

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
2016-YL-007**

**KLOROJENİK ASİDİN İNSAN SERVİKAL  
KANSER HÜCRELERİ (HeLa) ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Burçak YAVUZ**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK**

**AYDIN-2016**



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burçak YAVUZ tarafından hazırlanan "Klorojenik Asidin İnsan Servikal Kanser Hücreleri (HeLa) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez, 16.12.2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Betül BÜRÜN	MSKÜ	.....
Üye : Doç. Dr. Serdar KOCA	ADÜ	.....
Üye : Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİ	ADÜ	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../2016

Burçak YAVUZ



## ÖZET

### KLOROJENİK ASİDİN İNSAN SERVİKAL KANSER HÜCRELERİ (HeLa) ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Burçak YAVUZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

2016, 105 sayfa

Bu çalışmada klorojenik asidin (KA) farklı konsantrasyonlarının (100 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL ve 500 µg/mL) tek başına ve Tekamen (40 µg/mL) ile birlikte farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) insan servikal kanser (HeLa) hücre hattı ve insan periferik lenfositleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi MTT ve WST-8 canlılık testleri ile belirlenmiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren HeLa hücreleri, çözücü kontrol olarak KA'nın çözücüsü %0.1'lik DMSO ve pozitif kontrol olarak da Tekamen kullanılmıştır. KA muamelesinin HeLa hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği ortaya çıkmıştır. KA+Tekamen karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin KA'nın gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla olduğu görülmüştür. KA+Tekamen karışımının sitotoksik etkisi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistikî açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). KA ile muamele edilen periferik lenfositlerde, KA'nın önemli bir sitotoksik etkisinin olmadığı, KA+Tekamen karışımının ise, KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla etkiye sahip olduğu görülmüştür. KA ve KA+TE karışımının uygulanması sonucunda HeLa hücreleri üzerinde meydana gelen % sitotoksitesisi; MTT canlılık testi ile elde edilen veriler WST-8 canlılık testinden elde edilen verilerden daha yüksek olduğunu görülmüştür. Benzer şekilde tek başına KA ve KA+Tekamen karışımının uygulanmasında, periferik lenfositlerde MTT ve WST-8 canlılık testi sonucunda birbirinden farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Canlılık testleri, HeLa hücresi, insan servikal kanseri, klorojenik asit, sitotoksik etki, Tekamen





## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECT ON HUMAN CERVICAL CANCER CELLS (HeLa) OF CHLOROGENIC ACID

Burçak YAVUZ

M. Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

2016, 105 pages

In this study, chlorogenic acid (KA) different concentrations (100 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL ve 500 µg/mL) alone and Tekamen (40 µg/mL) with different times (24, 48 and 72 hours) human cervical cancer (HeLa) cell line and human peripheral lymphocytes vitro cytotoxic effects MTT and WST-8 was determined with their viability tests. In this work HeLa that contain just medium has been as a negative control and KA solution used as a control solvent containing %0.1 of DMSO and Tekamen been used for positive control According to the result obtained in both experiments the reactins of chlorogenic acid in HeLa cell did not shows important cytotoxic effects. KA+Tekamen reaction has more cytotoxic effect in HeLa cell than its effects when used alone. Comparing the cytotoxic effects of KA+Tekamen in negative, positive and solvent control the statistical differencies were found significant. ( $p<0.05$ ). KA alone does not have important cytotoxic effects in peripheral lymphocytes treatment, KA+Tekamen reactions shows more cytotoxic effects than when used alone. Comparing the reaction KA+Tekamen treatment with negative control, positive control and solvent control the differencies has been statistically significant ( $p<0.05$ ). The result of KA either or KA+Tekamen mixture reaction, shows that the % cytotoxic in HeLa cells including datas has been higher than the datas obtained in viability test of MTT and the result obtained in WST-8 viability test. In the same way KA alone and mixture of KA+Tekamen reactions the result of viability tests in peripheral lymphocytes MTT and WST-8 applied to different periods has given different results.

**Key Words:** Viability test, human cervical cancer, HeLa cell, chlorogenic acid, cytotoxic effect, Tekamen



## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen, araştırmanın tüm aşamalarında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Arş. Gör. Dr. Özlem ASLANTÜRK'e teşekkür ederim.

Çalışmamda kemoterapi ilaçların temininde yardımlarını esirgemeyen Aydın Atatürk Devlet Hastanesi Radyasyon Onkoloji Servisi çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Yine tez çalışması esnasında benden maddi ve manevi anlamda desteğini esirgemeyen her anımda yanımda olan değerli arkadaşım Yüksek Lisans öğrencisi Serap YÜCE'ye çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, benden maddi ve manevi anlamda desteğini esirgemeyen, bana cesaret ve güç veren başta Biyolog Yağmur OBUZ olmak üzere tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca tecrübe kazanmama ve iyi dostluklar edinmeme neden olan Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü hocalarına ve tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tez projemizi FEF-15013 No'lu Proje ile destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ve doğduğum andan bugüne kadar beni özveriyle yetiştiren, maddi manevi bütün destekleri sağlayan, beni bu günlere getiren, her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem Fatma YAVUZ, babam Nursel YAVUZ ve bütün aileme sonsuz teşekkür ederim.

Burçak YAVUZ



## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGE DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Bitkilerde Bulunan Sekonder Bileşikler.....	2
1.1.1. Alkaloidler.....	5
1.1.2. Glikozidler.....	5
1.1.3. Saponinler .....	6
1.1.4. Fenolik Bileşikler .....	6
1.1.4.1. Tanenler.....	7
1.1.4.2. Flavonoidler .....	8
1.1.4.3. Fenolik Asitler.....	9
1.2. Yeşil Kahve.....	13
1.3. Kanser .....	15
1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler .....	22
1.4.1. İrinotekan (Tekamen, Tekamensar, Campto).....	24
1.5. İnsan Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri.....	25
1.6. İnsan Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri Hücreleri (HeLa) .....	27
1.7. Sitotoksosite ve Sitotoksosite Belirleme Yöntemleri.....	28
1.8. Hücre Canlılık Testleri .....	30

1.8.1. MTT Hücre Canlılık Testi: .....	30
1.8.2. WST-8 Hücre Canlılık Testi.....	31
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	47
3.1. Materyal.....	47
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar .....	47
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler .....	47
3.2.2. Kullanılan Cihazlar.....	47
3.3. Yöntem .....	48
3.3.1. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Temini .....	48
3.3.2. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Canlandırılması ve Çoğaltılması .....	48
3.3.3. Çoğaltılan İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin 24 ve 48-Kuyucuklu Plaklara (24 ve 48-well plate) Ekilmesi .....	48
3.3.4. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Klorojenik Asit (KA) ve KA+Tekamen ile Muamele Edilmesi .....	49
3.3.5. İnsan Periferel Kan Lenfositleri İzolasyonu.....	50
3.3.6. Klorojenik Asidin İnsan Serviks Kanser Hücreleri ve İnsan Periferel Kan Lenfositleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testleri ile Belirlenmesi .....	50
3.3.6.1. MTT Hücre Canlılık Testi.....	51
3.3.6.2. WST-8 Hücre Canlılık Testi.....	52
3.4. İstatistiki Analiz .....	53
4. BULGULAR .....	54
4.1. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in HeLa Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi İle Belirlenmesi.....	54
4.2. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in İnsan Periferel Lenfosit Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi ile Belirlenmesi .....	58

4.3. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in HeLa Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin WST-8 Canlılık Testi ile Belirlenmesi .....	62
4.4. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in İnsan Periferik Lenfosit Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin WST-8 Canlılık Testi ile Belirlenmesi .....	67
4.5. MTT ve WST-8 Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR .....	87
ÖZGEÇMİŞ .....	103





**KISALTMALAR DİZİNİ**

AA	:Askorbik asit
AGS	:İnsan mide adenokarsinoma hücre hattı
ALT	:Alanin aminotransferaz
ALP	:Alkali fosfataz
ARH-77	:Ig G plazma hücreli lösemi hücre hattı
AST	:Aspartaz aminotransferaz
ATP	:Adenozin trifosfat
A549	:İnsan akciğer karsinoma hücre hattı
BA	:Borik asit
BCC-1	:İnsan deri karsinoma hücre hattı
BrdU	:Bromodeoksi üridin
BJ	:İnsan normal dermal fibroblast hücre hattı
BP	:Boraks pentahidrat
CAPE	:Kaffeik asit fenetil esteri
Caco-2	:İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
CCl <sub>4</sub>	:Karbontetraklorit
CCRF-CEM	:T hücresi lenfoblast benzeri hücre hattı
CE	:Karboksilesteraz enzimi
C38	:Kolon adenokarsinoma hücre hattı
C51	:Kolon adenokarsinoma hücre hattı
CO <sub>2</sub>	:Karbondioksit
CoCl <sub>2</sub>	:Kobalt(II) Klorür
°C	:Santigrat derece
CuCl <sub>2</sub>	:Bakır (II) klorür
DA	:Dopamin kaybı

DC	:Hasarlı hücre (Damage Cell)
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dk	:Dakika
DMEM	:Dulbecco's modified eagle's Medium
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DPD	:Disodyum pentaborat dehidrat
DPPH	:1-Difenil-2-pikrilhidrazil (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGCG	:Epigallokateşin gallate
FA	:Ferulik asit
FBS	:Fetal sığır serum (Fetal bovine serum)
FeCl <sub>3</sub>	:Demir (III) klorür
GA	:Gallik asit
GDI	:Genetik hasar indeksi (Genetic Damage Index)
gr	:Gram
HeLa	:İnsan serviks adenokarsinoma hücre hattı
HepG2	:İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
Hep3B	:İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HGF-1	:İnsan normal dişeti fibroblast hücre hattı
HLE-B3	:İnsan lens epitel hücre hattı
HPLC	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HSC-2	:İnsan oral skuamöz karsinomu hücre hattı
HSG	:İnsan oral skuamöz karsinomu hücre hattı
JB6 Cl 41-5a	:Sıçan epidermal normal hücre hattı
J82	:İnsan üriner mesane karsinoma hücre hattı

JAK/STAT	:Janus kinaz/ sinyal ileticisi transkripsiyon aktivatörü
KA	:Klorojenik asit
KCI	:Potasyum klorür
LC <sub>50</sub>	:% 50 Ortalama öldürücü konsantrasyon
IUPAC	:Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
IARC	:Uluslararası Kanser Ajansı (International Agency for Research Cancer)
ml	:Mililitre
MCF-7	:Östrojene bağımlı insan meme adenokarsinoma hücre hattı
MDA-MB-231	:Östrojene bağımsız meme adenokarsinoma hücre hattı
mM	:Milimolar
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
MTT	:3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
MA16/C	:Fare meme adenokarsinomu kanser hücre hattı
MMP-9	:Matris metaloproteinaz-9 Enzimi
MN	:Mikronukleus
MU	:Metilurea
NA <sup>+</sup>	:Sodyum iyonu
NCI-H520	:İnsan akciğer karsinoma hücre hattı
NCI-H661	:İnsan akciğer karsinoma hücre hattı
OSCC-1	:İnsan ağız karsinoma hücre hattı
PCE	:Polikromatik eritrositler

PC12	:Rat katekolominerjik feokromositoma hücre hattı
PO3	:Pankreatik duktal adenokarsinom kanser hücre hattı
PBS	:Fosfat tuz tamponu
PC-3	:İnsan prostat adenokarsinoma hücre hattı
ppm	:Milyon çözücüde çözünen madde miktarı
RNA	:Ribonükleik asit
RTCC-1	:İnsan böbrek karsinoma hücre hattı
SAH	:S-Adenozil-homosistein
SAM	:S-Adenozil metiyonin
SN	:Sodyum nitrit
TB	:Total bilirubin
U-2OS	:İnsan kemik osteokarsoma hücre hattı
XTT	:2,3-Bis (2-Metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2 H - Tetrazolium-5-karboksanilid (2,3-Bis-(2-Methoxy-4- Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
WST-1	:2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-[2,4-disulfofenil]- 2H tetrazolium monosodium tuzu (2- [4-diphenyl] -3- [4- nitrophenyl] -5- [2,4-di sulfonic] - 2H tetrazolium monosodium salt)
WST- 8	:2-(2-metoksi-4-nitrofenil) -3 (4-nitrofenil) -5 (2,4- disulfofenil) 2H-tetrazolyum, monosodyum (2- (2- methoxy-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4- disulfofenyl) -2H-tetrazolium, monosodium)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	4
Şekil 1.2. Kahve ağacı ( <i>Coffea arabica</i> ).....	11
Şekil 1.3. Klorojenik asidin formülü.....	11
Şekil 1.4. Yeşil kahve.....	13
Şekil 1.5. Yeşil kahve çekirdekleri.....	13
Şekil 1.6. Kansere neden olan faktörler.....	16
Şekil 1.7. Kanserin gelişimi.....	19
Şekil 1.8. Kanseri ve normal hücrelerin Taramalı Elektron Mikroskobu görüntü.....	20
Şekli 1.9. Kanserin büyümesi ve yayılması.....	21
Şekil 1.10. Irinotekan açık formülü.....	25
Şekil 1.11. Serviks kanseri.....	26
Şekil 1.12. İnsan serviks kanseri hücreleri (HeLa) .....	27
Şekil 1.13. MTT canlılık testi.....	31
Şekil 1.14. WST-8 canlılık testi.....	32
Şekil 3.1. Klorojenik asit'in HeLa hücreleri uygulanması.....	50
Şekil 3.2. Klorojenik Asit'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisinin MTT canlılık testi ile belirlenmesi.....	51
Şekil 3.3. Klorojenik Asit'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisinin WST-8 canlılık testi ile belirlenmesi.....	52
Şekil 4.1. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	56
Şekil 4.2. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	58
Şekil 4.3. Klorojenik Asit uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	60

- Şekil 4.4. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları .....62
- Şekil 4.5. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları.....64
- Şekil 4.6. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları .....67
- Şekil 4.7. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları.....69
- Şekil 4.8. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları .....71
- Şekil 4.9. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....74
- Şekil 4.10. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....76
- Şekil 4.11. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması .....78
- Şekil 4.12 Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması .....80

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu (Deri dışında kalan kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları) .....	15
Çizelge 4.1. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	55
Çizelge 4.2. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	57
Çizelge 4.3. Klorojenik Asit uygulanmış periferal lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları.....	59
Çizelge 4.4. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferal lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları .....	61
Çizelge 4.5. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları.....	64
Çizelge 4.6. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları .....	66
Çizelge 4.7. Klorojenik Asit uygulanmış periferal lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.8. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferal lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları .....	71
Çizelge 4.9. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	73

- Çizelge 4.10. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....75
- Çizelge 4.11. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması .....77
- Çizelge 4.12 Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması .....79



## 1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler hastalıkların önlenmesi, sağlığın sürdürülmesi ve hastalıkların iyileştirilmesi için ilaç olarak geleneksel ve modern tıpta kullanılmaktadır. Aynı zamanda besin takviyeleri, bitkisel çay, tat, çeşni olarak beslenmede de geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Bu bitkilerin drog denilen kurutulmuş, belirli ölçüde hazırlanmış bitki kısımlarından (kök, kök-sap, yumru, gövde veya odunsu yapı, kabuk, yaprak, çiçek, meyve, tohum ve herba) yararlanılmaktadır. Bir çok kullanım alanı olan tıbbi ve aromatik bitkiler biyolojik, kültürel ve endüstriyel kaynaklardır. Bu kaynaklara olan talep son yıllarda oldukça artmış ve artmaya devam etmektedir. Bu bitkilerin değeri tıp ve sağlık alanında sentetik yolla elde edilen etkin maddelerine göre çok yönlü etkiye sahip olmaları ve yan etkilerinin bulunmaması gibi nedenlerle artmaktadır. Güçlü ve tutarlı epidemiyolojik kanıtlar, bitkilerin kanser sıklığının azaltılmasında ve kanser kaynaklı ölümlerin önlenmesinde kullanılan ilaçların elde edilmesinde birincil kaynaklar olduğunu doğrulamaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verebilmesi nedeni ile, başta bitkiler olmak üzere doğal kaynaklardan elde edilen, yan etkisi olmayan alternatif ilaçların araştırılması giderek önem kazanmaktadır.

Bitkiler topraktan aldıkları su, mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşiklere dönüştürmektedirler. Bunlar bitki metabolizmasında oluşan ağırlıklı olarak kullanılan etken maddeler olarak bilinen örneğin; eterik yağlar (uçucu yağlar, esanslar), alkaloidler, tanenler ve acı maddelerdir. Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bu etken maddeler vücudun savunma gücünü artırır, organların işlevlerini destekler ve/veya iyileşmeyi hızlandırır. Böylece organizmadaki belirli dokuların ve organların işlevlerine olumlu etki yaparlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Bitki ekstrelerinden elde edilen doğal ilaçlar, çoğunlukla çok önemli bir yan etkiye sahip olmamakla birlikte, olumlu birden fazla etkiyi bünyelerinde taşımaktadırlar ve bu durum onları sentetik ilaçlara göre daha cazip hale getirmektedir. Özellikle 1990'lı yıllardan sonra, tıbbi ve aromatik bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması, doğal ürünlere olan talebin artması; bu bitkilerin kullanım hacmini her geçen gün arttırmaktadır (Bayram vd., 2010).

20. yüzyılın başlarında teknolojik gelişmelerin getirdiği yenilikler, sosyal ve politik değişimler bitkilerin ilaç olarak kullanımının hızla azalmasına neden olmuştur. Aynı zamanda ilaç sanayinde sentetik ilaçların üretilmesi de bunda etkili olmuştur (Bayram vd., 2010). Gelişmiş ülkeler özellikle tedavide bitkisel kaynaklara yönelmiş durumdadırlar. Tedavide kullanılan ilaçların önemli bir kısmını doğal kaynaklı ilaçlar oluşturmaktadır. Doğal kaynaklı ilaçların kullanım oranı gelişmiş ülkelerde %60, gelişmekte olan ülkelerde ise %4 civarındadır (Anonim, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sektör Raporu, 2012). Dünya nüfusunun yaklaşık %80'i sağlığına kavuşmak için geleneksel tıbbi ve tıbbi bitkileri kullanmaktadır (Toksoy vd., 2010). Bugün dünyada kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4.000 drog yaygın bir şekilde kullanılırken halen dünyada 2.000, Batı Avrupa'da ise 500 kadar tıbbi bitkinin ticareti yapılmaktadır.

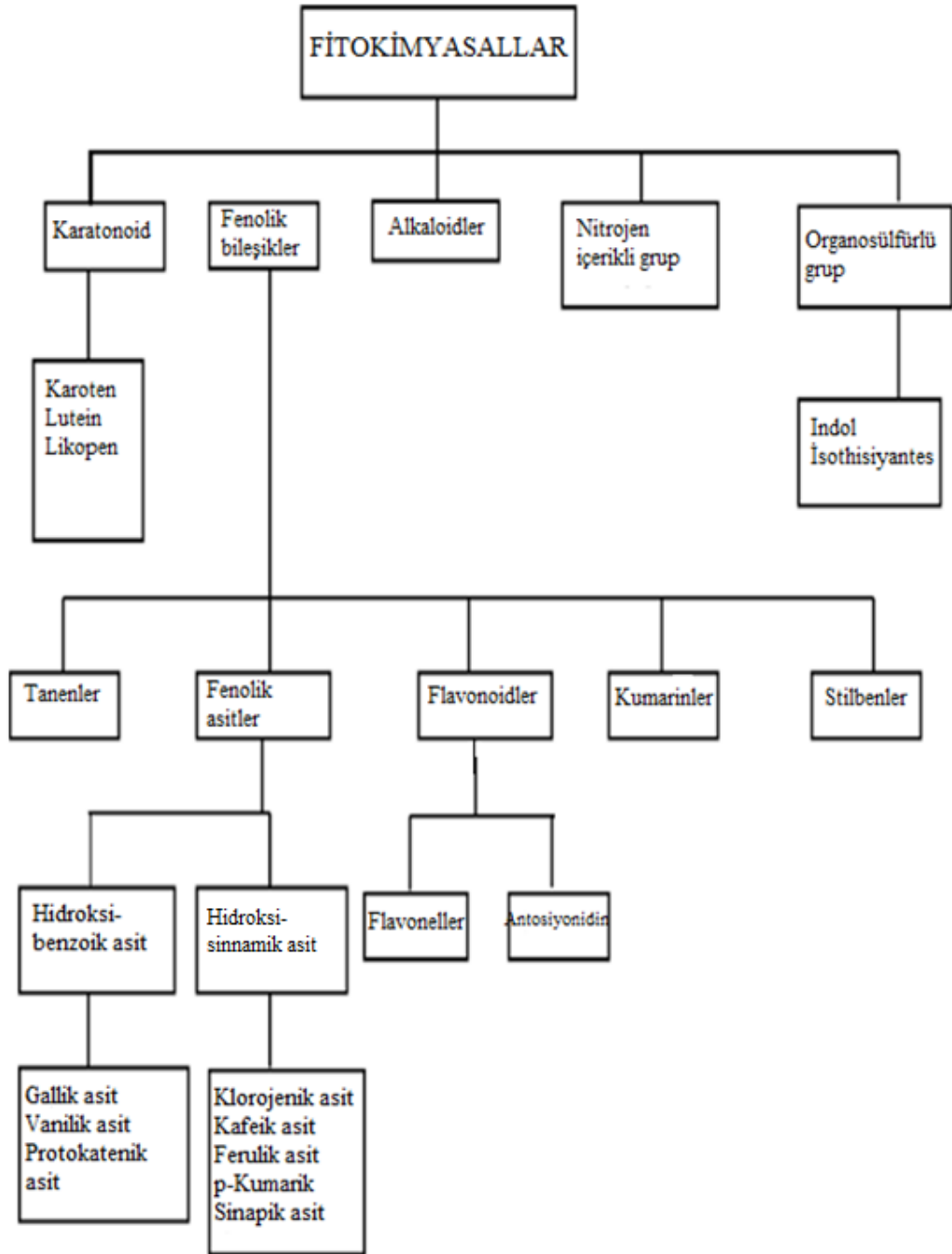
Günümüzde tıbbi bitkiler piyasasının yıllık yaklaşık 60 milyar dolarlık bir rakama sahip olduğu tahmin edilmektedir (Kumar, 2009; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011) ve yıllardır tıbbi etkiye sahip bitkisel ilaç araştırmaları oldukça ilgi duyulan bir araştırma alanı haline gelmiştir (Diken, 2009). Çoğu bitki sentetik ilaç yapımında biyoaktif ajan kaynağı olarak farmasötik endüstride ilaçların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Aboaba vd., 2006). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın (dünya nüfusunun yaklaşık %80'i) sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir. Gelişmiş ülkelerdeki reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimblastin, rezerpin, kinin, aspirin vb) oluşturmaktadır (Farnsworth vd., 1985). Ancak, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktların çoğunun biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları hakkındaki bilimsel veriler hala yetersizdir. Piyasada kanser tedavisine yönelik birçok ilaç olmasına rağmen yeni, etkin ve doğal kaynaklardan elde edilmiş, genotoksisite ve apoptozis gibi mekanizmalar üzerindeki etkisi tespit edilmiş ilaçlara halen büyük ihtiyaç duyulmaktadır.

### **1.1. Bitkilerde Bulunan Sekonder Bileşikler**

Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere "bitki kimyasalları" (fitokimyasallar) denilmektedir (Visioli vd., 2000). Fitokimyasallar bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatlarının oluşmasında etkili bir role sahiptir. Fitokimyasallar sahip oldukları

antioksidan aktiviteleri sayesinde birçok hastalığa karşı koruyucu ve iyileştirici bir etkiye sahiptirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasallar sağlık üzerindeki olumlu etkilerini; biyokimyasal reaksiyonlarda substrat, enzimatik reaksiyonlarda ko-faktör, bazı enzimatik reaksiyonların inhibitörü, bağırsaklarda zararlı ve istenmeyen maddeleri bağlayıp uzaklaştıran absorban/sekestran, hücre membranı ve hücre içinde bulunan reseptörleri agonize veya antagonize eden ligandlar olarak, reaktif toksik ajanları yakalayıp, esansiyel besin öğelerinin absorpsiyon ve stabilitesini artırarak, yararlı gastro-intestinal bakterilerin çoğalmasını arttırarak, yararlı oral, gastrik ve intestinal bakteriler için substratları fermente ederek ve zararlı mikroorganizmaları inhibe ederek göstermektedirler (Anonim, Fitokimyasallar. <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/Belge>, Erişim tarihi: 03.09.2014).

Fitokimyasallar; alkaloidler, glikozidler, tanenler, flavonoidler, saponinler gibi pek çok gruba ayrılmaktadır (Liu, 2004) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması (Liu, 2004' ten düzenlenerek)

### 1.1.1. Alkaloidler

Sekonder kimyasal bitki içerikleri arasında en geniş grubu olan alkaloidlerin çoğu oksijen içeren, peptid halkasında radikallerle yer değiştirebilen bir ya da daha fazla hidrojen atomu bulunduran nitrojen bazlı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin en temel özelliği, alkali olmaları ve mavi turnusol kağıdını kırmızıya çevirmeleridir. Günümüzde fitokimyasal araştırmalarla tanımlanan ve farmakolojik açıdan önemli olan 12000'in üzerinde alkaloid bulunmaktadır ve bunlara her gün yeni bir alkaloid eklenmektedir. Alkaloidlerin bitkileri herbivor ve patojenlere karşı koruma ve ayrıca farmasötik, stimulant, anestezi, narkotik gibi etkileri bulunmaktadır. Alkaloidler analjezik (morfin ve kodein), kas gevşetici (tubokurarin), antibiyotik (sanguinafin ve berberin), antikanser ajanı (vinblastin), antiaritmik (ajmalin) ve sedatif (skopolamine) gibi etkileri nedeniyle klinikte kullanılmaktadırlar. Bitki kökenli önemli alkaloidlere örnek olarak kafein, nikotin, kodein, atropin, morfin, ergotamin, kokain ve efedrin verilebilir (Doughari, 2012).

### 1.1.2. Glikozidler

İlk glikozid, 1830 yılında Fransız eczacı Leroux tarafından söğüt kabuğunda keşfedilmiş ve salicine ismi verilmiştir (Baytop, 1999). Glikozidler bitki öz suyunda bulunan renksiz, kristal karbon, hidrojen ve oksijen içeren (bazen nitrojen ve sülfür de içerebilmektedirler) ve suda çözünebilen bitkisel içeriklerdir. Kimyasal olarak glikozidler bir karbohidrat (glukoz) ve bir de karbohidrat olmayan (aglikon ya da genin) iki kısımdan oluşmaktadırlar. Glikozidler reaksiyonlarda nötral davranarak, ferment ya da mineral asitlerle bileşik oluşturarak hidroliz olabilmektedirler. Kimyasal olarak diterpen lakton ve triterpen lakton gruplarını içerebilmektedirler. Acı esanslılar olarak da adlandırılan glikozidlerin tiroksin ve metabolizmayı azaltıcı (tannik asit), kalp üzerinde etki edici (kardiyak glikozidler), cilt rahatsızlıklarında etkin (antrasen glikozidler), antikanser (şalkon glikozidler) gibi özellikleri vardır. Aynı zamanda siyanojenik bir glikozid olan amigdalin antikanser etkisiyle kanser tedavisinde kullanılabilirken, uygun dozda kullanılmadığında öldürücü etkisinin olduğu bilinmektedir (Doughari, 2012).

### 1.1.3. Saponinler

Saponin terimi, içinde bol miktarda saponin bulunduran ve eskiden sabun olarak kullanılan *Quillaja saponaria* bitkisinden türemiştir. Bu bileşiklerin en önemli etkisi, suda sabun özelliği göstermeleridir. Hidroliziyle bir aglikon olan sapogenin meydana gelmektedir. Bu sapogeninlerin steroidal ve terpenoidal olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Saponinler, triterpenler ve steroid aglikonlar ile birlikte şeker yapısıyla birleşmiş büyük yapılu bileşiklerdir. Steroid saponinler ve triterpen saponinler olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Bu bileşikler suda çözünebilirken, eterde çözünememekte ve glikozidlerde olduğu gibi hidrolizleri sonucunda ortama aglikonları vermektelerdir. Yüksek seviyede zehirli oldukları, kanı hemoliz ettikleri ve büyükbaş hayvanlarda zehirlenmelere sebep oldukları bilinmektedir. Acı-ekşi tadları olup, müköz membranda irritasyona neden olmaktadır. Saponinlerin hipolipidemik ve antikanser aktivite gibi önemli terapötik etkileri de bulunmaktadır (Doughari, 2012).

### 1.1.4. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk tadını ve renklerini verirler. Bazı fenolik bileşikler ise acı tadın oluşmasında da rol almaktadırlar. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar. Fenolik bileşikler üzerindeki araştırmalar, gıdaların tat oluşumunda aldıkları önemli rol, meyve sularında bulanıklık ve tortu oluşturmaları, bazı meyve ve sebzelerin renklerinin oluşmasında veya renk değişimlerinin ortaya çıkmasında aldıkları roller (Davidek vd., 1990), özellikle meyve sularında saflık kriteri olarak rol oynamaları (Simon vd., 1992), insan sağlığı üzerindeki etkileri (Corner vd., 2006) ve ilaç bilimi açısından önem taşımaları nedeni ile oldukça fazladır (Pierson ve Reddy, 1982). Meyvelerdeki fenolik bileşik kompozisyonları; büyüme, olgunlaşma ve depolamadaki çevresel şartlar, olgunlaşma derecesi, çeşit ve türün bir fonksiyonu olarak nitelik ve miktar bakımından önemli farklılık göstermektedirler (Simon vd., 1992). Fenolikler başlıca; benzoik asitin (C-C) hidroksilli türevleri olan fenolik asitler, sinamik asitlerden türeyen fenolik asitler ve glikozidik fenilpropanoid esterleri olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ancak daha yaygın olarak yapılan

sınıflandırılmaya göre gıdalardaki fenolik bileşikler; fenolik asitler (fenolik karbonik asitler) ve flavonoidler (flavan türevleri) olarak sınıflandırılmaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2001). Ayrı bir sınıflandırmaya göre de; fenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kumarinler ve stilbenler olarak sınıflandırılmaktadır (Huang vd., 2009). Kafeik asit bilinen en yaygın fenolik bileşiklerden bir tanesidir. Doğal antioksidanların kaynakları olan fenolikler nutrasötik (temel besleyici özelliğine ilave olarak sağlık yararları sağlayan gıda maddeleri) olarak kullanılmaktadırlar. Elma, yeşil çay ve kırmızı şarap gibi birçok besinde bulunabilen bu bileşikler, kalp rahatsızlıkları, antienflamatuar etki ve hatta kanser tedavisinde kullanılabilirlerdir.

#### **1.1.4.1. Tanenler**

Tanenler polifenolik bileşikler olup, kolza, bakla, çay ve sorgum gibi bitkilerden elde edilen, açık sarı-kahverengi toz, pul ya da süngersi bir kütle halindeki biçimsiz (amorf) maddelerdir. Tanenler genellikle bitkilerin kök, odun, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunur. Tanenler kimyasal açıdan, hidroliz olabilen tanenler ve kondanse tanenler olmak üzere iki ana grupta incelenir. Birinci grupta yer alan tanenler bir asit ya da enzim eşliğinde hidroliz olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi, suda çözünebilen bileşikler verirler. Reaksiyona girdiklerinde asidik özellik göstermelerinin nedeni fenoliklerin ve karboksilik grupların varlığından kaynaklanmaktadır (Doughari, 2012). Suda az, alkol ve asetonda iyi çözünmekte ve tanen özelliklerinden dolayı bileşiklerini bağlayabilmektedirler. Protein, karbohidrat, jelatin ve alkaloidlerle kompleks formlar oluşturmaktadırlar. Başlıca kullanım alanı olan dericilik ve boyacılık dışında tanenler şarap ve biranın berraklaştırılmasında, petrol kuyularındaki sondaj çamurunun akışkanlığının artırılmasında ve buhar kazanlarının çeperlerinde birikinti oluşumunun engellenmesinde kullanılır. Tıpta damarları ve mukozayı büzücü etkilerinden ötürü bademcik, farenjit, basur ve bazı deri hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlarının bileşimine girer. Tanenler antiseptik olarak da kullanılmaktadırlar ve bu aktiviteleri içerdikleri fenolik gruplardan kaynaklanmaktadır. Sentetik tannik asitler egzama tedavisi kapsamında çeşitli preparatlar içinde bulunurlar (Anonim, Tanen. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Tanen>, Erişim tarihi, 24.10.2014).

### 1.1.4.2. Flavonoidler

Flavonoidler polifenollerin önemli gruplarından birisidir. Yapısında birden fazla benzen halkası bulunduran ve birçok kaynakta antioksidan ya da serbest radikal süpürücü olarak kullanılan bileşiklerdir. Bu bileşikler flavan olarak bilinen ana bileşenlerden meydana gelmektedirler. 4000'in üzerinde flavonoidin olduğu ve bunlardan bazılarının yüksek bitkilerde pigment olarak bulunduğu bilinmektedir. Kuersetin, kaemferol ve kuersitrin bitkilerin %70'inde bulunan yaygın flavonoidlerdir. Flavonoidlerin bilinen diğer grupları, flavonlar, dihidroflavonlar, flavanlar, flavonoller, antosiyanidinler, proantosiyandinler, kalşonlar, kateşinler ve lökoantosiyanidinlerdir (Doughari, 2012). Doğadaki flavonoidler genellikle bir OH grubu bağlanmış bir şeker parçası ile glikositleri serbest yada konjuge formda bulunurlar. En önemli gıda kaynakları maydanoz, kekik, kiraz, zeytin, domates, çilek, elma, kimyon ve buğday gibi besinlerde bulunurlar. Flavonoidler ve sinamik asitler en önemli antioksidan ve serbest radikal tutucu ve zincir kırıcılar olarak bilinmektedirler (Shahidi ve Nacz, 1995). Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat ve tert-bütillhidrokinon (TBHQ), besin maddelerinde oksidatif acılaşmaya karşı kullanılmaktadır. Flavonoidlerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Flavonoidlerin güçlü antioksidan özelliği yanında bazı kronik hastalıkların riskini de azalttığı bilinmektedir (Huang, vd., 2009). Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin bir çoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavanoid radikallerinin stabilitesini ve böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El, 1997). Fenolik maddelerin sağlıkla ilişkisinde toplam fenolik miktarı veya flavanol, flavon gibi alt grupların miktarından çok bu maddelerin türevleri ve her birinin miktarının önemli olduğu belirtilmiştir (Cemeroğlu ve Cemeroğlu, 1998). Fenolik maddelerin büyük olasılıkla hücre metabolizmasında rol alan regülasyon faktörleri olduğu belirtilmektedir (Schobinger, 1988). Bazı çalışmalar da flavonoidlerin mutajen (Fieschi vd., 1989) ve kanserojen olduğu belirtilmekle birlikte bir çok çalışmada elde edilen bulgular flavonoidlerin antimutajen ve antikanserojen olduğunu



desteklemektedir (Hertog vd., 1992, Shahidi ve Naczki, 1995, Cemeroğlu ve Cemeroğlu, 1998, Wanasundara ve Shahidi, 1998).

### **1.1.4.3. Fenolik Asitler**

Fenolik asitler sinamik asitler (Hidroksinamik asitler) ve benzoik asitler (hidroksibenzoik asitler) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Fenolik asitler, genel olarak serbest halde bulunmamaktadır. Karboksil grupları karbonhidratlar, glikozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilmekte ve alkollerle fenol esterleri, amino bileşikleri ile de amidleri oluşturmaktadırlar. Fenolik asitlerin, fenolik hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle bileşerek glikozitleri oluşturmaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2001).

### **Hidroksibenzoik Asitler**

Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilpropan yapısına sahip ve renksiz bileşiklerdir (Cemeroğlu vd., 2001). Benzoik asit türevleri sinamik asit türevlerine göre çok daha az miktarda bulunmaktadırlar veya hiç bulunmazlar. Hidroksibenzoik asitler bağlı durumda bulunurlar. Bunlar, lignin ve hidrolize edilebilir tanen gibi karmaşık yapıların bileşenidirler. Hidroksibenzoik asitler ayrıca organik asit ya da şeker türevi halinde de bulunabilirler (Schuster ve Herrman, 1985).

### **Hidroksinamik Asitler**

Hidroksinamik asitler C6-C3 fenilpropan yapısında bileşiklerdir ve fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellikler göstermektedir. Meyve ve sebzelerde en yaygın bulunan hidroksinamik asitler; klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asittir (Cemeroğlu vd., 2001). Birçok meyvede kafeik asit en baskın hidroksinamik asittir ve erik, elma, kayısı, yaban mersini ve domateste bulunan toplam hidroksinamik asitin %75'ini oluşturmaktadır. Sitrus meyveleri ve ananasta ise baskın hidroksinamik asit, p-kumarik asittir (Shahidi ve Naczki, 1995).

Hidroksinamik asitler genelde bağlı halde nadiren serbest formda bulunurlar. Hidroksinamik asitler hücre duvarı polimerlerine bağlı olabilecekleri gibi, çoğunlukla bitkilerde kuinik asit ve karboksilli asitlerle ester halde veya şekerlerle şeker türevleri halinde de bulunabilmektedir. Ancak fenolik hidroksil gruplarıyla

glikolise olmazlar. Sebze ve meyvelerin dondurulma sterilizasyon şarap üretiminde fermentasyon işlemleri bu ürünlerde serbest hidroksisinnamik asit oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Özellikle Hidroksisinnamik asitin esterleri çok yaygındır (Belitz ve Grosch, 1999; Köksal, 2008).

Quinik asitin kafeik asit esteri olan klorojenik asit meyvelerde yaygın hatta tek baskın fenolik bileşik olabilen önemli bir hidroksisinnamik asit türevidir. IUPAC tarafından belirlenen sisteme göre 3-kafeoil-kuinik asit, noeklorojenik asit; 5-kafeoil-kuinik asit, klorojenik asit; 4-kafeoil-kuinik asit, kriptomklorojenik asit olarak adlandırılmıştır. Hidroksisinnamik asitlerin en önemli grubunu klorojenik asit oluşturmaktadır (Belitz ve Grosch, 1999; Köksal, 2008).

### **Klorojenik Asit**

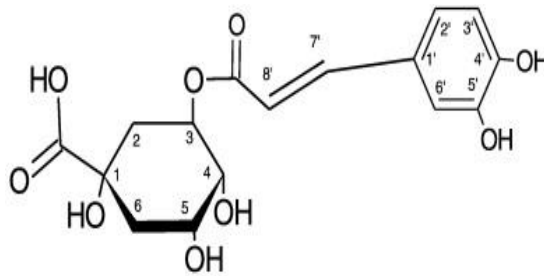
Kahve, kökboyasıgiller (Rubiaceae) familyasının *Coffea* cinsinde yer alan bir ağaç olup, çiçekleri beyaz ve hoş kokulu, kirazı andıran kırmızı meyvesinin içinde iki çekirdek bulunan, dikildikten yaklaşık 3 yıl sonra meyve vermeye başlayan ve 30-40 yıl boyunca aralıksız meyve veren bir ağaçtır. Doğal haline bırakıldığında 8-10 metreye kadar uzayan ağaç, meyvelerin kolay toplanabilmesi için sürekli budanarak 4-5 metre uzunluğunda bir çalı boyutunda tutulur. Bol yağış alan, ortalama sıcaklığın 18-24°C arasında bulunduğu ve don olayının görülmediği, ekvatorun 25° Kuzey'i - 30° Güney'i arasındaki kuşakta yetişir. Soğukta ağaç ölür, ayrıca ani ısı değişiklikleri de ağaca zarar verir. Doğada pek çok yetişen türü olmasına rağmen sadece *Coffea arabica* ve *Coffea robusta*'nın tarımı yapılmaktadır (Anonim, Kahve. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kahve>, Erişim tarihi: 10.05.2015) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Kahve ağacı (*Coffea arabica*)

(<http://www.travelcostarica.nu/images/stories/IT/smallplants/plantscoffeedtree01.JPG>, Erişim tarihi: 27.10.2015)

Yaban mersini, üzüm, elma, marul, brokoli, ıspanak, kiraz, kivi, enginar, erik gibi meyve ve sebzelerde ayrıca kepek ve yumurta gibi gıdalarda ve son yıllarda tütün yaprağında ve kahvenin içinde de bulunan ana bileşik olan klorojenik asit [1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)], hem alifatik hem de aromatik grupları içermektedir (Şekil 1.3). Kahve içerisindeki temel polifenolik bileşen olan klorojenik asitler; kafeoil kinik asit (yaklaşık %86'sı) ve daha az olarak feruloil kinik asit ve dikafeoil kinik asittir. Klorojenik asit, sinamik asit olarak bilinen fenolik bileşikler ve quinic asit arasında oluşan esterler sınıfına girer. Hidroksisinnamik asitlerin meyve ve sebzelerdeki miktarı düşüktür ve genellikle serbest formda bulunmaktadır ve çoğunlukla diğer bileşiklerle ester oluşturmuş formdadır (Spanos ve Wrolstad 1992). Bunlardan kafeik asidin quinic asitle oluşturduğu esterler özellikle önemlidir.



Şekil 1.3. Klorojenik asidin açık formülü

([https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid), Erişim Tarihi:04.11.2015)

Arabica tipi kahve (*Coffea arabica*)'nın bir fincanında, hazırlama yöntemine göre değişmekle beraber, 70-200 mg klorojenik asit bulunmaktadır. Kahve tohumlarının kavrulması ile klorojenik asit miktarının ve bileşiminin değiştiği bilinmektedir. Yeşil kahve ve kavrulmuş kahveden hazırlanan içeceklerde klorojenik asit içeriği bakımından değişiklikler ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bunun nedenin yeşil kahvenin kavrulması esnasında ısı ile oluşan reaksiyon olduğu bildirilmiştir (Iwai vd., 2004). Yeşil kahve çekirdeklerinin 1 gramında 34,4 – 41,6 mg klorojenik asit bulunurken, kavrulmuş kahvenin 1 gramda 2-7 mg klorojenik asit bulunmaktadır. 230 derecede 12 dakika boyunca kavru lan kahvede klorojenik asidin hemen hemen yarısı kayba uğrarken, 250 derecede 21 dakika kavru lan kahvede klorojenik asit neredeyse tamamen tükenmektedir (Anonim, Kahve. <http://www.dunyayagida.com.tr>, Erişim Tarihi: 04.06.2014).

Normal sınırlarda bir kahve tüketicisinin günde 0,5-1 gram civarında klorojenik asit aldığı, fazla kahve tüketmeyenlerde ise bu miktarın 100 miligram civarında olduğu hesaplanmıştır (Anonim, Kahve.<http://www.pharmetic.org/fitoterapi/yesil-kahve-tohumu-zayiflatirmi.html>, Erişim Tarihi:13.11.2015). Klorojenik asit'in vücuttaki emilimi farklı metabolik yollarla gerçekleşir. İlki mide de pasif emilimdir. Midenin asidik ortamında pasif difüzyon ile iyonik olmadan absorbe edilir. pH' nın 7 olduğu ince bağırsakta ise pasif difüzyon olarak emilimi gerçekleşmez. Bu yüzden ince bağırsakta aktif taşıma ile absorbe edilir. İn vitro çalışmalarda ince bağırsakta klorojenik asidin emilimi Na<sup>+</sup> bağlı transport mekanizmasıyla açıklanmıştır. Klorojenik asit, ince bağırsakta glikoz emilimini ve karaciğerden dolaşıma glikoz salınımını engeller. Bu da kandaki glikoz seviyesinin azalmasına ve vücudun enerji için karbonhidratların yerine yağ hücrelerini kullanmasına yol açar ve sonuç olarak vücutta yağ kaybı sağlanır. Her iki metabolizma da klorojenik asidin emiliminde önemli rol oynamaktadır (Olthof vd., 2001).

Yapılan çalışmalar, klorojenik asidin sitotoksik özelliğinden dolayı meme, prostat, kolon ve lösemi gibi kanser türlerinde, kanserli hücrelerin büyümesini engelleyerek antikanser özelliğe sahip olduğunu da göstermektedir (Naso vd., 2014). Yapılan bazı çalışmalar ile klorojenik asit'in, kardiyovasküler

rahatsızlıkların, Tip II diyabetin, Alzheimer'ın, iltihabi rahatsızlıkların oluşum riskini azalttığı belirlenmiştir.

## 1.2. Yeşil Kahve

Yeşil kahve, normal kahve gibi kavrulmadığı için de doğal etkilerini koruyan bir kahve çeşididir (Şekil 1.4). Yeşil kahve, klorojenik asit, kinik asit ve kafeik asit gibi bileşiklerin ana kaynağıdır. Ayrıca Çin tıbbında kullanılan *Lonicera japonica* Thunb'un çiçekleri ve tomurcukları, *Eucommia ulmodies*'in yaprakları klorojenik asit bakımından zengindir. (Upadhyay vd., 2012).



Şekil 1.4. Yeşil kahve (<http://puregreencoffee.com/articles/green-coffee-extract/>, Erişim tarihi 27.10.2015)

Yeşil kahve çekirdekleri klorojenik asit açısından son derece zengindir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Yeşil kahve çekirdekleri (<http://www.dunyagida.com.tr>, Erişim Tarihi: 06.06.2014)

Kahvenin kavrulması ile birlikte kahve çekirdeklerindeki klorojenik asit miktarı azalır. Yeşil kahve kavrulmadığı için yüksek antioksidan özellik gösteren klorojenik asit miktarı yüksektir. Klorojenik asitlerin kuvvetli antioksidan özellikleri bulunduğu, deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmalarda sağlıklı ve obez hayvanlarda lipid ve glikoz metabolizmasını düzenlediği, spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürdüğü gözlemlenmiştir. Kan basıncındaki benzer etkilerin hafif hipertansif deneklerde zengin polifenol içerikli kahve özütü verilmesiyle de sağlanabildiği bildirilmiştir. Son zamanlarda klorojenik asidin lipojenezi sağlayan enzimler üzerinde etkili olarak normal dokularda yağ birikimini azaltabileceği yönünde bazı deneysel bulgular dikkati çekmektedir. Yapılan çalışmalarda klorojenik asitin, kardiyovasküler rahatsızlıkların, Tip II diyabetin, Alzheimer'ın, iltihabi rahatsızlıkların oluşum riskini azalttığı ayrıca kanser hücrelerinin çoğalmasını da engellediği bilinmektedir. Yine yeşil kahve tüketimi ile ilgili yapılan çalışmalar, yeşil kahvenin insan ve hayvanlarda, yüksek tansiyonu düşürdüğünü, vücutta yağ birikmesini ve kilo alımını engellediğini ve glikoz metabolizmasını düzenlediğini göstermiştir. Diyabet hastalarında yeşil kahvenin kan şekerini düşürücü etkisi nedeni ile diyabet ilaç dozları bu durum göz önüne alınarak ayarlanmalıdır. Huzursuz bağırsak sendromunda kafein bu hastalığı tetiklediği için fazla miktarda yeşil kahve tüketimi de bu rahatsızlığın gelişimine ve diyareye yol açabilen bir faktör olabilmektedir. Osteoporoz (kemik erimesi) durumunda da kafeinin olumsuz etkisi bulunmakta olup, vücuttan kalsiyumun atılımını arttırması sebebiyle aşırı miktarda yeşil kahve tüketiminin osteoporozu arttırabileceği belirtilmektedir (Farah vd., 2008, Anonim, Yeşil kahve. <http://www.saglikafiyet.com/Yesil-Kahvenin-Faydalari,223.html>, Erişim tarihi: 15.02.2015).

Günümüzde gerek dünyada ve gerekse ülkemizde kanserin artış göstermesi, kansere karşı kullanılacak sentez yoluyla ya da tıbbi bitkilerden izole edilmek suretiyle elde edilecek yeni moleküllere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Tıbbi bitkilerden elde edilen ekstrelerin ve bu ekstrelerden elde edilen moleküllerin antikanser aktivitelerinin araştırılması günümüzde oldukça fazla önem kazanmıştır (Smith vd, 2001, Sreenivasan vd., 2003, Hostanska vd., 2004, Sharma vd., 2004, Afaq vd., 2004, Sreenivasan vd., 2006, Stagos vd., 2012, Ziech vd., 2012; Özenoğlu vd., 2013).

### 1.3. Kanser

Kanser günümüzde ciddi bir sağlık problemidir. Kanserin tanınması, engelleme çabaları ve tedavideki modern ilerlemelere rağmen, bu hastalık, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyerek hastaların yaşam kalitesini düşürmekte ve ölümlere neden olmaktadır. Her yıl dünyada yaklaşık 11 milyon kişi kansere yakalanmaktadır. Halen dünyada yaklaşık 25 milyon kanser hastası olduğu bilinmektedir. Dünya'daki ölüm nedenlerinin %12.5'i kanserden kaynaklandığı bilinmektedir. Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de kalp hastalıklarından sonra ikinci ölümcül nedenidir (Türkiye'de ölüm sebebi olarak kalp rahatsızlıklarının oranı %42 iken, kanser görülme sıklığı %12.9'dur) (Bilir, 2008). Sağlık Bakanlığı'nın yayınladığı 2014 yılı resmi verilerine göre, ülkemizde her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır (Anonim, Kanser istatistiği. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1672-2012-2013-2014-kanser-istatistikleri.html>, Erişim Tarihi: 17.02.2015) (Çizelge 1). Dünyada en sık görülen kanser türleri sıklık sırasına göre; mide, akciğer, meme, kolon ve rektum, serviks ve orofarenks kanserleri iken (Kelle, 2007); ülkemizde en sık görülen kanser çeşitleri; erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, yumurtalık, mide ve pankreas kanseri'dir.

Çizelge 1.1. Uluslararası Kansere Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu (Deri dışında kalan kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları) (Anonim, <http://www.iacr.com.fr/>, Erişim Tarihi: 16.11.2015)

	<b>ERKEK*</b>	<b>KADIN*</b>
<b>Dünya</b>	205,4	165,3
<b>IARC'a üye 24 ülke</b>	236,4	192,5
<b>AB (28 ülke)</b>	314,9	243,2
<b>ABD</b>	347,0	297,4
<b>Türkiye**</b>	23,4	150,9

\*Yaşa göre standardize edilmiş hız 100.000 kişide \*\* Türkiye Birleşik Veri Tabanı

Epidemiyolojik verilere göre kanserin görülme sıklığı çevreden (kirlilik, kimyasal maddeler, X ve UV ışınları gibi), yaşama biçiminden (sigara ve alkol alışkanlığı gibi) ve beslenme şekline (antioksidan faktörlerin, vitaminlerin, lifli veya yağlı

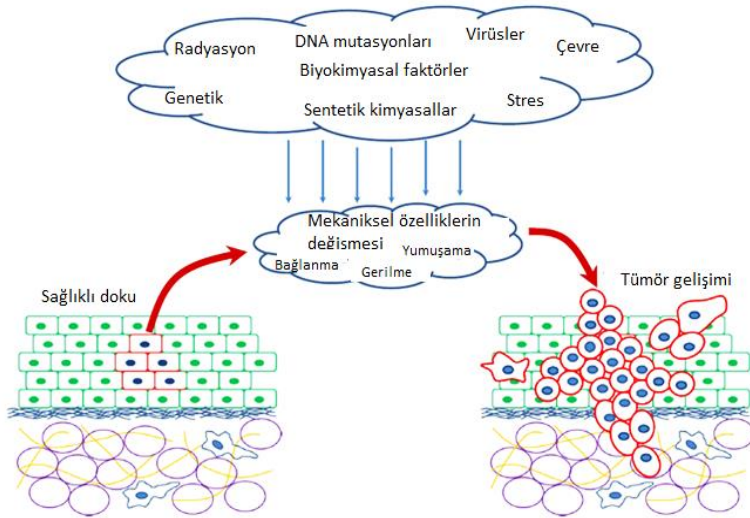
yiyeceklerin varlığı veya yokluğu gibi) etkilenmektedir (Bahçeci, 1999). Ayrıca kanseri tetikleyen başka faktörler de bulunmaktadır. Bunlar arasında;

1. X-ışınları, gama ışınları, ultraviyole ışınlarının etkisi altında kalan doku hücrelerinde oluşan iyonlar yüksek derecede reaktif olduklarından, DNA zincirini kopararak birçok mutasyonun oluşmasına sebep olmaktadır.

2. Anilin boya ve türevleri gibi belli tipteki kimyasal maddelerin mutasyon oluşturma etkisi oldukça fazladır.

3. Fiziksel olarak tahriş edici maddeler kansere neden olmaktadır. Tahriş edici maddeye temas sonucu dokuda oluşan harabiyet, hızlı bir mitotik çoğalma ile zamanla kanserli doku oluşturabilmektedir.

4. Birçok ailede kansere yakalanmaya karşı kalıtsal eğilim vardır. Özellikle kansere yatkın olan ailelerin kalıtsal genomlarında bir veya daha fazla mutasyona uğramış gen bulunmaktadır. Bu yüzden böyle bireylerde kanser büyümeye başlamadan önce, çok daha az sayıda ilave mutasyon olması kanseri başlatmak için yeterlidir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Kansere neden olan faktörler

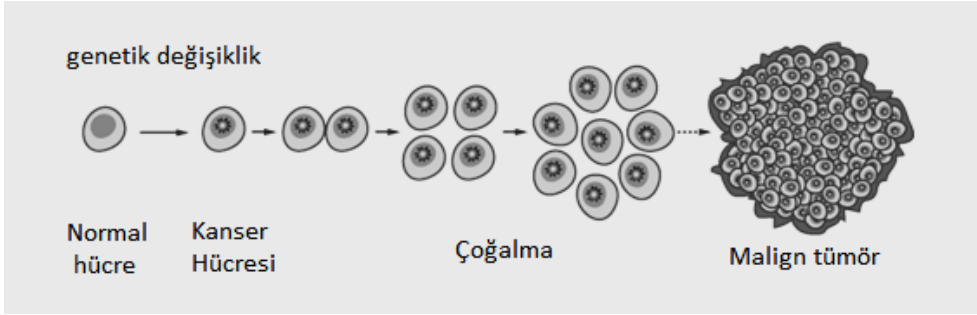
(<http://www.che.utexas.edu/2012/01/25/researchers-suggest-a-proximate-cause-of-cancer/>'den düzenlenerek. Erişim tarihi: 26.10.2015)



5. Laboratuvar hayvanlarında lösemi dahil bazı kanser tiplerinin oluşmasına belli tipte virüslerin neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumu iki yoldan açıklamak mümkündür: DNA virüslerinde, virüse ait olan DNA zinciri direkt olarak kromozomlardan birine yerleşmekte ve mutasyona sebep olarak, kanseri oluşturmaktadır. RNA virüslerinde ise, bu virüslerin bazıları ters transkriptaz enzimi taşırlar. Bu enzim DNA'nın RNA'dan kopyalama yapmasını sağlamaktadır. Bu şekilde kopyalanan gen, hayvan hücre genomuna kendini yerleştirerek kanserin oluşmasına yol açmaktadır (Guyton ve Hall, 2001; Özenoğlu vd., 2013).

Kanser hücreleri aşırı ve zamansız bir şekilde çoğalırlar ve sonuçta uzaktaki dokuları bile istila ederler (Merlo vd., 2006; Özenoğlu vd., 2013). Birçok kanser sadece bir hücreden ya da az sayıda hücreden ortaya çıkmaktadır (Nowell, 1976; Özenoğlu vd., 2013). Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre mitozunu kontrol eden genlerinin mutasyona uğraması veya anormal aktivasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır (Guyton ve Hall, 2001; Özenoğlu vd., 2013). Kanser, DNA dizisinde mutasyon sonucunda ortaya çıkan küçük bir değişiklik meydana geldiği zaman başlayabilmektedir (Herceg ve Hainaut, 2007; Özenoğlu vd., 2013). Kanser tiplerinin bazı formlarının hücre döngüsünde düzenlenemeyen özellikte olmasından dolayı, gen mutasyonları hücre döngüsünü etkileyerek kanser gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hücre döngüsü kontrolü kaybının sıklıkla gözleendiği yerlerden biri, restriksiyon noktasıdır. Restriksiyon noktası, hücre döngüsünün G1 fazının sonlarında bulunan anahtar bir kontrol noktasıdır ve hücre bölünmeden önce DNA replikasyonunun yönlendirildiği yerdir. Bu kontrol noktasındaki hatalar önemli sonuçlar doğurmaktadır. İlk olarak, bu kontrol noktasındaki hatalar önemli sonuçlar doğurmaktadır. İlk olarak, bu kontrol noktasının kontrolünün kaybı hücreyi anormal replikasyona yönlendirir. Bu kontrol noktası aynı zamanda kanser şekillenmesinde önemli olan iki yolağın bağlantı noktasıdır. pRb yolağı adını pRb tümör baskılayıcı proteinden almaktadır. pRb normalde hücrede fosforile değildir ve aktiftir. Aktif durumdaki pRb, hücre bölünmesini önlemektedir. pRb proteini fosforlandığında (pRb) inaktif hale gelir ve hücre bölünmesine izin verir. pRb oluşumunu etkileyen mutasyonlar pRb inaktivasyonunu etkiler. Bu mutasyonu taşıyan hücreler, fonksiyonel G1 restriksiyon noktasına sahip değildirler. G1'de kalmak ya da G0'a girmek için yetersizdirler, devamlı ve yetersiz replikasyon yaparlar. Diğer bir yolağı, c-Myc yolağıdır ve adını c-Myc proto-onkogeninden almaktadır. c-Myc yolağı hücre bir mitojen ile uyarıldığında aktiftir. c-Myc geninin ürünü bir transkripsiyon

faktörüdür ve bu protein diğer genlerin ifade edilmesi için bir sinyal olarak işlev görmektedir. c-Myc, proto-onkogen olarak adlandırılmaktadır. Çünkü mutasyonlar c-Myc aktivitesini artırarak hücre bölünmesinde artışa ve kansere neden olmaktadır (Anonim, 2013; Özenoğlu vd., 2013). Kanser hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılı halde bulunmaktadır. İnsan DNA'sı 23000 kadar gen içermektedir. Bu genlerin birkaç bin kadarı (3000-5000) kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, anormal bir proteinin üretimine (işlev kazanmış yada kaybetmiş), kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine (çok az yada çok fazla), veya bir proteinin hiç üretilmemesine neden olabilmektedir. Örneğin, KRAS geninde meydana gelen bir mutasyon, hücre zarının hemen içinde bulunan küçük bir proteinin, hücre büyümesinin sinyalini artıran bir protein halini almasına neden olmaktadır. Bu protein normalde hücre yüzeyindeki büyüme faktörlerinin reseptörleri ile hücre çekirdeğine hücre bölünmesini başlatmak için büyüme sinyalleri gönderen moleküler sistemler arasında bir ara sinyal maddesi olarak çalışmaktadır. KRAS geni mutasyon geçirdiğinde, buna karşılık gelen protein "açık" pozisyonuna kilitlenmiş bir şalter gibi davranarak, sürekli bir hücre bölünmesi sinyali vermektedir. KRAS mutasyonlarının kolorektal kanserinde (vakaların %30-40'ında) ya da akciğer adenokarsinomalarında (vakaların % 20-30'unda) gibi birçok kanser türünde yaygın olduğu bilinmektedir. Bu şekilde etkinleşmiş bir gen, hücre çoğalmasını hızlandırmaktadır. Tersine TP53 gibi bazı genler ise, etkin olmadıklarında kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bu gen yanlış hücre bölünmesini engellemek için doğal bir "acil fren" olarak çalışmaktadır. Bu gendeki bir mutasyon, proteini bozar ve proteinde gerektiğinde hücrelerin çoğalmasını durduramaz. TP53 mutasyonları hemen hemen her kanser çeşidinde bulunmaktadır. İşlevini kaybetmesi nedeniyle kanser gelişimine katkıda bulunan böyle bir gen, tümör baskılayıcı olarak adlandırılır, çünkü normal koşullarda etkin ürünleri kanser gelişimini baskılayan bir fren olarak çalışmaktadır (Olivier vd., 2008). Mutasyonlar (erken gelişme safhalarında vücut ve eşey hatları ayrıldıktan sonra) somatik bir hücre hattında sonradan ortaya çıkar. Zaman içinde çok sayıda somatik bir mutasyon vücut hücrelerinde birikir, çok sayıda genin fonksiyonunu değiştirir veya durdurur, sonunda kanserli bir hücre üretilir. Bu hücrenin yavru hücreleri, kanserli bir hücre klonuna dönüşür (Şekil 1.7).

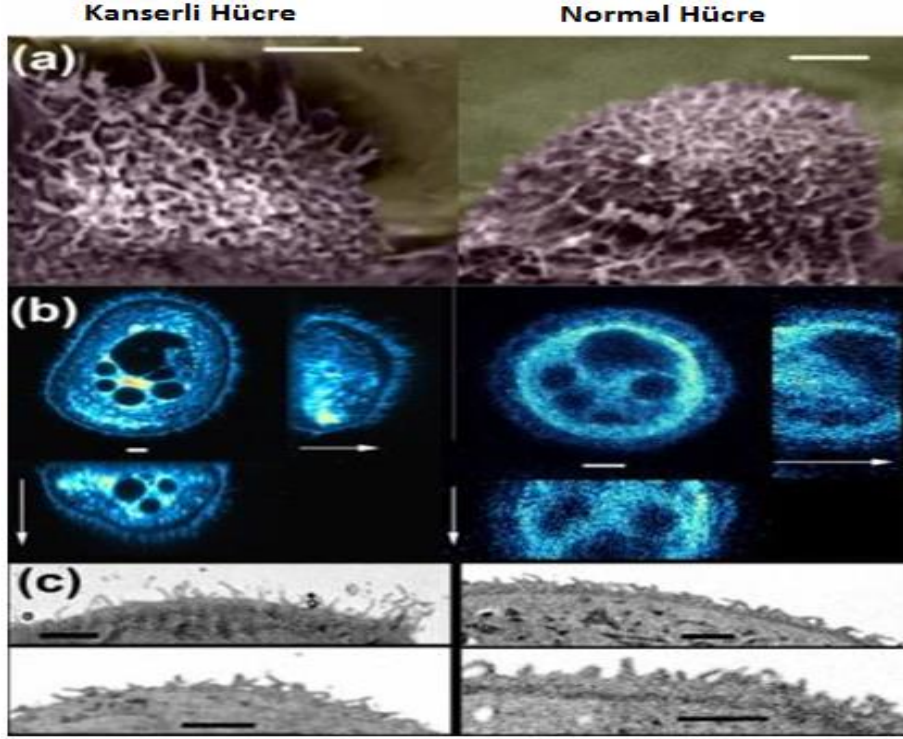


Şekil 1.7. Kanserin gelişimi (<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/cancer-cell-development/?region=on>'den düzenlenerek. Erişim tarihi 26.10.2015)

Tüm kanser hücreleri iki ortak özelliği paylaşırlar;

1. Anormal hücre büyümesi ve bölünmesi (hücre çoğalması)
2. Hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılması ve istilası (metastaz) (Klug ve Cummings, 2011; Özenoğlu vd. 2013).

Normal hücre ile kanser hücresi arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Kanser hücresi, hücrenin normal büyüme sınırına uymaz. Bunun nedeni tahminen normal hücrelerin büyümesi için gerekli büyüme faktörlerine bu hücrelerin gereksinimlerinin olmamasıdır. Normal hücrelere göre kanser hücreleri birbirlerine çok daha az tutunurlar. Bu yüzden bu hücrelerin dokular arasında dolaşmaya eğilimleri vardır. Kan dolaşımına girerek bütün vücuda dağılırlar, sayısız yeni kanser odakları oluştururlar (Şekil 1.8).

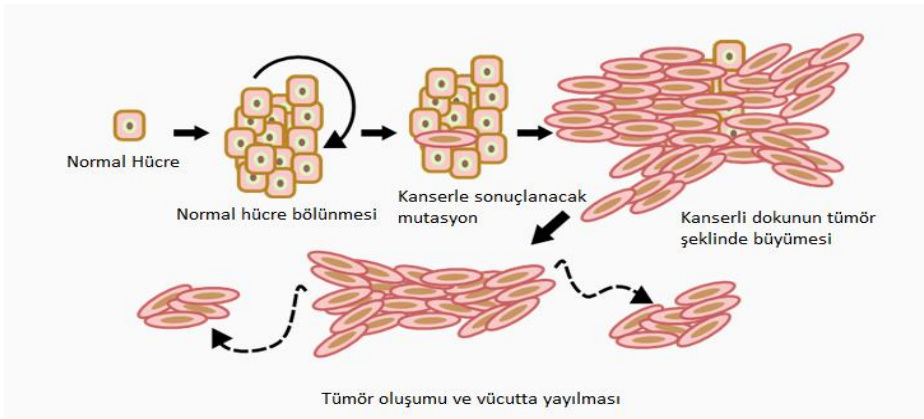


Şekil 1.8. İnsan servikal kanseri hücresi ve normal hücre epitelinde taramalı elektron mikroskobu görüntüsü a: Kanserli ve normal hücrelerin yüzeyindeki mikrovilluslar, b: zarda bulunan boşlukların kenarındaki mikrovilluslar c: hücre kenarından ince kesitlerde mikrovillusların yapısı ([http://www.clarkson.edu/camp/reports\\_publications/june09/page3.html](http://www.clarkson.edu/camp/reports_publications/june09/page3.html). Erişim tarihi 26.10.2015)

Bazı kanser hücreleri, çok sayıda damarların oluşmasına neden olacak anjiyogenik faktörleri üretirler ve böylelikle kanserin büyümesi için ihtiyaç duyulan besin maddelerini sağlarlar (Guyton ve Hall, 2001; Özenoğlu vd., 2013). Bazı kanser türleri, oksijen merkezli serbest radikallerden ve diğer reaktif oksijen türevlerinden kaynaklanmaktadır, çünkü bu tür serbest radikallerin normalden fazla sentezlenmesi, lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasarlara neden olmaktadır. Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde, DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişikliklerine yol açmakta ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir. DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazları ve şeker

molekülleri ile reaksiyona giren veya kromozomların yapısında bulunan proteinlerle çarpaz bağlar oluşturan karsinojen ajanlar, DNA molekülündeki baz delesyonları, zincir kırıkları, inversiyon gibi yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Mutasyonlarla meydana gelen değişiklikler sonucunda DNA'nın replikasyonu, genlerin transkripsiyonu ve translokasyonu veya aktivasyonunda değişiklikler oluşmaktadır. Yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler sonucu ekspresyonlarındaki ya da aktivitelerindeki düzenlemenin bozulmasıyla kanser oluşumunu kolaylaştıran bu genlere "onkogen" adı verilmektedir. Onkogenler genellikle mutasyon ya da başka nedenlerle yeni bir işlev veya aktivite kazanarak otozomal dominant etki göstermektedir (Herceg ve Hainaut, 2007).

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan, denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmanın kombinasyonudur (Şekil 1.9). Kültür ortamında normal hücreler komşu hücrelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler. Bu yapışma (adhezyon) noktalarında hücrelerde elektronca yoğun bir plak oluşur. Bununla birlikte, hücrelerin ameboid uzantılarında yavaşlama ve durma görülür (kontakt inhibisyon). Bu şekilde, hücre bölünmesi kontrol edilir. Deneysel olarak, normal hücreler bir kültür ortamında kendilerine sağlanan ortam şartları ne kadar iyi olursa olsun kontak inhibisyon nedeniyle tek tabaka oluşturduktan sonra sınırlı sayıda bölünme olduğu için, daha fazla çoğalmazlar. Fakat, kanser hücreleri sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar (Anonim, Kanser. <http://www.genetikbilimi.com>, Erişim Tarihi: 13.11.2015).



Şekil 1.9. Kanserlin büyümesi ve yayılması

(<https://honchemistry.wikispaces.com/How+Chemotherapy+Kills+Cancerous+Cells+-+Kendinden+Düzenlenerek>. Erişim tarihi: 26.10.2015)

Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik kontrolünü kaybederse çok hücreli bir yığın iyi huylu tümör (benign tümör) oluşmaktadır. Bu tür tümörler ameliyatla alınabilmektedir. Buna rağmen, eğer tümördeki hücreler bu yapıdan kurtulabilme, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme ve ikinci tümörleri biçimlendirebilme yetisine sahip olmuşlarsa, o zaman kötü huylu tümör (malignant tümör) ortaya çıkmaktadır (Klug ve Cummings, 2011). Orijin doku, kansere ayırıcı karakterler vermektedir. Kanserlerin yaklaşık %85'i epitel hücrelerinden kaynaklanır ve "karsinoma" olarak sınıflandırılır. Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) kaynaklanan kanserler sarkoma, bezsel dokulardan kaynaklanan kanserler (meme gibi) ise adenokarsinoma olarak adlandırılmaktadır.

#### **1.4. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler**

Günümüzde karşılaştığımız en önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser tedavisinde ideal yaklaşım, tümör hücrelerinin seçici olarak çevredeki normal hücrelere zarar vermeden yok edilmesi, bulunduğu koşullar içerisindeki hastanın yaşam süresini ve yaşam kalitesini artırmaktır.

Kanser tedavisi kanserin tipine, yerleşimine, evresine, kişinin genel sağlık durumuna ve diğer faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterir. Kanserde hastanın kişisel durumuna ve ihtiyaçlarına göre biçimlendirilmiş farklı tedavi planları uygulanır. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan üç yöntem bulunmaktadır. Bunlar; cerrahi, kemoterapi (ilaç tedavisi) ve radyasyon tedavisidir (radyoterapi, ışın tedavisi). Bu tedavilerin birisi ya da birkaçı kombine edilerek uygulanır.

Cerrahi müdahale, uzun zamandan beri kanser tedavisinin temelini oluşturmuştur. Cerrahi müdahalenin hedefleri değişiktir. Cerrahi müdahale kanserin ölümcül olup olmadığının belirlenmesi, kanserli bir kitlenin vücuttan alınması veya kötü huylu hücrelerin vücudun diğer taraflarına yayılıp yayılmadığının öğrenilmesi için yapılabilir. Bazen de cerrahi müdahale, kanserli tümör kitlesinin hepsinin alınması mümkün değilse, doktorun kemoterapi veya radyasyon tedavisini daha etkili hale getirmek için bu kitlenin mümkün olduğunca fazla bölümünün alınması şeklinde yapılır. Kanser yayılmamış ise cerrahi müdahale daha başarılı olurken, çok fazla yayılmışsa cerrahi müdahale tedavide etkisiz olabilir (Anonim, Kanserde cerrahi müdahale. <http://www.hekimce.com>, Erişim Tarihi: 13.11.2015).

Radyoterapi olarak da adlandırılan radyasyon tedavisi, iyi ve kötü huylu tümörleri tedavi etmek için yüksek dozda iyonize radyasyonunun kullanılmasıdır. Radyasyon tedavisi, cerrahi müdahaleden sonra kalan kanser hücrelerini öldürmek veya cerrahi müdahale ile uzaklaştırılmayan tümör hücrelerini yok etmek için kullanılır (Kahraman, 2004).

Kemoterapi kanserli hücreleri öldürmek için kullanılan ilaç tedavi yöntemidir. Kemoterapinin amacı "antikanser" ilaçları olarak adlandırılan özel ilaçlar kullanılarak birincil tümör hücrelerini küçültmek, tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatmak ve metastaz yapabilecek kanser hücrelerini öldürmek ve hastanın yaşam niteliğini yükseltebilmek için ağrı ve benzeri belirtileri ortadan kaldırmak ya da hafifletmektir. Kemoterapötik ajanlar mekanizmalarına göre, hücrenin çekirdeğindeki DNA'ya direkt zarar verenler, DNA habercilerinin sentezini durduranlar ve mitotik iğleri bozan veya sentezlerini etkileyenler olmak üzere üç ana kategoriye ayrılırlar. Kemoterapide tek bir ilaç veya iki yada daha çok ilacın kombinasyonları kullanılır. İlaçlar genellikle, ağızdan veya kan damarlarına veya kasa enjekte edilerek alınır. Kemoterapi genellikle tedavi periyodundan sonra iyileşme periyodu ve daha sonra tekrar tedavi periyodu şeklinde dönüşümlü olarak yapılır.

Piyasada kullanılmakta olan ilaçların çoğu spesifik hedefleyici değildir ve birçok yan etkiye neden olmaktadır (Pişkin vd., 2002). Günümüzdeki araştırmalar, antikanser ilaçlarının kanserli hücreyi hedeflenmesini sağlayacak özelliklerin araştırılması üzerinde toplanmaktadır. Ancak kanser ilaçlarının kullanımını kısıtlayan önemli iki nokta bulunmaktadır. Bunlardan biri, kemoterapötik ilaçların sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkisi, diğeri ise; kanser hücrelerinin zaman içerisinde direnç kazanmasıdır. Kanser hücreleri, zamanla ilaçları etkisiz hale getiren ya da hücre dışına atan mekanizmalar geliştirmektedir. Kemoterapötik ilaçların etkilediği bazı moleküller şekil değiştirerek zararlı etkiden korunabilmektedir. Yani kanser hücreleri bir bakıma ilaçtan kaçabilme yeteneğindedir. Bu tür ilaç dirençlerinin gelişmesini önlemek için, tedaviye erken başlamak oldukça önemlidir. Kemoterapinin en uygun dozda verilmesi, kürlerin mümkün olduğunca kısa aralıklarla verilmesi, ilaçların olumsuz, yani toksik yan etkilerini en düşük düzeyde tutarken tedavinin etkinliğini de arttırmaktadır.

Çoklu ilaç tedavisi de sıklıkla kullanılan yöntemlerden birisidir. Kanser hücrelerini değişik mekanizmalarla öldüren ilaçlar birlikte kullanıldığında birbirinin etkisini artırmaktadırlar.

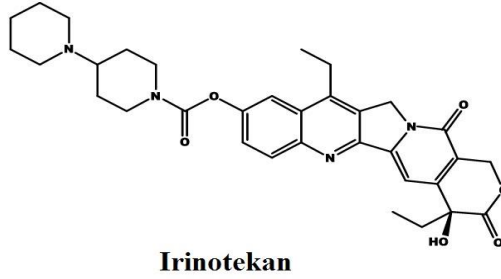
Kemoterapide uygulanan antikanser etkili ilaçların etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemekte ancak güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları belirtilmektedir (Borovskaya vd., 2006, Mork vd., 2007; Özenoğlu vd., 2013). Kullanılan bu ilaçlar kanser hücresi üzerine toksik etki gösterirken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki göstermekte ve etkilenen sağlıklı hücrelerin bulunduğu organların tahrip olmasına neden olmaktadır. Antikanser ilaçların istenmeyen bu yan etkileri ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda kanser kemoterapisi uygulanan hastalarda tedavide kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç oluştuğu da belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada kemoterapi kanserli hastaların % 80’de iyileşme görülürken, ancak % 20’lik bölümdeki hastaların kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirdiği ya da ölümcül toksisite oluşturduğu tespit edilmiştir (Korkmaz, 2002; Özenoğlu vd., 2013). Bu nedenlerden dolayı günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, kanser tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmektedir. Kanserlerin lazerle tedavisi, proton bombardımanı ile yok edilmesi, bağışıklık sistemini güçlendiren "immünoterapi" ve "gen tedavisi" en yeni tedavi yöntemlerindedir.

#### **1.4.1. İrinotekan (Tekamen, Tekamensar, Campto)**

Kemoterapide kullanılan ilaçların bir kısmı, tümör hücrelerini yok etmeye yönelik (sitotoksik), bir kısmı tümörün biyolojisine etki ederek tümörün gelişimini, çoğalmasını önleyen (sitostatik), diğerleri hormonlar ve bağışıklık yan etkilerini azaltmak veya yok etmek amacıyla kullanılır. Bu tür ilaçlardan biri olan İrinotekan (Camptosar), DNA topoizomeraaz I’in spesifik inhibitörü olup, metastatik ve tekrarlayan kolorektal kanserlerde çok sık kullanılan antineoplastik ve immunosupresif ilaçlardan bir tanesidir. Kamptotesinler spesifik olarak topoizomeraaz I enzimi ile etkileşir ve bu da DNA da geri dönüşümlü tek zincir kırıklarını indükleyerek torsiyonel gerilimi azaltır. İrinotekan uygulaması, kanser bulunan farelerde ve çeşitli histolojik tiplerdeki insan karsinoma ksenogreflerinde antitümör etkinlik göstermiştir. İrinotekan CE (karboksilesteraz) enzim ile hidroliz sonucunda aktif metaboliti olan SN-38’e dönüşmekte ve SN-38 topoizomeraaz



(TİP1) enzimini inhibe ederek DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engellemektedir. DNA topoizomeraz I'in inhibisyonu ile, tek zincirli DNA lezyonları meydana gelir ve DNA replikasyon sarmalı bloke olur. Bu durum hücrelerde sitotoksositeye neden olmaktadır. Oluşan bu sitotoksik aktivite, zamana bağımlı ve S fazına spesifiktir (Innocenti vd., 2004).

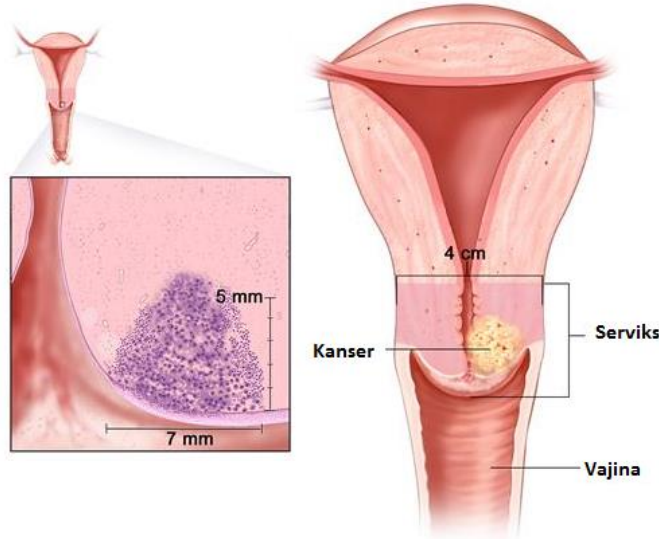


Şekil 1.10. Irinotekan açık formülü (<http://www.kanser.org/> Erişim Tarihi: 10.06.2014).

İn vitro sitotoksosite çalışmalarında SN-38'in sitotoksik etkisinin irinotekana bağlı olarak 2 ila 2000 kat arasında değişebildiği görülmüştür. Irinotekan, in vivo olarak mürin tümör modelleri (PO3 pankreatik duktal adenokarsinom, MA16/C meme adenokarsinomu, C38 ve C51 kolon adenokarsinomu) ve insan ksenograftleri (Co-4 kolon adenokarsinomu, Mx-1 meme adenokarsinomu, ST-15 ve SC-16 gastrik adenokarsinomu) üzerinde de geniş bir antitümör aktivite göstermektedir. Irinotekan ayrıca P-glikoprotein MDR (vinkristin ve doksorubisine dirençli P388 lösemi) gösteren tümörler üzerinde de etkili olup, antitümör aktivite göstermektedir. Tekamen'nin antitümör aktivitesinin yanı sıra irinotekanın en önemli farmakolojik etkisi, kolinesteraz enzim inhibisyonudur (Anonim, Kanser Tedavisinde kullanılan ilaçlar. <http://www.kansertedavileri.com/kemoterapi2.jsp>, Erişim Tarihi: 17.11.2015)

### 1.5. İnsan Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri

Serviks kanseri, servikal kanser ya da halk arasında rahim ağzı kanseri olarak bilinen rahim ağzı alt bölgesinin (servikal alanın) habis kanseridir (Şekil 1.11).



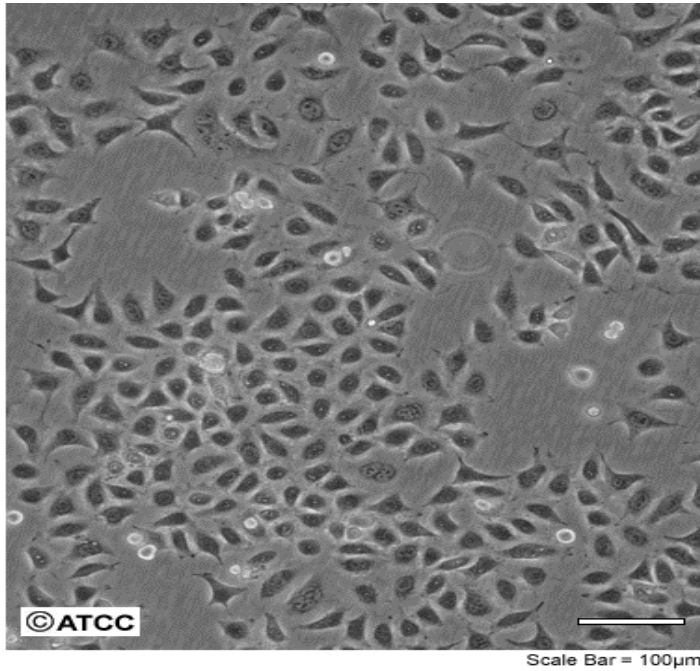
Şekil 1.11. Serviks kanseri ([http://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatment-pdq#link/stoc\\_h2\\_1](http://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatment-pdq#link/stoc_h2_1)'den değiştirilerek. Erişim tarihi: 26.10.2015)

Serviks kanseri, dünya üzerinde her 2 dakikada bir kadının ölümüne neden olan ve değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir (Ceyhan, 2007). Avrupa'da her yıl 50 bin, dünyada ise 500 bin kadına serviks kanseri tanısı konmakta, Avrupa'da yılda 25 bin, dünyada da 250 bin kadın bu nedenle ölmektedir (Bilir, 2007). Gelişmiş ülkelerde kadın kanserlerinin %3.6'sını, gelişmemiş ülkelerde kadın kanserlerinin %15'ini oluşturur (Ceyhan, 2007). Tarama programları, serviks kanserinin azalmasında önemli bir etkiye sahip olmasına rağmen hala kadınlar serviks kanseri nedeniyle ölmektedir. Serviks kanseri Türkiye'de en sık görülen sekinci kanser türüdür. Ortalama görülme yaşı 52'dir, ancak 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığında belirgin bir artış bulunmaktadır (Gökçe vd., 2011). Serviks kanserinin erken evrelerinde tipik olarak belirti yoktur. En erken bulgu muhtemelen rutin jinekolojik muayene esnasında saptanan anormal Pap smear sonucu olacaktır. Serviks kanseri oldukça yavaş gelişir, böylece belirtsiz dönem yıllar sürebilir. Serviks kanseri geliştikçe kadınlarda ortaya çıkan belirtiler, adet arası kanama, cinsel ilişki sonrası kanama ya da menopoz sonrası kanama gibi anormal vajinal kanama, sulu, pembe, soluk ve devamlı olan vajinal akıntı, normalden daha fazla

kanama olan ve daha uzun süren adet dönemleri'dir. Mesane, barsaklar, akciğerler ya da karaciğere yayılmış çok ileri düzeydeki serviks kanseri vakalarında ise; sırt ağrısı, kemik ağrısı ve kırıklar, yorgunluk, bitkinlik, vajinadan idrar ve dışkı kaçağı, bacak ağrısı, iştah kaybı, pelvik ağrı, şişmiş ayaklar ve kilo kaybı gibi belirtiler de gözlenmektedir (Anonim, İnsan serviks kanseri. <http://www.trsgo.org/menu/152/rahim-agzi-serviks-kanseri>, Erişim tarihi: 16.11.2015).

### 1.6. İnsan Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri Hücreleri (HeLa)

İnsan kanser hücreleri, ilk kez 1951 yılında servikal karsinomlu (rahim kanalı kanseri) bir hastadan alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve HeLa hücre serisi olarak adlandırılmıştır. Hücrelerin ait olduğu Henrietta Lacks isimli hasta 1951 yılında ölmesine rağmen, hastaya ait olan bu hücrelerinin ölümsüz olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu HeLa hücre serisi günümüzde hala kanser çalışmaları için sıklıkla tercih edilen ve yaygınlıkla kullanılan kültürü yapılmış en eski insan hücreleridir (Şekil 1.12) (Akçalı, 2010).



Şekil 1.12. İnsan serviks kanseri hücreleri (HeLa) ([www.atcc.org](http://www.atcc.org). Erişim tarihi: 26.10.2015)

## 1.7. Sitotoksisite ve Sitotoksisite Belirleme Yöntemleri

Sitotoksisite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (Aldridge, 1993, Murray vd, 2007; Tuncer ve Demirci, 2011). Sitotoksisite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in vitro olarak değerlendirilmektedir. Sitotoksisite testleri, test malzemesinin, hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve hücrelerin morfolojik özellikleri üzerine etkisinin kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği yöntemdir (International Standard 7405, 1997, International Standard 10993, 1999). Sitotoksite testleri; hücre canlılığı ve ölümü, hücre membranı, hücre organelleri, protein veya DNA sentezi ve hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir. Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önemlidir. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile gerçekleşebilir (ISO 7405, 2009; Tuncer ve Demirci, 2011).

İn vitro testler, organizmanın dışında yapılan testlerdir (Wataha, 2001). Bu tür testler, test tüpleri, hücre kültür kapları, flask veya diğer taşıyıcı kaplarda yapılabilmektedir. Memeli hücreleri, organeller, dokular, bakteri veya bazı enzim türleri, biyolojik sistem olarak kullanılabilir. Test edilecek materyal veya bu materyalden elde edilen özüt, biyolojik sistemle temas edecek şekilde test kabına yerleştirilir (Wataha, 2001; Wataha, 2003). Biyolojik sistemle materyal arasındaki temas, direkt veya indirekt olabilmektedir. Direkt temasta biyolojik sistem, materyal veya özüt ile doğrudan temas halinde iken indirekt temasta biyolojik sistemle materyal veya özüt arasındaki etkileşim agar, filtre membranlar veya dentin gibi bariyer sistemleri sayesinde olmaktadır (International Standard 10993, 1999, Wataha, 2001, Wataha, 2003, Saw vd., 2005).

Sitotoksisite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar:

1. Canlılık (viability) değerlendiren testler: Kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkilerinin incelenmesi,
2. Yaşam (survival) değerlendiren testler: Uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkilerinin incelenmesi,
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testleri

4. Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleridir (Freshney, 2005)

#### **in vitro sitotoksisite testlerinin avantajları**

1. Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi,
2. Çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilebilmesi,
3. Kantitatif ve karşılaştırılabilir sonuçlara ulaşılabilmesi,
4. Test yöntemlerinin standardize edilebilmesi,
5. Kullanım testlerine oranla toksik maddenin daha hassas değerlendirilebilmesi,
6. Hassasiyetlerinden dolayı, toksik materyalin hayvan deneylerine geçmeden elimine edilmesine imkân tanınmaları,
7. Hayvan ve insan denemelerine göre daha geniş kullanım alanına sahip olmalarıdır.

#### **in vitro sitotoksisite testlerinin dezavantajları**

1. Her test için bir tür hücre kullanılması,
2. Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
3. in vitro ortamın organizmada bulunan immün sistem, inflematuar sistem ve dolaşım sistemi gibi karmaşık koordinasyon mekanizmalarına sahip olamaması (Browne, 1988, Ekwall vd., 1993, Schmalz, 1997, Wataha, 2001; Wataha, 2003)

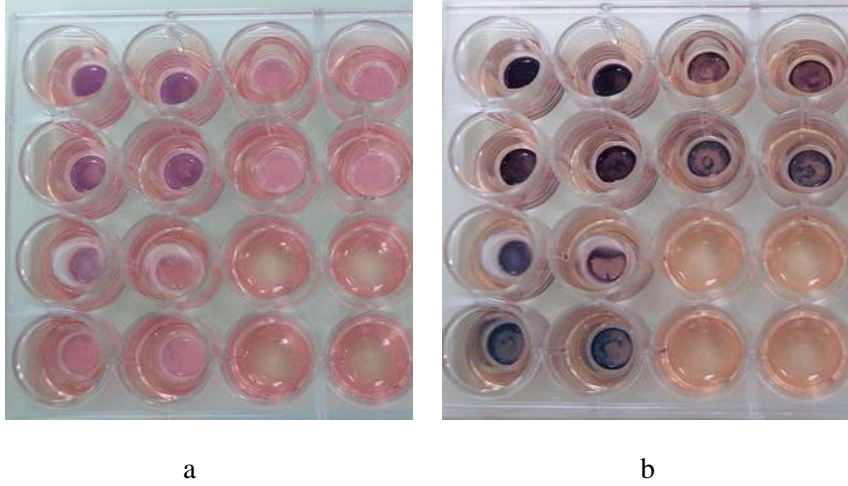
Birçok in vitro sistemde tek tür hücre kullanılması bu tür etkileşimlerin oluşmasını engellemektedir. Bu durum, in vitro test sonuçlarının in vivo şartlarla uyumluluğunu tartışmalı hale getirmektedir. Bütün sitotoksisite testlerinin, toksik olmayan bir ortamda, steril ve tekrarlanabilir olması önemlidir (Uzun ve Bayındır, 2011).

## 1.8. Hücre Canlılık Testleri

Hücre kültürün hücrelerin canlılığını belirlemede kullanılan canlılık testleri toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Canlılık testleri membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boya ile veya membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan ya da notral kırmızı gibi boyaların kullanılması ile yapılmaktadır (Tuncer ve Demirci, 2011). Denemelerde sıklıkla kullanılan hücre canlılık testleri başlıca; MTT, WST-1, WST-8, XTT, TTC, MTS, Tripan blue, BrdU Testidir.

### 1.8.1. MTT Hücre Canlılık Testi:

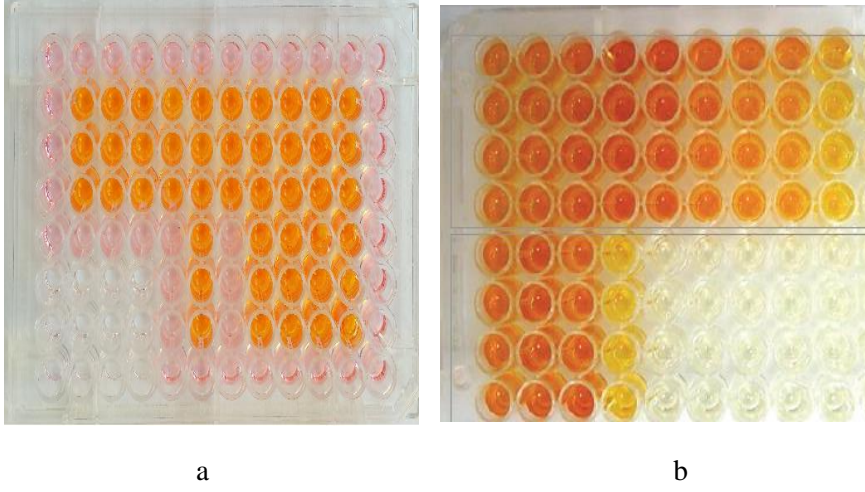
MTT testi Mossman (1983) tarafından hızlı, kolorimetrik ve kantitatif bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. En sık kullanım alanları; sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ortam komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir (Mosman, 1983). MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünebilir, oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosman, 1983; Moharamzadeh, 2009). Oluşan kristaller MTT solubilization çözeltilisinde (HCl/izopropanol) çözündürülerek oluşan mor renkli çözeltinin multiplak spektrofotometre kullanılarak 570 nm test, 690 nm referans dalga boylarında absorbans ölçümü yapılmaktadır. MTT ancak canlı hücrelerin mitokondrilerindeki aktif enzimler ile parçalanacağından elde edilen absorbans değerleri canlı hücre oranlarıyla ilgili bilgi vermektedir (Li vd., 2012) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. MTT canlılık testi: a: MTT indirgenmesinin başlangıç aşaması, b: MTT indirgenmesinin tamamlanma aşaması (www.iivs.org'den değiştirilerek, Erişim tarihi: 25.10.2015)

### 1.8.2. WST-8 Hücre Canlılık Testi

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan WST-8 testi (2-(2-metoksi-4-nitrofenil) -3 (4-nitrofenil) -5 (2,4-disulfofenil) 2H-tetrazolyum), canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir (Tominaga vd, 1998). Tetrazolium tuzları hücresel enzimler tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu WST-8 turuncu renkli formazana dönüşür. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle birlikte kültürdeki hücrelerde metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile doğru orantılı olarak formazan ile boyanan hücre formunda artış olmaktadır. Formazan boya metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı 450 nm spektrofotometrede ölçülmektedir (Doyle ve Griffiths, 1998). WST-8 testinin MTT testinden farkı; WST-8 testi ile daha hızlı sonuçlara ulaşılmıştır (Tominaga vd., 1998) (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. WST-8 canlılık testi: a: WST-8 indirgenmesinin başlangıç aşaması, b: WST-8 indirgenmesinin tamamlanma aşaması



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde kanser henüz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemidir. Son yıllarda kanser tedavisinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bu amaç doğrultusunda son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı ilaçların antikanser etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan bu araştırmalar sonucunda tıbbi bitki ekstralarının ve bu ekstralardan elde edilen ve sekonder metabolitlerinin antioksidan, serbest radikal süpürücü ve antikanser aktivitelerinin araştırılması konusunda günümüzde pek çok çalışma yapılmaktadır (Hsu vd., 2006, Granado-Serrano vd., 2007, Marinova vd., 2009, Vizotto vd., 2014) ve bu sekonder sekonder metabolitlerinin de kanser tedavisinde çözüm olabilmesi için alternatif bir yöntem olarak kullanılması önerilmektedir.

Pekçok sebze ve meyvede bulunan klorojenik asit (KA) ile yapılan çalışmalar, anti-HIV aktivitesi (McDougall vd., 1998) antioksidan aktivitesi (Yoshino ve Murakami, 1998, Kono vd., 1998, Paganga vd., 1999), P450-bağlı enzim sitokromu düzenleyici aktivitesi (Teel ve Huynh, 1998, Baer-Dubowska vd., 1998) ve antiallerjik aktivitesi (Ito vd., 1998) gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu, ayrıca sitotoksik özelliğinden dolayı meme, prostat, kolon ve lösemi gibi kanser türlerinde, kanserli hücrelerin büyümesini engelleyerek antikanser öaktiviteye de sahip olduğunu göstermektedir (Tanaka vd., 1990, Stich, 1992, Morishita vd., 1997, Naso vd., 2014). Ancak günümüzde halen KA'nın antitümör aktivitesi hakkında çok fazla ayrıntılı çalışma bulunmamaktadır.

Jiang vd. (2000), insan oral skuamöz hücre karsinomu (HSC-2) ve tükürük bezi tümörü (HSG) hücre dizilerilerine karşı KA'nın selektif sitotoksik etki gösterip göstermediğini, insan normal dişeti fibroblastları (HGF) ile karşılaştırarak araştırmışlardır. Araştırmacılar, KA'nın milimolar konsantrasyonlarda HSC-2 ve HSG hücreleri üzerinde oldukça yüksek oranda sitotoksik aktivite gösterdiğini, KA'nın sitotoksik aktivitesi nedeni ile katalaz veya  $\text{CoCl}_2$ 'nin önemli derecede azaldığını, fakat  $\text{FeCl}_3$  veya  $\text{CuCl}_2$ 'ün etkilenmediğini belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda yüksek konsantrasyonlardaki KA'nın alkali koşullar altında radikaller oluşturduğunu, düşük konsantrasyonlardaki KA'nın ise, superoksit ve hidroksi radikallerini süpürücü etkiye sahip olduğunu göstermiştir. KA'nın büyük DNA fragmentlerinin oluşmasına neden olduğu ve tümör hücrelerinde internükleozomal DNA ayrılması olmaksızın çekirdek kondensasyonu oluşturduğu da belirtilmiştir.

Hücrelerin kaspaz3 ile ön muamelesinin KA'nın sitotoksik aktivitesini kısmen engellediği, KA'nın sitotoksik aktivitesinin engellenmesi için de en az altı saate ihtiyaç olduğunu da araştırmannın bir başka sonucu olarak ifade edilmiştir.

Matris metalloproteinaz enzimleri, fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır. Anti-metalloproteinaz-9 (Anti-MMP-9), tümör hücrelerinin yayılmasını ve metastaz yapmasını engellemekten sorumlu olan ve *Euanymus alatus* bitkisinin gövde kabuklarının metanol ekstresinden elde edilen fenolik bir bileşiktir. İnhibitör metalloproteinaz-9, *Euanymus alatus* bitkisinde bulunan yeni bir fenolik bileşik olan 5-caffeoylquinic asit (klorojenik asit, KA) NMR ve FAB-MS yöntemi ile izole edilmiştir. KA'nın, bir matris metalloproteinaz olan (MMP)-9'ın zimografî yöntemi ile konsantrasyona bağlı olarak güçlü engelleyici etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca KA'nın, insan hepatoselüler karsinoma hücre hattında (Hep3B), hücresel proliferasyonu engellemediği ve sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir. KA'nın farklı dozları (0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 µg/mL) ile muamele edilen Hep3B hücrelerinde KA'nın 0-100 µg/mL arasındaki dozlarda, canlılıkta azalma gözlenmezken; 200 µg/mL'lik KA konsantrasyonunda elde edilen canlılık oranı, kontrolle karşılaştırıldığında %12 oranında azalma olduğu ortaya çıkmıştır. KA, doza bağlı olarak MMP-9 enzim aktivitesini inhibe etmesi nedeni ile, klorojenik asidin kanserli hastalarda metastazı ve kanserin yayılmasını engelleyebileceği yönünde etkisi olabileceği rapor edilmiştir (Jin vd., 2005).

Feng vd. (2005) KA'nın antioksidan kapasitesini belirleyebilmek için Randox belirtecini kullanmışlar ve sonuçta KA'nın güçlü bir antioksidan kaynağı olduğunu belirlemişlerdir. Yine insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) KA'nın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini ECIS yöntemi ile araştırmışlar ve klorojenik asidin 80 µg'lık konsantrasyonda A459 hücre hattı üzerinde güçlü bir proliferasyon engelleyici etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada ilginç olan nokta ise, aynı konsantrasyondaki KA'nın JB6 (sıçan epidermal hücre hattı) hücrelerinde oldukça düşük aktivite göstermesidir. Bu sonuç, KA'nın tümör hücre büyümesi üzerinde engelleyici etkisi olduğunu göstermiştir.

Saf polifenollerin (kuersetin, KA ve (-)epikateçin) ve doğal meyvelerden (çilek ve erik) elde edilen meyve ekstratlarının insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) üzerindeki canlılık ve apoptozis üzerine olan etkilerini araştırıldığı bir çalışmada (Ramos vd., 2005), hücre canlılığı Tripan blue boyama yöntemi ile, hücre

proliferasyonu Propoidium İyodür boyama yöntemi ve DNA elektroforez ve Flow Cytometry yöntemi ile araştırılmıştır. 18 saat süreyle kuersetin ve meyve ekstreleri ile muamele edilen hücrelerde, hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı buna karşın KA (250, 500, 750 ve 1000  $\mu\text{M}$ ) ve (-) epikateçin (100, 250, 500, 750 ve 1000  $\mu\text{M}$ )'in hücre canlılığı ve hücre ölümü üzerinde etkisi olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca, kuersetinin ve meyve ekstrelerinin HepG2 hücrelerini hücre döngüsünün G1 fazında tuttuklarını ve apoptozise girmelerini engellediğini de belirtmişlerdir. Kuersetin (50, 75, 100, 200 ve 300  $\mu\text{M}$ ), çilek (0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8  $\mu\text{M}$ ) ve erik (0.5, 0.75, 1, 1.25 ve 1.5  $\mu\text{M}$ ) ekstreleri HepG2 hücrelerini apoptozise yönlendirerek, HepG2 hücrelerinin canlılık oranını azaltmada etkili olmuşlardır.

DNA metilasyonu, omurgalılarda tipik olarak CpG (C; sitozin-P; fosfat-G; Guanin) bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun bağlanması neticesinde gerçekleşir. Metil grubu DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenmektedir. Neticede 5 metil sitozin oluşur ve burada metil vericisi olarak yine S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapar. Omurgalı genomunda CpG bölgeleri olarak adlandırılan alanlar özellikle gen promotör bölgelerinde, yani genin başlangıcında normalden daha fazla bulunurlar. Genin başlangıcı CpG adacıkları tarafından işaretlenmiştir ve buraya bağlanacak moleküller için bir tanıma bölgesi oluşturmaktadır. Metilasyon bazı sinyal yollarını denetler ve denetlemede oluşacak bir hata, kanser oluşumuna etki eder (Baylin vd., 1998, Bird, 2003; İzmirli vd., 2012). DNA metilasyonu gen ifadesinin epigenetik kontrol ve genom bütünlüğünü korumak için önemli bir mekanizmadır. Lee ve Zhu (2006) yapmış oldukları çalışmada, kaffeik asit ve KA'nın DNA metilasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada KA ve kaffeik asitin (genel kahve polifenoller) farklı konsantrasyonları (0.1, 5, 20 ve 50  $\mu\text{M}$ ) ile muamele edilen östrojene bağımlı meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve östrojene bağımsız meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) sentetik DNA substratlarının metilasyonu ve represantive bir genin metilasyon durumu üzerindeki düzenleyici etkisi araştırılmıştır. Uygun koşullar altında DNA'nın in vitro enzimatik DNA metilasyonu ve beslenmedeki catechol'ler üzerinde DNA metilasyonunun kaffeik asit ve klorojenik asidin doza bağlı olarak prokaryotik M.Sssl tarafından katalizlendiği gözlenmiştir. Kaffeik asit ve klorojenik asidin varlığında DNA metilasyonunun inhibe edildiği ve bu inhibisyonun büyük ölçüde S-adenosyl-homocystein (SAH)'in artışı nedeni ile catechol-0-methyl-transferase-

(COMT)-mediated *O*-metilasyonun oluşması ile ortaya çıktığı belirlenmiştir. Kültüre edilmiş MCF-7, MAD-MB-231 hücreleri kaffeik asit veya KA ile muamele edildiğinde RAR $\beta$  geninin promoter bölgesinin kısmen inhibe edildiği gösterilmiştir.

Gündelik hayatta genel olarak tüketilen sebze ve meyvelerin kanseri önlemedeki rolü bilinmektedir. Meyve ve sebzelerden elde edilen on farklı saf bileşiğin (p-kumarik asit, KA, ferulik asit, kaffeik asit, linalool, aukubin, vanilik asit, luteolin, baicalin, baicalein) sekiz farklı organa (serviks, mide, deri, akciğer, kemik, mesane, böbrek, ağız) ait dokuz farklı kanser türü (HeLa, AGS, BCC-1, H520 ve H661, U-2OS, J82, RTCC-1, OSCC-1 hücre hatları) üzerindeki antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda; bir monoterpen olan linalool ve baicalein ile luteolin (flavonoid) güçlü anti-proliferatif etki gösterdiği, buna karşın aukubin, kaffeik asit, KA, p-kumarik asit ve vanilik asidin dokuz ayrı kanser hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etki göstermediği ortaya çıkmıştır (Cherng vd., 2007).

Thurrow ve Lee (2012), KA ve neoklorojenik asit'in insan kolon kanseri (Caco-2) üzerindeki antikanserojenik etkisini araştırmışlardır. KA ve neoklorojenik asidin farklı konsantrasyonları (150, 300, 500  $\mu$ mol) ile 0, 24, 48, 72 saatlik muamele edilen Caco-2 hücrelerinin canlılık oranında kontrole göre, nispeten azalma olduğu gözlenmiştir. Muamele edilen hücrelerde, hücrelerin yüzeyinde özellikle hücre yüzeyinin pürüzlü hale gelmesi, düzensiz hücre şekilleri gibi morfolojik değişiklikler de meydana gelirken, muamele edilmeyen hücrelerde bu tarz morfolojik değişiklikler ortaya çıkmamıştır. Bu bulgular, hem klorojenik asidin hem de neoklorojenik asidin hücre proliferasyonu üzerindeki engelleyici etkilerinden dolayı, kolon kanserinde baskılayıcı bir bileşik olarak kullanılabilirliklerini ortaya koymaktadır.

5-Fluorourasil (5-Fu) kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. 5-fluorourasil diğer kanser ilaçları ile birlikte kullanıldığında, kanserli hastaların tedavisinde yetersiz kalmakta ve cerrahi müdahalelerden sonra hastalarda sağ kalım oranını azaltmaktadır (Machover, 1997). 5-fluorourasil meyve ve sebzelerden elde edilen nispeten toksik olmayan fitokimyasallar ile birlikte kullanıldığında ise, kemoterapiden etkilenen normal hücrelerdeki toksisiteyi azaltmaktadır. Sekiz farklı fenilpropanoidin (öjenol, ferulik asit, sinamik asit, kaffeik asit, KA, p-kumarik asit, 3,4-dimetoksisinamik asit ve 2,4,5-trimetoksisinamik asit) farklı

konsantrasyonları (0.002, 0.004, 0.007, 0.015, 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM) ile 5-Fu kombinasyonu birlikte 24 saat süreyle insan serviks kanser hücre hattına (HeLa) uygulanmış ve bu karışımların hücre canlılığı ve apoptozis üzerine etkileri araştırılmıştır (Hemaiswarya ve Doble, 2013). Öjenol, ferulik asit ve kaffeik asit ilaçlarla sinerjik etki meydana getirmiş ve daha sonraları miktarlarında azalmalar olmuştur. Çalışmanın sonuçları, fenilpropanoidlerin doza bağlı olarak DMSO ile muamele edilen hücelere göre hücre büyümesini inhibe ettiklerini göstermiştir. HeLa hücreleri en fazla öjenol'e karşı hassas davranmış, bunun da ilaçlar ve fenilpropanoidler arasındaki inteaksiyondan kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir. Farklı fenilpropanoidlerin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, öjenol> ferulik> sinamik> kaffeik> klorojenik> p-kumarik> 3,4 dimetoksisinamik> 2,4,5-trimethoksisinamik asit şeklinde olmuştur. Ayrıca HeLa hücrelerinde gözlenen apoptozis öjenol+5-Fu kombinasyonu ile artmış, HeLa hücrelerinde gözlenen morfolojik değişiklikler, hücrelerde ve çekirdekte büzülme, florosans yoğunluğunun artışı, hilal benzeri çekirdekçik görünümü ve apoptotik cisimcikler olmuştur. Nekrotik hücre sayısında ise önemli bir değişiklik ortaya çıkmamıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında, apoptotik hücrelerin oranı kombine muamelelerde daha fazla olmuştur.

*Artemisia annua* Çin tıbbında kullanılan önemli bir bitkidir. *Artemisia* sıcak su infüzyonunun MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi ve metabolik profili araştırılmış ve artemisinin aktivitesi tek başına ve KA ile birlikte kullanıldığında ve ekstrede bulunan farklı bir co-metabolitin (3-caffeoilquinic asit, 3CA) etkileri karşılaştırılmıştır (Sebure vd., 2014). Ayrıca klorojenik asit ile antikanser ilaç olan cisplatin birlikte kullanılarak karşılaştırma analizi ve *Artemisia* çay ekstresinin olası etkileşimleri de araştırılmıştır. Çalışma sonucunda artemisinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu, artemisinin farklı yolaklar ile bu etkiyi gösterdiği, cisplatinin oldukça yüksek oranda sitotoksik etkiye sahip olduğu, 3-caffeoilquinic asit'in MCF-7 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiği, *Artemisia* çayının 200 µM üzerindeki dozlarda etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Kombine çalışmalar ise, cisplatin ve 3CA'nın birlikte kullanılması durumunda benzer etkinin ortaya çıktığı, kafeik asit ve KA'nın birlikte kullanımının da bir kemoterapötik ilaç gibi etki gösterdiği belirtilmiştir. Artemisin ve 3CA kombine kullanımının birbirleri ile oluşturdukları antagonist etkilerden dolayı ise, antikanser ilaçlardan 2.5 kat daha az sitotoksik etki gösterdiği ortaya

konmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kanserde Artemisia çayı kullanımının önceden tahmin edilemeyen, olumsuz sonuçlara neden olabileceği belirtilmiştir.

Yeşil kahve çekirdekleri (GCB) ile daha önce yapılan çalışmalar, yağı alınmış GCB ve yağlı GCB çekirdeklerinin hayvanlarda kanser gelişimini engellediği göstermiştir. Miller vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada, yeşil kahve çekirdeklerinin kavrulması sonucunda etkisinin azalıp azalmayacağını araştırmışlardır. Bu amaçla, altmış sekiz Hamster dört gruba ayrılmış, 1. grup hayvanlar normal diyet ile beslenirken, 2. 3. ve 4. grupta bulunan Hamster'lar sırası ile; %15 kavrulmuş kahve çekirdekleri (RCB), %12.75 yağlı alınmış RCB'ye veya %2.25 RCB yağı ile beslenmiştir. Hamster'lar kanserojen bir madde olan, 7,12-dimetilbenz'in %0.5'lik çözeltisi ile haftada 3 kez muamele edilmişlerdir. Çalışmanın sonuçları, denemede Hamster'ların beslendiği her bir özel diyetin, önemli ölçüde tümör gelişimini azalttığını göstermiştir.

Gündelik diyet ile alınan polifenollerin kanseri önlemede etkili oldukları bilinmektedir. Serviks kanseri, kadınlarda meme kanserinden sonra ölüme neden olan ikinci kanser türüdür. Polifenol ekstrelerinin anti-servikal kanser önleyici etkileri ile gündelik olarak yaygın tüketilen yeşil çay, kahve ve kakaonun insan servikal kanseri hücre hattında (HeLa) hücreleri üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır (Krstic vd., 2015). Çalışmada kullanılan bütün polifenol ekstreleri HeLa hücreleri üzerinde apoptozis oluşturmuştur ancak en güçlü etkiyi yeşil çay göstermiştir. Kısa süreli yeşil çay ve kahve ekstreleri ile muamele intrasellüler oksijen türlerinin oluşumunu sağlamış ve glutasyon seviyesinin azalmasına yol açmıştır. Yeşil çay ve kahve ekstrelerinin sitotoksik aktivitesi kısmen C vitamini ile inhibe edilmiştir. Bu sonuçlara göre, test edilen polifenol ekstrelerinin pro-oksidan ve anti-proliferatif etkilerinden dolayı, in vitro anti-servikal kanser özelliği bulunduğu düşünülmüş ve bu etkiyi oluşturan ekstrelerin sırası ile yeşil çay>kahve>kakao olduğu ortaya çıkmıştır.

KA, kaffeik asit ve kuinik asitin esteridir. Sato vd. (2011) KA ve kaffeik asidin başlıca metabolitleri üzerinde yaptıkları araştırmada in vitro koşullarda gerçekleşen çalışma sonucunda kaffeik asidin KA'ten daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu, Caco-2 hücreleri tarafından klorojenik asidin kaffeik aside göre daha az alındığını bulmuşlardır. Oral olarak alınan bir bileşiğin fizyolojik önemi, o bileşiğin bağırsaklarda emilimi ve hedef doku tarafından alınımına bağlıdır. Bağırsak iskemisi perfüzyon hasarı üzerinde hem kaffeik asidin hem de

klorojenik asidin hasar oluşturucu etkisi araştırıldığında, kaffeik asitin g antioksidan aktivitesi nedeni ile, iskemi perfüzyon hasarında daha koruyucu bir rol üstlendiği belirtilmiştir.

Nitrik asit, midede asidik şartlar altında reaksiyona girerek N-nitrozo bileşiğine dönüşür. Bu bileşik hem sitotoksik hem de genotoksik özellik gösterir. Endojen olarak oluşan bu bileşik, yemek borusu ve mide kanserine neden olmaktadır. Askorbik asit ise oluşan bu nitrozasyonun inhibitörü olarak bilinir. Metilurea (MU)'ye sodyum nitrit (SN) eklenmesi sonucunda oluşan reaksiyon, midede N-nitroso-N methylurea oluşumuna neden olur. Abraham vd. (2013) yapmış olduğu çalışmada, diyetteki polifenollere eklenen askorbik asit (AA) kombinasyonunun endojen nitrozasyon ile oluşturulan genotoksik hasara karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. AA ve polifenol ferulik asit (FA), gallik asit (GA), klorojenik sit (KA) ve epigallokateşin gallate (EGCG) birlikte kombinasyon halinde sıçanlara oral yolla verildiğinde, deneme sonucunda sıçanların kemik iliğinden alınan hücrelerde mikronukleuslu polikromatik eritrositler (Mn, PCEs) ve metafazda bulunan kromozomlardaki kromozomal hasarlar belirlenmiştir. MU+Su karışımı sıçanlarda tek başına hasar oluşturken, AA, FA, GA, KA ve EGCC önemli lde hasar önleyici etkide bulunmuştur. AA, FA, GA ve KA, MNU ile birlikte uygulandığında ise, genotoksik etkinin azalmasında etkili olmamışlardır. Çalışmanın sonuçları, AA ve FA, GA ve KA'nın birlikte uygulanması sonucunda, bu karışımların sıçanlarda endojen olarak oluşan N-nitroso bileşiğikleri tarafından oluşturulan genotoksik hasara karşı anti-nitrikasit etkide bulduklarını ortaya koymuştur.

Sun ve arkadaşları (2014) yapmış oldukları çalışmada, sıçanlarda karbontetraklorid (CCl<sub>4</sub>)'in neden olduğu akut hepatoksik hasarlar üzerine klorojenik asidin (KA) koruyucu etkisini araştırmışlardır. KA'nın antioksidan aktivitesi in vitro olarak çeşitli yöntemlerle belirlenmiştir. Sıçanlara oral yolla tek doz (100 mg) karbontetraklorit verilmiş ve karbontetraklorit ile karaciğer toksisitesi indüklenmiştir. Hepatoksik etkiye uğrayan ratlara oral yolla farklı konsantrasyonlarda (100, 300, 500 mg) KA verilmiş ve 14. günün sonunda alanin aminotransferaz (ALT), aspartaz aminotransferaz (AST), alkali fosfataz (ALP) ve total bilirubin (TB) seviyeleri llmştir ve biyokimyasal sonuçları destekleme amacı ile de histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Sonuç olarak, KA'nın sıçan hücrelerinde in vitro koşullarda g antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer toksisite denemesi sonuçları, KA'nın

330 ve 500 mg/kg'lık konsantrasyonu ile ön muamelesi ile ALT, AST, ALP ve TB seviyelerinin CCl<sub>4</sub> ile muamele edilen grupla karşılaştırıldığında azaldığını göstermiştir. KA'nın 5000 mg/kg'lık konsantrasyonu muamele edilen sıçanlarda herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Ortaya çıkan bu sonuç, KA'nın CCl<sub>4</sub> tarafından sıçan karaciğerinde oluşturulan oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini ve bu mekanizmanın KA'nın serbest radikal süpürücü ve antioksidatif etkisi nedeni ile olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılır (Saygı, 2003). Ölçüm performansı için, tekrarlanabilirlik başarısı için ya da çalışmalarda karşılaştırma yapmak için hücre popülasyonlarının miktarlarının anlamlı bir şekilde belirlenmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle hücre popülasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonu belirleyebilmek için, bazı metodlar geliştirilmiştir (Doyle ve Griffiths, 1998). Genel olarak direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile birlikte vital bir boya (trypan blue-tripan mavisi) kullanılır. Bununla birlikte tüm vital boyalar öznel ve kesin değer vermezler. Bu metod kolay, çabuk ve ucuzdur ve toplam hücre süspansiyonundan sadece küçük fraksiyonlar gerektirir. Belirli deneysel amaçlar için ya da belirli durumlar için uygun olan birçok spesifik yöntem bulunmaktadır. Bunlar; diochromium sınıflandırma, hücre ATP, intrasellüler hacim spesifik boyalar (MTT, tryphenyl tetrazolium chloride, neutral red) redoks potansiyeli, yoğunluk, kalorimetri ve biyokütle gözlemlerini içerir. Örneklerin analizi için kullanışlı olan modern bir mikropak (96'lık kuyucuklu plak) geliştirilmiştir. Bu minyatür plaklar birçok örneğin çabuk ve eş zamanlı analizine izin verir. Bu formattaki mikropak, kullanılan kültürdeki ortam miktarını ve hücrelerin ihtiyaç duyduğu plastik kapları azalttığı için avantajlıdır. Kolorimetrik yöntem, örneklerin mikropak içerisinde mikropak okuyucusunda doğrudan ölçülmesine izin verir (Doyle ve Griffiths, 1998).

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) canlılık yöntemi, hücre canlılığını, proliferasyonunu ya da sitotoksitesini ölçmede kullanılan basit, kolorimetrik ve ekonomik bir yöntemdir (Arı vd., 2012). MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. MTT, suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak



bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile soluble hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosman, 1983). Formazon kristallerinin çözünmesiyle oluşan absorbans değerleri, canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. MTT'nin en çok kullanıldığı alanlar; sitokinlerin büyüme faktörlerinin, ortam bileşenleri hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir (Mosman, 1983).

Biray vd. (2006), propolisin insan T hücresi lenfoblast benzeri hücre hattında (CCRF-CEM) sitotoksik ve apoptotik özellik gösterip göstermediğini araştırmışlardır. CCRF-CEM hücre dizisinde sitotoksitenin değerlendirilmesi için, Tripan mavisi ve XTT yöntemleri, apoptozisin değerlendirilmesi için ise, apoptozis esnasında açığa çıkan oligonükleotidlerin saptanması esasına dayalı Eliza yöntemi ve apoptotik cisimciklerin flüoresan mikroskopta görüntülenmesini sağlayan Akridin Oranj-Etidyum Bromid boyama tekniği kullanılmıştır. Propolisin sitotoksik etkisinin saptandıktan sonra, propolisin etken maddelerinden olan ve tarçında bol miktarda bulunan, tarçın kokulu organik bir asit olan sinamik asit ( $C_6H_5-CH=CH-COOH$ ) ve CAPE (kafeik asit fenetil esteri)'in sitotoksik özellikleri aynı yöntemlerle değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, sinamik asit'in herhangi bir sitotoksik etki göstermediği, buna karşın CAPE'nin doz ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve  $IC_{50}$  dozunun  $1 \mu M$  olduğu tespit edilmiştir. Akridin Oranj-Etidyum Bromid boyama yöntemleri ile CAPE'nin aynı hücre dizisinde apoptozise neden olduğu da bulunmuştur. CAPE, normal hücreler üzerinde düşük toksisiteye sahip, yeni antimetastatik ve antianjiyojenik ajan olarak değer taşıdığından bu sonuçlar akut lenfoblastik lösemi tedavisinde propolisin ve özellikle CAPE'nin kullanılabilmesine yönelik yeni bir tedavi yöntemi olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir.

Dikmen vd. (2009), nar meyve kabuğu metanol ekstresinin (NKE) farklı konsantrasyonlarının (25, 50, 100, 200 ve 300  $\mu g/mL$ ), MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattındaki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etki, MTT ve nötral red (lizozomal aktivite) yöntemleri kullanılarak, apoptotik etki ise ssDNA apoptotik ELISA yöntemini kullanarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, NKE'nin, MCF-7 kanser hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkili olduğunu, mitokondrial ve

lizozomal aktivasyon absorbans değerlerinin özellikle 48 ve 72. saatlerde, 100, 200 ve 300  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  ekstre konsantrasyonlarında anlamlı düzeyde azaldığını belirlemişlerdir. Apoptotik etkideki en fazla artışı ise, 48. saatte 100, 200 ve 300  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  NKE konsantrasyonlarında olduğu tespit edilmiştir.

Köçkar vd. (2010), zeytin yaprağındaki en önemli fenolik bileşik olan oleuropein'in insan hepatoma (Hep3B), insan meme adenokarsinom (MCF-7) ve insan prostat kanser modeli (PC-3) hücrelerindeki anti-tümör aktivitesini araştırmışlardır. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlardaki oleuropein ile muamele edilmiştir. Oleuropein'nin antitümör etkisi, uygulama yapılan hücrelerde MTT test ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda, oleuropein'in doza bağlı olarak, MCF-7 ve PC-3 hücreleri üzerinde antitümör etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, oleuropein'nin hücre tipine spesifik olarak farklı etki gösterdiği ve oleuropein insan hepatoma hücresinde (Hep3B) hücre proliferasyonunu arttırıcı yönde etkisi olduğu da bulunmuştur.

Hücre hareketi, hücre bölünmesi, hücre içi madde taşınması, hücresel yapının sağlanması gibi biyolojik işlevlerde rol alan mikrotübüller, antikanser ilaçların esas hedefi konumundadır. Vinorelbin (Navelbin) mikrotübüller üzerinden etki gösteren moleküllerden birisidir ve çeşitli kanserlerde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Gökçe vd. (2011) insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerine, 24 saat süreyle 5-100  $\mu\text{M}$  doz aralığında vinorelbin uygulamışlar ve süre sonunda hücrelerdeki olası apoptotik etkiyi belirlemişlerdir. Bu amaçla, sırasıyla XTT canlılık testi yapılmış ve floresan mikroskopunda hücrelerin karakteristik morfolojisi değerlendirilmiş ve vinorelbin uygulanan hücrelerde B hücresi lenfoma 2 (BCL2) ve Siklin D1 (CCND1) genlerinin mRNA ifade düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, en yüksek vinorelbin konsantrasyonu olan 100  $\mu\text{M}$ 'da hücre canlılığının 24 saat sonunda %60'ın altına düştüğü belirlenmiştir. En etkili apoptotik doz 40  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuş ve ayrıca 40  $\mu\text{M}$  vinorelbin uygulamasının anti-apoptotik özellikteki BCL2 ile proto-onkogen olan CCND1 genlerinin mRNA ifade edilme düzeylerinde azalmaya neden olduğu da saptanmıştır.

Kanser hücrelerinde oksidatif stresin, hücre proliferasyonunun stimülasyonu, mutasyonların ve genetik instabilitenin artışı, antikanser ilaçlarına karşı hücresel duyarlılığın değişmesi gibi belirgin sonuçları bulunmaktadır. Buna karşın oksidatif stresin artışı, kanser hücrelerini öldürmek için bir fırsat da sağlayabilir.

Küçüksayan vd. (2011), Bleomisin'in N-Tera-2 testis kanseri hücre dizisinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucunda oluşturduğu sitotoksik etkiyi araştırmışlardır. Araştırmacılar, N-Tera-2 testis kanseri hücrelerine Bleomisin uygulamasının ardından hücre canlılığını MTT ([3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)- 2,5-difenil tetrasodyum bromid]) yöntemini kullanarak, hücrelerde oluşan oksidatif stresi de Protein Karbonil gruplarını ölçerek belirlemişlerdir. Sonuçta, Bleomisin'in 400 µg/ml dozu ile 24 saat süren inkübasyon sonucunda hücrelerin canlılığının, bleomisin uygulanmamış kontrol grubuna göre %54'e, 48 saat süren inkübasyonu sonucunda hücrelerdeki canlılığın %33 ve 72 saat süren inkübasyon sonucunda da hücrelerin canlılık oranının %22 oranda azaldığını bulunmuştur. Bleomisin'in 24 saat süren inkübasyonu sonucunda da protein karbonil gruplarının kontrol grubuna göre %62 oranında arttığı belirlenmiştir.

Paklitaksel ve yarısentetik türevi olan dosetaksel antitümör etkilerini, hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle yapmaktadır (Schiff vd., 1979, Ringel ve Horwitz, 1991; Erdemoğlu ve Şener, 2000). Dosetaksel meme, prostat ve mesane kanserinde sık kullanılan bir ilaçtır. Dosetaksel, paklitaksel'e göre hücre içine daha hızlı alınır ve hücre içinde daha uzun süre kalır. Bu özelliklerinden dolayı in vivo ve in vitro antitümör aktivite çalışmalarında dosetaksel'in paklitaksel'e göre 2-4 kat daha kuvvetli olduğu ve paklitaksel'e daha uzun süre maruz kalmanın antitümör aktivitede artışa neden olduğu gösterilmiştir (Rose, 1992, Lavelle vd., 1995, Eisenhauer ve Vermorken, 1998; Erdemoğlu ve Şener, 2000). Çoban vd. (2012) Ig G plazma hücreli lösemi hücre hattında (ARH-77) dosetaksel ile ortaya çıkabilecek sitotoksik etkiyi araştırmışlardır. Çalışmada ARH-77 hücreleri üzerinde dosetaksel'in farklı konsantrasyonlarını (0,1-1-10-50-100 µmol/L) kullanılmışlar ve sitotoksik etkiyi XTT test ile belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda dosetaksel'in 50 µmol/L'lik konsantrasyonunda ARH-77 hücreleri üzerinde letal doza eriştiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, dosetaksel'in plazma hücreli lösemi hücre hattında gösterdiği bu etkili sitotoksik etkisi nedeni ile, bu ilacın nadir gözlenen ve kötü prognozla karakterize edilen hastalık tedavisinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kahraman vd. (2013) yapmış olduğu çalışmada, farklı bor bileşikleri olan BA (borik asit), BP (boraks pentahidrat) ve DPD (disodyum pentaborat dekahidrat)'ın 250, 500 ve 1000 µM dozları ile muamele edilen ve sitogenetik olarak stabil olmayan CCL62 (HeLa kontaminant) insan amniyotik epitelyal hücre hattında

ortaya çıkabilecek sitogenetik hasarları incelemişlerdir. Bu amaçla hücre hatlarına bor bileşikleri uygulamasını takiben sitotoksisite için hücre canlılık testi (MTT) ve genotoksisite için kromozom aberasyonu ve mikronukleus testleri yapılmış ve bor bileşiklerinin her bir dozunda meydana gelen kromozom aberasyonlarının ve mikronukleusların (MN) frekansları hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar tür, doz ve süreye bağlı olarak bor bileşiklerinin CCL-62 (HeLa kontaminant) insan amniyotik epitelyal hücre hatlarının proliferasyonunu etkilediğini görmüşlerdir. Kromozom aberasyonu ve mikronukleus analizi verilerine göre ise; herhangi bir bor bileşiği uygulanmayan kontrol grubu hücrelerle, bor bileşikleri uygulanan hücrelerin kromozom aberasyonu ve mikronukleus sayıları karşılaştırıldığında kontrol grubu ve bor bileşiklerinin uygulandığı gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak bu çalışma ile farklı bor bileşikleri olan BA (borik asit), BP (boraks pentahidrat) ve DPD (disodyum pentaborat dekahidrat) 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  dozlarda kanser hücre hattı olan CCL-62 hücrelerine uygulanmış ve bu bileşiklerin, tür, doz ve maruziyet süresine bağlı olarak hücre çoğalması üzerinde etkili olduğu, fakat bu hücre hatlarında var olan sitogenetik anomalilerin sıklığı üzerine herhangi bir artırıcı ya da azaltıcı etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Resveratrolün çeşitli model organizmalarda (NAD)-bağımlı histon deasetilaz ailesi sirtuinlerin üyesi olan Sirt'i aktive ederek yaşam süresini uzattığı bilinmektedir. Ancak resveratrolün hücresel düzeyde hücre döngüsünü durdurduğu, erken yaşlanmaya ve apoptozise yol açtığı bilindiği için yaşlanmayı engelleyici etkileri tartışmalı hale gelmiştir. Üzüm çekirdeğinde bol miktarda bulunan resveratrolün insan normal dermal fibroblastlarında (BJ) yaşlanma üzerine olası etkilerinin ve sirtuinlerle olan ilişkisinin araştırıldığı çalışmada (Kılınçlı, 2013), resveratrolün 72 saatlik inkübasyon sonrasında 25  $\mu\text{M}$ ' dan itibaren BJ hücre proliferasyonunu azalttığı WST-1 ve BrdU testleriyle saptanmış ve Ki-67 immün boyama yöntemiyle de bu sonuç desteklenmiştir. Resveratrolün 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lik konsantrasyonlarda ise hücresel yaşlanmayı indüklediği Saß-Gal boyaması ile gösterilmiştir. Bunun yanısıra resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda (300  $\mu\text{M}$ ) hücre ölümüne neden olduğu TUNEL boyamasıyla belirlenmiştir. Sirt1, 2, 3, 6 ve 7'nin ifadelerinin Western Blot yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda, hücresel yaşlanmanın görüldüğü dozlarda Sirt1 ve 2' nin ifadesinde azalma olduğu ancak Sirt3, 6 ve 7' nin ifadelerinde ise değişiklik olmadığı bulunmuştur. Sonuç olarak

resveratrolün doza ve zamana bağlı olarak hücresel yaşlanmayı indüklediği ve buna bağlı olarak Sirt1 ve 2'nin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur.

Dünya genelinde baharat olarak tüketilen kırmızı acı biberin içerdiği kapsaisin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid) olası tümörögenез ve genotoksik özelliğinin yanı sıra çeşitli karsinojen ile mutajenlere antagonist olması ve tümöral hücre apoptozunun indüklemesi sebebiyle önemli bir ajan olarak tanımlanmaktadır. Ancak kapsaisin ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun nedenleri halen araştırma konusudur. Kaymaz vd. (2013), akut lenfoblastik lösemi hücre hattını (CCRF-CEM) kapsaisin ile muamele ettikten sonra, apoptoz analizi ve JAK/STAT (Janus Kinaz/ Sinyal İleticisi Transkripsiyon Aktivatörü) sinyal iletim yolağı elemanlarından STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6'nın mRNA seviyesindeki gen ekspresyonunu belirleyerek, kapsaisinin olası moleküler etki mekanizmasını belirlemeye çalışmışlardır. Kapsaisin ile muamele edilmiş CCRF-CEM hücrelerinde gözlenen apoptotik durum, kontrol grubu hücrelerin apoptotik durumu ile kıyaslandığında, muamele grubu hücrelerde % 37.1 oranında anlamlı bir apoptoz indüksiyonu saptanmıştır. Hedef genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında ise, STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarında sırasıyla -6.02, -49.6, -2.23, -5.53, -2.51 katlık anlamlı azalmalar saptanmıştır. Sonuç olarak, kapsaisin ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun olası nedenlerinden birinin, JAK/STAT sinyal yolağı elemanlarından; transkripsiyon faktörü olan ve lösemide artmış ekspresyon sergileyen STAT3, STAT5A ve -5B ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede azalmış olması olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca, sinyalleşme tetikleyicileri JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarındaki düşüşün sinyalleşmenin baskılanarak lösemik hücre proliferasyonunun yavaşlaması ve apoptozun indüklenmesi ile ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.

*Centaurea cadmea* Boiss. (Asteraceae) kök ve topraküstü kısımlarından elde edilen metanol ekstraktların üç farklı insan kanser hücre hattında insan servikal karsinoma hücre hattı (HeLa), insan akciğer adenokarsinoma hücre hattı (A549) ve insan osteokarsinoma hücre hattı (U-20S) ile kanserli olmayan normal hücre hattı (insan embriyonik böbrek hücre hattı, 293HEK) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri WST-1 reaktifi kullanılarak, hücre proliferasyon testi ile analiz edilmiştir. Sonuçta, *C. cadmea* toprak üstü kısımları kloroform ekstresinin tüm hücre hatlarında aktif olduğu bulunmuştur (IC<sub>50</sub>: 14.24-43.10 µg/mL) (Astari vd., 2014).

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aracılığıyla indirgeyerek formazan kristallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Kristallerin çözünmesiyle oluşan absorbans değerleri canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Fakat bazı kimyasallar ya da fitokimyasallar doğrudan MTT ile etkileşime girerek interferans yapabilmektedirler. Bu durum yanlış yorumlara neden olmaktadır (Arı vd., 2012). Arı vd'lerinin farklı bitki ekstraları kullanarak MTT metodunun hücre canlılığını belirlemede ne kadar güvenilir olduğu araştırmak için daha hassas bir yöntem olan ATP canlılık testiyle kıyaslayarak araştırmışlardır. Çalışmada *Hypericum adenotriticum*, *Salvia kronenburgei*, *Palergonium quersetorum* gibi bitkilerden elde edilen farklı bitki ekstraları insan meme kanserinin iki farklı hücre hattı (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerine uygulanmış ve hücre canlılığı MTT test ile belirlenmiş, yine bitki ekstralarının hücre ortamında MTT test ile verdiği absorbanslar belirlenmiştir. Ayrıca, MTT test sonuçlarını karşılaştırmak için hücre canlılıkları, ATP canlılık testiyle de analiz edilmiş, hücrelerde belirlenen ölümler mikroskobik olarak da değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, kullanılan bitki ekstralarının hem MCF-7 hem MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılıklarını anlamlı seviyede azalttığı gözlenmiştir. Mikroskobik sonuçlara uyumlu olarak, her iki kanser hattında da doza bağlı olarak hücre canlılıklarının azaldığı ATP testiyle de doğrulanmıştır. Fakat özellikle yüksek dozlarda hücre ölümleri gözlenmesine rağmen, MTT sonuçlarının bu hücre ölümlerini göstermediği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmaları ile, farklı bitki ekstralarının MTT ile etkileşime girerek hücre canlılığı lehine yanlış pozitif sonuç verdiğini (interferans oluşumu) ATP canlılık yöntemi ile karşılaştırılmaları ile ortaya koymuşlardır. Bitki ekstresi gibi interferans oluşturabilecek ajanların sitotoksikite analizlerinde MTT yönteminin güvenilir olmadığı ve uygun farklı yöntemlerin seçilmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Arı vd., 2012).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu tezde materyal olarak; insan serviks kanser hücre hattı (HeLa, ATCC CCL-2), ve insan periferel lenfosit hücreleri kullanılmıştır.

#### **3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar**

##### **3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler**

Tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri klorojenik asit (HWI Analytik GMBH Product No: 0050-05-90), antikanser ilaç olarak kullanılan Tekamen (Irinotecan Hydrochloride Trihydrate), Dimetil Sülfoksit (Sigma, D8418), Sodyum- piruvat (Na-pyruvate) (Sigma S8636), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D5546), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Lot040M3396), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma D1408), Mem Non-essential Amino Acid Solution (Sigma, M7145), L- glutamin (Sigma G 7513), Penisilin streptomisin (Sigma P0781), Tripsin-EDTA (Sigma Lot 11C508), RPMI-1640 Medium (Sigma, Lot 116K2416), Fetal calf serum (FCS), Histopaque-1077 (Sigma, RNBC 6075), Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma Lot BCBN 61904), Tox-1 Kiti (Thiazoly Blue Tetrazolium Sigma Lot MKBH9792V, MTT çözücü solüsyonu Sigma Lot 051M8719V), Hücre kültür şişesi (T-25 ve T-75 cm<sup>2</sup>) (Corning), Mikropipet, 24' lük, 48'lik ve 96'lık Kuyucuklu plak (Well Plate) (Corning), 15 ml ve 50 ml kapaklı falkon tüp (ISOLAB) ve tek kullanımlık steril pipet (Corning)'dir.

##### **3.2.2. Kullanılan Cihazlar**

Tez çalışması süresince cihazlar; hücre kültürü kabini (HeraSafe TipII Laminar Flow), invert ışık mikroskobu (Olympus CK40-SL), santrifüj (Hettich Rotina 38R), CO<sub>2</sub>'li hücre kültür inkübatörü (Thermo Hepa Class 100 Steri-cycle), elektrikli puar (Boeco) ve multiplak okuyucu spektrofotometre (Thermo Labsystems Multiskan Spectrum)'dir.

### **3.3. Yöntem**

#### **3.3.1. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Temini**

Bu tez kapsamında kullanılan insan serviks kanser hücre hattı (HeLa) (ATCC CCL-2) Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ADÜ-BİLTEM) hücre stoklarından temin edilmiştir. Bu çalışmada HeLa hücreleri seçilmesinin sebebi, serviks kanserinin kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinden biri olması, HeLa hücrelerinin kültür ortamında sınırsız sayıda bölünebilmeleri, insan kaynaklı olmaları ve kolay çoğaltılabilir olmasıdır. HeLa hücreleri yüzeye bağımlı (monolayer) ve süspanse formda üretilmektedir.

#### **3.3.2. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Canlandırılması ve Çoğaltılması**

Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ADÜ-BİLTEM)  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot tankı içerisinde stok olarak saklanan HeLa hücreleri denemeler için canlandırılmıştır. Hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de hızlıca çözdürülmüştür. Çözdürülen hücreler, içerisinde %10 Fetal Bovine serum, L-Glutamin, esensiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat ve sodyum bikarbonat bulunan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin iki günde bir besi ortamı değiştirilmiştir. Tez çalışması süresince HeLa hücrelerinin çoğaltılması rutin olarak sürdürülmüştür.

#### **3.3.3. Çoğaltılan İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin 24 ve 48-Kuyucuklu Plaklara (24 ve 48-well plate) Ekilmesi**

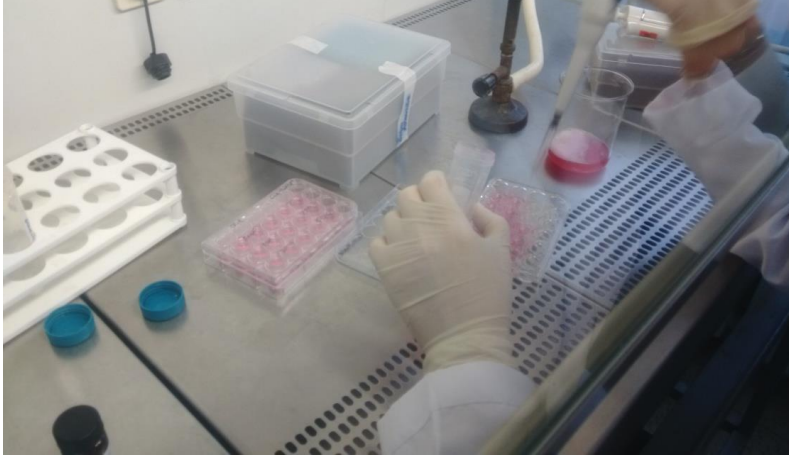
Hücreler uygun kültür koşullarında inkübe edildikten sonra morfolojik değişiklikleri ve hücre sayıları ışık mikroskobu ile takip edilmiştir. Belli periyotlarda besi ortamları değiştirilerek taze besin sağlanmıştır. Hücreler kültür kabı (flask) yüzeyini kapladığında pasajlama yapılmıştır. Kültür koşullarında kontaminasyona karşı pH değişikliği besi ortamının renk değişikliği takip edilerek yapılmıştır. Hücre kültür şişelerinde çoğaltılan insan serviks kanser hücreleri (HeLa), kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayınca (%80-90 yoğunluğa ulaştığında) tripsinle muamele edilip, 2-3 dakika  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde bekletilerek hücrelerin kültür şişesinde tutundukları zemini bırakması sağlanmıştır. Süspanse haldeki



HeLa hücrelerini içeren tripsin üzerine besiyeri ilave edilerek, tripsin inaktive edilmiş; tripsin+besiyeri karışımı içerisinde süspanse halde bulunan hücreler, kapaklı bir falkon tübü içerisinde toplanarak 800xg'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen hücreler, süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra besiyeri ile tekrar süspanse edilmiştir. 24 ve 48-kuyucuklu plağa her bir kuyucukta 500 µL olacak şekilde ekim yapılmış ve hücreler, 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde hücrelerin zemine tutunması için 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.3.4. İnsan Serviks Kanser Hücrelerinin Klorojenik Asit (KA) ve KA+Tekamen ile Muamele Edilmesi**

Analitik saflıktaki klorojenik asit (KA) az bir miktar dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülmüş ve stok çözeltide DMSO oranı % 0.1 olacak şekilde PBS ilave edilerek 1 µg/mL klorojenik asit (KA) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ön denemelerle belirlenen 100, 150, 300 ve 500 µg/mL'lik KA, DMEM besiyeri ile stoktan seyreltilerek hazırlanmıştır. HeLa hücreleri, KA'nın belirlenen konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir (Şekil 3.1). Çalışmanın ilk basamağında negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren HeLa hücreleri, pozitif kontrol olarak antikanser ilaç olarak kullanılan Tekamen (40 µg/mL); çözücü kontrol olarak da KA'nın çözücüsü olarak kullanılan % 0.1'lik DMSO ve kontrol hücre grubu olarak da insan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Çalışmanın ikinci basamağında HeLa hücreleri KA+Tekamen (40 µg/mL) ile muamele edilmiştir. Hücreler KA, Tekamen ve KA+Tekamen uygulamasından sonra 24 saatlik recovery (kurtarma) periyoduna bırakılmıştır. Uygulama grupları için izlenen işlem basamakları kontrol grupları için de aynı şekilde yapılmıştır. Denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Klorojenik Asidin HeLa hücreleri uygulanması

### 3.3.5. İnsan Periferel Kan Lenfositleri İzolasyonu

Çalışmada kontrol hücre grubu olarak kullanılan insan periferel kan lenfositlerin izolasyonu için sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, bilinen bir genetik hastalığı olmayan sağlıklı 25 yaşındaki bir kadın bireyden 5 ml kan örneği steril koşullarda heparinize tüp içerisine alınmıştır. Lenfosit izolasyonu, Boyum (1968) 'a göre yapılmıştır. Heparinize kan 1:1 oranında PBS ile seyreltilmiş, kan+PBS karışım üzerine 4:3 oranında Histopaque-1077 ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 400xg' de 30 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda lenfosit içeren faz ayrı bir tüpe alınarak PBS ile yıkanmış ve 250 g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. PBS ile yıkama işlemi 2 kez yapılmıştır. Santrifüjden sonra hücreler RPMI- 1640 besiyeri ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen lenfositler her bir kültürün 1 ml'sinde  $1 \times 10^3$  kadar hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir.

### 3.3.6. Klorojenik Asidin İnsan Serviks Kanseri Hücreleri ve İnsan Periferel Kan Lenfositleri Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisinin Hücre Canlılık Testleri ile Belirlenmesi

KA'in ve KA+Tekamen'in ayrı ayrı ve birlikte HeLa hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi MTT ve WST-8 canlılık testleri ile belirlenmiştir.

### 3.3.6.1. MTT Hücresel Canlılık Testi

KA ve KA+Tekamen'nin HeLa hücrelerindeki *in vitro* sitotoksik etkisini belirlemek için MTT canlılık testi uygulanmıştır. HeLa hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki (100, 150, 300 ve 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) KA ve KA+Tekamen ile 24, 48 ve 72 saat süresince muamele edilmiştir. HeLa hücreleri uygulamalardan sonra 24 saatlik recovery (kurtarma) periyoduna bırakılmıştır. Recovery periyodunun ardından 24 kuyucuklu plaklara besiyerinin 1/10'u kadar MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ilave edilerek 4 saat süreyle  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde inkübasyona devam edilmiştir. Uygulama süresinin sonunda kuyucuklara besiyeri kadar MTT çözme solüsyonu (HCl/izopropanol) ilave edilmiş ve kristallerin çözünmesi için 1 saat süreyle oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda oluşan kristallerin tamamen çözünmesi için pipetaj yapılmış ve Multiplak okuyucu spektrofotometrede, 570 nm'de absorbanlar okutulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Klorojenik Asidin HeLa hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin MTT canlılık testi ile belirlenmesi

Denemelerde uygulama gruplarının yanı sıra, sadece besiyerinde çoğaltılan HeLa hücreleri, çözücü (%0.1'lik DMSO) içeren besi yerinde çoğaltılan hücreler, antikanser ilaç olarak kullanılan Tekamen (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) içeren besiyerindeki hücreler ile Boyum (1968)'e göre izole edilen insan periferel kan lenfositleri olmak üzere dört farklı kontrol grubu kullanılmıştır ve her bir gruptaki *in vitro* sitotoksik etki aynı şekilde belirlenmiştir. Her bir deneme üç tekrarlı yapılmıştır.

KA'nın ve KA+Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi elde edilen absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - [(As/Ac) \times 100]$$

As: Örneğin (Uygulama grubu) absorbansı

Ac: Kontrol grubunun absorbansı

### 3.3.6.2. WST-8 Hücre Canlılık Testi

KA ve KA+Tekamen'nin HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisini belirlemek için, ayrı bir canlılık testi olan WST-8 canlılık testi de kullanılmıştır. HeLa hücreleri, farklı konsantrasyonlarda (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) hazırlanan KA ve KA+Tekamen ile 24, 48 ve 72 saat süresince muamele edilmiştir. Hücreler KA ve KA+Tekamen uygulamasından sonra 24 saatlik recovery (kurtarma) periyoduna bırakılmıştır. Recovery periyodunun ardından 48-kuyucuklu plaklara besiyerinin 1/10'u kadar WST-8 reaktif solüsyonu ilave edilmiş ve 2 saat süreyle CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda Multiplak okuyucu Spektrofotometrede, 450 nm'de absorbanslar belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Klorojenik Asidin HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisinin WST-8 canlılık testi ile belirlenmesi

KA'nın ve KA+Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi elde edilen absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Sitotoksisite} = 1 - [(As/Ac) \times 100]$$

As: Örneğin (Uygulama grubu) absorbansı

Ac: Kontrol grubunun absorbansı

Denemelerde uygulama gruplarının yanı sıra, sadece besiyerinde çoğaltılan HeLa hücreleri, çözücü (%0.1'lik DMSO) içeren besi yerinde çoğaltılan hücreler, antikanser ilaç olarak kullanılan Tekamen içeren besiyerindeki hücreler ile Boyum (1968)'e göre izole edilen insan periferel kan lenfositleri olmak üzere dört farklı kontrol grubu kullanılmıştır ve her bir gruptaki in vitro sitotoksik etki aynı şekilde belirlenmiştir. Her bir deneme üç tekrarlı yapılmıştır.

### **3.4. İstatistiki Analiz**

Üç tekrarlı sitotoksisite denemelerinden elde edilen verilerin ortalama değeri  $\pm$ Standart Hata (SD) olarak hesaplanmıştır. Kontroller ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar ile sonuçların istatistiki önemi, SPSS 16 istatistik paket programında One Way ANOVA varyans analizi yapılarak değerlendirilmiştir ( $p < 0.05$ ).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in HeLa Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi İle Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı konsantrasyondaki (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) klorojenik asidin (KA) tek başına ve Tekamen (TE; 40 µg/mL) ile birlikte (KA+TE) farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulanması sonucunda, HeLa hücreleri ve insan periferal lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için MTT ve WST-8 canlılık testleri yapılmıştır.

Tek başına KA'nın HeLa hücrelerine uygulanması sonucunda ortaya çıkan MTT canlılık testi sitotoksite verilerine bakıldığında, KA'nın farklı konsantrasyonlar ve farklı muamele sürelerinde sitotoksite üzerinde farklı sonuçları ortaya çıkardığı görülmüştür. En düşük konsantrasyon olan 100 µg/mL'lik KA muamelesi HeLa hücreleri üzerinde 24. saatte %30.25±0.20'lik bir sitotoksik etki gösterirken, 48. saatte gözlenen sitotoksik etki %24.57± 0.16, süre 72 saate çıkarıldığında ise sitotoksik etkinin azalarak %23.07±0.05'e düştüğü belirlenmiştir. Bu veriler düşük konsantrasyondaki KA muamelesinin HeLa hücrelerinde süre artışına bağlı olarak sitotoksik etkiyi azalttığını göstermektedir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). KA'nın artan konsantrasyonlarında da, muamele süresi artışı ile sitotoksik etkinin azaldığı görülmektedir. Sadece KA'nın en yüksek konsantrasyonu olan 500 µg/mL'lik konsantrasyonu ile 48 saat süre muamele edilen HeLa hücrelerinde sitotoksik etkinin %41.06±0.12'ye ulaştığı belirlenmiştir. Bu sonuç, negatif kontrol ve çözücü kontrol (DMSO) grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel anlamda önemli olduğu ( $p<0.05$ ); pozitif kontrol olarak kullanılan Tekamen'den elde edilen sitotoksite sonuçları ile karşılaştırıldığında ise, KA'nın sitotoksik etkisinin Tekamen'in sitotoksik etkisinden önemli derecede daha düşük olduğu ( $p<0.05$ ) görülmüştür (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Serviks kanserinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisine bakıldığında; Tekamen ile 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilen HeLa hücrelerinde gözlenen sitotoksik etki sonuçları farklılık göstermiştir. Süre artışı ile Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi de artmıştır. Tekamen'in sitotoksik etkisi sırasıyla %60.17±0.13, %66.27±0.32 ve %68.71±0.12 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1

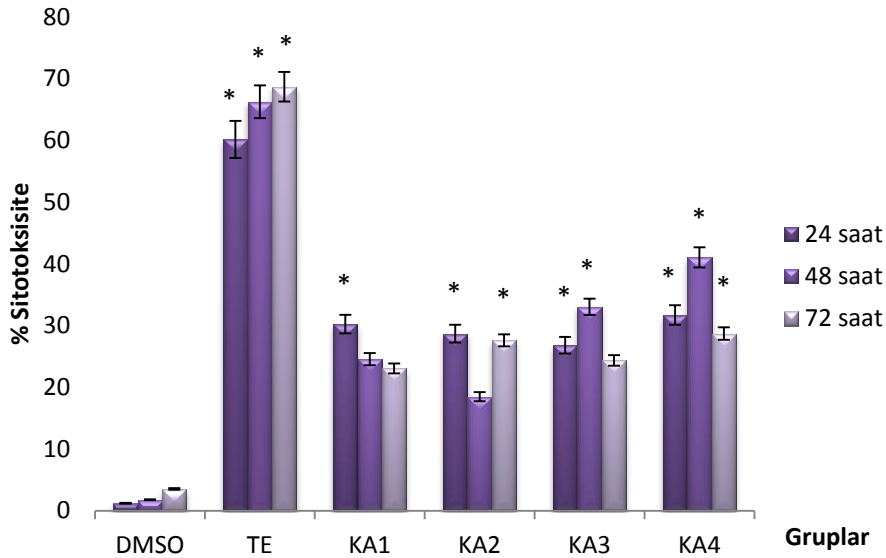
ve Şekil 4.1). Tekamen'in sitotoksik etkisi negatif kontrol ve DMSO ile muamele sonucu elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında aradaki fark, istatistiki açıdan önemlidir ( $p<0.05$ ).

Elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; KA'nın tek başına farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde uygulanmasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. HeLa hücreleri üzerinde en yüksek konsantrasyon olan 500  $\mu\text{g/mL}$ 'lik KA muamelesi kadar önemli bir sitotoksik etki ortaya çıkmamıştır.

Çizelge 4.1. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
<b>NEGATİF KONTROL</b>	0.00	0.00	0.00
<b>ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)</b>	1.23 $\pm$ 0.01	1.79 $\pm$ 0.07	3.54 $\pm$ 0.07
<b>TE</b>	60.17 $\pm$ 0.13*	66.27 $\pm$ 0.32*	68.71 $\pm$ 0.12*
<b>KA1</b>	30.25 $\pm$ 0.20*	24.57 $\pm$ 0.16	23.07 $\pm$ 0.05
<b>KA2</b>	28.70 $\pm$ 0.12*	18.50 $\pm$ 0.10	27.61 $\pm$ 0.12*
<b>KA3</b>	26.82 $\pm$ 0.02*	33.05 $\pm$ 0.07*	24.37 $\pm$ 0.02
<b>KA4</b>	31.72 $\pm$ 0.09*	41.06 $\pm$ 0.12*	28.72 $\pm$ 0.07*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40  $\mu\text{g/mL}$ ) **KA1:** 100  $\mu\text{g/mL}$ , **KA2:** 150  $\mu\text{g/mL}$ , **KA3:** 300  $\mu\text{g/mL}$ , **KA4:** 500  $\mu\text{g/mL}$  \*  $p<0.05$  seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.1. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE**: Tekamen (40 µg/mL) **KA1**: 100 µg/mL, **KA2**: 150 µg/mL, **KA3**: 300 µg/mL, **KA4**: 500 µg/mL \*  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir)

Farklı konsantrasyonlardaki (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) KA+Tekamen karışımının farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) HeLa hücrelerine uygulanması sonucunda sitotoksik etkide farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. KA+Tekamen karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki, KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla olmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). En düşük KA konsantrasyonu olan 100 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde gözlenen % sitotoksosite  $61.18 \pm 0.04$  iken, süre artışı ile sitotoksik etkide azalmalar olduğu gözlenmiştir (sırası ile;  $59.12 \pm 0.10$  ve  $43.13 \pm 0.12$ ). Benzer sonuçlar KA+TE karışımının 150 µg/mL'lik uygulamasında da elde edilmiştir. KA+TE karışımının 300 µg/mL'lik ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonları ile muamele edilen HeLa hücrelerinde 24. saatte sırası ile  $60.60 \pm 0.02$  ve  $62.44 \pm 0.004$  olan sitotoksik etki, süre 48 saate çıkarıldığında sırası ile  $66.81 \pm 0.07$  ve  $71.07 \pm 0.12$ 'ye çıkmıştır. KA+TE karışımı muamelesi sonrasında elde edilen bu değer Tekamen'in tek başına gösterdiği sitotoksik etki ve negatif kontrole göre çok daha yüksek olmuştur ve istatistiki açıdan da önemlilik arz etmektedir ( $p < 0.05$ ). Muamele süresi 72 saate çıkarıldığında her iki konsantrasyonda da sitotoksik etkide dramatik bir düşüş

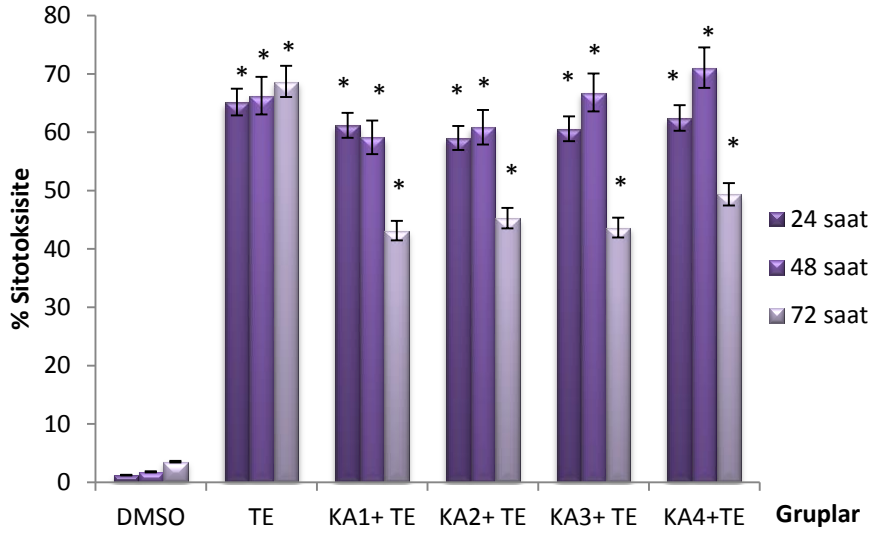


ortaya çıkmıştır (sırası ile; %43.66±0.33 ve %49.35±0.10) (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
<b>NEGATİF KONTROL</b>	0.00	0.00	0.00
<b>ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)</b>	1.23 ±0.01	1.79 ±0.07	3.54±0.07
<b>TE</b>	65.17±0.13*	66.27±0.32*	68.71±0.12*
<b>KA1+ TE</b>	61.18±0.04*	59.12±0.10*	43.13±0.21*
<b>KA2+ TE</b>	59.02±0.05*	60.85±0.16*	44.28±0.15*
<b>KA3+ TE</b>	60.60±0.02*	66.81±0.07*	43.66±0.33*
<b>KA4+ TE</b>	62.44±0.04*	71.07±0.12*	49.35±0.10*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.2. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları (DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL), KA1+TE: 100 µg/mL+Tekamen, KA2+TE: 150 µg/mL+Tekamen, KA3+TE: 300 µg/mL+Tekamen, KA4+TE: 500 µg/mL+Tekamen \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.)

#### 4.2. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in İnsan Periferik Lenfosit Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin MTT Canlılık Testi ile Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı konsantrasyondaki (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) klorojenik asidin (KA) tek başına ve Tekamen (40 µg/mL) ile birlikte (KA+TE) kombine olarak farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulandığında periferik lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan MTT canlılık testinin sonuçları Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de yer almaktadır.

Tek başına KA'nın periferik lenfosit hücrelerine uygulanması sonucunda ortaya çıkan sitotoksik etkiye bakıldığında, KA'nın farklı konsantrasyonlar (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) ve farklı sürelerde periferik lenfositler üzerinde üzerinde farklı sitotoksik etkilerde bulunduğu görülmüştür.

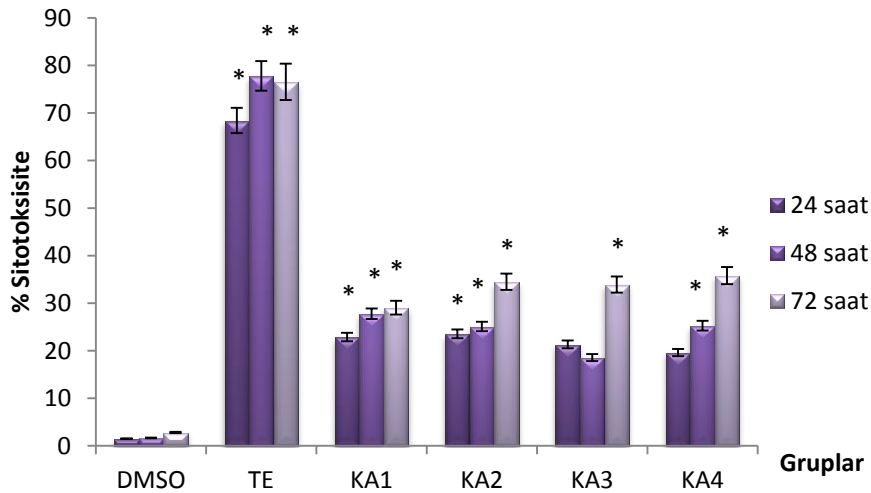
En düşük konsantrasyon olan 100 µg/mL' lik KA muamelesi periferel lenfosit hücreleri üzerinde 24 saatte %22.87±0.19 gibi oldukça düşük bir sitotoksik etki gösterirken, süre artışının da periferel lenfositler üzerindeki sitotoksik etkinin artışına dair istatistiki açıdan önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). KA'nın artan konsantrasyonları ile uzun süre muamele edilen periferel lenfositlerde sitotoksik etki, süre ile düşük oranda da olsa artmış görünmektedir. Bu sonuç, negatif kontrol ve çözücü kontrol olan DMSO ile karşılaştırıldığında aradaki fark, istatistiksel anlamda önemlidir (p<0.05). Çalışmanın sonuçları, pozitif kontrol olarak kullanılan Tekamen'in periferel lenfositleri üzerinde önemli derecede sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Tekamen ile 24, 48, 72 saat muamele edilen periferel lenfositlerde süre artışı Tekamen'in periferel lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisini arttırmıştır. Tekamen'in sitotoksik etkisi sırasıyla %71.44±0.23, %77.80±0.40 ve %76.57±0.03 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Tekamen'in sitotoksik etkisi negatif kontrol, DMSO ve KA muamelesi ile karşılaştırıldığında aradaki farkın, istatistiki açıdan önemli olduğu bulunmuştur (p<0.05).

Çizelge 4.3. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
<b>NEGATİF KONTROL</b>	0.00	0.00	0.00
<b>ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)</b>	1.49±0.02	1.64±0.06	2.80±0.04
<b>TE</b>	71.44±0.23*	77.80±0.40*	76.57±0.03*
<b>KA1</b>	22.87±0.19*	27.78±0.14*	29.05±0.28*
<b>KA2</b>	23.54±0.06*	25.09±0.08*	34.50±0.01*
<b>KA3</b>	19.32±0.05	18.54±0.13	33.90±0.13*
<b>KA4</b>	16.61±0.07	25.26±0.14*	35.80±0.12*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL) **KA1:** 100 µg/mL, **KA2:** 150 µg/mL, **KA3:** 300 µg/mL, **KA4:** 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.

Çalışmadan elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; KA'nın tek başına farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde periferik lenfositler üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye yol açmadığı ortaya çıkmıştır. Konsantrasyon ve uygulama süresi artışı da önemli bir sitotoksik etki oluşturmamıştır.



Şekil 4.3. Klorojenik Asit uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları (DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.)

KA+Tekamen karışımının farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde periferik lenfositlerine uygulanması sonucunda farklı oranlarda sitotoksik etki oluşturduğu görülmüştür. KA+Tekamen karışımının, periferik lenfositler üzerinde gösterdiği sitotoksik etki KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla olmuştur (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4). En düşük KA konsantrasyonu olan 100 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile 24 saat muamele edilen periferik lenfositlerde gözlenen % sitotoksosite değeri  $43.78 \pm 0.07$  iken, süre artışı ile sitotoksisitelerde 48 saatlik muamele sonucunda azalma olduğu görülmüştür ( $30.30 \pm 0.06$ ). Muamele süresi 72 saate çıkarıldığında ise, sitotoksosite değerinde yeniden bir artış ortaya çıkmış ve 24 saatlik muamele sonucunda ortaya çıkan sitotoksik etkiye benzer bir sonuç elde edilmiştir ( $42.98 \pm 0.05$ ). KA+TE karışımının diğer konsantrasyonlarında muamele süresinin artışı periferik lenfositlerdeki sitotoksisiteyi artırıcı yönde etkide bulunmuştur. 150 µg/mL'lik KA+TE karışımı muamelesi sonucunda

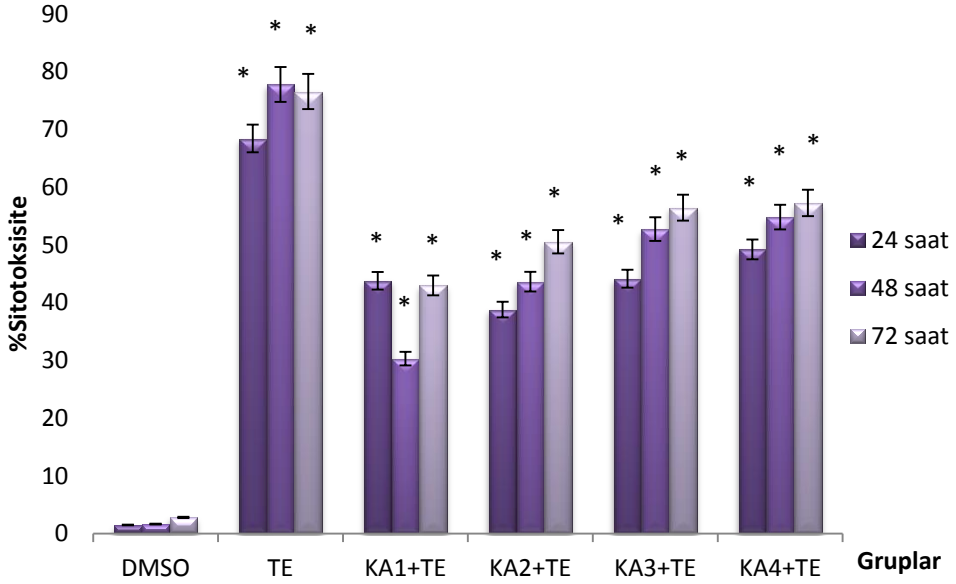
gözlenen sitotoksosite değeri 24. saatte %38.81±0.12 iken; muamele süresi 72 saate çıkarıldığında sitotoksik etki %50.55±0.01'ye yükselmiştir. Bu sonuç, negatif kontrol ve çözücü kontrol (DMSO) ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan önem arz etmektedir. Benzer sonuçlar KA+TE karışımının diğer konsantrasyon ve muamele sürelerinde de ortaya çıkmıştır.

Elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; KA'nın tek başına uygulandığında periferik lenfositler üzerinde önemli bir sitotoksik etki gösterdiğini, ve bu etkinin KA+TE karışımı uygulanmasında gerek konsantrasyon ve gerekse süre artışının sitotoksik etkiyi arttırdığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
NEGATİFKONTROL	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.49±0.02	1.64±0.06	2.8±0.04
TE	71.44±0.23*	77.8±0.40*	76.57±0.03*
KA1+TE	43.78±0.07*	30.30±0.06*	42.98±0.05*
KA2+TE	38.81±0.12*	43.63±0.13*	50.55±0.01*
KA3+TE	44.14±0.05*	52.75±0.12*	56.45±0.03*
KA4+TE	49.22±0.48*	54.81±0.16*	57.28±0.06*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.4. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT analizi sonuçları (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE**: Tekamen (40µg/mL), **KA1+TE**: 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE**: 150µg/mL+Tekamen, **KA3+TE**: 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE**: 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.)

### 4.3. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in HeLa Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin WST-8 Canlılık Testi ile Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan farklı konsantrasyondaki (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) klorojenik asidin (KA) tek başına ve Tekamen (TE; 40µg/mL) ile birlikte (KA+TE) farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulandığında, HeLa hücreleri ve insan periferel lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için ayrı bir canlılık testi olan WST-8 canlılık testi de yapılmıştır.

Tek başına KA'nın HeLa hücrelerine uygulanması sonucunda ortaya çıkan sitotoksik verilerine bakıldığında, KA'nın farklı konsantrasyonlar ve farklı muamele sürelerinde sitotoksikite üzerinde farklı sonuçları ortaya çıkardığı görülmüştür. En düşük konsantrasyon olan 100 µg/mL' lik KA muamelesi HeLa

hücreleri üzerinde 24. saatte  $18.03 \pm 0.10$ 'lık bir sitotoksik etki gösterirken, 48. saatte gözlenen sitotoksik etki  $18.62 \pm 0.34$  iken, süre 72 saate çıkarıldığında ise sitotoksik etki azalarak  $15.56 \pm 0.07$  olarak hesaplanmıştır. Bu veriler düşük konsantrasyonda KA muamelesinin HeLa hücrelerinde süreye bağlı olarak sitotoksik etkiyi azalttığını göstermektedir (Çizgelge 4.5 ve Şekil 4.5). KA'nın artan konsantrasyonlarında muamele süresi artışının sitotoksik etkiyi değiştirdiği görülmektedir. KA'nın en yüksek konsantrasyonu olan  $500 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonu ile 24 ve 48 saat süre muamele edilen HeLa hücrelerinde sitotoksik etki sırası ile  $29.01 \pm 0.59$  ve  $26.04 \pm 0.31$  olmuştur. Bu değerler negatif kontrol ve DMSO ile karşılaştırıldığında (0.00, 0.00 ve  $1.70 \pm 0.16$ ,  $1.65 \pm 0.46$ ) oldukça yüksektir. Muamele süresi arttıkça sitotoksik etki azalmış ve 72. saatte  $17.98 \pm 0.48$ 'e düşmüştür. Bu sonuç, hem negatif kontrol grubundan elde edilen sonuçlarla hem de pozitif kontrol olarak kullanılan Tekamen'den elde edilen sitotoksikite sonuçları ile karşılaştırıldığında aradaki farkın, istatistiksel anlamda önemli olduğunu ( $p > 0.05$ ), sadece 72 saatlik muamele sonucunda ortaya çıkan sitotoksik etkinin negatif kontrol ve DMSO'ya göre istatistiki açıdan önemsiz olduğunu göstermiştir.

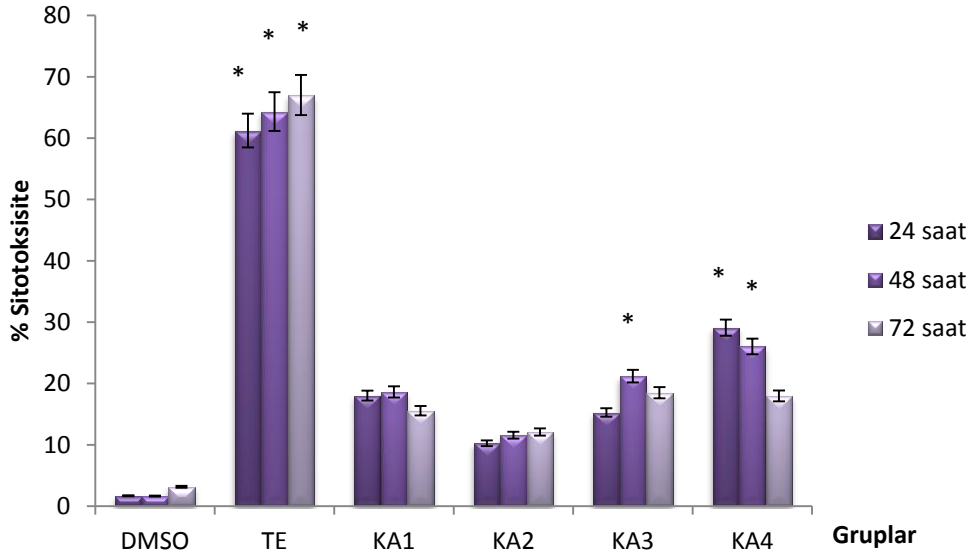
Serviks kanserinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisine bakıldığında ise; WST-8 testi sonuçları da Tekamen ile 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilen HeLa hücrelerinde gözlenen sitotoksik etkinin sonuçlarının farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Süre artışı Tekamen'in HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini artırıcı yönde etki etmiştir. Tekamen'in sitotoksik etkisi sırasıyla  $61.24 \pm 0.24$ ,  $64.33 \pm 0.32$  ve  $67.03 \pm 0.30$  olarak hesaplanmıştır (Çizgelge 4.5 ve Şekil 4.5). Tekamen'in sitotoksik etkisi negatif kontrol ve KA muamelesi karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiki açıdan önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; WST-8 canlılık testi sonuçları KA'nın tek başına farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde uygulanmasının Tekamen ile karşılaştırıldığında, HeLa hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.5. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.70±0.16	1.65±0.46	3.17±0.03
TE	61.24±0.24*	64.33±0.32*	67.03±0.30*
KA1	18.03±0.10	18.62±0.34	15.56±0.07
KA2	10.26±0.06	11.58±0.41	12.09±0.04
KA3	15.28±0.57	21.2±0.29*	18.5±0.08
KA4	29.1±0.59*	26.04±0.31*	17.98±0.48

DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.5. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları (DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.)

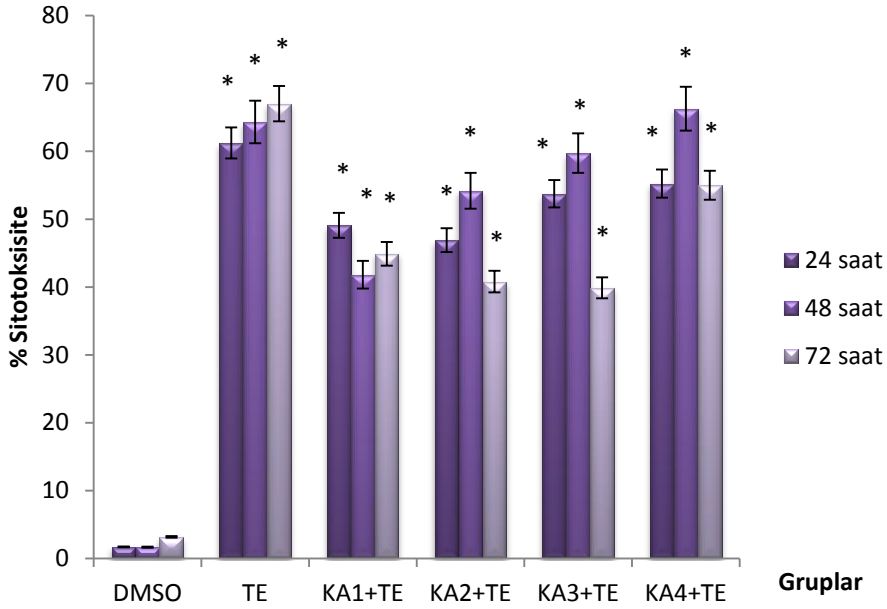


KA+Tekamen karışımının farklı konsantrasyonlar ve farklı sürelerde HeLa hücrelerine uygulandığında ortaya çıkabilecek sitotoksik etkinliğini belirlemek için yapılan WST-8 canlılık testinin sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da yer almaktadır. Deneme sonuçları KA+TE karışımının farklı konsantrasyonlar ve farklı sürelerde uygulanmasının HeLa hücreleri üzerinde farklı sitotoksik etki yaptığını göstermiştir. KA+TE karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden çok daha fazla olmuştur (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6). En düşük KA konsantrasyonu olan 100 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde gözlenen % sitotoksosite değeri  $49.10 \pm 0.11$  iken, 48. saatte sitotoksik etki  $41.82 \pm 0.01$ 'e gerilerken; 72. saatte tekrar artmış ve  $44.90 \pm 0.02$ 'ye yükselmiştir. Bu sonuç negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan da önemlidir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6). KA+TE karışımının 150 µg/mL ve 300 µg/mL'lik konsantrasyonunun 24 saat ve 48 saat'lik sürelerle uygulanması % sitotoksosite değerinde önce artış ( $46.92 \pm 0.21$  ve  $54.19 \pm 0.19$ ,  $53.75 \pm 0.32$  ve  $59.74 \pm 0.03$ ) göstermiş, süre 72 saate çıkarıldığında ise sitotoksik etki azalmaya başlamıştır (sırası ile;  $40.80 \pm 0.39$  ve  $39.88 \pm 0.16$ ). En yüksek sitotoksik etki, 500 µg/mL'lik konsantrasyondaki KA ile muamele edilme sonucunda ortaya çıkmıştır. 500 µg/mL'lik konsantrasyondaki KA+TE karışımı ile muamele edilen HeLa hücrelerindeki sitotoksik etki 24. ve 48. saatte sırası ile  $55.25 \pm 0.03$  ve  $66.28 \pm 0.49$  olurken; süre 72 saate çıkarıldığında sitotoksik etki  $55.00 \pm 0.17$ 'ye gerilemiştir. Elde edilen bu sonuç negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan da önemlilik arz etmektedir ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
<b>NEGATİF KONTROL</b>	0.00	0.00	0.00
<b>ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)</b>	1.70±0.16	1.65±0.46	3.17±0.03
<b>TE</b>	61.24±0.24*	64.33±0.32*	67.03±0.30*
<b>KA1+TE</b>	49.10±0.11*	41.82±0.01*	44.90±0.02*
<b>KA2+TE</b>	46.92±0.21*	54.19±0.19*	40.80±0.39*
<b>KA3+TE</b>	53.75±0.32*	59.74±0.03*	39.88±0.16*
<b>KA4+TE</b>	55.25±0.03*	66.28±0.49*	55.00±0.17*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.6. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE**: Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE**: 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE**: 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE**: 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE**: 500 µg/mL+Tekamen \*  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir.)

Çalışma sonucunda elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde, HeLa hücreleri KA+Tekamen karışımı ile birlikte muamele edildiğinde, KA'nın Tekamen'in HeLa hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltıcı yönde etki ettiği gözlenmiştir.

#### 4.4. Klorojenik Asit ve Klorojenik Asit+Tekamen'in İnsan Periferik Lenfosit Hücreleri Üzerindeki *in vitro* Sitotoksik Etkisinin WST-8 Canlılık Testi ile Belirlenmesi

Çalışmada farklı konsantrasyondaki (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) klorojenik asidin (KA) tek başına ve Tekamen (TE; 40 µg/mL) ile birlikte (KA+TE) farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulandığında, periferik lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan WST-8 canlılık testinin sonuçları Çizelge 4.7, Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7, Şekil 4.8'de yer almaktadır.

KA'nın tek başına periferik lenfosit hücrelerine uygulanması sonucunda ortaya çıkan sitotoksite verilerine bakıldığında, KA'nın farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde periferik lenfositler üzerinde farklı sitotoksik etkilerde bulunduğu görülmüştür.

En düşük konsantrasyon olan 100 µg/mL'lik KA muamelesi periferik lenfosit hücreleri üzerinde 24. saatte %26.61±0.21 gibi bir sitotoksik etki gösterirken, 48 saatlik uygulama sonucunda sitotoksik etkinin yine çok fazla artış göstermediği, 72 saatlik KA muamelesi sonucunda da periferik lenfositlerdeki sitotoksik etki daha da azalmış ve %22.97±0.18'lik bir sitotoksik etki ortaya çıkmıştır. KA'nın süreye bağlı olarak periferik lenfositler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki negatif kontrolle karşılaştırıldığında artmıştır. Elde edilen bu veriler negatif kontrol ve çözücü kontrol olan DMSO karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan önemlidir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). KA'nın 300 µg/mL'lik konsantrasyonu ile uzun süre muamele edilen periferik lenfositlerde sitotoksik etki, süre ile düşük oranda da olsa artmış görünmektedir. Bu sonuç, negatif kontrol ve pozitif kontrolden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında aradaki farkın yine istatistiksel anlamda önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.05).

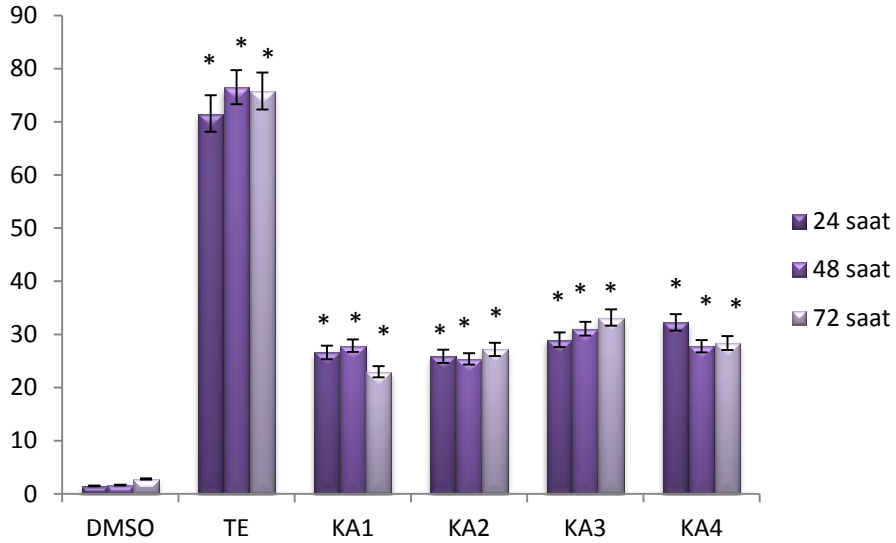
Serviks kanserinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan Tekamen'in periferik lenfositler üzerindeki in vitro sitotoksik etkisine bakıldığında; Tekamen ile 24, 48, 72 saat muamele edilen periferik lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki sonuçları farklılık göstermiştir. Süre artışı Tekamen'in periferik lenfositler üzerindeki sitotoksik etkinliğini arttırmıştır. Tekamen'in sitotoksik etkisi sırasıyla %71.58±0.13, %76.52±0.24 ve %75.80±0.16 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Tekamen'in sitotoksik etkisi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; KA'nın tek başına periferik lenfositler üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği ortaya çıkarmıştır. Yine KA'nın lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisi Tekamen ile karşılaştırıldığında da KA'nın sitotoksik etkisinin oldukça düşük olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.7. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.80±0.10	1.98±0.10	3.10±0.10
TE	71.58±0.13*	76.52±0.24*	75.80±0.16*
KA1	26.61±0.21*	27.88±0.01*	22.97±0.18
KA2	25.87±0.07*	25.40±0.03*	27.18±0.12*
KA3	27.30±0.09*	31.07±0.13*	33.81±0.09*
KA4	32.26±0.10*	27.78±0.16*	28.38±0.14*

DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.7. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları (DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.)

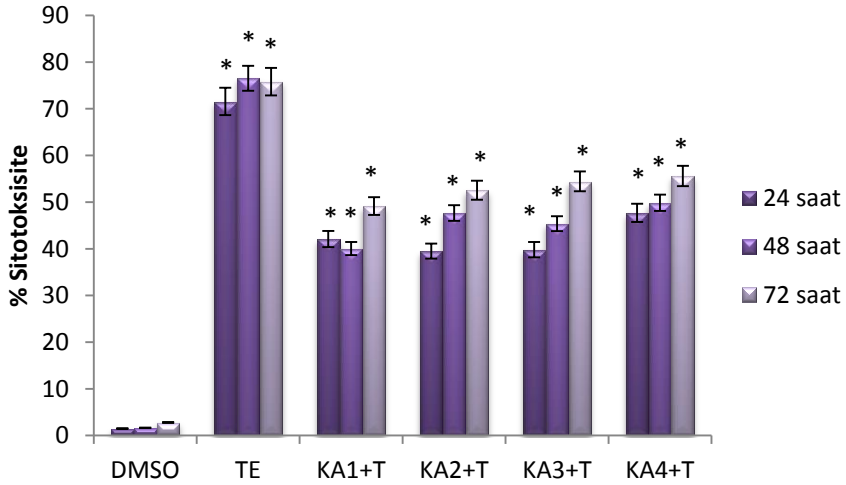
KA+Tekamen karışımının farklı konsantrasyonlar ve farklı sürelerde periferik lenfositlerine uygulanması sonucunda da farklı oranlarda sitotoksik etki oluşturduğu görülmüştür. KA+Tekamen karışımının, periferik lenfositler üzerinde gösterdiği sitotoksik etki KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden neredeyse iki kat daha fazla olmuştur (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). En düşük KA konsantrasyonu olan 100 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile 24 saat muamele edilen periferik lenfositlerde gözlenen % sitotoksikite değeri %42.10±0.12 iken, süre artışı ile sitotoksikitede 48 saatlik muamele sonucunda düşük oranda bir azalma olduğu görülmüştür (%40.05±0.16). Muamele süresi 72 saate çıkarıldığında ise, sitotoksikite değeri yeniden bir artış ortaya çıkmıştır (%49.12±0.19). Bu sonuç negatif kontrol ve çözücü kontrol olan DMSO'dan elde edilen sitotoksikite değeri ile karşılaştırıldığında (%3.10±0.10) istatistikî açıdan da önem arz etmiştir ( $p<0.05$ )(Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8). KA+TE karışımının diğer uygulama konsantrasyonları da muamele süresinin artışı ile periferik lenfositler üzerindeki sitotoksik etkiyi arttırmıştır. 150 µg/mL'lik KA+TE karışımı muamelesi sonucunda gözlenen sitotoksikite değeri 24. saatte %39.51±0.07 iken; muamele süresi 72 saate çıkarıldığında sitotoksik etki %52.55±0.14'e yükselmiştir. Bu sonuç, negatif kontrolden elde edilen değer ile karşılaştırıldığında istatistikî açıdan önem arz etmektedir. Benzer sonuçlar KA+TE karışımının diğer konsantrasyon ve muamele sürelerinde de ortaya çıkmıştır.

Elde edilen bütün veriler değerlendirildiğinde; KA'nın tek başına uygulandığında periferik lenfositler üzerinde önemli bir sitotoksik etki göstermediği, ancak KA+Tekamen karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden çok daha fazla olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.8. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları

Gruplar	% SİTOTOKSİSİTE		
	SÜRE		
	24. saat	48. saat	72. saat
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.80±0.10	1.98±0.10	3.10±0.10
TE	71.58±0.13*	76.52±0.24*	75.80±0.016*
KA1+TE	42.10±0.12*	40.05±0.16*	49.12±0.19*
KA2+TE	39.51±0.07*	47.66±0.07*	52.55±0.14*
KA3+TE	39.38±0.11*	45.38±0.24*	54.45±0.08*
KA4+TE	47.69±0.20*	49.85±0.14*	55.67±0.19*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL+Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+ Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.8. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair WST-8 analizi sonuçları (**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL + Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.)

#### 4.5. MTT ve WST-8 Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Bu tez çalışması kapsamında Klorojenik Asit, Tekamen ve KA+Tekamen karışımının HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi MTT ve WST-8 canlılık testi ile belirlenmiş olup, iki farklı canlılık testinden elde edilen sitotoksikite verileri karşılaştırılmıştır.

KA'nın gerek tek başına ve gerekse KA+TE karışımı birlikte uygulanması sonucunda HeLa hücreleri üzerin meydana gelen sitotoksik etkisiye dair elde edilen veriler incelendiğinde, MTT canlılık testi ile elde edilen sitotoksikite değerlerinin WST-8 canlılık testinden elde edilen verilerden daha yüksek olduğunu görülmüştür (Çizelge 4.9, Şekil 4.9 ve Çizelge 4.10, Şekil 4.10).

Benzer şekilde KA ile tek başına muamele edilen periferel lenfositlerde MTT canlılık testi sonucunda uygulanan her dört farklı konsantrasyon ve üç farklı süre birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin; 100 µg/mL ve 150 µg/mL'lik KA ile muamele edilen periferel lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki MTT test sonuçlarında daha yüksek görünürken, 300 µg/mL ve 500 µg/mL'lik KA ile muamele edilen periferel lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki WST-8 sonucunda daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11).

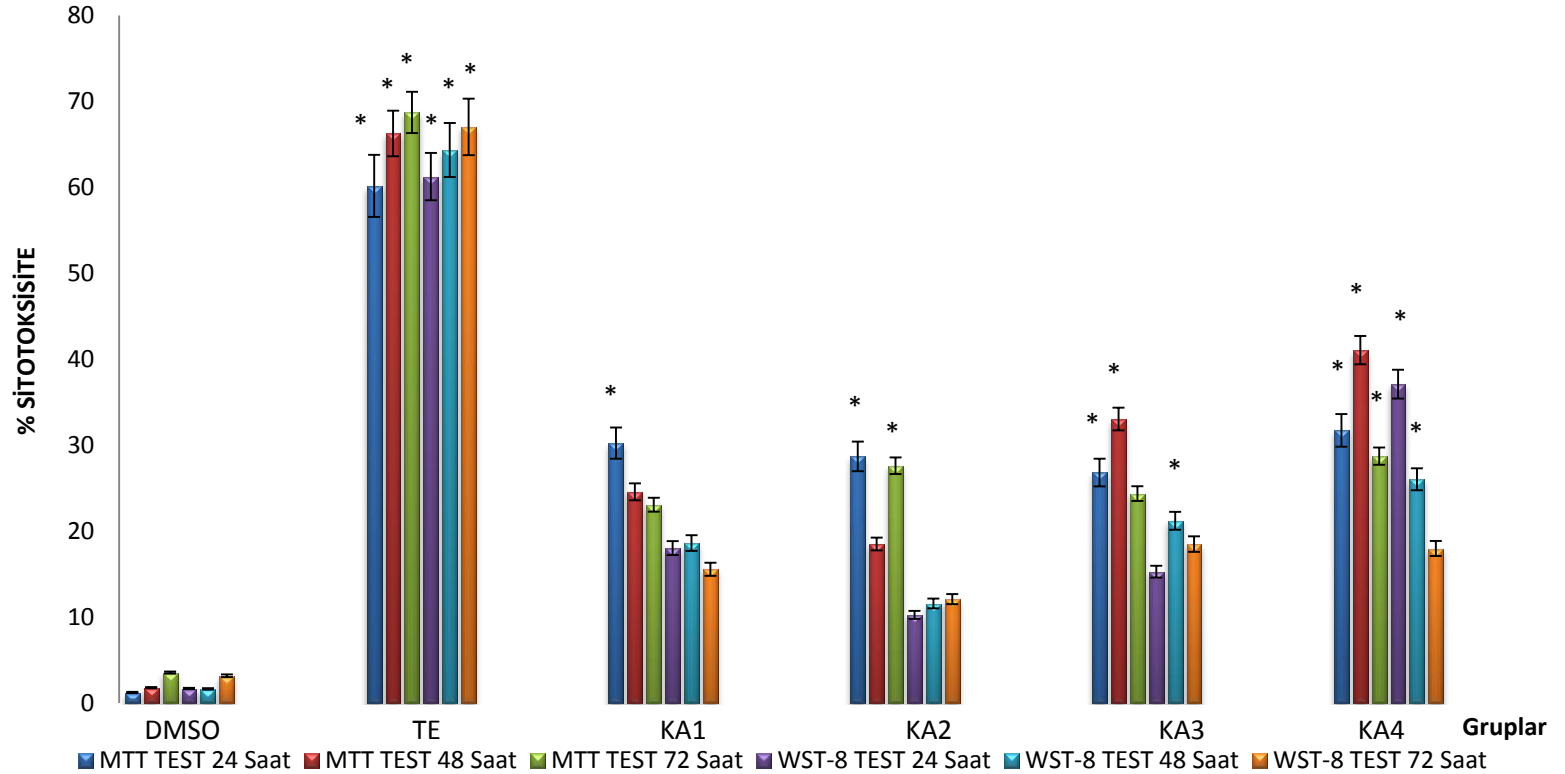
KA+TE karışımının periferel lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisine dair elde edilen veriler incelendiğinde de, MTT canlılık testinden elde edilen veriler ile, WST-8 canlılık testinden elde edilen veriler arasında yine farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12). Örneğin; 100 µg/mL ve 150 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile muamele edilen periferel lenfositlerdeki sitotoksik etki WST-8 testinde daha yüksek görünürken, 300 µg/mL KA+TE karışımı ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki, MTT testinde daha yüksek bulunmuştur. 500 µg/mL KA+TE karışımı ile muamele edilen lenfositlerden elde edilen gözlenen sitotoksik etki sonuçları hem MTT hem de WST-8 canlılık testinde birbirine yakın olmuştur.



Çizelge 4.9. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması

% SİTOTOKSİSİTE						
GRUPLAR	MTT TEST			WST-8 TEST		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.23±0.01	1.79 ±0.07	3.54±0.07	1.70±0.16	1.65±0.46	3.17±0.03
TE	60.17±0.13*	66.27±0.32*	68.71±0.12*	61.24±0.24*	64.33±0.32*	67.03±0.30*
KA1	30.25 ±0.20*	24.57±0.16	23.07±0.05	18.03±0.10	18.62±0.34	15.56±0.07
KA2	28.70±0.12*	18.50±0.10	27.61±0.12*	10.26±0.06	11.58±0.41	12.09±0.04
KA3	26.82±0.02*	33.05±0.07*	24.37±0.02	15.28±0.57	21.2±0.29*	18.50±0.08
KA4	31.72± 0.09*	41.06±0.12*	28.72±0.07*	29.10±0.59*	26.04±0.31*	17.98±0.48

DMSO: Dimetilsülfoksit (% 0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.

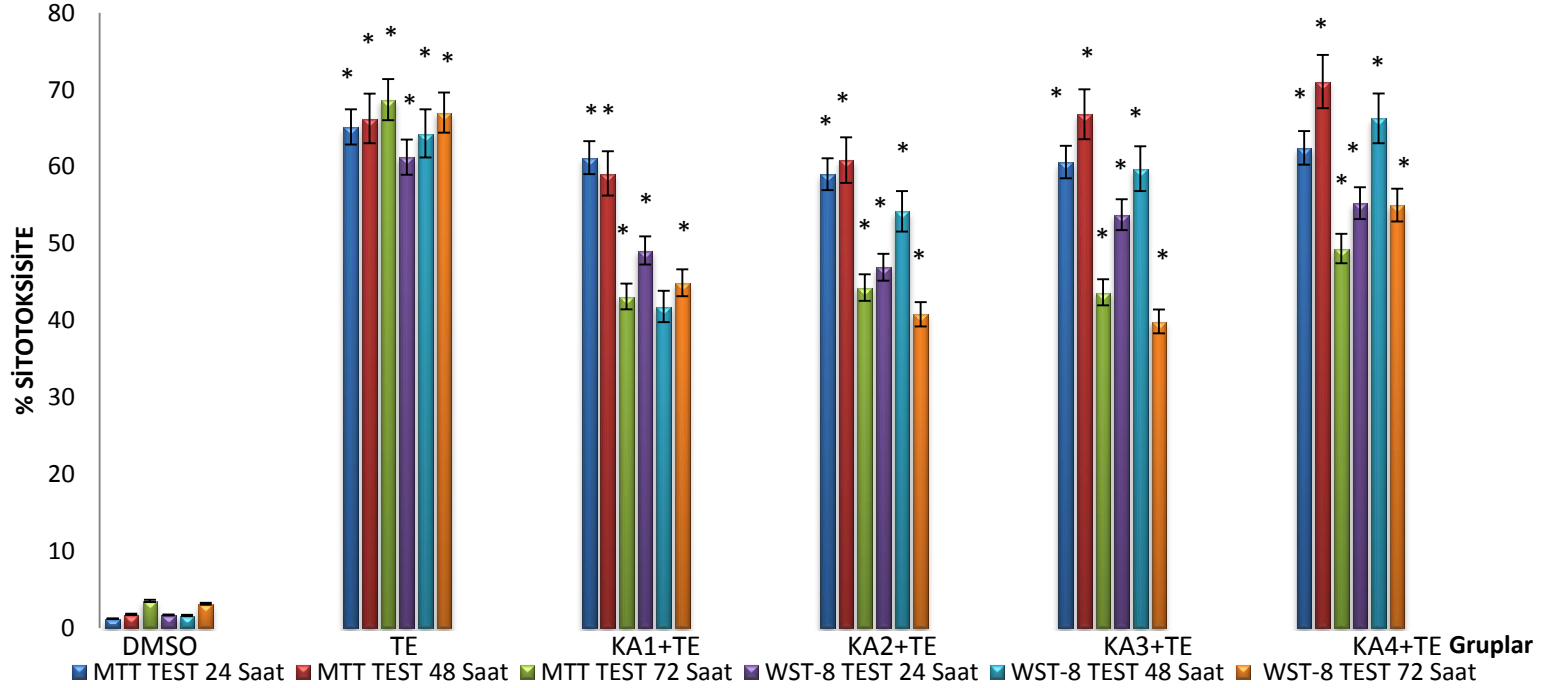


Şekil 4.9. Klorojenik Asit uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE**: Tekamen (40 µg/mL) **KA1**: 100 µg/mL, **KA2**: 150 µg/mL, **KA3**: 300 µg/mL, **KA4**: 500 µg/mL \*  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir.)

Çizelge 4.10. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması

% SİTOTOKSİSİTE						
GRUPLAR	MTT TEST			WST-8 TEST		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.23 ±0.01	1.79 ±0.07	3.54±0.07	1.70±0.16	1.65±0.46	3.17±0.03
TE	65.17±0.13*	66.27±0.32*	68.71±0.12*	61.24±0.24*	64.33±0.32*	67.03±0.30*
KA1+TE	61.18±0.04*	59.12±0.10*	43.13±0.21*	49.10±0.11*	41.82±0.01	44.90±0.02*
KA2+TE	59.02±0.05*	60.85±0.16*	44.28±0.15*	46.92±0.21*	54.19±0.19*	40.80±0.39*
KA3+TE	60.60±0.02*	66.81±0.07*	43.66±0.33*	53.75±0.32*	59.74±0.03*	39.88±0.16*
KA4+TE	62.44±0.04*	71.07±0.12*	49.35±0.10*	55.25±0.03*	66.28±0.49*	55.00±0.17*

**DMSO:** Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE:** Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE:** 100 µg/mL + Tekamen, **KA2+TE:** 150 µg/mL+ Tekamen, **KA3+TE:** 300 µg/mL+ Tekamen, **KA4+TE:** 500 µg/mL+ Tekamen \* **p<0.05** seviyesinde önemlidir.

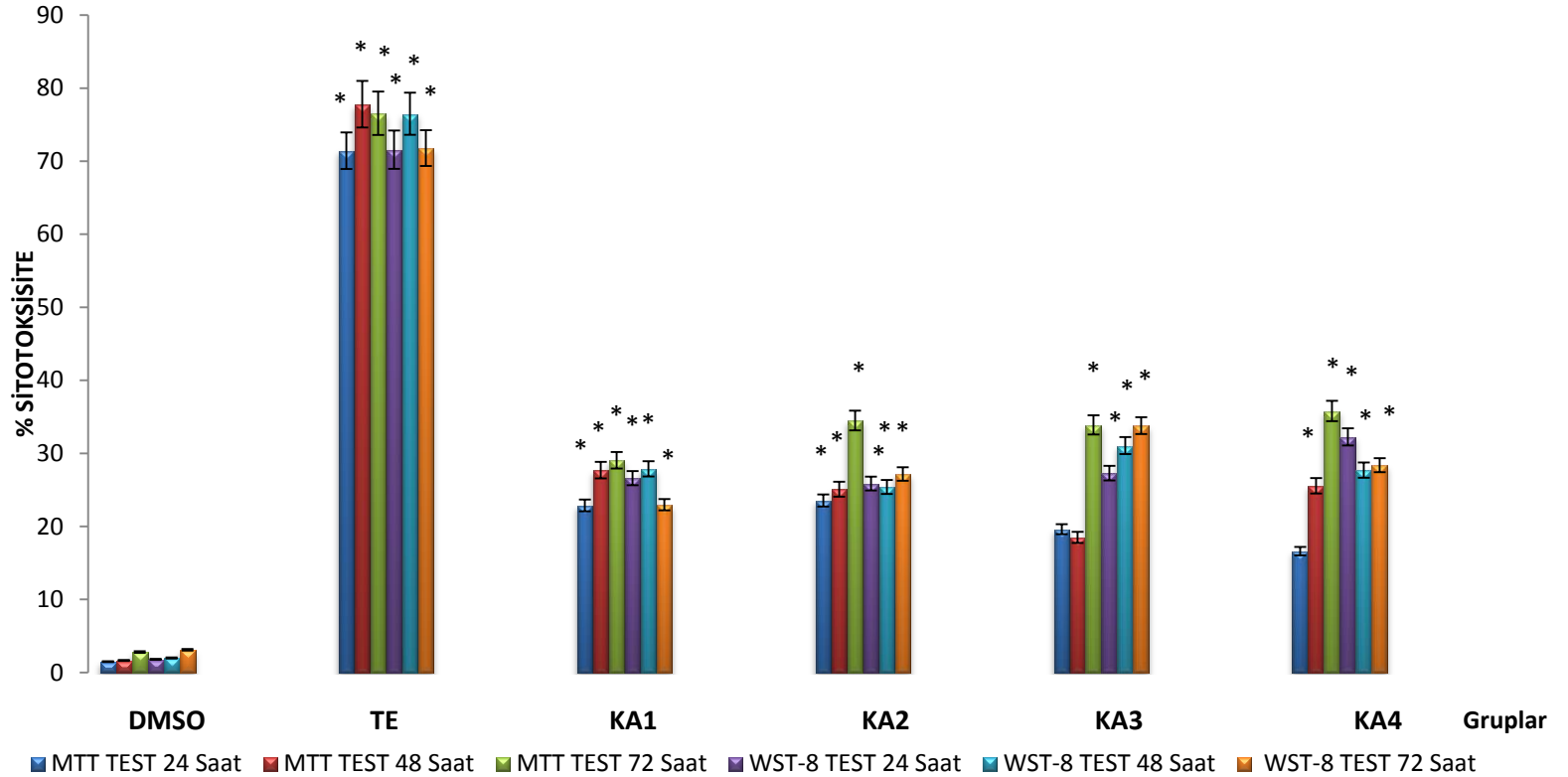


Şekil 4.10. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış HeLa hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (% 0.1), **TE**: Tekamen (40 µg/mL), **KA1+TE**: 100 µg/mL + Tekamen, **KA2+TE**: 150 µg/mL+ Tekamen, **KA3+TE**: 300 µg/mL+ Tekamen, **KA4+TE**: 500 µg/mL+ Tekamen \*  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir.

Çizelge 4.11. Klorojenik Asit uygulanmış periferel lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması

% SİTOTOKSİSİTE						
GRUPLAR	MTT TEST			WST-8 TEST		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
NEGATİF KONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.49±0.02	1.64±0.06	2.8±0.04	1.80±0.10	1.98±0.10	3.1±0.10
TE	71.44±0.23*	77.8±0.40*	76.57±0.03*	71.58±0.13*	76.52±0.24*	71.80±0.016*
KA1	22.87±0.19*	27.78±0.14*	29.05±0.28*	26.61±0.21*	27.88±0.01*	22.97±0.18*
KA2	23.54±0.06*	25.09±0.08*	34.50±0.01*	25.87±0.07*	25.40±0.03*	27.18±0.12*
KA3	19.32±0.05	18.54±0.13	33.90±0.13*	27.30±0.09*	31.07±0.13*	33.81±0.09*
KA4	16.61±0.07	25.26±0.14*	35.80±0.12*	32.26±0.10*	27.78±0.16*	28.38±0.14*

DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL) KA1: 100 µg/mL, KA2: 150 µg/mL, KA3: 300 µg/mL, KA4: 500 µg/mL \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.

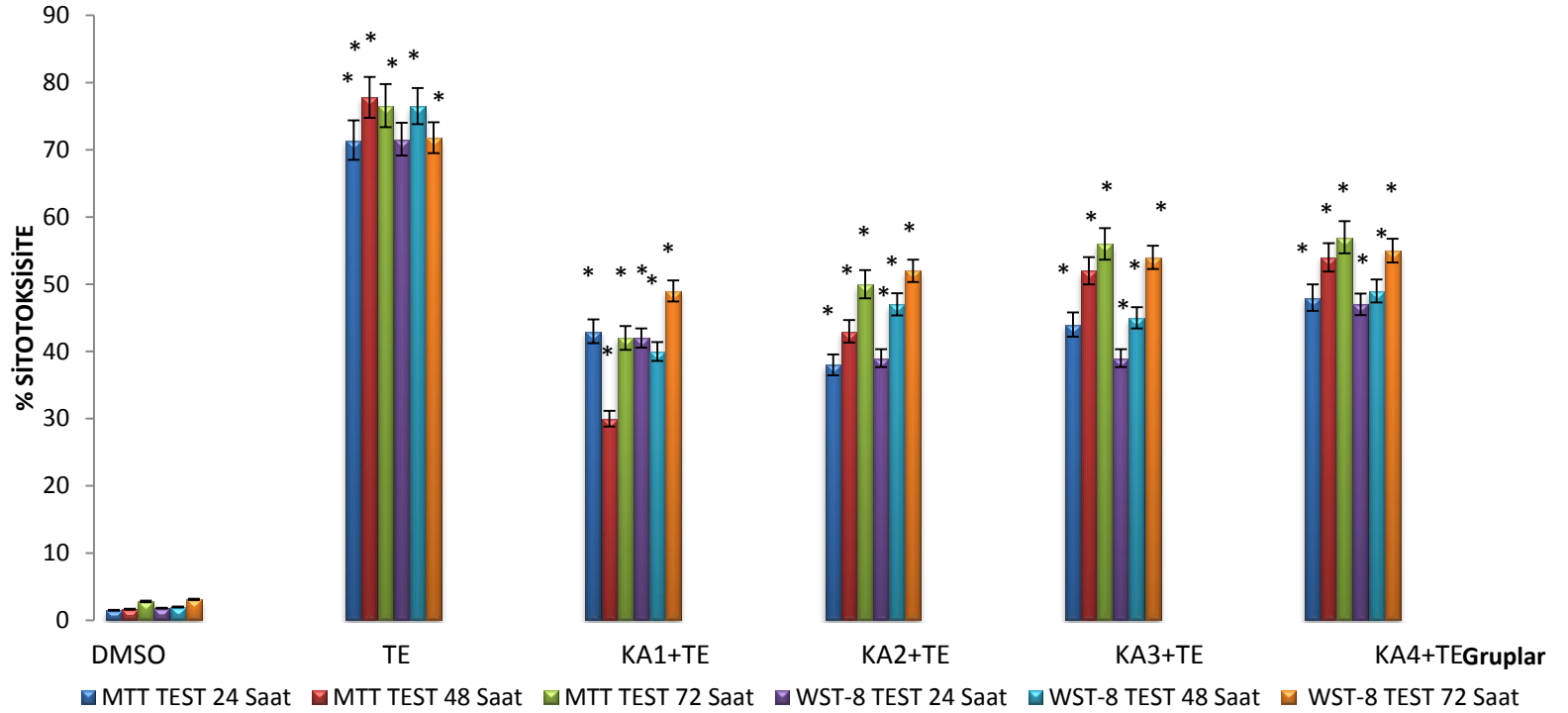


Şekil 4.11. Klorojenik Asit uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması (**DMSO**: Dimetilsülfoksit (%0.1), **TE**: Tekamen (40 µg/mL) **KA1**: 100 µg/mL, **KA2**: 150 µg/mL, **KA3**: 300 µg/mL, **KA4**: 500 µg/mL \*p<0.05 seviyesinde önemlidir.

Çizelge 4.12. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması

% SİTOTOKSİSİTE						
GRUPLAR	MTT TEST			WST-8 TEST		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
NEGATİFKONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ÇÖZÜCÜ KONTROL (DMSO)	1.49±0.02	1.64±0.06	2.8±0.04	1.80±0.10	1.98±0.10	3.10±0.10
TE	71.44±0.23*	77.8±0.40*	76.57±0.03*	71.58±0.13*	76.52±0.24*	75.80±0.016*
KA1+TE	43.78±0.07*	30.30±0.06*	42.98±0.05*	42.10±0.12*	40.05±0.16*	49.12±0.19*
KA2+TE	38.81±0.12*	43.63±0.13*	50.55±0.01*	39.51±0.07*	47.66±0.07*	52.55±0.14*
KA3+TE	44.14±0.05	52.75±0.12*	56.45±0.03*	39.38±0.11*	45.38±0.24*	54.45±0.08*
KA4+TE	49.22±0.48*	54.81±0.16*	57.28±0.06*	47.69±0.20*	49.85±0.14*	55.67±0.19*

DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40µg/mL), KA1+TE: 100 µg/mL + Tekamen, KA2+TE:150 µg/mL+ Tekamen, KA3+TE:300 µg/mL+ Tekamen, KA4+TE: 500 µg/mL+ Tekamen \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.



Şekil 4.12. Klorojenik Asit+Tekamen karışımı uygulanmış periferik lenfosit hücrelerinde süre ve doza bağlı olarak gözlenen % sitotoksik etkiye dair MTT ve WST-8 analiz sonuçlarının karşılaştırılması (DMSO: Dimetilsülfoksit (%0.1), TE: Tekamen (40 µg/mL), KA1+TE: 100 µg/mL+Tekamen, KA2+TE: 150 µg/mL+Tekamen, KA3+TE: 300 µg/mL+Tekamen, KA4+TE: 500 µg/mL+Tekamen \* p<0.05 seviyesinde önemlidir.)



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve son yıllardabitkilerden elde edilen etken maddelerin araştırmalar da kullanılması yaygınlaşmıştır. Özellikle kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda fitokimyasalların hücrelere etkisi belirlenmektedir. Sebze, meyve ve bitkiler de bulunan doğal biyoaktif maddelerin bazılarının kanser kemopreventif ya da antikanser aktiviyeye sahip olduğuna inanılmaktadır (Pezzutto, 1997, Christou vd., 2001, Mukherjee vd., 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozisin indüklenmesinde bitkiler veya bitkilerden elde edilen etken maddeler önemli yer tutmaktadır. Bitkiler, kardiyovasküler hastalıkların, prostat problemlerinin, depresyonların, enflamasyonun ve ağrıların tedavisinde ve bunların yanı sıra bitkilerden elde edilen etken maddelerin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisinin bulunduğunu gösterilmiştir (Benzie ve Wachtel-Galor, 2011).

Birçok sebze ve meyvede bulunan klorojenik asidin (KA); anti-HIV aktivitesi (McDougall vd., 1998) antioksidan aktivitesi (Yoshino ve Murakami, 1998, Kono vd., 1998, Paganga vd., 1999), P450-bağlı enzim sitokromu düzenleyici aktivitesi (Teel ve Huynh, 1998, Baer-Dubowska vd., 1998) ve antiallerjik aktivitesi (Ito vd., 1998) olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Fakat günümüzde halen KA'nın antitümör aktivitesi hakkında çok fazla ayrıntılı çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, KA'nın farklı konsantrasyonlarının (100, 150, 300 ve 500 µg/mL) tek başına ve antikanser ilaç olarak kullanılan Tekamen (40 µg/mL) ile birlikte farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) uygulanması sonucunda, insan servikal kanser (HeLa) hücre hattında ve insan periferik lenfositleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkisi iki farklı canlılık testi (MTT ve WST-8 test) kullanılarak araştırılmıştır

MTT test sonuçlarına göre, KA'nın tek başına HeLa hücrelerine uygulanması sonucunda ortaya çıkan sitotoksik etkinin negatif kontrol ve çözücü kontrole göre yüksek olmasına rağmen, Tekamen'in gösterdiği kadar yüksek bir sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Ortaya çıkan bu düşük orandaki sitotoksik etkinin değişmesinde muamele konsantrasyonu ve süre artışı da etkisiz olmuştur. WST-8 testi sonuçları da farklı konsantrasyon ve farklı sürelerde sadece KA ile muamele edilen HeLa hücreleri üzerinde KA'nın önemli

bir sitotoksik etki göstermediğini ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçların istatistikî açıdan önemsiz olduğu tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

Thurrow ve Lee (2012) KA ve neoklorojenik asit'in insan kolon kanseri (Caco-2) üzerindeki antikanserojenik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, KA ve neoklorojenik asidin farklı konsantrasyonlarının (150, 300, 500  $\mu\text{mol}$ ) farklı sürelerde (0, 24, 48, 72 saat) Caco-2 hücrelerinin canlılık oranını kontrole göre, nispeten azalttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, hem klorojenik asidin hem de neoklorojenik asidin hücre proliferasyonu üzerindeki engelleyici etkilerinden dolayı, kolon kanserinde baskılayıcı bir bileşik olarak kullanılabilme olasılığın olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda ise klorojenik asidin HeLa hücreleri üzerinde düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında çalışmamızın sonuçları Thurrow ve Lee'nin yaptıkları bu çalışmanın sonucuna benzerlik göstermektedir.

Miller vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada, yeşil kahve çekirdeklerinin kavrulması sonucunda etkisinin azalıp azalmayacağını belirlemek amacı ile dört gruba ayrılan altmış sekiz Hamster farklı besinlerle (normal diyet, %15 kavrulmuş kahve çekirdekleri (RCB), %12.75 yağı alınmış RCB'ye veya %2.25 RCB yağı) ile beslenmiştir. Hamster'lar ayrıca kanserojen bir madde olan, 7,12-dimetilbenzin %0.5'lik çözeltisi ile haftada 3 kez muamele edilmişlerdir. Çalışmanın sonuçları, denemede Hamster'ların beslendiği her bir özel özel diyetin, önemli ölçüde tümör gelişimini azalttığını ve yeşil kahvede bulunan bileşiklerin buna neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Antikanser ilaç olarak kullanılan 5-fluourasil meyve ve sebzelerden elde edilen nispeten toksik olmayan fitokimyasallar ile birlikte kullanıldığında ise, kemoterapiden etkilenen normal hücrelerdeki toksisiteyi azaltmaktadır. Sekiz farklı fenilpropanoidin (öjenol, ferulik asit, sinnamik asit, kaffeik asit, KA, p-kumarik asit, 3,4-dimetoksisinamik asit ve 2,4,5-trimetoksisinamik asit) farklı konsantrasyonları (0.002, 0.004, 0.007, 0.015, 0.03, 0.06, 0.13, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM) ile 5-Fu kombinasyonu 24 saat süreyle insan serviks kanser hücre hattına (HeLa) uygulanmış ve bu karışımların hücre canlılığı ve apoptozis üzerine etkilerini araştırılmıştır (Hemaiswarya ve Doble, 2013). Çalışmanın sonuçları, fenilpropanoidlerin doza bağlı olarak DMSO ile muamele edilen hücrelere göre hücre büyümesini inhibe ettiklerini göstermiştir. Çalışmada kullanılan farklı fenilpropanoidlerin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etki, öjenol > ferulik asit > sinnamik asit > kaffeik asit > klorojenik asit > p

kumarik asit>3,4dimetoksisinnamik asit> 2,4,5-trimethoksisinnamik asit sırası şeklinde olmuştur.

Kinolinler alkaloid bileşikler olup, birçoğu insektisit, antimikrobiyal, antiviral ve antikanserojenik aktivitelere sahiptir ve halen ilaç olarak kullanılmaktadır. 6,8bis(methythio)Q (2), 6,8diCNQ (3), 6,8-DiCNTHQ (4) ve 6,8-DiMEO-5-BrQ (5)'in HeLa tümör hücrelerinin proliferasyonuna olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bileşiklerinin HeLa hücre hattı üzerinde herhangi bir antiprolatif etkisine rastlanmazken; 6,8-DiMEO-5- BrQ adlı kinolin türevi bileşiğin, HeLa (insan serviks karsinoma hücresi) kanser hücrelerinin proliferasyonunu 75-100 µg/ml konsantrasyonda kontrol bileşik 5-FU'den daha önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür (Yüce Şahin vd, 2012).

Polifenol ekstralarının anti-servikal kanser önleyici etkileri ile gündelik olarak yaygın tüketilen yeşil çay, kahve ve kakaonun insan servikal kanseri hücre hattında (HeLa) hücreleri üzerindeki etkisinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada (Krstic vd., 2015), kullanılan bütün polifenol ekstraları HeLa hücreleri üzerinde apoptozis oluşturmuştur ancak en güçlü etkiyi yeşil çay göstermiştir. Kısa süreli yeşil çay ve kahve ekstraları ile muamele intrasellüler oksijen türlerinin oluşumunu sağlamış ve glutasyon seviyesinin azalmasına yol açmıştır. Bu sonuçlara göre, test edilen polifenol ekstralarının pro-oksidan ve anti-proliferatif etkilerinden dolayı, in vitro anti-servikal kanser özelliği bulunduğu düşünülmüş ve bu etkiyi oluşturan ekstraların sırası ile yeşil çay>kahve> kakao olduğu ortaya çıkmıştır. Feng vd. (2005) KA'nın antioksidan kapasitesini belirleyebilmek için Randox belirtecini kullanmışlar ve sonuçta KA'nın güçlü bir antioksidan kaynağı olduğunu belirlemişlerdir. Yine insan akciğer kanseri hücre hattında (A549) KA'nın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini ECIS yöntemi ile araştırmışlar ve klorojenik asidin 80 µg'lık konsantrasyonda A459 hücre hattı üzerinde güçlü bir proliferasyon engelleyici etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada ilginç olan nokta ise, aynı konsantrasyondaki KA'nın JB6 (sıçan epidermal hücre hattı) hücrelerinde oldukça düşük aktivite göstermesidir. Bu sonuç, KA'nın tümör hücre büyümesi üzerinde engelleyici etkisi olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmalar ise, klorojenik asidin metalloproteinaz MMP-9'in (Jin vd., 2005) beyin tümörü kaynaklı brain tumor- glioma hücrelerinde U-87 nin mikrozomal glukoz-6-fosfat translokaz enzimini inhibe ettiğini (Belkaid., 2006) ve ayrıca A549 insan kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve TPA- or NF-B, Aktivator Protein-1, ve MAPK sinyal yolu üzerinde de inhibe edici etkisi olduğunu göstermiştir (Feng

vd., 2005). Yine son zamanlarda klorojenik asitin bağımsızlık sistemi yollarına katılan gen ekspresyonunu değiştirerek tümör ilerlemesini inhibe etmesinin mümkün olabileceği de gösterilmiştir (Kang vd., 2013).

Bizim çalışmada ise, klorojenik asidin HeLa hücreleri üzerinde tek başına düşük sitotoksik etki gösterdiğini ve HeLa hücrelerinin proliferasyonunu engelleyemediği ortaya çıkarırken, MTT test sonuçları KA+Tekamen karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla olduğunu göstermiştir. Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde, en düşük KA konsantrasyonu olan 100 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinde gözlenen % sitotoksikite % 61.18±0.04 iken, süre artışı ile sitotoksik etkide azalmalar olduğu gözlenmiştir (sırası ile; %59.12 ±0.10 ve %43.13±0.12). Benzer sonuçlar KA+TE karışımının 150 µg/mL'lik uygulamasında da elde edilmiştir. Muamele süresi 48 saatte çıkarıldığında KA+TE karışımının gösterdiği sitotoksikite arttırmıştır. Ancak muamele süresi 72 saate çıkarıldığında her iki konsantrasyonda da sitotoksik etkide dramatik bir düşüş ortaya çıkmıştır (sırası ile; %43.66±0.33 ve %49.35±0.10) (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). WST-8 test verileri de KA+Tekamen karışımının, HeLa hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkinin konsantrasyon ve farklı sürelerde KA'nın tek başına gösterdiği sitotoksik etkiden çok daha fazla olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6).

Benzer şekilde KA ile tek başına muamele edilen lenfositlerde MTT canlılık testi sonucunda uygulanan her dört farklı konsantrasyon ve üç farklı süre birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin; 100 µg/mL ve 150 µg/mL'lik KA ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki MTT test sonuçlarında daha yüksek görünürken, 300 µg/mL ve 500 µg/mL'lik KA ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki WST-8 sonucunda daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.11, Şekil 4.11). KA+TE karışımının periferik lenfositler üzerindeki sitotoksik etkisine dair elde edilen veriler incelendiğinde de, MTT canlılık testinden elde edilen veriler ile, WST-8 canlılık testinden elde edilen veriler arasında yine farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12). Örneğin; 100 µg/mL ve 150 µg/mL'lik KA+TE karışımı ile muamele edilen lenfositlerdeki sitotoksik etki WST-8 testinde daha yüksek görünürken, 300 µg/mL KA+TE karışımı ile muamele edilen lenfositlerde gözlenen sitotoksik etki, MTT testinde daha yüksek bulunmuştur. 500 µg/mL KA+TE karışımı ile muamele edilen

lenfositlerden elde edilen gözlenen sitotoksik etki sonuçları hem MTT hem de WST-8 canlılık testinde birbirine yakın olmuştur.

Hücre canlılığı ve sitotoksosite yöntemleri, kimyasal ilaç görüntüleme ve sitotoksosite teslerinde kullanılmaktadır. Hücre canlılığı belirlemek için çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. Enzim temelli metodlar, MTT ve WST indirgeyici boyar belirteçler ve dehidrogenaz ile hücre canlılığında canlı hücreleri belirlemek için kullanılan kolorimetrik yöntemlerdir. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aracılığıyla indirgeyerek formazan kristallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Kristallerin çözünmesiyle oluşan absorbans değerleri canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Fakat bazı kimyasallar ya da fitokimyasallar doğrudan MTT ile etkileşime girerek interferans yapabilmektedirler. Bu durum yanlış yorumlara neden olmaktadır. Özellikle bitkisel ekstraktlarla yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda hücre ölümlerinin gözlenmesine rağmen, MTT sonuçlarının bu hücre ölümlerini göstermediği belirlenmiştir. Orta çıkan bu sonucun farklı bitki ekstraktlarının MTT ile etkileşime girerek hücre canlılığı lehine yanlış pozitif sonuç verdiğini (interferans oluşumu), bitki ekstresi gibi interferans oluşturabilecek ajanların sitotoksosite analizlerinde MTT yönteminin güvenilir olmadığı ve uygun farklı yöntemlerin seçilmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Arı vd., 2012). Yine Tominaga vd. (1998) de kendi çalışmalarının sonuçlarına göre, MTT teste sitotoksitenin WST-8 teste göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumu WST-8 testinin kromojenik indikatörlerinin MTT testinden daha yüksek hassasiyete sahip tetrazolium tuzundan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda da MTT ve WST-8 canlılık testinde elde edilen veriler arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir ve bu farklılığın da literatür bilgisine uygun olarak klorojenik asidin HeLa hücrelerinde bulunan çeşitli bileşikler ile interferans oluşturmasından kaynaklandığı sonucuna ulaşmak mümkündür. Ayrıca özellikle bitkisel ekstraktlar veya kimyasal bileşiklerle çalışırken sadece tek bir canlılık testi ile hücre proliferasyonunun ve sitotoksitenin belirlenmemesi gerektiği ve farklı canlılık testleri ile örneğin ATP canlılık testi gibi testler sonucunda elde edilen verilerle doğrulanması gerektiğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, klorojenik asidin tek başına periferik lenfositler üzerinde önemli bir sitotoksik etkisinin olmayışı önemlidir, ancak bu düşük sitotoksik etkinin HeLa hücreleri üzerinde de benzer şekilde olması, bizim uyguladığımız konsantrasyon

aralıklarında, klorojenik asidin serviks kanseri tedavisinde önemli bir ajan olamayacağını göstermiştir. KA+Tekamen'in birlikte kullanılmasının ise HeLa hücreleri üzerinde uygulanan teste bağlı olarak sitotoksik etki göstermesi önemli bir bulgudur. Ancak KA+TE muamelesi lenfositler üzerinde de sitotoksiteyi arttırıcı yönde etki etmiştir. Bu veriler ışığında KA'nın serviks kanseri hastalarının kemoterapatik tedavi sürecini olumsuz etkileyeceğinden, tedavi sürecinde KA ve KA bulunan sebze ve meyveleri tüketmesi önermemektedir. Yine serviks kanseri hastalarının da bu konularda bilgilendirilmesinin doğru olacağını düşünmekteyiz.

Daha ileri çalışmalarla klorojenik asidin HeLa kanser hücrelerinde hangi mekanizmalarla ve hangi düzeylerde etkinlik gösterdiğinin belirlenmesi ve etkinin organizma seviyesinde de olup olmadığının anlaşılabilmesi için öncelikle moleküler düzeyde çalışmaların yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aboaba, O. O., Smith, S. I., Olude, F.O. 2006. Antibacterial effect of edible plant extract on *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Nutrition**, 5(4): 325-327.
- Abraham, S. K., Khandelwal, N. 2013. Ascorbic acid and dietary polyphenol combinations protect against genotoxic damage induced in mice by endogenous nitrosation. **Mutation Research**, 757: 167– 172.
- Afag, F., Saleem, M., Aziz, M. H., Mukhtar, H. 2004. Inhibition of 12 tetradecanoylphorbol- 13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleanadrin. **Toxicology and Applied Pharmacology Journal**, 195: 361-69.
- Akçalı, A. 2010. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. **Türk Onkoloji Dergisi**, 25(3): 119-123.
- Aldridge, W. N. 1993. The biochemical principles of toxicology. **Experimental Toxicology**, 5:56-78.
- Anonim, 2012. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sektör Raporu, Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı.
- Anonim, 2013. Kanser nedir? Kanser, [http://tr.wikipedia.org/wiki/ Kanser](http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser).
- Anonim, 2014. Fitokimyasallar, <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster>. Erişim tarihi: 03.09.2014
- Anonim, 2014. Tanenler. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Tanen>. Erişim tarihi, 24.10.2014.
- Anonim, 2014. Yeşil kahve. <http://www.dunyagida.com.tr>. Erişim Tarihi: 04.06.2014.
- Anonim, 2015. İnsan serviks kanseri. <http://www.trsgo.org/menu/152/rahim-agzi-serviks-kanseri>. Erişim tarihi: 16.11.2015.
- Anonim, 2015. Serviks kanseri. [http://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatmentpdq#link/stoc\\_h2\\_1](http://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatmentpdq#link/stoc_h2_1)'den değiştirilerek. Erişim tarihi: 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Irinotekan açık formülü <http://www.kanser.org>. Erişim Tarihi: 10.06.2014.

- Anonim, 2015. İnsan serviks kanseri (HeLa) hücreleri [www.atcc.org](http://www.atcc.org). Erişim tarihi: 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Kahve ağacı resmi. <http://www.travelcostarica.nu/images/stories/IT/small-plants/plants/coffeetree01.JPG>. Erişim tarihi: 27.10.2015.
- Anonim, 2015. Kahve. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kahve>. Erişim tarihi: 10.05.2015.
- Anonim, 2015. Kanser istatistiği. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1672-2012-2013-2014-kanser-istatistikleri.html>, Erişim Tarihi: 17.02.2015.
- Anonim, 2015. Kanser Tedavisinde kullanılan ilaçlar. <http://www.kansertedavileri.com/kemoterapi2.jsp>. Erişim Tarihi: 17.11.2015.
- Anonim, 2015. Kanser Tedavisinde kullanılan yöntemler. <http://www.genetikbilimi.com>. Erişim Tarihi: 13.11.2015.
- Anonim, 2015. Kanser Tedavisinde kullanılan yöntemler. <http://www.hekimce.com>. Erişim Tarihi: 13.11.2015.
- Anonim, 2015. Kansere neden olan faktörler <http://www.che.utexas.edu/2012/01/25/researchers-suggest-a-proximate-cause-of-cancer/> den düzenlenerek. Erişim tarihi: 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Kanserın büyümesi ve yayılması <https://honchemistry.wikispaces.com/How+Chemotherapy+Kills+Cancerous+Cells+-+Kenda> 'dan düzenlenerek. Erişim tarihi: 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Kanserın gelişimi. <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/cancer-celldevelopment/?region=on> den düzenlenerek. Erişim tarihi 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Kanserli ve normal hücrelerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü. [http://www.clarkson.edu/camp/reports\\_publications/june09/page3.html](http://www.clarkson.edu/camp/reports_publications/june09/page3.html). Erişim tarihi 26.10.2015.
- Anonim, 2015. Klorojenik asit. <http://www.pharmetic.org/fitoterapi/yesil-kahve-tohumu-zayiflatirmi.html>. Erişim Tarihi:13.11.2015.



- Anonim, 2015. MTT test: a: MTT indirgenmesinin başlangıç aşaması, b: MTT indirgenmesinin tamamlanma aşaması. [www.iivs.org/](http://www.iivs.org/)den değiştirilerek. Erişim tarihi: 25.10.2015.
- Anonim, 2015. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu. <http://www.iacr.com.fr/>. Erişim Tarih: 16.11.2015.
- Anonim, 2015. Yeşil kahvenin diyabet üzerine etkisi. <http://www.saglikafiyet.com/Yesil-Kahvenin-Faydalari,223.html>. Erişim tarihi: 15.02.2015.
- Anonim,2015. Klorojenik asidin açık formülü, [https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid), Erişim Tarihi:04.11.2015.
- Arı, F., Karakaş, D., Cevatemrea, B., Debrelı Coşkun, M., Ulukaya, E. 2012. Bitki ekstraktlarında kullanılan MTT metodu ne kadar güvenilir?. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Astari, K. A., Bayran Erel, Ş., Aydın Köse, F., Köksal, Ç., Karaalp, C., 2014. Cytotoxic and antibacterial activities of *aentaurea cadmea* Boiss. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, 11(1): 101-106.
- Baer-Dubowska, W., Szaefer, H., Krajka-Kuzniak, Y. 1998. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. **Xenobiotica**. 28(8): 735-743.
- Bahçeci, Z. 1999. Moleküler Biyoloji. Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir.
- Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M., Issa, J. P. 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Advances in Cancer Research**, 72:141-96.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, D. 2010. Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin arttırılması olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I: 437–456. Ankara.
- Baytop, A. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri Yayınları. İstanbul.
- Belitz, H. D., Grosch, W. 1999. Food chemistry. **Springer**, 764- 781.

- Belkaid, A., Currie, J. C., Desgagnes, J., Annabi, B. 2006. The Chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal Glucose-6-Phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell International**, 6: 7.
- Benzie, I. F. F., Wachtel-Galor, S. 2011. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2. Baskı, CRC Press, Boca Raton ,Florida.
- Bilir, N. 2007. Serviks kanseri kontrolü çalışmaları ve HPV aşısı. Halk sağlığı uzmanları derneği teknik raporları: 3.
- Bilir, N. 2008. Sigara ve Kanser. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Klasmat Matbaacılık.
- Biray, Ç., Gündüz, C., Yılmaz, B., Şahin, F., Topçuğlu, N. 2006. Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (cape) ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (ccrf-cem)' de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. **Ege Tıp Dergisi**, 45(2) : 83 - 92.
- Bird, A. 2003. I12 transcription unleashed by active DNA demethylation. **Nature Immunology**, 4: 208-9.
- Borovskaya, T. G., Goldberg, V. E., Shchemerova, Y. A., Perova, A.V., Timina, E. A., Pakhomova, A.V. 2006. Evaluation of the progeny of rats treated with topoisomerase II inhibitor vepesid. **Bull Exp Biol Med**;141(5): 515-8.
- Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Immunology**, 5: 9-15.
- Browne, R. M. 1988. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials--does it have a role?. **International Endodontic Journal**, 21: 50-58.
- Cemeroğlu, A. P., Cemeroğlu, B. S. 1998. Sağlık açısından gıda fenolikleri. **Gıda Teknolojisi**, 3(9): 52-55.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M. 2001. Fenolik bileşikler. Meyve ve sebzelerin bileşimi, soğukta depolanmaları, Gıda Teknolojileri Derneği Yayınları: 78, Ankara.
- Ceyhan, M. 2007. İnsan papilloma virusu (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. **ANKEM Dergisi**, 21(2): 102-104.

- Cherng, J. M., Shieh, D. E., Chiang, W., Chiang, W. Y., Chiang, L. C. 2007. Chemopreventive effect of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 71(6): 1500-1504.
- Christou, L., Hatzimichael, E., Chaidos, A., Tsiara, S., Bourantas, K. L. 2001. Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. **European Journal of Hematology**, 67: 51-53.
- Corner, R., Mullen, N. Q., Khan, S. C., Marks, E. G., Wood, Carrier, M. J., Croizier, A. 2006. Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. **Nature**, 30: 444, 566.
- Çoban, D. Z., Avcu, F., Ural, A.U., Güran, Ş. 2012. Kemoterapötik ajan olarak dosetaksalin ARHH77 Ig G plazma hücreli lösemi hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi. **Cumhuriyet Tıp Dergisi**, 34: 247-251.
- Davidek, J., Velisek, J., Pokorny, J. 1990. Chemical changes during food processing. **Medical Press**, 302-320.
- Diken, M. E., 2009. Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir.
- Dikmen, M., Öztürk, N., Öztürk, Y. 2009. Nar meyve kabuğu ekstresinin MCF-7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri. **Ankara Eczane Fakültesi Dergisi**, 37(3): 179- 190.
- Doughari, J. H. 2012. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents, phytochemicals. A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. Publisher InTech. China.
- Doyle, A., Griffiths, J. B. 1998. Cell and Tissue Culture In: Laboratory Procedures in Biotechnology. **Scientific Consultancy & Publishing**, 62-64.
- Eisenhauer, E. A., Vermorken, J. B. 1998. The Taxoids. **Drugs**, 55(1): 5-30.
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F. 1993. Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. **Bourdeau P: John Wiley & Sons**; 75-97.
- Erdemoğlu, N., Şener, B. 2000. Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri. **Ankara Eczane Fakültesi Dergisi**, 29(1): 77-90.

- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., Lafay, S. 2008. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **Journal of Nutrition**, 138(12): 2309-2315.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, Guo, Z. 1985. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, 63(6): 965-981.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. **Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi**, 11: 52-67.
- Feng, R., Lu, Y., Bowman, L. L., Qian, Y., Castranova, V., Ding, M. 2005. Inhibition of activator protein-1, NF-B, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(30): 27888–27895.
- Fieschi, M., Codignola, A., Mosca, A. M. L. 1989. Mutagenic flavonol aglycones in infusions and fresh and pickled vegetables. **Journal Food Science**, 54(6): 1492-1495.
- Freshney, R. I. 2005. Culture of animal cells: a manual of basic technique, **John Wiley & Sons**, 5:359-373.
- Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E., Ekmekçi, A. 2011. İnsan servikal kanser Hela hücrelerinde Vinorelbin'in apoptotik etkisi. **DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi**, 25 (1): 05-14.
- Granado-Serrano, A. B., Martián, M. A. Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., Ramos, S. 2007. Molecular mechanisms of (-)-Epicatechin and Chlorogenic Acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 2020-2027.
- Guyton, A.C., Hall, J. E. 2001. Protein Sentezi, Hücre Fonksiyonu ve Hücre Çoğalmasının Genetik Kontrolü. In: Çavuşcuoğlu H, eds. Tıbbi Fizyoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri: 24-37.
- Hemaiswarya, S., Doble, M. 2013. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. **Phytomedicine**, 20: 151– 158.

- Herceg, Z., Hainaut, P. 2007. Genetic and Epigenetic Alterations as Biomarkers for Cancer Detection, Diagnosis and Prognosis. **Molecular Oncology**, 1: 26-41.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Venema, D. P. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal Agriculture Food Chem.** 40: 1591-1598.
- Hostanska, K., Nisslein, T., Freudenstein, J., Reichling, J., Saller, R. 2004. *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, 84: 151-60.
- Hsu, C. L., Huang, S. L., Yen, G. C. 2006. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 4191-4197.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y. 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, 62(1): 1–20.
- Innocenti, F., Undevia, S. D., Iyer, L., Chen, P. X., Das, S., Kocherginsky, M., Karrison, T., Janisch, L., Ramirez, J., Rudin, C, M., Vokes, E. E., Ratain, J. M. 2004. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of Irinotecan. **Journal of Clinical Oncology**, 22(8): 1382- 1388.
- International Standard 10993 “Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods.” International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1999.
- International Standard 7405. “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-test methods for dental materials.” International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 1997.
- Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H. 1998. Antiallergic activities of rambosin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 6 (7): 1051-1056.

- Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T. 2004. In Vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 52 (15): 4893-4898.
- İzmirli, M., Tufan, T., Alptekin, D. 2012. DNA metilasyonu. **Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, 21(4): 274-282.
- Jiang, Y., Kusama, K., Satoh, K., Takayama, F., Watanabe, S., Sakagami, H. 2000. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. **Phytomedicine**, 7(6): 483-491.
- Jin, U. H., Lee, J. Y., Kang, K. S., Kim, J. K., Park, W. H., Kim, J. G., Moon, S. K., Lim, C. H. 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Elsevier Life Sciences**, 77: 2760 – 2769.
- Kahraman, E., Deliloğlu Gürhan, İ., Korkmaz, M. 2013. Farklı bor bileşiklerinin CCL 62 (HeLa Kontaminant) insan amniyotik epitelyal hücre hatlarında olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. **Medicine Science**, 2(1): 454-68.
- Kahraman, G. 2004. Bor Nötron Yakalama Terapisi İçin Bor İçeren Polimerik Taşıyıcı Tasarımı ve Hücre Kültürlerinde Kullanımları. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Kang, T. Y., Yang, H. R., Zhang, J., Li, D., Lin, J., Wang, L., Xu, X. 2013. The Studies of chlorogenic acid antitumor mechanism by gene chip detection: The immune pathway gene expression. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2013: 7.
- Karadeniz, F., Ekşi, A. 2001. Elma suyunda fenolik madde dağılımı üzerine araştırma. **Tarım Bilimleri Dergisi**, 7(3): 135-141.
- Karakaya, S., El, S. N., 1997. Flavonoidler ve sağlık. **Beslenme ve Diyet Dergisi**, 26(2): 54-60.

- Kaymaz, B. T., Çetintaş Bozok, V., Kosova, B. 2013. İnsan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücrelerinin kapsaisin ile indüklenmiş apoptozunda rolü olabilecek JAK/STAT sinyal iletim yolağı elemanlarının gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi, **Kafkas Journal of Medical Sciences**, 3(3): 129-135.
- Kelle, İ. 2007. Kanser Tedavisinde Biyotoksinler. **Dicle Tıp Dergisi**, 34(3): 226-232.
- Kılınçlı, A. 2013. Resveratrolün Hüresel Yaşlanmanın İndüklenmesi ve Sirtüinlerin Aktivasyonunda Rolünün İnsan Dermal Fibroblastlarında Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen bilimleri, Yüksek lisnas tezi, Aydın.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, A. C. 2011. Genetik Kavramlar. Palme yayınları, pp.436-451. Ankara.
- Kono, Y., Kashine, S., Yoneyama, T., Sakamoto, Y., Matsui, Y., Shibata, H. 1998. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, 62 (1): 22-27.
- Korkmaz, S. 2002. Paklitaksel, Kersetin ve Berberinin, A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Köçkar, F., Aydoğan Türkoğlu, S., Aydın, M. 2010. Oleuropein'in prostat (PC-3), meme (MCF-7) ve hepatoma (HEP3B) kanser hücrelerinde anti-tümör etkisinin belirlenmesi. **Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi**, 3(2): 185-190.
- Köksal, G. 2008. Şeftali Meyvesinde Fenolik Madde Dağılımı ve Pulpa İşleme Sırasında Değişim. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Krstic, M., Stojadinovic, M., Smiljanic, K., Stanic-Vucinica, D., Cirkovic Velickovic, T. 2015. The anti-cancer activity of green tea, coffee and cocoa extracts on human cervical adenocarcinoma HeLa cells depends on both pro-oxidant and anti-proliferative activities of polyphenols. **Royal Society of Chemistry Advances**, 5:3260-3268.

- Kumar, S. A. 2009. Plants-based Medicines in India. Erişim, <http://pib.nic.in/feature/feyr2000/fmay2000/f240520006.html>.
- Küçüksayan E., Çört A., Yücel S. G., Özben Tomasi T., 2011. The effects of N-acetyl-L-cysteine on bleomycin induced apoptosis were determined in malignant testicular germ cell tumours by flow cytometry, 22nd Biennial Congress of the European-Association-for-Cancer-Research, Barcelona, İspanya.
- Lavelle, F., Bissery, M. C., Combeau, C. 1995. Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere). **Seminars in Oncology**, 22(4): 3-16.
- Lee, W. J., Zhu, B. T. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. **Carcinogenesis**, 27(2): 269–277.
- Li, Y., Huang, W., Huang, S., Du, J., Huang, C. 2012. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 422: 85-90.
- Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**. 3479-3485.
- Machover, D. 1997. A comprehensive review of 5-fluorouracil and leucovorin in patients with metastatic colorectal carcinoma. **Cancer**, 80: 1179–1187.
- Marinova, E. M., Toneva, A., Yanishlieva, N. 2009. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. **Food Chemistry**, 114: 1498–1502.
- McDougall, B., King, P., Wu, B. W., Hostornsky, Z., Reinecke, M. G., Robinson, W.E. 1998. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42(1): 140-146.
- Merlo L. M., Pepper J. W., Reid B. J., Carlo C. 2006. Maley Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, 6: 924-35.
- Miller, E. G., Gonzales, A. P., Orr, A. M., Binnie, W. H., Sunahara, G. I. 2009. The anticancer activity of coffee beans. **American Chemical Society**, 754: 56–63.



- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., Noort, R. V. 2009. Biocompatibility of Resin based dental materials. **Materials**, 2(2): 514-548.
- Morishita, Y., Yoshimi, N., Kawabata, K., Matsunaga, K., Sugie, S., Tanaka, T., Mori, H. 1997. Regressive effects of various chemopreventive agents on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. **Cancer Research**, 88(9): 815-820.
- Mork, C. N., Faller, D.V., Spanjaard, R.A. 2007. Loss of putative tumor suppressor EI24/PIG8 confers resistance to etoposide. **FEBS Letters**; 581: 5440-4.
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63.
- Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, A. C. 2001. Advances in cancer therapy with plant-based natural product. **Current Medicinal Chemistry**, 8: 1467-1486.
- Murray, P. E., García Godoy, C., García Godoy, F. 2007. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**,12(3): 58-66.
- Naso, L. G., Valcarcel, M., Roura-Ferrer, M., Kortazar, D., Salado, C., Lezama, L., Rojo, T., González-Baró, A. C., Williams, P. A. M., Ferrer, E. G. 2014. Promising antioxidant and anticancer (human breast cancer) oxidovanadium(IV) complex of chlorogenic acid. Synthesis, characterization and spectroscopic examination on the transport mechanism with bovine serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 135: 86-99.
- Nowell, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, 194: 23-8.
- Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V. 2008. Recent Advances in p53 Research: An Interdisciplinary Perspective. **Cancer Gene Ther Advance**, 10: 1038-1069.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Katan, B. M. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **In The Journal Nutrition**, 131: 66-71.

- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A. B., Taghidizaj, A.A., Derici, K., Yılmaz, E., Aras, S., Cansaran-Duman, D. 2013. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. **Türk Hijyen Den. Biyoloji Dergisi**, 70(4): 215-26.
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C. A. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities, what dose a serving constitute?. **Free Radical Research**, 30 (2): 153- 162.
- Pezzutto, J. M. 1997. Plant-derived anticancer agents. **Biochemical Pharmacology**, 53: 121-133.
- Pierson, M. D., Reddy, N. R. 1982. Inhibition of *Clostridium botulinum* by antioxidants and related phenolic compounds in comminuted pork. **Journal Food Science**, 47-1926.
- Pişkin, E., Dinger, S., İbşirlioğlu, T., Türk, M., Kahraman, G., 2002, Alternative approaches in cancer therapy: targeting, Beslenme, Çevre ve Kanser Sempozyumu, Sheraton Hotel, Ankara.
- Ramos, S., Alia, M., Bravo, L., Goya, L. 2005. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 1271-1280.
- Ringel, I., Horwitz, S. B. 1991. Studies with RP 56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol. **Journal of the National Cancer Institute**, 83:288-91.
- Rose, W. C. 1992. Taxol: A review of its preclinical in vivo antitumor activity **Anti-Cancer Drugs**, 3(3): 11-21.
- Sato, Y., Itagazi, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, 403: 136–138.
- Saw, T. Y., Cao, T., Yap, A. U., Lee, N. G. 2005. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. **Toxicol In Vitro**, 19: 145-154.

- Saygi, S. 2003. Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. **Gülhane Tıp Dergisi**, 45(3) : 291–298.
- Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, 277: 665-667.
- Schmalz, G. 1997. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. **Springer**, 1: 154-162.
- Schobinger, U. 1988. Meyve ve Sebze Suyu Üretim Teknolojisi.(Çeviren J. Acar) Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart. German.
- Schuster, B., Herrmann, K. 1985. Hydroxybenzoic acid and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. **Phytochemistry**, 24(11): 2761-2764.
- Sebure, J. O., Canelon, R. I., Sullivan, N., Lapkin, A. A., Barker, G. C. 2014. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF-7 breast cancer cells. **ChemMedChem**, 9: 2791 – 2797.
- Shahidi, F., Nacz, M. 1995. Food phenolics: Sources, chemistry effects, applications, Lancaster: **Technomics**, 312.
- Sharma, G., Tyagi, K. A., Singh, R. P., Chan, D. C. F., Agarwall, R. 2004 Synergistic anticancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast cancer cells. **Breast Cancer Research Treatment**, 85: 1-12.
- Simon, B. F., Perez- Izarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cardoves, C., Estrella, I. 1992. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 4: 1531-1535.
- Smith, J. A., Madden, T., Vijjswarapu, M., Newman, R. A. 2001. Inhibition of export of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. **Biochem Pharmacol**, 62: 469-72.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E. 1992. Phenolic of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 40(9): 1478-1487.

- Sreenivasan, Y., Rafhavendra, P. B., Manna, S. K. 2006. Oleandrin- Mediated expression of fas potentiates apoptosis in tumor cells. **Journal Clinical Immunology**, 26 (4): 308-10.
- Sreenivasan, Y., Sarkar, A., Manna, S.K. 2003. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kB and activator protein 1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. **Biochem Pharmacol**, 66: 2223-39.
- Stagos, D., Gregorios, D. A., Antonios, M., Spyrou, A., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D. 2012. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. **Food Chemistry Toxicol**; 50(6): 2155-70.
- Stich, H.E. 1992. Teas and tea components as inhibitors of carcinogen formation in model systems and man. **Preventive Medicine**, 21(3): 377-384.
- Sun, X. Z., Liu, S., Zhao, Z., Su, R. 2014. Protective effect of chlorogenic acid against carbon tetrachloride- induced acute liver damage in rat. **Chinese Herbal Medicines**, 6(1): 36-41.
- Tanaka, T., Nishikawa, A., Shima, H., Sugie, S., Shinoda, T., Yoshimi, N., Iwata, H., Mori, H. 1990 Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. **Basic Life Science**, 52: 429-440.
- Teel, R. W., Huynh, H. 1998. Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity. **Cancer Letters**, 27;133(2): 135-141.
- Thurrow, T., Lee, S. O. 2012. Effect of chlorogenic acid and neochlorogenic acid on human colon cancer cells. **Discovery**, 13: 87-94.
- Toksoy D., Bayramoğlu M. and Hacisalihoğlu S., 2010. Usage and the economic potential of the medicinal plants in Eastern Black Sea Region of Turkey. **Journal of Environmental**, 31(5): 623-628.
- Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K., Watanabe, M. 1998. A water- soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. **Analytical Communications**, 36: 47-50.
- Tuncer, S., Demirci, M. 2011. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. **Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi**, 21(2): 141-149.

- Upadhyay, R., Ramalakshmi, K., Jagan Mohan Rao, L. 2012. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, 130: 184–188.
- Uzun, İ., Bayındır, F. 2011. Dental materyallerin biyoyumluluk test yöntemleri. **G.Ü Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi**, 28(2): 115-22.
- Visioli, F., Caruso, D., Galli, C., Viappiani, S., Galli, G., Sala, A. 2000. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 278: 797–799.
- Vizotto, M., Porter, W., Byrne, D., Cisneros-Zevallos, L. 2014. Polyphenols of selected peach and plum genotypes reduce cell viability and inhibit proliferation of breast cancer cells while not affecting normal cells. **Food Chemistry**, 164: 363–370.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, 63(3): 335-342.
- Wataha, J. C. 2001. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **The Journal Prosthet Dentistry**, 86: 203-209.
- Wataha, J. C. 2003. Biocompatibility of dental materials. **Elsevier Science**: 171-202.
- Yoshino, M., Murakami, K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, 257(1): 40-44.
- Yüce Şahin, Ökten, S., Tekina, Ş., Çakmak, O. 2012. Bazı kinolin türevlerinin antikanser aktivitelerinin belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03–07 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G.P., Franco, R., Georgakilas, A.G. 2012. Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. **Cancer Letters**, 327(1-2): 16-25.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burçak YAVUZ  
Doğum Yeri ve Tarihi : Bandırma/ 26.01.1990

### EĞİTİM DURUMU

**Yüksek Lisans** : Adnan Menderes Üniversitesi/ Fen ve Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü  
**Lisans Öğrenimi** : Adnan Menderes Üniversitesi/ Fen ve Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü  
**Bildiği Yabancı Diller** : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### A-Bildiriler

1. **Yavuz B.** Biyolojik mücadele organizması entomopatojenik nematodların potansiyel doğal düşmanı: *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae), 17 .Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Bildiri Özeti Kitabı, 14-17 Temmuz, Ankara, 2010 ( Sözlü Sunum)
2. **Yavuz B.**, Yakar D. Toner dolum merkezinde çalışan bireylerin yanak mukozası epitel hücrelerinde genotoksitenin değerlendirilmesi, 19.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Bildiri Özeti Kitabı, 9-13 Temmuz, İstanbul, 2012 (Sözlü sunum).
3. Yakar D., **Yavuz B.** Sinameki (*Cassia angustifolia* Vahl) yapraklarından elde edilen sulu ekstraktlarının sitotoksik aktivitesinin araştırılması, 19.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Bildiri Özeti Kitabı, 9-13 Temmuz, İstanbul, 2012 (Sözlü sunum).
4. **Yavuz B.**, Aşkın Çelik,T., Bazı tıbbi bitkilerin sitotoksik ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, 20.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Bildiri Özeti Kitabı, 24-27 Haziran, Zonguldak, 2013 (Sözlü sunum).
5. Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö.S., Günay, N., **Yavuz, B.** Tester olarak kullanılan ve kullanılmamış rujlarda bakteriyel kontaminasyonun araştırılması. 4. Ulusal

Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi. Bildiriler Özet Kitabı, 14-16 Şubat, Antalya, 2014.

**6.** Aslantürk, Ö. S., Aşkın Çelik, T., **Yavuz, B.**, Yüce, S., Günay, N. Kuaför salonlarında çalışan bireylerdeki genotoksik riskin değerlendirilmesi. 4. Ulusal Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi. Bildiriler Özet Kitabı, 14-16 Şubat, Antalya, 2014

### **B-Projeler:**

**1- Klorojenik Asidin İnsan Servikal Kanser Hücreleri (HeLa) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması.** Adnan Menderes Üniversitesi, BAP, FEF-15013 No'lu proje, Araştırmacı.

**2- Carpobrotus acinaciformis L (Makas otu) Metanol Ekstresinin Fitokimyasal Analizi ve İnsan Metastatik Meme Kanseri (MCF-7) ve İnsan Kolon Kanseri (Caco-2) Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması.** Adnan Menderes Üniversitesi, BAP FEF-15034, No'lu proje, Araştırmacı, **(Devam ediyor).**

### **C-Katıldığı Çalıştaylar :**

**1.** Bakteri DNA İzolasyonu, Jel Koşurma, PCR, Agaroz Jel Görüntüleme Çalıştay, 4-9 Temmuz, İstanbul, 2011

**2.** Aydın Girişimcilik Kariyer ve İnovasyon Zirvesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aralık 24, Aydın, 2013.

**3.** Sağlıkta Araştırma Yöntemleri Kursu, Adnan Menderes Üniversitesi Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi (ADÜSEM), 19-23 Ocak, Aydın, 2015.

### **D- Bildirisiz Kongre ve Sempozyumlar**

**1. Yavuz B.** 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Marmara Üniversitesi, 4-9 Temmuz, İstanbul, 2011(Dinleyici).

**2. Yavuz B.** Kanser Biyolojisi ve Sempozyumu, Ege Üniversitesi, 31 Mart, İzmir, 2013 (Dinleyici).

**3. Yavuz B.** 1st International Forensic Biology& Genetic Congress, Ankara University, November 27-28.2014 (Dinleyici).



**İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Manyas Devlet Hastanesi Laboratuvarı Staj- 2010  
: Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitü,  
2014-

**İLETİŞİM**

E-posta Adres : [burcakyavuzz@gmail.com](mailto:burcakyavuzz@gmail.com)

GSM : 05445515950

Tarih : 07.01.2016.