



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**KAMFEROL, KERSETİN VE MİRİSETİNİN AKUT
LENFOBLASTİK LÖSEMİ (CRL2264) HÜCRELERİNDE
TOKSİKOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Serdar ÇETİNKAYA

Danışman

Prof.Dr. Onur ERDEM

Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı

Farmasötik Toksikoloji Programı

DOKTORA TEZİ

Şubat 2020

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalında/Programında
Serdar ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan
Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin Akut Lenfoblastik Lösemi (CRL2264)
Hücrelerinde Toksikolojik Değerlendirilmesi
başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

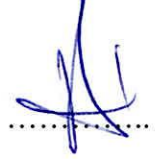
Danışman : Prof.Dr. Onur ERDEM
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



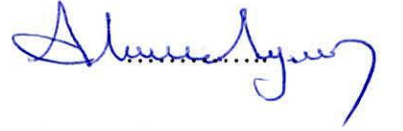
Başkan : Prof.Dr. Nurşen BAŞARAN
Hacettepe Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



Üye : Prof.Dr. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



Üye : Prof.Dr. Ahmet AYDIN
Yeditepe Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



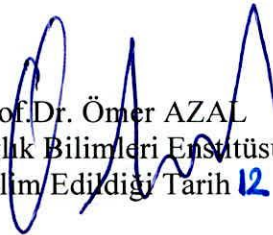
Üye : Doç.Dr. Merve BACANLI
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı
Bu tezin Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 06/02/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş, olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Ömer AZAL
Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Tezin Teslim Edildiği Tarih 12 / 02 / 2020



BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduđum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiđimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değerşiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Serdar ÇETİNKAYA

06.02.2020

ÖZET

Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan hastalık grubudur. Hastalıklara bağlı ölüm sıralamasında kanser ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında yaklaşık 18,1 milyon kişi kansere yakalanmıştır ve yaklaşık 9,6 milyon insan kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir. Kanserde, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin biri veya birkaçını içeren özgün bir tedavi rejimi uygulanır. Kullanılan bu yöntemler, hastalığın erken evrelerinde sıklıkla etkilidir. Ancak ilerlemiş tümörler genellikle aynı tedavilere dirençlidir. Uygulanan tedavi; halsizlik, bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkilerin görülmesine neden olur.

Kanser vakalarının tedavi yöntemlerindeki mortalite oranı, yan etkiler ve yıllık maliyeti göz önüne alındığında bu hastalık grubu için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bitkilerde yaygın şekilde bulunan flavonoid grubu maddelerden olan; kamferol, kersetin ve mirisetin bileşiklerinin akut lenfoblastik lösemi (CEM/C2) hücre hattındaki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında CEM/C2 hücrelerinde, bu flavonoidlere maruziyet sonucu oluşabilecek sitotoksik etkiler incelenmiştir. Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC_{50}) ve hücrelerin %30'unu öldüren konsantrasyon (IC_{30}) değerleri tespit edilmiş, Apoptotik değişiklikler ve genotoksik etkiler analiz edilmiştir. Ayrıca maruziyet ile oluşabilecek etkilerin altında yatan mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres ve oksidan/antioksidan değişiklikleri detaylı olarak değerlendirilmiştir.

Kamferol ($IC_{50} = 50,67 \mu M$), kersetin ($IC_{50} = 59,18 \mu M$) ve mirisetin ($IC_{50} = 50,26 \mu M$) için çalışılan hücre hattında sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu flavonoidlerin IC_{30} konsantrasyonlarının CEM/C2 hücrelerini apoptozise götürdüğü tespit edilmiştir. Ayrıca Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi ile genotoksik etkiler değerlendirildiğinde hücrelerdeki DNA hasarını anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. Çalıştığımız kamferol, kersetin ve mirisetin maddeleri CEM/C2 hücrelerinin antioksidan enzimlerine etki ederek hücrelerdeki toplam antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliğe yol açmıştır. Hücredeki oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir biyogösterge olan glutatyon (GSH) düzeyinde de değişikliğe neden olmuştur. Son olarak bu üç flavonoidin uygulandığı hücrelerde lipid peroksidasyon düzeylerinde de artış meydana gelmiştir.

Sonuç olarak, kamferol, kersetin ve mirisetin flavonoidleri akut lenfoblastik lösemisinin tedavisi için umut verici yaklaşımlar ortaya koymuştur. Elde ettiğimiz verilerin konuyla ilgili mevcut literatür bilgisine önemli düzeyde katkı sağladığı değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut Lenfoblastik Lösemi, Oksidatif stres, Sitotoksosite, Genotoksosite, Apoptozis, Flavonoid

ABSTRACT

Cancer is a disease caused by the uncontrolled proliferation of cells. In 2018, about 18.1 million people contracted cancer. Cancer is the second most common cause of death, accounting for an estimated 9.6 million deaths in the same year. In cancer treatment, a specific treatment regimen involving one or more of surgery, radiotherapy, and chemotherapy is applied. These methods are often effective in the early stages of the disease. However, advanced tumors are generally resistant to the same treatments. The therapy may cause side effects, such as weakness, nausea, vomiting, hair loss, and etc.

Considering the mortality rate, side effects, and annual costs in the therapy methods of cancer cases, new treatment methods are needed for this group of diseases. For this purpose, the main objective of this study is to evaluate the effects of the flavonols of kaempferol, quercetin, and myricetin which are commonly found in plants on acute lymphoblastic leukemia (CEM/C2) cell line.

Within the context of this thesis, the cytotoxic effects that may result from the exposure to these flavonoids in CEM/C2 cells were analyzed. The concentration (IC_{50}) that killed 50 percent of the cells and the concentration (IC_{30}) that killed 30 percent of the cells were detected, and apoptotic changes and genotoxic effects were analyzed. In addition, oxidative stress, which is one of the mechanisms underlying the effects that may result from exposure, and oxidant/antioxidant changes were evaluated in detail.

The cytotoxic effects were found in the cell line studied for kaempferol ($IC_{50} = 50,67 \mu\text{M}$), quercetin ($IC_{50} = 59,18 \mu\text{M}$), and myricetin mirisetin ($IC_{50} = 50,26 \mu\text{M}$). IC_{30} concentrations of these flavonoids were found to lead CEM/C2 cells to apoptosis. Furthermore, Single Cell Gel Electrophoresis Method (Comet) showed that genotoxic effects significantly increased DNA damage in the cells. In addition to affecting the antioxidant enzymes of CEM/C2 cells and leading to changes in the total antioxidant enzyme activities in the cells, kaempferol, quercetin, and myricetin substances were found to cause changes in glutathione (GSH) level, which is an important biomarker used in the evaluation of oxidative stress in the cell. Finally, there was an increase in lipid peroxidation levels in the cells treated with these three flavonoids.

In conclusion, the flavonols of kaempferol, quercetin, and myricetin have revealed promising approaches for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. The data obtained in this study can be considered to make significant contributions to the related literature knowledge.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Oxidative stress, Cytotoxicity Genotoxicity Apoptosis, Flavonoids

TEŞEKKÜR

Çalışma süresi boyunca beni destekleyen Gülhane Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın ilk gününden son gününe kadar bilgi ve tecrübeleri yanında her zaman desteğini gördüğüm tez danışmanım Prof.Dr. Onur ERDEM'e teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen Hacettepe Üniversitesi'nden Prof.Dr. Nurşen BAŞARAN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmalarında bana destek olan Gülhane Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji ABD öğretim üyesi Doç.Dr. Merve BACANLI'ya teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi F. Toksikoloji ABD öğretim üyesi ve elemanları olan Doç.Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU, Dr.Ecz. Aylin BALCI, Uzm.Ecz. Anıl YİRÜN ve Uzm.Ecz. Tuğbagül ÇAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan ve birçok konuda yardımlarını gördüğüm Gülhane Eczacılık Bilimleri Merkezi akademik ve idari personeline teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan Uzm.Bio. Meral SARPER ve Uzm.Bio. Sema ÖREN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde en büyük destekçim olan annem, babam ve kardeşlerime; her zaman yanımda olan, karşılaştığım tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, sevgisi ve desteğini esirgemeyen eşim Dr. Melike ÇETİNKAYA'ya; eğitim sürecimde çok zaman ayıramadığım oğlum Levent'e ve aramıza yeni katılan kızım Defne'ye teşekkür ederim.

Son olarak bu zorlu süreçte desteklerini esirgemeyen adlarımı bu sayfaya sığdıramayacağım tüm arkadaşlarım ve büyüklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi (Bilimsel Araştırma Projesi 2018/085) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kanser	3
2.2 Lösemi.....	5
2.3 Akut Lenfoblastik Lösemi	5
2.4 Kanser ve Doğal Ürünler	9
2.5 Flavonoid Yapıdaki Bileşikler	11
2.5.1 Flavonoidler ve Kanser	14
2.5.1.1 Kanser Önleyici Etkide Moleküler Mekanizmalar	16
2.5.2 Apoptoz.....	17
2.5.3 Flavonoidler ve Antioksidan Etki	20
2.6 Lipit Peroksidasyon.....	22
2.7 Antioksidan Savunma Sistemleri	23
2.7.1 Enzimatik Savunma Mekanizmaları	24
2.7.2 Enzimatik Olmayan Savunma Mekanizmaları	25
2.8 Kamferol	28
2.9 Kersetin	31

2.10	Mirisetin	34
2.11	DNA Hasarının Değerlendirilmesi.....	37
2.11.1	Tek Hüce Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi	38
3	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	41
3.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.2	Kullanılan Araç ve Gereçler.....	42
3.3	Kullanılan Çözeltiler	44
3.4	Yöntemler.....	47
3.4.1	Çalışma Grupları	47
3.4.2	Hücre Kültürü.....	47
3.4.3	WST1 Yöntemi ile Sitotoksisite Analizi.....	48
3.4.4	Comet Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi.....	49
3.4.5	Akım Sitometresi ile Apoptoz Ölçümü.....	51
3.4.6	Protein Miktarının Belirlenmesi.....	52
3.4.7	Katalaz Aktivitesinin (CAT) Ölçümü	54
3.4.8	Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü.....	56
3.4.9	Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü.....	57
3.4.10	Lipit Peroksidasyonun Ölçümü.....	59
3.4.11	Total Antioksidan Düzeyinin Ölçümü	60
3.5	İstatistiksel Yöntemler	62
4	BULGULAR.....	63
4.1	Sitotoksisite Tayini	63
4.2	Akım Sitometrisi ile Apoptoz Tayini.....	67
4.3	Comet Analiz sonuçları.....	69

4.4	Katalaz (CAT) Aktivitesi	70
4.5	Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi.....	71
4.6	Glutasyon (GSH) Düzeyi.....	72
4.7	Lipit Peroksidasyon Düzeyi	73
4.8	Toplam Antioksidan Düzeyi	74
5	TARTIŞMA	77
6	SONUÇLAR	89
7	KAYNAKLAR	91
	ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ	109

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 DSÖ'nün 2016 Yılı ALL Sınıflandırması	7
Çizelge 2.2 Reaktif Oksijen ve Azot Türleri.....	21
Çizelge 3.1 Çalışma Grupları.....	47
Çizelge 4.1 Kamferol, Kersetinin ve Mirisetin IC ₃₀ ve IC ₅₀ Değerleri.....	63
Çizelge 4.2 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücre Hattında DNA Hasarına İlişkin Bulgular	69
Çizelge 4.3 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Katalaz (CAT) Aktivitesi	70
Çizelge 4.4 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi.....	71
Çizelge 4.5 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutasyon (GSH) Düzeyi.....	72
Çizelge 4.6 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Lipit Peroksidasyon Düzeyi.....	73
Çizelge 4.7 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Toplam Antioksidan Düzeyi	74

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Flavonoidlerin Temel Yapısı	11
Şekil 2.2 Flavonoidlerin Biyosentez Yolağı (36).....	12
Şekil 2.3 Flavonoidlerin Alt Sınıfları.....	12
Şekil 2.4 Glutatyon (GSH) İndirgenme-Yükseltgenme Döngüsü	26
Şekil 2.5 Kamferolün Kimyasal Yapısı	28
Şekil 2.6 Kersetinin Kimyasal Yapısı	31
Şekil 2.7 Mirisetinin Kimyasal Yapısı	35
Şekil 3.1 Protein Standart Eğrisi	54
Şekil 3.2 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümüne Ait Kalibrasyon Grafiğı.....	55
Şekil 3.3 Glutatyon (GSH) Döngüsü	58
Şekil 3.4 Okside Glutatyon (GSSG) Standart Eğrisi	59
Şekil 3.5 Malandoaldehit-Tiyobarbitürük asit (MDA-TBA) Kompleksi	59
Şekil 3.6 Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümüne Ait Kalibrasyon Grafiğı.....	60
Şekil 3.7 Trolox Standart Eğrisi.....	61
Şekil 4.1 Kamferolün WST1 Testine Göre Sitotoksisite Dağılım Grafiğı.....	64
Şekil 4.2 Kamferolün CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiğı	64
Şekil 4.3 Kersetinin WST1 Testine Göre Sitotoksisite Dağılım Grafiğı	65
Şekil 4.4 Kersetinin CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiğı.....	65
Şekil 4.5 Mirisetinin WST1 Testine Göre Sitotoksisite Dağılım Grafiğı	66
Şekil 4.6 Mirisetinin CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiğı.....	66
Şekil 4.7 Apoptoz Analizi İçin Akım Sitometrisi İle Elde Edilen Kadran İstatistiğı Grafiğı*	68
Şekil 4.8 Apoptoz Analizi İçin Akım Sitometrisi İle Elde Edilen Sonuçların Bar Grafiğı	68

Şekil 4.9 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerinde DNA Hasarı Etkisine İlişkin Bulgular	70
Şekil 4.10 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Katalaz (CAT) Aktivitesi	71
Şekil 4.11 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi.....	72
Şekil 4.12 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutatyon (GSH) Düzeyi.....	73
Şekil 4.13 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Lipit Peroksidasyon Düzeyi.....	74
Şekil 4.14 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Toplam Antioksidan Düzeyi.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
BCA	: Bişinkoninik asit
CAT	: Katalaz
CEM/C2	: Akut lenfoblastik hücre hattı
Comet	: Tek Hücreli jel elektroforez yöntemi
DMBA	: 7,12-dimetilbenz-[a]-antrasen
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr	: Etidiyum bromür çözeltisi
FISH	: Floresanlı yerinde hibritleşme
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

HUVECs	: İnsan umbilikal ven endotel hücreler
IARC	: Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
IC₃₀	: %30 inhibisyon konsantrasyonu
IC₅₀	: %50 inhibisyon konsantrasyonu
KKDT	: Kardeş kromatit değişim testi
LMPA	: Düşük Erime Noktalı Agar Çözeltisi
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Metaloproteinaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMPA	: Normal Erime Noktalı Agar Çözeltisi
OECD	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PBS	: Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
PI	: Propidyum İyodür
RNB	: Reaktif nitrojen bileşikleri
ROB	: Reaktif oksijen bileşikleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SS	: Standart Sapma
TAOC	: Total Antioksidan Düzeyi

- TBA** : Tiyobarbitürük Asit
- TBARS** : Tiyobarbitürük asit reaktif maddeler
- TNF** : Tümör nekroz faktörü
- TPA** : 12-0-tetradekanoil forbol 13-asetat
- TRAIL** : Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand
- VEGF** : Vasküler endotel büyüme faktörü
- WBC** : Beyaz kan hücresi

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser vücudun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan yüzden fazla hastalık grubudur. Kanserde mortalite nedenini belirlemek amacıyla birçok teknik kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Daha az sıklıkla hedefe yönelik tedaviler, hormon tedavileri ve biyolojik tedavi yöntemleri kullanılır. Kanser hücreleri mutasyona uğrayarak veya metastaz yaparak tedaviye adapte olma eğilimi gösterebilir. Dolayısıyla yaygın olarak kullanılan cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri, bu tür esnek bir hastalık için her zaman tam tedavi sağlamaz. Kemoterapi tedavisinde halsizlik, bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkiler görülmektedir. Radyoterapi ve cerrahi tedavinin yol açtığı yan etkiler hastanın tedavi öncesi genel sağlık durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Kanser tedavisi sırasında hastanın yaşam kalitesini düşüren yan etkiler görülmesi, hastaların alternatif tedavi yöntemlerine yönelmesine neden olmuştur. Son araştırmalar, muhtemelen iki kanser hastasından birinin (kanser merkezlerinde tedavi edilen hastaların %50'sine kadar) bu ürünleri kullandığını ve üç Amerikalı'dan birinin tıbbi doğal ürünler kullandığını göstermektedir (1). Gelişmekte olan ülkelerdeki bireylerin tahminen %80'i sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için öncelikle doğal ürünler kullanmaktadır (2).

Bitkilerle tedavi araştırmacıların son yıllarda ilgisini çekmesine rağmen aslında geleneksel bitki tıbbında binlerce yıldır kullanılmaktadır. Flavonoid yapıda bileşik içeren baharat ve bitkisel preparatlar yüzyıllar boyunca birçok kültürde hekimler tarafından kullanılmış ve şifacılar hastalıkları tedavi etmek amacıyla bitkilerden yararlanmışlardır (3). Ayrıca yaklaşık 100.000 bitki türü tıbbi kullanımları için test edilmiştir (4). 2007 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), mevcut ilaçların %25'inin halk tıbbında kullanılan bitkilerden elde edildiğini tahmin etmektedir.

Bu tez çalışması, mevcut bilgiler ışığında, çocukluk döneminde sık görülen akut lenfoblastik lösemi tedavisine katkı sağlayabilecek şekilde tasarlanmıştır. Flavonoid

grubundan kamferol, kersetin ve mirisetin bileşiklerinin akut lenfoblastik lösemi (CEM/C2) hücre hattında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (%50 inhibisyon konsantrasyon-IC₅₀) ve hücrelerin %30'unu öldüren konsantrasyon (%30 inhibisyon konsantrasyon-IC₃₀) değerleri tespit edilmiştir. Hesaplanan IC₃₀ değerlerinde; tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemiyle bileşiklerin genotoksik etkileri ve akım sitometrisi yöntemi ile apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca oksidatif stres ve oksidan/antioksidan statü değişiklikleri (glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon, glutasyon (GSH) düzeyleri ve total antioksidan düzeyleri değerlendirilmiştir.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 KANSER

Kanser, hücrelerin normal sınırlarının ötesinde büyümesi ile karakterize, dokulara ve/veya organlara yayılabilen büyük bir hastalık ailesi için kullanılan jenerik bir terimdir. Kanseri belirtmek için kullanılan diğer yaygın terimler malign tümörler ve neoplazmalardır (5).

Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun hemen hemen her yerinde başlayabilir. İnsan vücudunda bulunan hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu gibi normal olarak yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandığında veya hasar gördüklerinde apoptozis adı verilen programlı bir ölüm çerçevesi içinde yaşamlarını sonlandırır ve bunların yerini yeni hücreler alır. Ancak kanser hücrelerinde, bu düzenli süreç bozulur (6). Kanser hücreleri kendi çoğalma sinyallerini kendisi oluşturması, immün sistemin yıkımından kaçması ve büyümeyi baskılayan sinyallere karşı duyarsızlaşması gibi sebeplerle programlı hücre ölümünden kaçır ve sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olur (7).

Kanser hücreleri normal hücre proliferasyonunu ve homeostazını düzenleyen düzenleyici devrelerde kusurlara sahiptir (8). Çoğu organı ve dokuyu kolektif olarak etkileyen yüzlerce tip ve alt tip olarak kendini gösterir (9). Kanser, tümör hücrelerinin neden olduğu hücre tipine ve dolayısıyla tümör kaynağına göre sınıflandırılır. Belirli hücre türlerinde başlayan bazı kanser kategorileri şunlardır:

Karsinom: Vücudun dış ve iç yüzeylerini kaplayan epitel hücreleri tarafından oluşturulur. Meme, akciğer, pankreas, böbrek, prostat ve kolon kanserleri bu grupta örnek gösterilebilir (6).

Sarkom: Kan damarları, lenf damarları, kas, yağ ve fibröz doku (tendonlar gibi) dahil olmak üzere kemik ve yumuşak dokularda oluşan kanserlerdir (6).

Lenfoma: Lenfositlerde başlayan kanserdir (T hücre veya B hücre). Bunlar hastalıklarla mücadele eden ve bağışıklık sisteminin bir parçası olan beyaz kan hücreleridir. Lenfomada, anormal lenfositler lenf nodları ve lenf damarlarının yanı sıra vücudun diğer organlarında birikmektedir. Hodgkin lenfoma ve Non-hodgkin lenfoma olmak üzere iki ana lenfoma türü vardır (6).

Multipl Miyelom: Multipl miyelom plazma hücrelerinde, bir başka tipte bağışıklık hücrelerinde başlayan kanserdir. Anormal plazma hücreleri miyeloma hücreleri olarak adlandırılır ve kemik iliğinde birikmekte ve tümörler vücudun her yerinde kemikler oluşturmaktadır. Multipl miyeloma ayrıca plazma hücre miyelomu ve Kahler hastalığı olarak adlandırılır (6).

Melanom: Melanom, melanin yapan özel hücreler olan melanosit (deri rengini veren pigment) haline gelen hücrelerde başlayan kanserdir. Çoğu melanom ciltte oluşur, ancak melanomlar ayrıca göz gibi diğer pigmentli dokularda da oluşabilir (6).

Beyin ve Omurilik Tümörleri: Bu tümörler, tümörün ilk olarak merkezi sinir sisteminde oluştuğu yere göre ve oluşturuldukları hücre tipine göre adlandırılır (6).

Lösemi: Kemik iliğinin kanı oluşturan dokusunda başlayan kanserler, lösemi olarak adlandırılır. Bu kanserler katı tümörler oluşturmazlar. Katı tümör yerine, kan ve kemik iliğinde çok sayıda anormal beyaz kan hücreleri (lösemi hücreleri ve lösemik blast hücreleri) oluşur ve normal kan hücrelerini dışarıda bırakır (6).

Diğer Tümör Tipleri

Germ Hücre Tümörleri: Germ hücreli tümörler, sperm veya yumurtaları oluşturan hücrelerde başlayan bir tür tümördür. Bu tümörler vücutta hemen hemen her yerde olabilir ve benign veya malign olabilirler (6).

Nöroendokrin Tümörler: Nöroendokrin tümörler, sinir sisteminden gelen bir sinyale yanıt olarak hormonları serbest bırakan hücrelerden oluşur. Normalden daha fazla miktarda hormon üretebilen bu tümörler birçok farklı semptomlara neden olabilir. Nöroendokrin tümörler benign veya malign olabilirler (6).

Karsinoid Tümörler: Karsinoid tümörler bir tür nöroendokrin tümördür. Genellikle gastrointestinal sistemde (çoğunlukla rektum ve ince bağırsakta) bulunan ve yavaş büyüyen tümörlerdir (6).

2.2 LÖSEMİ

Kan hücreleri pluripotent hematopoetik kök hücrelerin hematopoez süreç içerisinde çoğalarak olgun lenfosit, trombosit, granülosit, monosit, megakaryosit, eritrosit gibi periferik kan hücrelerine farklılaşırlar. Lösemi, kan hücreleri kanserleri için geniş bir terimdir (10). Lösemi hematopoez süreç içerisinde, lenf nodu ve kemik iliğindeki lökosit ile lökosit prekürsörlerinin mutasyonu sonucu gelişen ve işlevsiz malign hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olan hematolojik bir malignitedir.

Lösemi etkilenmiş lökosit tipine bağlı olarak miyeloid ve lenfoid lösemiye bölünebilir. Miyelositer lösemiler miyeloid hücre serisinden gelişirken lenfositik lösemiler ise kemik iliğindeki lenfoblastlar veya lenfositlerden gelişir. Ayrıca malign hücre olgunluğu ve klinik seyir evresine dayanarak akut ve kronik lösemiye ayrılırlar. Akut lösemiler blast olarak adlandırılan erken evredeki hücrelerden gelişir ve sık bölünüp hızlı gelişir. Kronik lösemiler ise olgun hücrelerden gelişir ve yavaş bölünüp birikim gösterirler (11).

2.3 AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoid progenit hücrelerin kan, kemik iliği ve/veya ekstramedüller bölgelerde mutasyonu sonucu gelişen ve işlevsiz malign hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olan bir lösemi türüdür. Tedavi edilmediği takdirde genellikle hızlı ilerler ve lenf bezlerine, karaciğer, dalak, merkezi sinir sistemine ve diğer organlara yayılabilir (12).

Akut lenfoblastik lösemi insidansı, ilk çocukluk (0-5 yaş) döneminde meydana gelen ilk tepe noktası ve 50'li yaşlarda meydana gelen ikinci bir tepe noktası olan iki modlu bir dağılım izler (12). Çocuklarda en sık görülen kanser türüdür ve 15 yaşından küçük çocuklar arasında kanser tanısının yaklaşık %25'ini ALL oluşturur (13).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) raporlarına göre 2018 yılında dünya genelinde 437.033 lösemi vakası kayıt altına alınmıştır. Bu vakaların 309.006'sı ölümlle sonuçlanmıştır (14). Ülkemizde ise 2018 yılında vaka sayısı 6029, ölüm oranı ise 4.681 olarak kayıtlara geçmiştir (15).

Etiyoloji

Akut lenfoblastik lösemnin gelişmesine yol açan olaylar kesin olarak bilinmemektedir. İyonize radyasyon, pestisitler, benzen gibi bazı solventler ve Epstein-Barr, HTLV-1 ve HIV gibi virüslerin risk faktörleri olduğu düşünülmektedir. Vakaların %5'inden azı Down sendromu, Klinefelter sendromu, Fanconi anemisi, Ataksi telenjektazi sendromu, Bloom sendromu ve Nijmegen breakage sendromu gibi genetik hastalıklarla ilişkilidir (16), (17).

Genetik

Akut lenfoblastik lösemi, lösemik klonun başlatılmasını ve ilerlemesini sağlayan genetik sapmalar ile karakterizedir. Bu genetik anormallikler genellikle nokta mutasyonları, kimerik füzyon genleri, onkogen deregülasyonu veya aneuploidi (tüm kromozomların kazanılması veya kaybı) ile sonuçlanan kromozomal translokasyonlardır (18).

9. kromozom üzerindeki ABL genin 22. kromozom üzerindeki BCR genin yanına gelmesi ile BCR-ABL1 füzyon geni oluşur ve Philadelphia kromozomu ismini alır. ABL geni ABL proteini oluşturur ve bu protein sinyal iletimi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol alır. BCR proteini ise RAS sinyal yolağının aktivitesini etkileyen GRB-2 proteinine bağlanmasını kolaylaştırır. BCR-ABL füzyonu proteinlerin görevini yapamaz hale getirir ve lösemi hücrelerinin yaşam kabiliyetini ve proliferasyonunu artırır (18). Bunun dışında akut lenfoblastik lösemide genetik anormallikler: t(12;21)(p13;q22) kromozomlarda translokasyon ETV6-RNX1 füzyon genini, t(1;19)(p23;q13) ise TCF3-PBX1 füzyon genini oluşturur. 51-65 kromozom üzerindeki düzenlemeler FLT3, NRAS, KRAS, PTPN11, PAX5 mutasyonları oluşturur. Bu moleküler kusurlar B-ALL'nin büyük bir (%75) çoğunluğunu oluşturan primer anormalliklerdir. T-ALL'nin büyük bir bölümü ise

t(5;14)(q35;q32) ile BCL11-TLX3; t(1;7)(p34;q34) ile TRB-LCK ve t(6;7)(q23;q34) ile TRB-MYB gen kusurları oluşturur (18).

Sınıflandırma

Akut Lenfoblastik Löseminin sınıflandırılmasında ilk olarak French-American-British (FAB) sınıflanması kullanılmıştır. Bu sınıflama sitoplazma, çekirdekçik vakuol ve bazofilleri baz alan 3 alt tipe (L1, L2 ve L3) ayrılır (12). 1997 yılında, DSÖ, ALL'nin morfolojisi ve sitogenetik profilini hesaba katmaya yönelik kompozit bir sınıflandırma önermiş ve üç tip ALL [B lenfoblastik (B-ALL), T lenfoblastik (T-ALL) ve Burkitt hücreli lösemi] tanımlamıştır (19). Daha sonra 2008 yılında revize edilen Burkitt hücreli lösemi, artık Burkitt Lenfoma'dan ayrı bir varlık olarak görülmediğinden elimine edilmiş ve ALL iki tip olarak sınıflandırılmıştır. B-ALL; B-ALL ve tekrarlayan genetik anormallikleri olan B-ALL olmak üzere iki alt tipe ayrılır (20). DSÖ 2016 yılında tekrarlayan genetik anormallikleri olan B-ALL'ye yeni alt tipler ekleyerek tekrar revize etmiştir (Çizelge 2.1) (21).

Çizelge 2.1 DSÖ'nün 2016 Yılı ALL Sınıflandırması

<i>B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma</i>
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - NOS
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - Tekrarlayan genetik anormallikleri olan
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - Hipodiploid
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - Hiperdiploid
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - t(9;22)(q34;q11.2)[BCR-ABL1]
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - t(v;11q23)[KMT2A yeniden düzenlendi]
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - t(12;21)(p13;q22)[ETV6-RUNX1]
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1]
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - t(5;14)(q31;q32)[IL3-IGH]
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - iAMP21 (geçici)
B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma - BCR-ABL1 benzeri (geçici)
<i>T hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma</i>
Erken dönem T hücreli prekürsör lenfoblastik lösemi
Geçici varlık: Doğal öldürücü (NK) hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma

Klinik Özellikler

Akut lenfoblastik löseminin ilk belirtileri özellikle çocuklarda spesifik değildir. Çocuklarda karaciğer ve dalağın vücut dışından hissedilebilmesi, ateş, soluk ten rengi ve morarma gibi bulgulardan biri veya daha fazlası görülebilir. Hastalarda enfeksiyona

bağlı olmayan ateş, gece terlemesi ve kilo kaybı olur. Fiziki muayenede peteşi, solgunluk ve ekimoz görülebilir. Artan lenfoblastların kemik iliğinde kan yapımını engellemesinden dolayı anemi ve buna bağlı olarak bitkinlik, enerji kaybı, hareketle artan nefes darlığı meydana gelir. Ayrıca lenfoblastlardaki artış, eklem ağrıları, baş ağrısı, iştahsızlık, bulantı, kusma ve kilo kaybına neden olur. Lenfoblastların birikmesine bağlı olarak lenf bezleri, dalak ve karaciğerde hissedilebilir büyüme saptanabilir. Trombosit sayısının azalması nedeniyle burun ve diş eti kanamaları ayrıca ciltte morluk görülür. Bağışıklık sisteminin bozulmasından dolayı yüksek ateş, tekrarlayan enfeksiyonlar eklem ağrısı ve genişlemiş lenf bezleri yaygın olarak görülür (16), (22).

Tedavi

Akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kemoterapi, radyasyon terapisi, kök hücre nakli ve monoklonal antikor gibi hedefli tedavi olmak üzere dört tip tedavi yöntemi vardır. Tedavi hem klinik hem de laboratuvar özellikleri tarafından tanımlanan risk gruplarına göre yönetilir. Risk grupları yaş ve beyaz kan hücresi (WBC) sayısına göre belirlenir. Ayrıca risk gruplarını; hasta ve klinik özellikler, (teşhis yaşı, merkezi sinir sistemi tutulumu, down sendromu, cinsiyet), lösemik özellikler (immünofenotip ve sitogenetik/genomik değişiklikler) ve ilk tedaviye cevap (7. Gün ve 14. Gün kemik iliği yanıtı, multiagent indüksiyon tedavisinde ve sonrasında periferik kan cevabı) gibi faktörler de etkiler. Risk grubuna göre tasarlanmış düşük veya yüksek tedavi protokolleri uygulanır (23), (24).

Akut lenfoblastik lösemi tedavisinin iki aşaması vardır (23), (24).

I- Remisyon indüksiyon kemoterapisi

II- İndüksiyon sonrası tedavi (tam remisyon sağlandıktan sonra)

a. Birleştirme/yoğunlaştıma terapisi

b. Bakım terapisi

➤ Remisyon indüksiyon kemoterapisi

Tedavinin ilk aşamasıdır. Amaç, lösemik hücreleri öldürmektir. Bu aşama 4 hafta sürer. Tedavide antrasiklin (doksorubisin veya daunorubisin), siklofosfamid, vinkristin, kortikosteroid (prednisone veya deksametazon) ve L-asparaginaz gibi ilaç kombinasyonları kullanılır (23), (24).

➤ Konsolidasyon/Yoğunlaşma

Bu tedavinin ikinci aşamasıdır. Lösemi remisyonla girdiğinde başlar. Amaç vücutta kalan ve nüksetmeye neden olabilecek lösemi hücrelerini öldürmektir. Tedavi kemoterapi protokolleri ya da allojenik kök hücre naklinden oluşur. Hangi tedavinin seçileceği, risk faktörlerine ve uygun donörün olup olmadığına bakılarak karar verilir. Bu dönemde beyin ve omurilikte saklanmış blastların nüks etmesini engellemek amacıyla belden özel iğne yardımıyla kemoteropatik ilaç verilmesi ve sıklıkla başa ve omurgaya radyoterapi uygulanmasından meydana gelir (23), (24).

➤ Bakım

Bu tedavinin üçüncü aşamasıdır. Amaç, tekrarlayan ve relapsa neden olabilecek kalan lösemi hücrelerini öldürmektir. Tedavi daha hafif kemoterapi protokollerinin genellikle 2-3 yıl verilmesinden oluşur. Hastalara 3-6 ay olmak üzere toplam 2 yıl süreyle kemik iliği biyopsisi yapılması gerekir. Genellikle 5 yıl boyunca hastalığı nüks etmeyenlerin tedavi olduğu yani hastalığın tekrarlamayacağı kabul edilir (23), (24).

2.4 KANSER VE DOĞAL ÜRÜNLER

Kanser, büyük bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada hastalıklara bağlı ölüm sıralamasına bakıldığında kanser ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında yaklaşık 18,1 milyon kişi kansere yakalanmış (25) ve 9,6 milyon insanın ölümüne sebep olmuştur (26). 2040 yılında ise kansere yakalanma vakasının 29,5 milyon olacağı tahmin edilmektedir (25). Kanser hastalığında ölümleri yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülür. 2010 yılında kanserin yıllık maliyetinin yaklaşık 1,16 trilyon Amerika Birleşik Devletleri (ABD) doları olduğu tahmin edilmektedir (26).

Kanserde, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin biri veya birkaçını içeren spesifik bir tedavi rejimi uygulanır. Birincil hedef, genellikle kanseri tedavi etmek veya yaşamı önemli ölçüde uzatmaktır. Hastanın yaşam kalitesini iyileştirmek de tedavide önemli bir amaçtır (26).

Kullanılan bu yöntemler, hastalığın erken evrelerinde sıklıkla etkilidir ancak ilerlemiş tümörler genellikle aynı tedavilere dirençlidir (27). Ayrıca uygulanan tedavi halsizlik, bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkilerin yanısıra daha ciddi yan etkilerin görülmesine de neden olur. Radyoterapi ve cerrahi tedavinin yan etkileri hastanın tedavi öncesi genel sağlık durumuna bağlıdır. Ayrıca her ne kadar cerrahi veya radyoterapi şeklinde kanser tedavisi, hastalık erken tespit edildiğinde etkili olsa da, primer bir tümör hücresinin metastazı teşhis edilememektedir (28).

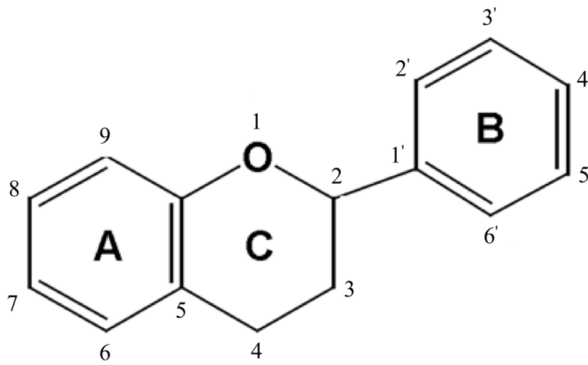
Bitkiler, potansiyel eczanelerdir ve dünyadaki yaşamın başlamasından bu yana insan medeniyetleriyle birlikte var olmuş ve birlikte gelişmiştir. Yüzyıllar boyunca, bitkiler hastalıklar için ilaç olarak kullanılmıştır (29).

İnsan sağlığını tehdit eden hastalıkların görülme sıklığı ve karmaşıklığının artmasıyla birlikte, yeni ve etkili biyomoleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkiler, yeni bileşiklerin keşfedilmesine derinden katkıda bulunmuştur ve geleneksel olarak kullanılan şifalı bitkilerden daha yeni biyolojik olarak aktif metabolitleri aramak amacıyla arayış devam etmektedir (29). 1981 ve 2002 yılları arasında dünya çapında uygulanan yaklaşık 877 küçük moleküllü ilacın çoğu, (%61) doğal ürünlerdeki kökenlerine kadar uzanır (1).

Kanser vakalarının tedavi yöntemlerindeki mortalite oranı, yan etkiler ve yıllık maliyeti göz önüne alındığında bu hastalık grubu için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulması kaçınılmazdır. Bitkisel kaynaklı doğal bileşikler, yüksek biyoyararlanımları, güvenilirlikleri, daha az yan etkiye neden olmaları ve düşük maliyet etkinlikleri düşünüldüğünde kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar oluşmasını sağlayabilir (30).

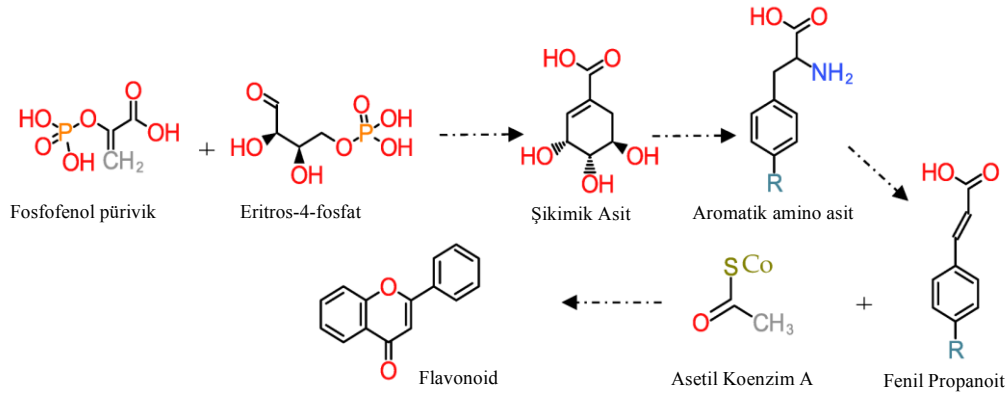
2.5 FLAVONOİD YAPIDAKİ BİLEŞİKLER

Flavonoidler bitkilerin farklı yerlerinde üretilen sekonder metabolitler olarak tanımlanır. Bitkilerde en yaygın bulunan bu maddeler, bitkilerin renk ve tat özelliklerini sağlayan madde grubudur. Meyveler, yapraklı sebzeler, kökler, yumrular, soğanlar, otlar, baharatlar, baklagiller ve tahıllar gibi bitkisel gıdalarda ve meyve, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövde gibi tıbbi bitkilerde bulunur (31)–(33). Günümüzde binlerce flavonoid yapısı aydınlatılmıştır ve hızla yeni flavonoidler de bulunmaktadır (34).

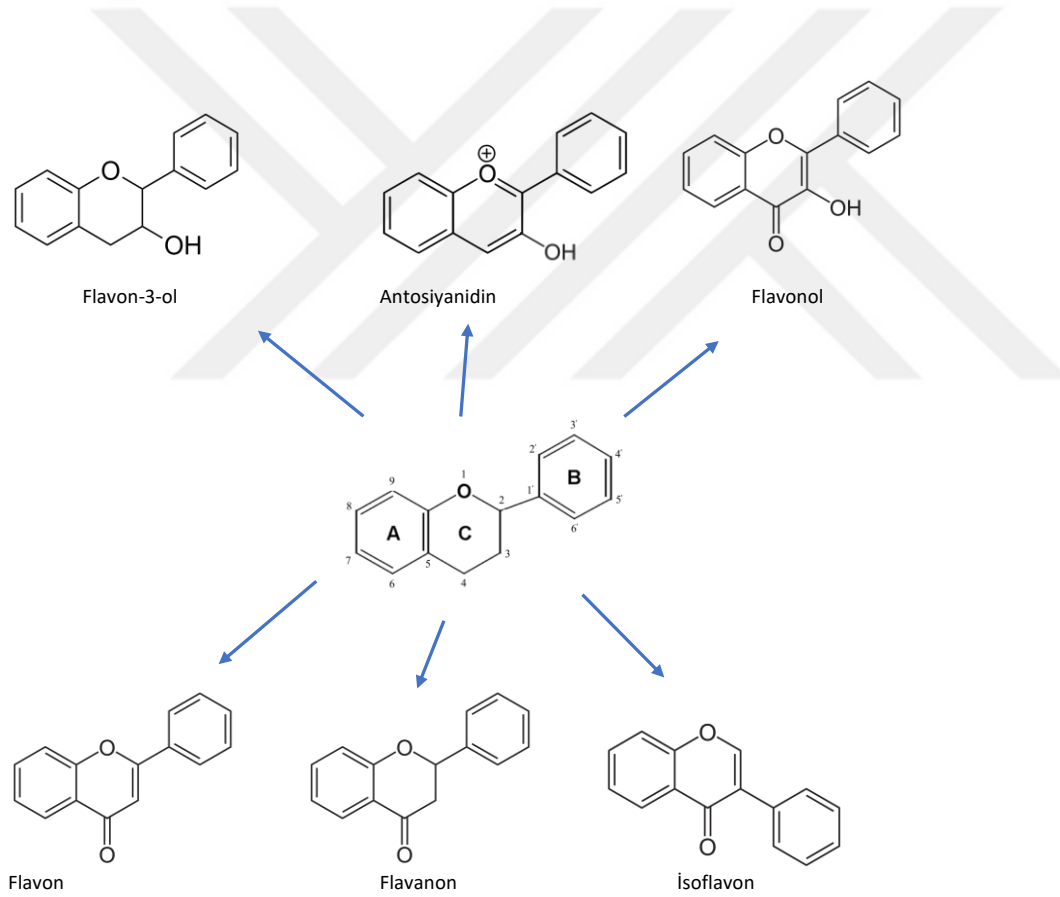


Şekil 2.1 Flavonoidlerin Temel Yapısı

Flavonoidler, temel kimyasal yapısı flavan omurgası olan, iki fenil halkasının (A ve B) propan zinciriyle birleşmesinden oluşan, 15 karbon atomlu difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır (Şekil 2.1) (31), (35). A aromatik halkası, asetat/malonat yolundan, B halkası ise fenilalaninden şikimat yolundan türetilir (Şekil 2.2) (36). Kalkon sentaz enzimi, tüm flavonoidlerin türetildiği kalkonlu iskeletler üretir. Daha sonra bitki türlerine bağlı olarak izomeraz, redüktaz, hidroksilaz ve birkaç $Fe^{2+/2-}$ okzanotarat bağımlı dioksijenaz gibi bir enzim grubu bazik flavonoid iskeleti değiştirir. Transferazlar ise şeker, metil grupları ve/veya asil kısımları ile flavonoid omurgasını değiştirir. Bu modifikasyonlarla C halkasını değiştirerek farklı flavonoid sınıflarına neden olur (31), (37). Bu sınıflar kimyasal yapılarına göre 6 alt sınıfa ayrılır. Bunlar flavan-3-oller (flavanoller veya kateşinler olarak da bilinir), flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinlerdir (Şekil 2.3) (35).



Şekil 2.2 Flavonoidlerin Biyosentez Yolağı (36)



Şekil 2.3 Flavonoidlerin Alt Sınıfları

Bitkilerin genellikle tüm organlarında bulunan flavonoidler önemli fizyolojik ve morfolojik görevlerde rol alırlar. Bitkilerde, polenlere böcekleri çekmek için tozlayıcıları ve tohum dağıtıcıları çeken çiçek ve meyveleri renklendirir (4). Böylece bitki üremesinde rol alır. Gıda bitkilerinin lezzetlendirilmesinde görev alır. Zararlı

Ultraviyole A ve B (UV-A, UV-B) ışınlarını absorplama özelliklerinden dolayı bitkileri UV radyasyonundan ve UV kaynaklı reaktif oksijen bileşiklerinden (ROB) koruma görevleri vardır (38). Soğuk, sıcak, kuraklık ve tuzluluk gibi birçok biyotik ve abiyotik strese karşı koruyucu fonksiyonlar sağlayabilir (37), (39), (40). Ayrıca, flavonoidler enerji transferlerinde, fotosentez ve morfogenezin düzenlenmesi, büyüme faktörlerinin düzenlenmesi ve cinsiyetin belirlenmesinde rol oynarlar (4). Bunların dışında antifungal ve antibakteriyal koruma ile patojen organizmalara karşı bitkilerin korunmasında önemli görevleri vardır (41), (42).

Bitkilerde birçok görevde yer alan flavonoidler sebze ve meyve gibi birçok bitkisel gıda ve meyve suyu, çay ve şarap gibi içecekler içerisinde yer aldığından günlük insan diyetinde önemli miktarlarda bulunmaktadır.

İnsanlarda günlük flavonid alımı coğrafyaya ve beslenme kültürüne, tarımsal uygulamalara ve iklim stresine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte genel olarak 20 mg ile 500 mg arasında değişiklik gösterebilir (43). Avrupa ve ABD’de flavonoid alımı konusunda birçok çalışma yapılmıştır ancak Güney Amerika için yeterli veri yoktur. Çin'deki veriler 19,13 mg/gün ve Kore’deki veriler ise 107 mg/gün olduğunu gösterse de tüm Asya kıtası içinde yeterli veri yoktur. Avrupa’da flavonoidlerin ortalama alım miktarı 428 mg/gün dür. Güney bölgelerinde bu miktar ortalama 301 mg/gün iken kuzey bölgelerinde 348 mg/gün ve orta bölgelerinde 506 mg/gün olarak kendini gösterir. ABD’de ise flavonoid tüketimi kadın ve erkekler için sırasıyla ortalama 236 mg/gün ve 224 mg/gün tahmin edilen ortalamalar bulmuştur. Avustralya popülasyonunda ortalama flavonoid tüketimi 351 mg/gün olarak tahmin edilmektedir. (36).

İnsan beslenmesinin önemli bir bölümünü oluşturmasına ve geleneksel bitki tıbbında binlerce yıldır kullanılmasına rağmen flavonoidlerin sağlık üzerine olası etkileri son yıllarda yıllarda büyük ilgi odağı olmuştur (44).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar meyve ve sebzelerce zengin diyetle beslenen bireylerin kanser, felç ve yaşa bağlı patolojilere karşı daha düşük riske sahip olduklarından ve pek çok kanser türünün gelişimini engellediğinden bahsetmektedir (45). Elma, kızılcık, ve soğan gibi meyve ve sebzelerden elde edilen flavonoidlerin

kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde kritik rol oynadığı bildirilmiştir (43). Ayrıca yaşlı erkeklerde koroner kalp hastalığı ve myokard enfarktüs nedeniyle ölümü ve postmenapozal kadınlarda koroner kalp hastalığı riskini %35 oranında azalttığını bildiren çalışmalar vardır (46), (47).

İtalya’da yapılan yaklaşık 10.000 kanser hastası ve 16.000 kontrol içeren vaka kontrol çalışması; oral ve gırtlak kanseri gelişme riski, toplam flavonoidlerin alımı ile ters orantılı olduğunu kaydetmiştir. Özellikle narenciye ile beslenme özofagus kanseri riskini azaltmıştır. 9959 erkek ve kadını içeren prospektif bir çalışmada ise, 24 yıllık bir süre içinde artan flavonoid alımı ile akciğer kanseri vakalarında azalma gözlenmiştir. Bazı epidemiyolojik çalışmalar ise flavonoid alımının, kanser insidansı ve mortalitesinin etkileriyle ilgili çelişkili sonuçlar bulsa da mevcut olan birçok veri, sağlığı korumak ve kanser gibi geniş bir hastalık spektrumunun önlenmesi için dengeli bir diyeti tavsiye etmektedir (48).

Kanser ve kronik hastalıklara karşı koruyuculuğun yanı sıra flavonoidlerin antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, antidiyabetik, analjezik, antialerjik, hepatoprotektif, sitostatik, östrojenik ve antiöstrojenik fonksiyonlar gibi bir dizi biyolojik aktivite gösterdiği de rapor edilmiştir (43), (48). Bazı flavonoidler güçlü antiviral/bakteri aktivitesi açısından araştırılmış ve influenza, hepatit C ve *Escherichia coli* enfeksiyonlarına karşı terapötik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (43).

2.5.1 Flavonoidler ve Kanser

Flavonoidlerin kansere karşı koruyucu etkisini araştırmak amacıyla çok sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalar tersini söylese de flavonoid alımının kanser riski ile ilişkisini inceleyen kohort ve vaka kontrol çalışmalarından elde edilen veriler, flavonoidlerin akciğer kanseri riskini azaltabileceğini göstermiştir (49). Yapılan çalışmalar flavonoidlerin gırtlak kanseri; flavanonların özofagus kanseri; antosiyanidin, flavonol, flavon ve izoflavonların yüksek alımının ise kolorektal kanser riskinde azalma sağladığını göstermiştir (50). Hawaii, Uruguay ve İspanya’da ayrı ayrı yapılan vaka kontrol çalışmaları, ağız boşluğu, farinks, larenks ve özofagus, akciğerler, mide kanserleri gibi farklı kanser

türlerinin oluşumu ile antioksidan özellikli toplam flavonoid, beta-karoten ve E vitamini alımı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (49).

Birçok *in vitro* çalışmada flavonoidlerin farklı hücre hatlarında antikanser etki ettiği gösterilmiştir. Zenginleştirilmiş zencefil ekstresi ile yapılan bir çalışmada, ekstrenin meme kanseri (MCF-7) hücre hattında önemli antikanser aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. *Blumea balsamifera* bitkisinin yapraklarından izole edilen luteolin-7-metil eter bileşiğinin insan akciğer kanseri hücre dizilerine (NCI-H187) karşı güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (51), (52). Ayrıca luteolinin insan derisine nüfuz ettiği ve aynı zamanda cilt kanserinin önlenmesi ve tedavisi için aday molekül olduğunu ifade eden çalışmalar da vardır (53). Başka bir çalışma ise apigeninin cilt papillomlarını inhibe ettiğini ve papillomların karsinomlara dönüşümünü azalttığını kanıtlamıştır (54).

Hayvan modellerini kullanan *in vivo* çalışmalar, flavonoidlerin tümör başlatma ve tümör ilerlemesine karşı koruyucu etkilerini göstermiştir. Genistein ve daidzein bakımından zengin fermente soya sütünün yedi haftalık sıçanlara verilmiş ve 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridin tarafından indüklenen meme tümör oluşumunu inhibe ettiği iddia edilmiştir (55). Bir flavonoid olan nobiletin, doku tümör hücrelerinin metastaz ve anjiyogenezisin de rol oynayan metaloproteazların (MMP) ve MMP'lerin enzimatik aktivitesini inhibe eden metaloproteaz doku inhibitörlerinin (TIMP) ekspresyonunu düzenlenler. Nobiletin insan fibrosarkom (HT-1080) hücrelerinde TIMP ekspresyonunun arttırarak ve MMP ekspresyonunun baskılayarak tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını inhibe etmiştir (56). Kızılcıktan izole edilmiş ve saflaştırılmış proantosiyanidinlerin *in vivo* eksplant tümör U87'nin büyümesini yavaşlattığı iddia edilmiştir (57). *In vivo* çalışmalar luteolinin kanserli hücrelerin gelişimini geciktirdiğini veya engellediğini göstermiştir. Tümör hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi, hücre döngüsü inhibisyonu ve hücre sinyalleme (içsel ve dışsal) yollarına etki ederek apoptozun indüklenmesi yoluyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir (53).

2.5.1.1 Kanser Önleyici Etkide Moleküler Mekanizmalar

Flavonoidler kanser tedavisine birçok mekanizma ile etki edebilirler. Yapılan çalışmalar bu bileşiklerin hücre döngüsünü durdurma indüksiyonu, anti-anjiyogenezis, metastaz, sinyal yollarına etki, antioksidan/pro-oksidan etki ve apoptotik süreçlere etki ile kanser önleyici etkisini göstermiştir (43).

Anjiyogenez, tümör gelişiminde var olan, kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması ile çok önemli bir aşamadır. Bu işlemle tümörün büyüklüğü artar ve ayrıca tümör diğer organlara da taşınır. Bu nedenle, diyet flavonoidleri ile anjiyogenez hedefleme kanser kemoterapisinde değerli bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Çalışmalar, galangin ve kamferol gibi flavonoidlerin vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile uyarılmış insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVECs) anjiyogenez sürecini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (58).

Tümör hücrelerinin kökenlerinden diğer dokulara kan ve lenfatik damarlar yoluyla göçüne “metastaz” denir ve bu durum MMP'ler olarak bilinen proteolitik enzimlerin aşırı ekspresyonu ile sağlanır. MMP'ler hücre dışı matrisi bozar, böylece kanserli hücrelerin komşu organları istila etmesine izin verir. On yedi farklı flavonoidle yapılan bir çalışmada incelenen bileşiklerden sadece ikisi hariç tüm flavonoidlerin MMP-9 ekspresyonunu inhibe ederek meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-23) göçü ve istilayı inhibe ettiğini göstermiştir (59), (60).

Hücre döngüsü kontrol noktalarına ve tümör baskılayıcı genlere müdahale edilerek kanser hücrelerinin sonsuz hücresel çoğalması engellenebilir. Araştırmalar, birçok kanser türünde kanser hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde flavonoidlerin önemli bir rol oynadığını doğrulamıştır. Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hücre hattında naringenin etkisi değerlendirilmiş ve hücrelerin G0/G1 ve G2/M fazlarının durmasına neden olduğu belirlenmiştir (61). Başka bir çalışma ise mirisetin ve metil öjenolinin kombinasyon tedavisi ile insan serviks adenokarsinoma (HeLa) hücrelerinde G0/G1 hücre döngüsü fazını durdurduğunu göstermiştir.(62).

Hücre sinyal yolları; protein sentezi, hücre büyümesi, motilite, hücre mimarisi, polarite, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü gibi çok çeşitli işlevlerle birbirine

bağlıdır. Proto-onkogen tirozin-protein kinaz olan Fyn, Ras proteinini aktive ederek çeşitli sinyal yollarını düzenler. UV-B'nin neden olduğu koşullar altında Fyn'nin aşırı aktivasyonu cilt kanseri gelişiminde kritik bir rol oynar. Bu yüzden Fyn, cilt kanseri tedavisinde ideal bir hedeftir. Flavonoidlerle yapılan bir çalışma, Fyn proteinini hedef almış ve Fyn aktivasyonunu inhibe ederek cilt kanserine karşı kemopreventive etki göstermiştir (63).

2.5.2 Apoptoz

Apoptoz veya apoptozis, hasarlı veya istenmeyen hücrelerin programlı olarak ölmesi olarak tanımlanır (49). Apoptoz, canlının normal gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ve/veya hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde savunma mekanizması olarak ortaya çıkar (64). Sağlıklı yetişkin bir insanda günde yaklaşık 10 milyon hücre apoptoz geçirir (65). Gelişmekte olan bir insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan ara dokunun kalkması ya da kemik iliğinde üretilen milyonlarca B ve T hücrelerinin olgunlaşma sırasında çoğunun (>%95) ölümü apoptozla gerçekleştirilir (66). Ayrıca bir hücre, tamir edilemeyecek şekilde hasar gördüğünde veya bir virüsle enfekte olduğunda da apoptoza gider (65).

Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, protein sentezi, RNA ve enerjiye gereksinim duyan, genlerle düzenlenen, programlı, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptozun ilk gözle görülür değişiklikleri hücrenin büzülmesi ve çekirdeğin ve kromatinin yoğunlaşmasıdır. Bunu, hücre çekirdeği ve kromatinin parçalanması, hücre yüzey bölümünde balonlaşma ve son olarak hücrenin apoptotik cisimler adı verilen membranla çevrili hücresel yapılardan oluşan parçalara ayrılması izler. Apoptotik cisimler fagositler ve çevre hücreler tarafından fagositoz ile yok edilir. İnterstisyel boşluğa hiçbir hücresel materyal salınmadığından apoptoza karşı immün reaksiyon gerçekleşmez (67).

Apoptozis, hücresel ölüm şekli olan nekrozdan ayırt edilmelidir. Nekroz apoptozisin aksine, genetik olarak programlanmamıştır, komşu hücre gruplarını etkiler ve enflamatuvar bir yanıt verir. Apoptozdan farklı olarak, nekrozda hücre zarı bütünlüğü kaybı, organel şişmesi ve lizozomal sızıntı nedeniyle hücresel şişlik

vardır. DNA'nın bozulması rastgeledir ve parçalanmış hücreler makrofajlar tarafından yutulur (68).

Bir hücrenin apoptozis ile hayatta kalması veya ölmesi, hücre içindeki ve çevresindeki pro-apoptotik (stres veya ölüm) ve anti-apoptotik (mitojenik veya hayatta kalma) sinyaller arasındaki denge ile belirlenir. Radyasyon, kimyasal ve bulaşıcı ajanlar, genetik düzensizlikler, anafiklaksi gibi immünolojik reaksiyonlar, beslenme dengesizlikleri, oksijen yoksunluğu, ısı stresi ve diğer ciddi hücre stresi tipleri nedeniyle hücre hasarı pro-apoptotik yolları başlatır. Apoptoz düzeninin bozulması organ fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır, hücre büyümesi ve hücre ölümü arasında denge etkilenir (68).

Apoptozu karakterize eden 3 özellik vardır: protein bölünmesi veya hidroliz, nükleer DNA'nın parçalanması ve apoptotik hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınması (68). Bu özelliklerden Bcl-2 familyası, kaspazlar ve Bcl-2 familyası proteinleri tarafından sinyalleri kaspaza ileten Apaf-1/CED-4 proteini sorumludur (69). Proteinlerin bölünmesi temel olarak kaspaz adı verilen bir sistein proteaz ailesinin aktivasyonu ile oluşur. Kaspazlar, inaktif bir formda sentezlenir ve spesifik başlatma mekanizmaları ile aktive edilir (68).

Hücrede apoptozisin başlatılması için uyarılması gerekir. Bu uyarılar hücrenin içinden (iç (intrinsik) yolak) meydana gelebildiği gibi dış etkilere (dış (ekstrinsik) yolak) de kaynaklanabilmektedir.

Dış (Ekstrinsik) Yolak

Dış yolak, pro-apoptotik molekül veya ligandlar tarafından aktive edilen hücre yüzeyindeki pro-apoptotik reseptörlerle başlar. Bunlar, TNFR1 ve Fas reseptörüdür. TNFR1 ve Fas reseptörleri tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine aittir. Fas, aktif B hücreleri ve T hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur. Pro-apoptotik reseptörleri aktive eden ligandlar Fas ligandını (FasL) ve TNF α 'yı içerir. FasL, aktive edilmiş T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilir. TNF- α , ağırlıklı olarak aktive edilmiş monosit/makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir. Ekstrinsik yolun hücre içi kısmı,

ölüm bölgesi olarak adlandırılır. Üç veya daha fazla dış yolak-ligand kompleksi demet oluşturduktan sonra, ölüm bölgesi yaklaşır ve bir adaptör proteini için bir bağlanma bölgesi oluşur. Adaptör proteini, bu reseptöre özgüdür. Bu ligand-reseptör-adaptör proteini kompleksi, ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılır ve başlatıcı kaspazların (kaspaz 8 ve 10) alımı ve birleştirilmesine yol açar (68).

İç (İntrinsik) Yolak

Bu yol; DNA hasarı, ROB, radyasyon, toksinler, viral enfeksiyonlar, hormon veya büyüme faktörü yoksunluğu, kemoterapötik ajanlar, sitokinler ve glukokortikoidler gibi hücrel streslere cevap olarak hücre içinden başlatılır. Bu yolun başlatılması sonunda pro-apoptotik proteinlerin kaspaz enzimlerini aktive edecek ve apoptozu tetikleyecek mitokondrilerden salınmasına neden olur. Apoptozda iç yolağın düzenlenmesi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir. Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek apoptozisin başlaması ve sonlanmasında önemli rol alır (64). Bcl-2 protein ailesi üç gruba ayrılmıştır. Grup I anti-apoptotik aktiviteye sahipken, Grup II ve III hücre ölümünü teşvik eder. Hücrenin içsel yolak ile apoptoza gitmesi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki aktivite dengesine bağlıdır (68).

Çok hücreli organizmalarda, dokulardaki hücre sayısı, programlanmış hücre ölümü yani apoptoz ile yakından kontrol edilir. Apoptozis sürecindeki, anti-apoptotik proteinin aşırı ekspresyonu, pro-apoptotik proteinin aşırı baskılanması, kaspazın ekspresyonunun azaltılması, ekspresyonu ve tümör baskılayıcı proteinlerde defekt, kanser de dahil olmak üzere birçok insan patolojik durumuna yol açar (60).

Birçok araştırma flavonoidlerin, kanserin hem önlenmesinde hem de tedavisinde bir antioksidan olarak faydalı olduğunu göstermiştir.

Çeşitli bitki türlerinde bulunan Chrysin'in kemopreventif etkisini üç farklı insan kolorektal kanser hücre hattında (HCT116, DLD1 ve SW837) değerlendirmiş. Chrysin, insan kolorektal kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünde pro-apoptotik sitokin TNF- α ve TNF- β 'yü indükleyerek rol almıştır (70).

Lawsonaringenin *Lawsonia alba* Lam.'ın yapraklarından izole edilmiş bir flavonoiddir. Kolorektal kanser (HT-29) hücre hattında yapılan çalışmada anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonunu düşürerek apoptozisi engellemiştir (71).

Hücrelerde apoptozis birçok farklı yöntemle tespit edilebilmektedir. Günümüzde morfolojik görüntüleme, immunositokimyasal, biyokimyasal (akış sitometrisi) yöntemler kullanılmaktadır. Akış sitometrisi hücre yüzeyi antijenlerini (fosfotidilserin ve Anneksin V) ve bunları taşıyan hücreleri ayırmaya yarayan bir floresan antikor tekniğidir. Akış sitometrisi yardımıyla floresan maddelerle işaretlenmiş, antikor kullanılarak, yüzey proteininin belirlenir. Böylece apoptotik hücreler rahatlıkla belirlenir. Teknik aynı zamanda azalan DNA'nın gösterilmesi prensibine de dayanmaktadır. DNA yoğunluğu normal hücreye göre hem apoptotik hücrede hem de apoptotik cisimciklerde daha azdır (64).

2.5.3 Flavonoidler ve Antioksidan Etki

Flavonoidlerin birçok biyolojik aktivite ve hastalara karşı koruyucu etkileri serbest radikalleri süpürme kabiliyetleri, dolayısıyla oksidatif stresi ve buna bağlı olarak oksidatif hasarı azaltma yeteneklerinden kaynaklanır (34).

Serbest radikaller, bağımsız olarak varlığını sürdürebilen, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren (radikal) ve reaktif özellik sergileyen atom, atom grupları veya molekülerdir. Kimyasal simgeleri sağ üst köşeye konan nokta veya çizgiyle (R^{\bullet} , R^{-}) gösterilir. Serbest radikal, hem ROB'ları hem de reaktif nitrojen bileşiklerini (RNB) tanımlamada kullanılır (Çizelge 2.2) (72).

Çizelge 2.2 Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Radikaller	Non-radikaller
<i>Reaktif oksijen bileşikleri (ROB)</i>	
Superoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, HO^{\cdot}	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Alloksil, RO^{\cdot}	Singlet oksijen, 1O_2
<i>Reaktif azot bileşikleri (RNB)</i>	
Nitrik oksit, NO^{\cdot}	Nitröz asit, HNO_2
Azot dioksit, NO_2^{\cdot}	Nitrosil katyonu, NO^+
	Nitroksil anyonu, NO^-
	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Alkil peroksinitritler, $ROONO$

Serbest radikaller; sigara, hava kirliliği, iyonize radyasyon, UV radyasyon, yüksek doymamış yağ asitli diyet, karsinojenik bileşikler ve çevresel toksikanlar gibi dış kaynaklar aracılığıyla meydana gelebilir. Bununla birlikte hücrelerde önemli miktarda ROB üretilmektedir (73), (74). ROB, aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak meydana gelmektedir. Ksenobiyotik metabolizması, mitokondriyal elektron transportu, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve parçalanma reaksiyonları bu bileşiklerin oluşumuna sebep olur (75), (76). ROB'lar, diğer moleküllerle reaksiyona girdiklerinde radikal olmayan bileşiklere radikal hale getirir. Bu sebeple serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonlar oluşturur (77).

ROB/RNB'nin biyolojik sistemlerde zararlı veya faydalı olarak ikili bir rol oynarlar. ROB'un yararlı etkileri enfeksiyöz ajanlara karşı savunmada hücrel sinyalizasyon sisteminde rol alır. Ayrıca mitojenik yanıtı indükler. Yüksek konsantrasyonlarda ROB; lipitler, membranlar, proteinler ve nükleik asitleri etkileyerek hücre yapılarına hasar verir (78). İnsan vücudunun normal fizyolojisinde pro-oksidan ve antioksidan dengesi, hafif şekilde pro-oksidanlar lehinedir; yani hâlihazırda organizmada bir miktar oksidatif stres zaten vardır (79). ROB'un zararlı etkileri, antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanların antioksidan etkisi ile dengelenmektedir (78).

Endojen veya eksojen sebeplerden dolayı hücredeki serbest radikal miktarının artışı oksidatif stres olarak tanımlanır (80). İlaç kullanımı, klorlu bileşikler, çevresel

kirleticiler, bazı metal iyonları, UV ışınları, iyonize radyasyon, alkol ve sigara kullanımı, beslenme bozuklukları oksidatif stresi artırır ve bu artış DNA'da tek ve çift iplik kırıkları, baz modifikasyonları, abazik alanlar, şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar gibi oksidatif DNA hasarının artışına ve neden olabilir (80).

Oksidatif stres, başlı başına bir hastalık olarak görülmemektedir. Bununla birlikte yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserde dahil olmak üzere birçok hastalıkta önemli bir neden olarak değerlendirilmektedir (81).

Reaktif oksijen bileşikleri, yüksek reaktiviteye sahip oksidan moleküller olup genetik materyal olan DNA ile ayrıca lipit, protein gibi hücrenin önemli makromolekülleriyle reaksiyona girerek oksidatif hasar yaparlar. ROB, DNA polimerazlar gibi proteinleri ve DNA onarım enzimlerini hedef alırlar. Böylece doğrudan veya dolaylı yoldan lipit peroksidasyona neden olup protein hasarına da yol açabilirler (80). Hücre ve organellerin membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, oksidatif atığa karşı duyarlıdır. ROB artışı, lipit peroksidasyonu ile membran lipitlerini parçalayarak, hücre yapısını bozar ve hücre ölümüne kadar gidebilen hasara neden olur (77).

2.6 LİPİT PEROKSİDASYON

Hücre membranı, sürekli olarak oksidatif atakların hedefi konumundadır. Burada bulunan doymamış yağ asitleri, birden fazla sayıda çifte bağ içermektedir. Bu bağlar, ROB tarafından bir elektron koparılarak kolayca okside edilir ve lipit hidroperoksitler ile lipit peroksil radikalleri oluşur. Bu süreç, "lipit peroksidasyonu" adı verilir.

Bu mekanizmanın başlangıcında, membran fosfolipitlerin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden, ROB tarafından bir hidrojen atomu koparılır. Serbest radikal ve lipit, yeni bir serbest radikal oluşturulmuş olur. Bu süreç, yayılma aşamasıyla çoğalarak devam eder. Süreç bir kez başladığı zaman zincirleme reaksiyon (başlama, yayılma, sonlanma) şeklinde ilerler (82).

Lipit peroksidasyonun biyolojik membranlarındaki sonuçları; membran potansiyelinin düşürülmesi, H^+ ve diğer iyonlara permeabilitenin artması, membran akışkanlığının değişmesi ve membranın yırtılarak hücre içeriğinin ve lizozomal hidrolitik enzimlerin dışarıya salınması şeklinde görülür. Hücre ölümü ile sonuçlanan tablolar da meydana gelebilir. Lipit peroksidasyon sonucu oluşan ürünler başlıca lipit hidroperoksitler (LOOH), malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksialkanellerdir. MDA başta olmak üzere 4-hidroksialkanellerin de çeşitli toksik etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (83)

Lipit oksidasyon ürünlerinin saptanabilmesi için, çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) ölçümü, lipit peroksidasyonunun taranması ve izlenmesi için iyi bilinen bir yöntemdir. Bu yöntemde, güçlü asidik şartlarda ısıtma sonucu tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren biyolojik örnekler, kolorimetrik veya florometrik yöntemlerle ölçülebilen, pembe renkli ürünler vermektedirler. MDA, tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin bir örneği olarak, lipitlerin oksidatif hasarının geçerli bir biyogöstergesi olma işlevi dolayısıyla, uzun zamandan beri yoğun şekilde incelenmektedir (84).

2.7 ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

İnsan vücudu serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan korumak için ayrıntılı bir antioksidan savunma sistemi içerir. GPx, CAT ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimatik antioksidanlar, glutatyon (GSH), C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve flavonoidler ise non-enzimatik endojen antioksidanlardır (78). GSH, ROB'a karşı ilk savunmayı oluşturur ve ikincil savunma da ona bağımlı enzimler tarafından oluşturulur (85). SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüşmesini sağlar ve oluşan H₂O₂, CAT ve GPx tarafından yok edilir (86). Eksojen antioksidanlar diyetle alınan vitaminler, karotenoidler ve minerallerdir. 1990 ortalarından sonra bu gruba fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar da dahil olmuştur. Bunların antioksidan özellikleri ve hastalıklardaki koruyucu, engelleyici etkileri üzerine araştırmalar bu tarihlerde başlamış ve hızla artmıştır (87). Fenolik bileşikler, serbest radikalleri yok ederek ve lipit peroksidasyon oluşturma yeteneğine sahip olan

bakır (II) ve demir (III) gibi metal iyonlarla şelasyon yaparak antioksidan etki gösterirler (88).

2.7.1 Enzimatik Savunma Mekanizmaları

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz enzimi etkili bir hücre içi antioksidandır ve süperoksit radikalinin hidrojen peroksit'e dönüşmesini sağlar. Oluşan H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından yok edilir.



Süperoksit dismutaz, birçok izoformda bulunur. İnsanlarda; sitozolik (Cu/Zn-SOD), mitokondriyal (Mn-SOD) ve ekstrasellüler (EC-SOD) olmak üzere üç farklı formu vardır. Mn-SOD, anti-tümör aktivitesine sahip en etkili antioksidan enzimlerden biridir. Farklı hücre hatları üzerinde yapılan bir dizi çalışma, Mn-SOD'un aşırı ekspresyonunun tümör büyümesinin gecikmesine yol açtığını doğrulamıştır. Mn-SOD aktivitesinin birçok kanserde oldukça düşük olduğu bulunsa da, bazı deneyler Mn-SOD ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını doğrulamıştır (78).

Katalaz (CAT)

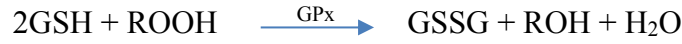
Katalaz bitki, hayvan ve aerobik bakteri hücrelerinde peroksizom adlı hücre organelinde bulunan bir enzimdir. CAT, hem normal aerobik metabolizmanın hem de patojenik ROB üretiminin toksik bir ürünü olan H₂O₂'nin detoksifikasyonunda yer alır. Bir CAT molekülü bir dakika 6 milyon H₂O₂ molekülünü suya ve oksijene dönüştürebilir (78).



Glutatyon peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz enzimi selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki şekli vardır. GPx enzimlerinin tümü dört aynı alt birimin tetramerleridir. Her alt birim, aktif bölgede, peroksit substratının iki elektron

indirgenmesine doğrudan katılan bir selenosistein içerir. Enzim, selenosisteinin azaltılmış halini yeniden oluşturmak için nihai elektron verici olarak GSH kullanır.



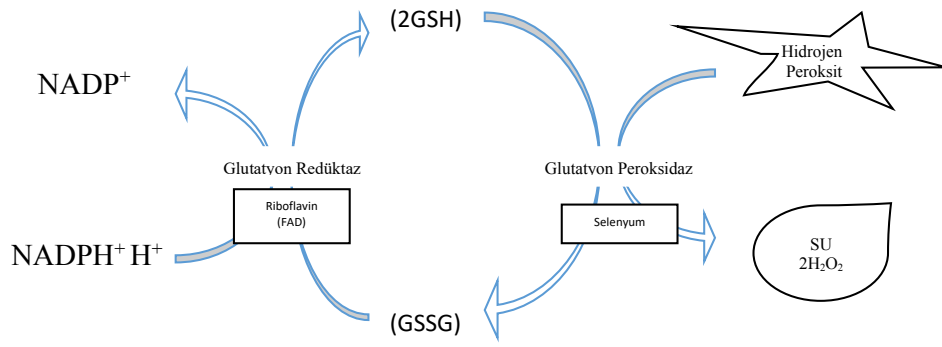
Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 dahil olmak üzere hidroperoksitlerin azalmasını, azaltılmış GSH ile katalizler ve hücreyi oksidatif hasardan koruma işlevini yerine getirir. GSH metabolizması, antioksidan savunma mekanizmalarının en temellerinden biridir. GPx düşük oksidatif stres seviyelerine karşı ana koruma kaynağıdır (78).

2.7.2 Enzimatik Olmayan Savunma Mekanizmaları

Glutatyon (GSH)

Glutatyon, hem bitkilerde hem de hayvanlarda yaygın şekilde dağılan tripeptit yapısında (γ -glutamilsisteinilglisin) hücre içi enzimatik olmayan antioksidandır. Hücre içi GSH havuzu sitozol (%85), mitokondri (%10-15), endoplazmik retikulum ve çekirdek kısımlarındaki moleküllerden oluşmaktadır. Glisin, sistein ve glutamik asit'ten oluşan glutatyon, hem indirgenmiş formda (GSH), hem de yükseltgenmiş okside disülfid formunda (GSSG) bulunur (89).

Glutatyon, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda glutatyon transferazlarına nükleofilik bir yardımcı substrat olarak hizmet eder ve hidroperoksitlerin indirgenmesinde glutatyon peroksidazları için önemli bir elektron donörüdür. İki molekül GSH'nin okside olarak disülfid bağıyla bağlanır ve bir molekül H_2O_2 indirgenir. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) aracılığı ve glutatyon redüktaz enzimiyle bir molekül GSSG, yine iki molekül GSH haline getirilir. Böylece, GPx enziminin aktivitesinin sürekliliği sağlanır (Şekil 2.4). GSH'ye ait redoks döngüsü, düşük düzeydeki oksidatif strese karşı birincil önemdeki korunmadır. Yüksek düzeydeki oksidatif stres için bu koruyuculuk CAT tarafından sağlanır (89).



Şekil 2.4 Glutatyon (GSH) İndirgenme-Yükseltgenme Döngüsü

Glutatyonun, hücrel redoks ortamını dengeleyerek, hücreyi apoptozise karşı koruma işlevi de bulunur. Çekirdekdeki glutatyon, DNA'nın onarımı ve ekspresyonu için protein sülfidlerin redoks durumunu korur. GSH ayrıca amino asit taşınımı ve protein sülfidril redüksiyon durumunun korunmasında rol oynar (90). Bunun dışında çok sayıda çalışma kanser insidansı ve GSH arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (78).

Diğer Moleküller

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında, glutatyondan başka vitamin C ve E, β -karoten ve flavonoidler gibi moleküller bulunmaktadır. Askorbik asit (Vitamin C), önemli ve güçlü bir antioksidan olup; hidrofilik ortamda bulunmaktadır. Vitamin C, tek başına aktivite gösterebildiği gibi, Vitamin E ve karotenoidlerle de işbirliği yaparak antioksidan aktive gösterirler (78).

Endojen veya eksojen sebeplerle ROB/RNB'nin artışı yani oksidatif stres kanser hücreleri oluşmasına neden olur. Birçok malign hücre kültüründe yüksek ROB seviyeleri görülmüştür. *In vitro* olarak gözlemlenen bu artış *in vivo* olarak da bulunmuştur. Hücrelerin kötü huylu kanser haline gelebilmesi için birçok kazanılmış yetenek (artan hücre çoğalması, apoptoz direnci, hücrel ölümsüzleştirme, artan anjiyogenez, metastaz) geliştirmesi gerekir. Ek olarak, genetik dengesizliğin, bu yeteneklerin kazanılmasında kilit bir rol oynar (28). Oksidatif stresdeki artış, proto-onkojenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri gibi bazı önemli hücrel elementleri, hücrel sinyalleşme (nükleer faktör- κ B (NF- κ B)), sinyal transdüseri ve

transkripsiyon (STAT-3) yollarını, kinazlar, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve proteinlerin yapısında yaptıkları değişikliklerle bu yetenekleri kazanır (91).

İnsan vücudundaki SOD, CAT, GPx, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) ve GSH gibi antioksidan savunma sistemleri, ROB üretimi ve nötrleştirilmesi arasındaki dengeyi sağlar. Düşük seviyelerde ROB hücre içi sinyal ve homeostazı düzenleyerek yararlı etkiler gösterir, fakat hücre içi antioksidan savunma sistemlerin yeterli olmadığı durumlarda aşırı ROB birikimi kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olur (91).

Antioksidan aktiviteye sahip ajanlar, ROB'un hücresele seviyelerinde artışı azaltarak ve/veya önleyerek kanseri önleyici etkilere neden olabilir. Pro-oksidan ajanlar, ROB'un hücresele seviyelerini arttırdığı için, bu ajanların kanserojen etkilere neden olabileceği bilinmektedir. Ancak pro-oksidan maddeler ROB'un hücresele seviyelerini sitotoksik seviyelere yükselttiğinde, bu maddeler seçici kanser hücrelerinin öldürülmesini indükleyebilir ve terapötik olarak faydalı olabilir. Bu sebepten hem antioksidan hem de pro-oksidan özellik gösteren flavonoid yapıdaki bileşikler kanser gelişiminde koruyucu bir rol oynar (28), (91).

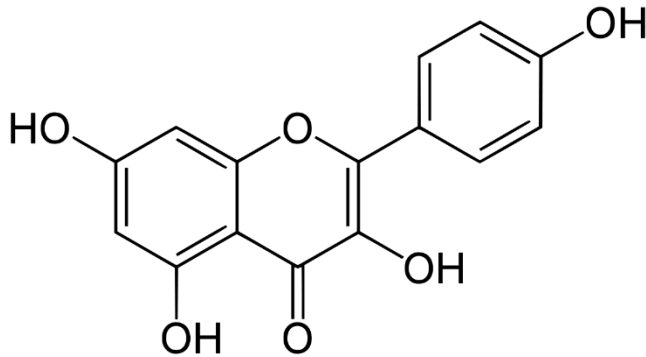
Birçok araştırma flavonoidlerin, kanserin hem önlenmesinde hem de tedavisinde bir antioksidan olarak faydalı olduğunu göstermiştir. Wushen adı verilen 55 farklı doğal içerikten üretilen bir gıda karışımı ile beslenen S180 tümör taşıyan fareler *in vivo* olarak incelenmiştir. Wushen bu farelerde anti tümör aktivitesi göstermiştir. Ayrıca antioksidan etkilerini değerlendirmek için CAT, GPx ve SOD enzim aktiviteleri ve MDA konsantrasyonu ölçülmüş ve karışımın anti tümör potansiyelinin antioksidan özellikleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (92).

Rosaceae familyasına ait Maesilden elde edilen 7,12-dimetilbenz-[a]-antrasen (DMBA) ve 12-0-tetradekanoil forbol 13-asetat (TPA), indüklenmiş fare derisi karsinogenezine inhibe edici etkisi ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. DMBA-TPA kaynaklı Maesil'in, farelerde deri karsinogenez gelişimini ve lipid peroksidasyonu azalttığı ve toplam antioksidan kapasiteyi artırdığı saptanmıştır (93).

Flavonoidler pro-oksidatif özellikler sergileyerek de kanser hücrelerini öldüren etki ortaya koyar. Fesleğinde bulunan ursolik asit ümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligandın (TRAIL) neden olduğu apoptoz üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TRAIL, TNF ailesinin üyesi ve apoptoz-indükleyen sitokindir. Çalışma insan kolon adenokarsinomu (HCT116, HT29, Caco2), insan embriyonik böbrek karsinoması (A293), insan prostat kanseri (PC3), insan meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF-7), skuamöz hücreli karsinom (SCC4) ve insan kronik lösemi (KBM -5) hücre hatlarında yapılmış ve ursolik asidin TRAIL'in indüklediği apoptozu güçlendirdiği bulunmuştur. Hücre hatlarında ursolik asidin ROB üretmesi, ölüm reseptörlerinin yukarı regülasyonu ile antiapoptotik proteinlerin aşağı regülasyonu yoluyla TRAIL kaynaklı apoptozu gerçekleştirmiştir (94). Başka bir çalışma kersetinin insan yumurtalık kanseri hücrelerini TRAIL'e duyarlı hale getirip getiremediğini araştırmıştır ve sonuçlar kersetinin, kanser hücrelerini TRAIL'e duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Kersetin, ölüm reseptörü DR5 ekspresyonunu indüklemiştir. DR5'in regülasyonuna ROB üretilmesinin aracılık ettiği de gösterilmiştir (95).

2.8 KAMFEROL

Kamferol (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) (Şekil 2.5), birçok yenilebilir bitki (brokoli, lahana, fasulye, pırasa, soğan, domates, çilek ve üzüm) ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bitkilerde (*Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Equisetum arvense*, *Moringa oleifer* ve *Sophora japonica*) bulunan bir flavonoiddir (96).



Şekil 2.5 Kamferolün Kimyasal Yapısı

Kamferol difenil propan yapısına (C6-C3-C6) sahiptir ve 4-koumaroil-CoA (C6-C3) 'un üç malonil-CoA (C6) molekülü ile yoğunlaştırılmasıyla sentezlenir (97). Düşük molekül ağırlıklı (MA: 286,23 g/mol) ve sarı renkli bir bileşiktir (96).

Biyoyararlanım

Doğada çoğunlukla glikozitleri şeklinde bulunan bileşiğe glikoz, ramnoz, galaktoz ve rutinoz gibi şekerler genellikle glikozitler oluşturmak üzere bağlanır. Kamferolün yüksek glikozit polaritesi, emilimini engeller, ancak aglikonların ara polaritesi emilimi kolaylaştırır. Kamferol esas olarak ince bağırsakta emilir. Kamferolün lipofilikliğı, pasif difüzyonla emilimini kolaylaştırır, ancak yapılan çalışmalar difüzyon ya da aktif taşımayla da absorbe olabileceğini göstermektedir (98). Kamferol, konjugasyon enzimleriyle ince bağırsakta metabolize edilebilir. Kolon mikroflorası tarafından da yoğun şekilde metabolize edilir. Kolonik bakteriler hem glikozitleri hem aglikonlara hidrolize edebilir. Emiliminden sonra, kamferol, glukuronidasyon, sülfatlama veya metilasyona uğrayarak metabolize edilir (98), (99).

Toksik Etkileri

Kamferolün güvenliğı ile ilgili çelişkili raporlar vardır. Bazı çalışmalar kamferolün antimutajenik aktiviteyi indüklediğini göstermiş olmasına rağmen (100), (101) diğer çalışmalar da bu flavonoidin genotoksik etkileri indükleyebileceğini ortaya koymuştur (102), (103). Flavonoidler antioksidanlar olarak bilinmesine rağmen, bu bileşikler ayrıca spesifik koşullar altında pro-oksidan ajanlar olarak da hareket edebilirler. Kamferolün de pro-oksidan aktivitesi genotoksik etkilerinin görülmesinde önemli bir rol oynayabilir (104). Çok sayıda *in vitro* çalışma kamferolün genotoksik ve kanserojen olabileceğini gösterilmesine rağmen bu etkiler *in vivo* çalışmalarda gösterilmemiştir (96).

Biyolojik Aktivitesi

Çok sayıda prelinik çalışma, kamferolün antioksidan, antikanser, anti-enflamatuar, antimikrobiyal, nöroprotektif, kardiyoprotektif, antidiyabetik, anti-osteoporotik ve östrojenik/antiöstrojenik etki gösterdiğini ispatlamıştır (96).

Antioksidan Etki

Flavonoidlerin antioksidan özellikleri yaygın olarak kabul edilmektedir. Çok sayıda çalışmada kamferol, bazı kamferol glikozitleri ve birkaç kamferol içeren bitkilerin sadece *in vitro* değil, *in vivo* olarak antioksidan aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (103).

Bazı çalışmalar, C4'te bir okso grubuyla birlikte C2-C3'te bir çift bağ mevcudiyetinin ve C3, C5 ve C4 'de hidroksil gruplarının varlığının, kamferolün antioksidan aktivitesinde yer alan önemli yapısal özellikler olduğunu göstermiştir. Kamferol, ksantin oksidaz enzimi gibi ROB üreten enzimlerin aktivitesini inhibe edebilir (105). Diğer flavonoidler gibi kamferolde, Fenton reaksiyonu ile demir veya bakır iyonlarını şelatlayarak hidroksil radikal oluşumunu azaltabilir (96). Kamferol ayrıca, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu veya aktivitesini artırarak antioksidan etkilerin görülmesini sağlayabilir (106).

Kamferolün antioksidan aktivitesi birçok *in vivo* çalışmada gözlenmiştir. Örneğin, kamferolün hücre içi ROB birikimini azalttığı ve *Caenorhabditis elegans*'ın sağ kalımını arttırdığı bulunmuştur (107). Kamferol türevleri içeren *Capparis spinosa* ekstresi, sağlıklı gönüllülerde topikal olarak uygulandığında önemli antioksidan aktivite göstermiştir (108).

Kanser

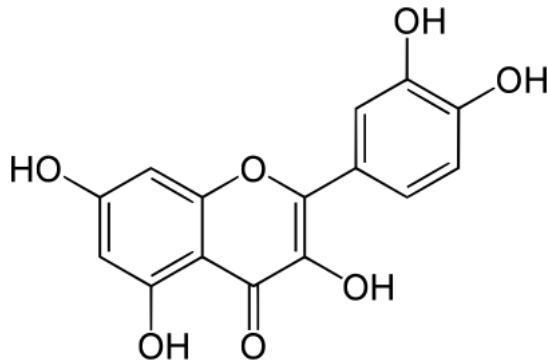
Epidemiyolojik kanıtlar (vaka kontrol ve kohort çalışmaları), kamferol bakımından zengin gıdaların tüketiminin mide (109), akciğer (110), yumurtalık (111) ve pankreas kanseri (112) de dahil olmak üzere bazı kanser türlerinin gelişme riskini azaltabileceğini göstermiştir. Her ne kadar az sayıda çalışma kamferolün *in vivo* hayvan modellerinde anti-kanserojen aktivitesini değerlendirmiş olsa da birçok preklinik çalışma bu flavonoidin kanseri önleyici ve tedavi edici özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (96).

Bazı çalışmalar, düşük kamferol konsantrasyonlarının DNA'yı farklı kanserojenlerin neden olduğu hasardan koruyabileceğini öne sürmektedir (113), (114).

Kamferol, kanser hücresi ölümünün indüklenmesine birçok mekanizma ile katılabilir. Siklin bağımlı kinaz CDK1'in aktivitesinin inhibisyonu ile hücre döngüsünün G2/M evresinde durdurulmasına neden olabilir (115). Kamferol, genomun koruyucusu olarak adlandırılan p53 tümör baskılayıcı proteinine etki ederek hücre döngüsünü durdurabilir. Ayrıca, kanser hücrelerinde, onkogen cMyc genel olarak aşırı eksprese edilir. Artan cMyc seviyeleri CDKN1A mRNA konsantrasyonlarını antagonize eder. Kamferol kemoterapi ilacı sisplatin ile birlikte uygulandığında, cMyc mRNA seviyelerini düşürür ve yumurtalık kanseri hücrelerinde CDKN1A mRNA'nın seviyelerini artırır. Sisplatin, kanser hücrelerini tahrip etmekte başarısız olur, ancak kamferol ilavesi ile cMyc ekspresyonunu engelleyerek apoptozu başarıyla indükler (116).

2.9 KERSETİN

Kersetin (3,5,7-trihidroksi-2-(3,4-dihidroksifenil)-4kromen-4-on) (Şekil 2.6), bir fenil benzo (c) pironandan türetilmiş ve insan diyetinde bol miktarda bulunan bir flavonoiddir (117), (118). Farklı meyve ve sebzelerde yaygın olarak dağılır. Soğan, elma ve domates ve marul oldukça zengin kersetin kaynakları olarak kabul edilir. Kersetinin çay, biber, kişniş, rezene, turp, dereotu ve çilek gibi farklı bitki türlerinde de bulunur (119).



Şekil 2.6 Kersetinin Kimyasal Yapısı

Kersetin bitkilerde yaygın olarak glikozit formlarında bulunur ve ana grupları genel olarak kersetin-*O*-glikozitlerdir. Kersetin-3-*O*-glukozit fasulye, adaçayı ve karabuğdayda; Kersetin-3-*O*-galaktosid, yaban mersini ve erikte bulunurken,

Kersetin-3-O-ksilosid mango meyvesinde bulunur. Disakkarit formundaki kersetin türevleri de bitki ve sebzelerde yaygın olarak bulunur. Örneğin kersetin-3-O-rhamnosilglukosid kiraz, ıspanak, üzüm ve kuru erikte bulunur (118).

Günlük beslenmede kersetin alımının 5-40 mg/gün olduğu tahmin edilmektedir ve bu seviyeler flavonoid bakımından zengin meyve ve sebzeleri (elma, soğan, domates) bol miktarda tüketen bireylerde günde 200-500 mg'a kadar çıkabilir (120).

Kersetin ve türevleri genellikle sarı renkli toz veya kristaller şeklinde bulunur (MA: 302,236 g/mol). Kersetin lipofilik bir bileşiktir ve etanolde (4,0 mg/mL, 37°C) orta derecede, dimetil sülfoksitte (150 mg/mL, 25°C) ise yüksek oranda çözünür. Suda çözünürlüğü ise çok azdır (0,01 mg/mL, 25°C) (118).

Biyoyararlanım

Kersetin biyoyararlanımı farklı gıdalarda bulunan glikozitlerinin tipine bağlıdır. Aglikon formlarının %24'ü, mide-bağırsak yolu yoluyla emilirken kersetin glikozitlerinin hidrofilik özellikleri nedeniyle %52'si ince bağırsakta emilir. Kersetin glikozitlerin emilimindeki artışın deglikosilasyon ve/veya taşıyıcı aracılı taşınma yoluyla olduğu ileri sürülebilir (121). Deglikosilasyon sırasında, kersetin glikozitler, β -glukosidazların aktivitesi ile aglikon formuna dönüşür ve daha sonra aglikon formu, gastrointestinal sistemden emilir. Daha sonra kersetin ince bağırsak, karaciğer, böbrekler ve kolon gibi organlarda glukuronidasyon, sülfatlama veya metilasyona uğrayarak metabolize edilir (117), (118).

Toksik Etkileri

Kersetin insan vücudundaki serbest radikallerle reaksiyona girerek toksik özellikteki oksidasyon ürünleri oluşturabilir. Yani tiyoller ile yüksek derecede reaktif olan kersetin-kinin ve GSH ana reaktif olabilir. Kersetinin mutajenik/genotoksik etkisi hakkında çok sayıda çalışma vardır (118). 1970'lerden önce yapılan çalışmalarda kersetin standart testlerle genotoksik olarak kabul edilmiştir (120). Bununla birlikte, farklı türlerle yapılan birkaç uzun süreli *in vivo* çalışması bunun böyle olmadığını

göstermiştir. Nihai kararı IARC vermiş ve kersetinin, insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmadığı sonucuna varmıştır (122). Uzun süreli kersetin tüketiminin hematolojik ve idrar biyogöstergeleri üzerinde önemli bir yan etkisi yoktur ve kersetinin yüksek dozlarda bile (2000 mg/kg'a kadar) güvenli bir bileşik olduğu rapor edilmiştir (117), (120), (123).

Biyolojik Aktivite

Kersetin, antioksidan (124), antiobezite (117), antiviral (125), antiinflamatuvar (126) ve antikanserojen (127) etkiler ile birlikte bazı kardiyovasküler hastalıklar da (yani kalp hastalığı, hipertansiyon ve yüksek kan kolesterolünü hafifletme) dahil olmak üzere birçok sağlığa yararlı etki ile yaygın şekilde ilişkilendirilir (118).

Antioksidan Etki

Kersetin, *in vitro* ve *in vivo* koşullar altında güçlü doğal antioksidan ve reaktif oksijen ve azot türleri süpürücüsü olarak bilinir (128). Süperoksit ve hidroksil radikallerine, nitrik okside ve ayrıca perokside karşı güçlü bir temizleyici aktivitesi gösterir (129). Kersetin yapısındaki B halkasındaki serbest hidroksil gruplarında katekol kısmının varlığı ve C-halkasındaki 3-pozisyonu antioksidan ve serbest radikal temizleyici potansiyelden sorumludur. Kersetin doğrudan serbest radikalleri ve lipit peroksitleri söndürür ve dolaylı olarak enzimatik olmayan antioksidanların (örneğin azaltılmış GSH) oluşumunu artırır ve *in vivo* koşullarda antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırır. Ayrıca, ksantin oksidaz (XOD), lipoksijenaz (LOX) ve NADPH oksidaz gibi oksidatif enzimleri inhibe ederek antioksidanlar olarak etki ettiği ileri sürülmektedir (117), (130).

Kersetin, otokatalitik oksidasyon ile o-kinona dönüştürülür ve o-yarı kinon reaktif bir ara ürün olarak üretilir. Oksijen molekülleri bu radikal ile reaksiyona girerek O₂ ve H₂O₂ üretimi ile sonuçlanabilir. Bu ROB, hücrel redoks sinyal yollarını etkiler ve hücrel oksidatif hasarı indükleyebilir. Bu nedenle, kersetinin hem pro-oksidan hem de bir antioksidan olarak hareket etmesi mümkündür. Bu paradoksal fenomen kersetin ve diğer bazı flavonoidlerin hücrel oksidatif hasarı hızlandırmasının

ve/veya çeşitli *in vitro* çalışmalarda anti-mutajen yerine mutajen olarak hareket etmesinin nedenini açıklayabilir (130).

Kanser

Kersetin, doğal olarak meydana gelen bir kemopreventif ajanın prototipi olarak kabul edilebilir, çünkü biyolojik aktiviteleri (antioksidan, anti-inflamatuar, anti-proliferatif, proapoptotik ve anti-anjiyojenik), karsinogenezin başlatılmasından istila ve metastazlara kadar geçen tüm aşamalarını kapsar. Tümörlerin gelişimini ve korunmasını destekleyen farklı genetik, biyokimyasal ve immünolojik yönleriyle etki eder. Kersetin “kanser işareti” olarak tanımlanan farklı hedeflere müdahale edebilen çok hedefli bir inhibitör olarak görev yapabilir (120).

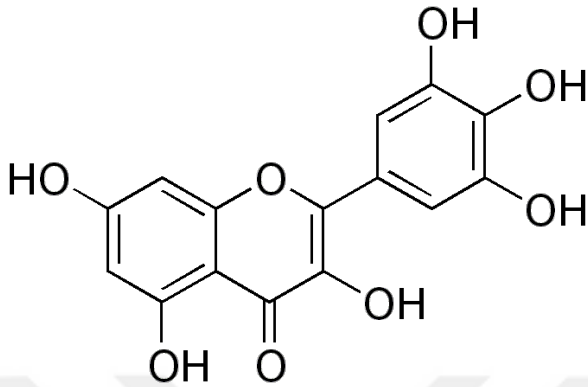
Büyüme faktörleri, hücre döngüsü, hücre büyümesi, hücre sağ kalımı ve enerji metabolizması boyunca ilerlemeyi düzenleyen sinyal yollarını etki ederek, farklı kökenlerden (prostat, servikal, akciğer, meme ve kolon) kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engeller (120).

G2/M geçişinde veya G1 fazında farklı hücre tiplerinde hücre döngüsü durmasına neden olur. Meme kanseri hücrelerine 24 saatlik bir aralıkta uygulanan nispeten düşük dozdaki kersetin (1-10 mM), günlük tüketim koşullarını taklit eder ve G0/G1 fazında hücre döngüsü durmasını tetikler (131). Kersetinin 25 mM dozda bir telomeraz inhibitörü olarak etkili ederek kolon adenokarsinom (CaCo-2) ve meme adenokarsinom (MCF-7) hücre hatlarını yaşlanmaya dolayısıyla apoptozise götürür (132). Ayrıca, kersetin HepG2 insan hepatoma hücrelerinde iki farklı mekanizma yoluyla apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (117), (130).

2.10 MİRİSETİN

Mirisetin (3,5,7-trihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-4-kromenon) (Şekil 2.7) meyvelerde, sebzelerde ve tıbbi bitkilerde bulunan yaygın bir flavonoiddir (133). Mirisetinin biosentezinde yer alan enzimler bitkilerde nispeten yaygın olarak bulunduğundan, bu flavonoidin bitkilerde yaygın şekilde dağılması şaşırtıcı değildir.

Soğan, sarımsak, brokoli ve taze fasülye gibi sebzelerde; kuş üzümü, yaban mersini, böğürtlen gibi dutsu meyvelerde ve siyah çayda bol miktarda bulunur. Ayrıca *Ginkgo biloba*, ısırgan otu, semiz otu gibi bitkilerde de olduğu tespit edilmiştir (134), (135).



Şekil 2.7 Mirisetinin Kimyasal Yapısı

Mirisetin doğada daha çok glikozitler şeklinde bulunur. Yapıları, C halkasını oluşturmak üzere sıklıkla siklize olan üç karbonlu bir zincirle birleştirilmiş iki aromatik halkadan (A ve B halkaları) oluşur. Mirisetin, ilave bir hidroksil grubu varlığı ile kersetinden farklıdır (60), (136).

Günlük ortalama mirisetin alımı diyetle ilgili olarak değişkenlik gösterir (137).

Mirisetin, suda çok az miktarda çözünür (MA: 318,2351 g/mol). Bileşik bazik sulu ortamda ve dimetilformamid, dimetilasetamid, tetrahidrofuran ve aseton gibi bazı organik çözücülerde yüksek oranda çözünür. Zayıf asidik (pKa 6,63) ve düşük pH'da (2,0) oldukça stabildir (60), (138).

Biyoyararlanım

Oral olarak tüketilen tüm maddeler gibi, mirisetinde karaciğer ve barsak duvarı boyunca ilk geçiş metabolizmasına maruz kalır. Diğer flavonoidler gibi, mirisetin de esas olarak ince bağırsakta emilir. İnce bağırsakta konjugasyon enzimleriyle metabolize edilebilir. Mirisetin kolon mikroflorası tarafından yoğun şekilde metabolize edilir. Emiliminden sonra, son olarak karaciğerde glukuronidasyon, sülfatlama veya metilasyona uğrayarak metabolize edilir.

Toksik Etkileri

Mirisetin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Bu çalışmaların çok azı, olumsuz etkiler konusunda endişeler uyandırmıştır (138). Mirisetin farelere intraperitoneal yoldan 1000 mg/kg/bw uygulanmış ve toksik etki ve ölüm görülmemiştir (139). Ayrıca zebra balığı larvalarında 100 mg/kg üzerindeki dozlarda herhangi bir toksisiteye neden olmamıştır (58).

Biyolojik Aktivite

Mirisetin temel olarak demir şelatörü, antioksidan, antiinflamatuar, antiviral, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri ile bilinmektedir (140). Çeşitli çalışmalar, mirisetinin DNA polimerazlarına, RNA polimerazlarına, ters transkriptazlara, telomerazlara, kinazlara ve helisazlara karşı etkinlik gösterdiğini ispatlamıştır (138).

Antioksidan Etki

Mirisetin, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan sistemler yoluyla antioksidan etki gösterir. H₂O₂ ile indüklenen hücre hasarını SOD, CAT ve GPx gibi hücresel antioksidan savunma enzimlerinin aktive ederek, membran lipid peroksidasyonu ile TBARS oluşumunu inhibe ederek ROB oluşumunu azalttığı saptanmıştır (141). Mirisetinin kateterik B halkasında ilave bir hidroksil grubu içermesi ayrıca yapısındaki çift bağlar sayesinde demir şelasyonu ile enzim inhibisyonu ve antioksidan maddeler olarak etkili görev yapmasını sağlar (142).

Mirisetin antioksidan olduğu kadar pro-oksidan özellik de gösterebilen bir moleküldür. Yüksek dozlarda mirisetin moleküler oksijeni ROB'a ve Fe (III)'ü Fe (II)'ye indirger. Bu indirgenme sonucu oluşan Fe (II)'nin oto-oksidasyon sonucu oksijenden süperoksit (O₂) radikali oluşturduğu tespit edilmiştir (143).

Kanser

Mirisetin antikanser aktiviteleri üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar, bileşiğin karaciğer, cilt, pankreas ve kolon kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok insan kanser hücre hattında sitotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca,

kanserin başlatılması ve ilerlemesinde rol oynayan kilit enzimleri de inhibe ettiği saptanmıştır (138).

Hepatoselüler karsinomda, mirisetin HepG2 hücrelerinde bir hücre döngüsü inhibe edici mekanizmayı düzenlediği bulunmuştur. Mirisetinin, HepG2 hücrelerinde G2/M hücre döngüsü fazını iki farklı mekanizma ile durdurduğu ispatlanmıştır (144). Mirisetinin, MEK, JAK1, Akt ve MKK4 kinaz aktivitesinin kısıtlanması yoluyla tümör promotörünün neden olduğu neoplastik hücre dönüşümünü kuvvetle inhibe ederek cilt kanserine karşı koruma sağladığı bulunmuştur (145). Mesane kanseri T24 hücrelerinin yaşama kabiliyeti ve çoğalması, mirisetine maruz kaldıktan sonra azalmıştır. Ayrıca, apoptozu indüklemiştir ve G2/M'de siklin B1 ve sikline bağımlı kinaz (cdc2)'i düşürerek hücre döngüsünü durdurmuştur (146).

Çalışmalar mirisetinin vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile uyarılmış insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde (HUVEC'ler) anjiyogenez sürecini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Böylece anjiyogenez yani tümör gelişiminde yeni kan damarlarının oluşması engellenmiştir (58).

Mirisetinin birçok kanser hücresi tipinde apoptotik hücre ölümü tarzını arttırdığı gösterilmiştir (60). Hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde, mirisetin, nükleer fragmanlar ve yoğunlaştırılmış kromatin oluşturarak apoptozu önemli ölçüde indüklemiştir (144). Ayrıca ROB seviyesini artırarak apoptotik hücre ölümü modunu teşvik ettiği bulunmuştur (147).

2.11 DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Genomik bütünlüğün korunması, hücre için büyük önem taşır. Yüksek reaktiviteye sahip oksidan moleküller, radyasyon veya kimyasal mutajenler DNA'da tek ve çift iplik kırıkları, baz modifikasyonları, abazik alanlar, şeker hasarı veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak DNA hasarının artışına neden olur. DNA hasarı etkili bir şekilde tanınmalı ve onarılmalıdır (148). Onarılmamış DNA veya yanlış DNA hasarının onarımı, hücre ölümüne veya uzun ömürlü çok hücreli organizmalarda, tümörijenik potansiyeli olan hücrelerin oluşmasına neden olabilir (80), (149). DNA hasarının değerlendirilmesinde, kardeş kromatit değişim testi

(KKDT), Floresanlı Yerde Hibritleşme (FISH), Comet ve Sitokinezde Durdurulmuş Mikroçekirdek tekniği gibi çeşitli yöntemler kullanılır. Comet yöntemi DNA hasarını tespit eden hızlı ve güvenilir ve ucuz bir test yöntemidir. Ayrıca son yıllarda giderek daha popüler hale gelmiştir (150).

2.11.1 Tek Hüce Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi

Comet olarak da ifade edilen tek hücreli jel elektroforez, hücre seviyesinde DNA hasarı tespit etmek için yaygın kullanılan hızlı, hassas ve basit bir yöntemdir. Comet Yöntemi ilk olarak 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından bulunduğu kabul edilmektedir. Aslında Ryberg ve Johanson 1978 yılında alkali koşullar altında ($\text{pH} \geq 12$) agaroz gömülü tek hücrelerde iplik kopmalarının tespiti için sunmuştur (151). Singh ve arkadaşları 1988 yılında Comet yönteminin alkali versiyonunu geliştirmişler ve hasarın derecesini ölçmek için DNA kuyruk uzunluğunu kullanmışlardır. Günümüzde ise hasarın derecesini otomatik olarak tanıyan yazılımlar kullanılarak uygulanan bu yöntem *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarda yaygın olarak kullanılan ve Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) kılavuzlarına girmiş bir genotoksisite testidir (148), (152), (153).

Comet yöntemi, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda ve alkali pH'da farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. İlk olarak, hücreler bir mikroskop lamı üzerinde agaroz içine gömülür. Agarozda, hücreler ve nükleer zarlar parçalanır ve DNA, alkali elektroforeze tabi tutulur. Hasar seviyesine göre göç eden DNA, spesifik floresan boya ile boyandıktan sonra floresan mikroskobu kullanılarak görselleştirilir ve hücrelerdeki DNA hasarı değerlendirilir (150).

Comet Testinin avantajları: çalışılacak numune başına az sayıda hücreye (<10.000) ihtiyaç duyulması, daha sağlam istatistiksel analizlere olanak sağlayan bireysel hücre düzeyinde veri toplanması, DNA hasarı tespitinde hassasiyet, düşük maliyet, uygulama kolaylığı, deneylerin kısa sürede tamamlanması ve ekogenotoksikolojik gibi çalışmalar dahil olmak üzere, hem *in vitro* hem de *in vivo* ökaryot tek hücre popülasyonunun kullanılması olarak sıralanabilir (148), (153). Bu

avantajlar Comet yönteminin DNA hasarının tanınmasında kullanılan genotoksisite testleri arasında kullanılan popüler bir yöntem olmasını sağlar.



3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

AnnexinV-PI kit	BioLegend
Antioksidan kiti	Cayman Chemical
CEM/C2 (Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Hattı)	ATCC
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Sigma
Etidiyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol (Etanol)	Sigma-Aldrich
Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum (Na ₂ EDTA)	Sigma
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biological Industries
Fosfat Tamponlu Serum (PBS) Fizyolojik Tableti	Sigma
Glutasyon (GSH) kiti	Cayman Chemical
Glutasyon Peroksidaz (GPx) kiti	Cayman Chemical
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) (%35)	Merck
Kamferol	Santa Cruz Biotechnology
Katalaz (CAT) kiti	Cayman Chemical
Kersetin	Sigma-Aldrich

L-Glutamin	Sigma
Mirisetin	Santa Cruz Biotechnology
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
Penisilin/Streptomisin	PAA The Cell Culture Company
RPMI-1640	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
TBARS Deney kiti	Cayman Chemical
Tripan Mavisi	Sigma
Tris	Sigma
Triton X-100	Sigma
WST-1 kiti	Roche

3.2 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

İnkübatör (CO ₂ 'li)	Sanyo
Biyogüvenlik kabini	Bilser
Su Banyosu	GFL
Vorteks	Velp
Hassas Terazı	Mettler Toledo

Buzdolabı	Bosch
İnvert Mikroskop	Leica
Ultra saf su cihazı	Veolia
Işık ve Faz Kontrast Mikroskobu	Leica, DFC280
Dijital Kamera	Leica DC490
Santrifüj	Centra MP4R
Flow Sitometri	Beckman Dickinson
Elektroforez Sistemi	Invitrogen
Güç Kaynağı	Invitrogen
Buz kırma makinası	Scotsman AF100
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Mikro Santrifüj	eraeus, Hettich,
Elisa Okuyucu	BioTek
Mikropipet (10-100µL, 100-1000µL, 1-5mL)	Eppendorf, Boeco
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Pipet (5-10-25 mL)	Costar
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²)	Biofil
Falcon tüpü (15, 50 mL)	İsolab

Eppendorf tüp	Labosel
96 kuyucuklu plak	Falkon
6 kuyucuklu plak	Falkon
Lam/Lamel	Isolab

Pipet ucu (0,5-10, 10-200 µL, 100-1000 µL)Eppendorf

3.3 KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Kamferol Çözeltisi

Kamferol DMSO ve besiyeri içinde çözülerek 10 mM'lık bir stok hazırlandı. Bu stok 0,22 mikronluk filtreden geçirildi. Daha sonra 10 mM'lık stoktan besiyeri ile 1 mM'lık ikinci bir stok hazırlandı. 1 mM'lık ikinci stoktan besiyeri ile dilüe edilerek kamferol konsantrasyonları (%0,1 DMSO içeren) oluşturuldu. Çözeltiler uygulamadan önce taze hazırlandı.

Kersetin Çözeltisi

Kersetin DMSO ve besiyeri içinde çözülerek 10 mM'lık bir stok hazırlandı. Bu stok 0,22 mikronluk filtreden geçirildi. Daha sonra 10 mM'lık stoktan besiyeri ile 1 mM'lık ikinci bir stok hazırlandı. 1 mM'lık ikinci stoktan besiyeri ile dilüe edilerek kersetin konsantrasyonları (%0,1 DMSO içeren) oluşturuldu. Çözeltiler uygulamadan önce taze hazırlandı.

Mirisetin Çözeltisi

Mirisetin DMSO ve besiyeri içinde çözülerek 10 mM'lık bir stok hazırlandı. Bu stok 0,22 mikronluk filtreden geçirildi. Daha sonra 10 mM'lık stoktan besiyeri ile 1 mM'lık ikinci bir stok hazırlandı. 1 mM'lık ikinci stoktan besiyeri ile dilüe edilerek mirisetin konsantrasyonları (%0,1 DMSO içeren) oluşturuldu. Çözeltiler uygulamadan önce taze hazırlandı.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi

125 mg LMPA 25 mL PBS içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C’de saklandı.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi

500 mg NMPA 50 mL PBS içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak tamamen berrak oluncaya kadar karıştırılarak çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C’de saklandı.

Elektroforez Tampon Çözeltisi

52,8 mL 10 N NaOH ve 8,8 mL 200 mM EDTA çözeltisi 1705 mL soğuk distile su ile karıştırılarak deney günü taze olarak hazırlandı.

Etanol Çözeltisi (%50)

150,3 mL %99,8’lik etanol çözeltisinden alındı. Distile suyla 300 mL’ye tamamlandı.

Etanol Çözeltisi (%75)

225,5 mL %99,8’lik etanol çözeltisinden alındı. Distile suyla 300 mL’ye tamamlandı.

Etidyum Bromür (EtBr) Çözeltisi

10 mg EtBr 50 mL distile suda çözüldü ve 200 µg/mL’lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Boyama sırasında 1 mL stok çözelti alınıp, distile suyla 10 mL’ye tamamlanarak 20 µg/mL’lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 mL distile suda çözüldü ve 4°C’de saklandı.

Stok Lizis Çözeltisi

146,1g NaCl, 37,2g Na₂EDTA ve 1,2 g Tris 500 mL distile suda çözüldü. 10g NaOH eklenip çözelti pH'sı 10'a ayarlandı. 10g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi ve distile su ile son hacmi 890 mL'ye tamamlandı maddeler çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Lizis Çözeltisi

178 mL stok lizis çözeltisi, 20 mL DMSO 2 mL ve Triton X-100 karıştırıldı. Çözelti deney zamanı hazırlandı. 4°C'de bekletildi ve deney sırasında soğuk çözelti şeklinde kullanıldı.

0,1 M H₂O₂ Çözeltisi

9,7 µL %35'lik H₂O₂ çözeltisinden alındı. 4°C'de 990,3 µL distile su ile 1 mL'ye tamamlandı.

1 mM H₂O₂ Çözeltisi

Deney zamanı 20 µL 0,1 M H₂O₂ çözeltisinden alındı. 4°C'de 1980 µL PBS ilave edilerek 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

50 µM H₂O₂ Çözeltisi

50 µL H₂O₂ (1 mM) çözeltisi üzerine 950 µL 4°C'deki PBS çözeltisi ilave edildi.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48,5 mg Tris 750 mL distile suda çözüldü. Çözelti pH'sı 7,5'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 750 mL'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

3.4 YÖNTEMLER

3.4.1 Çalışma Grupları

Tez çalışması kapsamında, CEM/C2 hücre hattında Çizelge 3.1’de gösterilen çalışma grupları oluşturuldu.

Çizelge 3.1 Çalışma Grupları

Grup	Doz				
Kersetin	1000 µM	500 µM	250 µM	125 µM	62,5 µM
	31,25 µM	15,63 µM	7,81 µM	3,90 µM	1,95 µM
Mirisetin	1000 µM	500 µM	250 µM	125 µM	62,5 µM
	31,25 µM	15,63 µM	7,81 µM	3,90 µM	1,95 µM
Kamferol	1000 µM	500 µM	250 µM	125 µM	62,5 µM
	31,25 µM	15,63 µM	7,81 µM	3,90 µM	1,95 µM
Negatif Kontrol	Herhangi bir maddeye maruz bırakılmamış hücre hattı				
Pozitif Kontrol	*Siklofosamid, ** H ₂ O ₂				

* Comet yönteminde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır

** Akım sitometrisi yönteminde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır

3.4.2 Hücre Kültürü

Hücrelerin çoğaltılması ve WST1 testi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kök Hücre Laboratuvarı’nda yapılmıştır.

Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC, Manassas, VA, ABD) firmasından, donmuş hücre hattı olarak satın alınmış olan ve sıvı azot tankında saklanan CEM/C2 hücreleri, çalışma öncesinde 37°C’ye getirilen su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek çözümleri sağlandı. Çözülen hücreler 15 mL’lik falkona alındı ve üzerine 10 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı, kalan hücre pelleti üzerine taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Bu işlem iki defa yapılarak saklama ortamında kullanılan DMSO uzaklaştırıldı. İkinci santrifüj işleminden sonra hücre pelleti 15 mL’lik taze besiyeri eklenerek homojenize edildi ve 75cm²’lik flasklara aktarıldı. Besiyeri olarak %10 fetal bovine serumu (%10 FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren RPMI-1640 kullanıldı. Kültür ortamındaki

hücreler %5 karbondioksit (CO₂) ve %95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edildi. Hücreler deneyler için yeterli sayıya ulaşmaya kadar besiyeri, kontaminasyon ve doygunluk durumu kontrol edilerek pasajlandı. Çalışmalarda meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak saklandı.

Kültür edilen hücrelerin canlılıkları ve sayıları tripan mavisi boyası testi ile takip edilmiştir. Hücreler PBS içinde hazırlanmış %0,4 tripan mavisi ile 9:1 (v/v) oranında karıştırıldı. Hücreler ışık mikroskobu altında Neubauer lamında bulunan 4x4'lük karelerden oluşmuş 4 alan içerisinde sayıldı.

Canlı hücre sayısı aşağıdaki formül ile gerçekleştirildi.

A : Yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım ortalaması)

B : Seyreltme faktörü = 10/1 (Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi karışımı)

Canlı Hücre Sayısı (hücre/mL) = A x B x 10⁴

Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu besiyeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.

3.4.3 WST1 Yöntemi ile Sitotoksite Analizi

Yöntemin Esası

Bu yöntemin temel prensibi proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkli WST1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum]-1,3-benzen disülfofenil) tetrazolyum tuzunun koyu kırmızı renkli, suda çözünmeyen formazan kompleksine dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Böylece renk değişimi multiplak okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülebilir.

Yöntemin Uygulanışı

Tüm işlemler steril şartlarda ve hava akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Laminar kabinin ultraviyole ışığı çalışmadan önce ve sonra 30 dakika açık bırakılmıştır. Çalışma ortamı ve gereçler kullanım öncesi ve sonrası %70'lik etanol ile sterilize edilmiştir.

Uygun besiyeri ve inkübatörde çoğaltılan ve sayılan hücreler, çoklu pipet ile 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 100 µL besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra kamferol, kersetin ve mirisetinin 1,95-1000 µM aralıklarındaki konsantrasyonlardaki çözeltileri 48 saat süreyle hücrelere uygulandı.

Zaman bağımlı inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 10 µL WST1 solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda multiplak okuyuculu spektrofotometrede örneklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Aşağıdaki formüle göre her bir grubun hücre canlılık oranı (%) hesaplandı. Böylece kültürdeki hücrelerin %50'sini (IC₅₀) ve %30'unu (IC₃₀) öldüren inhibitör konsantrasyonu kamferol, kersetin ve mirisetin uygulanmış hücrelerde ayrı ayrı belirlendi.

$$\text{Hücre canlılık oranı} : (A_{\text{test}} - A_{\text{kör}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}})$$

$$\% \text{Hücre canlılık oranı} : (A_{\text{test}} - A_{\text{kör}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}) \times 100$$

$A_{\text{örnek}}$: Test grubunun absorbansı

A_{kontrol} : Kontrol grubunun absorbansı

$A_{\text{kör}}$: Kör grubunun absorbansı

3.4.4 Comet Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

Comet yöntemiyle genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Örnekler laboratuvara soğuk zincirle taşındı.

Yöntemin Esası

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Agaroz jel içinde mikroskop lamına yayılan hücrelere, hücre membranını parçalayan lizis işlemi uygulanır. Bir elektrik alanına maruz kaldığında (elektroforez) DNA sarmalı gevşer ve serbest kalan DNA kırıklarının anoda doğru hareket ederek kuyruklu yıldız görünümünün (Comet) oluşmasına neden olur. Böylece elektroforez sonrası DNA'ya özgü floresan bir boya kullanılarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapılır.

Yöntemin Uygulanışı

Bu yöntem için kullanılacak hücrelerin çoğaltılması işlemi "Hücre Kültürü" başlığı altında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Neubauer sayım lamında yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu seyreltildi ve her bir kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı. Kuyucuklara ekilen hücreler 37°C 'de, CO_2 inkübatöründe bir gün süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kamferol, kersetin ve mirisetin maddelerinin WST1 sitotoksitesite yönteminde %30 canlılık gösteren konsantrasyonları 48 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alındı. 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve dipte yaklaşık 50 μL besiyeri kalacak şekilde süpernatant dikkatlice aspire edildi.

Pozitif kontrol dozlaması için hücre besiyerleri aspire edildi. Son konsantrasyon 50 μM olacak şekilde H_2O_2 ile muamele edildi. Bunun için kuyucuklara 950 μL PBS ve 50 μL H_2O_2 (1mM) ilave edildi. -20°C 'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pozitif kontrol grupları da diğer gruplar gibi aynı işlemlerden geçirilerek steril ependorflara aktarıldı.

LMPA (%0,5'lik) 37°C 'de eritildi ve 50 μL hücre süspansiyonu ile karıştırıldı. Daha sonra, önceden NMPA (%1'lik) çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerlerine lamel kapatıldı.

Agarın katılaşması için lamalar buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda lam üzerindeki lamel zedelenmeden alındı. Lamlar soğuk lizis çözeltisine daldırıldı ve 1 saat buzdolabında bekletildi. Normal doz grupları ve H₂O₂ uygulanan gruplar ayrı ayrı şalelerde en az 1 saat lizise bırakıldı. Lizis işleminin ardından elektroforez tankının içinden çıkarılan tepsiye yerleştirildi. Lamlar elektroforez tankında aralık kalmayacak, agar yayılan kısımları üste gelecek ve hepsi aynı yöne bakacak şekilde yerleştirilmesine dikkat edildi. Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu. Elektroforez tankının içerisinde lamlar akım uygulamadan 20 dakika, hemen ardından 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika bekletildi. Bu işlemten sonra lamlar tanktan çıkarılıp 5 dakika distile suda, daha sonra 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi. Süre sonunda lamlar sırasıyla 5'er dakika %50'lik, %75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde bekletildi. Okuma zamanına kadar lam kutusunda saklandı.

Okuma sırasında lamaların üzerine 50 mL EtBr çözeltisi (20 µg/mL) ilave edildi ve lamel ile kapatıldı. Floresan mikroskopunda Comet Analysis Software, version 4.0 bilgisayar programı yardımıyla her lamda 100 hücrede DNA hasar derecesi kuyruk yoğunluğu olarak değerlendirildi. Ek bir DNA hasarını önlemek için işlemler karanlıkta yapıldı.

3.4.5 Akım Sitometresi ile Apoptoz Ölçümü

Apoptoz ölçümü BD Accuri™ C6 Plus akım sitometre (Beckman Dickinson, ABD) cihazı ile Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uluslararası Proje Koordinasyon Yürütme Birimi, Arge Merkez Başkanlığı Laboratuvarın'da gerçekleştirildi. Apoptotik hücre ölümü üreticinin protokolüne göre propidium iyodürlü (PI) (Biolegend, San Diego, CA) Annexin V-FITC Apoptoz Saptama Kiti kullanılarak tespit edildi.

Yöntemin Esası

Annexin V, kalsiyum bağımlı bir şekilde fosfatidilserin (PS) bağlayan hücre içi proteinlerin annexin ailesinin bir üyesidir. PS normalde sadece sağlıklı hücrelerde plazma zarının hücre içi broşüründe bulunur, ancak erken apoptoz sırasında, zar asimetrisi kaybolur ve PS dış broşürün içine geçer. Florokrom etiketli

Annexin V daha sonra apoptotik hücreleri spesifik olarak hedeflemek ve tanımlamak için kullanılabilir. Sadece Annexin V, bağlaması apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayırım yapamaz. Nekrotik ve apoptotik hücreler arasında ayırım yapmak için Propidyum Iyodür Solüsyonu (PI) kullanılmalıdır. Erken apoptotik hücreler PI'yi dışlayacak, geç evre apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler pozitif olarak lekelenektir (154).

Yöntemin Uygulanışı

Bu yöntem için kullanılacak hücrelerin çoğaltılması işlemi “Hücre Kültürü” başlığı altında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Neubauer sayım lamında yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu seyreltildi ve her bir kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı. Kuyucuklara ekilen hücreler 37°C 'de, CO_2 inkübatöründe bir gün süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kamferol, kersetin ve mirisetin maddelerinin WST1 sitotoksiste yönteminde %30 canlılık gösteren konsantrasyonları 48 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 15 mL'lik falkon tüpelere alındı. 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan hücre pelletine 500 μL PBS eklendi ve nazikçe vortekslendi. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılarak yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem iki defa gerçekleştirildi. Hücreler soğuk BioLegend Hücre Boyama Tamponu ile iki kez yıkandı ve daha sonra $1,0 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonunda Annexin V bağlama tamponu içinde süspand edildi. 5 mL'lik bir test tüpüne 100 μL hücre süspansiyonu aktarıldı. 5 μL FITC Annexin V ve 10 μL PI solüsyonu sırayla eklendi. Hücreler nazikçe vortekslendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 400 μL Annexin V bağlama tamponu eklendi. Akım sitometrisinde Annexin-V için FL1 kanalı ve PI için FL3 kanalında okuma gerçekleştirildi. Analizler akım sitometri cihazında kadran istatistiği yapılarak (%) apoptoz olarak değerlendirildi.

3.4.6 Protein Miktarının Belirlenmesi

Bu yöntem için kullanılacak hücrelerin çoğaltılması işlemi “Hücre Kültürü” başlığı altında anlatıldığı gibi yapılmıştır. 75cm^2 'lik flaslara ekim yapıldı. Konfluent hale gelmiş flaslara kamferol, kersetin ve mirisetin maddelerinin WST1 sitotoksiste

yönteminde %30 canlılık gösteren konsantrasyonları 48 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 15 mL'lik falkon tüpelere alındı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan hücre pelletine 500 µL PBS eklendi ve nazikçe vortekslendi. Her bir flastktan elde edilen hücre pelleti 1 mL besiyerinde süspansiyon olarak eppendorf tüplere aktarıldı. Pelletler lizis tampon çözeltisi eklendi ve akabinde hücre süspansiyonları iki gruba ayrıldı. İlk grup 3500 devir/dakika hızda 15 dakika, ikinci grup 13000 devir/dakika hızda 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar toplanarak analiz süresine kadar -80°C'de saklandı. 3500 devir/dakika santrifüjlenen hücre lizatları ile protein ile CAT ve GPx enzim aktiviteleri belirlendi. 13000 devir/dakika santrifüjlenen hücre lizatları ile de protein, GSH, MDA ve total antioksidan düzeyleri belirlendi.

Yöntemin Esası

Bişinkoninik asit (BCA) deneyinin esası, alkali koşullar altında Cu^{+2} -protein kompleksinin oluşumuna, hemen ardından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgenme miktarı mevcut protein ile orantılıdır. BCA, alkali ortamlarda Cu^{+1} ile mavi-mor renkli kompleks oluşturur ve 562 nm'de güçlü bir absorbans sergiler. Böylece proteinler ile alkali Cu^{+2} indirgenmesi spektrofotometrik olarak ölçülebilir.

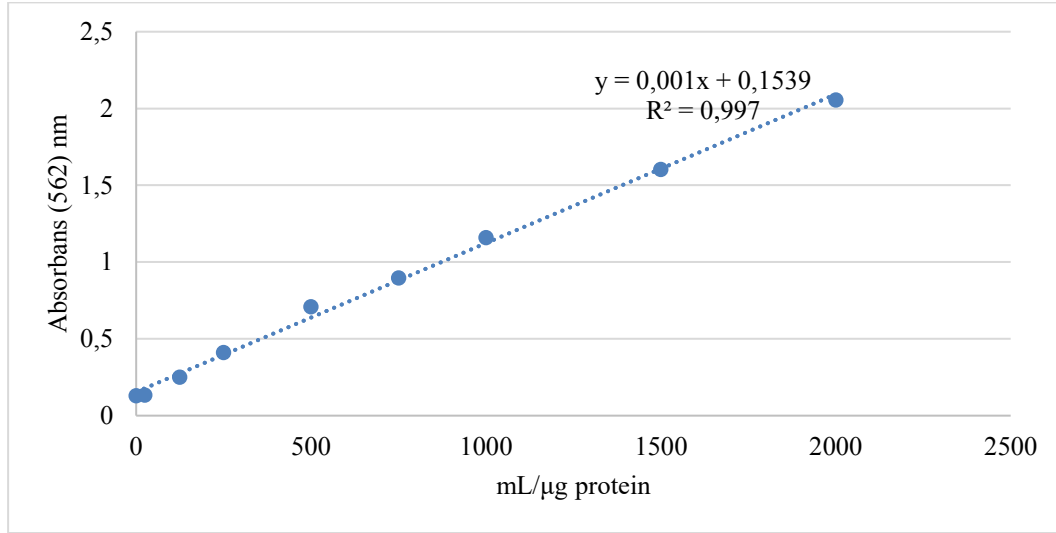
Yöntemin Uygulanışı

Boster Kit; BCA reaktifi A, BCA reaktifi B ve standart içermektedir. Bu çözelti kit talimatlarına göre hazırlandı.

BCA Reaktifi A ve BCA Reaktifi B 50:1'de karıştırıldı. 25 µL standart ve hücre lizatları kuyucuklara eklendi. Her bir kuyucuğa 200 µL BCA çalışma reaktifi eklendi ve iyice karıştırıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Plaka oda sıcaklığına soğutuldu. 10 dakika içinde 562 nm'de absorbansı ölçüldü.

Protein Miktarının Hesaplanması

Deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve protein standartlarının konsantrasyonları ile standart eğrisi (Şekil 3.1) oluşturulmuştur. Protein miktarları hesaplanmış ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Protein Standart Eğrisi

3.4.7 Katalaz Aktivitesinin (CAT) Ölçümü

Yöntemin Esası

Hücrelerdeki CAT enzim aktivitesi, CAT'ın peroksidatik fonksiyonunu kullanılarak tayin edilmiştir. Yöntem, H₂O₂'de optimum konsantrasyon varlığında CAT'ın metanol ile reaksiyonuna girmesi sonucunda oluşan formaldehitin, kromojen (4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol; purpald) ile mor tonlarında renkli bir bileşik oluşturması ve bu renk şiddetinin kolorimetrik olarak 540 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. 1 ünite enzim 25°C'de, 1 dakikada 1 nmol formaldehit oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Yöntemin Uygulanışı

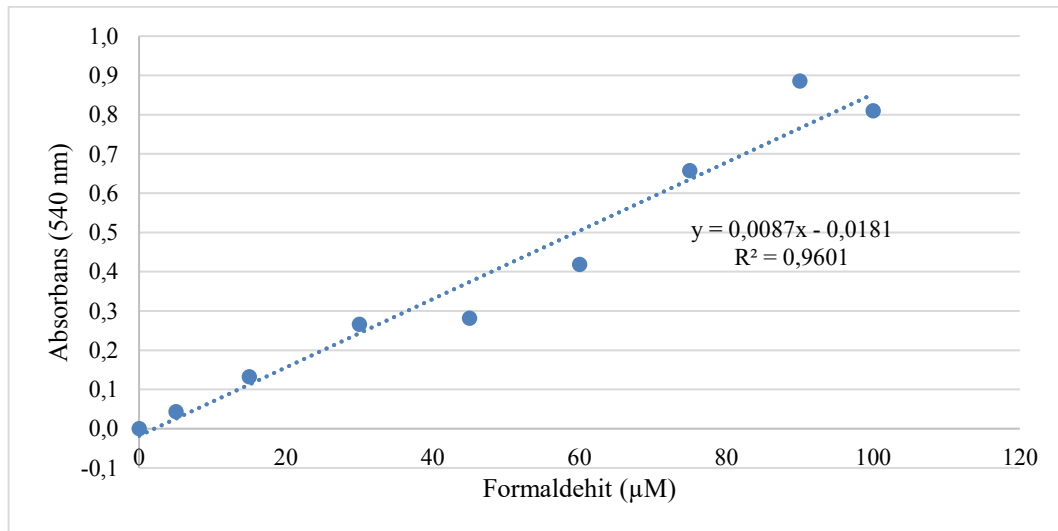
Cayman Chemical Kit; test tamponu, metanol, formaldehit standartları, assay buffer, katalaz, potasyum hidroksit, hidrojen peroksit, purpald ve potasyum periyodat içermektedir. Bu çözeltiler kit talimatlarına göre hazırlanmıştır.

Plak üzerinde belirtilen kuyucuklara kuyucuk başına 100 µL seyreltilmiş test tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL formaldehit standartları eklendi. Pozitif kontrol olarak iki kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş assay buffer, 30 µL metanol ve 20 µL seyreltilmiş CAT (Kontrol) eklendi. Örneklerin olduğu kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş test tamponu, 30 µL metanol ve 20 µL CEM/C2 hücre lizatları eklendi. Tüm kuyucuklara 20 µL seyreltilmiş H₂O₂ hızlı bir şekilde eklenerek reaksiyonları başlatıldı.

Plak oda sıcaklığında 20 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. Reaksiyonu sona erdirmek için her bir kuyucuğa 30 µL potasyum hidroksit eklendi ve daha sonra her bir kuyucuğa 30 µL katalaz purpald (Kromojen) eklendi. Plak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µL CAT potasyum periyodu eklendi. Plak çalkalayıcıda oda sıcaklığında beş dakika inkübe edildi. Plaktaki kuyucukların absorbansı ELISA okuyucu kullanılarak 540 nm'de ölçüldü.

Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması

Deney sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve formaldehit standartlarının konsantrasyonları ile oluşturulan standart eğriden (Şekil 3.2) formaldehit konsantrasyonları (µM) hesaplanmıştır.



Şekil 3.2 Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümüne Ait Kalibrasyon Grafiği

Katalaz aktivitesi hesaplanırken formaldehit konsantrasyonu, tepkimenin izlenme süresi ve dilüsyon faktörü kullanılmış; protein değerleri kullanılarak spesifik aktivite belirlenmiştir.

$$\text{CAT Aktivitesi (nmol/dk/mL)} = \text{Formaldehit (M)} / 20 \text{ dk} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (nmol/mg protein)} = \text{Aktivite (nmol/dk/ml)} / \text{mg protein.mL}^{-1}$$

3.4.8 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü

Yöntemin Esası:

Yöntem, GPx aktivitesini dolaylı olarak GR ile birleşmiş bir reaksiyonla ölçme esasına dayanır. GPx ile H₂O₂'nin azaltılması üzerine üretilen GSSG, GR ve NADPH ile azaltılmış durumuna geri dönüştürülür: NADPH'nin NADP⁺'ya oksidasyonuna 340 nm'de absorbanstaki azalma oranı numunedeki GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Yöntemin Uygulanışı

Cayman Chemical Kit; deney tamponu, glutasyon peroksidaz, Ko-substrat karışımı ve kümen hidroperoksit içermektedir. Bu çözeltiler kit talimatlarına göre hazırlandı.

Enzimatik olmayan üç kuyucuğa 120 µL test tamponu, 50 µL ko-substrat karışımı ve 50 µL NADPH eklendi. Pozitif kontrol üç kuyucuğa 50 µL test tamponu, 50 µL ko-substrat karışımı, 50 µL NADPH ve 20 µL dilüe edilmiş GPx (kontrol) eklendi. Numune kuyucuklarına 50 µL test tamponu, 50 µL ko-substrat karışımı, 50 µL NADPH ve 20 µL örnek eklendi. Kullanılan tüm kuyucuklara 20 µL kümen hidrojen peroksit eklenerek reaksiyon başlatıldı. Plaka birkaç saniye dikkatlice karıştırıldı. 340 nm'de her dakikada ölçüm yapılarak 5 dakika boyunca absorbanstaki azalma ölçüldü.

Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Hesaplanması

Dakika başına absorbans değışiklikleri (ΔA_{340}) hesaplanarak, absorbans değeri zamanın bir fonksiyonu olacak şekilde grafik oluşturulmuştur. Enzimatik olmayan örneklerin dakika başına absorbans değeri ile örneklerin absorbans değeri arasındaki fark bulunmuştur. Aşağıdaki formül kullanılarak GPx aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \Delta A_{340} (\text{ilk okuma}) - \Delta A_{340} (\text{ikinci okuma})$$

$$\text{GPx aktivitesi (nmol/min/mL)} = [(\Delta A_{340}/\text{min})/0,00373 \mu\text{M}^{-1}] \times (0,19 \text{ mL}/0,02 \text{ mL}) \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

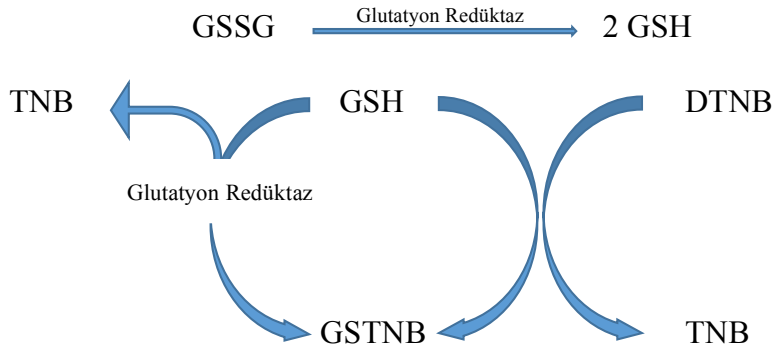
$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (nmol/min/mg protein)} = \text{GPx aktivitesi/protein (mg/mL)}$$

3.4.9 Glutasyon (GSH) Düzeyinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Yöntemin esası, 5,5'-ditiyo-bis-2-(nitrobenzoik asit) (DTNB)'nin GR ile katalizlenen bir reaksiyonla, sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'e dönüşmesinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Glutasyonun sülfidril grubu DTNB ile reaksiyona girer ve sarı renkli bir TNB üretir. Birlikte üretilen disülfür GSTNB (GSH ile TNB arasında), GSH'nin geri dönüşümü ve daha fazla TNB üretmek için GR ile azaltılır (Şekil 3.3). TNB üretim hızı, doğrudan numune içindeki GSH konsantrasyonu ile orantılı olan bu geri dönüşüm reaksiyonuyla doğru orantılıdır. TNB'nin 405-414 nm'de emiliminin ölçülmesi, numunede GSH düzeyinin belirlenmesini sağlar.



Şekil 3.3 Glutatyon (GSH) Döngüsü

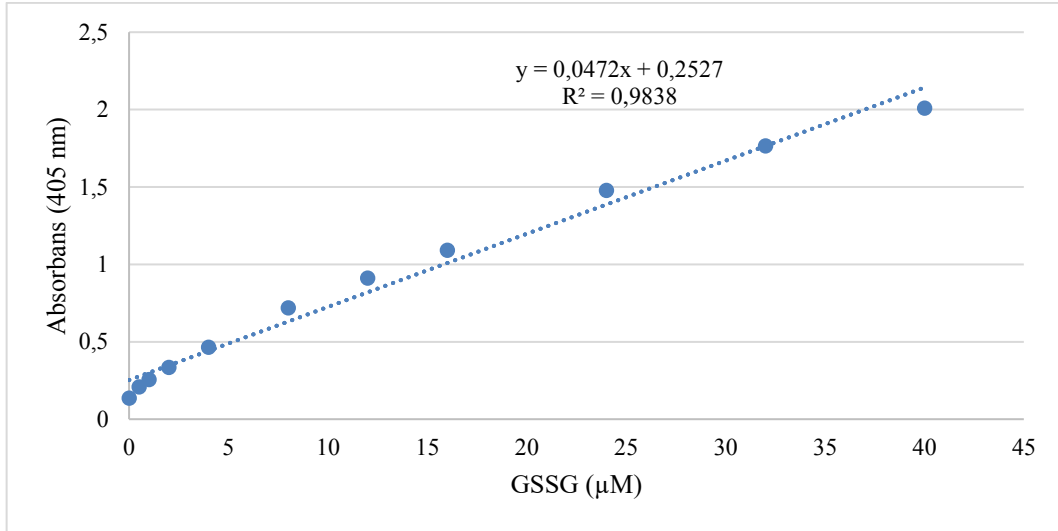
Yöntemin Uygulanışı

Cayman Chemical Kit; MES tampon, GSSG Standardı, GSH Ko-Faktör karışımı, GSH enzim karışımı içermektedir. Bu çözeltiler kit talimatlarına göre hazırlandı.

Plaktaki kuyucuklara oyuk başına 50 µL GSSG standart (tüp A-H) eklendi. Numune kuyucuklarının her birine 50 µL numune eklendi. Plaktaki standartların ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa çok kanallı bir pipet kullanarak 150 µL taze hazırlanmış tahlil kokteyli eklendi. Plak karanlıkta çalkalayıcıda 25 dakika inkübe edildi. Tahlil kokteyli, 20 ml'lik vialde, MES tamponu (11,25 mL), ko-faktör karışımı (0,45 mL), enzim karışımı (2,1 mL), distile su (2,3 mL) ve DTNB (0,45 mL) karıştırılarak hazırlandı. Örneklerin absorbans değerleri kinetik metodla ölçüldü. Bu yöntemle göre plak 410 nm'de beş dakika aralıklarla 30 dakika boyunca okundu.

Glutatyon (GSH) Düzeyinin Hesaplanması

Okside glutatasyon (GSSG) standartlarının konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri ile oluşturulan standart eğrisinden (Şekil 3.4) örneklerdeki toplam GSH konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verildi.

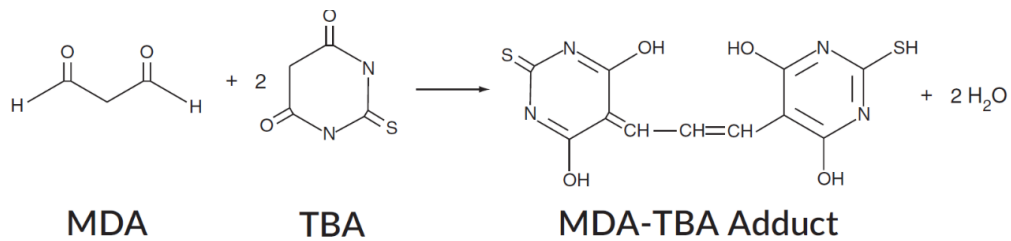


Şekil 3.4 Okside Glutatyon (GSSG) Standart Eğrisi

3.4.10 Lipit Peroksidasyonun Ölçümü

Yöntemin Esası

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonunun doğal bir ürünüdür. Yöntem MDA ve tiyobarbitürik asidin (TBA) yüksek sıcaklıkta (90-100°C) ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA kompleksinin verdiği renk şiddetinin 530 nm'de kolorimetrik olarak ölçülme esasına dayanır (Şekil3.5).



Şekil 3.5 Malandoaldehit-Tiyobarbitürik asit (MDA-TBA) Kompleksi

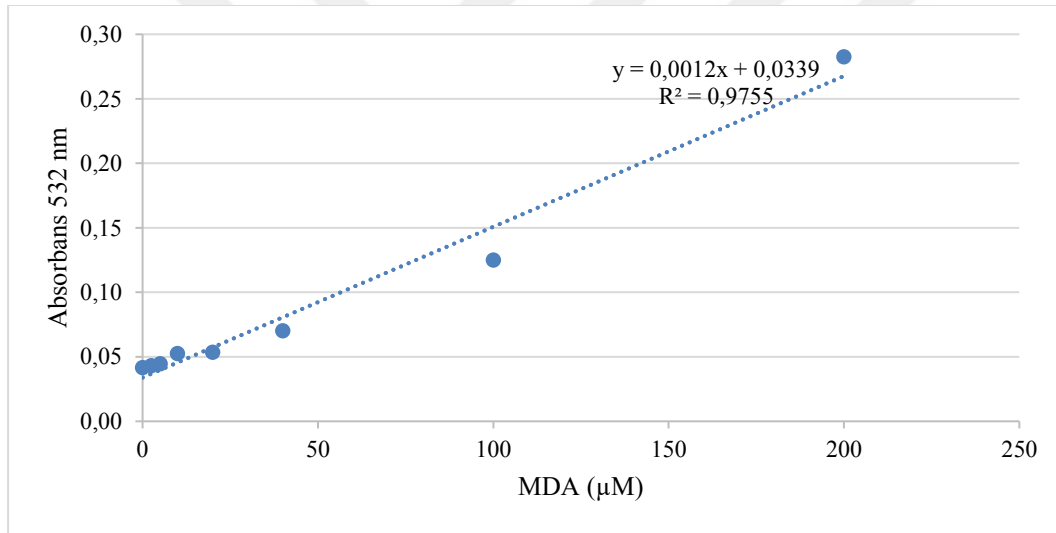
Yöntemin Uygulanışı

Cayman Chemical Kit; Tiyobarbitürik asit, TBA asetik asit, TBA sodyum hidroksit, TBA malondialdehit ve TBA sodyum dodesil sülfat (SDS) içermektedir. Bu çözeltiler kit talimatlarına göre hazırlandı.

5 mL'lik cam tüplere 100 µL numune ve standart eklendi. Her cam tüpe 100 µL SDS çözültisi eklendi ve karıştırıldı. Her cam tüpe 4 mL renk reaktifi eklendi. Ağız kapatılan tüpler 100°C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Bir saat sonra şişeler çıkartıldı ve reaksiyonu durdurmak için buz banyosuna yerleştirildi. 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Cam tüpler, 4°C'de 1600 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Tüplerden 150 µL alındı ve 96 kuyucuklu plaklara eklendi. 530 nm'de absorbanslar okundu.

Malandoaldehit (MDA) Düzeyinin Hesaplanması

Her standardın absorbans değerlerine göre kalibrasyon doğrusu çizildi ve MDA düzeyleri µM cinsinden hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 3.6 Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümüne Ait Kalibrasyon Grafiği

3.4.11 Total Antioksidan Düzeyinin Ölçümü

Yöntemin Esası

Bu yöntem, numunedeki antioksidanların 2,2'-Azino-di-(3-etilbenziazolin sülfonat) (ABTS[®])'in ABTS^{®•+} 'ya metmyoglobin tarafından oksidasyonunu inhibe etme esasına dayanmaktadır. Üretilen ABTS^{®•} miktarı, 750 nm veya 405 nm'de absorbansı okunarak izlenebilir. Örnekteki antioksidanların ABTS[®] oksidasyonunu

önleme kapasitesi, suda çözünür bir tokoferol analogu olan troloks ile karşılaştırılır ve millimolar troloks eşdeğerleri olarak ölçülür.

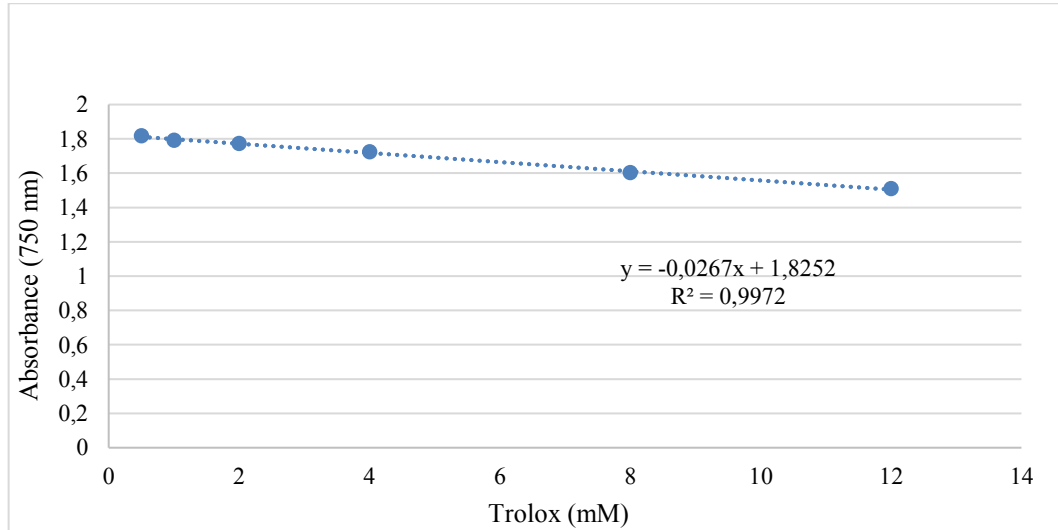
Yöntemin Uygulanışı

Cayman Chemical Kit; Tiyobarbitürik asit, deney tamponu, trolox, kromojen, metmyoglobin ve hidrojen peroksit içermektedir. Bu çözeltiler kit talimatlarına göre hazırlandı.

5 mL cam tüplere sulandırılmış trolox ve deney tamponu eklendi. Plak üzerindeki kuyucuklara 10 µL trolox standardı, 10 µL metmyoglobin ve 150 µL kromojen eklendi. Plak üzerindeki kuyucuklara 10 µL numune, 10 µL metmyoglobin ve 150 µL kromojen eklendi. Kullanılan tüm kuyucuklara 40 µL H₂O₂ eklendi. Plak karanlıkta ve oda sıcaklığında beş dakika boyunca bir çalkalayıcıda inkübe edildi. 750 nm'de absorbansı okundu.

Total Antioksidan Düzeyinin Hesaplanması

Her standardın absorbans değerlerine göre kalibrasyon doğrusu çizildi (Şekil 3.7) ve antioksidan düzeyleri µM cinsinden hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 3.7 Trolox Standart Eğrisi

3.5 İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi. SPSS 21.0 for Windows programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Bonferroni test ile belirlendi. $p < 0.05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.



4 BULGULAR

4.1 SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ

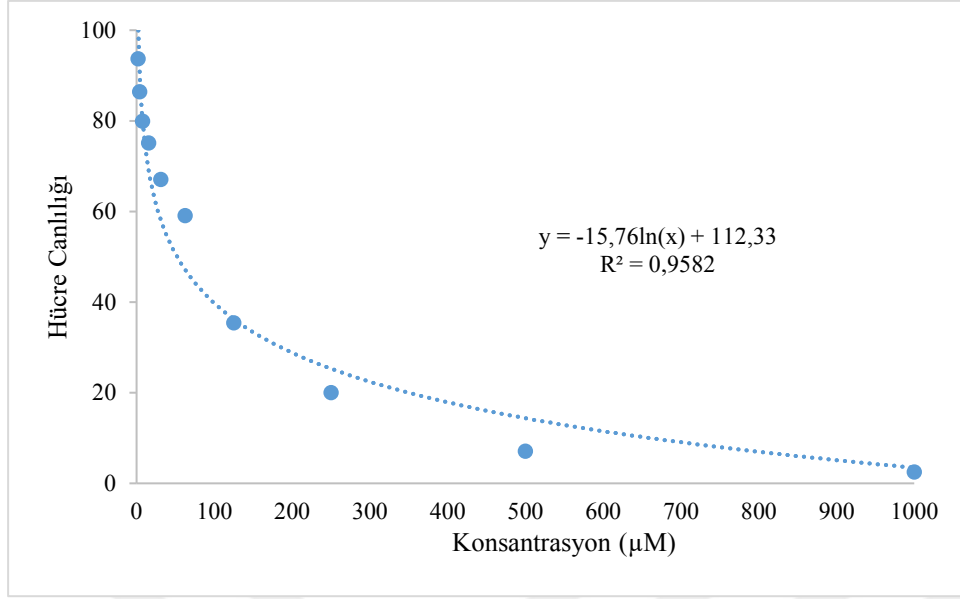
CEM/C2 hücreleri kamferol, kersetin ve mirisetinin 1,95-1000 μM aralığındaki konsantrasyonlarındaki çözeltilerine 48 saat süreyle maruz bırakılmış ve sonrasında WST1 yöntemi ile hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Deneyler, üç farklı zamanda ve beş tekrar ile yapılmıştır. Kontrol grubuna kamferol, kersetin ve mirisetinin çözündüğü çözelti uygulanmıştır. Hücre canlılıkları herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre % olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (inhibitör konsantrasyon 50, IC_{50}) değerleri ile hücre canlılığında %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon (inhibitör konsantrasyon 30, IC_{30}) değerleri Çizelge 4.1. verilmiştir.

Çizelge 4.1 Kamferol, Kersetinin ve Mirisetin IC_{30} ve IC_{50} Değerleri

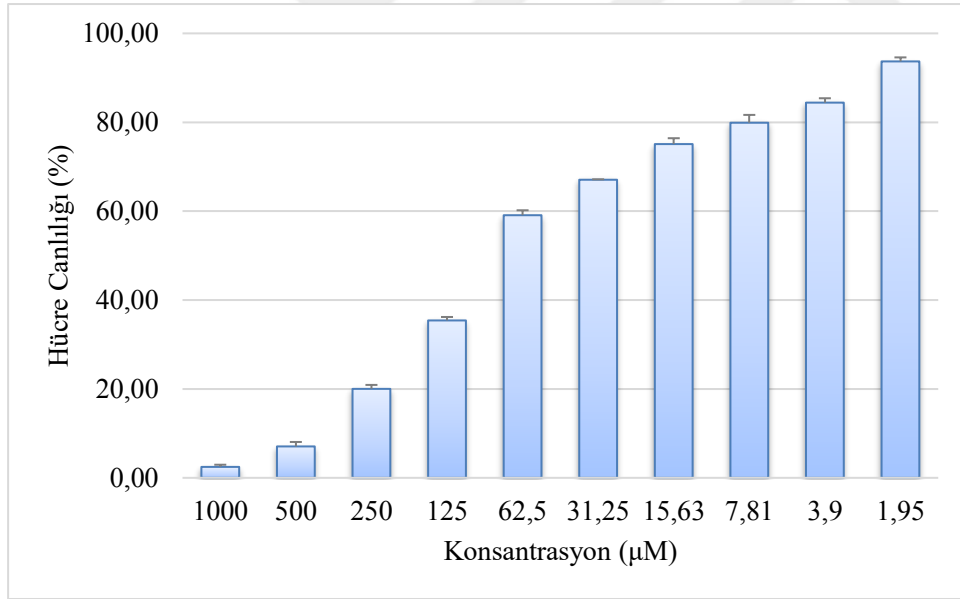
	Kamferol (μM)	Kersetin (μM)	Mirisetin (μM)
IC_{30}	45,37	54,33	45,55
IC_{50}	50,67	59,18	50,26

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC_{50} değerleri sırasıyla 50,67 μM , 59,18 μM ve 50,26 μM olarak bulunurken IC_{30} değerleri ise sırayla 45,37 μM , 54,33 μM ve 45,55 μM olarak bulunmuştur.

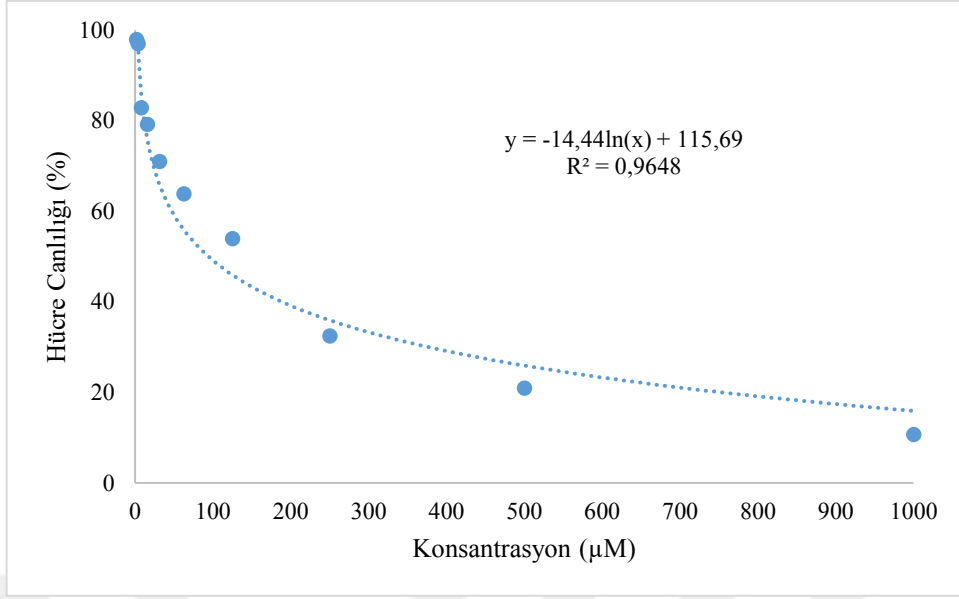
Yaptığımız çalışmaya göre 1,95-1000 μM konsantrasyon aralığında kamferol, kersetin ve mirisetinin CEM/C2 hücrelerinde logaritmik artışla sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Sitotoksosite dağılım grafikleri Şekil 4.1, 4.3 ve 4.5'te görülmektedir. Ayrıca CEM/C2 hücre hattındaki % canlılık grafikleri ise Şekil 4.2, 4.4 ve 4.6'da gösterilmiştir.



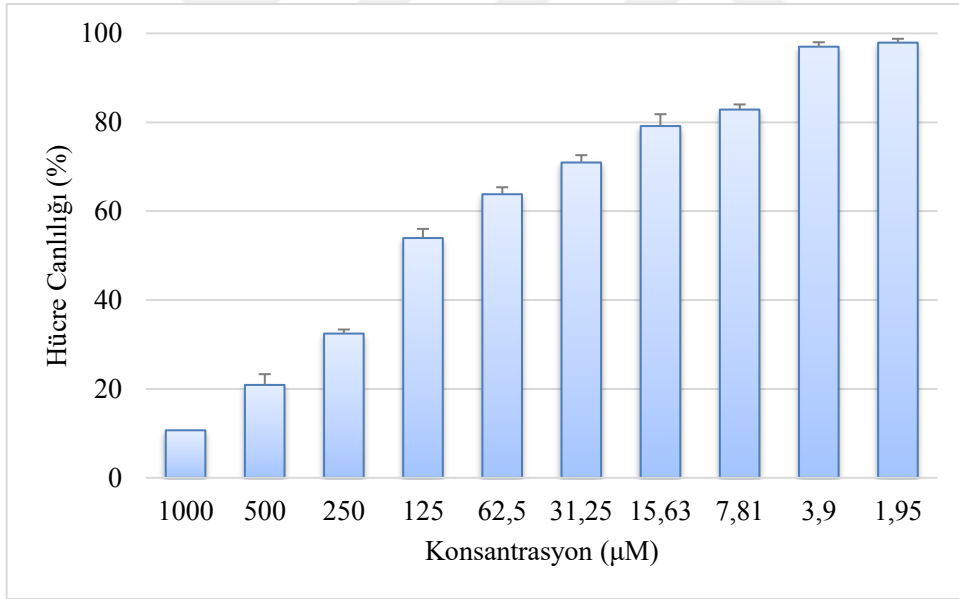
Şekil 4.1 Kamferolün WST1 Testine Göre Sitotoksosite Dağılım Grafiği



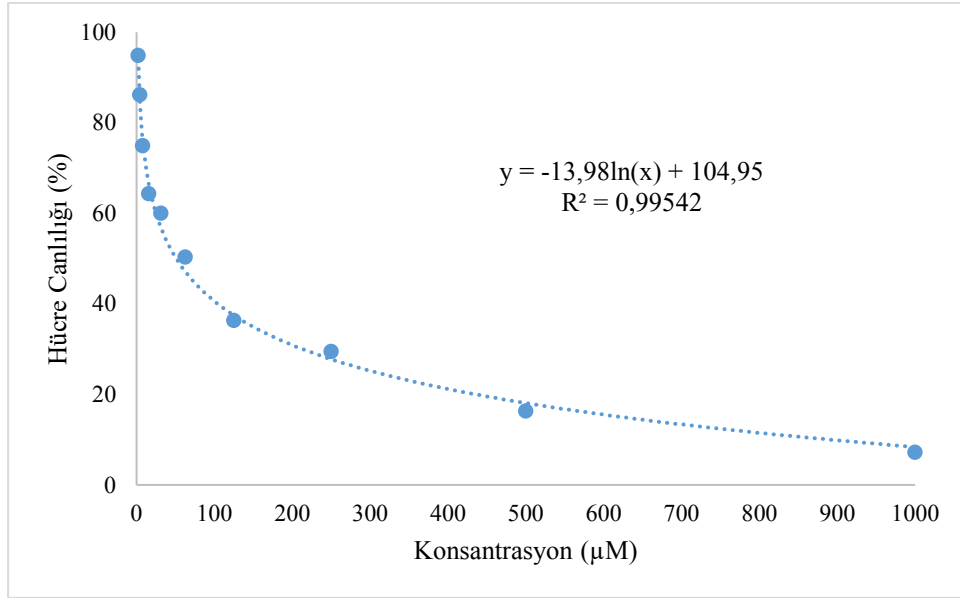
Şekil 4.2 Kamferolün CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiği



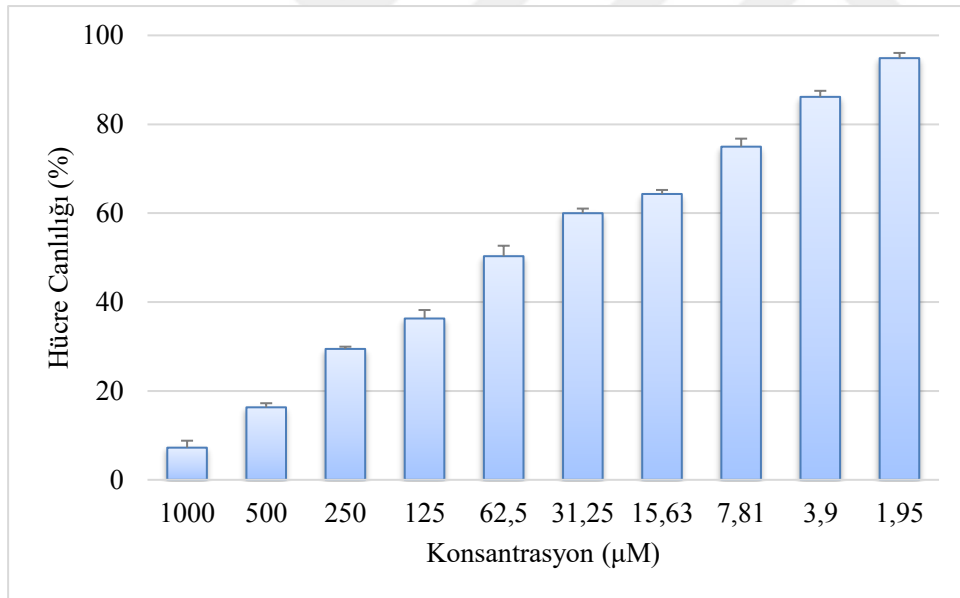
Şekil 4.3 Kersetinin WST1 Testine Göre Sitotoksisite Dağılım Grafiği



Şekil 4.4 Kersetinin CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiği



Şekil 4.5 Mirisetinin WST1 Testine Göre Sitotoksosite Dağılım Grafiği

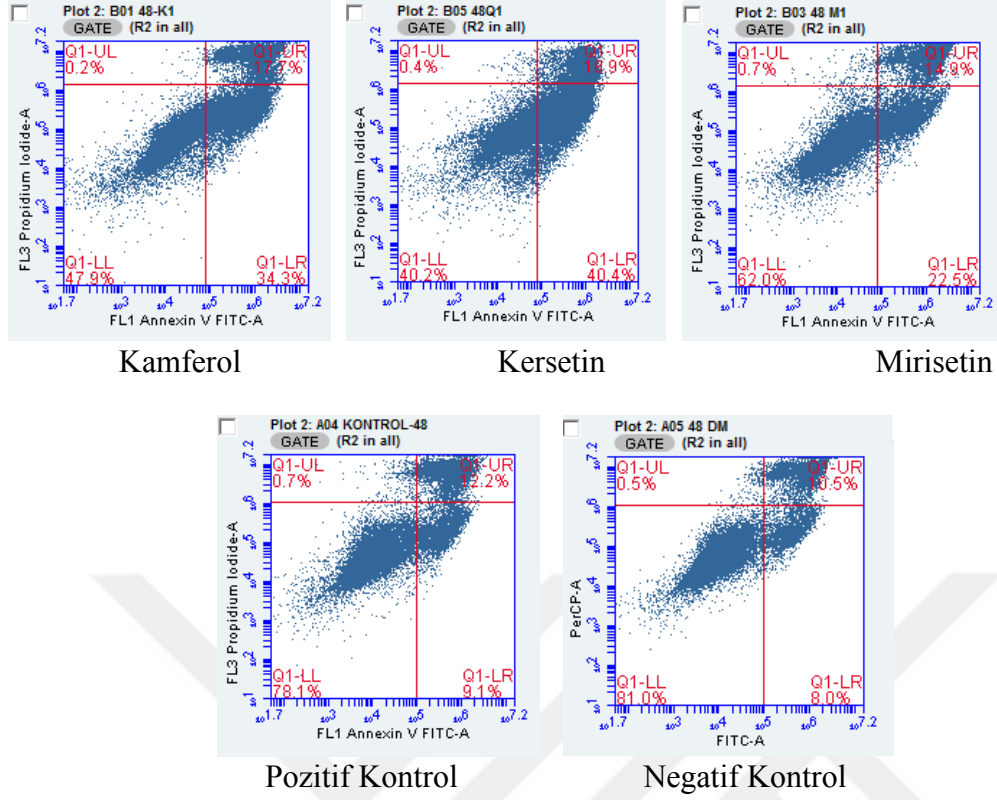


Şekil 4.6 Mirisetinin CEM/C2 Hücre Hattındaki % Canlılık Grafiği

4.2 AKIM SİTOMETRİSİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

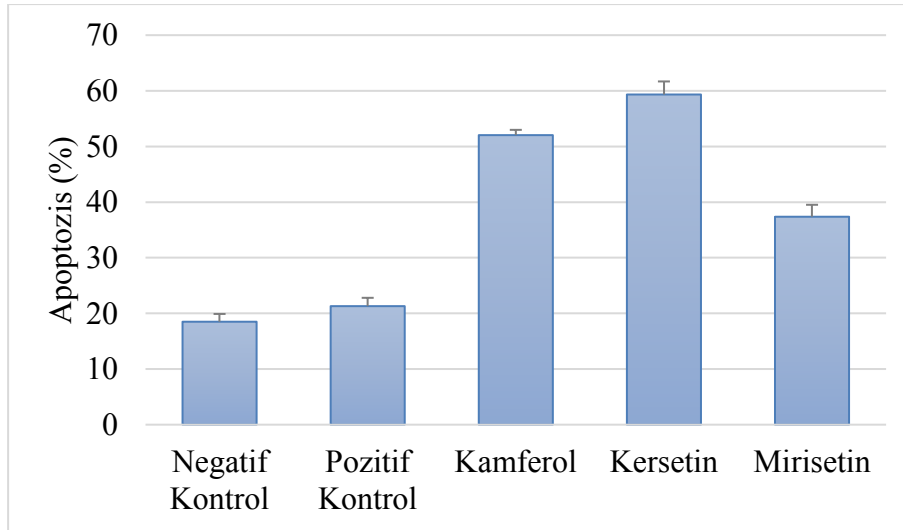
Kamferol, kersetin ve mirisetinin %30 inhibisyona neden olan konsantrasyon çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda Anneksin V-FITC ve PI boya ile boyandıktan sonra akım sitometresinde okuma yapılmıştır.

Deneyler, üç farklı zamanda yapılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak herhangi bir madde uygulanmayan hücreler kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubuna ise siklofosfamid uygulanmıştır. Negatif kontrol grubunu oluşturan CEM/C2 hücrelerinde %8,0 oranında erken apoptoz, %10,5 oranında geç apoptoz olmak üzere %18,5 oranında toplam apoptoz gözlenmiştir. Siklofosfamid uygulanan pozitif kontrol grubunda ise %9,1 oranında erken apoptoz ve %12,2 oranında geç apoptoz olmak üzere %21,3 oranında toplam apoptoz gözlenmiştir. Kamferolün IC₃₀ konsantrasyonuna maruz kalan CEM/C2 hücrelerinde erken apoptoz %34,3 ve geç apoptoz %17,7 olmak üzere toplam %52 oranında apoptoz gözlenmiştir. Kersetinin IC₃₀ konsantrasyonunda erken apoptoz %40,4 ve geç apoptoz %18,9 olmak üzere toplam %59,3 oranında apoptoz gözlemlenirken miristenin IC₃₀ konsantrasyonunda ise erken apoptoz %22,5 ve geç apoptoz %14,9 olmak üzere toplam %37,4 oranında apoptoz gözlenmiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.8'de akım sitometrisinde apoptoz analizinin bar grafiği görülmektedir.



Şekil 4.7 Apoptoz Analizi İçin Akım Sitometrisi İle Elde Edilen Kadran İstatistiği Grafiği*

*Sağ üst kadranda geç apoptoz, sağ alt kadranda ise erken apoptoz yüzdeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Apoptoz Analizi İçin Akım Sitometrisi İle Elde Edilen Sonuçların Bar Grafiği

4.3 COMET ANALİZ SONUÇLARI

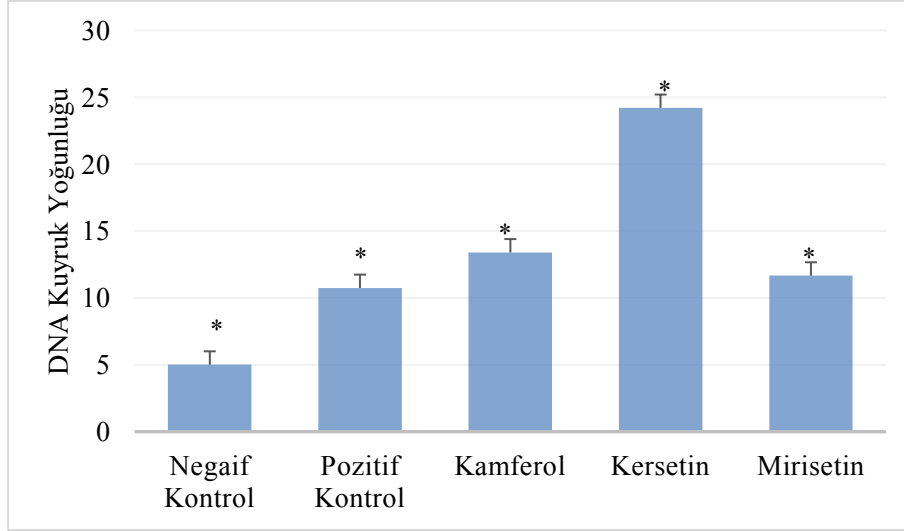
Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki DNA hasarı kuyruk yoğunluğu cinsinden Comet yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Çizelgede, toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk yoğunluğu ve standart sapmaları verilmiştir.

Kamferol, kersetin ve mirisetin, negatif kontrole kıyaslandığında CEM/C2 hücrelerinde DNA hasarını anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kamferol ve kersetin pozitif kontrole (50 μM H₂O₂) kıyasla bu hücrelerdeki DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazladır. Mirisetin ise bu hücrelerde pozitif kontrole yakın bir değerle DNA hasarına neden olmuştur. Comet sonuçları CEM/C2 hücrelerinde kuyruk yoğunluğu cinsinden DNA hasarını en fazla kersetinin neden olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücre Hattında DNA Hasarına İlişkin Bulgular

Gruplar	Kuyruk Yoğunluğu
Negatif Kontrol	5,01 ± 2,58 *
Pozitif Kontrol	10,74 ± 2,62 *
Kamferol	13,40 ± 3,43 *
Kersetin	24,20 ± 3,91 *
Mirisetin	11,66 ± 2,44 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * ($p<0,05$)



Şekil 4.9 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerinde DNA Hasarı Etkisine İlişkin Bulgular

* (p<0,05)

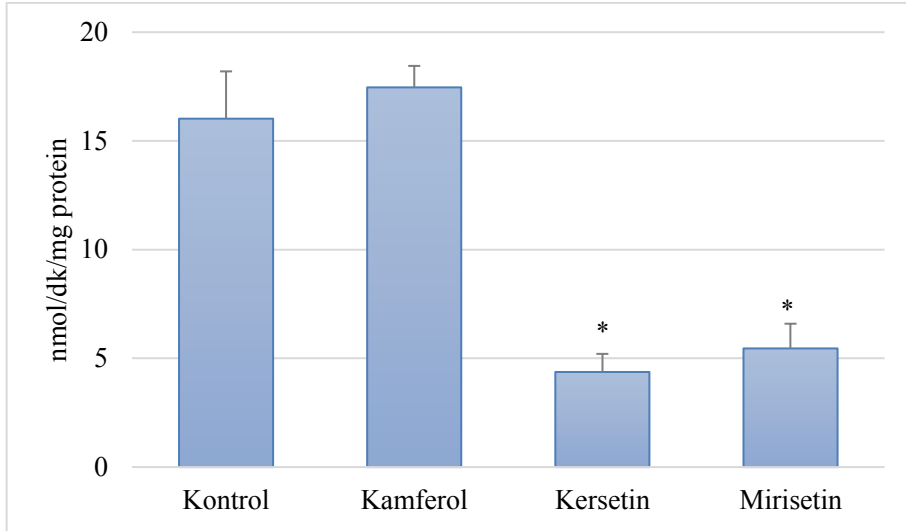
4.4 KATALAZ (CAT) AKTİVİTESİ

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki CAT aktiviteleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Kersetin ve mirisetinin bu hücrelerdeki CAT aktivitesi kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sergilemiştir (p<0,001). Kamferolün hücrelerdeki CAT aktivitesinde ise kontrol grubu hücrelerine göre artış görülmüştür ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.3 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Katalaz (CAT) Aktivitesi

Gruplar	Katalaz Aktivitesi (nmol/min/mg protein)
Kontrol	16,02 ± 2,17
Kamferol	17,46 ± 0,99
Kersetin	4,37 ± 0,83 *
Mirisetin	5,46 ± 1,14 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * (p<0,05)



Şekil 4.10 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Katalaz (CAT) Aktivitesi
* (p<0,05)

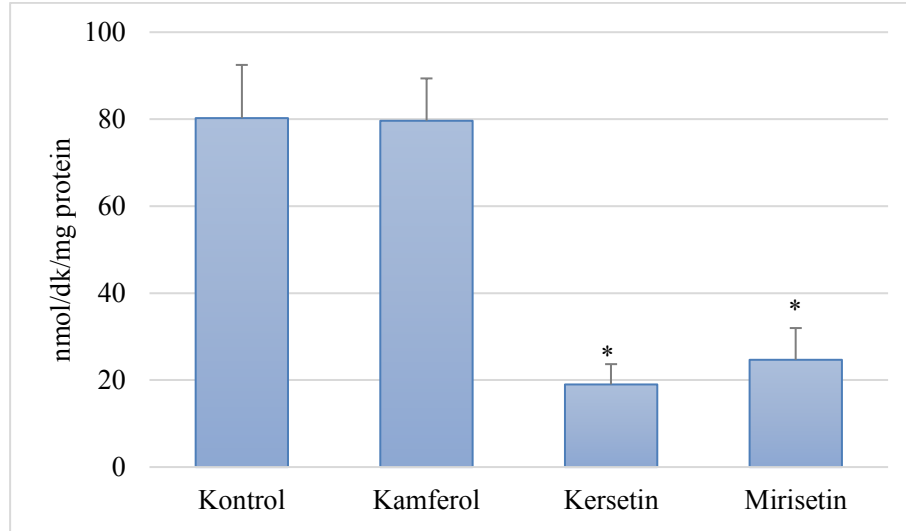
4.5 GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPX) AKTİVİTESİ

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki GPx aktiviteleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Kersetin ve mirisetinin bu hücrelerdeki GPx aktivitesi kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sergilemiştir (p<0,001). Kamferolün hücrelerdeki GPx aktivitesinde ise kontrol grubu hücrelerine göre artış görülmüştür ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.4 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

Gruplar	Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi (nmol/min/mg protein)
Kontrol	80,24 ± 12,23
Kamferol	79,63 ± 9,74
Kersetin	19,00 ± 4,67 *
Mirisetin	24,67 ± 7,30 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * (p<0,05)



Şekil 4.11 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

* (p<0,05)

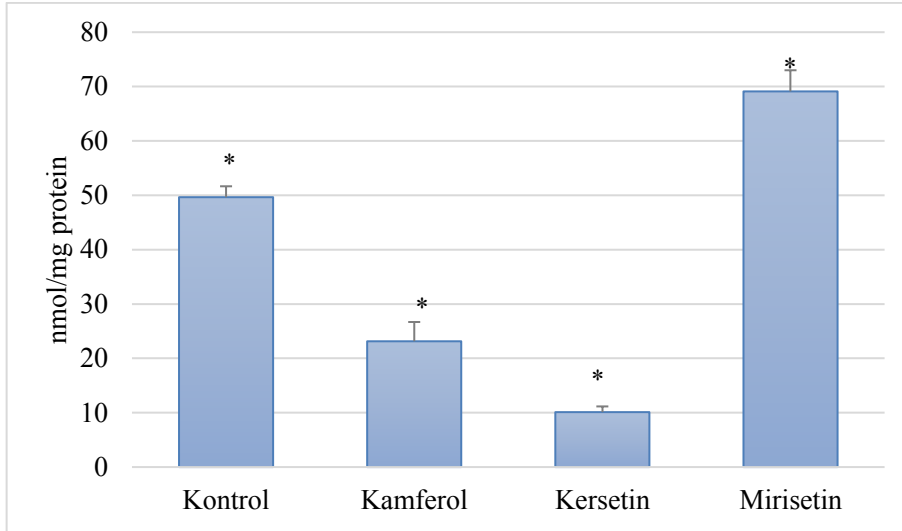
4.6 GLUTATYON (GSH) DÜZEYİ

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki GSH düzeyi Çizelge 4.5 ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Kamferol ve kersetinin bu hücrelerdeki GSH düzeyi kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir (p<0,001). Bu düşüş Kersetinin uygulandığı hücrelerde daha fazla görülmektedir. Mirisetinin uygulandığı hücrelerin GSH düzeyleri kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında artış sergilemiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,001).

Çizelge 4.5 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutatyon (GSH) Düzeyi

Gruplar	Glutatyon Düzeyi (nmol/mg protein)
Kontrol	49,64 ± 2,01 *
Kamferol	23,14 ± 3,55 *
Kersetin	10,10 ± 1,05 *
Mirisetin	69,11 ± 3,89 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * (p<0,05)



Şekil 4.12 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Glutatyon (GSH) Düzeyi
* (p<0,05)

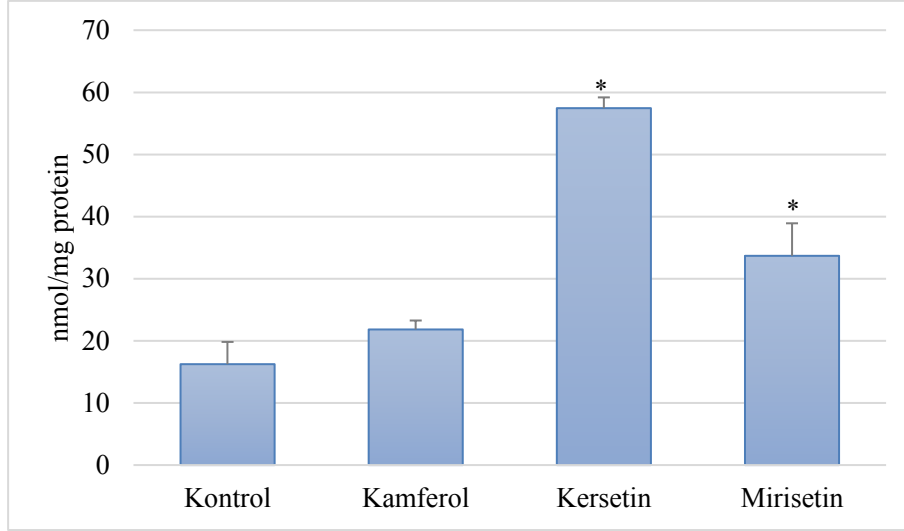
4.7 LİPİT PEROKSİDASYON DÜZEYİ

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki lipit peroksidasyon düzeyi Çizelge 4.6 ve Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Kamferol, kersetin ve mirisetinin bu hücrelerdeki lipit peroksidasyon düzeyleri kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu artış kersetin ve mirisetin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı iken (p<0,001), kamferol grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.6 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Lipit Peroksidasyon Düzeyi

Gruplar	Lipit Peroksidasyon Düzeyi (nmol/mg protein)
Kontrol	16,24 ± 3,58
Kamferol	21,83 ± 1,44
Kersetin	57,45 ± 1,74 *
Mirisetin	33,68 ± 5,24 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * (p<0,05)



Şekil 4.13 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Lipit Peroksidasyon Düzeyi
* (p<0,05)

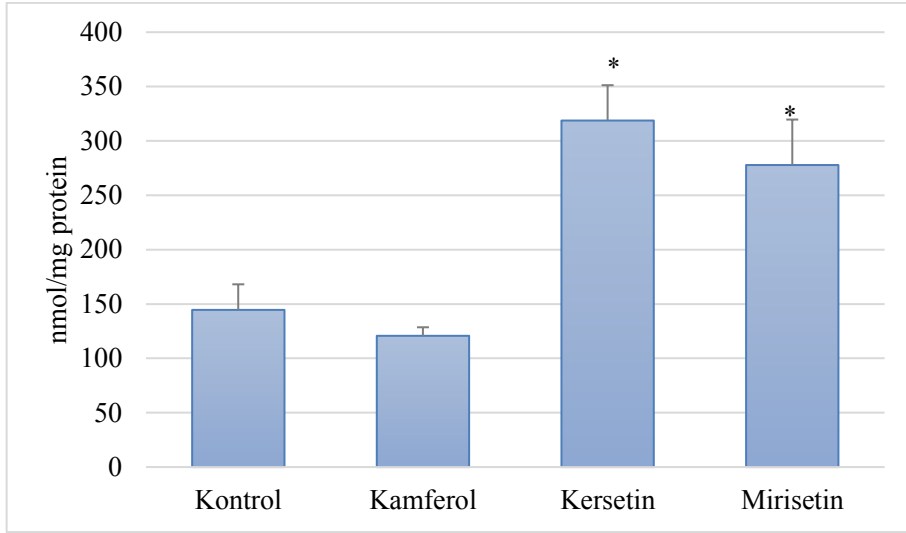
4.8 TOPLAM ANTIOKSİDAN DÜZEYİ

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Süre sonunda tüm grupların bu hücrelerdeki total antioksidan düzeyi Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Kersetin ve mirisetinin bu hücrelerdeki total antioksidan düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p<0,05). Kamferolün hücrelerdeki total antioksidan düzeyi ise kontrol grubu hücrelerine göre azalmıştır ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.7 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Toplam Antioksidan Düzeyi

Gruplar	Total Antioksidan Düzeyi (nmol/mg protein)
Kontrol	144,57 ± 23,53
Kamferol	120,73 ± 7,84
Kersetin	318,76 ± 32,50 *
Mirisetin	277,81 ± 41,84 *

Tüm değerler ortalama ± SS olarak verilmiştir. * (p<0,05)



Şekil 4.14 Kamferol, Kersetin ve Mirisetinin CEM/C2 Hücrelerindeki Toplam Antioksidan Düzeyi

* (p<0,05)

5 TARTIŞMA

Flavonoidler, bitkilerin birçok yerinde üretilen sekonder metabolitlerdir. Meyveler, yapraklı sebzeler, kökler, yumrular, soğanlar, otlar, baharatlar, baklagiller ve tahıllar gibi bitkisel gıdalarda ve tıbbi bitkilerin meyve, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunur (31)–(33). Bitki üremesine katkı sağlamak, bitkileri zararlı UV ışıklardan korumak, antifungal ve antibakteriyel etkiler ile patojen organizmalara karşı bitkilerin korunmasını sağlamak flavonoidlerin görevlerinin sadece bazılarıdır. Peki insan diyetinde bulunan bu flavonoidlerin insan sağlığındaki etkisi nedir?

Yapılan epidemiyolojik araştırmalarda meyve ve sebzelerce zengin diyetle beslenen bireylerin felç ve yaşa bağlı gelişen patolojik durumlara karşı daha düşük riske sahip oldukları gösterilmiştir. Flavonoidlerin dünyada hastalıklara bağlı ölüm sıralamasında ilk sırada yer alan koroner kalp hastalığı riskini azalttığı bildiren çalışmalar vardır (46), (47). Ayrıca flavonoid alımının kanser riski ile ilişkisini inceleyen Kohort ve vaka kontrol çalışmalarından elde edilen veriler, flavonoidlerin hastalıklara bağlı ölüm oranında ikinci sırada yer alan kanser oluşum riskini azaltabileceğini göstermiştir (49). Genel anlamda bazı çalışmalar tersini söylese de genel kanı sebze ve meyvece zengin diyetle beslenmenin, kansere yakalanma riskini düşürdüğü yönünde sonuçların olduğunu vurgulamaktadır (155).

Kanser! Sadece 2018 yılında yaklaşık 18,1 milyon kişiyi etkilediği ve 9,6 milyon insanın ölümüne sebep olduğu hastalık ailesi. 2010 yılı maliyeti yaklaşık 1,16 trilyon ABD doları. (26).

Bu çalışma kapsamında, epidemiyolojik çalışmalara göre kanseri riskin azaltan flavonoidlerin kanser üzerine etkisini aydınlatmak amacıyla çocukluk döneminde sık rastlanan bir kanser türü olan ALL seçilmiştir. Yapısı iyi bilinen flavonoidlerden olan fakat bu hücre grubunda pek çalışılmayan kamferol, kersetin ve miristenin etkileri CEM/C2 hücre hattında *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, bu flavonoidlerin akut lenfoblastik lösemi hücre hattı olan CEM/C2 hücrelerinde toksik etkileri incelenmiştir. Hücrelerde bu flavonoidlerin 1000 µM (her seferinde doz yarıya indirilerek) 1,95 µM konsantrasyon aralığında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları hesaplanmış ve söz konusu flavonoidlerin IC₃₀ konsantrasyonlarında apoptotik etkileri çalışılmıştır. Ayrıca toksik etkilerin altında yatabileceği düşünülen olası mekanizmaların incelenmesi amacıyla CAT ve GPx enzim aktiviteleri ve GSH, lipid peroksidasyon ile toplam antioksidan düzeyi gibi oksidan/antioksidan statü parametreleri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada WST1 yöntemiyle kamferol, kersetin ve mirisetinin CEM/C2 hücrelerinde sitotoksik etkisinin konsantrasyon artışıyla birlikte logaritmik bir artış gösterdiği saptanmıştır. Flavonoidlerin (kamferol, kersetin ve mirisetin) IC₅₀ değerleri sırasıyla 50,67 µM, 59,18 µM ve 50,26 µM olarak saptanırken IC₃₀ değerleri ise 45,37 µM, 54,33 µM ve 45,55 µM; olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda ayrıca kamferol, kersetin ve mirisetinin CEM/C2 hücrelerinde apoptotik etkileri incelenmiştir. CEM/C2 hücreleri bu flavonoidlerin %30 inhibisyona neden olan konsantrasyonlarına 48 saat süreyle maruz bırakılmış ve hücreler Annexin V-FITC/PI ile boyamaya tabi tutulduktan sonra akım sitometresinde okuma yapılmıştır.

Negatif kontrol grubu olarak hücrelere herhangi bir madde uygulanmamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak ise siklofosfamid uygulanmış hücreler değerlendirilmiştir. Çalışmamıza göre pozitif kontrol grubu ve üç flavonodün IC₃₀ konsantrasyonları negatif kontrol grubuna göre apoptotik etki göstermiştir. Negatif kontrol grubundaki hücreler toplam %18,5 apoptoza giderken bu oran pozitif kontrol gurubunda %21,3 olarak gözlenmiştir. En fazla apoptoza giden hücreler kersetinin (%59,3) uygulandığı hücreler olarak saptanmıştır. Daha sonra kamferol (%52) ve en son olarak da mirisetin (%37,4) gelmektedir.

Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kersetin, kersitrin, mirisetin ve mirisitrin gibi bazı flavonoidlerin prostat kanseri hücre hattında (PC-3) MTT yöntemi ile hücre proliferasyonu ve Annexin V-FITC/PI ile apoptozis etkileri incelemiştir.

Sonuçlar mirisetin, mirisitrin ve kersetinin PC-3 hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Apoptoz oranının, doza bağlı bir şekilde artan flavonoid konsantrasyonu ile arttığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, PC-3 hücre apoptozunun indüklenmesinde en etkili flavonoidin mirisetinin olduğunu göstermiştir (156).

Sun ve arkadaşları ise mesane kanseri hücre hattında (T24) bir çalışma tasarlamışlardır. Mirisetinin T24 hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda, doza bağlı bir şekilde G2/M'de hücre döngüsü durmasını teşvik ettiği ve DNA fragmantasyon analizi ile apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. Mirisetin ile indüklenen apoptoz, Bcl-2 ailesi proteinlerinin modülasyonu ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmışlardır (157).

Zhang ve arkadaşları flavonların ve flavonollerin bir insan özofagus adenokarsinom hücre hattı (OE33) üzerindeki sitotoksik etkileri karşılaştırmış ve sitotoksik etkilerinden sorumlu moleküler mekanizmalar araştırılmışlar. MTT tahlilinin sonuçları, flavonların (luteolin, apigenin, chrysin) ve flavonollerin (quercetin, kaempferol, myricetin) OE33 hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksisiteyi indükleyebildiğini göstermişlerdir. OE33 hücrelerinin inhibisyonu üzerindeki gücü (IC₅₀) değeri sırayla kersetin (78 µM), luteolin (84 µM), chrysin (107 µM), kamferol (111 µM), apigenin (151 µM), mirisetin (205 µM). Flavonların ve flavonollerin OE33 hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri hücreler 24 saat boyunca ilgili flavonoidler (80 µM) ile muamele edilmesi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme Akış sitometrisi ile yapılmış ve anneksin-V FITC/PI ile etiketlenmiştir. Sonuçlar flavonlar ve flavonollerin neden olduğu sitotoksisiteye apoptoz aracılık ettiğini göstermiştir (158).

İnsan hepatokarsinom (HepG2) hücre hattında yapılan çalışmada ise mirisetinin apoptozu indüklediği bulunmuştur. Xiao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 33-198 µM dozları arasında HepG2 hücreleri mirisetin 24 saat dozlanmış ve akış sitometrisinde Annexin V-FITC ve PI boyama ile analiz edilmiştir. 24 saat boyunca 66 µM'den daha yüksek dozlarda mirisetin ile dozlanan hücrelerin apoptoz gittiği tespit edilmiştir (159).

Kersetinin insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-453) üzerindeki antikanser etkileri, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptozun indüksiyonunun araştırıldığı çalışmada kersetine maruz kalan hücrelerin apoptoza gittiği belirlenmiştir. Sonuçlar, kersetin tarafından hücre döngüsü durması ve apoptozun indüklenmesi için çoklu yolların varlığını göstermiştir (160).

Çalışmamız yukarıdaki farklı hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarla benzerlik gösterse de çelişen yerler dikkatten kaçmamaktadır. Xu ve arkadaşları PC-3 hücrelerinde mirisetinin kersetine göre daha fazla apoptotik etki gösterdiğini ifade etmiştir. Biz ise çalışmamızda CEM/C2 hücrelerinde kersetinin mirisetine göre daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğunu bulduk.

Zhang ve arkadaşları ise OE33 hücre hattında yaptığı çalışmada kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₅₀ değerlerini sırasıyla 111 µM, 78 µM ve 205 µM olarak bulmuştur. Bu sonuçlar çalıştığımız flavonoidlerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin hücre tipinin yanında doza da bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Srivastava ve arkadaşları lösemi de dahil olmak üzere bazı kanser hücre hatlarında ve hayvan modellerinde kersetin ve elajik asidin antitümör etkinliklerini incelemişlerdir. Kersetin ve elajik asidin sitotoksik etkisi, üç lösemik hücre hattında (CEM (ALL), K562 (KML) ve İnsan B hücresi lösemi hücre (Nalm6)), iki meme kanseri hücre hattında ((T47D), (EAC)) ve iki normal hücre hattında ((HEK 293T), (MEF1)) değerlendirilmiştir. Hücreler artan kersetin ve elajik asit konsantrasyonu (48 saat boyunca 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM) ile muamele edilmiş ve sitotoksik etki MTT ve tripan mavisi yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kersetinin lösemik hücrelerde doza bağlı bir şekilde sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. Kersetinin IC₅₀ değerinin Nalm6, K562 ve CEM'de 48 saatlik maruziyet sonrasında sırasıyla 20 µM, 40 µM ve 55 µM olduğu tespit edilmiştir. Lösemik hücrelerin yanı sıra kersetinin meme kanser hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu ancak normal hücreler üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kersetinin test edilen kanser hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesi sırasında S fazı durmasını ve ardından kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (161). Yapılan bu kapsamlı çalışma bizim çalışmamızla benzer sonuçlar

göstermektedir. Srivastava ve arkadaşları CEM hücrelerinde kersetinin IC₅₀ değerinin 55 µM olduğunu gösterirken bizim çalışmamız CEM/C2 hücrelerinde kersetinin IC₅₀ değerinin 59,18 µM olduğunu göstermektedir.

Marfe ve arkadaşlarının insan kronik miyelojenöz lösemi (K562) ve insan promiyelositik lösemi (U937) hücre hattında 50 µM dozda kamferolün etkilerini değerlendirdiği çalışmada kamferolün Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve Bax ekspresyonlarını artırarak apoptozu indüklediğini gösterilmiştir (162).

Pan ve arkadaşları mirisetinin anti-proliferatif etkisini lösemi K562 hücre hattında araştırmıştır. Hücre canlılığı tetrazolyum türlerinden olan MTS/PMS deneyi ile belirlenmiş ve mirisetinin K562 hücre hattında IC₅₀ değeri 21.88 µM olarak bulunmuştur. K562 hücrelerindeki apoptoz derecesi, Annexin-V/PI boyaması kullanılarak akış sitometrisi ile incelenmiştir. Sonuç olarak mirisetinin pürin nükleotit biyosentez yolağına müdahale ederek hücre döngüsü durmasını ve K562 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini ifade etmişlerdir (163).

Rusak ve arkadaşları doğal olarak meydana gelen 6 flavonoidin (kersetin, mirisetin, kamferol, taxifolin, izorhamnetin ve methylquercetagenin glikosil) akut miyelit lösemi (HL-60) hücre hattında hücre proliferasyon, apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki ilişkiyi araştırılmışlardır. Flavonoidlerin 48 saatlik maruziyetten sonra IC₅₀ değerleri kersetin, isorhamnetin, mirisetin ve kamferol için sırasıyla 20,1 µmol/L, 25,0 µmol/L, 35,5 µmol/L, 42,1 µmol/L olarak bulunmuştur. Mirisetin, kersetin, isorhamnetin ve kamferol HL-60 hücrelerimizde apoptozu indüklerken, taksifolin ve metilquercetagenin etkisiz olduğu bulunmuştur (164).

Çalışmamız Marfe arkadaşlarının çalışması ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışma kamferolün etkilerini kronik miyelojenöz lösemi hücrelerinde değerlendirirken biz akut lenfoblastik lösemi hücre hattında değerlendirdik ve yakın konsantrasyonlarda benzer değerler bulduk.

Pan, Rusak ve arkadaşlarının çalışması ile kıyaslandığında ise çalışmamız farklılık göstermektedir. Pan ve Rusak aynı hücre hattını kullanmasına rağmen mirisetinin IC₅₀ değerlerinde farklı sonuçlar görülmektedir.

Matsui ve arkadaşları kersetinin de içinde olduğu bazı diyet biyoflavonoidlerinin, çeşitli insan lösemi hücrelerinde apoptoz etkisini incelemişlerdir. Kronik miyelojenöz lösemi kaynaklı K-562 ve KU-812, prekürsör-B-akut lenfoblastik lösemi kaynaklı NALM-16, NALM-20, HPB-NUL ve NALM-17 ve histiositik lenfoma kaynaklı U-937 hücre hatlarında genistein, genistin, kersetin, fisetin, luteolin, apigenin ve rutin gibi flavonoidlerin etkileri değerlendirilmiştir. Apoptotik hücre insidansını ölçmek için Anneksin V-FITC ile boyanarak akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Luteolin, genistein, kersetin ve fisetin BV-173 hücrelerinde önemli apoptoz indüklerken, genistein ve rutin etki gösterememiştir. Biyoflavonoidlerin doza bağlı olarak apoptoz indükleyici etkisi olduğu ifade edilmiş ve apoptoz mekanizmasının transmembran potansiyelinin bozulması ve kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivasyonu ile olduğu bulunmuştur (165).

Lazaro ve arkadaşları insan lösemi hücre hattı olan K562'de kersetin, apigenin, fisetin ve mirisetin gibi bazı flavonoidlerin büyüme-inhibe edici aktivitesini değerlendirmiştir. Her ne kadar sitotoksik etkilerinin bizim çalışmamızla benzeştiği görülse de hücrelerde XTT sitotoksikite testinin güvenilirliği tartışma konusudur (166).

Brisdelli ve arkadaşları 2007 yılında insan kronik miyeloid (K562) ve insan akut lenfoblastik (HSB-2) lösemi hücre hattında kersetinin hücre proliferasyonun ve apoptotik etkilerini değerlendirmişlerdir. 25 µM kersetin hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat uygulanmış ve canlılık tripan mavisi ile değerlendirilmiştir. 25 µM kersetin K562 hücrelerinde hafif bir sitotoksikiteye neden olurken HSB-2 hücreleri pratik olarak etkilememiştir. Apoptoz ise akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. 25 µM kersetin ile tedavi edilen K562 hücreleri, 24 ila 72 saat arasındaki kontrol hücrelerinden önemli ölçüde farklı bir hücre döngüsü profili gösterirken HSB-2 hücre döngüsü üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (167). Brisdelli ve arkadaşlarının hücre proliferasyonunu sadece tripan mavisi ile değerlendirmesi, farklı sitotoksikite testleri kullanmaması çalışmanın gücü konusunda soru işaretlerine neden olmuştur.

Moradzadeh ve arkadaşları kamferolün HL-60 ve NB4 lösemi hücreleri üzerindeki sitotoksik, pro-apoptotik ve farklılaşmayı indükleyen etkilerini araştırmak

için çalışma tasarlamışlardır. Hücre canlılığı, floresan bir bileşik olan resorufine rezazurin indirgeme yöntemi kullanılarak 530 nm'de elisa okuyucuda belirlenmiştir. Apoptoz üzerine etkileri ise propidyum iyodür ve NBT boyama teknikleri kullanılarak akış sitometrisinde saptanmıştır. Ayrıca, apoptozda yer alan genlerin ekspresyon seviyeleri (PI3 K, AKT, BCL2, BAX, p53, p21, PTEN, CASP3, CASP8 ve CASP9), farklılaşma (PML-RAR ve HDAC1) ve çoklu ilaç direnci (ABCB1) ve ABCC1), nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rt-PCR) kullanılarak belirlenmiştir. 48 süreyle kamferole maruz bırakılan hücrelerde kamferolün IC₅₀ değerleri HL60 hücrelerinde 250,6 µM iken NB4 hücrelerinde ise 725,6 µM olarak tespit edilmiştir. Kamferolün, alt G1 hücre popülasyonunu arttırdığını ve MDR'nin inhibisyonu ve Bax/Bcl2 oranının artırılması yoluyla promiyelositik lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediğini bulunmuştur (168). Bu çalışmada kamferolün hücreler üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonlarının bizim çalışmamız ve diğer çalışmalarla kıyaslandığında çok yüksek olduğu görülmektedir.

Çalışmaları genel olarak değerlendirdiğimizde kamferol, kersetin ve mirisetin gibi falvonoidlerin lösemi hücre hatlarında (her ne kadar sitotoksikite konsantrasyonları ufak değişiklik gösterse de) sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği raporlanmıştır. Ayrıca bazı çalışmalar apoptotik etki mekanizmalarını da aydınlatmıştır. Çalışmalar genel olarak ise kronik lösemi hücrelerinde yoğunlaşmıştır.

Genotoksik etkiler; kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarının CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruziyetinden sonra Comet analizi ile değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak herhangi bir madde uygulanmayan hücreler ve pozitif kontrol grubu olarak ise 50 µM H₂O₂ uygulanmış hücreler değerlendirilmiştir.

Kamferol, kersetin ve mirisitenin IC₃₀ konsantrasyonları hücrelere uygulandığında her iki kontrol grubuna göre (negatif kontrol, pozitif kontrol) kıyaslandığında maddelerin hücrelerdeki DNA hasarını anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur.

Wu ve arkadaşları kamferolün insan lösemi HL-60 hücrelerinde *in vitro* DNA hasarına neden olup olmadığını ve DNA onarımıyla ilişkili protein ekspresyonunu

etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Canlı hücrelerin yüzdeleri akış sitometrisi deneyi ile DNA hasarını ise Comet analizi incelenmişlerdir. Sonuçlar kamferolün doza bağlı olarak canlı hücreleri azalttığını göstermiştir. Comet testi, kamferolün DNA hasarını doza bağımlı bir şekilde indüklediğini göstermiştir (169).

Raggazon ve arkadaşları kersetinin de bulunduğu bazı flavonoidlerin (kersetin, baicalein, baicalin ve daidzein) meme (MCF-7) ve lösemi (CCRFCEM) kanseri hücre hatları üzerindeki etkisini MTS-PMS, Comet ve akış sitometrisi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Hücre canlılığı testi 0 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM ve 1000 μM dozlardaki test bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonundaki etkileri değerlendirilerek yapılmıştır. Kersetinin IC_{50} değeri 24 ve 48 saatlerde her iki hücre hattında da 100 μM dan büyük olarak tespit edilmiş. 72 saat inkübasyonun sonunda IC_{50} değeri MCF-7 hücrelerinde 83,6 μM , CCRFCEM hücrelerinde ise 38,2 μM olarak bulunmuştur. Comet analizinde, kersetinin her iki hücre hattında da çekirdeğe girip DNA hasarı ürettiğini tespit etmişlerdir. Daidzein MCF-7 hücrelerinde hiçbir etki göstermemiş CCRFCEM hücreleri için sadece kersetin aktif etki göstermiştir (170).

Das ve arkadaşları kersetin, mirisetin, kamferol, apigenin ve luteolin gibi flavonoidlerin K562 lösemi hücrelerinde kanser önleyici etkilerini Comet testi ile değerlendirmiştir. K562 hücreleri, flavonoidlerin her birinin 100 μM konsantrasyonları ile ayrı ayrı ve kombinasyonlar halinde 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Tüm flavonoidlerin, 100 μM konsantrasyonda K562 hücrelerine potansiyel hasar verdiği gözlemlenmiştir. Flavonoidlerin DNA hasarını indüklediği saptanmıştır ve DNA hasarı oluşturma sıralaması mirisetin > kaempferol > kersetin > luteolin > apigenin olarak belirlenmiştir. Deneyler kombinasyon halinde gerçekleştirildiğinde kersetin ve mirisetin kombinasyonunun en fazla DNA hasarına neden olduğu iddia edilmiştir (171).

Bu üç çalışma yaptığımız çalışma ile birlikte değerlendirildiğinde, deney tasarımı olarak farklılık arz etse de sonuç olarak benzerlik göstermektedir. Her üç flavonoid de (kamferol, kersetin ve mirisetin) lösemi hücrelerinde DNA hasarı

meydana getirmiş ve bu hasar 50 μM H_2O_2 uygulanmış hücrelerin verdiği DNA hasarından daha fazladır.

Tez sonuçları göstermektedir ki kamferol, kersetin ve mirisetin akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki göstermektedir. Çalışılan flavonoidler hücre DNA'sında hasar meydana getirerek hücreleri apoptozise yönlendirmektedir. Tez çalışmamızın yanında benzer çalışmalar olması bu verileri desteklemektedir.

Bu bulgular dışında test edilen üç flavonoidten mirisetinin akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde sitotoksik olduğu gösterilmiş olsa da bu üç flavonoidin oksidatif enzimlerin aktivitesini etkileyip etkileyemeyeceği sorusu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, kamferol kersetin ve mirisetinin CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek gerekir.

Oksidatif strese karşı detoksifikasyonda rol alan enzimler, GPx ve CAT enzimleridir. Her iki enzim aktivitesinde oksidatif strese neden olan etkenler karşısında artma ya da azalma şeklinde değişiklikler meydana geldiği rapor edilmektedir. Kamferol, kersetin ve mirisetinin antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, bu tez çalışması kapsamında değerlendirilen bu flavonoidlerin CEM/C2 hücre hattında etkilerinin incelendiği çalışmaların son derece sınırlı olduğu belirlenmiştir.

Seerano ve arkadaşları kersetinin 5-50 μM konsantrasyonlarının etkilerini insan hepatom HepG2 hücrelerinde 4 ve 18 saat süreyle inkübasyondan sonra p38-MAPK ve Nrf2 protein ifadeleri analizi, GSH, GPx ve GR enzim aktiviteleri ölçümleri ile değerlendirmişlerdir. 50 μM kersetinin GPx aktivitesi 4 saat sonra artmış 18 saat sonra ise kontrol grubuna yakın bir değere dönmüştür (172).

Robaszkiewicz ve arkadaşları kersetinin non-small akciğer kanser (A549) hücrelerinde sitotoksite ve apoptozisin yanında toplam antioksidan kapasite ve SOD, CAT ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi bazı antioksidan enzim düzeylerini değerlendirmiştir. Kersetinin 5, 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonları bu hücrelere uygulanmış ve etkileri madde uygulanmayan hücrelere göre kıyaslanmıştır. SOD,

CAT ve GST enzim aktivitelerinde kersetin ile muamele edilen hücrelerde 1 ve 3 saatlik maruziyetten sonra önemli bir değişiklik görülmemiştir. 6 saatlik maruziyetten sonra antioksidan enzimlerin aktivitelerinde azalmaya sadece 100 µM kersetin uygulaması neden olmuştur (173).

Çalışmamızda ise CEM/C2 hücrelerine kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonları 48 saat süreyle uygulanmış, CAT ve GPx aktiviteleri değerlendirilmiştir. Kersetin ve mirisetinin CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Kamferolün uygulandığı hücrelerdeki CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre artış görülmüştür ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. GPx aktivitesi de CAT aktivitelerine yakın sonuçlar vermiştir. Kersetin ve mirisetinin uygulandığı hücrelerde GPx aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir. Ancak kamferolün uygulandığı hücrelerdeki CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre artış görülmüştür ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamız yukarıda bahsi geçen çalışmalarla kıyaslandığında deneysel tasarım farklılığından dolayı farklı sonuçlar bulunmuştur. Kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarının CEM/C2 hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığı ve hücrelerin oksidatif hasardan korunabilmek için adaptif bir savunma yanıtı geliştirdiği şeklinde yorumlanabilir. Kamferol için söz konusu olmasada bu flavonoidler IC₃₀ konsantrasyonlarında CEM/C2 hücrelerinde pro-oksidan özellik sergilemiştir. Ancak, bu konuda özellikle transkripsiyonel ve translasyonel düzeyle antioksidan enzimlerin mRNA ve protein düzeylerinin belirlendiği daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Glutasyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin, GSH), organizmada bulunan önemli antioksidan tiyoldür ve oksidatif stres sırasında redoks savunmasının merkezinde yer alır. Redükte glutasyon/okside glutasyon (GSH/GSSG) oranındaki değişiklikler, oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde kullanılan en önemli biyogöstergelerden biridir (90).

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonlarındaki çözeltileri CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılması sonucu GSH düzeyleri incelendiğinde farklı sonuçlar bulunmuştur. Kamferol ve kersetinin bu hücrelerdeki

GSH düzeyi kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterirken ($p < 0,001$), mirisetinin uygulandığı hücrelerin GSH düzeyleri kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak artış sergilemiştir ($p < 0,001$).

Membran lipitlerinin oksidatif hasarı sonucu lipit peroksidasyon meydana gelir ve peroksidasyon sonucunda toksik etkilere sahip MDA gibi lipit peroksidasyon ürünleri oluşturur. MDA, lipit peroksidasyonunun önemli göstergelerindedir. Hücre membranlarında yer alan lipitlerin peroksidasyonuna yol açarak membranların iyon geçirgenliğini bozar, DNA gibi önemli makromolekülleri etkileyerek ciddi hasarlara neden olabilir veya enzim aktivitelerini değiştirebilir (174).

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC_{30} konsantrasyonlarının CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılması sonucu lipit peroksidasyon düzeyi incelenmiştir. Üç flavonoidin uygulandığı hücrelerdeki lipit peroksidasyon düzeyleri kontrol grubuna göre kıyaslandığında artış göstermiştir. Kersetin ve mirisetin grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken kamferol grubundaki lipit peroksidasyon düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmemiştir. Bu durumda kamferol, kersetin ve mirisetin CEM/C2 hücrelerde ciddi membran hasarlarına yol açabileceği ve bunun da hücrenin ölümünü tetikleyecek mekanizmaları devreye sokabileceği öngörülebilir.

Kamferol, kersetin ve mirisetinin IC_{30} konsantrasyonlarının CEM/C2 hücrelerine 48 saat süreyle maruz bırakılması sonucu toplam antioksidan düzeyi değerlendirilmiştir. Kersetin ve mirisetinin uygulandığı hücrelerde toplam antioksidan düzeyleri kontrol grubu hücrelerinde göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Kamferolün uygulandığı hücrelerde ise kontrol grubuna göre toplam antioksidan düzeyi azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres uzun zamandır kanserle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bu ilişkinin doğası karmaşıktır. ROB ve oksidatif stres kanseri tetikleyebilir. Kanser hücreleri normal hücrelerden daha fazla ROB üretmektedir. Çeşitli kanser kemoterapötik ajanları tümör hücreleri için seçici olarak toksik olabilir, çünkü oksidatif stresi artırırlar ve zaten stres altında olan bu hücreleri

sınırlarının ötesine iterler (175). Yaptığımız çalışma bu tezi desteklemektedir. Çalıştığımız kamferol, kersertin ve mirisetin her ne kadar flavonoide göre değişiklik gösterse de çalıştığımız CEM/C2 hücrelerinin anti-oksidan enzimlerine etki etmiştir. Ayrıca bu hücre içerisindeki toplam anti-oksidan seviyelerini değiştirmiştir. Böylece kamferol, kersertin ve mirisetinin IC₃₀ konsantrasyonları CEM/C2 hücrelerinin oksidatif stresinde artışa neden olmuştur. ROB üretimini artıran veya ROB atma kapasitesini azaltan bir ajanın eklenmesi, bir tümör hücrelerini lipit peroksidasyon, DNA hasarı ve protein oksidasyonu açısından kırılma noktasının ötesine itebilir. Çalışmamızdaki GSH, lipit peroksidasyon sonuçları bu olguyu desteklerken Comet analiz sonuçları ise çalıştığımız kanser hücrelerin DNA'sında hasar meydana getirdiğini ispatlamaktadır.

Tabii ki, kanser çok sayıda genin aktivasyonu, mutasyonu veya baskılanmasından da kaynaklanan karışık mekanizmaya sahiptir. Bu nedenle bu çalışma, tüm kanser formlarının mutlaka ROB sinyalizasyonundaki bir artışla ilişkili olduğu sonucuna varmak için yeterli değildir.

6 SONUÇLAR

Dünyada hastalıklara bağlı ölüm sıralamasına bakıldığında kanser ikinci sırada yer almaktadır ve bu durum büyük bir halk sağlığı sorunudur. 2018 yılı verileri yaklaşık 18,1 milyon kişi kansere yakalandığını ve kanserin 9,6 milyon insanın ölümüne sebep olduğunu göstermektedir. 2010 yılında kanserin yıllık maliyetinin yaklaşık 1,16 trilyon ABD doları olduğu düşünülmektedir.

Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin bir veya daha fazla model içeren spesifik bir tedavi rejimi uygulanır. Tedavideki hedef, genellikle kanseri tedavi etmek veya yaşam kalitesiyle birlikte hayatını önemli ölçüde uzatmaktır.

Antikanser tedavisi hastalığın erken evrelerinde sıklıkla etkilidir, ancak ileri evrelerde tümörler genellikle aynı tedavilere dirençlidir. Kanser için yeni tedavi yöntemleri gereklidir, çünkü hastaların çoğu geleneksel kemoterapiye ilk tepkiye rağmen yaygın hastalıktan ölmeye devam etmektedir. Birçok antikanser ajanı, sağlıklı hücrelere özgüllük gösteren DNA veya hücre iskeletine zarar veren ilaçlardır.

Kanser vakalarının tedavi yöntemlerindeki mortalite oranı, yan etkiler ve yıllık maliyet göz önüne alındığında bu hastalık grubu için yeni tedavi yöntemleri gerekmektedir. Bitkiler, potansiyel eczanelerdir ve yüzyıllar boyunca hastalıklar için ilaç olarak kullanılmıştır. Bitki kaynaklı doğal bileşikler, yüksek biyoyararlanımları, güvenlikleri, minimal yan etkileri ve maliyet etkinlikleri düşünüldüğünde kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar sergileyebilir. Doğal bileşikler, antikanserojenik etkilerinden sorumlu olabilecek çoklu mekanizmalarda önemli roller oynayabilir.

Hücredeki programlanmış hücre ölümü ve ROB düzenlemesini tam olarak anlasak, kanser gibi hücreleri öldürebilir ve tedavi için yeni yöntemler geliştirebiliriz. Ancak süreçler olağanüstü karışıktır.

Yaptığımız tez çalışması ile insan diyetinde sık rastlanan kamferol, kersetin ve mirisetin gibi flavonoidlerin akut lenfoblastik lösemi hücrelerinden elde edilen CEM/C2 hücre hattında sitotoksik etkilerini inceledik. IC₅₀ değerlerini tespit ettik. IC₃₀ değerlerinde ise hücrelerin apoptotik etkilerini değerlendirdik. Çalıştığımız

maddelerin IC₃₀ konsantrasyonlarının kanser hücrelerini apoptozise götürdüğünü tespit ettik. Böylece programlanmış hücre ölümünü kontrol etmeye dayanan kanser tedavisine yönelik bir katkı sağladık. Comet yöntemi ile genotoksisite değerlendirildiğinde flavonoidlerin IC₃₀ konsantrasyonlarında hücrelerin DNA'larına hasar verdiğini gördük. Ayrıca bu hücre hattında ROB düzenlemesinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak antioksidan enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyon düzeylerinde kayda değer veriler tespit ettik.

Çalışmamız bitkilerden elde edilen kamferol, kersetin ve mirisetin flavonoidlerinin akut lenfoblastik lösemisinin tedavisi için umut verici yaklaşımlar ortaya koysa da veriler çok kompleks olan kanser hastalığında ufak bir yer teşkil etmektedir. Sonuç olarak çalışmamız antikanserojenik etkilerinden sorumlu olabilecek mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik deneylerin yanında *ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

7 KAYNAKLAR

- (1) A. Goel, A. B. Kunnumakkara, and B. B. Aggarwal, "Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 4, pp. 787–809, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.bcp.2007.08.016.
- (2) P. K. Mukherjee and A. Wahile, "Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 103, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.jep.2005.09.024.
- (3) T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343–356, 2005, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- (4) I. Górnaiak, R. Bartoszewski, and J. Króliczewski, *Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids*, vol. 18, no. 1. 2019.
- (5) "Kanser." [Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. [Accessed: 09-Dec-2019].
- (6) "Kanser Nedir? - Ulusal Kanser Enstitüsü." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- (7) D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Chapter 2: Hallmarks of Cancer: An Organizing Principle for Cancer Medicine."
- (8) D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- (9) D. Hanahan, "Rethinking the war on cancer," *Lancet*, vol. 383, no. 9916, pp. 558–563, Feb. 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62226-6.
- (10) "Lösemi — Hasta Sürümü - Ulusal Kanser Enstitüsü." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/types/leukemia>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- (11) M. Pokharel, "Leukemia : A Review Article," 2012.
- (12) T. Terwilliger and M. Abdul-Hay, "Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update," *Blood Cancer J.*, vol. 7, no. 6, p. e577, Jun. 2017, doi: 10.1038/bcj.2017.53.

- (13) PDQ Adult Treatment Editorial Board, *Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version*. 2002.
- (14) “(No Title).” [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- (15) “(No Title).” [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- (16) S. Paul, H. Kantarjian, and E. J. Jabbour, “Adult Acute Lymphoblastic Leukemia,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 91, no. 11, pp. 1645–1666, 2016, doi: 10.1016/j.mayocp.2016.09.010.
- (17) T. Terwilliger and M. Abdul-Hay, “Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update,” *Blood Cancer J.*, vol. 7, no. 6, p. e577, Jun. 2017, doi: 10.1038/bcj.2017.53.
- (18) C. J. Harrison, A. V. Moorman, C. Schwab, I. Iacobucci, and C. Mullighan, “Cytogenetics and Molecular Genetics,” in *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*, Springer International Publishing, 2017, pp. 61–98.
- (19) N. L. Harris *et al.*, “The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues,” *Ann. Oncol.*, vol. 10, no. 12, pp. 1419–1432, Dec. 1999, doi: 10.1023/A:1008375931236.
- (20) J. W. Vardiman *et al.*, “The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes,” 2009, doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- (21) D. A. Arber *et al.*, “The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia,” *Blood*, vol. 127, no. 20. American Society of Hematology, pp. 2391–2405, 19-May-2016, doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
- (22) R. T. Clarke, A. Van den Bruel, C. Bankhead, C. D. Mitchell, B. Phillips, and M. J. Thompson, “Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 101, no. 10, pp. 894–901, Oct. 2016, doi: 10.1136/archdischild-2016-311251.
- (23) PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version*. 2002.
- (24) “Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®)—Health Professional Version - National Cancer Institute.” [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/adult-all-treatment-pdq>. [Accessed: 09-Dec-2019].

- (25) "Cancer Tomorrow." [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. [Accessed: 08-Dec-2019].
- (26) "Cancer." [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed: 08-Dec-2019].
- (27) J. M. Matés, J. A. Segura, F. J. Alonso, and J. Márquez, "Oxidative stress in apoptosis and cancer: An update," *Arch. Toxicol.*, vol. 86, no. 11, pp. 1649–1665, 2012, doi: 10.1007/s00204-012-0906-3.
- (28) C. Martin-Cordero, A. Jose Leon-Gonzalez, J. Manuel Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, and M. Lopez-Lazaro, "Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents," *Curr. Drug Targets*, vol. 13, no. 8, pp. 1006–1028, 2012, doi: 10.2174/138945012802009044.
- (29) S. N. Bibi *et al.*, "Ethnopharmacology, phytochemistry, and global distribution of mangroves—a comprehensive review," *Marine Drugs*, vol. 17, no. 4. MDPI AG, 2019, doi: 10.3390/md17040231.
- (30) M. Abotaleb *et al.*, "Flavonoids in cancer and apoptosis," *Cancers*, vol. 11, no. 1. MDPI AG, 01-Jan-2019, doi: 10.3390/cancers11010028.
- (31) N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Analytical, Nutritional and Clinical Methods Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- (32) J. B. Harborne and C. A. Williams, "Advances in flavonoid research since 1992," *Phytochemistry*, vol. 55, no. 6, pp. 481–504, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- (33) M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J. F. Borzelleca, G. W. Flamm, G. M. Williams, and T. C. Lines, "A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 45, no. 11, pp. 2179–2205, 2007, doi: 10.1016/j.fct.2007.05.015.
- (34) A. W. Boots, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, "Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 585, no. 2–3, pp. 325–337, 2008, doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
- (35) C. Busch, M. Burkard, C. Leischner, U. M. Lauer, J. Frank, and S. Venturelli, "Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer," 2011, doi: 10.1186/s13148-

015-0095-z.

- (36) C. Rodríguez-García, C. Sánchez-Quesada, and J. J. Gaforio, "Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies," *Antioxidants*, vol. 8, no. 5, p. 137, May 2019, doi: 10.3390/antiox8050137.
- (37) M. L. Falcone Ferreyra, S. P. Rius, and P. Casati, "Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications," *Front. Plant Sci.*, vol. 3, no. SEP, pp. 1–15, 2012, doi: 10.3389/fpls.2012.00222.
- (38) B. W. Shirley, "Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway," *Trends Plant Sci.*, vol. 1, no. 11, pp. 377–382, Nov. 1996, doi: 10.1016/S1360-1385(96)80312-8.
- (39) E. R. Anderson, M. E. Lovin, S. J. Richter, and E. P. Lacey, "Multiple *Plantago* species (Plantaginaceae) modify floral reflectance and color in response to thermal change," *Am. J. Bot.*, vol. 100, no. 12, pp. 2485–2493, Dec. 2013, doi: 10.3732/ajb.1300180.
- (40) J.-H. B. Hatier and K. Gould, "Anthocyanin Function in Vegetative Organs," doi: 10.1007/978-0-387-77335-3_1.
- (41) C. Alasalvar, J. M. Grigor, D. Zhang, P. C. Quantick, and F. Shahidi, "Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 3, pp. 1410–6, Mar. 2001.
- (42) C. G. Fraga, M. Galleano, S. V. Verstraeten, and P. I. Oteiza, "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols," *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 435–445, 2010, doi: 10.1016/j.mam.2010.09.006.
- (43) T. yang Wang, Q. Li, and K. shun Bi, "Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 12–23, 2018, doi: 10.1016/j.ajps.2017.08.004.
- (44) D. K. Patel, K. Patel, M. Gadewar, and V. Tahilyani, "Pharmacological and bioanalytical aspects of galangin-a concise report," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, no. 1 SUPPL., pp. S449–S455, 2012, doi: 10.1016/S2221-1691(12)60205-6.
- (45) X. Wu, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, and R. L. Prior, "Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 12, pp. 4026–4037, Jun. 2004, doi: 10.1021/jf049696w.
- (46) M. G. L. Hertog *et al.*, "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the

- Zutphen Elderly Study,” *Lancet*, vol. 342, no. 8878, pp. 1007–1011, Oct. 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)92876-U.
- (47) L. Yochum, L. H. Kushi, K. Meyer, and A. R. Folsom, “Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 149, no. 10, pp. 943–949, May 1999, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009738.
- (48) C. Busch, M. Burkard, C. Leischner, U. M. Lauer, J. Frank, and S. Venturelli, “Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer,” *Clin. Epigenetics*, vol. 7, no. 1, Jul. 2015, doi: 10.1186/s13148-015-0095-z.
- (49) P. Batra and A. K. Sharma, “Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives,” *3 Biotech*, vol. 3, no. 6, pp. 439–459, 2013, doi: 10.1007/s13205-013-0117-5.
- (50) M. Rossi, C. Bosetti, E. Negri, P. Lagiou, and C. La Vecchia, “Flavonoids, proanthocyanidins, and cancer risk: A network of case-control studies from Italy,” *Nutr. Cancer*, vol. 62, no. 7, pp. 871–877, Oct. 2010, doi: 10.1080/01635581.2010.509534.
- (51) S. Rahman, F. Salehin, and A. Iqbal, “In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 11, Sep. 2011, doi: 10.1186/1472-6882-11-76.
- (52) N. Saewan, ... S. K.-J. of M., and undefined 2011, “Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC,” *researchgate.net*.
- (53) G. Seelinger, I. Merfort, U. Wölfle, C. S.- Molecules, and undefined 2008, “Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin,” *mdpi.com*.
- (54) H. Wei, L. Tye, E. Bresnick, D. B.-C. research, and undefined 1990, “Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice,” *AACR*.
- (55) T. Ohta, S. Nakatsugi, K. Watanabe, ... T. K.-, and undefined 2000, “Inhibitory effects of Bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazopyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial,” *academic.oup.com*.
- (56) T. Sato, L. Koike, Y. Miyata, M. Hirata, Y. M.-C. Research, and undefined 2002, “Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue,” *AACR*.
- (57) P. Ferguson, E. Kurowska, ... D. F.-T. J. of, and undefined 2004, “A flavonoid fraction from

cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines,” *academic.oup.com*.

- (58) J. D. Kim, L. Liu, W. Guo, and M. Meydani, “Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 3, pp. 165–176, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.06.006.
- (59) K. Amrutha *et al.*, “Discovery of lesser known flavones as inhibitors of NF- κ B signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells - A SAR study,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 24, no. 19, pp. 4735–4742, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.bmcl.2014.07.093.
- (60) K. P. Devi, T. Rajavel, S. Habtemariam, S. F. Nabavi, and S. M. Nabavi, “Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin,” *Life Sci.*, vol. 142, pp. 19–25, 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.004.
- (61) D. Maggioni *et al.*, “Myricetin and naringenin inhibit human squamous cell carcinoma proliferation and migration in vitro,” *Nutr. Cancer*, vol. 66, no. 7, pp. 1257–1267, 2014, doi: 10.1080/01635581.2014.951732.
- (62) J. L. Yi *et al.*, “Myricetin and methyl eugenol combination enhances the anticancer activity, cell cycle arrest and apoptosis induction of cis-platin against HeLa cervical cancer cell lines,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 8, no. 2, pp. 1116–1127, 2015.
- (63) K. J. Sung *et al.*, “Myricetin suppresses UVB-induced skin cancer by targeting Fyn,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 14, pp. 6021–6029, Jul. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0899.
- (64) S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- (65) W. Chaabane *et al.*, “Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer,” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 61, no. 1, pp. 43–58, Feb-2013, doi: 10.1007/s00005-012-0205-y.
- (66) G. Carella, “Introduction to apoptosis in ophthalmology,” *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 13 Suppl 3, pp. 1–26, 2003, doi: 10.1177/112067210301303s02.
- (67) J. Tower, “Programmed cell death in aging,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 23, no. PA, pp. 90–100, 2015, doi: 10.1016/j.arr.2015.04.002.
- (68) M. A. O’Brien and R. Kirby, “Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease,” *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, vol. 18, no. 6, pp. 572–585, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x.

- (69) I. Budihardjo, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang, "Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 269–290, Nov. 1999, doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.269.
- (70) S. M. Bugel, J. A. Bonventre, and R. L. Tanguay, "Comparative developmental toxicity of flavonoids using an integrative zebrafish system," *Toxicol. Sci.*, vol. 154, no. 1, pp. 55–68, 2016, doi: 10.1093/toxsci/kfw139.
- (71) A. Anwar, N. Uddin, B. S. Siddiqui, R. A. Siddiqui, S. Begum, and M. I. Choudhary, "A natural flavonoid lawsonaringenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells by targeting multiple signalling pathways," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 45, no. 5, pp. 1339–1348, Oct. 2018, doi: 10.1007/s11033-018-4294-5.
- (72) D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, and M. I. Panayiotidis, "Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 711, no. 1–2, pp. 167–173, 2011, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015.
- (73) P.-G. Pietta*, "Flavonoids as Antioxidants," 2000, doi: 10.1021/NP9904509.
- (74) K. Ishige, D. Schubert, and Y. Sagara, "Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 30, no. 4, pp. 433–446, 2001, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00498-6.
- (75) M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, and J. Lunec, "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease," *FASEB J.*, vol. 17, no. 10, pp. 1195–1214, Jul. 2003, doi: 10.1096/fj.02-0752rev.
- (76) M. D. Evans and M. S. Cooke, "Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids," *BioEssays*, vol. 26, no. 5, pp. 533–542, May 2004, doi: 10.1002/bies.20027.
- (77) B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, 1985.
- (78) M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- (79) W. Dröge, "Free radicals in the physiological control of cell function," *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 1, pp. 47–95, 2002, doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

- (80) M. Dizdaroglu, E. Coskun, and P. Jaruga, "Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques," *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 5, pp. 525–548, 2015, doi: 10.3109/10715762.2015.1014814.
- (81) J. M. McCord and M. A. Edeas, "SOD, oxidative stress and human pathologies: A brief history and a future vision," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 59, no. 4. Elsevier Masson SAS, pp. 139–142, 01-May-2005, doi: 10.1016/j.biopha.2005.03.005.
- (82) R. Kohen and A. Nyska, "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification," *Toxicologic Pathology*, vol. 30, no. 6. pp. 620–650, Nov-2002, doi: 10.1080/01926230290166724.
- (83) B. Halliwell and S. Chirico, "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 5, pp. 715S-725S, May 1993, doi: 10.1093/ajcn/57.5.715S.
- (84) Y. Yoshida, A. Umeno, and M. Shichiri, "Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo," *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 52, no. 1. pp. 9–16, Jan-2013, doi: 10.3164/jcfn.12-112.
- (85) J. D. Hayes and L. I. McLellan, "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress.," *Free Radic. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 273–300, Oct. 1999.
- (86) J. M. Matés, "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.," *Toxicology*, vol. 153, no. 1–3, pp. 83–104, Nov. 2000.
- (87) M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability.," *Ann. Ist. Super. Sanita*, vol. 43, no. 4, pp. 348–61, 2007.
- (88) A. Ebrahimi and H. Schluesener, "Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls," *Ageing Res. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 329–345, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.arr.2012.01.006.
- (89) R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, and C. Giovannini, "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 10. pp. 577–586, Oct-2005, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- (90) S. K. Biswas and I. Rahman, "Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation:

The role of glutathione,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 30, no. 1–2. pp. 60–76, Feb-2009, doi: 10.1016/j.mam.2008.07.001.

- (91) S. Prasad, S. C. Gupta, and A. K. Tyagi, “Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals,” *Cancer Lett.*, vol. 387, pp. 95–105, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.CANLET.2016.03.042.
- (92) C. Wang *et al.*, “Wushen, a food mixture containing 55 different natural ingredients, inhibits S180 tumor growth in vivo,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 7, pp. 1475–1480, 2014, doi: 10.1039/c4fo00008k.
- (93) J. A. Lee *et al.*, “Fermented prunus mume with probiotics inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate induced skin carcinogenesis through alleviation of oxidative stress,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 14, no. 5, pp. 2973–2978, 2013, doi: 10.7314/APJCP.2013.14.5.2973.
- (94) S. Prasad, V. R. Yadav, R. Kannappan, and B. B. Aggarwal, “Ursolic acid, a pentacyclin triterpene, potentiates trail-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: Evidence for the role of reactive oxygen species and JNK,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 7, pp. 5546–5557, Feb. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.183699.
- (95) L. Yi, Y. Zongyuan, G. Cheng, Z. Lingyun, Y. GuiLian, and G. Wei, “Quercetin enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in ovarian cancer cells through reactive oxygen species (ROS) mediated CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)-death receptor 5 pathway,” *Cancer Sci.*, vol. 105, no. 5, pp. 520–527, May 2014, doi: 10.1111/cas.12395.
- (96) J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, and M. Lopez-Lazaro, “A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 298–344, Apr. 2011, doi: 10.2174/138955711795305335.
- (97) B. Winkel-Shirley, “Biosynthesis of flavonoids and effects of stress,” *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 5, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 218–223, 2002, doi: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
- (98) V. Crespy *et al.*, “The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound,” *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 284, no. 6, pp. G980–G988, Jun. 2003, doi: 10.1152/ajpgi.00223.2002.
- (99) E. . Oliveira and D. . Watson, “In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes,” *FEBS Lett.*, vol. 471, no. 1, pp. 1–6, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0014-

5793(00)01355-7.

- (100) R. Edenharder and X. Tang, "Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 35, no. 3–4, pp. 357–372, 1997, doi: 10.1016/S0278-6915(97)00125-7.
- (101) A. R. Francis, T. K. Shetty, and R. K. Bhattacharya, "Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine," *Carcinogenesis*, vol. 10, no. 10, pp. 1953–1955, 1989, doi: 10.1093/carcin/10.10.1953.
- (102) I. D. Silva, A. Rodrigues, J. Gaspar, R. Mala, A. Laires, and J. Rueff, "Mutagenicity of kaempferol in V79 cells: The role of cytochromes P450," *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, vol. 16, no. 4, pp. 229–241, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1520-6866(1996)16:4<229::AID-TCM4>3.0.CO;2-K.
- (103) P. Niering *et al.*, "Protective and detrimental effects of kaempferol in rat H4IIE cells: Implication of oxidative stress and apoptosis," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 209, no. 2, pp. 114–122, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.taap.2005.04.004.
- (104) L. Mira, M. T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. H. Florêncio, and K. R. Jennings, "Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity," *Free Radic. Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 1199–1208, Nov. 2002, doi: 10.1080/1071576021000016463.
- (105) M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, and R. Apak, "Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method," *Anal. Chim. Acta*, vol. 636, no. 1, pp. 42–50, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.01.037.
- (106) N. Doronicheva, H. Yasui, and H. Sakurai, "Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 30, no. 2, pp. 213–217, Feb. 2007, doi: 10.1248/bpb.30.213.
- (107) L. Wang *et al.*, "Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*," *Arch. Toxicol.*, vol. 81, no. 26, pp. 9798–9804, 2007, doi: 10.1021/jf0620719.
- (108) F. Bonina *et al.*, "In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds," *J. Cosmet. Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 321–335, Nov. 2002.

- (109) R. Garcia-Closas, C. A. Gonzalez, A. Agudo, and E. Riboli, "Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain," *Cancer Causes Control*, vol. 10, no. 1, pp. 71–75, 1999, doi: 10.1023/A:1008867108960.
- (110) Y. Cui *et al.*, "Dietary flavonoid intake and lung cancer - A population-based case-control study," *Cancer*, vol. 112, no. 10, pp. 2241–2248, May 2008, doi: 10.1002/cncr.23398.
- (111) M. A. Gates, S. S. Tworoger, J. L. Hecht, I. De Vivo, B. Rosner, and S. E. Hankinson, "A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 121, no. 10, pp. 2225–2232, Nov. 2007, doi: 10.1002/ijc.22790.
- (112) U. Nöthlings, S. P. Murphy, L. R. Wilkens, B. E. Henderson, and L. N. Kolonel, "Flavonols and pancreatic cancer risk: The multiethnic cohort study," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 166, no. 8, pp. 924–931, Oct. 2007, doi: 10.1093/aje/kwm172.
- (113) D. Anderson, N. Basaran, M. M. Dobrzyńska, A. A. Basaran, and T. W. Yu, "Modulating effects of flavonoids on food mutagens in human blood and sperm samples in the comet assay.," *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, vol. 17, no. 2, pp. 45–58, 1997.
- (114) E. Cemeli, T. E. Schmid, and D. Anderson, "Modulation by flavonoids of DNA damage induced by estrogen-like compounds," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 44, no. 5, pp. 420–426, 2004, doi: 10.1002/em.20071.
- (115) F. Casagrande and J. M. Darbon, "Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 61, no. 10, pp. 1205–15, May 2001, doi: 10.1016/s0006-2952(01)00583-4.
- (116) A. Y. Chen and Y. C. Chen, "A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 4, pp. 2099–2107, 15-Jun-2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.139.
- (117) S. F. Nabavi, G. L. Russo, M. Daglia, and S. M. Nabavi, "Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat!," *Food Chem.*, vol. 179, pp. 305–310, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.006.
- (118) W. Wang *et al.*, "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review," 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.004.
- (119) A. Aras *et al.*, "Targeting cancer with nano-bullets: curcumin, EGCG, resveratrol and quercetin on flying carpets.," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 9, pp. 3865–71, 2014, doi:

10.7314/apjcp.2014.15.9.3865.

- (120) M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto, and G. L. Russo, "The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 6–15, 2012, doi: 10.1016/j.bcp.2011.08.010.
- (121) P. C. Hollman, J. H. de Vries, S. D. van Leeuwen, M. J. Mengelers, and M. B. Katan, "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 62, no. 6, pp. 1276–1282, Dec. 1995, doi: 10.1093/ajcn/62.6.1276.
- (122) T. Okamoto, "Safety of quercetin for clinical application (Review).," *International journal of molecular medicine*, vol. 16, no. 2. pp. 275–278, 2005, doi: 10.3892/ijmm.16.2.275.
- (123) I. Erlund, "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology," *Nutr. Res.*, vol. 24, no. 10, pp. 851–874, Oct. 2004, doi: 10.1016/J.NUTRES.2004.07.005.
- (124) M. Dueñas, ... S. G.-M.-... of P. and, and undefined 2010, "Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin," *Elsevier*.
- (125) S. Anandam and S. Selvamuthukumar, "Fabrication of cyclodextrin nanospheres for quercetin delivery: Physicochemical characterization, photostability, and antioxidant effects," *J. Mater. Sci.*, vol. 49, no. 23, pp. 8140–8153, Dec. 2014, doi: 10.1007/s10853-014-8523-6.
- (126) R. Kleemann *et al.*, "Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models," *Atherosclerosis*, vol. 218, no. 1, pp. 44–52, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.023.
- (127) A. Kumari, S. K. Yadav, Y. B. Pakade, B. Singh, and S. C. Yadav, "Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 80, no. 2, pp. 184–192, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.06.002.
- (128) S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, S. Eslami, and A. H. Moghaddam, "In vivo protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue," *Food Chem.*, vol. 132, no. 2, pp. 931–935, May 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.070.
- (129) L. C. Wilms, J. C. S. Kleinjans, E. J. C. Moonen, and J. J. Briedé, "Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro," *Toxicol. Vitro.*, vol. 22, no. 2, pp. 301–307, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.tiv.2007.09.002.
- (130) A. Murakami, H. Ashida, and J. Terao, "Multitargeted cancer prevention by quercetin," *Cancer*

Lett., vol. 269, no. 2, pp. 315–325, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.CANLET.2008.03.046.

- (131) J.-H. Jeong, J. Y. An, Y. T. Kwon, J. G. Rhee, and Y. J. Lee, “Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 106, no. 1, pp. 73–82, Jan. 2009, doi: 10.1002/jcb.21977.
- (132) D. T. Cosan, A. Soyocak, A. Basaran, I. Degirmenci, H. V. Gunes, and F. M. Sahin, “Effects of various agents on DNA fragmentation and telomerase enzyme activities in adenocarcinoma cell lines,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, no. 4, pp. 2463–2469, Apr. 2011, doi: 10.1007/s11033-010-0382-x.
- (133) J. M. Harnly *et al.*, “Flavonoid Content of U.S. Fruits, Vegetables, and Nuts,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 26, pp. 9966–9977, Dec. 2006, doi: 10.1021/jf061478a.
- (134) Y. Oyama, P. A. Fuchs, N. Katayama, and K. Noda, “Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca²⁺-loaded brain neurons,” *Brain Res.*, vol. 635, no. 1–2, pp. 125–129, Jan. 1994, doi: 10.1016/0006-8993(94)91431-1.
- (135) C. Ozcan and M. Yaman, “Determination of myricetin in medicinal plants by high-performance liquid chromatography,” *Instrum. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 1, pp. 44–52, 2015, doi: 10.1080/10739149.2014.940533.
- (136) K. S. Park, Y. Chong, and M. K. Kim, “Myricetin: biological activity related to human health,” *Appl. Biol. Chem.*, vol. 59, no. 2, pp. 259–269, 2016, doi: 10.1007/s13765-016-0150-2.
- (137) P. C. H. Hollman and M. B. Katan, “Health effects and bioavailability of dietary flavonols,” in *Free Radical Research*, 1999, vol. 31, no. SUPPL., doi: 10.1080/10715769900301351.
- (138) D. K. Semwal, R. B. Semwal, S. Combrinck, and A. Viljoen, “Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities,” *Nutrients*, vol. 8, no. 2, pp. 1–31, 2016, doi: 10.3390/nu8020090.
- (139) Y. Yang *et al.*, “SNARE-wedging polyphenols as small molecular botox,” *Planta Med.*, vol. 78, no. 3, pp. 233–236, 2012, doi: 10.1055/s-0031-1280385.
- (140) K. C. Ong and H.-E. Khoo, “Biological effects of myricetin,” *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.*, vol. 29, no. 2, pp. 121–126, Aug. 1997, doi: 10.1016/S0306-3623(96)00421-1.
- (141) Z. H. Wang *et al.*, “Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 29, no. 1, pp. 12–18, Jan.

- 2010, doi: 10.1016/j.etap.2009.08.007.
- (142) P. Mladěnka *et al.*, “In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 5, pp. 693–701, May 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.02.003.
- (143) V. Chobot and F. Hadacek, “Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin,” *Redox Rep.*, vol. 16, no. 6, pp. 242–247, Nov. 2011, doi: 10.1179/1351000211Y.0000000015.
- (144) X. H. Zhang, Z. Q. Zou, C. W. Xu, Y. Z. Shen, and D. Li, “Myricetin induces G2/M phase arrest in HepG2 cells by inhibiting the activity of the cyclin B/Cdc2 complex,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 4, no. 2, pp. 273–277, Mar. 2011, doi: 10.3892/mmr.2011.417.
- (145) N. J. Kang, S. K. Jung, K. W. Lee, and H. J. Lee, “Myricetin is a potent chemopreventive phytochemical in skin carcinogenesis,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1229, no. 1, pp. 124–132, Jul. 2011, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06122.x.
- (146) F. Sun, X. Y. Zheng, J. Ye, T. T. Wu, J. L. Wang, and W. Chen, “Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo,” *Nutr. Cancer*, vol. 64, no. 4, pp. 599–606, 2012, doi: 10.1080/01635581.2012.665564.
- (147) P. Morales and A. I. Haza, “Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 32, no. 12, pp. 986–993, Dec. 2012, doi: 10.1002/jat.1725.
- (148) E. Cemeli, A. Baumgartner, and D. Anderson, “Antioxidants and the Comet assay,” *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 681, no. 1, pp. 51–67, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.mrrev.2008.05.002.
- (149) S. P. Jackson, “The recognition of DNA damage,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 6, no. 1, pp. 19–25, 1996, doi: 10.1016/S0959-437X(96)90005-2.
- (150) P. Moller, L. E. Knudsen, S. Loft, and H. Wallin, “The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors,” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 9, no. 10, pp. 1005–1015, 2000.
- (151) P. Moller, “The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures,” *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 98, no. 4, pp. 336–345, Apr. 2006, doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x.
- (152) *Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*. OECD Publishing, 2014.

- (153) T. S. Kumaravel, B. Vilhar, S. P. Faux, and A. N. Jha, "Comet Assay measurements: A perspective," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 53–64, Feb-2009, doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.
- (154) "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI." [Online]. Available: <https://www.biolegend.com/en-us/products/fic-annexin-v-apoptosis-detection-kit-with-pi-8230>. [Accessed: 19-Dec-2019].
- (155) Y. H. Choi and G. H. Yan, "Pycnogenol® inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells," *Phyther. Res.*, vol. 23, no. 12, pp. 1691–1695, Dec. 2009, doi: 10.1002/ptr.2812.
- (156) R. Xu *et al.*, "Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 in vitro," *Elsevier*.
- (157) F. Sun, X. Y. Zheng, J. Ye, T. T. Wu, J. L. Wang, and W. Chen, "Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo," *Nutr. Cancer*, vol. 64, no. 4, pp. 599–606, May 2012, doi: 10.1080/01635581.2012.665564.
- (158) Q. Zhang, X. Zhao, Z. W.-F. and C. Toxicology, and undefined 2008, "Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis," *Elsevier*.
- (159) X.-H. Zhang *et al.*, "Myricetin Induces Apoptosis in HepG2 Cells Through Akt/p70S6K/Bad Signaling and Mitochondrial Apoptotic Pathway."
- (160) E. J. Choi, S. M. Bae, and W. S. Ahn, "Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 31, no. 10, pp. 1281–1285, Oct. 2008, doi: 10.1007/s12272-001-2107-0.
- (161) S. Srivastava *et al.*, "Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis," *Sci. Rep.*, vol. 6, Apr. 2016, doi: 10.1038/srep24049.
- (162) G. Marfe *et al.*, "Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction," *J. Cell. Biochem.*, vol. 106, no. 4, pp. 643–650, Mar. 2009, doi: 10.1002/jcb.22044.
- (163) H. Pan *et al.*, "Myricetin is a novel inhibitor of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase with anti-leukemia activity," *Elsevier*.

- (164) G. Rusak, H. Gutzeit, J. M.-N. Research, and undefined 2005, "Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells," *Elsevier*.
- (165) J. Matsui *et al.*, "Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells," *Leuk. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 573–581, 2005, doi: 10.1016/j.leukres.2004.11.015.
- (166) M. López-Lázaro, E. Willmore, and C. A. Austin, "The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 696, no. 1, pp. 41–47, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.010.
- (167) F. Brisdelli, C. Coccia, B. Cinque, M. G. Cifone, and A. Bozzi, "Induction of apoptosis by quercetin: Different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 296, no. 1–2, pp. 137–149, Feb. 2007, doi: 10.1007/s11010-006-9307-3.
- (168) M. Moradzadeh *et al.*, "Kaempferol increases apoptosis in human acute promyelocytic leukemia cells and inhibits multidrug resistance genes," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 2, pp. 2288–2297, Feb. 2018, doi: 10.1002/jcb.26391.
- (169) L. Y. Wu *et al.*, "Kaempferol induces DNA damage and inhibits DNA repair associated protein expressions in human promyelocytic leukemia HL-60 cells," *Am. J. Chin. Med.*, vol. 43, no. 2, pp. 365–382, Apr. 2015, doi: 10.1142/S0192415X1550024X.
- (170) P. A. Ragazzon, T. Bradshaw, C. Matthews, J. Iley, and S. Missailidis, "The characterisation of flavone-DNA isoform interactions as a basis for anticancer drug development," *Anticancer Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 2273–2283, 2009.
- (171) A. Das, D. Majumder, and C. Saha, "Correlation of binding efficacies of DNA to flavonoids and their induced cellular damage," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 170, pp. 256–262, May 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.019.
- (172) A. B. Granado-Serrano, M. A. Martín, L. Bravo, L. Goya, and S. Ramos, "Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 195, no. 2, pp. 154–164, 2012, doi: 10.1016/j.cbi.2011.12.005.
- (173) A. Robaszekiewicz, A. Balcerczyk, and G. Bartosz, "Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells," *Cell Biol. Int.*, vol. 31, no. 10, pp. 1245–1250, 2007, doi: 10.1016/j.cellbi.2007.04.009.
- (174) P. F. Good, P. Werner, A. Hsu, C. W. Olanow, and D. P. Perl, "Evidence for neuronal oxidative

damage in Alzheimer's disease," *Am. J. Pathol.*, vol. 149, no. 1, pp. 21–28, Jul. 1996.

- (175) P. T. Schumacker, "Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 175–176, 2006, doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.015.



ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Serdar ÇETİNKAYA
 Doğum yeri ve tarihi : Konya 21.07.1981
 Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Medeni durumu : Evli
 Askerlik durumu : Muaf
 İletişim adresi ve telefonu : Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ecz.Bil.Mrk. Ankara
 0312 304 60 73
 serdarctnkaya@gmail.com
 Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Yüksek Lisans	GATA Ecz.Bil. Mrk. F.Toksikoloji AD.	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Batıkent Mobil Lisesi	1998

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

2009-2010	İlaç Fabrikası Kom.	Kalite Kont. Kısım Amiri
2010-2013	Kara Kuvvetleri Kom.	Tahakkuk Sb.
2012-2012	Kabil As.Has.	Eczacı Sb.
2013-2016	GATA	Arş.Gör.
2016-devam ediyor	SBU	Arş.Gör.

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Toksikoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımlar

1. K. Demirkaya, B. C. Demirören, Z. O. Torun, O. Erdem, S. Cetinkaya & C. Akay, In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium levels in rats, European Journal of Oral Sciences,

2016, 0909-8836, 124, 1, 75-81.

2. Arslan, F., Yıldızoğlu, Ü., Durmaz, A., & Çetinkaya, S. (2018). Improving the rhinomanometry technique using benzoin tincture. *The Journal of Laryngology & Otology*, 132(5), 404-407.
3. Arslan, A., Ozkan, C. K., Sig, A. K., Dogan, E., Esim, O., Cetinkaya, S., ... & Ozkan, Y. (2018). Evaluation of A Novel Oxiconazole Nitrate Formulation: The Thermosensitive Gel. *Saudi Pharmaceutical Journal*.

Uluslararası Kongrelerde Sunulmuş Bildirimler

1. A Arslan, C. Köse Özkan, E. Dođan, A. K. Siđ, Ö. Eşim, S. Çetinkaya, F. Atalay, A. Savaşer & Y. Özkan, Determination Of Oxiconazole Nitrate's Antifungal Activity Characterization Against Candida Albicans Types And Comparison With Developed Thermosensitive Gel Formulation, Poster Sunumu, 2nd International Gazi Pharma Symposium, 11 Ekim 2017, 13 Ekim 2017.
2. T. Bayhan, O. Erdem, Ş. Ünal Cangül, F. Gümrük, S. Çetinkaya, E. Çırak & İ. Eker, Fanconi Aplastik Anemili Hastalarda Ağır Metal Düzeyi, Poster Sunumu, 11. Ulusal Pediatrik Hematoloji Kongresi, 04 Mayıs 2017, 07 Mayıs 2017.
3. E. Çırak, O. Erdem, S. Çetinkaya, S. T. Ceyhan, C. Akay, C. Korkmaz & M. Ulubay, Assessment Of Heavy Metal Levels In Follicular Fluid Of Women With Unexplained Infertility, Poster Sunumu, 2nd International Congress Of Forensic Toxicology, 26 Mayıs 2016, 30 Mayıs 2016.
4. S. Çetinkaya, Investigation Of Heavy Metals In Some Lipstick Products In Turkey, Poster Sunumu, 2nd International Congress Of Forensic Toxicology, 26 Mayıs 2016, 30 Mayıs 2016.
5. N. Gezer, O. Erdem, S. Çetinkaya, E. Çırak, C. Akay & Z. Kayaaltı, Investigation Of Toxic Heavy Metals In Mineral Water Samples Sold In Turkey, Sözlü Sunum, 2nd International Congress Of Forensic Toxicology Congress., 26 Mayıs 2016, 30 Mayıs 2016.
6. O. Erdem, S. Çetinkaya, M. Kaplan, E. Çırak, S. Gökçe & C. Akay, Micronuclei Frequencies In Oral Mucosa Cells In Patients Undergoing Nickel-titanium Orthodontic Archwires Therapy, Poster Sunumu, 51st Congress Of European Society Of Toxicology, 13 Eylül 2015, 16 Eylül 2015.