 152-178.
26. Koyunoglu F, Tekin S, Konar V, Sandal S. İnsan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerine Apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: In vitro bir çalışma. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2013; 1: 23-28.
27. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. Toxicol In Vitro 2015; 29: 314-319.
28. Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. Eur J Cancer Prev 1998; 7: 9-16.
29. Liu M, Li XQ, Weber C, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. J Agr Food Chem 2002; 50: 2926-2930.
30. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agr Food Chem 2002; 50: 7449-7454.
31. Ollsson ME, Gustavsson KE, Nilsson A, Duan R. Inhibition of cell proliferation in vitro by fruit and berry extract and correlations with antioxidant levels. J Agric Food Chem 2004; 52: 7264-7271
32. Pieme CA, Kumar SG, Dongmo MS, et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. BMC Complement Altern Med 2014; 14: 1-10.
33. Badmus JA, Ekpo OE, Hussein AA, Meyer M, Hiss DC. Antiproliferative and apoptosis induction potential of the methanolic leaf extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don). Evid Based Complement Alternat Med 2015; 756482: 1-11.
34. Sivas H, Tomsuk Ö. Antiproliferative and apoptotic effects of the essential oil of *Origanum onites* and carvacrol on Hep-G2 cells. Anadolu University Journal of Science and Technology-C Life Sciences and Biotechnology 2011; 1: 171-180.
35. Haghighi SR, Asadi MH. Anti-proliferative effect of the extracts and essential oil of *Pimpinella anisum* on gastric cancer cells. J Herbmed Pharmacol 2016; 5: 157-161.
36. Demir AT. Origanum Syriacum Uçucu Yağı-Gümüş Nanopartikül Kompleksinin Antikanser Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
37. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010; 15: 7313-7352.
38. Igbal E, Abu Salim K, Lim LBL. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus veletinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. J King Saud Univ 2015; 27: 224-232.