İZMİR KEKİĞİNİN MCF7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASINI ENGELLEMESİ YÖNÜNDEN ETKİLERİ

AYDA BERİL NAS

Rehber Öğretmen: Demet İzgü

TED ANKARA KOLEJİ VAKFI OKULLARI Taşpınar Köyü Yumrubel Mevkii No:310 İncek, Gölbaşı/Ankara, 06830

TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi

AMAÇ

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen meme kanseri olgularının en az sayıya düşürülmesinde beslenme alışkanlıklarında değişikliğin faydasının olacağı hipotezinden yola çıkılarak İzmir kekiğinin bu projede öncelikle laboratuar şartlarında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerinde büyüme inhibisyonu etkilerinin araştırılması planlanmıştır

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasında en sık karşılaşılan kanser türüdür. Türkiye'de kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının yaklaşık %33.7sini meme kanseri oluşturur (1). Meme kanserinin %40-50'si 40 ile 50 yaş aralığında görülmektedir. Yayılım göstermeden erken dönemde tanı konması durumunda 5 yıllık sağ kalım oranı %95 den fazladır. Ancak, daha da önemlisi bu kanser olgularının hiç ortaya çıkmadan önleme stratejileridir. Meme kanserinin cerrahi ve medikal tedavisinin yanı sıra alternatif tedavi yöntemlerinin de günümüzde var olduğu bilinmektedir.

Kekik, ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasından *Thymus*, *Thymbra*, *Origanum*, *Coridothymus*, *Satureja*, cinslerinin genel adı olan, kendine özgü kokusu ile tanınan çimenlik, tarla, orman kıyılarında ve çayırlarda görülen bitki türlerinin ortak adıdır. İzmir kekiğinin (*or ganum on tes)* özellikle timol ve karvakrol olmak üzere birçok aktif bileşenlerden zengin olduğu gösterlmiştir (2).

Kekik bitkisinden yaprak çiçek durumlarının su buharı distilasyonu yöntemi ile %2-%8 oranında yakıcı, lezzetli, kokulu uçucu yağı elde edilir. Bu uçucucu yağda esas olarak aktif monoterpen fenollerden timol ve karvakrol bulunmaktadır. Ayrıca monoterpen hidrokarbon öncüleri olan *p*-cymene, *α*-terpinene, oksijene monoterpenler (linalool, borneol), sesquiterpenes (esas itibarı ile β-caryophyllene) ve bunların oksijene derivatifleri de (örneğin caryophyllene oxide) içermektedir (3).

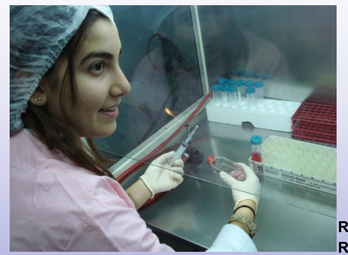
Kekik içeriğinin esasını oluşturan timol salmonella ve stafilokokkus gibi bakterilere karşı etkin olduğundan antibakterial özelliği, bunun yanında antiviral, antifungal ve immune sistemi uyarıcı etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Timolun hücre membranını bozarak etki gösterdiği düşünülmektedir. Kekik yağı içinde aktif moleküllerden karvakrolun meme kanseri hücreleri üzerinde çoğalmayı durdurucu etkisi olduğu gösterilmiştir (4). Satooka ve Kubo timolun melanoma hücreleri üzerinde anti-oksidant radikaller yoluyla toksik etkisini bildirmişlerdir (5).

İzmir kekiği

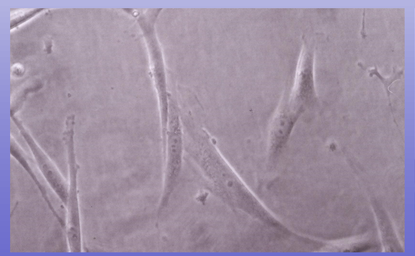
Soya gibi bazı bitkilerin yoğun kullanıldığı ülkelerde meme kanserinin daha az sıklıkta görüldüğü bilinmektedir. Mastelic J ve ark. kekik yağı içinde bulunan timol ve karvakrol derivatiflerinin insan uterin karsinoma hücreleri üzerine antiproliferatif (hücre bölünmesini durdurucu) etkisi olduğunu göstermişlerdir (6). Bu bulgulardan yola çıkarak yoğun olarak aktif moleküller içeren halk arasında çok iyi bilinen, Türkiye'de özellikle Ege bölgesinde olmak üzere birçok bölgede yetişen ve yaygın olarak kullanılan İzmir kekiğinin meme kanseri üzerindeki önleyeci etkisi olabileceği hipotezinden yola çıkarak laboratuar şartlarında bu bitkinin ekstresinin meme kanseri hücreleri üzerine etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

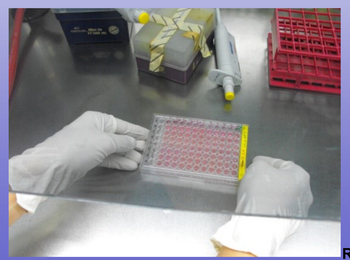
YÖNTEM:

İzmir kekiği ekstresinin elde edilmesi: Çalışmamızda İzmir kekiği İzmir Ziraat Odasından sağlanmış olup, ekstresi ise Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuarlarında kekik yapraklarından %100 eter yağı olarak hazırlanmıştır (Resim 1). **Dilüsyonların hazırlanması:** Hücre kültürlerine uygulanan İzmir kekiği ekstresi 5 µL İzmir kekiği 15 µL DMSO içinde (birinci dilüsyon), 10 µL İzmir kekiği 10 µL DMSO içine (ikinci dilüsyon), 15 µL İzmir kekiği 5 µL DMSO içinde (üçüncü dilüsyon) ile dilüe edildildikten sonra 160 µL besi yeri içerisinde hücrelere uygulandı (Resim 2). MCF7 olarak isimlendirilen insan meme kanseri hücre hattı daha önce ATCC hücre bankasından elde edilerek Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının hücre kültürü laboratuvarında donuk olarak saklandığı sıvı azot tankından çıkartılarak çözüldü. **Hücre canlılığı ve sitotoksisite testi:** İnsan MCF7 meme kanseri hücreleri (Resim 3) $1X10^4$ hücre/kuyu olmak üzere 96 kuyulu plaklara ekilip 18 saat tutunmaları için beklendi (Resim 4). Etken madde olarak farklı konsantrasyonlarda İzmir kekiği yağı ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı ve sitotoksisitesi kolorimetrik WST-1 kit (Roche, Cat no 11644807001) ile belirlendi. Kararlı (dayanıklı) tetrazolium tuzu olan WST-1 hücrelerde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H nın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. Bizde çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda İzmir kekiğinin insan meme kanseri hücre hattı olan MCF7 hücrelerinde sitotoksik etkisini göstermek amacıyla WST-1 i kullandık. Bunun için inkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu kuyulara 10 µL WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) eklendi ve 4 saat 37ºC de %5 CO_2 li inkübatörde inkübe edildi. Dört saat sonra 420-600 nm dalgaboyunda mikro ELISA okuyucuda (Versamax microplate reader, Moleculer Devices) okundu. Elde edilen verilerden Softmax Pro5 ile sitotoksisite grafikleri elde edildi.



Resim 1
Resim 2





Resim 3

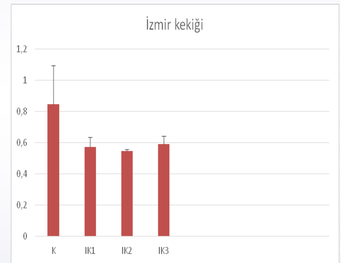
Resim 4

BULGULAR ve TARTIŞMA:

Hücre canlılığı ve sitotoksisite testi bulguları:

Çalışmamızda İzmir kekiği ekstresinin farklı dilüsyonlarda sitotoksik etkisi araştırılması planlandı ve bu maddenin meme kanseri hücrelerine etkinlikleri birbiri ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler Grafik 1 de izlenmektedir. İzmir kekiğinde dozdan bağımsız olarak tüm gruplarda uygulama sonrası hücre canlılığındaki değişim kontrol grubuna göre belirgindi. İzmir kekiğinin tüm dilüsyonlarındaki değişimleri olarak tüm gruplarda uygulamadan 24 saat sonra faz kontrast mikroskop altında hücrelerin incelenmesinde hücre sayısındaki düşüş ve hücrelerin tutunma özelliğinde azalış dikkati çekti.

Grafik 1. İnsan MCF7 hücrelerine 24 saat süreyle farklı dilusyonda WST-1 sitotoksite testi ile elde edilen optik densite değerlerine ait deneyin ortalaması ve standart deviasyon verilmiştir. Ortalama ± SEM 24 saat uygulaması sonrası canlılık testinin grafiği izlenmektedir. Kontrol (K): by+hücre, İK1: 5 µL İzmir Kekiği + 15 µL DMSO, İK2: 10 µL İzmir Kekiği + 10 µL DMSO, İK3: 15 µL İzmir Kekiği + 5 µL DMSO



TARTIŞMA:

Meme kanseri en sık görülen kanser türlerinden birisidir (1). Bu nedenle de yukarıda bahsedilen önleme ve tedavide yeni ve etkili tedavilere acil ihtiyaç vardır. Son yıllarda birçok hastalıkta olduğu gibi meme kanserinde de hastalığın coğrafik açıdan bazı ülkelerde daha az sıklıkta görülmesinden yola çıkılarak özellikle bitkisel alternatif tedavi şeçenekleri ortaya çıkmaya başlamıştır (soyanın yoğun olarak kullanıldığı ülkelerde meme kanseri sıklığının daha az olduğu bilinmektedir). Anadolu'da kekiğin beslenme amaçlı mutfağımızda yer almasının yanında birçok hastalığa iyi geldiği için bu amaçla halk arasında kullanıldığı bilinmektedir. Kekiğin mutfağımızdaki yeri dışında yağı içinde bulunan aktif moleküllerden karvakrol fırın ürünleri, ciklet, içecek ve tatlılarda lezzetlerindirici olarak eklenmektedir. İzmir kekiği ektresinde esas olarak monoterpen fenoller olan timol ve karvakrol bulunmaktadır. Kekik içeriğinin esasını oluşturan timolun antibakterial özelliği, bunun yanında antiviral, antifungal ve bağışıklık sistemi uyarıcı etkileri bilinmektedir (3). Buradan yola çıkılarak laboratuar şartlarında da bu bitkinin ekstresinin etkileri araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda İzmir kekiği ekstresinde ise tüm dilüsyonlarda (dozdan bağımsız), uygulanan meme kanseri hücre kültürleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meme kanseri hücreleri sayısında düşüş ve hücrelerin tutunma özelliğinde azalış şeklinde etki göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışmada İzmir kekiği ekstresinin laboratuar şartlarında meme kanseri hücresi üzerinde etkisi olduğu, hücre bölünmesini durdurduğu, apoptosisi hızlandırdığı, başka bir deyişle kanser hücrelerini öldürdüğü gösterilmiştir. Her ne mekanizma ve hangi etkin maddeden olursa olsun hücre proliferasyonu üzerinde önemli etkisi olan ve ülkemizde yaygın olarak yetişen bu bitkinin meme kanserini önleyeci etkisinin klinik çalışmalarla gösterilmesi durumunda çok sayıda meme kanseri olgularının beslenme şeklinde değişiklik gibi basit, kolay ve ucuz yöntemlerle en aza indirilebileceği gösterilmiş olacaktır.

Teşekkür: Hacettepe Üniversitesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı'ında Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sevda Fatma Müftüoğlu'na, araştırma görevlisi Ayşegül Süzer'e, doz ayarlamasını yapan Gazi Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Süreyya Barun'a, kekik ektresinin hazırlandığı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim Üyesi Prof Dr Belma Konuklugil'e ve araştırmanın başından itibaren bana sonsuz yardımlarından dolayı Demet İzgü öğretmenime teşekkür ederim.

Kaynaklar:

1. Eser S, Yakut C, Özdemir R, Karakilinç H, Özalan S, Marshall SF, Karaoğlanoğlu O, Anbarcioğlu Z, Üçüncü N, Akin Ü, Özen E, Özgül N, Anton-Culver H, Tuncer M. Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation . Asian Pac J Cancer Prev 2010;11(6):1731-9.
2. Oya KAÇAR, Ecdriç GÖKSU, Nedime AZKAN, İzmir Kekiğinde (Origanum emlles L.) Farklı Sıklıkların Bazı Agronomik ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. U.Ü. Ziraat Fakultesi Dergisi Sayı: 2 (2006) Cilt: 21.
3. Babili FE, Bouajila J, Souchard JP, Bertrand C, Bellvert F, Fouraste I, Moulis C, Valentin A. Oregano: Chemical Analysis and Evaluation of Its Antimalarial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. Journal of Food Science 2011;76(3):512-18.
4. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB231. Phytomedicine 2010;17:581–88.
5. Hiroki Satooka, Isao Kubo. Effects of Thymol on B16-F10 Melanoma Cells. J. Agric. Food Chem 2012;60:2746-52.
6. Mastelić J, Jerković I, Blažević I, Poljak-Blazi M, Borović S, Ivancić-Baće I, Smrecki V, Zarković N, Brcić-Kostic K, Vikić-Topić D, Müller N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. J Agric Food Chem 2008;56(11):3989-96.