KSÜ Tarım ve Doğa Derg 26 (6), 1268-1276, 2023
KSU J. Agric Nat 26 (6), 1268-1276, 2023
https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1205655

Farklı Yıllarda Toplanan Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. ex Bentham) Türünün Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

Orhan ÜNAL[1] ✉, Esra AYDEMİR[2], Serap ÖZKAYA GÜL[3], Mehmet TORUN[4]
[1,2]Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Antalya TÜRKİYE, [3]Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Antalya Türkiye, [4]Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Antalya TÜRKİYE
[1]https://orcid.org/0000-0001-9633-5726, [2]https://orcid.org/0000-0002-5206-7333, [3]https://orcid.org/0000-0002-7071-4805
[4]https://orcid.org/ 0000-0002-6287-2993
✉: ounal@akdeniz.edu.tr

ÖZET

Kanser, genomdaki birçok mutasyonun birikimi ile ortaya çıkan sistemik bir hastalıktır. Kanser tedavilerinde kullanılan farklı tedavi yöntemleri nedeniyle zamanla hücrelerde yüksek toksisite ve ilaç direncine neden olması sebebiyle tedavilerdeki başarıyı engellemektedir. Bu nedenle kanser tedavisi için doğal ürünler ve bunların sentetik türevleri büyük bir potansiyel taşımaktadır. Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss.&Heldr. Ex Bentham) antibakteriyel ve antioksidatif etki başta olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu çalışmada farklı yıllarda toplanan bitkileren elde edilen su ekstraktlarının meme kanser hücrelerinde sergilediği sitotoksik etkiler incelenmiştir. Çalışmada 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF10-A hücre hatlarında yapılmıştır. 2017, 2018 ve 2019 yıllarında toplanan S.pisidica bitkisinin su ekstraktları 1-1000 ng/mL dozlarda hücrelere uygulanmıştır. WST-8 hücre canlılığı belirleme kiti ile sitotoksisite testi inkübasyon süreleri sonunda yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda MCF-7 hücrelerinde 2017 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda IC50 değeri 1.95 ng/mL, 2019 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda IC40 değeri 3.9 ve 1.95 ng/mL olduğu hesaplanmıştır. Daha agresif olan MDA hücrelerinde 2019 yılına ait *S.pisidica* su ekstraktının 48 saatlik inkübasyondaki IC50 değeri ise 7.8 ng/mL'dir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında fenolik içeriklerin yıllara bağlı olarak farklılık gösterdiği ve 2017 örneğinde düşük 2019 örneğinde ise yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur.

Ekoloji

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi
Geliş Tarihi : 16.11.2022
Kabul Tarihi : 05.05.2023

Anahtar Kelimeler
Lamiaceae
Salvia pisidica
Kanser
Sitotoksisite
Ekoloji

Investigation of the Cytotoxic Effect of Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. ex Bentham) Species Collected in Different Years

ABSTRACT

Cancer is a systemic disease that occurs with the accumulation of many mutations in the genome. Due to the different treatment methods used in cancer treatments, it prevents the success of the treatments due to the high toxicity and drug resistance in the cells over time. Therefore, natural products and their synthetic derivatives have great potential for cancer treatment. Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss.&Heldr. ex Bentham) has many biological activities, especially antibacterial and antioxidative effects. In this study, the cytotoxic effects of water extracts of plants collected in different years against breast cancer cells were investigated. In this study, 24, 48 and 72 hour incubations were made in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF10-A cell lines. The water extracts of *S.pisidica* plant collected in 2017, 2018 and 2019 were applied to the cells at doses of 1-1000 µg/mL. At the end of the incubation period, cytotoxicity test was performed with the WST-8 cell viability determination kit. In the results of the experiment, it was calculated that the IC50 value of the extract of 2017 was 1.95 ng/mL in 48 hours of incubation, and the IC40 value of the extract of 2019 was 3.9 and 1.95 µg/mL in 48 hours of incubation in MCF-7 cells. In the more aggressive MDA cells, the IC50 value of the 2019 *S.pisidica* water extract in 48 hours of incubation is 7.8 µg/mL. When the

Ecology

Research Article

Article History
Received : 16.11.2022
Accepted : 05.05.2023

Keywords
Lamiaceae
Salvia pisidica
Cancer
Cytotoxicity
Ecology

results obtained were examined, it was found that the phenolic contents differed depending on the year and were low in the samples of 2017 and high in the samples of 2019.

Atıf Şekli: Ünal, O., Aydemir, E., Özkaya Gül, S., & Torun, M. (2023) Farklı Yıllarda Toplanan Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. ex Bentham) Türünün Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg 26* (6), 1268-1276. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1205655

To Cite : Ünal, O., Aydemir, E., Özkaya Gül, S., & Torun, M. (2023). Investigation of the Cytotoxic Effect of Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. ex Bentham) Species Collected in Different Years. *KSU J. Agric Nat 26*(6), 1268-1276. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1205655

GİRİŞ

Sağlıklı yaşam bitkilerde bulunan antioksidan etkili maddelerin ve fenolik bileşiklerin etkilerine önem vermektedir. Bitkiler doğal antioksidan bileşiklerin başlıca kaynaklarıdır. Doğal antioksidanların en önemli grupları ise fenolik maddelerdir. Bunlar polifenolik komponentler olup tüm bitki kısımlarında görülürler. Yaygın olan bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler başta olmak üzere kumarinler, sinnamik asit türevleri, fenolik asitler ve tokoferollerdir (Deveci ve ark., 2016). Araştırmalar fenolik bileşiklerin sağlık üzerinde antidiyabetik, antienflamentuar, antialerjik, antiviral, antimikrobiyal, antitrombotik ve antipatojenik olmak gibi bir çok yararının olduğunu göstermiştir (Atak & Uslu, 2018).

Salvia türleri, halk hekimliğinde yara iyileşmesi, mide, karaciğer ve romatizma ağrılarının hafifletilmesinde ve dünyanın çeşitli yerlerinde soğuk algınlığı tedavisinde infüzyon ve kaynatma şeklinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak *Salvia*'dan elde edilen uçucu yağlar, gıda tatlandırıcılarında, farmasötiklerde ve parfümeride kullanılmaktadır. *Salvia* türleri esas olarak uçucu yağ ve fenolik asit, flavonoid içeriğinin yüksek olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada toplam fenolik, flavonol içerikleri sırasıyla 54.57mg gallik asit, 16.70 mg kateşin ve 18.19 mg rutin bulunmuştur (Özkan ve ark., 2010). Farmakolojik çalışmalar, Lamiaceae familyasının bitki türlerindeki uçucu yağların antikanser veya antimitojenik/antiproliferatif aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Lampronti, 2006).

Lamiaceae (Labiatae) familyası 250 cins ve 6500 adet tür içeren çok geniş bir familyadır. Familya çoğu tıbbi ve aromatik özellikte olan adaçayı (*Salvia* sp.), kekik (*Thymus* sp.), nane (*Mentha* sp.), mercanköşk (*Origanum* sp.), biberiye (*Rosmarinus* sp.), lavanta (*Lavandula* sp.), reyhan (*Ocimum* sp.) gibi pek çok bitkiyi kapsamaktadır (Taştan ve ark., 2022). *Salvia* L. (Lamiaceae) cinsinin Türkiye'de yaklaşık 90 türü bulunmaktadır. Bunlardan biri olan *Salvia* türleri temelde uçucu yağ ve fenolik içerik bulundurmaktadır (Özkan ve ark., 2010). Çalışmada kullanılan bitki, Benli Şalba (*Salvia pisidica* Boiss.&Heldr. ex Bentham), Lamiaceae familyasına ait endemik bir bitkidir (Behçet, 2020). Bu tür, menekşe-mavi çiçekleri olan 14-35 cm uzunluğunda çok yıllık bir yarı çalımsı bir bitkidir. Deniz seviyesinden 950 ila 1750 m yükseklikte kuru kireçtaşı yamaçları ve tarla kenarlarını tercih eder. Sadece Burdur, Uşak, Antalya ve Afyon ilinde yetiştiği Anadolu'ya özgüdür ve Antalya'da "ada çayı" adı verilen bir bitki çayı türü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Hedge, 1982).

Kadınlarda en yaygın görülen ve ölüme neden olan kanserler 2020 dünya kanser istatistiklerine göre sırasıyla; akciğer, serviks ve meme kanserleridir (Ferlay ve ark., 2021). Bunlardan meme kanseri, kadınlarda %15 oranında ölüme neden olmakta ve tanı konulan kanser tiplerinin %30'unu kapsamaktadır (Siegel ve ark., 2019). Bu nedenle meme kanseri 2020 yılında dünyada en çok tanı konulan kanser tipi olarak belirlenmiştir (Ferlay ve ark., 2021).

Kanser tedavilerinde; kemoterapi, radyasyon ve kombinasyon terapileri gibi birçok tedavi stratejisi olmasına rağmen, meydana gelen yan etkiler giderek artmaktadır (Greenwell ve ark., 2015).

Bilinen en eski tedavi şekli bitkisel kaynaklarla tedavidir (Çelik ve ark., 2007). Bitkiler insanlık tarihi boyunca yaşamın vazgeçilmez temel kaynaklarından biridir. Bunun temel nedeni ise insanların bitkileri sadece beslenme için değil çeşitli hastalıkların tedavisi içinde kullanmalarıdır (Deveci ve ark., 2016). İlaçların yan etkilerinin giderek artması ve direnç oluşması da düşünüldüğünde bitkilerden elde edilen doğal ürünler ve bunların sentetik türevleri, kanser tedavileri için umut vaat etmektedir (Zhong ve ark., 2015).

Salvia türlerinden, *S.miltiorrhiza*'da meme kanserine karşı etkili olan ana bileşenler, dihidrotanshinon I (DHT), tanshinone I, tanshinone IIA ve kriptotanshinon dahil olmak üzere yağda çözünür tanshinonlar ve salvianolik asit A, salvianolik asit B, salvianolik asit C ve rosmarinik asit tarafından temsil edilen suda çözünür fenolik asitlerdir. S.miltiorrhiza'nın etkili bileşenlerinden birisi olan dihidrotanshinon-I, antikanser, antiinflamatuar, kardiyoprotektif ve diğer farmakolojik aktiviteleri nedeniyle günümüze kadar kapsamlı olarak incelenmiştir (Chen ve ark., 2019). DHT'nin meme adenokarsinomunda apoptozu ve G1 fazlı hücre döngüsü durmasını indüklediği rapor edilmiştir (Tsai ve ark., 2007). Salvianolik asitler, S. miltiorrhiza'da suda çözünür bileşenlerdir. Esas olarak Sal A, Sal B, Sal C ve RA'yı içermektedir (Wu ve ark., 2020). Sal A, MCF-7 hücrelerinde proliferasyonu ve indüklenen

apoptozu inhibe etmektedir (Cai ve ark., 2014). Sal A, Bcl-2 ve p-Akt ekspresyonunu inhibe etmekte ve PTEN ve Bax ekspresyonunu desteklemektedir. Ayrıca Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve PARP bölünmesini indükleyerek MCF-7 hücrelerinde apoptoza yol açmaktadır (Cai ve ark., 2014). Sal B, Caspase-3, Caspase-9 ve Bax ekspresyonunu artırmakta ve MCF-7 hücrelerinde apoptozu teşvik etmek için Bcl-2 ekspresyonunu azaltmaktadır. Sal B, Bcl-xl, Survivin ve p-ERK ekspresyonunu inhibe etmekte ve MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Caspase-3 ve Caspase-8 aktivasyonunu desteklemektedir (Quan ve ark., 2019).

Kanser çalışmalarında MDAMB-231 hücreleri, MCF7 hücre hattından sonra en yaygın kullanılan hücre hattıdır. Östrojen ekspresyonuyla hormon duyarlılığının yüksek olmasından dolayı MCF7 hücreleri hormon bağımlı çalışmalarda tercih edilen model olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda MCF7 hücreleri meme hücrelerinin luminal epitelyal fenotipinin belirteçlerini protein seviyesinde ifade etmektedir (Levenson & Jordan, 1997). MCF7'nin ifade ettiği belirteçleri MDAMB-231 hücreleri ifade etmez. Yüksek düzeyde vimentin içeren MDAMB-231 hücreleri mezenkimal fenotipin bir belirteci olarak, üçlü negatif meme kanserleri için sıklıkla kullanılan bir modeldir (Mladkova ve ark., 2010). Bu üçlü negatif meme kanserleri beyin ve akciğerler başta olmak üzere diğer organlara metastaz yapabilmektedir. Bundan dolayı, tekrarlama olasılığı diğer meme kanserlerine göre daha yüksektir (Foulkes ve ark., 2010).

Çalışmada farklı yıllarda toplanan *S. pisidica*'nın sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

S. pisidica çiçeklenme döneminde Antalya, Korkuteli ilçesinden, yaklaşık 950 m yükseklikten kuru kalker yamaçlardan Mayıs 2017, Mayıs 2018 ve Mayıs 2019 yıllarında toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri oda sıcaklığında, gölgede laboratuvar koşullarında kurutulmuştur. Kurutulan bitki materyali gölgede bir öğütücü ile toz haline getirilmiştir. Ekstraksiyon için 7.5 gr bitki materyali 100 mL su içinde 24 saat aralıklı çalkalanarak ıslatılmıştır. Ekstraksiyon sonunda 1 No'lu Whatman filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Süzüntü, 40 ^{o}C'de bir döner buharlaştırıcı ile indirgenmiş basınç altında kuruyana kadar konsantre edilmiştir ve bu işlem her numune için üç kez tekrarlanmıştır ve ardından liyofilize edilmiştir. Kurutulan ekstraktlar kullanılıncaya kadar buzdolabında (4 ^{o}C) saklanılmıştır (Özkan ve ark., 2010).

Fenolik İçerik Analizi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

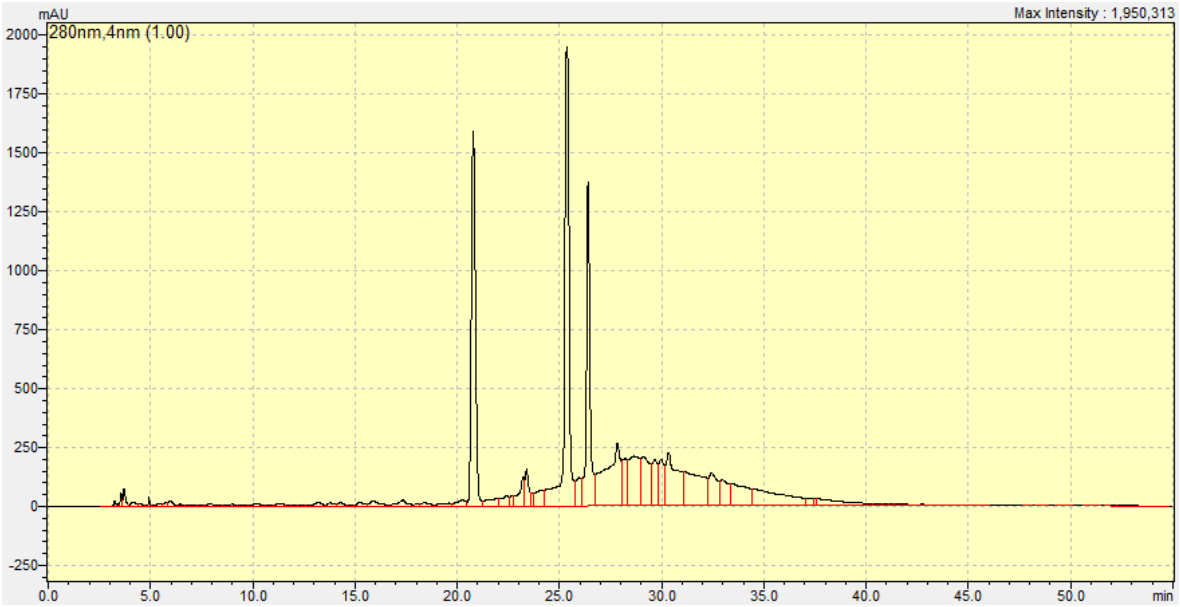
Örneklerin fenolik bileşiminin analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik analiz için örnekler 0.45 µm'lik membran filtreden süzülüp, HPLC (SIL-20A Prominence, Shimadzu, Japonya)'ye 10 µL enjekte edilmiştir. Bileşenlerin ayrımında C18 kolon (LiChroCART® 250-4 250 mm × 4 mm 5 µm Nucleosil® 100) ve DAD dedektör (SPD-M20A Diode Array Detector Shimadzu, Japan) kullanılmıştır (Torun ve ark., 2014). Mobil faz olarak su/asetik asit/metanol (88/2/10, v/v/v) (mobil faz A) ve metanol/asetik asit/su (90/2/8, v/v/v) (mobil faz B) karışımı kullanılmış olup mobil faz akışı 0.9 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Mobil faz akış programı başlangıçta A:B 100:0 olup 15. dakikada A:B 85:15, 25. dakikada A:B 50:50, 35. dakikada A:B 30:70, 50. dakikada A:B 25:75 ve 55. dakikada A:B 100:0 olarak uygulanmıştır. Bileşenler maksimum absorbansı verdiği dalga boyunda [vanilik asit (260nm), gallik asit, (+)-kateşin, (-)-epikateşin) (280 nm), ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve p-kumarik asit (320 nm)] ölçülmüştür (Şekil 1). Örneklerin fenolik madde bileşenlerinin belirlenmesinde standartlar örneklerin yürütüldüğü koşullarda dört farklı konsantrasyonda tutulma zamanları göz önüne alınarak analiz edilmiş ve standartlardan hazırlanan kalibrasyon eğrileri ile hesaplamalar yapılmıştır.

Hücreler ve Kültür Koşulları

MDAMB-231 (ATCC® HTB-26), MCF-7 (ATCC® HTB-22™), ve MCF10A (ATTC CRL-10317) hücreleri ATCC'den elde edilmiştir. MDAMB-231 ve MCF-7 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum piruvat ve 0.02 mM esansiyel olmayan amino asitlerle desteklenmiş RPMI 1640 ortamında çoğaltılmıştır. MCF10A hücreleri, MEMB (Kat no: CC-3151) besiyerine MEGM singleQuats (Kat no: CC-4136) büyüme faktörleri ilave edilerek çoğaltılmıştır.

Hücre Canlılığı Testi

96 kuyucuklu steril plaklara hücreler 1x10^{4} hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Besi yerler 24 saatlik inkübasyon sonunda uzaklaştırılmıştır. Her üç ekstrakt %1 FBS içeren besi yeri içinde, 1 µg/ml olan en yüksek dozdan seri sulandırmalar ile dozlar (1.95-1000 ng/ml) hazırlanmıştır. Kuyucuklara ekstraktlar 200 µl şeklinde eklenmiş ve 37°C'lik etüvde %5 CO_2'li atmosferde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her bir inkübasyon süresinin ardından WST-1 hücre proliferasyon kiti (Roche, Cat. No. 11644807001) kullanılarak ekstraktların sitotoksik etkileri belirlenmiştir (Yeh ve ark., 2018). İnkübasyon süresi sonunda plakların absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go), ölçülerek kaydedilmiştir.



Şekil 1. HPLC'de elde edilen örnek kromatogram (1: Vanilik asit, 2: Gallik asit, 3: Klorojenik asit, 4: Kafeik asit, 5: Ferulik asit, 6: p-kumarik asit, 7: Rutin, 8: (-)-epikateşin)

Figure 1. Example chromatogram obtained in HPLC (1: Vanillic acid, 2: Gallic acid, 3: Chlorogenic acid, 4: Caffeic acid, 5: Ferulic acid, 6: p-coumaric acid, 7: Rutin, 8: (-)-epicatechin)

Tripan Mavisi Testi

Hücre canlılığını doğrudan mikroskopta gözlemleyebilmek için kullanılmıştır. Ayrıca bu test elde edilen sitotoksisite test sonuçlarını desteklemek içinde kullanılmıştır. Hücre canlılığı hücre içerisine Tripan mavisinin alınıp alınmamasına göre değerlendirilmiştir. Membran hasarlı hücrelerin içine boya girdiği için bu hücreler mavi renktedir. Canlı hücrelerin içine boya girişi olmadığı için hücreler şeffaf renklidir.

İstatistiksel Analiz

Sitotoksisite testlerinden elde edilen verileri değerlendirmek için Graph-pad InStat istatistik programında Tek Yönlü Anova ve ardından Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Elde edilen veriler Sigma Plot 10.0 programı ile Ortalama ± SEM değerleri şeklinde grafik haline getirilmiştir. Ayrıca MDA ve MCF-7 hücrelerinde yıllara göre değişen içeriklerin 1.95-1000 µg/mL dozlardaki etkilerinin Pearson Korelasyon Analizi ve Isı Haritası yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Fenolik İçerik: Çalışmada kullanılan *S.pisidica* ekstraktların fenolik içeriklerinin analizi sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında fenolik içeriklerin yıllara bağlı olarak farklılık gösterdiği ve 2017 örneğinde düşük 2019 örneğinde ise yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur.

Çizelge 1. *S.pisidica* Ekstraktlarında Tespit Edilen Fenolik Bileşikler

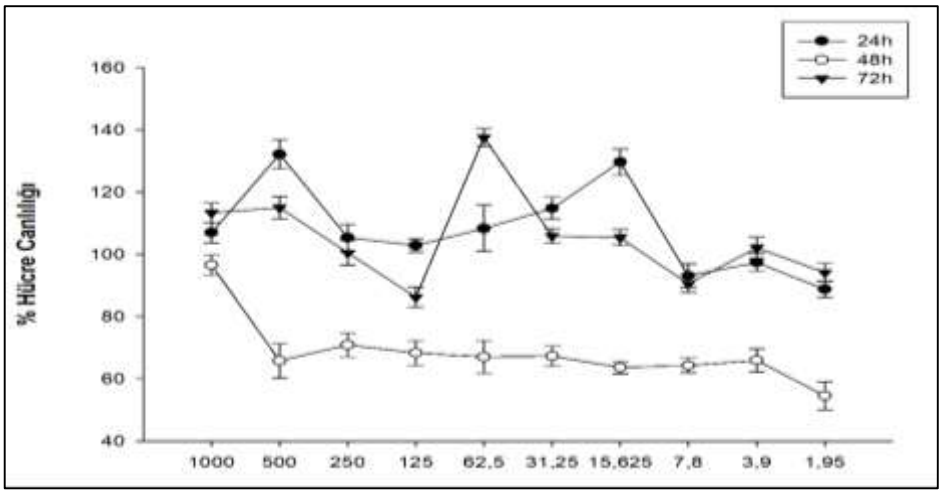
Table 1. Phenolic Compounds Detected in S.pisidica Extracts

Fenolikler (mg/mL) *(Phenolics)*	**2017**	**2018**	**2019**
Vanillic	$0.116^{c}\pm0.00$	$0.148^{b}\pm0.00$	$0.213^{a}\pm0.03$
Gallic	$0.038^{b}\pm0.00$	$0.043^{a}\pm0.00$	$0.031^{c}\pm0.00$
Chlorogenic	$0.655^{c}\pm0.00$	$0.694^{b}\pm0.00$	$1.914^{a}\pm0.04$
Caffeic	$0.008^{c}\pm0.00$	$0.012^{b}\pm0.01$	$0.028^{a}\pm0.01$
Ferulic	$0.128^{b}\pm0.00$	$0.109^{c}\pm0.00$	$0.248^{a}\pm0.01$
p-Coumaric	$2.273^{c}\pm0.02$	$2.378^{b}\pm0.07$	$3.797^{a}\pm0.05$
Rutin	$0.517^{b}\pm0.00$	$0.359^{c}\pm0.02$	$0.594^{a}\pm0.01$
(-)-Epicatechin	$0.505^{c}\pm0.04$	$0.565^{b}\pm0.01$	$0.858^{a}\pm0.02$
(+)-Catechin	Nd	nd	nd
3-hydroxycinnamic acid	Nd	nd	nd
o-Coumaric	Nd	nd	nd

Sonuçlar ortalama ± standart hata, farklı üst simge harfleri olan bir satırdaki değerler önemli ölçüde ($p < 0.05$) farklıdır
nd: not determined (Tespit edilemedi).
Results mean ± standard error, values in a row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$)
nd: not determined.

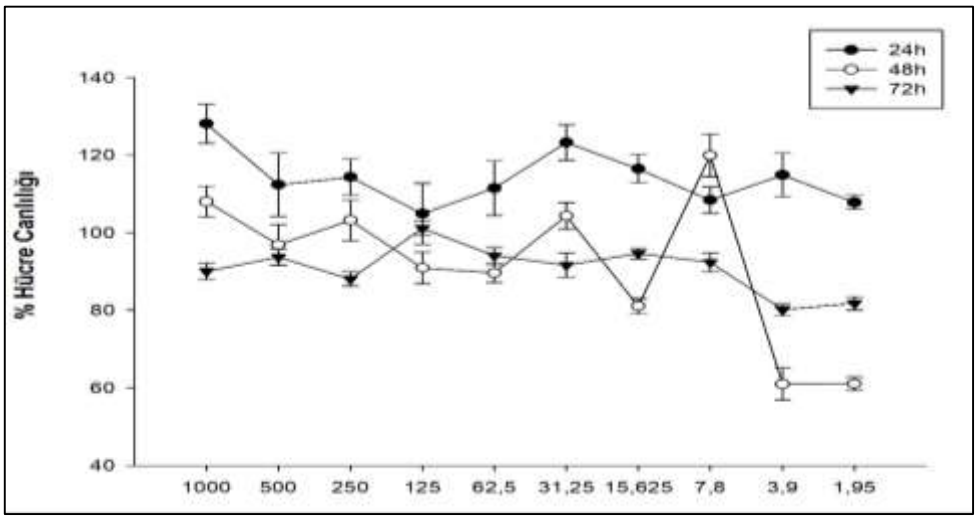
Sitotoksik Etkiler

S.pisidica bitkisinin 2017, 2018 ve 2019 yıllarına ait su ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendiğinde, MCF-7 hücrelerinde 2017 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda IC50 değeri 1.95 ng/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 2). 2019 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda IC40 değeri 3,9 ve 1.95 ng/mL olduğu hesaplanmıştır (Şekil 3). Daha agresif olan MDA hücrelerinde 2019 yılına ait *S.pisidica* su ekstraktının 48 saatlik inkübasyondaki IC50 değeri ise 7.8 ng/mL'dir (Şekil 4).



Şekil 2. MCF-7 Hücrelerinde 1.95-1000 µg/mL Aralığındaki Dozlarda 2017 Yılına Ait *S.pisidica* Su Ekstraktı İle Muamelesi Sonucu Kontrole Kıyasla Hücre Canlılığı Yüzdesi.

Figure 2. Percentage of Cell Viability in MCF-7 Cells After Treatment with 2017 S.pisidica Water Extract at Doses in the Range of 1.95-1000 µg/mL Compared to Control.

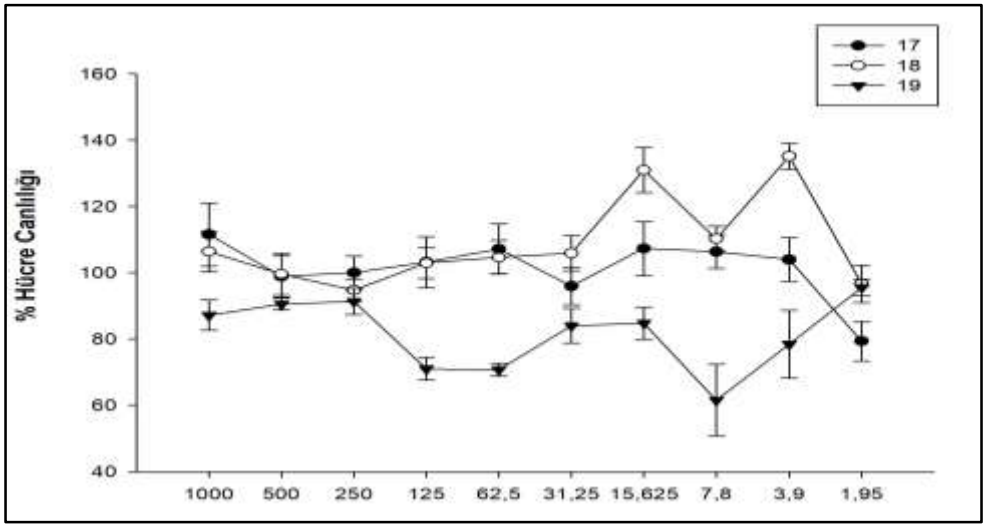


Şekil 3. MCF-7 Hücrelerinde 1.95-1000 µg/mL Aralığındaki Dozlarda 2019 Yılına Ait *S.pisidica* Su Ekstraktı İle Muamelesi Sonucu Kontrole Kıyasla Hücre Canlılığı Yüzdesi.

Figure 3. Percentage of Cell Viability in MCF-7 Cells After Treatment with 2019 S.pisidica Water Extract at Doses in the Range of 1.95-1000 µg/mL Compared to Control.

Çalışmada, fenolik içerikler incelendiğinde yıllara bağlı olarak farklılıklar görülmüştür (Çizelge 1). Fenolik bileşiklerin içeriklerinin farklılık göstermesinin nedenleri arasında toplanma zamanı ve çevresel faktörler etkilidir (Atak & Uslu, 2018). Çalışılan 2017 yılı örneklerinde içerik daha az 2019 örneklerinde içerik daha fazla bulunmuştur. Bunun nedenlerinden biri örneğin bekletilmesi nedeniyle fenolik içeriğinin azalması olabileceği düşünülmektedir. Bir diğer neden olarak bitkinin yetiştiği ortamın iklimsel faktörleri özellikle sıcaklığın etkili olacağı düşünülmüştür. Antalya Devlet Meteoroloji Müdürlüğü'nden alınan Korkuteli'ne ait 2017, 2018 ve 2019 iklimsel verileri (Çizelge 2) incelendiğinde yıllara bağlı olarak aylık sıcaklık ortalamalarında bir farklılık olduğu ve bir artış olduğu görülmektedir. Fialová ve ark. (2015)'in yapmış olduğu çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Mentha* L.

Türlerinde yıllara bağlı olarak fenolik içeriklerinin değiştiğini bulmuşlardır. Benzer şekilde Başyiğit & Baydar (2017)'de yapmış olduğu çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Salvia officinalis* L. farklı zamanlarındaki hasatlarında fenolik bileşiklerin miktarının değiştiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4. MDA Hücrelerinde 1.95-1000 µg/mL Aralığındaki Dozlarda 2019 Yılına Ait *S.pisidica* Su Ekstraktı İle Muamelesi Sonucu Kontrole Kıyasla Hücre Canlılığı Yüzdesi.

Figure 4. Percentage of Cell Viability in MDA Cells After Treatment with 2019 S.pisidica Water Extract at Doses in the Range of 1.95-1000 µg/mL Compared to Control.

Çizelge 2. Yıllara Bağlı Korkuteli İlçesine Ait Sıcaklık Değerleri (°C)

Table 2. Temperature Values of Korkuteli District in Years (°C)

Yıllar *(Years)*	Aylar *(Monts)*												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ortalama *(Average)*
2017	0.2	4	7	10.9	15.7	21.5	25.7	23.5	21.5	13.8	7.6	5.4	13.06
2018	4.4	6.5	9.4	14.8	17.8	20.4	24.9	24	20.8	14.5	9.3	4.3	14.25
2019	2.5	5.2	7.9	10.2	16.7	20.8	23.7	24.6	20.2	16	9.9	5	13.55

S.pisidica ile ilgili yapılmış olan bir çalışmada (Özkan ve ark., 2010) toplam fenolik, flavanol ve flavonol içerikleri, antioksidan aktiviteleri ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada HPLC ile bir fenolik profili belirlenmemiştir. Çalışmada HPLC ile bir fenolik profili belirlenmiş ve p-Coumaric, chlorogenic ve rutin içeriklerinin *S.pisidica* su ekstraktının içerisinde en yüksek miktarda bulunduğu belirlenmiştir.

Salvia türleri ile yapılan literatürde birçok çalışma yer almaktadır. *S.tebesana* türünün petrol eteri ekstraktı A2780 (yumurtalık), MCF-7 (meme) ve DU145 (prostat) kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermektedir (Eghbaliferiz 2019). *S.dominica* ve *S.triloba*'dan elde edilen etanol ekstrelerinin T47D ve MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve sitotoksik etki sergilediği belirtilmiştir (Abu-Dahab 2014). Bir diğer *Salvia* türü olan *S.suffruticosa* ekstraktının T-47D, MDA-MB-231 ve MCF-7 olmak üzere birçok meme kanseri hücre hatlarına yönelik güçlü inhibitör etki sergilediği göstermektedir (Rustaie, 2018). *S.verticillata*'nın kloroform ve petrol eteri kök ekstrelerinin ise sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini analiz edilmiş ve MDAMB-231 hücreleri için IC50 değeri 30.90 ug/ml olarak hesaplanmıştır (Barjaktarevic, 2021).

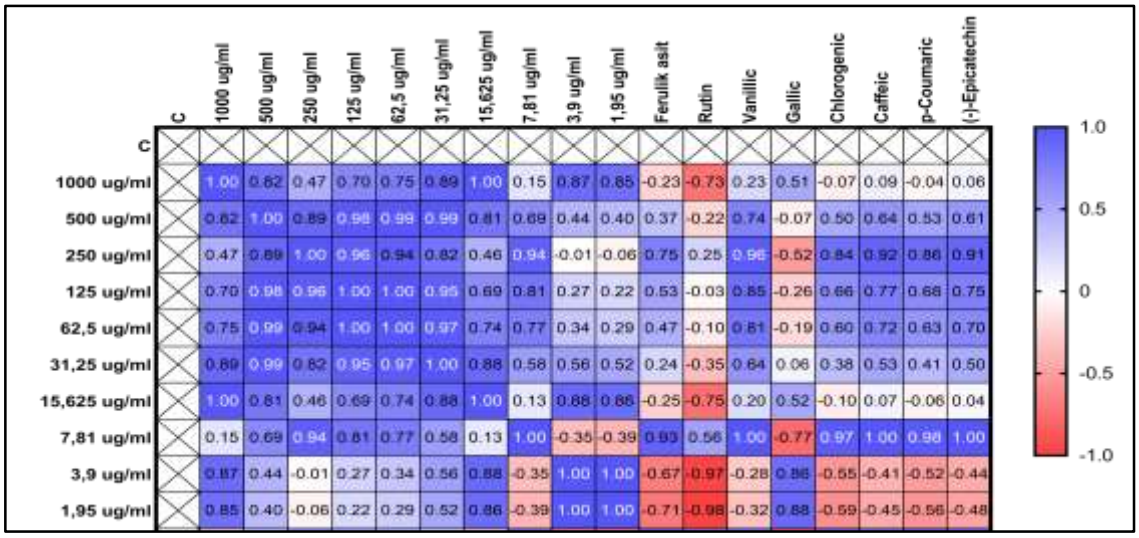
Çalışma kapsamında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile gerçekleştirilen sitotoksisite denemeleri sonucunda *S.pisidica* su ekstraktının yıllara bağlı olarak farklı sitotoksik etkiler sergilediği belirlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde 2017 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda IC50 değeri 1.95 µg/mL olarak belirlenmiştir. 2019 yılına ait ekstraktın 48 saatlik inkübasyonda ise IC40 değeri 3.9 ve 1.95 µg/mL olduğu hesaplanmıştır. Daha agresif olan MDA hücrelerinde 2019 yılına ait *S.pisidica* su ekstraktının 48 saatlik inkübasyondaki IC50 değeri ise 7.8 µg/mL'dir.

Rutin, antikarsinojenik, sitoprotektif, antiinflamatuar, antimutajenik etkiler dahil olmak üzere çoklu farmakolojik aktivitelere bir flavonoldür (Saleh, 2019). Yang ve ark. (2017)'de yapmış olduğu çalışmada Rutin, MCF-7 hücreleri için 45.6 µM IC50 değerleriyle, doza bağlı bir şekilde MCF-7 kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. ElKhazendar ve ark. (2019)'de yapmış olduğu çalışmada ise ferulik asit, 48 saatte sırasıyla 75.4

µg/mL konsantrasyonda MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir.

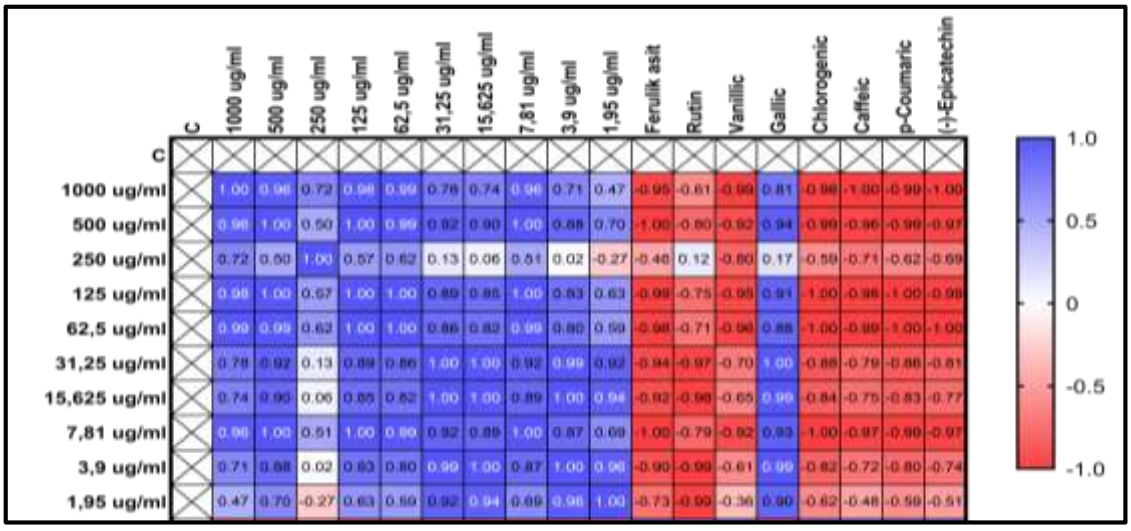
SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak elde edilen bu veriler ile ekstraktın içerikleri incelendiğinde ferulik asit ve rutin miktarlarındaki değişimlerin sitotoksisitede istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yarattığı görülmektedir. Yıllara göre ferulik asit ve rutin etken maddelerinin miktarları incelendiğinde 2017 yılındaki ekstraktlarda sırasıyla; 0.128 mg/ml ve 0.517 mg/ml; 2018 yılındaki ekstraktlarda 0.109 ve 0.359 mg/ml; 2019 yılındaki ekstraktlarda ise 0.248 ve 0.594 mg/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda ferulik asit ve rutin miktarındaki değişiklikler ile meme kanserindeki hücre canlılığı arasında negatif yönde güçlü korelasyon olduğu görülmektedir (Şekil 5 ve 6, ferulik asit için r=-0.71; rutin için r=-0.98).



Şekil 5. MCF-7 Hücrelerinde Yıllara göre değişen içeriklerin 1.95-1000 µg/mL Dozlardaki etkilerinin Pearson korelasyon analizi ve ısı haritası.

Figure 5. Pearson correlation analysis and heat map of the effects of year-varying contents in MCF-7 Cells at Doses of 1.95-1000 µg/mL.



Şekil 6. MDA Hücrelerinde Yıllara göre değişen içeriklerin 1.95-1000 µg/mL Dozlardaki etkilerinin Pearson korelasyon analizi ve ısı haritası.

Figure 6. Pearson correlation analysis and heat map of the effects of year-varying contents in MDA Cells at Doses of 1.95-1000 µg/mL.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, içeriklerin yıllara bağlı olarak içeriklerinde farklılıklar oluşmakta ve bu farklılıklar sonucu hücre canlılığındaki etkiler de değişmektedir. Tüm içerikler incelendiğinde ferulik asit ve rutin miktarlarının hücre canlılığında azalmaya sebep olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış

olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Abu-Dahab, R., Abdallah, M.R., Kasabri, V., Mhaidat, N.M.,& Afifi, F.U. (2014). Mechanistic studies of antiproliferative effects of *Salvia triloba* and *Salvia dominica* (Lamiaceae) on breast cancer cell lines (MCF7 and T47D). *Zeitschrift für Naturforschung C, 69*(11-12), 443-451.

Atak, E., & Uslu, M.E. (2018). Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *MCBÜ Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi, 27*(3), 39-48.

Barjaktarevic, A., Ćirović, N., Arsenijevic, N., Volarevic, V., Markovic, B., Mitić, V., Jovanic, V.S., & Cupara, S. (2021). Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Salvia verticillata* L. Extracts. Indian Journal of *Pharmaceutical Sciences. 83*(6), 1280-1287.

Başyiğit, M., & Baydar, M. (2017). Tıbbi Adaçayı (*Salvia officinalis* L.)'nda Farklı Hasat Zamanlarının Uçucu Yağ ve Fenolik Bileşikler ile Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi. *Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences. 21*(1), 131-137.

Behçet, L., & Yapar, Y. (2020). Türkiye'den Bazı Kareler İçin Yeni Floristik Kayıtlar. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 9*(4):1482-1495.

Cai, J., Chen, S., Zhang, W., Zheng, X., Hu, S., Pang, C., Lu, J., Xing, J., & Dong, Y. (2014). Salvianolic acid A reverses paclitaxel resistance in human breast cancer MCF-7 cells via targeting the expression of transgelin 2 and attenuating PI3 K/Akt pathway. *Phytomedicine. 21*(12), 1725-1732.

Chen, X., Yu, J., Zhong, B., Lu, J., Lu, J.J., Li, S., & Lu, Y. (2019). Pharmacological activities of dihydrotanshinone I, a natural product from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Pharmacological Research. 145*, 104254-104254.

Çelik, S., Konkan, R., Erkme, & H. (2007). Tabo A, Erkıran M. Bitkisel ilaçlar ve psikiyatride kullanımı. *Düşünen Adam. 20*(4), 186-195.

Deveci, H.A., Gökhan, N., Kırpık, M.A., Harmankaya, A., & Yıldız, Y. (2016). Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar. *Kafkas Üniversitesi Fen Bil. Enst. Derg. 9*(1), 26-32.

Eghbaliferiz, S., Soheili, V., Tayarani-Najaran, Z., Asili, J. (2019). Antimicrobial and cytotoxic activity of extracts from *Salvia tebesana* Bunge and *Salvia sclareopsis* Bornm cultivated in Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants. 25*(4), 1083-1089.

ElKhazendar, M., Chalak, J., El-Huneidi, W., Vinod, A., Abdel-Rahman, W.M., & Abu-Gharbieh, E. (2019). Antiproliferative and proapoptotic activities of ferulic acid in breast and liver cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 18*(12), 2571-2576.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer. 149*(4), 778–789. https://doi.org/10.1002/IJC.33588

Fialová, S., Tekeľová, D., Rendeková, K., Klinčok, J., Kolárik, M., Kurucová, K., & Grančai, D. (2015). Phenolic compounds variation in *Mentha* L. species in the course of a four-years period Kolísanie fenolových látok v rôznych druhoch *Mentha* L. počas 4 ročného obdobia. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen. LXII*, (Suppl IX), 2-7. ISSN 1338-6786 (online) and ISSN 0301-2298 (print version), DOI: 10.1515/afpuc-2015-0013.

Foulkes, W.D., Smith, I.E., & Reis, J.S. (2010). "Triple-Negative Breast Cancer." *New England Journal of Medicine. 363*(20), 1938-1948.

Greenwell, M., & Rahman, P.K.S.M. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res. 6*(10), 4103–4112. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12.

Hedge, I.C. (1982). *Salvia* P.H. Davis (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean islands, *Edinburgh University Press, Edinburgh. 7*, 400-461

Lampronti, İ.,& Saab, A.M., Gambari, R. (2006). Magnoliophyta Bölümüne Ait Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağların Antiproliferatif Aktivitesi. *Int. J. Oncol. 29*, 989-995.

Levenson, A.S., & Jordan, V.C. (1997). "MCF-7: the first hormoneresponsive breast cancer cell line." *Cancer Res. 57,* 3071–3078.

Mladkova, J., Sanda, M., Matouskova, E., & Selicharova, I. (2010). "Phenotyping breast cancer cell lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 using 2-D electrophoresis and affinity chromatography for glutathione-binding proteins." *BMC Cancer 10*, 449. https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-449.

Özkan, G., Sağdıç, O., Göktürk, R.S., Ünal, O., Albayrak, S. (2010). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisidica*. *LWT-Food Scıence And Technology. 43*(1), 186-190.

Quan, G., Chen, W., Wen, Y., Yan, Y., Gu, M., & Pan, Y. (2019). Chemoprotective efficacy of salvianolic acid B via triggering apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Pharmacology. 15*(1), 110-115.

Rustaie, A., Hadjiakhoondi, A., Akbarzadeh, T., Safavi, M., Samadi, N., & Sabourian, R. (2018). Phytochemical constituents and biological activities of *Salvia suffruticosa*. *Research Journal of Pharmacognosy. 5*(2), 25-32.

Saleh, A., ElFayoumi, H.M., Youns, M., & Barakat, W. (2019). Rutin and orlistat produce antitumor effects

via antioxidant and apoptotic actions. Naunyn-Schmiedeberg's *Archives of Pharmacology. 392*(2), 165-175.

Siegel, R.L., Miller, K.D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, CA: A Cancer. *Journal for Clinicians. 69*(1), 7-34.

Taştan, P., Birim, D., Fafal, T., Armağan, G., & Kıvçak, B. (2022). Bazı Lamiaceae Bitkilerinin Yağ Asidi Bileşiminin Belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25* (6), 1199-1204. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.984818.

Torun, M., Rácz, G., Fogarassy, E., Vatai, G., Dinçer, C., Topuz, A., & Özdemir, O. (2014). Concentration of sage (*Salvia fruticosa* Miller) extract by using integrated membrane process. *Separation and Purification Technology. 132*, 244-251.

Tsai, S.L., Suk, F.M., Wang, C.I., Liu, D.Z., Hou, W.C., Lin, P.J., Hung, L.F., & Liang, Y.C. (2007). Anti-tumor potential of 15, 16-dihydrotanshinone I against breast adenocarcinoma through inducing G1 arrest and apoptosis. *Biochemical Pharmacology. 74*(11), 1575-1586.

Wu, Y., Xu, S., & Tian, X.Y. (2020). The effect of salvianolic acid on vascular protection and possible mechanisms. Oxidative *Medicine and Cellular Longevity*. 5472096. doi: 10.1155/2020/5472096.

Yang, S., Zhang, H., Yang, X., Zhao, H., & Zhu, Y. (2017). Evaluation of antiproliferative activities of rutin on human colon cancer lovo cells and breast cancer MCF-7 cells. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. 39*(2),99-107.

Yeh, C.N., Wu, R.C., Cheng, C.T., Tsai, C.Y., Chang, Y.R., Yeh, T.S., Wu, T.H., Lee, W.C., Chiang, K.C. (2018). HO-1 Is a Favorable Prognostic Factor for HBV-HCC Patients Who Underwent Hepatectomy. *Cancer Manag Res, 10*, 6049–6059, doi:10.2147/CMAR.S186931.

Zhong, J., Reece, E.A., Yang, P. (2015). Punicalagin exerts protective effect against high glucose-induced cellular stress and neural tube defects. *Biochemical and biophysical research communications. 467*(2), 179-184.