

**KİNİK ASİDİN SİTOTOKSİK/GENOTOKSİK VE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI
AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARINDA
BELİRLENMESİ**

Ersin KOCAOĞLU



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİNİK ASİDİN SİTOTOKSİK/GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN SAĞLIKLI AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARINDA
BELİRLENMESİ**

Ersin KOCAOĞLU

Doç. Dr. NİLÜFER ÇİNKİLİÇ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bursa – 2014

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Ersin KOCAOĞLU tarafından hazırlanan ‘Kinik asidin sitotoksik/genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer epitel hücre hatlarında belirlenmesi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Başkan: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Rahmiye AYDIN
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
01/ 04/ 2014

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada:

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahriyat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

01 / 04 / 2014

Ersin KOCAOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KİNİK ASİDİN SİTOTOKSİK/GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARINDA BELİRLENMESİ

Ersin KOCAOĞLU

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

Yapılan bu tez çalışmasında kinik asidin sitotoksik ve genotoksik etkileri, insan akciğer epitel hücre hattı (Beas-2b) hücrelerinde klonojenik test, formazan boyama XTT testi ve tek hücre jel elektroforez (Komet) testi kullanılarak araştırılmıştır. Kinik asitin antijenotoksik etkisi ise bilinen bir DNA hasarı ve apoptoz indükleyici kemotarapötik ilaç olan cisplatin ile birlikte kullanılarak çalışılmıştır.

Çalışmamızda kinik asidin ve cisplatinin tek başlarına oluşturdukları sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla kinik asit için klonojenik test, cisplatin için XTT testi uygulanmıştır. Çeşitli dozlarda kinik asit (12 – 18 μM) ve cisplatin'e (0,5 – 50 μM) maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde hayatta kalış eğrileri hazırlanmıştır. Klonojenik test ile kinik asidin IC50 dozu 15,48 μM olarak belirlenmiştir. XTT testi ile cisplatinin IC50 dozu ise 19 μM olarak belirlenmiştir. Komet testi için kullanılacak optimum kinik asit konsantrasyonları (5 ve 10 μM) ve cisplatin dozları ise IC50 dozu olan 19 μM ve bu dozun yarısı 9,5 μM olarak belirlenmiştir.

Komet testi sonucunda kinik asitin 10 μM dozunda genotoksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir. Cisplatin ile muamele sonucunda ise 9,5 μM dozunda genotoksisitede anlamlı şekilde artış olduğu gözlenirken, 19 μM dozunda genotoksik etkinin artış göstermediği belirlenmiştir. Kinik asitin antijenotoksik etkisini belirlemek için cisplatinle gerçekleştirilen kombine uygulamalarında ise, hem 9,5 μM hem 19 μM cisplatin iki doz kinik asitle birlikte uygulanmış ve kinik asitin cisplatin uygulamasında gözlenen genotoksik etkiyi azaltmadığı belirlenmiştir. Düşük dozda kinik asit ilave edilen cisplatin uygulamasında komet testinde kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti parametrelerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir. Tek cisplatin dozuna göre oluşan bu düşüşlerin cisplatinin hasarlı hücreleri büyük oranda apoptoza götürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek dozda kinik asitle kombinlenen cisplatin gruplarında ise üç komet parametresinde de anlamlı yükselme gözlenmiştir. Bu durum ise yüksek doz kinik asitin cisplatince oluşturulan apoptozu azaltması ve hasarlı hücre sayısını tekrar yükseltmesinden kaynaklanabilir. Sonuç olarak kinik asit antijenotoksik etki göstermemiştir. Kinik asitin apoptozu baskılama etkisinin olup olmadığı ya da genotoksik etkiye sahip olup olmadığının farklı deney yöntemleri ile araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Kinik asit, cisplatin, fenolik bileşikler, komet testi, sitotoksisite

2014, ix + 57 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

THE INVESTIGATION OF CYTOTOXIC/GENOTOXIC AND ANTI-GENOTOXIC EFFECTS OF QUINIC ACID IN HEALTHY HUMAN LUNG EPITHELIAL CELL LINE

Ersin KOCAOĞLU

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ

This study investigated the cytotoxic and genotoxic effects of quinic acid alone or its anti-genotoxic effects in combination with cisplatin on Beas-2b human lung epithelial cells using viability assays (clonogenic and XTT) and single cell gel electrophoresis (Comet) assay.

In our study to determine cytotoxic effects of quinic acid we performed clonogenic assay and for cisplatin we used XTT formazan dye assay. For cytotoxicity assays, Beas-2b cells exposed to several doses of quinic acid (12 to 18 μM) and cisplatin (0,5 to 50 μM) and survival curves were prepared. IC50 dose of quinic acid was found as 15,48 μM with clonogenic assay. IC50 dose of cisplatin was found as 19 μM with XTT assay. Optimal quinic acid concentrations were chosen as (5 and 10 μM) and these doses were used alone or in combination with (9,5 μM and 19 μM) cisplatin doses.

In consequences of comet assay we have been identified increasing genotoxicity in the highest dose of quinic acid at statistically significant levels. With cisplatin treatment at a dose of 9,5 μM the genotoxicity was observed to increase as statistically significant, in the IC50 dose rate of cisplatin we did not see any significant increase in the genotoxicity. In combined dose applications with 9,5 μM cisplatin and 5 and 10 μM quinic acid we found no significant increase or decrease in tail length, tail % DNA and olive tail moment parameters. This means that quinic acid was not anti-genotoxic. While high dose cisplatin (19 μM) showed significantly decreased genotoxic effects, 5 μM quinic acid had no effects in combination with this cisplatin dose. However 10 μM quinic acid increased the genotoxic effects of high dose of cisplatin in combination showing the probable apoptosis blocking effect of quinic acid. So we could observe the exact level of damaged cells. Consequently, quinic acid did not show any antigenotoxic effects with cisplatin treatment and it should be applied further apoptosis and genotoxicity tests to better understand the exact mechanism of quinic acid.

Keywords: Quinic acid, cisplatin, phenolic compounds, comet assay, cytotoxicity

2014, ix + 57 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam **Doç. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ**'a,

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarımdan faydalandığım sevgili hocalarım Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ, Arő. Gör. Dr. Özgür VATAN, Arő. Gör. Dr. Dilek YILMAZ'a,

Deney aşamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarım Özgün TEKSOY, Mümin COŐKUN'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm Duygu KAHRAMAN'a ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ersin KOCAOĞLU

01 / 04 / 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Fenolik Bileşikler.....	3
2.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	6
2.3. Sinnamatlar.....	6
2.3.1. Hidroksisinnamatlar.....	7
2.3.1.1. Kinik Asit.....	8
2.3.1.2. Klorojenik Asit.....	11
2.3.1.3. Kafeik Asit.....	12
2.4. Fenoliklerin Antioksidan Özellikleri.....	12
2.5. Oksitadif Hasar ve Oksidatif Hasar Oluşturan Maddeler.....	13
2.6. Kanser Terapi İlaçları.....	16
2.6.1. Cisplatin.....	18
2.7. Tez çalışmasının amacı ve hipotez.....	19
2.8. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri.....	19
2.8.1. Genotoksisite Test Yöntemleri.....	19
2.8.1.1. Tek Hücre Jel Elektrophorez “KOMET” Testi.....	20
2.8.1.2. Mikronükleus Testi.....	21
2.8.1.3. Kromozom Aberasyonu Testi.....	22
2.8.2. Sitotoksisite Test Yöntemleri.....	23
2.8.2.1. XTT Testi.....	23
2.8.2.2. Klonojenik Test.....	24
3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar.....	26
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.3. Hücre Kültürü.....	30
3.4. Çalışma Planı.....	31
3.5. Klonojenik Test.....	32
3.6. XTT Testi.....	33
3.7. Komet Testi.....	34
3.8. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Kinik asidin Beas-2b Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Klonojenik Test ile Belirlenmesi.....	36
4.2. Cisplatinin XTT Testi ile % İnhibisyonunun Belirlenmesi.....	37

4.3.	QA'nın Cisplatinle kombinlendiğinde DNA Hasarı Oluşturma Etkisi, Komet Testi Sonuçları.....	38
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	46
	KAYNAKLAR.....	50
	ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
ml	Mililitre
mg	Miligram
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram / Miliitre
mg/mL	Miligram / Mililitre
mM	Milimolar
XTT	(2,3 Bis-[2-Metoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
H_2O_2	Hidrojen peroksit
M	Molar
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
H_2O	Su
mA	Miliamper
NaCl	Sodyum Klorür
HCl	Hidrojen Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Süperoksit radikali
$\text{OH}^{\bullet-}$	Hidroksil radikali
$\text{NO}^{\bullet-}$	Nitrik oksit radikali
$\text{ROO}^{\bullet-}$	Peroksil radikali
EtBr	Etidyum Bromür
Na_2EDTA	Etilendiamintetraasetik asit Disodyum

Kısaltmalar	Açıklama
ABS	Kromozom aberasyonu testi
ATCC	American Type Culture Collection
Beas-2b	İnsan akciğer sağlıklı epitel hücre hattı
CA	Kafeik asit
CGA	Klorojenik asit
Cspt	Cisplatin
Cyt-B	Sitokalazin-B
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IC50	%50 'lik inhibitör konsantrasyonu
LMA	Düşük yoğunluklu agaroz
MN	Mikro Nükleus
QA	Kinik asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCE	Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi (Komet)
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
SOD	Süperoksit dismutaz
UV	Ultraviyole ışık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Hidroksisinnamatların temel yapısı.....	8
Şekil 2.2.	Kinik asidin moleküler yapısı.....	9
Şekil 2.3.	Klorojenik asidin moleküler yapısı.....	11
Şekil 2.4.	Kafeik asidin moleküler yapısı.....	12
Şekil 2.5.	8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)'in moleküler yapısı.....	14
Şekil 2.6.	Oksidatif hasar tamir yolağı BER.....	15
Şekil 2.7.	Hücre döngüsünde anti-mitotiklerin varlığı ile mitozun önlenmesi.....	18
Şekil 2.8.	Cisplatinin moleküler yapısı.....	19
Şekil 2.9.	Komet testinde sağa doğru artan nükleer DNA hasarları.....	20
Şekil 2.10.	Komet yönteminin aşamaları.....	21
Şekil 2.11.	Mikronukleus (MN) yönteminin aşamaları.....	22
Şekil 2.12.	Süperoksitin XTT/MTT'yi azaltması.....	23
Şekil 2.13.	Tümör hücrelerinde klonojenik testin aşamaları.....	24
Şekil 4.1.	Çeşitli konsantrasyonlarda QA'ya maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları.....	36
Şekil 4.2.	Çeşitli konsantrasyonlarda cisplatin'e maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde XTT testi ile belirlenen % canlılık oranları.....	37
Şekil 4.3.	komet testinden elde edilen mikroskopik görüntüler (20X). a) Kontrol b) 5 µM kinik asit c) 9,5 µM Cspt d) 9,5 µM Cspt + 10 µM kinik asit e) 19 µM Cspt f) 19 µM Cspt + 10 µM kinik asit.....	39
Şekil 4.4.	Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile kuyruk uzunluğu (µM) değerleri.....	41
Şekil 4.5.	Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile kuyruk % DNA değerleri.....	42
Şekil 4.6.	Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile olive kuyruk momentleri değerleri.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı fenolik bileşikler.....	5
Çizelge 2.2. Bazı kemoterapi ajanlarının etki mekanizmaları.....	17
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan cihazlar.....	26
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	27
Çizelge 3.3. Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları.....	31
Çizelge 3.4. Klonojenik testinde kullanılan QA dozları.....	31
Çizelge 3.5. XTT testinde kullanılan cisplatin dozları.....	32
Çizelge 4.1. QA'nın tek başına ve cisplatinle kombine dozları.....	38
Çizelge 4.2. Komet Testinde elde edilen ortalama değerler.....	40

1. GİRİŞ

Kinik asit meyve, kahve, kakao çekirdeği, şarap ve kına kına bitkilerinde gözlenen ve doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Kinik asit, klorojenik asit hidrolizi ile sentetik olarak oluşturulabilir (Çinkılıç ve ark. 2013). Polifenolik bileşikler, çok sayıda bitki türünde bulunan sekonder bitki metabolitleridir. Polifenoller arasında, klorojenik asit (CGA) önemli bir fenolik asittir ve bu asitin hidrolizi ile kafeik asit (CA) ve kinik asit (QA) oluşur (Suryaprakash ve ark. 2000). Cisplatin ise göğüs, yumurtalık, testis, akciğer kanserlerinde, kolorektal ve nöroblastomda yaygın olarak kullanılan bir kanser kemoterapi ilacıdır. Cisplatinin baskın olumsuz etkileri ise; ototoksisite, bulantı, kusma, nöropati ve nefropatidir. Cisplatin, hücresel yan etkilere ve nefrotoksisiteye sebep olan çeşitli hücre sinyal yolları aktivasyonunu, mitokondriyal disfonksiyon, sodyum-potasyum ATPaz inhibisyonu, oksidatif stres, apoptoz ve nekrozu içeren çeşitli biyokimyasal mekanizmaları içermektedir (Valentovic ve ark. 2013).

Çalışmamızda bitkisel fenolik bileşik olan kinik asitin sitotoksik/genotoksik etkilerine bakılmış, DNA hasarı yaptığı ve apoptotik etkisi olduğu bilinen bir ajan olan cisplatinle muamelesinde olası antijenotoksik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada elde edilen bulgularda kinik asidin kanser hücrelerine karşı, selektif bir sitotoksik aktivitesi olduğu gösterilmektedir. NCI-H23 hücrelerinin, kinik aside diğer hücre hatlarından daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu tür kurkumin, resveratrol ve kateşin gibi güçlü antioksidan bileşiklerinin, tümör baskılayıcı ve sitotoksiteyi attırıcı ajanlar olduğu gözlenmiştir (Ooi ve ark. 2011).

Kahvedeki önemli bileşenlerin potansiyel genotoksik ve mutajenik etkileri incelenmiştir. Kafeinin mutajenitesi, alifatik dikarboniller gibi kimyasal olarak reaktif bileşenlere bağlanmıştır. Kavrurma işlemi sırasında oluşan son bileşiklerin, özellikle bakteriler için mutajenik ancak memeli hücreleri için daha az mutajenik olduğu gözlenmiştir. Fenolik bileşikler mutajenik değil aksine antikanserojendir ancak yüksek sıcaklıkta kahve çekirdeklerinin kavrulmasında mutajenik heterosiklik aminler üretilir. Kahve ve kafeinin yüksek dozlarda alımında insanlarda mutajenik etkiler gözlenebilirken, orta düzeyde tüketimde mutajenik aktivite yok denecek kadar az olmaktadır (Nehlig ve Debry 1994).

Antitümör ajanları, plazma membranı ile etkileşerek hücre çoğalmasını inhibe ederler. Bunlar büyüme faktörü antagonistleri, büyüme faktörü reseptör blokerleri olarak hareket ederler. Mitojenik sinyal transdüksiyonunu engelledikleri ya da doğrudan sitotoksik etkiler gösterdikleri gözlenmiştir. Son olarak, antrasiklinler, platin kompleksleri ve alkile edici ajanlar da dahil olmak üzere DNA-hedefli ilaçları temsil ettiği düşünülen antitümör ajanlar, zar hasarlarının ortaya çıkmasına neden olur. Bu ilaçların anti-tümör aktivitesine katkıları tartışılmıştır (Grunicke ve Hofmann 1992).

Cisplatin testis kanseri, yumurtalık germ hücreli tümörler, rahim ağzı kanseri, habis melanom ve adrenokortikal karsinom da dâhil olmak üzere çeşitli tümörlerin yönetiminde kullanılan en etkili kemoterapötik ajanlardan biridir. Tedavi edici etkinliği, doza bağımlıdır. Cisplatinin başlıca yan etkileri, akut böbrek hasarı ve böbrek yetmezliğine yol açan nefrotoksisiteyi içermesidir. Cisplatin, doza bağımlı bir şekilde hücre ölümlerine neden olmuştur. Cisplatinin 180 µg/ml dozunda, Vero hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği gözlenmiştir (Rjiba-Touati ve ark. 2013).

Çalışmamızda kinik asidin, Beas-2b sağlıklı insan akciğer epitel hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik ve genotoksik etkileri tek başına ve sitotoksik ve genotoksik etkisi bilinen bir ilaç olan cisplatinle birlikte olası antigenotoksik etkisi, canlılık testleri ve komet testi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolikler bileşikler, bitki gelişiminde büyük bir öneme sahip olan ve yüksek bitkilerin tüm dokularında bulunan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Ayrıca fenolik bileşikler, çiçek pigmentleri olarak, istilacı organizmalara karşı koruyucu maddeler olarak, sinyal molekülleri olarak, hücre ve bitki gelişimini etkileme açısından, böcek ilacı olarak da işlev görebilir. Fenolik bileşiklerin sentezi ve salınması, çeşitli biyotik ve abiyotik faktörler tarafından uyarılmayla gerçekleşir (Makoi ve Ndakidemi 2007).

Fenolik bileşikler, tüm bitkilerde bulunan tanınmış fitokimyasallardır. Fenoliklerin zengin kaynakları olan bitkisel besinler, kalp hastalığını önlemek için antioksidan olarak hareket eden, inflamasyonu azaltan, kanser ve diyabet insidansını düşüren hem de insan hücrelerinde mutagenез oranlarını azaltabilen moleküllerdir. Meyve, sebze ve baklagiller gibi bitki ürünlerinin tüketimi ile sağlanan koruma daha çok fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkilidir (Khoddami ve ark. 2013).

Fenolik bileşikler, bitkilerin ve meyve ağaçlarının metabolizma komplekslerinde önemli bir role sahiptir. Bu bileşikler meyve ağaçlarının büyümesi, gelişmesi ve meyvelerin hasat süreleri dahil olmak üzere bir çok fizyolojik süreci etkiler. Gıdalarda bulunan temel fenolik bileşik kompozisyonları, insan beslenmesi üzerinde de oldukça etkilidir (Stampar ve ark. 2006).

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler:

- İnsan sağlığı açısından işlevleri,
- Tat ve koku oluşumundaki etkileri,
- Renk oluşumu ve değişimine katılmaları,
- Antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri,
- Fenoloksidaz enzimlerinin etkisiyle enzimatik renk esmerleşmelerine neden olmaları,
- Çeşitli gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi pek çok açıdan önem taşımaktadırlar.

İkincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Nizamlioğlu ve Nas 2010). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir. Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler. Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir. Fenolik bileşiklere, beslenme fiziolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyo flavonoid" adı da verilmektedir (Nizamlioğlu ve Nas 2010).

Fenolik bileşikler, pentoz fosfat, şikimat ve bitkilerde fenilpropanoidlerden türevlenen ikincil metabolitlerdir. Fenolik bileşikler, meyve ve sebzelerin renk ve duyuşal özelliklerine katkıda bulunmanın yanında patojenlere ve yırtıcı hayvanlara karşı koruma sağlayan, büyüme ve üremede önemli bir rol oynayan yapıya sahiptir. Fenolik bileşikler, anti-alerjik, anti-aterojenik, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-trombotik, kalp ve damar genişletici etkileri gibi geniş bir yelpazede fiziolojik özellikler sergiler (Balasundram ve ark.2006).

Fenolik bileşikler, şarap, çay ve kahve gibi bitkisel kökenli içecekler ile meyve, sebze, tahıl ve baklagiller gibi sık tüketilen bitkisel gıdalarda geniş bir yelpazede yer alan yüksek bitkilerin her yerinde bulunan bileşenleridir. Bu bileşikler, genellikle patojenlerin ultraviyole radyasyon veya saldırganlığa karşı savunma aracı olarak bitkilerin ikincil metabolitleri olarak bulunmaktadır. Bu bileşiklerin çoğunun, insan kronik dejeneratif hastalıklara (kataraktlar, maküler dejenerasyon, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet mellitus) karşı potansiyel koruyucu etkisi vardır (Scalbert ve ark. 2005, Farah ve Donangelo 2006).

Fenolik bileşikler, bitkisel gıdalarda görülen biyoaktif maddelerdir. Fenolik bileşikler, taze ve işlenmiş bitkisel gıdalarının besin kalitesi ile yakından ilişkilidir. Polifenoloksidaz ile katalize edilen (enzimatik esmerleşme reaksiyonu) fenolik bileşikler, meyve ve sebzelerde istenmeyen renk, lezzet ve besin kaybı oluşmasına neden olabilir. Bitkilerde gözlenen birçok fenolik bileşik, doğal antioksidan kaynaklarıdır. Birçok gıdada görülen fenolik bileşiklerin, mutasyon ve karsinogenez üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Ho 1992).

Fenolik bileşiklerin büyük bir çoğunluğu (Çizelge 2.1), bitkisel gıdalardan meydana gelen polifenoller olarak adlandırılır (Scalbert ve Williamson 2000). Bitkiler için savunma ajanı olan polifenollerin, insanlar tarafından tüketildiğinde de yararlı olacağı düşünülmektedir. Bu bileşikler insanlarda aynı antioksidan özellikleri sunabilir. Ayrıca bileşikler, vücut hücrelerini koruyarak, vücutta serbest radikal hasarını önlemek için çalışır (Anonim 2013a).

Çizelge 2.1. Bazı fenolik bileşikler

Fenolik Bileşikler	
Catechol	Vanilin
Salicylic acid	Cinnamic acid
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Gentisic acid
Syringic acid	<i>p</i> -Coumaric acid
Gallic acid	<i>t</i> -Ferulic acid
Caffeic acid	Chlorogenic acid
Quinic acid	Quercetine
Ferulic acid	Kaempfeol
Catechin	Rutin

Bitkilerde fenolik bileşikler; bitkilerde temel fizyolojik ihtiyaçları karşılar, onları ultraviyole radyasyon, patojen ve predatörlerden (avcılardan) korur, renk ve lezzetine katkı sağladığı gibi onların büyüme ve üremesini de kolaylaştırır (Frank 2004). Yüksek düzeyde fenolik bileşik içeren çoğu gıdalar ve içeceklerde, fenolik bileşikler genellikle renk, tat, burukluk gibi onların duyuşal özelliklerini sağlar (Williamson ve ark. 2000).

Fenolik bileşiklerin temel yapısal özellikleri, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan bir aromatik halkadan oluşur (Chirinos ve ark. 2009). Bu yapısal çeşitliliğe rağmen, bu bileşik grupları polifenoller olarak adlandırılır. Doğal olarak oluşan fenolik bileşikler, mono-ve polisakaritler ile konjugatları olarak bulunur ve fenolik gruplarının bir ya da daha fazlasına bağlı olarak esterleri ve metil esterleri gibi fonksiyonel türevlerini ortaya çıkarabilir (Balasundram ve ark. 2006).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Bitki fenolik bileşikleri, moleküldeki fenol sayısına göre basit fenoller veya polifenoller olarak sınıflandırılır. Doğal polifenoller; fenolik asitler ve türevleri, flavonoidler, lignanlar, stilbenler, tanenler ve ligninler olarak sınıflandırılır. Bitki fenolik bileşikleri de; basit fenoller, kumarinler, ligninler, lignanlar, yoğunlaştırılmış ve hidrolize edilebilir tanenler, fenolik asitler ve flavonoidler içerir (Shahidi ve Naczki 2003, Soto-Vaca ve ark. 2012).

Fenolik asitler, özellikle üzüm gibi meyvelerin tohumlarında ve derilerinde bulunur. Sebzeler için, fenolik asitlerin en yüksek konsantrasyonları, yapraklarda bulunmaktadır. Bu meyve ve sebzeleri yediğimizde, fenolik asitler bağırsak sisteminde emilerek alınır. (Anonim 2013a).

Fenolik asitler bitkiler âlemi içinde, diğer temel fenolik sınıflar ve esterleri, glikozitler veya amidler şeklinde görülür ancak nadiren serbest formda da gözlenebilir. Fenolik asitler; aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ve konumuna göre farklılaşır (Pereira ve ark. 2009).

Fenolik asitlerin iki temel yapısı vardır; hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asit'tir. Hidroksibenzoik asit türevleri gallik, vanilik, protokateşik ve siringik asit içerirken, hidroksisinnamik asit türevleri ferülik, kafeik, p-kumarik ve sinapik asit içerir. Fenolik bileşiklerin diğer bir önemli sınıfı ise, hücre duvarı fenolikleridir. Bunlar, çözünebilir ve hücre bileşenlerinin diğer türleri ile kompleks halinde bulunabilirler. Hücre duvarı fenoliklerinin iki ana grubu, ligninler ve hidroksisinnamik asitlerdir (Baucher ve ark. 1998, Vanholme ve ark. 2010).

Fenolik asit bileşikleri, bitkilerde çok fazla görülmüştür. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda kahvede, elmada, turunçgil meyvelerinde ve sularında ve tahılların kepeğinde bulunur (Clifford 2000).

2.3. Sinamatlar

Sinamik asitin tuzu ya da esteri olan sinamatlar, beyaz kristalli bir organik asittir ve su içinde az çözünür. Sinamatlar etilheksil metoksisinamat, isoamil p-metoksisinamat ve benzil sinamat gibi çeşitli formlarda görülür. Sinamik asit fenilalanin'den türevlenir ve

en iyi şekilde, koku ve tat veren tarçın yağı bileşiği olarak bilinir. Sinnamik asit'in antibakteriyel, antifungal ve parazitle mücadeleye karşı yeteneği vardır. Etilheksil metoksisinamat, suda çözünmez ve güneş kremleri ve güneş koruması sağlayan makyaj ürünlerinde yaygın olarak gözlenir. Benzer şekilde, izoamil p-metoksisinamat, UV ışığını absorbe edebilen bir organik bileşiktir. UV ışınlarını absorbe etmesiyle, cilt kanseriyle, cildin erken yaşlanmasını önlemeye yardımcı olabilir. Benzil sinnamat, tarçın kokusu veren, katı veya kristal bir maddedir. Bu madde, güzellik sektöründe koku olarak kolonya ve saç bakım ürünlerine eklenir (Anonim 2013b).

Sinnamatlar (kafeik asit: kahvede, yaban mersininde, elmada, elma şarabında, p-kumarik asit: Ispanakta, pancar liflerinde, tahıl kepeğinde, ferulik asit: kahvede, narenciye sularında, şeker pancarı liflerinde, tahıl kepeğinde; sinapik asit: Brokolide, lahanada, diğer yapraklı brassica türleri ve narenciye sularında) ile klasik klorojenik asitler ve ona yakın türevleri (Konjugeler: kafeoilkinik asitler: kahvede, yaban mersininde, elmada, elma şarabında, p-coumaroylquinic asitleri: kirazda; feruloilkinik asitleri: kahvede; tartarik konjugeler: ıspanak, marul, üzüm ve şarapta; malik konjugeler: marul, ıspanak, baklagillerde; rosmarinik asit: mutfakta kullanılan yeşilliklerde, karışık otlarda, dolma biberde; hücre duvarı konjugeler: ıspanak, şeker pancarı lifi, tahıl kepeğinde) yiyeceklerde ve içeceklerde meydana gelir (Clifford 1999).

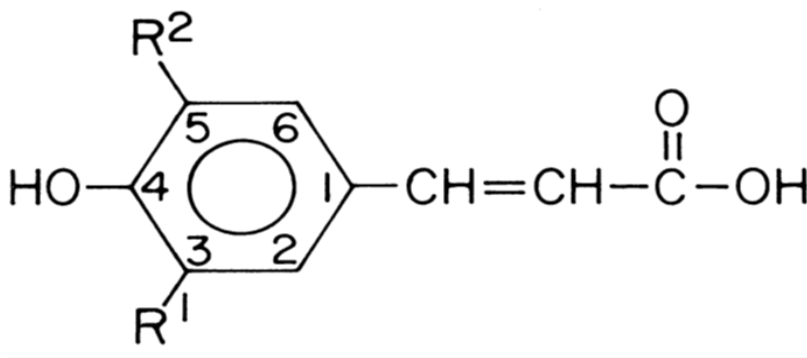
Sinnamatlar ve flavonoidler, bitki hücre duvarında önemli rol oynarlar ve yaygın olarak bitkiler tarafından sentezlenen fenolik sekonder metabolitler olarak bilinir. UV ışınlarına karşı savunmada rol oynadıkları gibi, patojen girişine karşı koruma ve yaralanmalarda da tamir olayına katılmaktadır (Williamson ve ark. 2000).

2.3.1.Hidroksisinnamatlar

Hidroksisinnamik asit, sinamik asit türevi olan fenolik asitlerin bir sınıfıdır. Bu bileşikler aslında birçok yiyecekte bulunan ve hidroksibenzoik asitlere göre daha sık görülen bileşiklerdir. Gıdalarda bulunanlar; kafeik asit, cichoric asit, sinamik asit, klorojenik asit, caftaric asit, coutaric asit, fertaric asit, diferulic asit, kumarik asit, kumarin, ferulik asit ve sinapinik asittir. Bu bileşiklerin bazıları turunçgiller, alove, alıç, üzüm, armut, enginar, kekik, fesleğen, elma, çilek, kahve, ananas, ayçiçeği, ekinezya,

yaban mersini, mısır, pirinç, yulaf, mantar ve fıstık gibi gıdalarda bulunabilir (Anonim 2013a).

Hidroksisinnamatların temel yapısı Şekil 2.1' de gösterilmektedir. Fenolik bileşiklerin çoğunda olduğu gibi, fenil halkası hidroksi veya metoksi gruplarına sahip olabilir. Böylece temel sinamat; p-kumarik, kafeik, ferulik veya sinapik asit olabilir. Genel olarak asitler, serbest halde oluşmaz, bunun yerine esterleştirilir. En yaygın ester gruplarından biri kinik asittir. Ancak sinamatlar tartarik asit, glukoz, gliserol ve hidroksi yağ asitleri gibi diğer bileşiklerine esterlenebilir (Nagel 1985).



Şekil 2.1. Hidroksisinnamatların temel yapısı. R¹,R²=H, p-kumarik asit; R¹=OH, R²=H, kafeik asit; R¹=OCH₃, R²=H, ferulik asit; R¹,R²=OCH₃, sinapik asit (Nagel 1985).

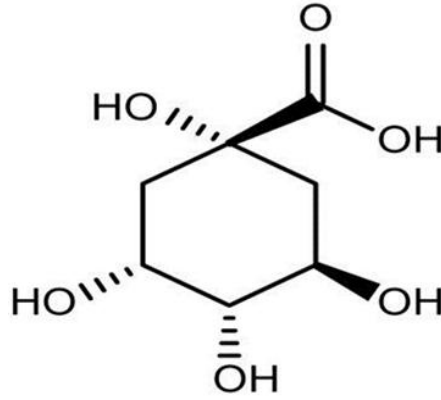
Hidroksisinnamik asitler ve bunların türevleri, neredeyse tamamen p-kumarik, kafeik ve ferulik asitten elde edilirken, nadiren sinapik asitten elde edilir (Herrmann 1989). Hidroksisinnamik asitler, genellikle glikozit, ester gibi çeşitli konjüge biçimlerde meydana gelir (Eskin 1990).

Kinik asit de, hidroksisinnamik asitin esteridir (Möller ve Herrmann 1982).

2.3.1.1. Kinik Asit

Kinik asit cyclitol, bir siklik poliol ve bir sikloheksan karboksilik asitten oluşur (Şekil 2.2). Kinik asit, kınakına ağacı kabuğundan, kahve çekirdekleri ve diğer bitki ürünlerinden elde edilen ve klorojenik asitin hidrolizi ile oluşan sentetik kristalli bir asittir. Kinik asit, suda çözünür ve büyük renksiz prizmalar olarak kristalize olur. Kinik asit, yeni ilaçların sentezi için çok yönlü bir başlangıç malzemesidir. Tamiflu adı verilen

ilaçta, influenza (grip) virüsünün A ve B tiplerinin tedavisi için bir ilaç olarak başarılı bir şekilde geliştirilmiş ve piyasaya arz edilmiştir (Anonim 2013d).



Şekil 2.2. Kinik asidin moleküler yapısı (Shih ve Gao 2013).

Kinik asit, kavrulmuş kahve içinde bulunan baskın asitlerden biridir. Hatta serbest kinik asit, yeşil kahve çekirdeklerinde bulunur. Çoğu da klorojenik asit gibi kinik asit esterlerinin indirgenmesi ile oluşur (Scholz ve Maier 1990).

50 yılı aşkın süredir kinik asit ve hippürik asitin herhangi bir biyolojik etkinliğe sahip olmadığına inanılırdı. Yapılan çalışmalarda kinik asitin, gastrointestinal sistemdeki (GI) nikotinamid ve triptofan sentezinde besinsel destek sağladığı görüldü (Pero ve ark. 2009).

Uzmanlar, ağız yoluyla alınan kinik asitin hippürik asite dönüşümünü kobaylarda gözlemlemişlerdir. İnsanlarda ve köpeklerde düşük miktarlarda dönüşüm gözlenirken, koyunlarda yüksek miktarlarda dönüşüm gözlenmiştir (Adamson ve ark. 1970).

Aster scaber bitkisinden elde edilen kinik asidin koruyucu etkileri Tetrahydropapaveroline (THP) kaynaklı sitotoksositeye karşı sıçan C₆ glioma hücrelerinde değerlendirilmiştir. Bu esnada test edilen 4 farklı kinik asit türevinden 4,5-dicaffeoyl quinic acid, THP-kaynaklı sitotoksositeye karşı yüksek koruyucu etki göstermiştir. THP ile tedavi edilen C₆ hücrelerinde, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri ile hayatta kalma oranlarında azalma gözlenirken, malondialdehit ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Birlikte ele alındığında, sonuçlar 4,5-dicaffeoyl quinic acid'in oksidatif strese bağlı hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için potansiyel bir ajan olabileceğini göstermektedir (Soh ve ark. 2003).

Son zamanlarda, *Aster scaber*'den elde edilen kinik asit türevleri ve monoterpen glikozitlerinin yapıları ve biyolojik faaliyetleri araştırılmaktadır. Kinik asit türevleri, insanda bağışıklık sisteminin yetersizliği sonucu görülen virüs-1 integrasyonu inhibe etmiştir. Ayrıca kinik asit türevleri, PC₁₂ hücrelerinde β -amiloid peptid ve nörotropik aktiviteye karşı nöroprotektif etki göstermiştir (Soh ve ark. 2003).

Zeng ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmalar sonucunda kinik asidin antiinflamatuvar özelliğinin olduğu bulunmuştur. Kinik asidin bu özelliği, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) isimli pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörünün inhibisyon mekanizması ile gerçekleşir (Zorlu 2010).

Elephantopus mollis bitkisinden elde edilen özüt, geleneksel kanser ve diyabet de dâhil olmak üzere çeşitli serbest radikal aracılı hastalıkları tedavi etmek için tüketilmektedir. *Elephantopus mollis* bitkisinden izole edilen çok etkili bir antioksidan bileşiğinin, aynı zamanda anti-kanser ve anti-diyabetik olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmada özütün antioksidan içeriğinde, 3,4-di-O-kafeoil kinik asidin büyük bir rol oynadığını göstermektedir (Ooi ve ark. 2011).

Kafeik asit ve 5 kafeoil kinik asit, doğal olarak meydana gelebilen fenolik bileşiklerdir ve bitkilerde kinik asit esteri olarak bulunabilir. Bitkilerde 5-kafeoil kinik asit, kinik asitin 5 hidroksil grubu ile kafeik asitin karboksil grubu arasında ester bağı oluşması yoluyla üretilir. Kafeik asit ve 5-kafeoil kinik asitin; iltihap, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi kronik hastalıkların riskini azalttığı bu çalışmada belirlenmiştir (Park 2009).

Yapılan çalışmalarda 3,4-di-O-kafeoil kinik asitin, oksidatif stresle ilişkilendirilen nörodejeneratif hastalıkları tedavi etmek veya önlemek için bir potansiyel tedavi edici ajan olacağı düşünülmüştür (Kim ve ark. 2005).

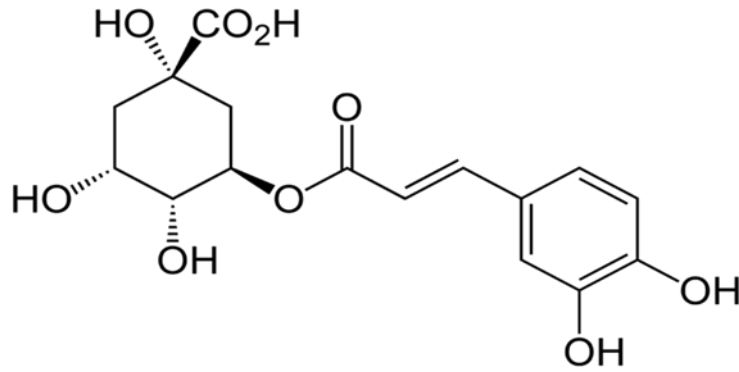
Phagnalon rupestre (Asteraceae)'den izole edilen kinik asit'in kafeoil konjugatları ile karboksi-metil formları, sıçan karaciğer mikrozomlarında lipid peroksidasyonu üzerine inhibitör aktivite göstermiştir (Góngora ve ark. 2003).

Beş yeni kinik asit türevleri ve bunların bilinen iki 3-O-feruloilkinik asitleri, *Scorzonera divaricata* köklerinden izole edilmiştir. Bunlar; (-)-1,4-di-O-feruloyl-3-O-dihydrocaffeoylquinic asit, (-)-1-O-feruloyl-4-O-dihydrocaffeoylquinic asit, (-)-3, 5-di-

O-feruloilkinik asit, (-)-1-O-feruloyl-3-O-dihidro-kafeoilkinik asit ve (-)-1-O-feruloyl-5-O-dihydrocaffeoylquinic asit'tir. Üç kinik asit türevleri güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. (-)-1,4-Di-O-feruloyl-3-O-dihydrocaffeoylquinic asit ise, Hep-G2 hücre hatlarına karşı orta derecede aktivite göstermiştir (Yang ve ark. 2013).

2.3.1.2. Klorojenik Asit

Klorojenik asit, kahve çekirdekleri içinde yüksek seviyelerde bulunan kafeik asidin bir kinik asit konjugatıdır (Şekil 2.3). Kahvede yeşil çayda, elma, armut, çilek, domates ve yaban mersini gibi meyvelerde bulunur. Yeşil kahve ekstresi insanlarda kan basıncını azalttığı gösterilmiştir ve bu etkiye ferulik asit metaboliti, vazoreaktivite ve genel kan basıncını düşürücü yeteneğini artırarak katkıda bulunmuştur. Klorojenik asit ve kahve (kafeinli ve kafeinsiz her ikisi de) Hidrojen Peroksit (H₂O₂) kaynaklı strese karşı nöronlarda bir anti-oksidan olarak hareket edebilmektedir. Kahvenin, parkinson hastalığına karşı koruma ile bağlantılı olduğu bilinmektedir ve bu durumun kafein içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir. In vivo çalışmalarda, kahvede bulunan klorojenik asitin diyabet riskini azalttığı ve glukoz toleransını artırdığı gözlenmiştir (Anonim 2013e).



Şekil 2.3. Klorojenik asidin moleküler yapısı (Zeiger 1998).

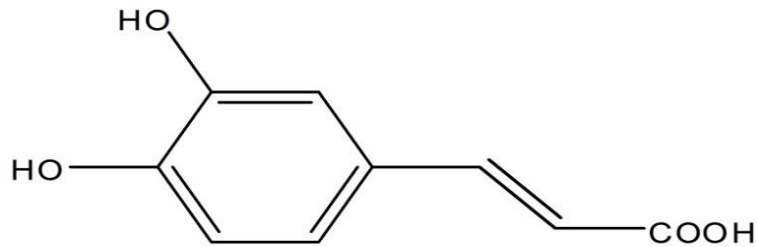
Klorojenik asit ve kahvenin retinal dejenerasyona karşı koruyucu etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. Klorojenik asit ile ön-muamele edildiğinde, konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre ölümünü önemli ölçüde zayıflattığı gözlenmiştir. Ayrıca, kahve ekstresi apoptotik proteinlerin düzenlenişini önleyebilir. Klorojenik asit ve kahve ekstresi Thy-1'in (yüzey glikoproteini) baskılanmasını önleyerek, hücre ölümünü azaltır. Kahvede

bulunan ana bileşen CGA, önemli ölçüde hipoksi kaynaklı retina hücrelerinin apoptozunu azalttığını göstermiştir ve bu kahve tüketimi, retina dejenerasyonunun önlenmesine yardımcı olabilir (Jang ve ark. 2013).

Klorojenik asit polifenollerin en bol bulunan, çeşitli fizyolojik özelliklere sahip çeşididir. Klorojenik asitin, akut inflamatuvar ağrı üzerindeki antinosiseptif etkisi olduğu bildirilmesine karşın, az da olsa nöropatik ağrılar üzerinde de etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda, klorojenik asidin, nöropatik ağrılar için yeni tedavi yönteminde yararlı olacağı bulunmuştur (Hara ve ark. 2013).

2.3.1.3. Kafeik Asit

Kafeik asit, hidroksisinasamik asit olarak sınıflandırılan organik bir bileşiktir (Şekil 2.4). Bu fenolik gruplarda oluşan, sarı bir katıdır. Kafeik asit, tüm bitkilerde bulunur çünkü biyokütlenin başlıca kaynaklarından biri olarak lignin biyosentezinde anahtar bir ara maddedir. Kafeik asit kahvede bulunur. Bu, argan yağı içinde bulunan ana doğal fenollerin biridir. Ayrıca, arpada da bulunur. Kafein ile ilişkisiz olan kafeik asit, kinik esterleri olan coumaroyl esterinin hidroksilasyonu ile sentezlenir. Bu hidroksilasyon, klorojenik asidi dönüştürür ve şikimik asitin esterleri, kafeik asit elde edilir. Kafeik asidin, oksidatif mekanizma ile kanser hücresi çoğalması üzerinde inhibitör etkisi vardır (Anonim 2013d).



Şekil 2.4. Kafeik asidin moleküler yapısı (Zeiger 1998).

2.4. Fenoliklerin Antioksidan Özellikleri

Gıda biyoaktif bileşenleri olarak fitokimyasallar, çok ilgi çekici bulunmaktadır. Son çalışmalar, bitkilerden türetilen birçok besin polifenolik bileşenlerinin, vitamin E veya

C'den (in vitro) daha etkin antioksidanlar olduğunu göstermiştir (Rice-Evans ve ark. 1997).

Yapılan bir çalışmada, kan lipid konsantrasyonları ve antioksidan enzim aktiviteleri ve morfolojik değişiklikler içeren, beyaz ginseng bileşiklerinin etkisi, yüksek kolesterol diyeti ile indüklenen hiperkolesterolemisi olan tavşanlarda araştırılmıştır. Beyaz ginsenglerde bulunan düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin, yüksek kolesterol diyeti ile uyarılan Yeni Zelanda tavşanlarında, hiperlipidemi ve aterosklerozun iyileştirilmesi için kısmen etkili olduğu gözlenmiştir (Lee ve ark. 2013).

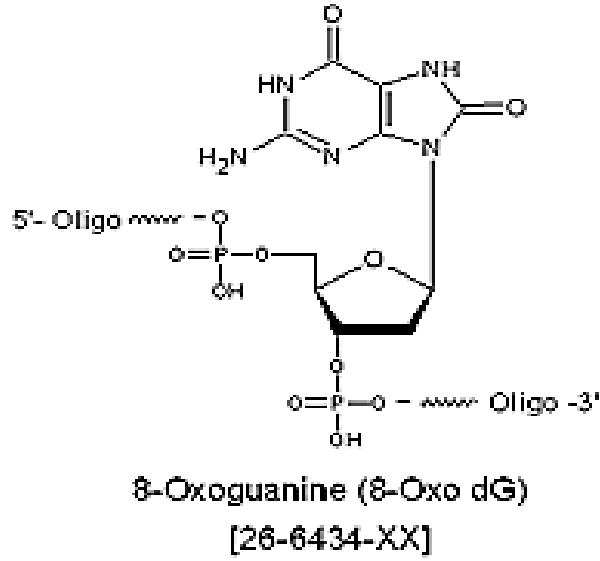
Kırmızı şarapta bulunan flavonoidler (antosiyantinler, kateşinler) ve non-flavonoidler (stilbenler) *Vitis vinifera* hücre süspansiyonlarından izole edilerek kullanılmıştır. Uzun bir süre boyunca orta içimde kırmızı şarap içenlerde fenolik bileşikler (stilbenler, kateşinler, antosiyantinler) in koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği gözlenmiştir (Fauconneau ve ark. 1997).

Çalışmalar biberiye, kekik, adaçayı ve *Labiatae* ailesine ait diğerler bileşiklerin de, antioksidan özellikler sergilediklerini göstermektedir. Bazı araştırmacıların rapor ettiği diğer türler, örneğin karanfil, tarçın ve kişniş de antioksidan özellikleri gösterirler. *Umbelliferae* familyasında gözlenen kimyon, kişniş ve biber gibi çeşitli baharatların güçlü antioksidan etkisi sergilediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, flavonoidler ve fenolik asitler açısından zengin bitkilerin, doğal antioksidanların iyi bir kaynağı olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, baharatlardaki fenoliklerin kalitatif ve kantitatif analizi, toplam antioksidan kapasitesi ve türlerin toplam fenolik içeriği arasındaki ilişkiyi açıklamak için yararlı olabilir. Toplam fenolik ve antioksidan aktivitesi arasında pozitif ve anlamlı bir korelasyon ortaya çıkmıştır. Seçilen 32 tane Polonya bitkisinden özellikle *Labiatae* familyasına ait bazı bitkilerde, mükemmel serbest radikal süpürücü ve güçlü bir doğal fenolik antioksidan özelliği gösterdiği gözlenmiştir (Wojdyło ve ark. 2007).

2.5. Oksidatif Hasar ve Oksidatif Hasar Oluşturan Maddeler

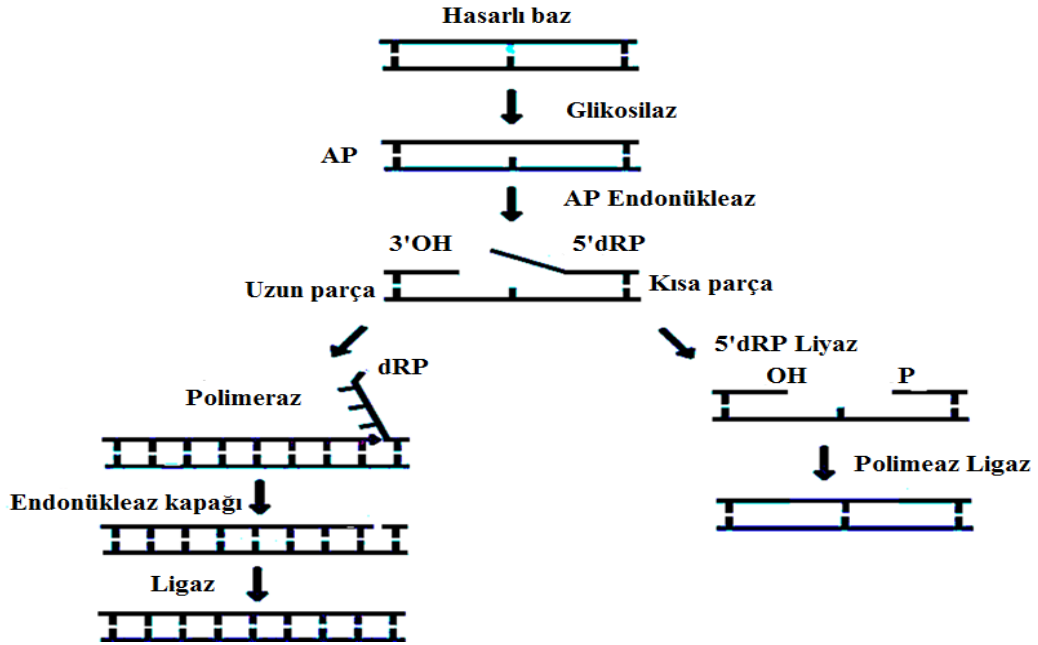
Oksidatif hasar, serbest oksijen radikalleri içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumundan kaynaklanan hücrel metabolizmanın doğal bir sonucudur. Bununla birlikte hasarın seviyesi, çeşitli fiziksel ya da kimyasal maruziyetten kaynaklanan

oksidatif stres koşulları altında artabilmektedir. Oksidatif hasar kanser, kalp damar hastalıkları ve yaşlanmanın geliştirilmesinde rol oynayan patolojik süreçlere yol açabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS), DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar. Bu hasara uğrayan bazlar arasında, oksidatif DNA hasarının belirleyicisi olarak 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) (Şekil 2.5) üzerinde önemle durulmuştur (Atmaca ve Aksoy 2009, Zaremba ve Oliński 2010).



Şekil 2.5. 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG)'in moleküler yapısı.

Genomun bütünlüğünü sürdürmek yaşam için gereklidir. Bununla birlikte, nükleik asitlerden özellikle de DNA, fiziksel ve kimyasal ajanlardan zarar görmeye yatkındır. Bu zararlar arasında oksidatif lezyonlar, aerobik hücrelerde metabolizma tarafından oksidanların üretiminde, bazı modifikasyon tiplerinde gözlenmiştir. Oksidatif hasar öncelikle baz eksizyon tamir (BER) yolağı (Şekil 2.6) ile tamir edilir. Bu durum, sıralı şekilde enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleştirilir (Souza-Pinto 2013).



Şekil 2.6. Oksidatif hasar tamir yolağı BER.

Geniş bir yelpazedeki organik bileşiklerin (DNA, protein, karbohidratlar ve lipidler) yapısal hasarı, oksidatif reaksiyonların sonucu olarak ortaya çıkabilir. Reaktif oksijen türlerinin açtığı oksidatif hasar "oksidatif stres" olarak ta bilinir. Biyolojik sistemler, güçlü enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri içerir ve oksidatif stres oksidan/antioksidan dengesinde bir kayma gösterir. İnflamasyon, kanser, yaşlanma, radyasyon hasarı ve fotobiyolojik etkiler gibi çeşitli biyolojik süreçler, reaktif oksijen türleri içermektedir (Sies 1986).

Peroksil radikalleri (ROO^{\cdot}), nitrik oksit radikalleri (NO^{\cdot}), hidroksil radikalleri (OH^{\cdot}) ve süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) gibi serbest radikaller içeren reaktif oksijen türleri (ROS) pek çok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. ROS, oksijen metabolizmasının bir sonucu olarak oksijenli yaşam esnasında oluşan fizyolojik metabolitlerdir. Normal şartlar altında ROS, antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan faktörler gibi antioksidan savunma sistemleri tarafından etkili bir şekilde yok edilir. Bununla birlikte patolojik koşullar altında, ROS'un yok edilmesi ve üretilmesi arasındaki denge kırılabilir, bunun sonucunda biomakromoleküller oksidatif stres kaynaklı ROS'tan zarar görür (Ko ve ark. 2012).

Canlı organizmaların oksidatif denge olarak bilinen hassas dengenin korunmasında, serbest radikaller tarafından üretilen oksidatif hasarı hafifletmek veya onarmak için hazır bir antioksidan savunma sistemi vardır. Bu denge serbest radikal üretiminin lehine kırıldığında, oksidatif stres olarak bilinen bir fizyolojik durum oluşur. Serbest radikallerin, biyolojik sistemlerde ikili bir rol oynadığı bilinmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, ciddi hücre bileşenlerinin oksidatif hasarına sebep olmuştur. Hücresel hasar bir ömür boyunca birikir ve bu değişiklikler kanser gibi, yaşa bağlı hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamıştır. Gerçekten de birçok çalışma, kanser hücreleri ile sağlıklı hücrelerin karşılaştırılmasında artmış bir ROS üretimini göstermektedir. Serbest radikallerin DNA hasarı ve genomik instabilite'ye neden olduğu bilinmektedir (Vera-Ramirez ve ark. 2011).

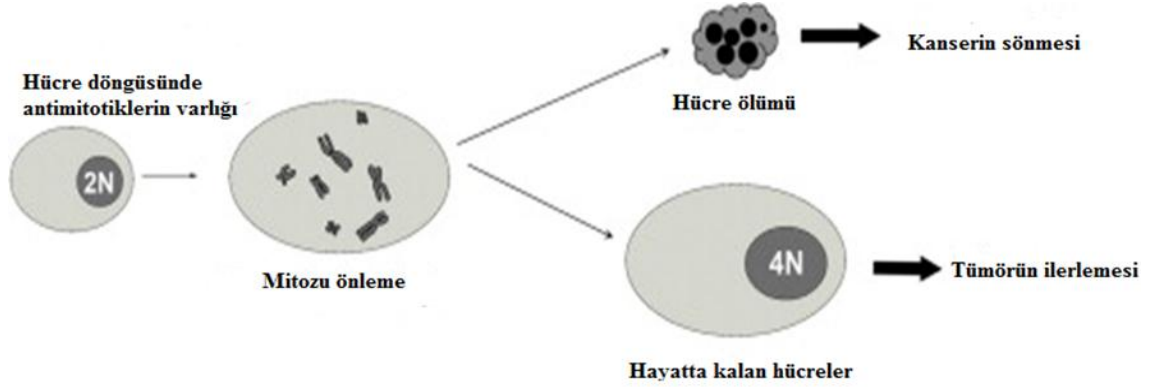
2.6. Kanser Terapi İlaçları

Kanser en tehlikeli hastalıklardan biridir. Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyasyon ve hormon tedavisi gibi farklı yöntemler vardır. Kemoterapi halen kanser tedavisi için en etkili yöntemlerden biridir. Antineoplastik ilaçların kullanımı, yeni genetik bileşimlerin sentezini engelleyerek hücre büyümesini bozar veya DNA'da tedavi edilemeyecek hasarlara neden olur. Bununla birlikte kemoterapinin iki önemli olumsuzluğu vardır; toksisite ve ilaç direnci. Tüm kemoterapötik tedaviler için uygulanan ilaçlar tümör hücrelerini öldürdüğü gibi, aynı zamanda sağlıklı hücreleri de etkiler ve öldürebilir. Bu ilaçların yan etkileri de çok fazladır. Kemoterapi tümör hücre mutasyonuna sebep olabilir. Ayrıca, ilaç direnci geleneksel kemoterapi başarısızlığının en önemli nedenlerinden biridir (Batmani ve Khaloozadeh 2013). Kemoterapi ajanlarının etki mekanizmaları Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Bazı kemoterapi ajanlarının etki mekanizmaları

İLAC	ETKİ MEKANİZMASI
5-Fluorouracil	Anti metabolit, hücre siklusunda pirimidin antagonisti
Ara C (cytaribine)	S fazı sırasında DNA'ya hasar veren anti metabolit
Asparaginase	Lösemi hücre proliferasyonunu önleyen aspartik asit için asparaginin hidroliziyle katalizlenen enzim
BCNU (Carmustine)	Alkilleyici ajan
Bleomycin	DNA'daki tek zincir kırıklarını indükleyen antibiyotik
Busulfan	Alkilleyici ajan
Cisplatin	Alkilleyici ajan
Cyclophosphamide	Alkilleyici ajan, DNA çapraz bağlayıcı nitrojen mustard türevi
Dactinomycin (Actinomycin-D)	DNA ile kompleks biçimde, DNA, RNA, protein sentezini inhibe eden

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha yüksek proliferasyon oranları göstermektedir. Vinka alkaloidler ve taksanlar gibi şu anda kullanılan bazı anti-tümör ilaçları, mikrotübülleri hedefleyerek mitozun engellenmesi için hareket ederler. Son yıllarda farklı mitotik düzenleyiciler (Şekil 2.7), anti-tümör tedaviler için ilaç hedefi olarak önerilmektedir (Marzo ve Naval 2013).



Şekil 2.7. Hücre döngüsünde anti-mitotiklerin varlığı ile mitozun önlenmesi.

Hormonal tedavi ya da immünoterapi kullanıldığı için birkaç kanser türü (örneğin, meme kanseri) hariç sitotoksik ilaçlar, kanser için kemoterapide önemlidir. Sitotoksik ilaçlar, hızla büyüyen ve bölünen hücreler için toksik olmasına rağmen kanser tedavisinin de önemli bileşiklerindedir. Kanser hücrelerinin genellikle hızlı büyümesini ve çoğalmasını önlemek için, kanser hücreleri sitotoksik ilaçlar ile öldürülür (Wong ve ark. 2007).

2.6.1. Cisplatin

Cisplatin (sis-ya da diamminedichloroplatinum CDDP), yaygın olarak zor tümörlere karşı geniş bir yelpazede kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Cisplatin, çoğalan hücreler için son derece zehirlidir. Bu durum, DNA ile yakınlaşmalar oluşturur ve DNA replikasyonu ve mitozu engellemektedir (Sancho-Martínez ve ark. 2012).

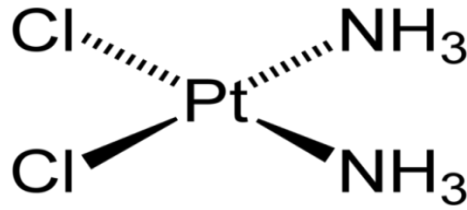
Cisplatin; testis, mesane, akciğer, yemek borusu (özofagus), mide ve yumurtalık kanserlerini tedavi etmek için verilen bir kemoterapi ilacıdır (Anonim 2013c).

Cisplatin kullanımında, alerjik reaksiyon belirtileri olan deri döküntüleri ve kaşıntı, yüksek sıcaklık (ateş), titreme, yüz kızarması, baş dönmesi, baş ağrısı, nefes darlığı, anksiyete ve idrar yapma hissi gözlenebilir (Perry 2007, Sweetman 2011).

Cisplatin, DNA hasar ajanları sınıfındaki anti kanser ajanlarından biridir. Cisplatin aracılı kanser kemoterapisi sırasında, tümör hücresi/konak içinde cisplatinin çok aşamalı etkileri gözlenmiştir. Cisplatinin, antioksidanların ve serbest radikallerin üretiminin

azaltılması gibi önemli yan etkileri vardır. Cisplatin uygulanmasından sonra, DNA hasarıyla sonuçlanan DNA fragmentasyonu, kromozomal kırıklar ve genomik kararsızlığına neden olan mikronükleus oluşmasına neden olabildiği gibi mutajenez, kanser ve apoptotik hücre ölümüne de yol açabilir (Attia ve ark. 2008).

Cisplatin (Şekil 2.8), DNA çift zincirlerine zincir arası ve zincir içi çapraz bağlanır. Bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzer. DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozar. Şekil 2.8'de cisplatinin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Cisplatinin moleküler yapısı (Erkurt ve ark. 2009).

2.7. Tez çalışmasının amacı ve hipotez

Çalışmada DNA ve kromozom hasarı yaptığı iyi bilinen kanser ilacı cisplatinin Beas-2b akciğer sağlıklı epitel hücre hattında canlılık testleri ve komet testi ile genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu hasarın bitkisel fenolik bileşik kinik asit muamelesi ile önlenip önlenmeyeceği aynı test yöntemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

2.8. Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri

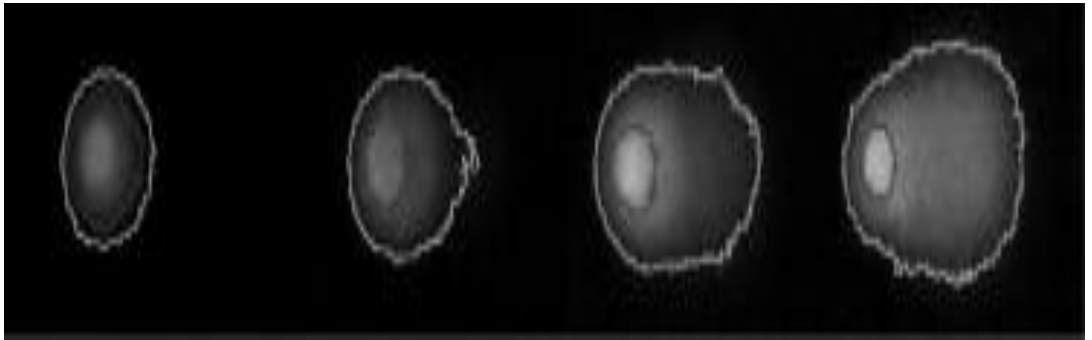
2.8.1. Genotoksisite Test Yöntemleri

Genotoksisite testi, genellikle DNA hasarına göre tehlike tanımlanmasıdır. Bu hasarlar gen mutasyonu, yapısal kromozom sapmaları, rekombinasyon ve sayısal değişiklikler şeklinde görülebilir. Bu testleri pozitif olan bileşikler, insanlarda kanserojen ve/veya mutajen olma potansiyeline sahip olduğundan bu testler ağırlıklı olarak kanserojen ve genotoksisite tahmini için kullanılmıştır (Jena ve ark. 2002).

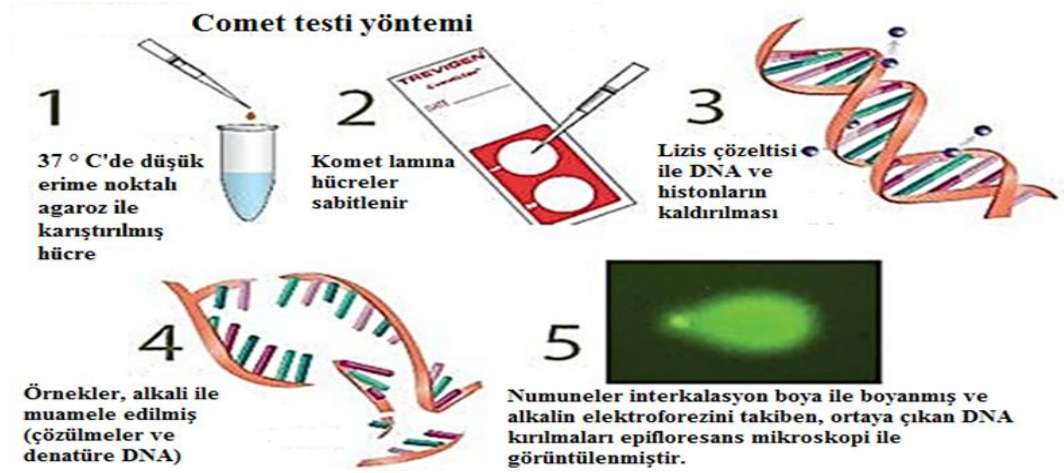
2.8.1.1. Tek Hücre Jel Elektroforez “KOMET” Testi

Komet ya da SCGE (tek hücre jel elektroforezi) deneyi, hem in vivo hem de in vitro olarak DNA düzeyindeki genotoksisitenin belirlenmesi için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Test, hücre lizisi ve DNA'nın çözülmesinden sonra, agaroz matrisi içinde tek tek hücrelerin elektroforezine dayanmaktadır. DNA, (elektrik alanında) DNA'nın kısa fragmentleri için daha yüksek bir geçiş hızı olan anoda doğru hareket eder. Floresan boyama sonrası hücreler, DNA zincir kırıklarıyla nukleusun hasarsız DNA içeriğini ifade eden kometin başı olan yapıyı oluşturur. Komet kuyruğu olarak görülen yapı ise, DNA'nın çift veya tek zincir kırıklarıyla oluşan yapısıdır (Ritter ve Knebel 2009).

Komet test yönteminin geliştirilmesinde ilk adımı atan kişiler; Rydberg ve Johanson (1978) ve Östling ve Johanson (1984) 'dır. Pek çok gelişme, deneyin spesifikliğini ve hassasiyetini göstermiştir. DNA bazlarının modifikasyonları ve tek-çift zincir kırılmaları gibi DNA hasarının farklı tiplerini ayıran önemli bir deneydir. Sitotoksisite ya da apoptotik olaylar gibi yanlış pozitif sonuçlara yol açan faktörlerin önemi hakkında bilgi sağlanmasında, mikronukleus ya da kromozom aberasyonu gibi genotoksisiteye ilişkin testlerle birlikte in vivo/in vitro olarak kullanılabilen bir yöntemdir (Tice ve ark. 2000, Hartmann ve ark. 2003).



Şekil 2.9. Komet testinde sağa doğru artan nükleer DNA hasarları (Ritter ve Knebel 2009).



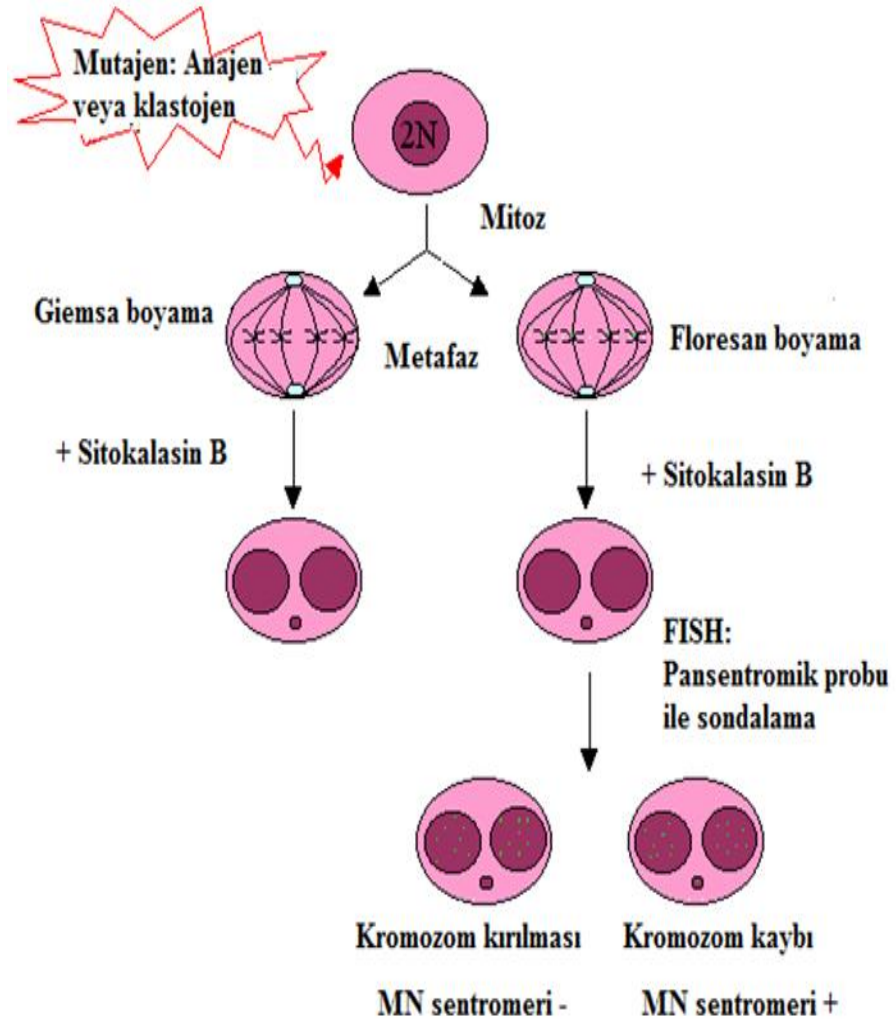
Şekil 2.10. Komet yönteminin aşamaları (Anonim 2013f).

Tek hücre jel elektroforez deneyi, büyük bir hassasiyetle DNA hasarı (Şekil 2.9) tespit yeteneğine sahiptir. Diğer testler ile karşılaştırıldığında, komet deneyinin, maliyeti düşüktür, örnek başına az sayıda hücre gerektirir ve sonuçlar hızlı bir şekilde ortaya çıkar. Alkalın komet testi, tek ve çift zincir kırıklarını algılar, eksik eksizyon onarım yerlerini algılayarak, oksidatif lezyonlar gibi DNA hasarlarını tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu nedenle bu deney, DNA onarım çalışmalarında, genotoksinlerin belirlenmesi için in vitro ve in vivo şeklinde (Şekil 2.10) yaygın olarak kullanılan klinik araştırmalar için tamamlayıcı bir yöntemdir (Braz ve Fávero Salvadori 2007).

2.8.1.2. Mikronükleus Testi

In vitro mikronükleus (MN) testi, bileşiklerin güvenliğinin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmaktadır (Nörenberg ve ark. 2013). Kromozom fragmentleri veya hücre bölünmesi sonrası sitoplazma içindeki tüm kromozomlar mikronükleus oluşturur. In vitro mikronükleus testi, yaygın olarak klastojenik ve anajenik maddelerin belirlenmesi için yıllardır kullanılmaktadır (Sobol ve ark. 2012).

MN testinde, tek bir çekirdek bölümü tamamlayan hücre, sitokalsin-B (Cyt-B) kullanılarak (Şekil 2.11) sitokinez performansı engellenir ve dolayısıyla kolayca binükleus (çift nükleus) görünümü kazanır (Fenech 2000).



Şekil 2.11. Mikronukleus (MN) yönteminin aşamaları (Anonim 2013g).

2.8.1.3. Kromozom Aberasyonu Testi

In vitro kromozom aberasyonu testi'nin (ABS) amacı, kromozomlarda yapısal değişikliklere neden olan yapının bir klastojen olup olmadığını belirlemektir. ABS'nin standart tipi olarak, solvent kontrol ve en az üç pozitif doz grupları oluşturulur. Her bir dozda metafaz hücrelerinin bir numunesi incelenir ve kromozom aberasyonu sergileyen hücreler tanımlanır (Kim ve ark. 2000).

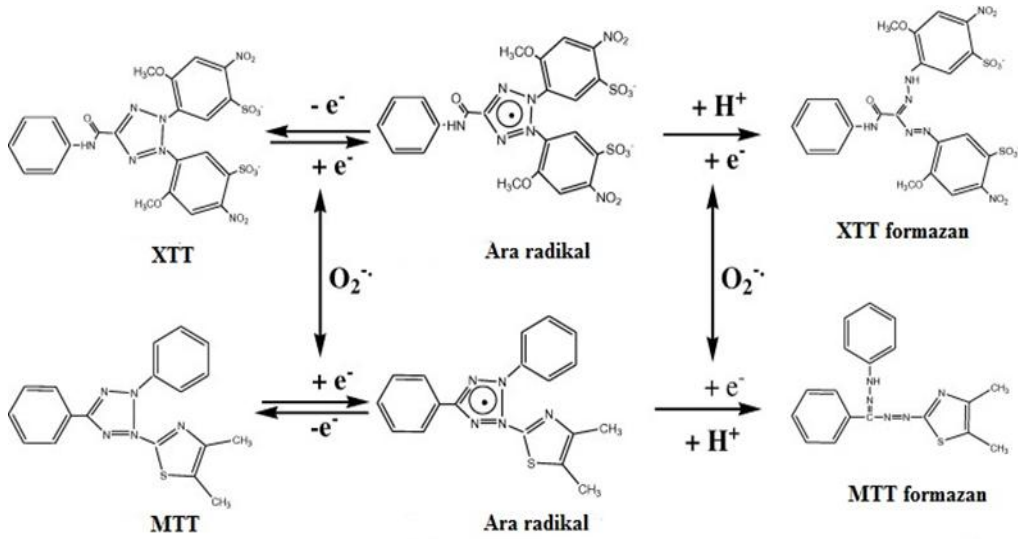
Kültürlenmiş memeli hücreleri kullanılarak yapılan kromozom aberasyonu testi, çevresel mutajenler ve/veya kanserojenleri tahmin etmek için kullanılan hassas yöntemlerden biridir ve Salmonella mikrozomu deneyi (Ames testi) için tamamlayıcı bir testtir. Bu

test, birçok kimyasal ve doğal bileşiklerin genotoksitesi ve mutajenitesinin değerlendirilmesi için kullanılır (Ishidate Jr. ve ark. 1998).

2.8.2. Sitotoksite Test Yöntemleri

2.8.2.1. XTT Testi

XTT, hücre canlılığı ve proliferasyonunu tahmin etmek için kullanılır. Canlılık ve proliferasyon, XTT için canlı hücreler içinde mevcut mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerin kapasitesine dayanmaktadır. XTT, süperoksit ile azaltılabildiği gibi MTT de azaltılabilir (Şekil 2.12) (Wang ve ark. 2011).



Şekil 2.12. Süperoksitin XTT/MTT'yi azaltması.

XTT hücre proliferasyon deneyi, ilk Scudiero ve arkadaşları tarafından 1988 'de tanımlanmıştır. XTT, tümör hücre hatları, hücre büyümesi ve ilaç duyarlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. XTT, renksiz ya da hafif sarı bir bileşiktir, indirgendiği zaman parlak turuncu olur. Bu renk değişimi, pozitif yüklü dördüncül tetrazol halkasının bir kısmının kırılması ile gerçekleştirilir. XTT redüksiyonu, onun formazan ürününü çözebilir. Yani, XTT'nin indirgenmesi ile renkli formazan türevleri oluşur (Scudiero ve ark. 1988).

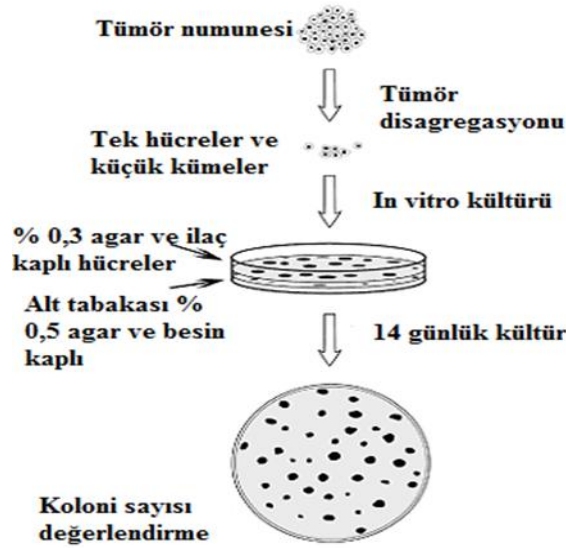
Yeni bir tetrazolyum tuzu XTT, normal aktive edilmiş T hücreleri ve çeşitli sitokin bağımlı hücre hatları ile hücre canlılığı ve proliferasyonunu belirlemek için, kolorimetrik deneyde kullanılmak üzere değerlendirilmiştir. Metabolik olarak aktif

hücrelerin dehidrojenaz enzimleri ile XTT bölünmesi, suda çözünebilen yüksek ölçüde renkli formazan ürününü vermektedir (Roehm ve ark. 1991).

2.8.2.2. Klonojenik Test

Koloni formasyon testi de denilen klonojenik test, koloni oluşturmak için tek bir hücrenin yeteneğini ölçen bir in vitro hücre hayatta kalma deneyidir. İlk olarak Puck ve Markus (1956) tarafından 1956 yılında tanımlanmıştır. Radyasyon sonrası ölen hücrelerin yeniden üreyenlerinin belirlenmesi için onkolojik araştırma alanında tercih edilen bir yöntemdir. Ancak son zamanlarda, ksenobiyotiklerin diğer sınıflarına maruz kaldıktan sonra hücre yaşayabilirliğini belirlemek için de bir yöntem olarak önerilmektedir (Herzog ve ark. 2007).

Artan araştırma çabaları, insan tümörleri için in vitro klonojenik deneylerin uygulanmasına yöneltmiştir (Şekil 2.13). Çeşitli yarı katı matrisler klonojenik hücrelerin hareketsiz kalması amacıyla kullanılmıştır. Bu deneyler ile bazı teknik sorunlar bulunmakla birlikte, bu yöntemin, insan kanserinin klinik öncesi ve klinik çalışmalara geniş bir uygulanabilirliğe sahip olduğunu kanıtlamıştır. Klonojenik hücreler üzerinde sitogenetik çalışmalarla ilaç etkilerinin çalışmaları birleştirilerek primer ve metastatik kanser ile ilaç direncinin ortaya çıkmasının değerlendirilmesi açısından yararlı olabileceği düşünülmektedir (Salmon ve ark. 1986).



Şekil 2.13. Tumor hücrelerinde klonojenik testin aşamaları.

Klonojenik deney veya koloni formasyon deneyi, kolonideki tek bir hücrenin büyüme yeteneğine dayalı bir in vitro hücre hayatta kalım deneyidir. Koloni en az 50 hücreden oluşur. Sınırsız üreme yeteneği olduğundan popülasyonda her hücre test edilir. Klonojenik deney, iyonize radyasyon ile muameleden sonra, hücre üreme ölümünü belirlemek için tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen aynı zamanda, diğer sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için de kullanılabilir (Franken ve ark. 2006).

Klonojenik test, radyasyon etkilerinin çalışılması için 1950'lerde tanımlanmıştır. Memeli hücrelerinde radyasyonun etkisi üzerinde klonojenik test kullanılmıştır. Çeşitli mekanizmalar hücre ölümü için tarif edilmiş olmakla birlikte, üreme bütünlüğü kaybı ve çoğalmaya yetersizlik en ortak özelliklerdir. Klonojenik test, böylece büyük bir koloni ya da bir klon oluşturmak üzere üreme yeteneğini muhafaza eden ve belirsiz çoğalan bir hücrenin kabiliyetini belirler. Klonojenik testte belirlenen hücre canlılık eğrisi, üreme yeteneğini muhafaza eden hücrelerin fraksiyonu ile kullanılan maddenin dozu arasında bir ilişki olarak tanımlanır. Klonojenik test, başlangıçta hücrelerin radyasyonun etkilerini araştırmak için kullanılmış ve radyobiyojide önemli bir rol oynamış olsa da, artık yaygın olarak klinikte potansiyel uygulamalar ile ajanların etkilerini incelemek için kullanılmaktadır (Munshi ve ark. 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada kinik asit ve cisplatin bileşiklerinin, sağlıklı insan akciğer epiteli (Beas-2b) hücreleri üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla klonojenik test, XTT testi ve komet testleri uygulanmıştır. Tüm deneysel çalışmalarımız Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar

Deneysel kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, deneysel kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel kullanılan cihazlar

CİHAZ	MARKA-MODEL
Görüntüleme sistemi	KAMERAM-21
Floresan mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Floresan mikroskop güç kaynağı	NIKON – C-SHG1
pH metre	HANNA INSTRUMENTS – HI 221
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Hassas terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
+4°C buzdolabı	REGAL
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
Saf (Distile) su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Pastör fırını	ELEKTRO-MAG – M 3025P
Su banyosu	NÜVEBATH NBS

Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Elektroforez Tankı	
Elektroforez Tankı Güç Kaynağı	
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Işık Mikroskobu	Olympus
Inverted (Ters yüz) mikroskop	SOIF
60mm ve 100mm’lik steril petripler	FALCON
Besiyeri Tüpleri	
Sınıf II Laminar Akım	PRO LAB
Mikropipet	
Steril serolojik pipetler (5,10 ve 25 ml’lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril plastik flasklar (T-12,5; T-25; T-75)	FALCON
Canlı hücre sayım cihazı ve yazılımı	INNOVATIS – CEDEX XS
Canlı hücre sayım cihaz lamı	ROCHE – CEDEX SMART SLIDE
Hücre sayım cihazı ve ucu	MILLIPORE – MA 01821

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

KİMYASAL MADDE	FİRMA	KATALOG NO
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA	12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA	08537
Penisilin–Streptomisin solüsyonu (100 ml)	THERMO SCIENTIFIC	SH40003.12

Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SCIENTIFIC	SH30239.01
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	G7513
Fetal Bovine Serum (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu (100 ml)	SIGMA – ALDRICH	T4049
DPBS/Modified	THERMO SCIENTIFIC	SH30028.02
Sodyum Klorür (NaCl)	SIGMA	1064041000
Sodyum Hidroksit (NaOH)	SIGMA	06203
Na ₂ EDTA	SIGMA	E5134-500G
Tris	MERCK	K40452787001
Triton-X-100	GERBU	
DMSO		
Mutlak Etanol	GURUP DELTALAR	
Mutlak Metanol	MERCK	1060082500
Kristal viyole	MERCK	1159400100
PBS (10 L)	SIGMA	D5652
Agaroz	MERCK	K33719436
Düşük Yoğunluklu Agaroz	SIGMA	A9414
Tripan Mavisi	SIGMA	
Etidyum Bromür (EtBr)	SIGMA	
96 kuyucuk	Orange Scientific	5530100
ELIZA	BioTek	ELx800
XTT çözeltisi	NIARA	

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Klonojenik test için:

Kinik asid (QA) çözeltisinin hazırlanması

0,01 gr QA tartılıp 160 µl saf suda (dH₂O) çözülür.

Besiyeri hazırlanması

500 ml'lik şişedeki RPMI-1640 medyum içerisine; 60 ml fetal bovine serum (FBS), 6 ml sodyum pirüvat, 6 ml penisilin-streptomisin, 3 ml L-glutamin eklenerek hazırlanmıştır.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisinin Hazırlanması

%35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl saf su eklenerek 5 ml'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmış olur. 5 ml'lik yeni stoktan 5 ml besiyeri bulunan T-25 flaska 50 µl aktarılır.

Hücre sayım lamına aktarılacak çözeltinin hazırlanması

50 µl hücre üzerine 50 µl tripan mavisi eklenir. 100 µl'lik karışımdan 10 µl çekilerek lama yayılır.

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) Hazırlanması

4.8 gr DPBS tartılarak 500 ml saf suda çözülür.

Kristal viyole Boyasının Hazırlanması

Toz halindeki kristal viyole boyasından 0.5 gr tartılarak üzerine 100 ml metanol eklenir.

Komet testi için:

Lamların agar ile kaplanması

0,65 gr normal melting agaroz 100 ml distile suya eklenir ve karışım ısıtılır.

Düşük Yoğunluklu Agaroz (LMA) Hazırlanması

0.065 gr LMA tartılır ve 10 ml suda ısıtılarak çözülür.

Lizis Tamponu Hazırlanması

2,5 M NaCl: 29,22 gr NaCl, 100 mM Na₂EDTA: 7,4448 gr Na₂EDTA, 10 mM Tris: 0,2422 gr Trisma Base hassas terazide tartılmıştır. Tartılan kimyasallar ısıtmadan 178 ml distile suda çözülmüş ve NaOH veya HCl kullanılarak pH=10' a ayarlanmıştır. Lizis buffer işleminden önce bu çözeltiye 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO eklenmiştir.

Yürütme Tamponu Hazırlanması

0,747 gr Na₂EDTA ve 18g NaOH tartılarak 1,5 lt distile suda çözülür. Çözeltinin pH>13 olmalıdır. +4°C'de çözelti saklanır.

Nötralizasyon Tamponu Hazırlanması

4.8456 gr Trisma Base tartılarak 100 ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH'ı 7,5'a ayarlanır.

Etidyum bromür boyasının hazırlanması

EtBr, 20 µg/ml konsantrasyonda distile su içinde çözülmüştür.

XTT testi için:

Cisplatin çözeltisinin hazırlanması

10 mg / 20 ml stok cisplatin çözeltisi kullanılmıştır.

XTT çözeltisinin hazırlanması:

-20 derecede bulunan XTT^I ve XTT^{II} çözeltileri, karanlık ortamda 37°C su banyosunda ısıtılır ve laminar akımda 1:50 oranında karıştırılır.

Çalışmamızda kullandığımız deneyler; klonojenik test, komet testi ve XTT testleri uygulanmıştır.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada ATCC kökenli CRL 9609 numaralı hazır hücre hatları olan normal insan akciğer epitel hücre hattı (Beas-2b) kullanılmıştır.

Sağlıklı akciğer epitel hücreleri (Beas-2b), filtre kapaklı T-75 flasklarda, RPMI-1640 ile hazırlanmış besiyeri ortamında çoğaltılmıştır. Beas-2b hücreleri, T-75 flasklarda 37°C ve % 5 CO₂ ortama sahip inkübatör içerisinde yaşatılmıştır. RPMI-1640 besiyerinin içine; % 10 fetal bovine serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 Sodyum Piruvat ve % 0,5 L-Glutamin eklenir.

Hücrelerin pasajlanma yöntemi ise şöyledir; flasklardaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler yaklaşık 1 dk PBS ile yıkanır ve tekrar aspire edilir. Tripsin eklenerek mikroskopta hücrelerin zeminden ayrılıp ayrılmadığına bakılır, tripsini durdurmak için aynı miktarda besiyeri eklenir, hücre süspansiyonu pipetle toplanıp falkon tüpüne konur, hücreler 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilir, süpernatant kısmı kalacak şekilde aspire edilir ve toplam hücre sayısı hesaplanır. Son olarak belirlenen hacimdeki hücre süspansiyonu, besiyeri eklenmiş flaska aktarılarak inkübatöre kaldırılır.

Çizelge 3.3. Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları

FLASKLAR	(D)PBS	TRİPSİN	BESİYERİ
T-12,5	1-2 ml	1 ml	2,5 ml
T-25	2-3 ml	2-3 ml	5 ml
T-75	5-6 ml	4-5 ml	10 ml

3.4. Çalışma Planı

QA ve cisplatin ile tek başına ve kombine olarak muamele edilen Beas-2b hücrelerinde gerçekleştirilen, Klonojenik Testte kullanılan QA dozları Çizelge 3.4'te, XTT Elisa Testi kullanılan cisplatin dozları Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Klonojenik testinde kullanılan QA dozları

12 µM	14 µM	17 µM	17,5 µM	18 µM
-------	-------	-------	---------	-------

Çizelge 3.5. XTT testinde kullanılan cisplatin dozları

0,5 µM	1 µM	2,5 µM	5 µM	12,5 µM	25 µM	50 µM
--------	------	--------	------	---------	-------	-------

Klonojenik test ile kinik asidin % 50 ve üstü yaşayabilirlik oranı gösteren 2 değeri (5 ve 10 µM) seçilmiş ve cisplatinin XTT testinden elde edilen IC50 dozu (19 µM) ve bu dozun yarısı olan 9,5 µM dozları ile kombinlenerek komet testi gerçekleştirilmiştir.

3.5. Klonojenik Test

Klonojenik test QA için uygulanmıştır. Testin prosedürü;

1. Flaskta bulunan hücreler pasajlanır.
2. Flasklardan toplanan hücreler tüplere aktarılır.
3. Tüp içerisindeki hücreler +4°C’de 1000 rpm’de santrifüj edilir.
4. Hücrelerin süpernatant kısmı atılır geriye pellet kısmı kalır.
5. Hücre sayımı yapılarak tüpteki toplam hücre belirlenir.
6. Deney gruplarının sayısı kadar T-25 flasklara hücre ekilir.
7. Ekimden birkaç gün sonra hücreler QA dozlarıyla dozlanır.
8. Dozlamadan 24 saat sonra hücreler pasajlanır ve tüplere alınır.
9. Santrifüjden sonra supernatant kısmı atılır ve kalan pelletten canlı hücre sayımı yapılır.
10. 60 mm’lik petriye 500 canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplama yapılır. 100 mm’lik petrilere kullanılıyor ise petrilere 1000 canlı hücre ekilir.
11. Petrilere hücre aktarımından sonra petrilere 37°C % 5’lik inkübatöre kaldırılır.

12. Petriler her gün inverted mikroskopta kontrol edilir ve koloniler belli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra petriler boyanır.

13. Koloni olarak sayım yapılabilmesi için her kolonide en az 40 hücre bulunması gerekmektedir.

14. Boyama için petriler PBS ile yıkanır, etanolle 5dk fikse edilir ve kristal viyole ile 5 dk boyanır.

Petri başına düşen ortalama koloni sayısı (N), kontrol grubu için petri başına düşen ortalama koloni sayısı (L) olarak belirtilirse, her doz grubu için % canlılık (yaşayabilirlik);

Petri başına düşen ortalama koloni sayısı (N)

% Canlılık (yaşayabilirlik) = ----- x 100

Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı (L)

3.6. XTT testi

XTT testi cisplatin için uygulanmıştır. Testin prosedürü;

1. XTT için 96 kuyucuğa belirli sayıda hücre ekilir ve hücreler 24 saat süreyle 37°C, % 5 CO₂ inkübatörde çoğalmaya bırakılır.
2. 24 saat sonunda besiyeri değiştirilir.
3. Ekimden 2 gün sonra dozlama yapılır. Dozlamadan sonra hücreler tekrar inkübasyona kaldırılır.
4. İnkübasyondan sonra besiyeri aspire edilerek kuyucuklar PBS ile yıkanır.
5. Kuyucuklara tekrar besiyeri eklenir.
6. Dozlamadan 1 gün sonra hazırlanan XTT ölçüm solüsyonu her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde eklenir.

7. XTT dozlamasından sonra inkübasyona kaldırılan hücreler, 2 saat sonra ELIZA'da 450 nm ve 630 nm'de ayrı ayrı absorbans değerleri okunur.

ELIZA okuması sonucu oluşan absorbanslardan canlılık şu formülle hesaplanır; (kör ortalama; sadece besiyeri içeren kuyucukların ortalamasıdır)

Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması - kör ortalama

% Canlılık = ----- x 100

Kontrol hücre absorbansı ortalaması – kör ortalama

3.7. Komet testi

1. Komet testinde kullanılmak üzere agaroz kaplı lamlar hazırlanır.
2. Deneyden bir gün önce lizis tamponu hazırlanır.
3. Hücreler tüplere toplanır ve +4°C'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
4. Santrifüjden sonra supernatant kısmı atılır ve geriye pellet kısmı kalır.
5. Hücre sayımı yapılır ve tüpteki toplam hücre sayısı belirlenir.
6. Hücrelerin yoğun olduğu tüplere 2 ml PBS eklenerek seyreltilir.
7. Santrifüj esnasında hücreleri agaroz içine gömmek için (LMA) agar hazırlanır.
8. LMA'dan, su banyosunda 37°C'de bulunan ependorfların içine 250'şer µl aktarılır.
9. Tüpteki hücrelerden 100 µl çekilir ve 250 µl LMA bulunan ependorflara aktarılır. LMA ve hücre karışımı mikropipet yardımıyla iyice süspanse edilir.
10. Jel ve hücre karışımından 50 µl alınarak agaroz kaplı lam üzerine yayılır.
11. Lamel ile kapatılan lamlar buz akülerinin üstüne konularak soğumaya bırakılır.
12. Lamlar +4°C'de 15 dk bekletildikten sonra üzerindeki lameller alınır.

13. Lamlar şalelere konur ve üzerlerine 100 µl lizis tamponu eklenir. Şaleler alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'ye kaldırılır ve 1 gece bekletilir.
14. Lamlar elektroforez tankına dizildikten sonra, tanka yürütücü tampon eklenir ve lamlar 20 dk tampon içinde bekletilir.
15. 20 dk sonunda yürütme işlemi başlatılır. Yürütme işlemi için, güç kaynağı 300 mA ve 25 V'a ayarlanarak 25 dk yürütme yaptırılır.
16. Yürütmeden sonra lamlar, karanlıkta tekrar şaleye alınır ve üzerlerine nötralizasyon tamponu eklenerek +4°C'de, 5 dk bekletilir.
17. Nötralizasyon işleminden sonra lamlar distile suyla yıkanır ve havada kurumaya bırakılır.
18. Lamlar kurutulduktan sonra 5 dk soğuk etanolde fikse edilerek tekrar kurumaya bırakılır.
19. Lamlar Etidyum Bromür ile 1 dk boyanır ve üzeri lamel ile kapatılarak floresan mikroskopta incelenir.
20. Her lamdan 100 hücre sayılır ve değerlendirme komet yazılımı yardımıyla yapılır.

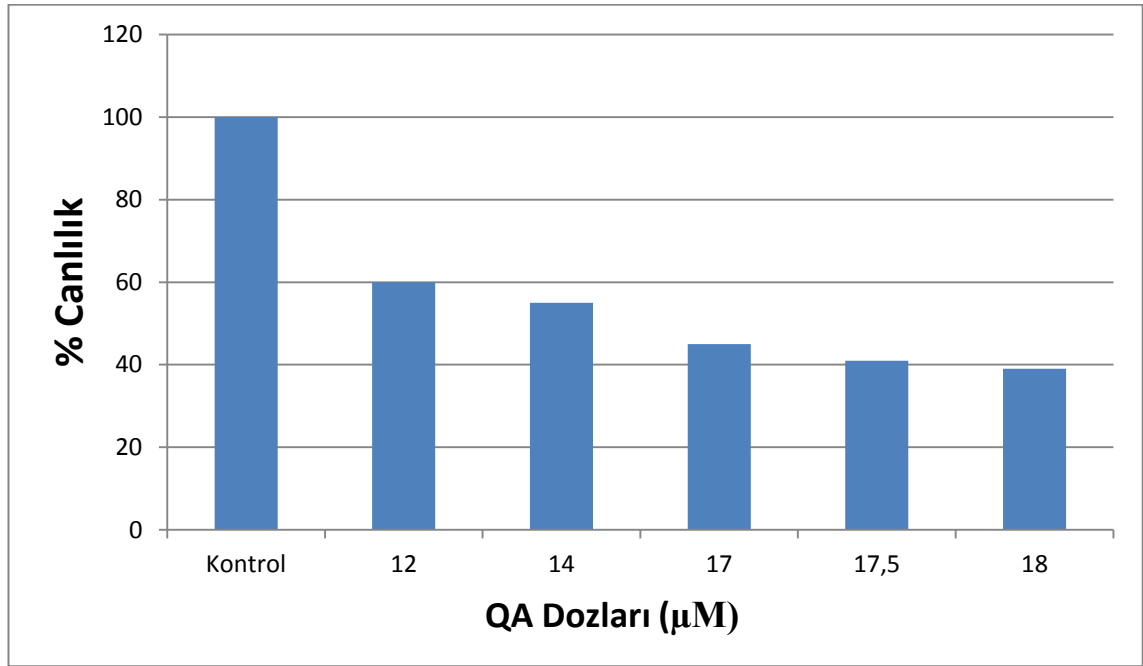
3.8. İstatistiksel Analizler

Komet analizinde Non parametrik Man-Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler SPSS 2.0 yazılımı kullanılarak bilgisayarda gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kinik asidin Beas-2b Hücre Hattı Üzerindeki Etkisinin Klonojenik Test ile Belirlenmesi

Tez çalışmamızda kullanılan kinik asitin Beas-2b hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla; kontrol grubu, 12 μM , 14 μM , 17 μM , 17,5 μM ve 18 μM olarak belirlenen kinik asit dozlarıyla klonojenik test yapılmıştır. Sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla yapılan bu testte, elde edilen sonuçlara göre test gruplarının % canlılık (yaşayabilirlik) oranları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

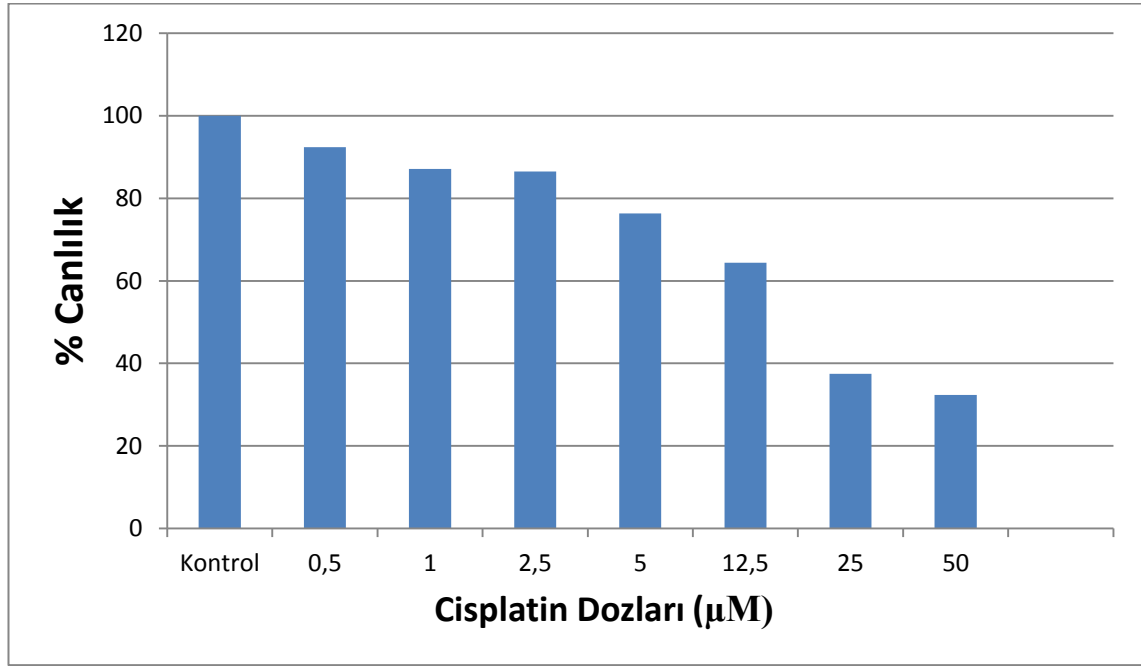


Şekil 4.1. Çeşitli konsantrasyonlarda QA’ya maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde Klonojenik test ile belirlenen % canlılık oranları. QA; Kinik Asit. (**IC50=15,48 μM**)

Şekil 4.1’de Klonojenik test ile belirlenen QA’nın insan akciğer epitel hücre hattı (Beas-2b) üzerindeki % canlılık grafiği görülmektedir. Grafiğe göre, 12 μM dozda canlılığı % 60’a, 14 μM dozda canlılığı % 55’e, 17 μM dozda canlılığı % 45’e, 17,5 μM dozda canlılığı % 41’e, 18 μM dozda ise canlılığı % 39’lara kadar düşürmüştür. Klonojenik testimizde % 50 inhibisyona (IC50) neden olan doz 15,48 μM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, % 50 inhibisyonun altındaki iki doz belirlenmiştir.

4.2. Cisplatinin XTT Testi ile % İnhibisyonunun Belirlenmesi

Çalışmada genotoksisite testlerinde kullanılacak cisplatin dozlarını belirlemek için Beas-2b hücreleri üzerinde çeşitli dozlardaki cisplatin'in % inhibisyon etkisini XTT Eliza testi ile araştırdık. 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 12,5 μM , 25 μM ve 50 μM olarak belirlenen cisplatin dozlarıyla XTT testi yapılmıştır. XTT testi ile belirlenen % canlılık grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Çeşitli konsantrasyonlarda cisplatin'e maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde XTT testi ile belirlenen % canlılık oranları. (**IC₅₀=19 μM**)

Şekil 4.2.'de cisplatinin XTT testi ile belirlenen canlılık oranları insan akciğer epitel hücre hattı (Beas-2b) üzerindeki % canlılık grafiğinde görülmektedir. Grafiğe göre, 0,5 μM dozda canlılığı % 92'ye, 1 μM dozda canlılığı % 87'ye, 2,5 μM dozda canlılığı % 86'ya, 5 μM dozda canlılığı % 76'ya, 12,5 μM dozda canlılığı % 64'e, 25 μM dozda canlılığı % 37'ye, 50 μM dozda ise canlılığı % 32'ye kadar düşürmüştür. XTT testimizde % 50 inhibisyona (IC₅₀) neden olan doz 19 μM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, IC₅₀ (19 μM) ve bu dozun yarısı olan 9,5 μM olarak iki doz seçilmiştir.

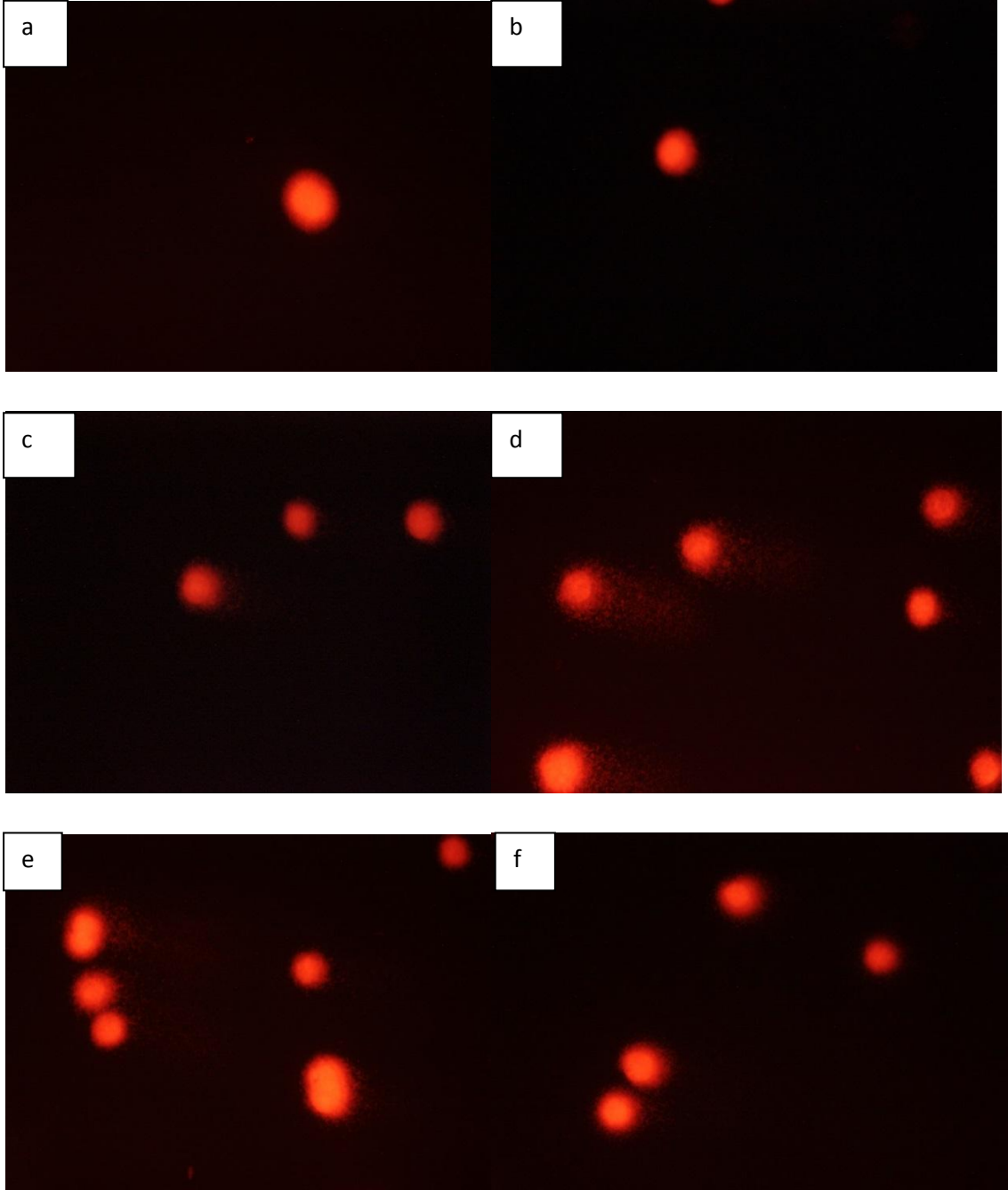
Klonojenik test ve XTT testleri sonucunda belirlenen cisplatin dozu ve kinik asit dozları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. QA'nın tek başına ve cisplatinle kombine dozları

Kontrol Grubu	QA Dozları (μM)	Cisplatin Dozları (μM)	Cisplatin + QA
Kontrol	5	9,5 μM	9,5 μM + 5 μM QA
			9,5 μM + 10 μM QA
	10	19 μM	19 μM + 5 μM QA
			19 μM + 10 μM QA

4.3. QA'nın cisplatinle kombinlendiğinde DNA Hasarı Oluşturma Etkisi, Komet Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan kinik asitle cisplatinin DNA hasarı üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan komet testinde; Klonojenik testle belirlenen kinik asidin IC50'sine göre, % 50 inhibisyonun altında olan 5 μM ve 10 μM dozları seçilmiştir. XTT testiyle belirlenen cisplatinin IC50'sine göre, IC50 dozu 19 μM ve bu dozun yarısı olan 9,5 μM dozları seçilmiştir. Kinik asit dozlarıyla cisplatin dozları kombinlenerek komet testi yapılmıştır. Yapılan komet testi sonunda her çalışma grubu için; kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Kuyruk Moment Uzunluğunun kuyruk % DNA ile çarpımı olan olive kuyruk momenti değerleri (standart hatalarıyla birlikte) hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Komet testinde elde edilen görüntü örnekleri Şekil 4.3'te verilmiştir.

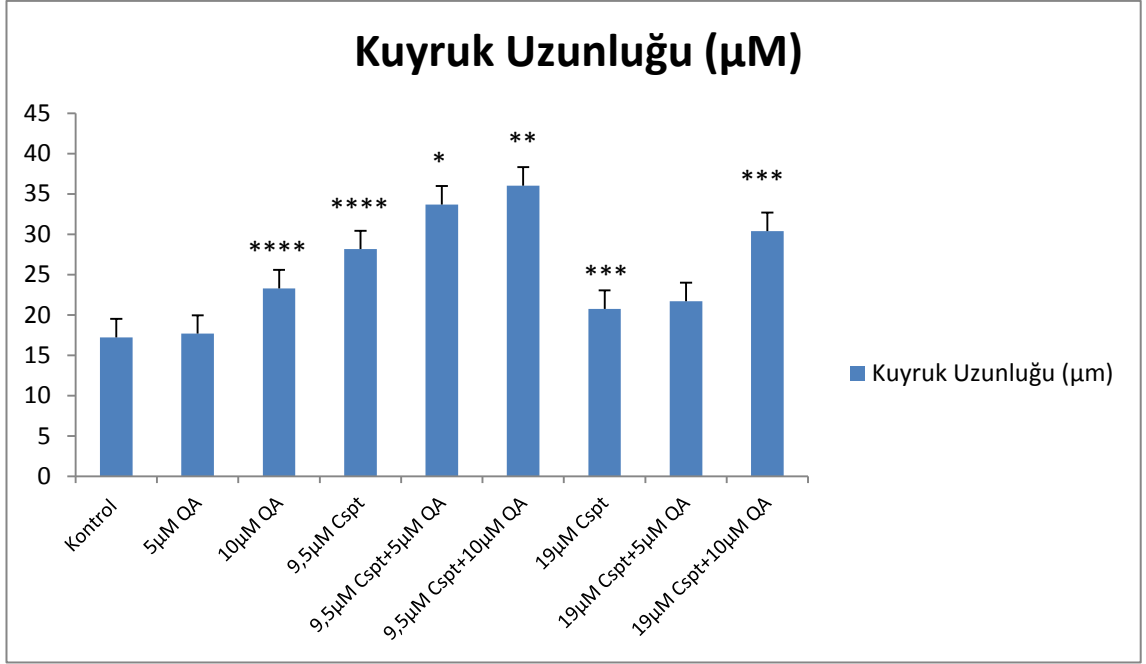


Şekil 4.3. Komet testinden elde edilen mikroskobik görüntüler (20X). a) Kontrol b) 5 µM kinik asit c) 9,5 µM cisplatin d) 9,5 µM cisplatin + 10 µM kinik asit e) 19 µM cisplatin f) 19 µM cisplatin + 10 µM kinik asit.

Çizelge 4.2. Komet Testinde elde edilen ortalama değerler. QA; Kinik Asit, Cspt; Cisplatin.

	<u>Kuyruk Uzunluğu</u>	<u>Kuyruk % DNA</u>	<u>Olive Kuyruk Momenti</u>
Kontrol	17,21±1,30	23,49±1,58	4,02±0,32
5 µM QA	17,67±1,34	24,78±1,51	4,61±0,42
10 µM QA	23,29±1,80	32,70±1,53	6,69±0,56
9,5 µM Cspt	28,14±2,23	41,06±1,78	9,80±0,81
9,5 µM Cspt + 5 µM QA	33,68±2,39	40,09±1,69	11,05±0,96
9,5 µM Cspt + 10 µM QA	36,03±2,40	37,01±1,71	11,00±0,93
19 µM Cspt	20,75±1,25	21,26±1,15	4,59±0,33
19 µM Cspt + 5µM QA	21,68±1,41	26,29±1,10	5,58±0,49
19 µM Cspt + 10µM QA	30,36±1,82	34,02±1,41	8,79±0,62

Şekil 4.4'te her test grubu için oluşan kuyruk uzunluğu oranları gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile kuyruk uzunluğu (μM) değerleri. QA; Kinik Asit. Cspt; Cisplatin. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$)

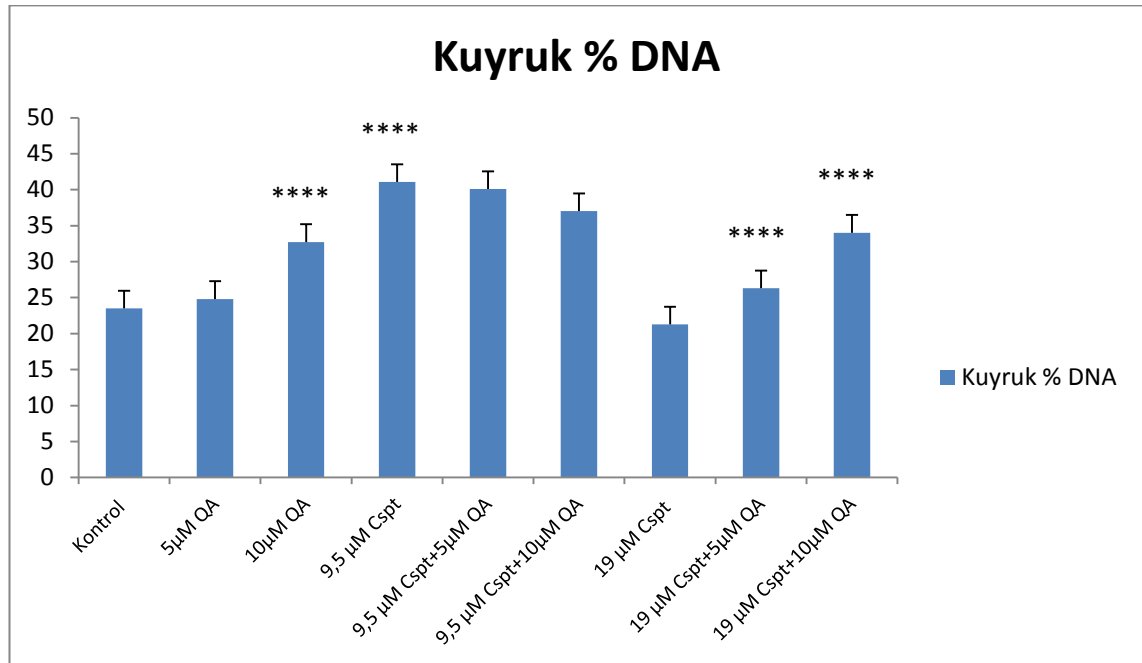
Kuyruk uzunluğu bakımından kontrol grubu ile 5 μM QA doz grubu Man Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama kuyruk uzunluğu değeri $17,21 \mu\text{M} \pm 1,30$ bulunurken, QA dozlarından 5 μM dozunda $17,67 \pm 1,34$; 10 μM dozunda $23,29 \pm 1,80$ olarak bulunmuştur. 5 μM QA dozunda $17,67 \pm 1,34$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). 10 μM QA dozunda $23,29 \pm 1,80$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,0001$).

Cisplatin dozlarında kuyruk uzunluğu ise, 9,5 μM dozunda $28,14 \pm 2,23$; 19 μM dozunda $20,75 \pm 1,25$ olarak bulunmuştur. 9,5 μM dozunda $28,14 \pm 2,23$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,0001$). 19 μM dozunda $20,75 \pm 1,25$ olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$).

9,5 µM Cspt + 5 µM QA ve 9,5 µM Cspt + 10 µM QA uygulama gruplarında ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla 33,68±2,39 ve 36,03±2,40 olarak bulunmuştur. 9,5 µM Cspt + 5 µM QA dozu, 9,5 µM Cspt dozunda 28,14±2,23 olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 9,5 µM Cspt + 10 µM QA dozu, 9,5 µM Cspt dozu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,01$).

19 µM Cspt + 5 µM QA ve 19 µM Cspt + 10 µM QA uygulama gruplarında ortalama kuyruk uzunluğu değerleri sırasıyla 21,68±1,41 ve 30,36±1,82 olarak bulunmuştur. 19 µM Cspt + 5 µM QA dozu, 19 µM Cspt dozunda 20,75±1,25 olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). 19 µM Cspt + 10 µM QA dozu, 19 µM Cspt dozunda 20,75±1,25 olarak belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,001$).

Komet testinde belirlenen bir başka ölçüm kuyruk % DNA miktarıdır. Beas-2b hücre hattında QA ve cisplatin muamelesi sonrasında yapılan komet testinde ölçülen kuyruk % DNA grafiği Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile kuyruk % DNA değerleri. QA; Kinik Asit. Cspt; Cisplatin. (**** $p < 0,0001$)

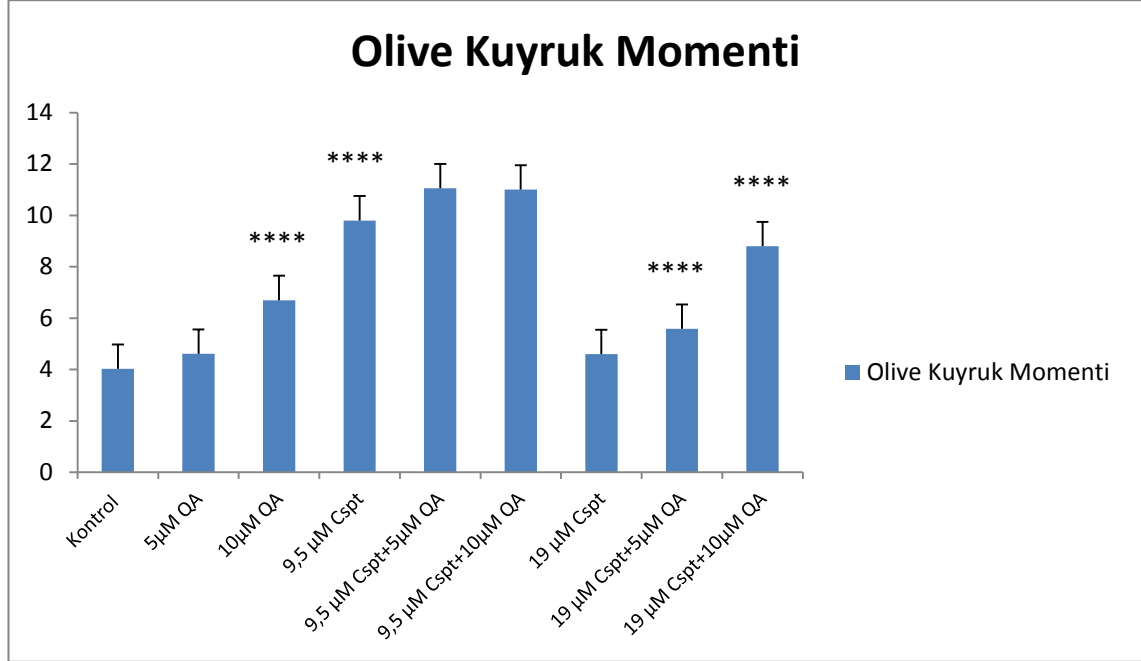
Kuyruk % DNA bakımından kontrol grubu ile 5 μ M QA doz grubu Man Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama kuyruk % DNA değeri 23,49 \pm 1,58 μ M bulunurken, QA dozlarından 5 μ M dozunda 24,78 \pm 1,51; 10 μ M dozunda 32,70 \pm 1,53 olarak bulunmuştur. 5 μ M QA dozunda 24,78 \pm 1,51 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri kontrol ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). 10 μ M QA dozunda 32,70 \pm 1,53 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p\leq 0,0001$).

Cisplatin dozlarında ortalama kuyruk % DNA değeri ise, 9,5 μ M dozunda 41,06 \pm 1,78; 19 μ M dozunda 21,26 \pm 1,15 olarak bulunmuştur. 9,5 μ M dozunda 41,06 \pm 1,78 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p\leq 0,0001$). 19 μ M dozunda 21,26 \pm 1,15 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

9,5 μ M Cspt + 5 μ M QA ve 9,5 μ M Cspt + 10 μ M QA uygulama gruplarında ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 40,09 \pm 1,69 ve 37,01 \pm 1,71 olarak bulunmuştur. 9,5 μ M Cspt + 5 μ M QA dozu, 9,5 μ M Cspt dozunda 41,06 \pm 1,78 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). 9,5 μ M Cspt + 10 μ M QA dozu, 9,5 μ M Cspt dozunda 41,06 \pm 1,78 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız belirlenmiştir ($p>0,05$).

19 μ M Cspt + 5 μ M QA ve 19 μ M Cspt + 10 μ M QA uygulama gruplarında ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 26,29 \pm 1,10 ve 34,02 \pm 1,41 olarak bulunmuştur. 19 μ M Cspt + 5 μ M QA dozu, 19 μ M Cspt dozunda 21,26 \pm 1,15 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır ($p\leq 0,0001$). 19 μ M Cspt + 10 μ M QA dozu, 19 μ M Cspt dozunda 21,26 \pm 1,15 olarak belirlenen ortalama kuyruk % DNA değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p\leq 0,0001$).

Komet testinden elde ettiğimiz bir diğer veri de olive kuyruk momentidir. Beas-2b hücre hattında QA ve cisplatin muamelesi sonrasında yapılan komet testinde ölçülen olive kuyruk momenti grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Beas-2b hücre hattında uygulanan çeşitli dozlardaki QA ile cisplatinin komet testi ile olive kuyruk momenti değerleri. QA; Kinik Asit. Cspt; Cisplatin. (****p<0,0001)

Olive kuyruk momenti bakımından kontrol grubu ile 5 µM QA doz grubu Man Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda ortalama olive kuyruk momenti değeri $4,02 \pm 0,32 \mu\text{M}$ bulunurken, QA dozlarından 5 µM dozunda $4,61 \pm 0,42$; 10 µM dozunda $6,69 \pm 0,56$ olarak bulunmuştur. 5 µM QA dozunda $4,61 \pm 0,42$ olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p > 0,05$). 10 µM QA dozunda $6,69 \pm 0,56$ olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,0001$).

Cisplatin dozlarında ortalama olive kuyruk momenti değeri ise, 9,5 µM dozunda $9,80 \pm 0,81$; 19 µM dozunda $4,59 \pm 0,33$ olarak bulunmuştur. 9,5 µM dozunda $9,80 \pm 0,81$ olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri kontrol ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,0001$). 19 µM dozunda

4,59±0,33 olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

9,5 μM Cspt + 5 μM QA ve 9,5 μM Cspt + 10 μM QA uygulama gruplarında ortalama olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 11,05±0,96 ve 11,00±0,93 olarak bulunmuştur. 9,5 μM Cspt + 5 μM QA dozu, 9,5 μM Cspt dozunda 9,80±0,81 olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). 9,5 μM Cspt + 10 μM QA dozu, 9,5 μM Cspt dozu ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$).

19 μM Cspt + 5 μM QA ve 19 μM Cspt + 10 μM QA uygulama gruplarında ortalama olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 5,58±0,49 ve 8,79±0,62 olarak bulunmuştur. 19 μM Cspt + 5 μM QA dozu, 19 μM Cspt dozunda 4,59±0,33 olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p\leq 0,0001$). 19 μM Cspt + 10 μM QA dozu, 19 μM Cspt dozunda 4,59±0,33 olarak belirlenen ortalama olive kuyruk momenti değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır ($p\leq 0,0001$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada kinik asitin, Beas-2b sağlıklı insan akciğer epitel hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkiler araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda kinik asitin sağlıklı insan akciğer epitel hücrelerinin yarısını öldürdüğü IC50 dozu bulunmuş ve çalışmada kullanmak amacıyla IC50'nin altındaki iki doz belirlenip, sitotoksik ve genotoksik etkileri klonojenik ve komet testi ile belirlenmiştir. Kemoterapi ilacı olan cisplatinin de IC50 dozu bulunmuş ve çalışmada kullanmak amacıyla IC50 dozu (19 µM) ve bu dozun yarısı olan 9,5 µM dozları hesaplanarak sitotoksik ve genotoksik etkileri XTT ve komet testi ile belirlenmiştir. Kinik asitin iki dozu cisplatin dozları ile kombinlenerek anti-genotoksik etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada beklediğimiz aksine kinik asit cisplatin ile kombinlendiğinde cisplatinin genotoksik etkisini artırıcı bir etki oluşturmuştur.

Antikanser ajanların antioksidan, sitotoksik ve apoptotik aktiviteleri karşılaştırıldığında sadece sitotoksik özelliğe sahip olanların daha iyi antikanser etkinlik sağladığı gözlenmiştir. Sitotoksik etkiye sahip olan ajanlar, sadece kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ederek kanser sürecini geciktirmez aynı zamanda kemoterapide üretilen serbest radikalleri önleyerek, komşu hücelere hasar vermeden kanserli hücre ölümünü uyarıcı kronik bir komplikasyonu da önlemiş olurlar (Ooi ve ark. 2011).

Oksidatif stres, süperoksit anyon radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kalmaz. Yüksek ROS hasarı, karaciğer sirozu ve fibrozis gibi birçok insan patolojilerine katılır. Fazla ROS, hali hazırda hücrel makromoleküller ve yapılar ile etkileşerek zar geçirgenliğini değiştirebilir, proteazlar ve nükleazları etkinleştirerek, gen ekspresyonunu değiştirebilirler. Sitoprotektif enzimler ise, hücre ROS toksisitesinde mücadele ettiği gibi aynı zamanda oksidatif strese karşı hücreleri korur ve çok sayıda toksik maddelerin ve karsinojenlerin toksik ve neoplastik etkileri için son derece etkili ve yeterlidir. Çeşitli sitoprotektif enzimler arasında, heme oksijenaz-1 (HO-1) 'in koruma fonksiyonları vurgulanmıştır. Hücrel stres sırasında HO-1'in antioksidan vücut dengesinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığını düşünülmektedir. Son zamanlarda meyve, sebze, yağlı tohumlar gibi doğal kaynaklarda bulunan doğal antioksidan fitokimyasalların kullanımına yönelik küresel bir eğilim olmuştur. Klorojenik asit ya da kinik asit kahve çekirdekleri, elma ve yaban mersini gibi

birçok bitkide bulunur. Kinik asit, hidroksil radikal oluşumunu inhibe eder ve lipid peroksidasyonu için antioksidan olarak kabul edilmektedir (Hwang ve ark. 2009).

Oksidatif DNA hasarı genellikle kanserojen olarak kabul edilir ve kanser, yaşlanma gibi birçok patolojik süreçlere aktif olarak katılmaktadır. İyonize radyasyon, UV ışığı, kimyasal ve genotoksik ajanlar gibi çeşitli çevresel faktörler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olabilir. Mikronükleus testi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), kardeş kromatid değişimi (SCE) testi ve tek hücre jel elektroforez (SCGE) veya komet testini içeren birçok genotoksik testler vardır. Yaygın olarak meyveler, sebzeler, baharatlar, şifalı otlar ve içeceklerde önemli miktarlarda mevcut olan polifenollerden özellikle flavonoidler, diyabet, kanser ve koroner kalp hastalığı gibi pek çok hastalığı tedavi etmek için kullanılmıştır. Ayrıca, flavonoidler antiviral, antimikrobiyal, antiplatelet ve antitoksik faaliyetlerinin yanı sıra, antioksidan ve antigenotoksik aktivite sergilediği gösterilmiştir. Bu faaliyetlerin, redoks özelliklerinin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır (Kilani-Jaziri ve ark. 2011).

Çinkılıç ve ark. (2013)'nin yaptığı çalışmada, DNA hasar ajanlarını analiz etmek için kullanılan komet testinde 0,5, 1, 2 ve 4 µg/ml kinik asit dozlarında DNA hasarının frekansını arttırmadığı gözlenmiştir. Bu durum fenolik bileşiklerin genotoksik olmadığını düşündürmektedir. Kinik asidin antigenotoksik etkileri olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre kinik asit Beas-2b hücre hatlarında ancak yüksek dozlarda sitotoksik etki oluştururken, belirlenen IC50'nin altındaki iki dozda (5 ve 10 µM) komet testinde anlamlı genotoksik etki oluşturmaktadır. Kinik asit'in bu dozlarını cisplatin ile kombinlediğimizde, en düşük kinik asit dozu olan 5 µM kinik asit, 9,5 µM dozdaki cisplatinin oluşturduğu DNA hasarını bir miktar attırırken, 10 µM kinik asit, 9,5 µM dozdaki cisplatinin oluşturduğu DNA hasarını daha fazla arttırmaktadır. Aynı şekilde 5 µM kinik asit, 19 µM dozdaki cisplatinin oluşturduğu DNA hasarını düşük bir miktar attırırken, 10 µM kinik asit, 19 µM dozdaki cisplatinin oluşturduğu DNA hasarını daha fazla arttırmaktadır. Çinkılıç ve ark. (2013)'ün bir çalışmasında kinik asitin güçlü antioksidan ve antigenotoksik etkileri olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızdaki bulguların aksine bu makalede kinik asitin 4 µg/ml (10 µM) dozunda ve daha düşük dozlarında sitotoksik olmadığı ve komet testinde genotoksik etki oluşturmadığı öne sürülmüştür. Bizim bulgularımızla anılan çalışmadaki bulguların farklı olmasını şu

şekilde açıklayabiliriz. Bizim çalışmamızda Beas-2b hücre hatları kullanılmıştır. Diğer çalışmada sağlıklı insanlardan alınan kan lenfositleri üzerinde çalışılmıştır. Ayrıca diğer çalışmada radyasyon öncesinde kinik asit muamelesi ve sonrasında koruyucu etki değerlendirmesi yapılmıştır. Dolayısıyla kinik asitin olası sitotoksik etkisi radyokoruyucu etkisine göre alt düzeyde kalmış olabilir.

Çalışmada kullandığımız kinik asit kahve ve kakao çekirdeklerinin bileşiminde yoğun olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Kahve ana bileşenleri neredeyse yarım yüzyıl boyunca bilinmektedir ve özellikle kafeik asitle ilgili çalışmalar geniş bir konu olmuştur (de Paulis ve ark. 2002). Kinik asit ile yapılmış sitotoksikite ve genotoksikite çalışmaları oldukça sınırlıdır. Daha çok kinik asitin çeşitli türevleri üzerine çalışmalar literatürde mevcuttur. Fenolik bileşik olarak kinik asite çok benzer olan ve birleştiklerinde klorojenik asidi oluşturan kafeik asitle gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda kafeik asitin farklı hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

İnsan mide kanseri hücrelerinde kafeik asit 100 μM (18,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dozda, sitotoksik etki göstermiştir (Zeiger ve Tice 1998). Kafeik asitin 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozu ile insan lösemi hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlenmiştir. HL-60 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonunda 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (211 μM) dozda kafeik asitin sitotoksik olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda 10 μM dozda kinik asit Beas-2b hücre canlılığı üzerine etki etmezken aynı dozda komet testinde kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti oranında anlamlı artışa sebep olarak genotoksik etki göstermiştir. Kinik asit ve kafeik asit ile gerçekleştirilmiş çalışmalar göz önüne alındığında sağlıklı akciğer epitel hücreleri olan Beas-2b hücrelerinin kinik asit muamelesine karşı oldukça duyarlı olduğunu söyleyebiliriz. Kinik asitin kafeik asit ile birleşiminden oluşan klorojenik asit ile kafeik asitin genotoksikitesine bakıldığında, her ikisi de izole edilmiş ya da plasmid DNA'da in vitro DNA zincir kırıklarını indüklemiştir (Zeiger ve Tice 1998). Klorojenik asit 250 μM (88,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dozda zayıf bir pozitif etki göstererek DNA çift zincir kırıkları oluşturmuştur. Kafeik asit ise, 250 μM (45,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dozda pozitif etki göstererek DNA çift zincir kırıkları oluşturmuştur. Çalışmamızdaki bulgular ile karşılaştırıldığında kinik asit, kafeik asit ve klorojenik asite oranla daha genotoksik görünmektedir (Zeiger ve Tice 1998).

Çalışmamızda cisplatin 19 μM dozda Beas-2b hücrelerinin yarısını öldürücü etki göstermiştir. Bu doz ve bu dozun yarısı ile gerçekleştirilen komet testinde ise IC50 nin yarısı olan dozda yüksek genotoksik etki göstermiştir. Ancak IC50 dozu olan 19 μM dozunda cisplatinin daha yüksek genotoksik etki göstermesi beklenirken aksine daha düşük genotoksisite oluşturmuştur. Genotoksisite oranının düşmesinin, cisplatinin olası apoptotik etkisi sebebiyle DNA hasarlı hücreleri öldürmesinden kaynaklandığı düşünülebilir. Hücre tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak cisplatin, transkripsiyon veya DNA replikasyon mekanizmaları ile sitotoksisiteye neden olur. Kalsiyum sinyali, ölüm reseptör sinyali, mitokondriyal yolların aktivasyonu ve çeşitli sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu ile cisplatin, apoptozisin indüksiyonuyla tümör hücrelerine zarar verir (Florea ve Büsselberg 2011). Çalışmada kinik asitin, cisplatinin 9,5 μM dozu ile kinik asitin iki dozu birleştiğinde cisplatinin tek başına olan genotoksik etkisini baskıladığı görülmüştür. Ancak cisplatinin IC50 dozu (19 μM) ile kinik asitin her iki dozunu kombinlediğimizde komet testinde hem kuyruk uzunluğu hem kuyruk % DNA oranları hem de olive kuyruk moment oranlarının tek başına cisplatine göre yüksek oranda arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçların kinik asitin cisplatince indüklendiği düşünülen apoptoz etkisini baskılaması ve sayılabilen DNA hasarlı hücre oranını arttırmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca platinle kinik asit kompleks bir bileşik oluşturmuş olabileceğinden genotoksisiteyi arttırıcı bir etki gösterebilir.

Sonuç olarak kinik asit çalışmamızda tek başına genotoksik etki göstermiş, ancak cisplatinle kombine edildiğinde antigenotoksik etki yerine genotoksisiteyi arttırıcı olarak çalışmıştır. Bu durumda hipotezimizde öne sürdüğümüzden farklı bir etkisi olduğunu belirlemiş bulunmaktayız. Kinik asitin bu etki mekanizmasını belirlemek için apoptoz testleri gibi farklı yöntemler uygulamak gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Adamson, R.H., Bridges, J.W., Evans, M.E., Williams, R.T. 1970.** Species Differences in the Aromatization of Quinic Acid in vivo and the Role of Gut Bacteria. *Biochemical Journal*, 116(3):437-43.
- Anonim, 2013a.** All You Ever Need To Know About Phenolics, February 18, 2012. <http://phenolics.org/>.
- Anonim, 2013b.** Cinnamate. <http://skinfoedia.com/Cinnamate>.
- Anonim,2013c.** <http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertreatment/Treatmenttypes/Chemotherapy/Combinationregimen/Gemcitabinecisplatin.aspx>
- Anonim, 2013d.** Quinic acid, Caffeic acid. http://en.wikipedia.org/wiki/Quinic_acid. http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid.
- Anonim, 2013e.** Chlorogenic acid. <http://examine.com/supplements/Chlorogenic+Acid/>.
- Anonim, 2013f.** Comet assay. <http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx>.
- Anonim,2013g.** http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm.
- Atmaca, E., Aksoy, A. 2009.** Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2):79 – 83.
- Attia, S.M., Helal, G.K., Abd-Ellah, M.F., Mansour, A.M., El-sayed, E.M. 2008.** The effects of oral grape seed extract on cisplatin-induced cytogenotoxicity in mice. *Society of Professional Journalists*, 16(2): 120-128.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1):191–203.
- Batmani, Y., Khaloozadeh, H. 2013.** Optimal drug regimens in cancer chemotherapy: A multi-objective approach. *Computers in Biology and Medicine*, 43(12):2089–2095.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W. 1998.** Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci*, 17(2):125–197.
- Braz, M.G., Fávero Salvadori, D.M. 2007.** Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. *Toxicol In Vitro*, 21(5):972-6.
- Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huamán, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., Campos, D. 2009.** HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem.*, 113(4):1243–1251.
- Clifford, M. N. 1999.** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 79(3):362–372.

- Clifford, M. N. 2000.** Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, 80(7): 1033-1043.
- Çinkılıç, N., Cetintas, S.K., Zorlu, T., Vatan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., Bilaloglu, R. 2013.** Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food. Chem. Toxicol.*, 53:359-63.
- de Paulis, T., Schmidt, D.E., Bruchey, A.K., Kirby, M.T., McDonald, M.P., Commers, P., Lovinger, D.M., Martin, P.R. 2002.** Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter. *Eur. J. Pharmacol.*, 442(3):215-23.
- Erkurt, M.A., Kuku, İ., Kaya, E., Aydoğdu, İ. 2009.** Kanser Kemoterapisi ve Böbrek. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16 (1):63-68.
- Eskin, N. A. M. 1990.** Biochemistry of Foods. Academic Press, San Diego, 401-432 pp.
- Farah, A., Donangelo, J.M. 2006.** Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):23-36.
- Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J.M. 1997.** Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.*, 61(21):2103-10.
- Fenech, M. 2000.** The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.*, 455(1-2):81-95.
- Florea, A-M., Büsselberg, D. 2011.** Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3(1):1351-1371.
- Frank, J. 2004.** Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability. Model studies in rats and humans. *Doctoral thesis*, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. 2006.** Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.*, 1(5):2315-9.
- Góngora, L., Máñez, S., Giner, R.M., Recio Mdel, C., Schinella, G., Ríos, J.L. 2003.** Inhibition of xanthine oxidase by phenolic conjugates of methylated quinic acid. *Planta Medica*, 69(5):396-401.
- Grunicke, H., Hofmann, J. 1992.** Cytotoxic and cytostatic effects of antitumor agents induced at the plasma membrane level. *Pharmacology & Therapeutics*, 55(1):1-30.
- Hara, K., Haranishi, Y., Kataoka, K., Takahashi, Y., Terada, T., Nakamura, M., Sata, T. 2013.** Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur. J. Pharmacol.* pii: S0014-2999(13)00807-8.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18(1):45-51.

Herrmann, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 28(4):315-47.

Herzog, E., Casey, A., Lyng, F.M., Chambers, G., Byrne, H.J., Davoren, M. 2007. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials--the clonogenic assay. *Toxicol. Lett.*, 174(1-3):49-60.

Ho, C-T. 1992. Phenolic Compounds in Food. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*, Chapter 1, pp 2–7.

Hwang, Y.P., Yun, H.J., Chun, H.K., Chung, Y.C., Kim, H.K., Jeong, M.H., Yoon, T.R., Jeong, H.G. 2009. Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage. *Chem. Biol. Interact.*, 2009 Oct 30;181(3):366-76.

Ishidate Jr., M., Miura, K.F., Sofuni, T. 1998. Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 404(1–2):167–172.

Jang, H., Ahn, H.R., Jo, H., Kim, K.A., Lee, E.H., Lee, K.W., Jung, S.H., Lee, C.Y. 2013. Chlorogenic acid and coffee prevent hypoxia-induced retinal degeneration. *J. Agric. Food. Chem.* Epub ahead of print.

Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. 2002. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ich guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34: 86-99.

Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2):2328-2375.

Kilani-Jaziri, S., Bhourri, W., Skandrani, I., Limem, I., Chekir-Ghedira, L., Ghediraa, L. 2011. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. *South African Journal of Botany*, 77(3):767–776.

Kim, B.S., Zhao, B., Kim, H.J., Cho, M. 2000. The statistical analysis of the in vitro chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.*, 469(2):243-52.

Kim, S.S., Park, R.Y., Jeon, H.J., Kwon, Y.S, Chun, W. 2005. Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Research*, 19(3): 243–245.

Ko, S-C., Kim, D., Jeon, Y-J. 2012. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7):2294–2302.

- Lee, L-S., Cho, C-W., Hong, H-D., Lee, Y-C., Choi, U-K., Kim, Y-C. 2013.** Hypolipidemic and Antioxidant Properties of Phenolic Compound-Rich Extracts from White Ginseng (*Panax ginseng*) in Cholesterol-Fed Rabbits. *Molecules*, 18(10):12548-12560.
- Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A. 2007.** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, 6(12):1358-1368.
- Marzo, I., Naval, J. 2013.** Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*, 86(6):703–710.
- Möller, B., Herrmann, K. 1982.** Analysis of quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in plant material by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 241(2):371–379.
- Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. 2005.** Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol. Med.*, 110:21-8.
- Nagel, C.W. 1985.** Application of high performance liquid chromatography to analysis of flavonoids and phenyl propenoids. *Cereal Chem.*, 62(2):144-147.
- Nehlig, A., Debry, G. 1994.** Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: A review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 317(2):145–162.
- Nizamlioglu, N.M., Nas, S. 2010.** Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 5(1):20-35.
- Nörenberg, A., Heinz, S., Scheller, K., Hewitt, N.J., Braspenning, J., Ott, M. 2013.** Optimization of upcyte® human hepatocytes for the in vitro micronucleus assay. *Mutat Res.*, 758(1-2):69-79.
- Ooi, K.L., Muhammad, T.S., Tan, M.L., Sulaiman, S.F. 2011.** Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. 135(3):685-95.
- Park, J.B. 2009.** 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10):800-5.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B. 2009.** Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6):2202-2211.
- Pero, R.W., Lund, H., Leanderson, T. 2009.** Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytotherapy Research*, 23(3):335–346.
- Perry, M.C. 2007.** The Chemotherapy Source Book. 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins, 779 pp.

- Puck, T.T., Marcus, P.I. 1956.** Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 103(5):653-66.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science.*, 2(4):152–159.
- Ritter, D., Knebel, J. 2009.** Genotoxicity testing in vitro - development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicol In Vitro.*, 23(8):1570-5.
- Rjiba-Touati, K., Ayed-Boussema, I., Belarbia, A., Azzebi, A., Achour, A., Bacha, H. 2013.** Protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin cytotoxicity and genotoxicity in cultured Vero cells. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 65(1-2):181-7.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L. 1991.** An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods.*, 142(2):257-65.
- Salmon, S.E. 1986.** Human tumor clonogenic assays: Growth conditions and applications. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19(1-2):21-8.
- Sancho-Martínez, S.M., Prieto-García, L., Prieto, M., López-Novoa, J.M., López-Hernández, F.J. 2012.** Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther.*, 136(1):35-55.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. 2005.** Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1):215-217.
- Scalbert, A., Williamson, G. 2000.** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130(8):2073-85.
- Scholz, B.M., Maier, H.G. 1990.** Isomers of quinic acid and quinide in roasted coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 190(2):132-134.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H, Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. 1988.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48(17):4827-4833.
- Shahidi, F., Naczki, M. 2003.** Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton London New York Washington, D.C., 566 pp.
- Shih, T.L., Gao, W-L. 2013.** The first synthesis of 7-(hydroxymethyl)thiepane-3,4,5-triols from d-(–)-quinic acid. *Tetrahedron*, 69(7):1897–1903.
- Sies, H. 1986.** Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12):1058–1071.
- Sobol, Z., Homiski, M.L., Dickinson, D.A., Spellman, R.A., Li, D., Scott, A., Cheung, J.R., Coffing, S.L., Munzner, J.B., Sanok, K.E., Gunther, W.C., Dobo, K.L., Schuler, M. 2012.** Development and validation of an in vitro micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutat Res.*, 746(1):29-34.

- Soh, Y., Kim, J., Sohn, N.W., Lee, K.R., Kim, S.Y. 2003.** Protective Effects of Quinic Acid Derivatives on Tetrahydropapaveroline-Induced Cell Death in C6 Glioma Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(6):803-7.
- Soto-Vaca, A., Gutierrez A, Losso, J.N., Xu, Z., Finley, J.W. 2012.** Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *J. Agric. Food Chem.*, Epub ahead of print.
- Souza-Pinto, N.C. 2013.** Repair of Oxidative DNA Damage. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, Pages 142–143.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colaric M. 2006.** Traditional walnut liqueur – cocktail of phenolics. *Food Chemistry*, 95(4):627–631.
- Suryaprakash, P., Kumar, R.P., Prakash, V. 2000.** Thermodynamics of interaction of caffeic acid and quinic acid with multisubunit proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27(3):219-28.
- Sweetman, S.C. 2011.** Martindale: The Complete Drug Reference, 37th edition. Pharmaceutical Press. 4160 pp.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35(3):206-21.
- Valentovic, M.A., Ball, J.G., Mike Brown, J., Terneus, M.V., McQuade, E., Van Meter, S., Hedrick, H.M., Roy, A.A., Williams, T. 2013.** Resveratrol attenuates cisplatin renal cortical cytotoxicity by modifying oxidative stress. *Toxicol. In Vitro.*, 28(2):248-257.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjarr, W. 2010.** Lignin biosynthesis and structure. *Plant. Physiol.*, 153(3):895–905.
- Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., Ramirez-Tortosa, C.L., Granados-Principal, S., Lorente, J.A., Quiles, J.L. 2011.** Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 80(3):347–368.
- Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J.K. 2011.** Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol. In Vitro.*, 25(8):2147-51.
- Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W., Couteau, D. 2000.** Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*, 28(2):16-22.
- Wojdyło, A., Oszmian´ski J., Czemerys, R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3):940–949.

Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Li, Y., Wu, X.Y. 2007. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59(6):491-504.

Yang, Y.J., Liu, X., Wu, H.R., He, X.F., Bi, Y.R., Zhu, Y., Liu, Z.L. 2013. Radical scavenging activity and cytotoxicity of active quinic acid derivatives from *Scorzonera divaricata* roots. *Food Chem.*, 138(2-3):2057-63.

Zaremba, T., Oliński, R. 2010. Oxidative DNA damage--analysis and clinical significance. *Postepy Biochem.*, 56(2):124-38.

Zeiger, E., Tice, R. 1998. Chlorogenic Acid [327-97-9] and Caffeic Acid [331-39-5] Review of Toxicological Literature. *National Institute of Environmental Health Sciences, Ph. D*, Research Triangle Park, North Carolina 27709.

Zeng, K., Thompson, K.R., Yates, C.R., Miller, D.D. 2009. Synthesis and Biological Evaluation of Quinic Acid Derivatives as Anti-inflammatory Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(18):5458-5460.

Zorlu, T. 2010. Bazı bitkisel antioksidanların mutajenik ve antimutajenik etkilerinin kısa süreli genotoksisite test yöntemleri ile belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ersin KOCAOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / TÜRKİYE – 15.11.1986

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Yıldırım Emirsultan Lisesi (YDA) / 2001 – 2005

Lisans : U.Ü. F.E.F. Biyoloji Bölümü / 2006 – 2011

Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D. Genel Biyoloji B.D. / 2011 – 2014