

HAZİRAN 2018

Yüksek Lisans Biyoloji Bölümü

Sami Serhat TONUS

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OZONLANMIŞ FINDIK YAĞI'NIN SİTOTOKSİK ETKİ
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

SAMİ SERHAT TONUS

HAZİRAN 2018

**Ozonlanmış Fındık Yağı'nın Sitotoksik Etki Potansiyelinin
Belirlenmesi**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Sibel BAYIL OĞUZKAN

Sami Serhat TONUS

Haziran 2018



©2018 [Sami Serhat TONUS]

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Ozonlanmış Fındık Yağı'nın Sitotoksik Etki Potansiyelinin Belirlenmesi

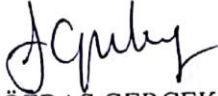
Öğrencinin, Adı Soyadı: Sami Serhat TONUS

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2018 Saat: 10:00

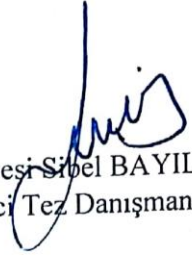
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

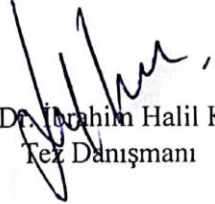

Prof. Dr. A Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.


Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Dr. Öğr. Üyesi Sibel BAYIL OĞUZKAN
İkinci Tez Danışmanı


Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvanı, Adı ve Soyadı):

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin TEKİN

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KÖÇKAR

İmzası


.....

.....

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Sami Serhat TONUS



Çok Kıymetli Aileme ve desteğini esirgemeyen herkese...

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYTOTOXIC EFFECT POTENTIAL OF OZONATED HAZELNUT OIL

TONUS, Sami Serhat

M.Sc. in Biology Department

Supervisor Assoc. Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Co-advisor Asst. Prof. Dr. Sibel BAYIL OĞUZKAN

June 2018

46 Pages

Hazelnut is an extremely important agricultural product with high nutritional value produced in our country. The use of hazelnut oil has also increased and the ozonated form has never been obtained before. Ozonated vegetable oils are preferred for ozone treatment because they are easy to apply and obtain. In this study, refined hazelnut oil was used as a control group in this study in order to determine the cytotoxic effect potential of hazelnut oils obtained by ozonation at 7-8 different times and the density, viscosity, peroxide and iodine values were determined. Potential cytotoxic effect was determined by MTT test in 3 different cell lines to determine the safe use of ozonated hazelnut oil (samples 2, 3, 4, 5). For this, viability rates were calculated at 5 different concentrations of each sample after 48 and 72 hours incubation in H1299 lung cancer, HUVEC endothelial cells and A549 cell line. As a result, it was determined that there was no cytotoxic effect of hazelnut oil applied at 3 different cell lines at 5 different concentrations (100/ 50/ 25/ 12,5/ 6,25 µg/ml). At the same time, it was also shown that there was no toxic effect of ozonation of the samples when compared with refined ozonated hazelnut oil. For this reason, ozonated hazelnut oils can be used as an alternative to refined hazelnut oil without any toxic effects resulting from the ozonation process. This information has led to the conclusion that ozone can be used safely in the absence of a cytotoxic effect of hazelnut oil ozonation in the light, but it can also be produced as a functional oil containing pharmacological effects as well as cosmetic effects.

Key Words: MTT, Ozone oil, Hazelnut, Cytotoxic effect, Functional oil

ÖZET

OZONLANMIŞ FINDIK YAĞI'NIN SİTOTOKSİK ETKİ POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

TONUS, Sami Serhat

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

İkinci Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Sibel BAYIL OĞUZKAN

Haziran 2018

46 Sayfa

Fındık ülkemizde üretilen besleyici değeri yüksek olan son derece önemli bir tarım ürünüdür. Fındık yağının kullanımı da giderek artmakla beraber ozonlanmış formu daha önce hiç elde edilmemiştir. Ozonlu bitkisel yağlar, uygulanması ve elde edilmesi kolay olduğu için ozon tedavisinde çok tercih edilmektedir. Bu çalışma kapsamında 7-8 debide farklı sürelerde ozonlanarak elde edilen ve dansitesi, viskozitesi, peroksit ve iyot değerleri belirlenmiş olan fındık yağlarının sitotoksik etki potansiyelinin belirlenmesi amacıyla bu çalışmada kontrol grubu olarak ticari form olan rafine fındık yağı kullanılmıştır. Ozonlanmış fındık yağlarının (2, 3, 4, 5 nolu örnekler) güvenli bir şekilde kullanılabilirliğinin tespiti için 3 farklı hücre hattında MTT testi uygulanması ile sitotoksik etki potansiyeli belirlendi. Bunun için H1299 akciğer kanseri, HUVEC endotel hücreleri ve A549 hücre dizisinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası her numunenin 5 farklı konsantrasyonunda ki canlılık oranları hesaplandı. Sonuç olarak 3 farklı hücre hattına 5 farklı konsantrasyonda (100/50/25/12,5/6,25 µg/ml) uygulanan fındık yağlarının sitotoksik bir etkisinin olmadığı saptandı. Aynı zamanda rafine ozonlanmış fındık yağı ile kıyaslandığında numunelerin ozonlanma ile oluşan toksik bir etkisinin olmadığı da ortaya konuldu. Bu nedenle ozonlanmış fındık yağlarının, rafine fındık yağına alternatif bir ürün olarak ozonlama işleminden kaynaklanan herhangi bir toksik etkisinin olmadan kullanılabilmesi bu çalışma ile ortaya konuldu. Bu bilgiler ışığında fındık yağının ozonlanmasının sitotoksik bir etkisinin olmaması güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi aynı zamanda ozonun gerek farmakolojik gerekse de kozmetik etkilerini de bünyesinde bulunduran fonksiyonel bir yağ olarak üretilebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: MTT, Ozonlu yağ, Fındık, Sitotoksik etki, Fonksiyonel yağlar

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden beri hiçbir bilgisini, yardımını, emeğini esirgemeyen, her koşulda bize sabırlı ve iradeli olmayı öğütleyen, bir işi yaparken özenli ve dikkatli bir şekilde yapmamız gerektiğini bize aşıl原因, sadece akademik olarak değil manevi olarak da desteğini hiç eksik etmeyen danışman hocam Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışma kapsamında projeye destek veren Gaziantep Üniversitesi Rektörlüğüne ve Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Yönerim Birimine teşekkürlerimizi sunarım.

Lisans eğitimi sırasında tanıdığım ve karakteri ile bizlere bir öncü olan, duruşu ile bizlere güven veren, akademik çalışmaları ve bilimsel bilgisi ile bizlere ışık tutan Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN hocama sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Lisans eğitimim sırasında tanıdığım, bize bir hocadan çok abla gibi davranan, Y. Lisans çalışmalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e yaptığım hatayı affederek göstermiş olduğu büyüklüğü unutmam imkansız olup kendisine özürlerimi sunar desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Maddelerin temininde, fiziksel ve kimyasal analizlerinin yapılmasında her türlü imkanı bize sağlayan Prof. Dr. İbrahim Halil UĞRAŞ hocama teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans döneminde tanıdığım ve hem hayat anlamında hem akademik anlamda bana çok yardımcı olan ve yol gösteren, neşeli kişiliği ve pozitif duruşu ile daima öncü olan ikinci danışmanım Yrd. Doç. Sibel BAYIL OĞUZKAN hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans çalışmaları sırasında maddi ve manevi yardımını benden esirgemeyen, desteğini sürekli hissettiğim Asiye GÖZÜBÜYÜK'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Çalışmalar sırasında bilgilerini benden esirgemeyen her konuda yardımcı olan Canan AFACAN, Bekir Sıddık KURT, Mesut ÇAY arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Fındık (<i>Corylus L.</i>).....	1
1.2. Fındığın Ekonomik Önemi.....	3
1.3. Fındık İçereği, Yağ Eldesi ve Ozonlanmış Yağlar.....	5
1.4 Hücre Kültürü ve Sitotoksisite Çalışmaları	10
1.5. Hücre Hatları.....	12
1.5.1. H1299 ve A549 Hücre Hatları.....	12
1.5.2. HUVEC Hücre Hattı	12
BÖLÜM 2	15
LİTERATÜR ÖZETİ	15
BÖLÜM 3	17
MATERYAL ve Yöntem	17
3.1. Deney Yağları	17
3.2. Fiziksel Analizler.....	18
3.2.1. Viskozite Ölçümü.....	18
3.2.2. Yoğunluk Ölçümü	18

3.3 Kimyasal Analizler.....	19
3.3.1 Peroksit Değerleri.....	19
3.3.2 İyot Değeri Tayini.....	20
3.3.3 Yağ Asidi Bileşeni Analizi.....	21
3.4 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları.....	23
3.4.1 Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması.....	23
3.4.2 Hücrelerin Sayımı.....	23
3.4.3 MTT Canlılık Belirleme Yöntemi.....	25
3.5 İstatistiksel Analiz.....	27
BÖLÜM 4	28
BULGULAR	28
BÖLÜM 5	38
TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	41

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1 Dünya Fındık Üretim Verileri (Kabuklu/ Bin ton).....	4
Tablo 2 Fındığın Genel Bileşimi (%).....	6
Tablo 3 Fındık İçerisindeki Vitamin Kompozisyonu.....	6
Tablo 4 Çalışmada Kullanılan Numune Kodları ve İçerikleri.....	17
Tablo 5 Numunelerin Viskozite Ölçüm Sonuçları.....	18
Tablo 6 Numunelerin Yoğunluk Ölçüm Değerleri.....	19
Tablo 7 Numunelerin Peroksit Ölçüm Değerleri.....	20
Tablo 8 Numune İyot Değerleri.....	21
Tablo 9 Numunelerin Yağ Asidi % içerikleri.....	22
Tablo 10 Ozonlanmış Fındık Yağı Numunelerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	28
Tablo 11 MTT sonucu Tüm Hücre Hatları, İnkübasyon Süreleri, Konsantrasyonlar ve Canlılık Oranları.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1 Türkiye’de illere göre fındık bahçelerinin dağılımı.....	2
Şekil 2 Fındık Üretiminin İllere Göre Dağılım.....	2
Şekil 3 Ozon Molekülü.....	8
Şekil 4 Ozonlu yağ molekülü örneği (Trioleil gliserit).....	9
Şekil 5 Hücre Kültür Laboratuvar Çalışmaları.....	10
Şeki 6 MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları	11
Şekil 7 H1299 Hücre Hattı Görüntüsü	13
Şekil 8 A549 Hücre Hattı Görüntüsü	13
Şekil 9 HUVEC Hücre Hattı Görüntüsü.....	14
Şekil 10 Thoma Lamı	24
Şekil 11 Formazan kristalleri mikroskop görüntüsü.....	26
Şekil 12a Ozonlanmamış rafine fındık yağı (1nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları	30
Şekil 12b Ozonlanmamış rafine fındık yağı (1nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları	30
Şekil 13a 7-8debi 60dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (2nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	31
Şekil 13b 7-8debi 60dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (2nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları	31

Şekil 14a 7-8debi 120dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (3nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	32
Şekil 14b 7-8debi 120dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (3nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	32
Şekil 15a 7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (4nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	33
Şekil 15b 7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (4nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	33
Şekil 16a 7-8debi 120dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (5nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	34
Şekil 16b 7-8debi 120dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (5nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları.....	34

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

Cpt	Santipoise (viskozite birimi)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
GC	Gaz Kromatografisi
HClO	Hipoklorik asit
HPLC	Yüksek Basıncılı sıvı Kromatografi
MI	Maksimum İnhibisyon
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
O₃	Ozon gazı
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
SPSS	İstatistik Analiz Programı

BÖLÜM I

GİRİŞ

1.1 Fındık (*Corylus L.*)

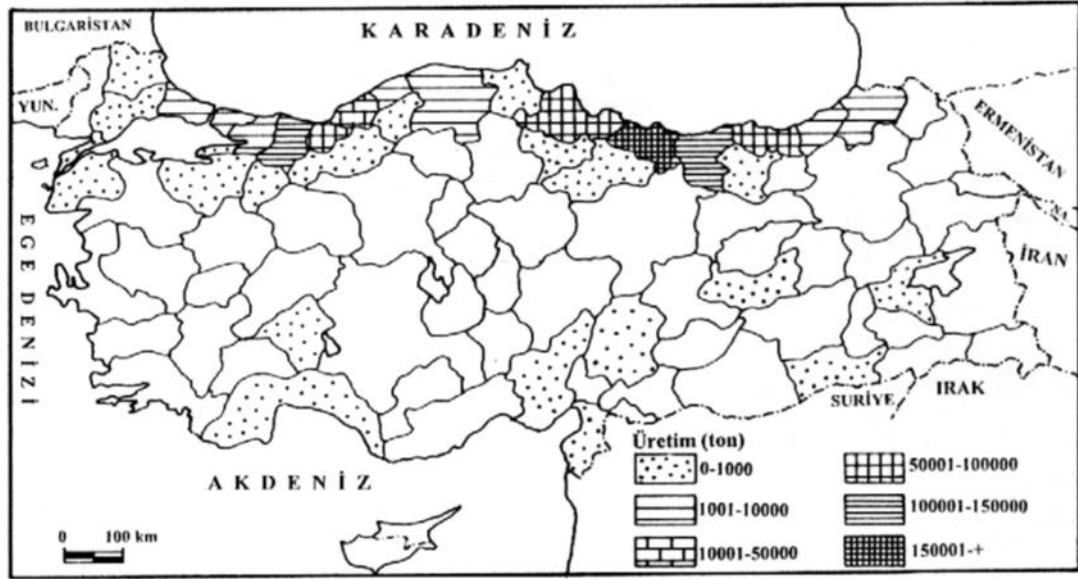
Bitkiler insan sağlığı açısından ve yaşam standartlarını yükseltmek için insanlığın varoluşundan beri kullanılmaktadır (1). Türkiye bulundurduğu bitki zenginlikleri açısından dünyanın en zengin ülkeleri arasında büyük öneme sahip bir ülke konumundadır. Ülkemizde bulunan bu bitki çeşitliliğinin en büyük sebebi uygun iklim koşulları, uygun arazi ve toprak yapısına sahip olmasıdır. Bundan dolayı ülkemizde yaklaşık olarak 174 familyaya ait 1251 cins ve 12000'den fazla tür ve alt türler geniş bir yayılım göstermektedirler (2). Bu bitkilerin yaklaşık 500 türü tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu kullanıma sahip olanlardan yaklaşık 200 tanesi hem tıbbi hem de aromatik olarak ihracı yapılmaya uygundur (3). Son yıllarda bilimsel çalışmalar ile birlikte artık bitkilerin tedavi edici özellikleri ve bunlardan yarar sağlanması üzerine araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Tüm bunlar ile beraber tarım sektöründe, çok yoğun dağılıma sahip olan ve ekonomik açıdan da değerlendirilmiş bir faaliyet de meyveciliktir (4). Türkiye bitki çeşitliliği ve bu bitkilerin kullanımı konusunda üst sıralarda olduğu gibi meyvecilik alanında da zengin ülkelerden biridir. Yetiştiriciliği yapılan meyvelerden bir tanesi de, geleneksel olarak çok değerli olan ve ekonomik açıdan ülkemizin enlerinden biri olan fındıktır. Zaten Türkiye, gerek fındık yetiştirme alanları ve gerekse de fındık üretimi açısından ilk sıralardadır.

Fındık (*Corylus L.*) 12 ya da 20 tür bulundurmakla beraber ülkemizde kültürü yapılan türler; *Corylus avellana* (adi fındık), *Corylus colurna* (Türk fındığı) ve *Corylus maxima* (Kan fındığı)'dır (5). Bu kültür bitkisinin esas anavatanı Türkiye'dir.



Şekil 1 Türkiye’de illere göre fındık bahçelerinin dağılımı



Şekil 2 Fındık Üretiminin İllere Göre Dağılımı

1.2 Fındığın Ekonomik Önemi

Ülkemizde fındık üretimine ve yetiştirilmesine en uygun koşullara sahip alanın oranı %74,8 'dir ve bu üretim alanının %72,5' ini Karadeniz Bölgesi oluşturmaktadır. Önemli döviz kaynağımızdan biri olan fındığın, ülke ekonomisindeki ticari etkinliğinin büyük olduğu göz önünde bulundurulduğunda üretilen fındıkların, ihracata kaliteli olarak sunulması büyük önem teşkil etmektedir. Fındığın kalitesini oluşturan faktörler; fındığın üretiminden tüketimine kadar gerçekleştirilen hasat, kurutma, depolama ve nakliye gibi birçok işlemlerden etkilenmektedir (13). İhracat sorunlarından dolayı her yıl satılmayan fındığın uygun olmayan depo koşullarında uzun süre beklemeye maruz kalması sonucu küf üremesi nedeniyle aflatoksin oluşma riski artmakta ve içerdiği doymamış yağ asitlerinden dolayı lipit oksidasyonu sonucu fındığın karakteristik özellikleri ve kimyasal bileşimi etkilenmektedir (14). Bu da ülkemiz ekonomisi açısından önemli kayıplara neden olmaktadır (15,16).

Fındığın anavatanı Anadolu olup, dünyada fındığın ilk üretiminin ve ticaretinin başladığı yer Türkiye'dir. Son 5 yıl içerisinde Türkiye dünya fındık üretiminin %70'lik önemli bir dilimini tek başına karşılamaktadır. Dünyada en önemli fındık üretim bölgeleri olarak İtalya, Amerika ve İspanya gelmektedir. Yaklaşık 534,000 ton yıllık üretimi ve 136,000 milyon ton ihracatı ile ülkemiz, 400 milyon Amerikan doları dolayında gelir elde etmektedir.

Fındık Karadeniz bölgesinde milyonlarca kişinin gelir kapısı durumundadır. Doğu Karadeniz' den batıya doğru yayılım göstermekte olup, gübreleme, ilaçlama ve bahçe bakımı gibi huşular konusunda halkın bilinçlenmesiyle ürün miktarında son dönemlerde büyük bir artış olmuştur (17).

Tablo 1 Dünya Fındık Üretim Verileri (Kabuklu/Bin ton)

Fındık Üretimi	2012	2013	2014	2015	2016	Ortalama
Türkiye	660.000	549.000	412.000	646.000	420.000	537.000
İtalya	84.000	100.000	80.458	125.000	130.000	103.800
ABD	32.000	40.000	35.000	27.850	37.800	34.830
İspanya	16.000	18.000	19.500	22.000	18.000	18.700
Azerbaycan	40.000	35.000	25.000	40.000	50.000	103.800
Gürcistan	28.000	40.000	35.000	50.000	60.000	42.600
Diğerleri	25.000	25.000	25.000	42.000	42.000	31.800
Toplam	885.000	807.200	632.800	952.850	757.800	807.130

Son 5 yıllık ortalama veriler dikkate alındığında ülkemiz üretimi 537 bin ton (%67), diğer ülkelerin üretimi ise 270 bin ton (%33) civarındadır (Tablo 1). Dünyada fındık tüketiminin tamamına yakını Avrupa ülkeleri tarafından gerçekleştirilmekte ve büyük ölçüde çikolata ve şekerleme sanayinde ham madde olarak kullanılmaktadır.

Dünya fındık ihracatının son 5 yıllık ortalaması kabuklu fındık karşılığı 684 bin tondur. Bunun %75'ini Türkiye gerçekleştirmektedir (INC). Dünya fındık üretim ve ihracatının çok önemli bir kısmını Türkiye'nin sağlamasından dolayı ülkemizin iç piyasada uyguladığı politikaların dünya piyasaları ve fiyatlarına etkisi de fazla olmaktadır. Son yıllarda fındık iç tüketim miktarı 100–120 bin ton civarında olup yağ dâhil son 5 yıllık tüketim ortalaması 129 bin tondur.

1.3 Fındık İçeriği, Yağ Eldesi ve Ozonlanmış Yağlar

Fındık, yağ ve protein açısından zengin ve besleyici içeriğe sahip bir meyvedir. 100 g iç fındık, 55 - 66 g yağ, 11 - 15 g protein, 12 - 17 g karbohidrat, 8 - 10 g lif içerir ve yaklaşık 650 kcal. enerji sağlar. Fındık yağı bileşimi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda içerik olarak zeytinyağı ile benzer olduğu ve tüm çeşitlerinde en fazla asidin, oleik asit (18:1) olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, sırasıyla linoleik (18:2), palmitik (16:0), stearik (18:0) ve linolenik (18:3) asitlerin de bulunduğu rapor edilmiştir (6). Fındık sağlıklı beslenme yönünden uygun niteliklere sahip ve yüksek enerji içeren bir besin maddesidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tekli doymamış yağ asidi oleik asidin (%82 oleik asit, %12 linoleik asit, %15 palmitik asit ve %1 stearik asit) kanda kolesterolün yükselmesini önlediği ve böylece kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (7). Ayrıca kalsiyum, magnezyum, fosfor ve potasyum başta olmak üzere iyi bir mineral kaynağıdır. Sodyum bakımından düşük ve tansiyonu dengelediği fakat mineraller bakımından zengin olduğu için fındık ve fındık yağı, demir ve çinko bakımından en iyi kaynaklardan biridir (6).

200 yılı aşkın bir süredir bitkisel yağların yapıları akademik çalışmaların esas konularından biri olmuştur. Özellikle son yüzyılın son yarısından itibaren kimya ve biyokimya alanlarında bulunan yeni bilgiler sayesinde, çok çeşitli olan doğal ürünler ve onların özellikleri ile ilgili mekanizmalar anlamlandırılmaya başlanmıştır (8). Bitkisel yağların % 97 – 98'i trigliserid formundadır. Yağların doğal yapıları ve karakterleri, içerisinde bulundukları doymuş ve doymamış yağ asitlerine bağlıdır. Oleik, stearik, palmitik, linoleik, laurik, mistirik ve linolenik asit bu yağ asitlerindedir ve bunların hepsinin bağ yapıları gliserol yapısının türevleri biçimindedir (9). Bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritler yağa çok fazla olumlu özellik katmaktadır. Çift bağlar, hidrojenasyonda da olduğu gibi sıklıkla yağların kimyasal modifikasyonlar için kullanılmaktadır. Trigliseritlerin ozonlanması bir diğer reaksiyon türüdür ve son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir (10).

Tablo 2 Fındığın genel bileşimi (%)

Nem	Yağ	Protein	Karbonhidrat	Kül	Lif
5,30	62,47	16,93	14,28	2,17	6,45

Tablo 3 Fındık içerisindeki vitamin kompozisyonu

α- tokoferol	β- tokoferol	γ- tokoferol	Toplam vitamin E	Vit. B1	Vit. B2	Niasin	Toplam sterols	Kaynaklar
			17.747	0.334	0.051			(Baş.vd. 1986) (26)
30.38							127.14	(Parcerisa vd. 1998) (27)
35.53				0.3	0.1	1.81		(Açkurt vd.1999) (28)
			42.32					(özdemir vd.2001) (29)
16.5	1.78							(Delgado- Zamarreno vd. 2001) (30)
				0.42	0.1	1.94		(Alasalvar vd.2003a) (31)
38.23	1.15	3.89	43.45				113.52	(Alasalvar vd.2003b) (31)
31.01		6.12					102.93	(Maguire vd. 2004) (32)
40.451	1.968	4.197					203.1	(Bada vd. 2004) (33)
38.6	0.89	0.24						(Lee vd. 2004) (34)

Ülkemizde genellikle üretimin fazla olduğu ya da yeterli ihracatın gerçekleşmediği yıllardan, ertesi yıla devreden fındıkların gerektiği gibi muhafaza edilememesi önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bir sonraki yıla kalan fındıkların kalitelerinde önemli ölçüde kayıplar oluşmaktadır. Stokların birkaç yıl üst üste birikmesi sonucu, bazı yıllarda fındıklar yenmeyecek duruma gelmekte ve yağ olarak değerlendirilmek üzere yağ fabrikalarına verilmektedir.

Fabrikaya gelen fındık, öğütülerek partikül haline getirilir. Bu yolla hücrelerin kırılması ile fındıktan yağın ekstraksiyonunu kolaylaştırır. Öğütülmüş fındık 90–110°C aralığında kavrulur ve bu sıcaklıkta preslenir (18). Böylece preslenen yağ filtrelerden geçirilerek ham yağ tankına alınır ve küspesi ayrılır. Küspede kalan yağ bir solvent yardımı ile genellikle hekzan kullanılarak geri kazanılır. Küspede yağ oranı, %2-3'e çekilir; elde edilen yağ ham yağ tankına gönderilir (19).

Ham yağlar, gliserit olmayan safsızlıkları değişik oranlarda içerirler. Bu safsızlıklardan dolayı ham yağ, tat, aroma, koku ve renk açısından tüketilemeyecek haldedir. Ham yağın tat, aroma, koku ve rengini istenilen seviyeye ulaştırabilmek için yapılan işlemlere rafinasyon denir.

İşlenmemiş yağda önemli oranda müsilajlı maddeler, özellikle de fosfatitler mevcuttur. Bunların yağdan uzaklaştırılması amacı ile yağın ağırlığının %1'i oranında sıfır sertlikte su verilerek fosfatitler hidratlanır ve yağdan uzaklaştırılır. Bu işlem ekstraksiyon ünitelerinde gerçekleşmekte ve degumming olarak adlandırılır (19). Ham yağ, depolama tanklarında bekletilmeleri sırasında müsilajlı maddeler atmosferik ve yağ içerisinde mevcut oluşabilen suyun oluşturduğu tortunun etkisi ile dibe doğru çöker. Bundan dolayı özel şartlar olmadıkça ham yağ rafinasyon ünitelerinde degumming işlemine tabi tutulmaz. Yağ doğrudan nötralizasyona gönderilir.

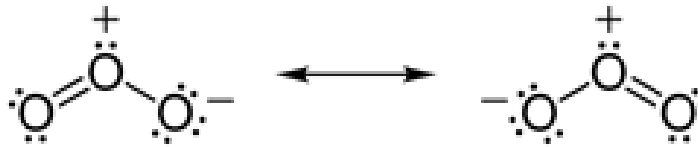
Yağda bulanabilecek çok az miktarda ki müsilajlı maddeler de nötralizasyon, ağartma aşamalarında yağdan uzaklaştırılır (18).

Kimyasal bileşimi zeytinyağına benzer olan (20) fındık yağının son yıllarda tüketimi giderek artmaktadır. Fındık yağı yüksek miktarda (%82-84) oleik asit bulundurmaktadır. (21). Bunu takiben linoleik (%9-11), palmitik (%4), stearik asit (%1,5-2,3) gelmektedir. Fındık yağı evlerde yemeklerde, kızartmalarda ve salatalarda diğer bitkisel yağlar yerine kullanılmaktadır (22).

Ozonun bitkisel yağlarla olan reaksiyonları, bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitlerinde bulunan karbon-karbon çift bağları ile meydana gelmektedir (8). Ozonlanmış bitkisel yağlar, doğal bitkisel yağlara oranla çok daha karmaşık yapılara sahiptir (9).

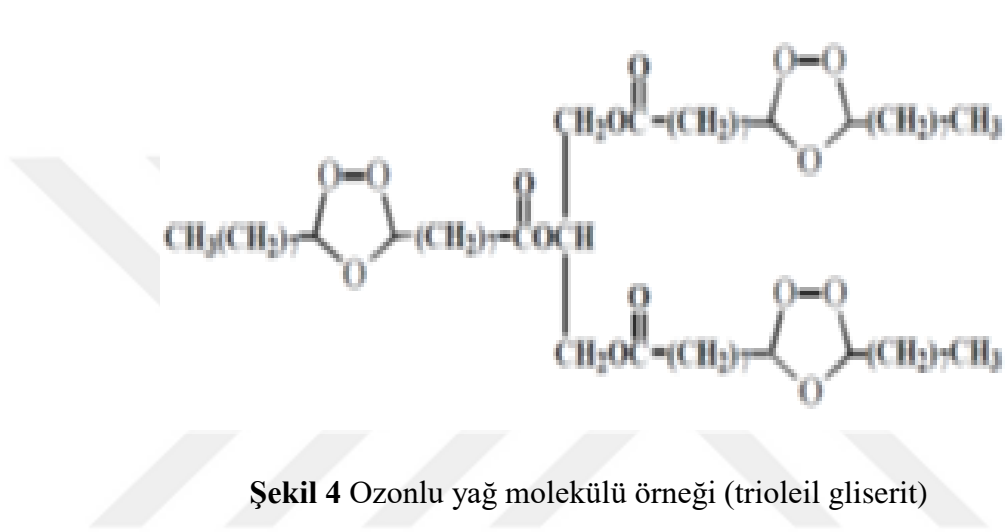
Ozonun bitkisel yağlarla reaksiyonu sonucunda hidroperoksitler, ozonidler, aldehitler, peroksitler, diperoksitler ve poliperoksitler gibi oksijenlenmiş bileşikler meydana gelir (11,12). Bu oksijenlenmiş ürünler birçok biyolojik aktiviteye karşı duyarlıdır. Doymamış yağlardan elde edilen oksijenlenmiş ürünler, reaksiyonun gerçekleştiği şartlara bağlıdır. Bu şartlar arasında; reaksiyonun nerede gerçekleştirildiği, reaksiyon ısısı, reaktör tipi, reaksiyon karışımın karıştırılması, ayarlanan ozon dozu gibi şartlar bulunur (8). Ozonlanan bitkisel yağlar birçok kullanım alanına sahiptir. Örneğin; modifiyeli biyodizel gibi. Ozonlanmış bitkisel yağların, mikroorganizmalara karşı etkileri; gıda, kozmetik, farmakoloji sanayi gibi alanlarda kullanılması ile de yakından ilgilidir (13). Özellikle ozonidler ve peroksitler antiseptik etkileri nedenleriyle tıp alanında büyük yarar sağlamaktadır (13).

Ozon gazı dezenfektan giderici olarak ilk 1881 de kullanıldı. 1926 da, Berlin Kaiser İnstitute'den DR.Otto Warburg kanserin nedeninin hücresel boyuttaki oksijen eksikliği olduğunu iddia etti. Bu bilim adamı 1931 yılında Nobel Tıp Ödülünü ardından tekrar 1944 yılında da aynı ödülü ikinci kez kazandı. 1950'lerin başlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde ozonlanmış sıvı yağın bir formu pazarlanmaya başlandı. Yara temizliğinde dezenfektan olarak büyük takdir topladı. O günlerde ozon jeneratörleri teknolojik olarak yetersizdi. Bu nedenle ticari olarak zeytinyağı yeterli miktarda piyasaya verilemiyordu. Günümüzde çok kullanışlı ve güçlü ozon jeneratörleri artık rahatlıkla üretilmektedir.



Şekil 3 Ozon molekülü

Ozonun sudaki çözünürlüğü oksijenden 10 kat daha fazla olup, (23,24) saf suda hızlıca çözünür ve biyolojik sıvılarda çözünmüş olan organik ve inorganik moleküllerle anında reaksiyona girer (25). Ozon özellikle poliansatüre yağ asitleri, askorbik asit gibi antioksidanlar, sistein gibi sülfhidril (SH) grupları içeren tiyol bileşikleri, redükte glutatyon (GSH) ve albümin ile tepkimeye girer. Ozonun organik ve inorganik moleküllerle girdiği bu tepkimeler süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit ($HClO$) gibi pek çok serbest oksijen radikalinin oluşumuna yol açar.



Şekil 4 Ozonlu yağ molekülü örneği (trioleil gliserit)

1.4 Hücree Kùltürü ve Sitotoksisite Çalışmaları

Hücree kùltürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel olarak tasarlanmış kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan arı bir şekilde yaşatılmasıdır. İnsan da dâhil olmak üzere herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi, hücre kùltürü çalışmalarının tercih sebepleri arasında yer almaktadır (35).

Hücree kùltürünün sıkça tercih edildiği alanlar kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksisite çalışmalarıdır (36). Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları, bir madde-nin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır.

Hücree temelli sitotoksisite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir (37).



şekil 5 Hücree Kùltür Laboratuvar Çalışmaları

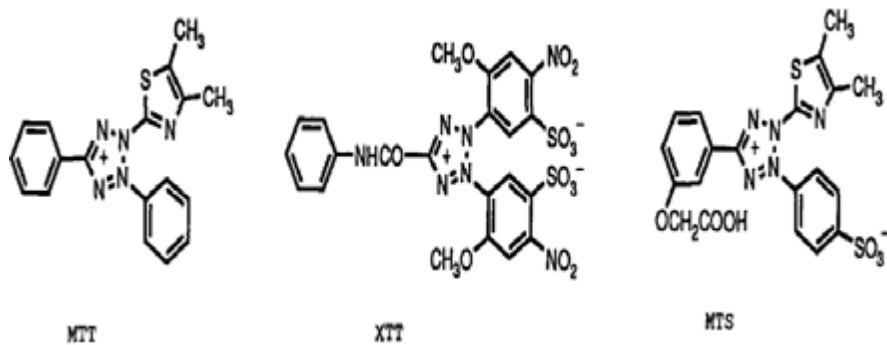
Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (38). Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir (39).

DeneySEL olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır (40).

Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksosite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir (39).

Sitotoksosite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (41-42-43).

Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür(MTT),3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksümetoksisfenil)-2-(4-ülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid(XTT),2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır (39, 44, 45, 46).



Şekil 6 MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları (47).

1.5 Hücre Hatları

1.5.1 H1299 ve A549 Hücre Hatları

İlk kez 1911'de Peyton Rous tarafından tümör virüsü olarak belirlenen mikrobiyolojide virüslerin üretilmesi, tanımının yapılması ve virüs aşılarının geliştirilmesi amacıyla kullanılan hücre hatları günümüzde genel olarak kanser ilaçlarının geliştirilmesinde ve etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (48,49).

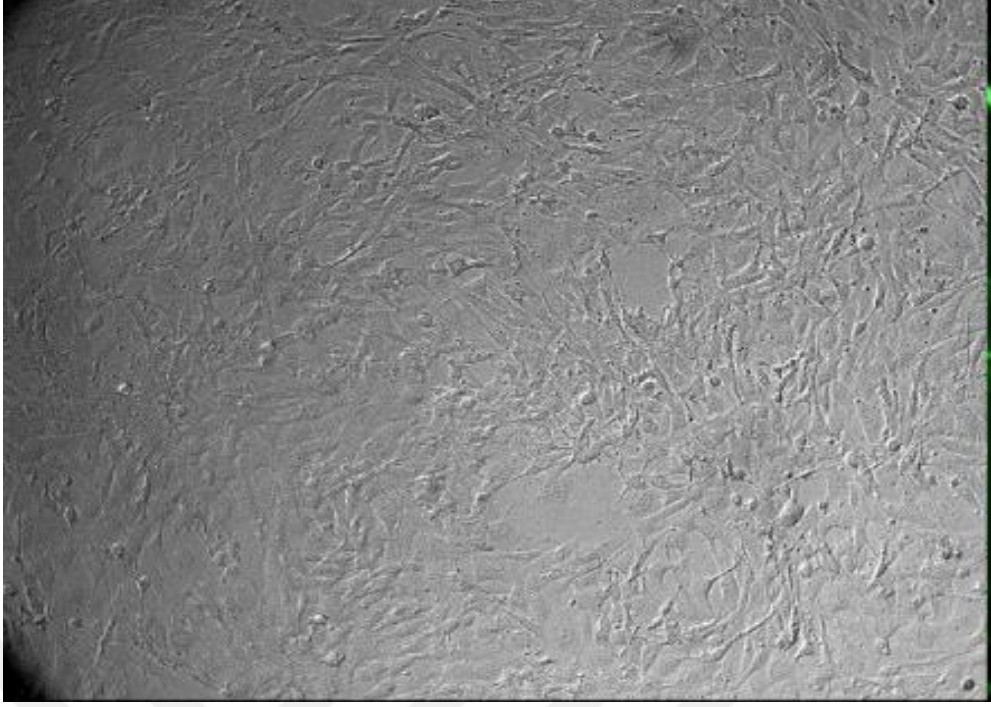
Akciğerlerde gözlenen kanserler mikroskop altında görünümüne bakılarak küçük hücre dışı akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olarak iki gruba ayrılırlar. H1299 ve A549 akciğer kanseri araştırmalarında kullanılan hücre hatları olarak bilinmektedirler. H1299 küçük hücre dışı akciğer kanser hücre hattı, A549 küçük hücreli akciğer kanser hücre hattıdır (50).

1.5.2 HUVEC Hücre Hattı

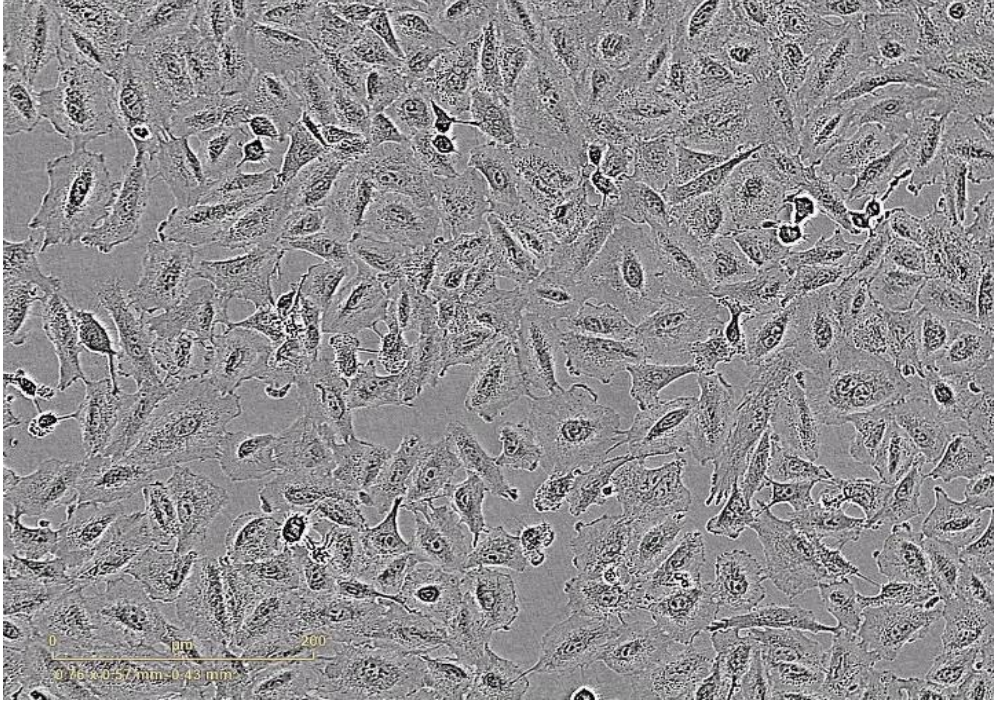
İnsan göbek kordonu damar endotel hücreleri normal olarak insan göbek bağı kordonundan elde edilir. Endotel hücrelerinin, patolojisini ve özelliklerini çalışmak için model sistem olarak kullanılmaktadır. İnsan endotel hücre modelinde gerçekleştirilen deneyler neticesinde, genetik faktörlerin incelenmesinin de gittikçe değer kazanmaya başladığı göz önünde bulundurulduğunda etken maddelerin daha etkili kullanılması mümkün hale gelecektir (51).

Endotel hücreler, biyolojik birçok alanda faydalı bir çalışma modeli sağlar. İlk izolasyondan bu yana, insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECs), uygun bir kültür ortamı sağlamak kolay olduğundan ötürü en çok çalışılan endotel hücrelerdir. Ancak, araştırma için anjiyogenez, geçirgenlik ya da diğeri gibi süreçler üzerinde odaklanan mikrovasküler endotel hücreler (EC) çalışmak için çok daha önemli fizyolojik modeldir (52).

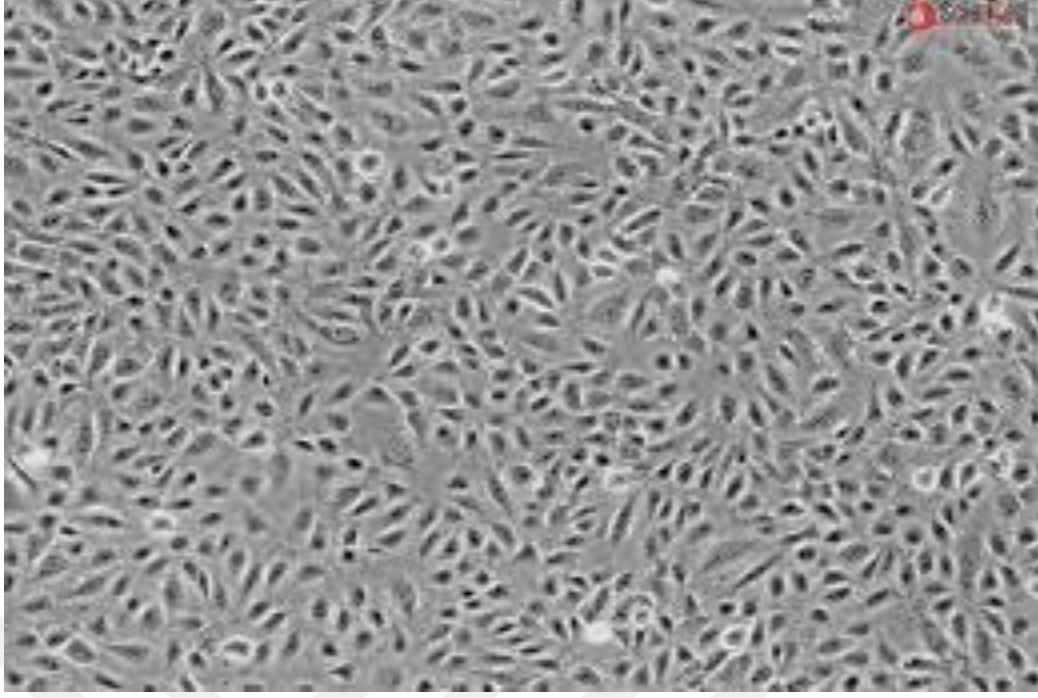
İnsan göbek kordonu damar endotel hücre hattı (HUVEC) aşısı, antikor ve enzim üretimi, ilaç araştırmaları, hücreler arası bağlantılar gibi pek çok farklı deneysel çalışma için bu hücrelerin in vitro çalışmasına imkan sağlar. En iyi endotel hücre kaynağı özelliğine sahiptir. Çalışmalar için kolay bulunur ve maliyeti düşüktür (53).



Şekil 7 H1299 Hücre Hattı Görüntüsü



Şekil 8 A549 Hücre Hattı Görüntüsü



Şekil 9 HUVEC Hücre Hattı Görüntüsü

Ozonlu bitkisel yağlar, uygulanması ve elde edilmesi kolay olduğu için ozon tedavisinde çok tercih edilmektedir. Bu çalışma kapsamında kullanılan ozonlanmış fındık yağlarının ozon işleminden kaynaklanan herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda çıkan veriler ozonlanmış fındık yağının tıbbi ve kozmetik alanında kullanılabilirliği açısından da önem teşkil etmektedir. İlk defa ozonlama işlemi gerçekleştirilen fındık yağının, sitotoksik etki potansiyelinin belirlenmesi diğer yapılacak çalışmalar için de bir öncül teşkil etmektedir.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında ozonlanmış fındık yağı ile yapılan herhangi bir sitotoksik aktivite potansiyeli çalışması literatürde kaydedilmemiştir. Ozonlu bitkisel yağlar gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerindeki, değeri yüksek terapötik, antibakteriyel ve fungusit etki potansiyellerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (8, 60, 61).

Yağlar ile reaksiyonu sonucu ozon gazı, doymamış yağ asitlerinde bulunan karbon-karbon bağları arasında Criegee mekanizmasına göre stabilize olur (62, 63). Bu nedenle ozonlanmış yağlar 4 °C'de 2 yıl boyunca stabil bir şekilde kalabilirler (64).

Ozonlanmış zeytinyağı ile yapılan çalışmalarda; ozonlanmış zeytinyağının temel antioksidanlar tarafından yönlendirilen çeşitli biyolojik faydaları olduğu saptanmıştır (65).

Bunun yanında in vitro olarak L929 fare fibroblast hücreleri üzerine ozonlanmış zeytinyağı uygulaması yapılarak sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışma kapsamında sadece ozon uygulamasının hücrelerin viskozitesini etkilemesi sonucunda önemli ölçüde hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiş olup ozonlama süresinin bu viskoziteyi etkilediği belirtilmiştir. Çalışma kapsamında bu viskoziteyi azaltmak için ozonlanmış yağ gliserol ile karıştırılarak kullanılmıştır. Bu kapsamda MTT metodu kullanılarak yapılan çalışmada ozonlanmış zeytinyağının hücre canlılık oranlarının üzerine pozitif bir etkisi olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ifade edilmiştir (66).

Fareler üzerinde yapılan diğer bir çalışma sonucunda ise ozonlanmış susam yağının kollojen lifler üzerindeki etkisine bakılmış, elde edilen sonuçlara göre hasarlı kollojen liflerin ozonlanmış susam yağı uygulaması ile birlikte kollojen liflerin yenilenme süresinin kısaldığı saptanmıştır (67).

Rafine olmayan fındık yağının ozonlanması ve biyolojik aktivitesinin araştırılması üzerine yapılan çalışma kapsamında anti-bakteriyel etki belirlenmesinde *Enterococcus*

faecalis, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenesis*, *Yersinia tuberculosis*, *Pseudomonas aeriginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloaceae* bakterileri kullanılmış ve sonuç olarak en etkili sonuçlar 110 dakikalık ozonlama işlemine tabi tutulan numunelerde olduğu tespit edilmiştir (68).

Rafine olmayan fındık yağının ozonlanması ve biyolojik aktivitesinin araştırılması üzerine yapılan çalışma kapsamında yapılan antioksidan analizleri sonucunda en etkili antioksidan potansiyelinin 110 dakika ozonlama işlemine tabi tutulan numunelerde olduğu tespit edilmiştir (68).

Yapılan diğer bir çalışmada ise fareler üzerinde oluşturulan yara oluşumlarına normal yağlar referans alınarak ozonlu fındık yağının etkisi saptanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda normal yağlar ile ozonlu fındık yağının yara iyileşimi üzerine anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (68).

Ozonlanmış fındık yağının kozmetik uygulamalarda kullanılması için gereken alerjen testleri sonucunda da herhangi bir alerjik reaksiyonun gerçekleşmediği bildirilmiştir (68).

Literatür taraması sonucunda ozonlanmış yağlar ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bunların çoğunluğu tıbbi uygulamalarda kullanımına yönelik çalışmalar olmakla beraber biyolojik aktivite ve yağların fiziksel-kimyasal içeriği hakkında çalışmalardır. Bunun yanında toksik etki araştırmalarına literatürde çok rastlanılmamaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Deney Yağları

Çalışma kapsamında kullanılan numuneler Düzce Üniversitesi Kimya Bölümü A.B.D Başkanı Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ'tan temin edilmiştir. Üretilen yağlar Düzce Üniversitesi Merkez Laboratuvarında Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ tarafından soğuk pres ortamında üretilmiştir. Yağların fiziksel ve kimyasal analizleri yapılmıştır. Ozonlama işleminin yapılması için, rafine edilmiş fındık yağı, (çotanak, ticari olarak Arifoğlu firmasından alınmıştır) Rafine edilmemiş soğuk pres (50-60°C'de pres) fındık yağı ve ekstraksiyonla (hekzan, 50 °C'de 1000 rpm, 24 saat) elde edilmiş rafinesiz fındık yağı olmak üzere üç farklı fındık yağı içeriği kullanılmıştır. Ozonlama işlemi sırasında 200 ml'lik numunenin 3-4 ve 7-8 debi arasında ozon gazı akışıyla 10 dakikadan başlamak üzere 10'ar dakikalık artışlarla, 1000 rpm seviyesinde karıştırılarak, 120 dakikaya kadar ayrı ayrı ozon jeneratörü yardımlarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yağlar uygulama süresince 4 ° C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan yağlara ait numune listesi Tablo 4'te gösterildiği gibidir.

Tablo 4 Çalışmada kullanılan numune kodları ve içerikleri

Numune kodu	Numune açıklaması
1	Rafine Fındık Yağı
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmışhekzanekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmışhekzanekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı

3.2 Fiziksel Analizler

3.2.1 Viskozite Ölçümü

Deney yağları soğuk pres ortamında laboratuvarında üretilmiştir. Viskozite ölçümü esnasında Brookfield viskozimetresi, Spindle No:21, adaptör Small sample cihazı kullanılmıştır. Cihaz ısısı 25°C, Hız (rpm) 80, Zaman (t) 3 dakika da 30 sn arayla 6 ölçüm yapılmıştır, yaklaşık olarak 30 ml hacim kullanılmıştır. Sıcaklığı 25°C'ye ayarlanan sistemde, Brookfield viskozimetresi küçük örnek adaptörü ile, spindle No:21 kullanılarak, 80 rpm'de 3 dakika 30 saniye'lik 6 ölçüm yapılmış ve 6 sonucun ortalaması alınmıştır. 30 ml hacimde viskozite ölçümü yapılmıştır. Viskozite değerleri Tablo 5'de gösterildiği şekildedir.

Tablo 5 Numunelerin viskozite ölçüm sonuçları

Numune kodu	Numune açıklaması	Viskozite(cpt, 25 °C)
1	Rafine Fındık Yağı	65,0
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	66,3
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	95,6
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	77,8
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	92,0

3.2.2 Yoğunluk Ölçümü

Kullanılan cihaz: Anton Paar DMA 38 kullanılarak yoğunluk tayini ölçümü yapılmıştır.

Analiz yöntemi: Bir enjektör ile numuneler Anton Paar DMA 38 cihazına yüklenmiştir. Yoğunluğun sabitlendiği seviyeye kadar yaklaşık olarak üç dakika değerler takip edilmiştir. Her bir numuneden sonra cihaz temizlenmiş ve diğer numune için hazır hale getirilmiştir. Yoğunluk ölçümü 25 °C'de yapılmıştır. Yoğunluk değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6 Numunelerin Yoğunluk Ölçüm Değerleri

Numune kodu	Numune açıklaması	Yoğunluk (g/ml, 25 °C)
1	Rafine Fındık Yağı	0,914
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,912
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,922
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	0,918
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	0,925

3.3 Kimyasal Analizler

3.3.1 Peroksit Değerleri

Kullanılan malzemeler; 50 ml'lik dereceli cam büret, Cam erlenler (250ml'lik), Balon joje, Kloroform JT Baker (HPLC grade), Sodyum thio sülfat Sigma Aldrich , Glasiyel asetik asit Merck, Potasyum iyodür Sigma Aldrich, Nişasta Sigma Aldrich, Potasyum iyodür Sigma Aldrich,

Analiz yöntemi: Titrimetrik

Potasyum iyodür çözeltisi: Saf su 5 dakika kaynatılıp soğutulmuştur. 60 ml suda doymuş potasyum iyodür çözeltisi hazırlanmıştır.

Sodyum thiosülfat çözeltisi: 0,01 M sodyum thiosülfat çözeltisi su ile hazırlanmıştır.

Seyreltme çözeltisi: Glasiyel asetik asit: kloroform 3:2 (h/h) karışımı hazırlanmıştır.

Nişasta çözeltisi: 100 ml'lik balon jojeye 1 g nişasta çözeltisi tartılmıştır. Üzerine 60 ml su eklenmiş ve kaynatılarak çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonraki aşamada üzerine 10 mg Merkür iyodür eklenmiş, çözünmesi için karıştırılmış. Tüm bu çözeltiler elde edildikten sonra deney düzeneği kurulmuştur. 250ml'lik erlenlere numuneler sıra ile tartılmıştır. Üzerlerine 30.0'ar ml seyreltme çözeltisi ilave edilerek çözünmesi için çalkalanmıştır. Bu aşamanın ardından üzerine 0,5 ml potasyum iyodür çözeltisi ilave edilerek 1 dakika çalkalanmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için en son 30 ml su ilave edilmiş ve hazırlanan titrasyon düzeneğinde sarı renk kaybolana kadar titre edilmiştir.

Daha sonra üzerine 5 ml nişasta çözeltisi ilave edilerek oluşan mavi renk kaybolana kadar titre edilmiştir. Titrasyon işlemi hazırlanan her numune için tekrar edilmiştir. Toplam harcanan hacim kullanılarak peroksit değeri hesaplanmıştır. Peroksit değerleri Tablo 7’de verildiği gibidir.

Tablo 7 Numunelerin Peroksit Ölçüm Değerleri

Numune kodu	Numune açıklaması	Peroksit (mEqO ₂ /kg)
1	Rafine Fındık Yağı	3,67
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	28,07
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	246,47
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	160,16
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	301,45

Hesaplama;

$$1000(V_T - V_B)N/W = \text{Peroksit Değeri (mEq O}_2\text{/kg)}$$

VT: Test için harcanan toplam titrant

VB: Seyreltme çözeltisi için harcanan toplam titrant

N: Sodyum Thiosülfat normalitesi

W: Tartım (g)

3.3.2 İyot Değeri Tayini

Çalışma için kullanılan malzemeler; 50 ml’lik dereceli cam büret, Cam erlenler (250ml’lik), Balon joje, Kloroform JT Baker (HPLC grade), Sodyum thio sülfat SigmaAldrich, Glasiyel asetik asit Merck, Potasyum iyodür Sigma Aldrich, Nişasta Sigma Aldrich, iyot bromür

Kullanılan yöntem: Yaklaşık olarak 0.5-1 gram arasında tartılmış olan numune 15 ml kloroform yardımıyla çözülmüş elde edilen çözeltiliye iyot bromür çözeltisi eklenmiştir. 20g/l asetik asitte karıştırılmıştır ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Sonra

10ml potasyum klorür (10g/l) çözeltisi ilave edilmiştir. Karıştırılan çözeltiye 5 ml nişasta (1g/100ml) çözeltisi ilave edilmek suretiyle, renk değişimi gözlemlenmiştir. Elde edilen çözelti 0.1 N Na₂S₂O₃ çözeltisi ile renksiz çözelti elde edilene kadar titre edilmiştir (V₁). Aynı işlemler kör çözeltisi için de gerçekleştirilmiş ve harcanan hacimler kaydedilmiştir (V^o). İyot değerleri Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 8 Numunelerin İyot Değerleri

Numune kodu	Numune açıklaması	İyot Değerleri
1	Rafine Fındık Yağı	85,13
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	87,18
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	66,43
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	80,08
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	53,17

Hesaplama;

$$(1,269(V^0 - V^1) N)/W = \text{İyot Değeri}$$

V^o:Blank için harcanan toplam titrant

V₁: Numune için harcanan toplam titrant

N: Sodyum Thiosülfat normalitesi

W: Tartım (g)

3.3.3 Yağ Asidi Bileşeni Analizi

Kullanılan malzemeler; 25 ml’lik balon joje, Cam beher, 50ml’lik balon joje, 5 ml’lik calibre pipet, iso-propanol JT Baker (HPLC grade), Yağ asidi standartları Sigma Aldrich, Asetonitril Merck (HPLC grade), Saf su Ultrasaf, Trietilamin Merck (HPLC grade), Fosforik asit Sigma Aldrich(HPLC grade), 0.45 PTFE Sartorius, Kolon 250*4.6*5 -C18 Ace, HPLC Waters 2960, Dedektör Waters 2487(UV), Karıştırıcı Voltreks.

Akış hızı: 1.0ml/dk

Hareketli faz: Asetonitril/iso-propanol (2/1), (%0.5 'lik trietiamin;pH:4.0'E fosforik asit)

Dedektör: UV ,

Dalga boyu: 208 nm,

Kolon özellikleri: 250*4.6*5 –C18 ACE

Kolon sıcaklık: 50 °C

Kolon sıcaklık: 10 °C

Enjeksiyon hacmi: 100 mikrolitre

Akış süresi: 30 dakika

Numune çözeltisi: 0.1 gram yağ numunesi 25 ml' lik balon jøjeye tartılmış, üzerine 15 ml Iso-propanol ilave edilmiş ve voltreks karıştırıcısı ile yaklaşık on saniye karıştırılmıştır. Asetonitril ile hacmine tamamlanmıştır. 0.45 mikron teflon filtreden süzülerek viallendi Elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Standart çözeltisi: Yaklaşık 30 mg yağ asidi standartı 25 ml'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine 15 ml Iso-propanol ilave edilmiş ve voltreks karıştırıcısı ile yaklaşık on saniye karıştırılmıştır. Asetonitril ile hacmine tamamlanmış ve 0.45 mikron teflon filtreden süzülerek viallenmiştir. Elde edilen çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bileşen değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9 Numunelerin Yağ Asidi % İçerikleri

Numune kodu	Numune açıklaması	Trilinolein (%mg/g)	Triolein (%mg/g)	Triheksanoin (%mg/g)	Trioktanoin (%mg/g)
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,22	14,44	0,92	7,88
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,10	9,65	0,62	4,56

3.4 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

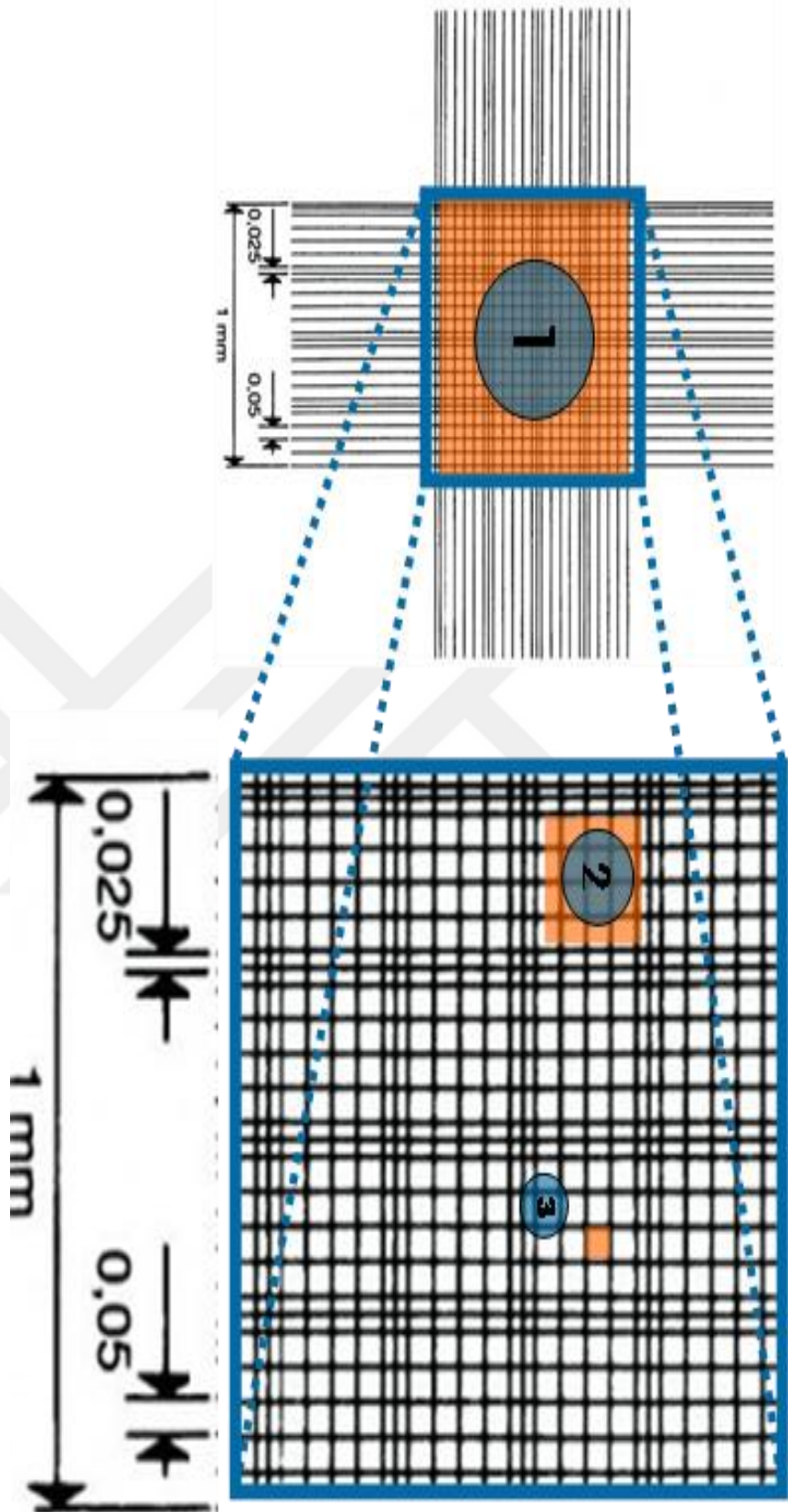
3.4.1 Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması

Çalışma için kullanılacak olan hücre hatları -80 °C'den çıkarılarak sıcak su banyosunda erimeleri sağlanmıştır. Daha sonra uygun olarak hazırlanan besiyerine alınarak santrifüj işleminden geçirilmiştir. Santrifüj işleminin bitimiyle birlikte oluşan pellet besiyeri içerisinde homojen hale gelene kadar çözdürülmüştür ve 25 cm²'lik kültür kabına 5 ml besiyeri eklenerek üzerine homojen olan pellet kısmı eklenmiştir. 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Aradan 24 saat geçtikten sonra önceki besiyeri alınarak yeni besiyeri ortamına alım yapılarak hücrelerin büyümeleri amaçlanmıştır. Kültüre edilen hücreler her gün mikroskop altında kontrol edilmiş ve hücrelerin durumu göz önüne alınarak çoğalma olmayan durumlarda besiyeri değişimi yapılmıştır.

Tripsinizasyon işleminin gerçekleştirilmesi için, kültür kabına yapışan hücrelerin kaldırılması için besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücreleri serumdan arındırmak için tuzlu fosfat tamponu ile yıkama yapılmıştır. %1 oranındaki tuzlu fosfat tamponu aspire edildikten sonra hücrelerin kültür ortamından ayrılması için 0,5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 4 dakika 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübe edilerek tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden 5 dakika sonra hücrelerin kültür kabından ayrılıp ayrılmadıklarının kontrol edilmesi için mikroskop altında inceleme yapılmış ve ayrılmanın gerçekleştiği görüldükten sonra hücrelere 5 ml besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu falkon tüpe alınarak santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatant atılarak pellet 2 ml besiyeri ortamında homojenize hale getirildi. Daha sonra üzerine 5 ml besiyeri eklemesi yapıldı ve 7 ml'lik hücre süspansiyonu kültür kaplarına alınarak 37 °C %5 CO₂'li ortamda kültür işlemi gerçekleştirildi. Tüm bu uygulama basamakları hücreler istediğimiz sayıya ulaşana kadar tekrar edilerek çalışma için kullanılacak hücrelerin çoğalması sağlandı (54,55).

3.4.2 Hücrelerin Sayımı

Hücrelerin sayısının belirlenmesi amacıyla tripsinizasyon işlemi sonrasında elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl 0,5 ml'lik tüpe alınmıştır ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi boyası eklenerek karışması sağlanmış ve bu karışımdan 15µl alınarak thoma lamında invert mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu yaklaşık olarak hesaplanmıştır (55).



Şekil 10 Thoma Lami

3.4.3 MTT Canlılık Belirleme Yöntemi

Sitotoksik etki potansiyelinin belirlenmesi amacıyla kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT testi kullanılmıştır. MTT canlılık belirleme yöntemi; hücre canlılığını, proliferasyonu ya da sitotoksitesini ölçmede kullanılan kolorimetrik ve ekonomik bir yöntemdir. MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Kolorimetrik yöntem için kullanılan esas parametre canlı hücrelerin göstermiş oldukları metabolik aktiviteleridir. Bu yöntem, MTT'nin tetrazolium halkasının parçalanması temeline dayanmaktadır. Bu metotta, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu için aktif durumda olan mitokondri bulunmalıdır ve yalnızca bu aktiflik sonucunda görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve kristallerin çözünmesiyle oluşan spektrofotometrik olarak belirlenen absorbans değerleri canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (56, 57, 58). Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha aktif oldukları için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir (59).

MTT çalışması için hazır olarak alınan ticari kitin içerisindeki prosedür kullanılmıştır. Aynı pasaj sayısına sahip A549, H1299 ve HUVEC hücreleri, hücre kültür kaplarının ortalama %80'ini kapladıklarında besiyerleri ortamdan alınmıştır ve Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra A549, H1299 ve HUVEC hücreleri sayılarak 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 24 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. 5 farklı dozda, 100 µl 5 farklı numune, üçer tekrarlı olarak uygulanan hücreler 48 ve 72 olmak üzere iki farklı süre uygulaması için inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amaçlı olarak kit içeriğindeki kör, maksimum inhibisyon (MI) için TritonX100 ve özüt uygulanmayan sadece hücre içeren kuyucuk şeklinde kontrol kuyucukları üçer tekrarlı olarak oluşturuldu. 48 ve 72 saat olmak üzere iki ayrı süre için hazırlanan hücre kültür kaplarına inkübasyon sonunda bütün kuyucuklara 10µl MTT solüsyonu ilave edilerek karanlıkta 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. MTT solüsyonuna tabi bıraktığımız hücrelerde formazan kristalleri görüntüsü meydana gelmiş ve oluşan formazan kristalleri Cristal Dissolving çözeltisi yardımıyla çözüldükten sonra oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Okunan absorbans değerleri kullanılarak hücresinin canlılık oranları belirlenmiştir.

% Canlılık hesabı:

Numune uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, numune uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

%Canlılık= [100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması/ numune uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı) (55).



Şekil 11 Formazan kristalleri mikroskop görüntüsü

3.5 İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen sonuçlar SPSS 21 (IBM) istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. TWO-WAY ANOVA (Çift yön ANOVA) testi ile değerlendirilmiştir. Değer %95 güven aralığında post-hoc testlerinden Tukey testi kullanılarak incelenmiş ve gruplar arasındaki farklar belirlenmiştir.



BÖLÜM 4

BULGULAR

Ozonlama işleminin ardından yağ içeriğindeki çift bağılı yağ asitleri parçalanma göstermiş ve bu parçalanma ozonlama süresiyle ilişkili olarak, artmıştır. Çift bağılarda gerçekleşen ozonlanma yoğunluğu etkilemiş ve bu etkiye paralel olarak viskozitede artış göstermiştir. Aktif oksijen kaynaklı peroksitlerin varlığı artmış, peroksit değeri yüksek değerlere ulaşmıştır. İyot değerindeki değişimler ozonlamanın varlığını gösteren en keskin göstergedir. Ozonlama süresine bağlı olarak, İyot değerinde azalma meydana gelmiştir. İyot değerinin düşüşü çifte bağ sayısının azalmasına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Ölçülen değerler Tablo 10’da gösterildiği gibidir.

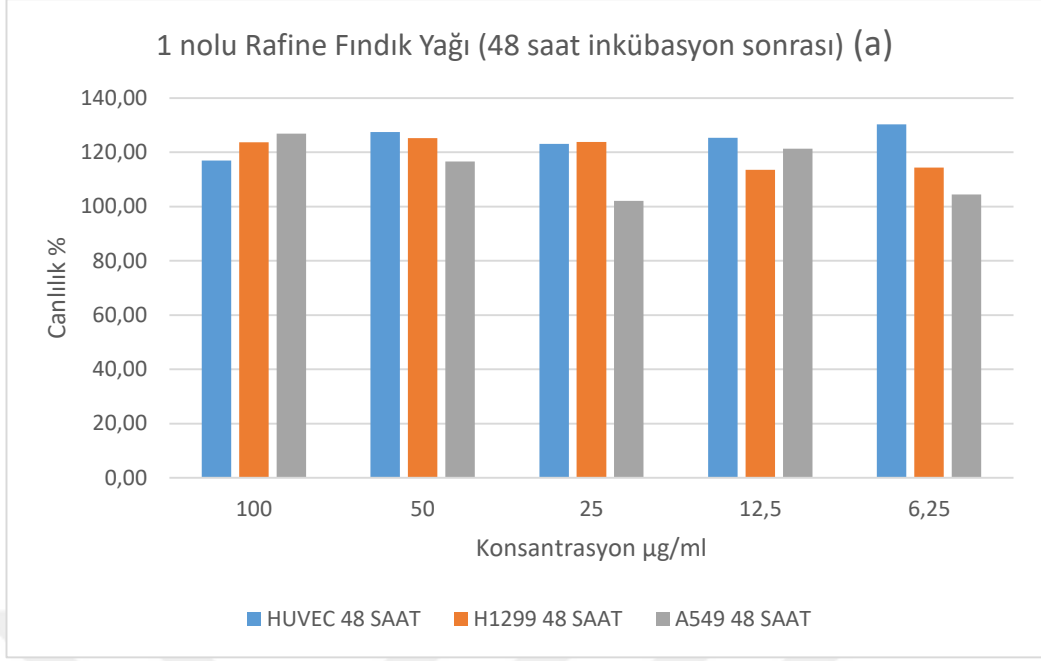
Tablo 10 Ozonlanmış Fındık Yağı Numunelerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Numune kodu	Numune açıklaması	Yoğunluk (g/ml, 25 °C)	Viskozite (cpt, 25 °C)	Peroksit (mEqO ₂ /kg)	İyot Değeri
1	Rafine Fındık Yağı	0,914	65,0	3,67	85,13
2	7-8 debi, 60 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,912	66,3	28,07	87,18
3	7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı	0,922	95,6	246,47	66,43
4	7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	0,918	77,8	160,16	80,08
5	7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı	0,925	92,0	301,45	53,17

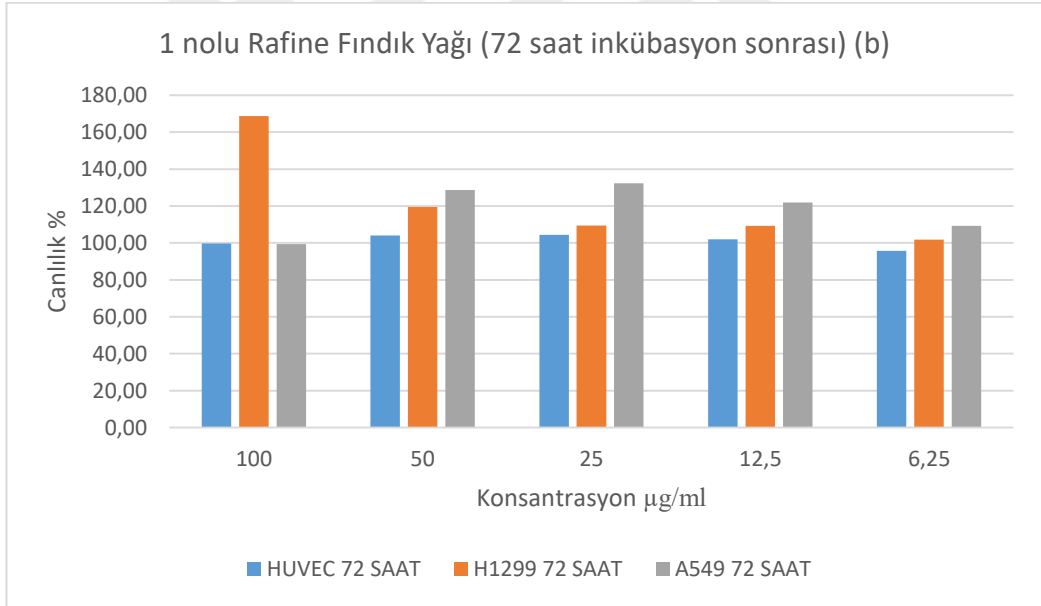
MTT çalışması için öncelikle aynı pasaj sayısına sahip A549, H1299 ve HUVEC hücreleri, hücre kültür flaksının yaklaşık %80'ini kapladığı zaman besiyerleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin tutunduğu flaks tabanından ve birbirlerinden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında A549, H1299 ve HUVEC hücrelerinin sayımları yapılarak 96'lık hücre kültür kaplarının kuyucuklarına yaklaşık 5000 hücre olacak şekilde konmuştur ve 24 saat 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

Elimizde bulunan 5 farklı ozonlanmış fındık yağı numunelerinden her biri 5 ayrı konsantrasyon ve üçer tekrarlı ayarlanarak her birinden 100µl olacak şekilde hücrelere uygulanmış ve hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak üçerli tekrar çalışılan Maksimum inhibisyon için TritonX100, hiçbir madde uygulanmamış sadece hücre içeren kuyucuklar (MO) ve 5-Florurasil konulmuştur. İnkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 10µl MTT solüsyonu ilave edilerek 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. MTT solüsyonuna tabi bıraktığımız hücrelerde formazan kristallerinin oluşup oluşmadığına mikroskop altında bakılarak oluşumun gözlenmesinin ardından kristallerin çözünmesi için SDS çözeltisi kullanılarak oluşan renk şiddetinin ölçümü için 570nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometre ile ölçümleri yapılmıştır. Ölçümden elde edilen absorbans değerleri canlılık yüzdesi hesapları için kullanılmıştır ve aşağıdaki formülle hesaplanarak değerlendirilmiştir.

%Canlılık= [100x Ozonlu fındık yağı uygulanan hücrelerin absorbans ortalaması/
Numune uygulanmamış kontrol hücreleri (MO) absorbansı]

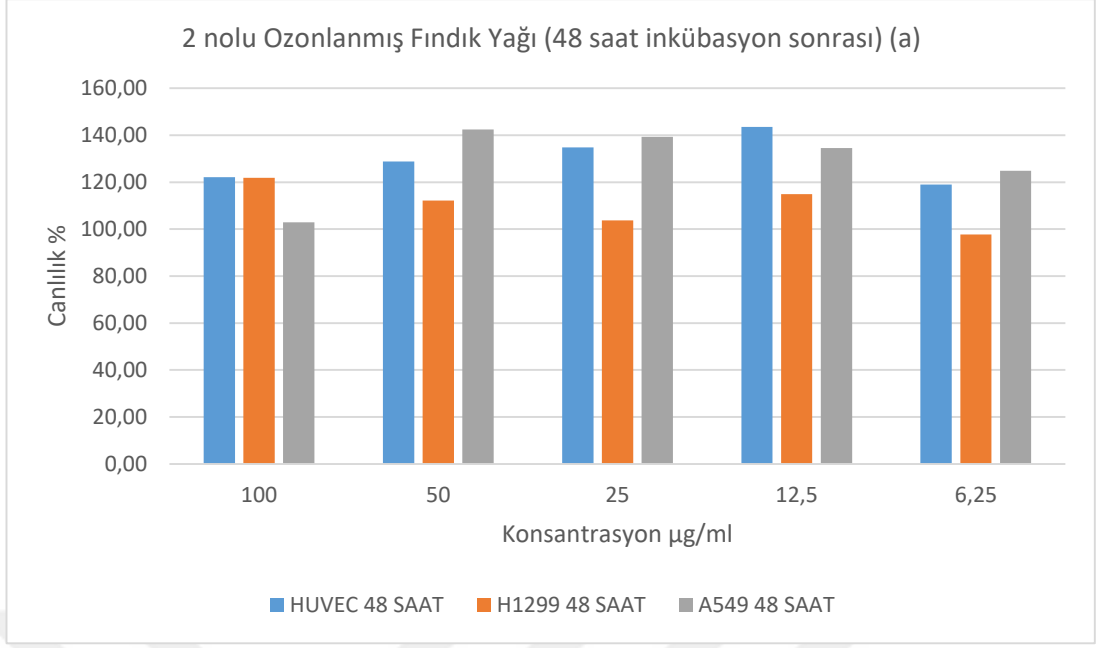


Şekil 12a Ozonlanmamış rafine fındık yağı (1nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

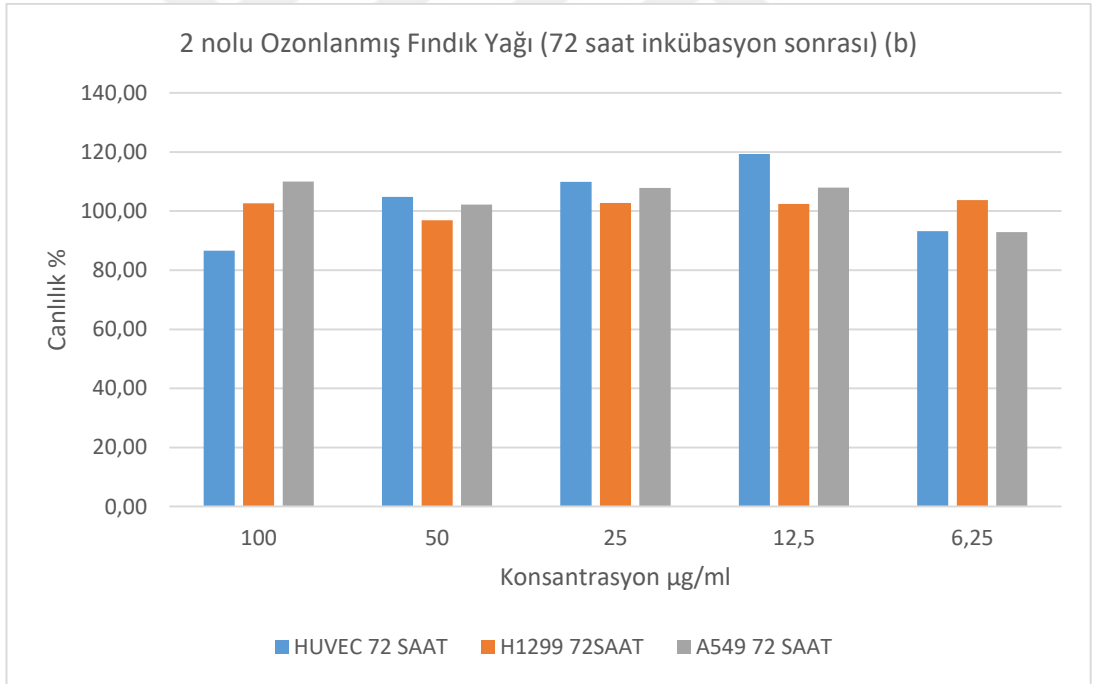


Şekil 12b Ozonlanmamış rafine fındık yağı (1nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

Ozonlanmamış rafine fındık yağı (1) numunesinin 48saat inkübasyon sonrası canlılık oranları 3 farklı hücre hattı ve 5 farklı konsantrasyonda kıyaslandığında Şekil 12a’da görüldüğü gibi en yüksek canlılık oranına sahip konsantrasyonun 6,25µg/ml bu konsantrasyonun en yüksek canlılığı HUVEC hücre hattında sağladığı 72saat inkübasyon sonrasında ise en yüksek canlılık oranını Şekil 12b’de görüldüğü gibi H1299 hücre hattında 100µg/ml konsantrasyonda olduğu saptandı.



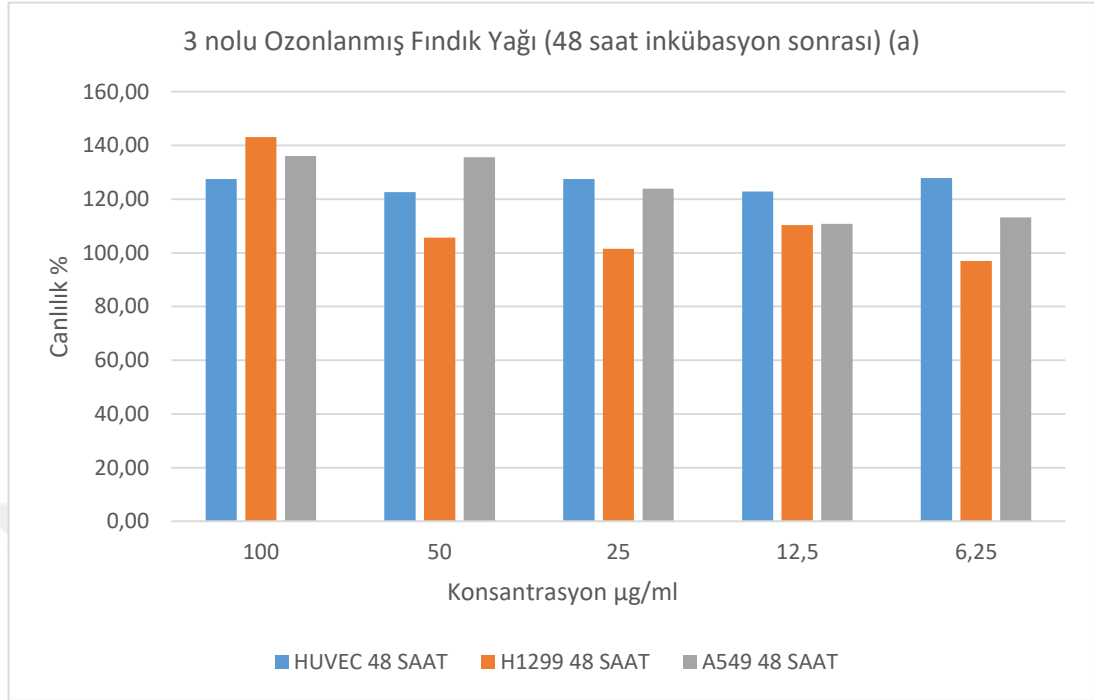
Şekil 13a 7-8debi 60dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (2nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları



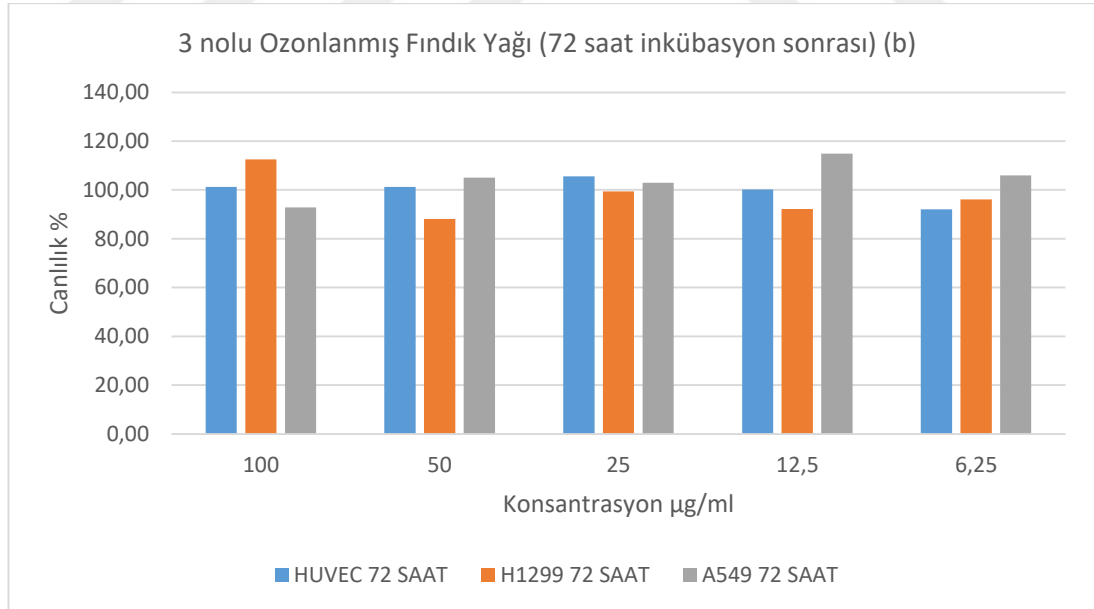
Şekil 13b 7-8debi 60dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (2nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

7-8debi 60 dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (2) numunesinin 48saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde canlılık oranları Şekil 13a’da görüldüğü gibi en yüksek canlılık oranının HUVEC hücre hattı üzerine 12,5µg/ml konsantrasyonun olduğu saptanırken 72saat inkübasyon sonrasında hücre hatları

üzerinde çıkan canlılık oranlarına Şekil 13b’de görüldüğü gibi en yüksek canlılık oranının HUVEC hücre hattı üzerine 12,5µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.



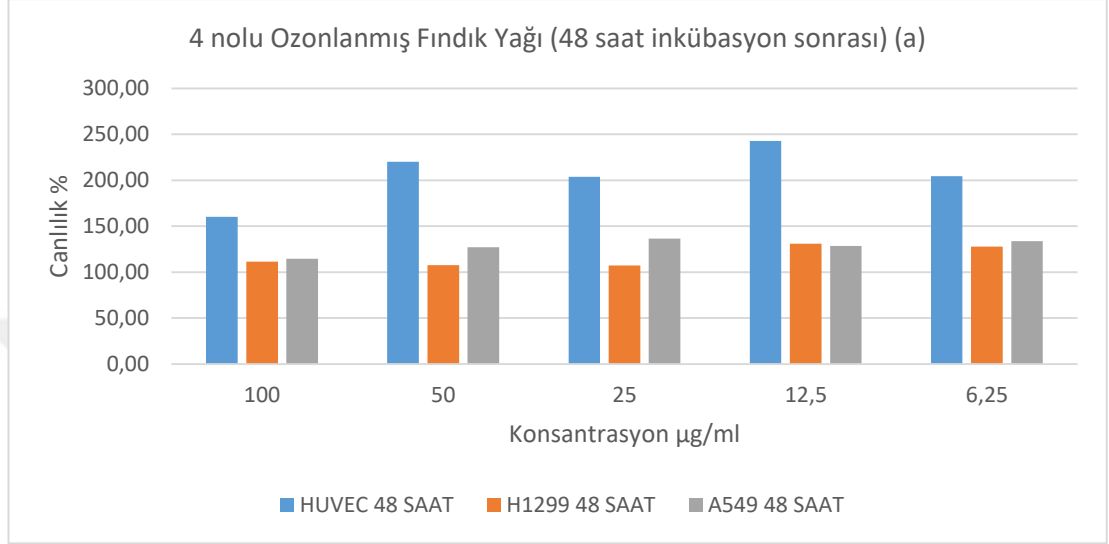
Şekil 14a 7-8debi 120dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (3nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları



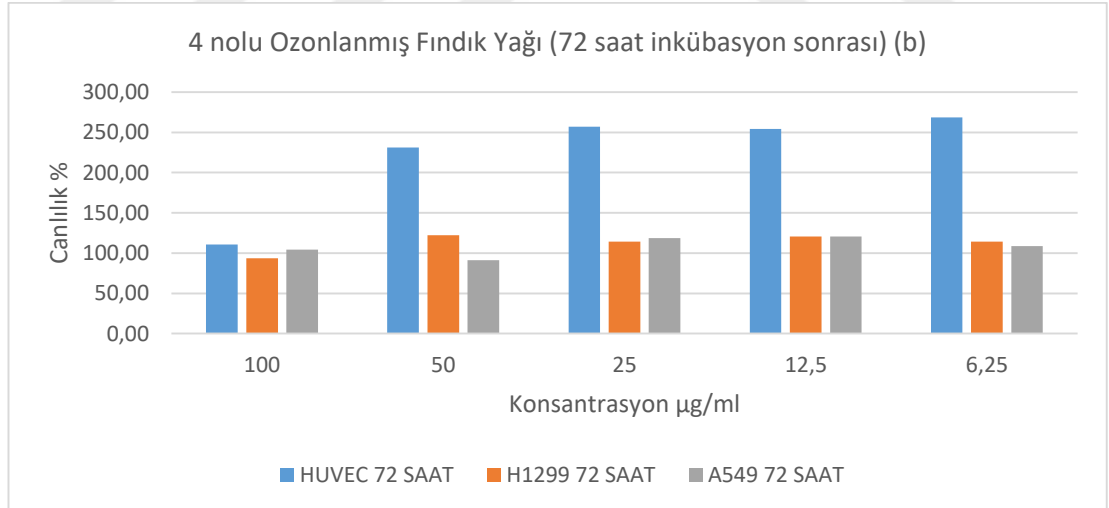
Şekil 14b 7-8debi 120dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (3nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

7-8debi 120 dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı (3) numunenin 48saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında

Şekil 14a’da görüldüğü gibi en yüksek canlılık oranının H1299 hücre hattı üzerine 100µg/ml konsantrasyonun olduğu saptanırken 72saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında Şekil 14b’de görüldüğü gibi en yüksek canlılık oranının A549 hücre hattı üzerine 12,5µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.



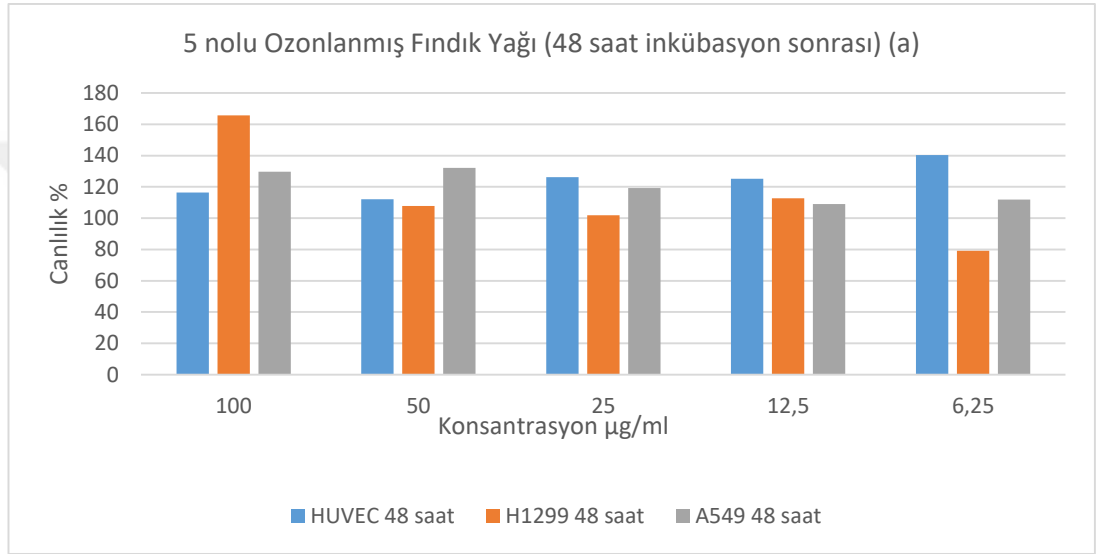
Şekil 15a 7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (4nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları



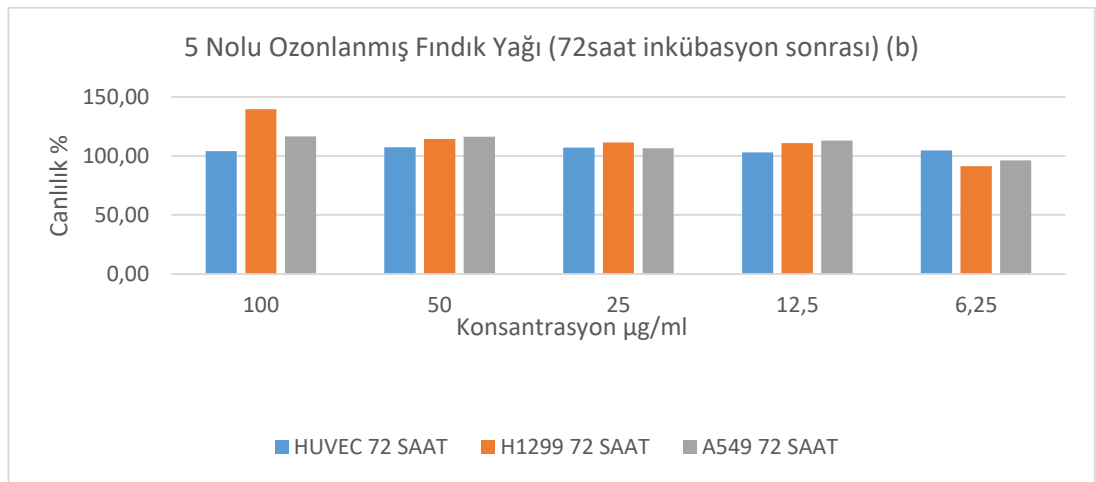
Şekil 15b 7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (4nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

Şekil 15a'da görüldüğü üzere 4nolu (7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) numunenin 48saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranının HUVEC hücre hattı üzerine 12,5µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.

Şekil 15b'de görüldüğü üzere 4nolu (7-8debi 60dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) numunenin 72saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranının HUVEC hücre hattı üzerine 6,25µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.



Şekil 16a 7-8debi 120dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (5nolu) numunenin 48 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları



Şekil 16b 7-8debi 120dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı (5nolu) numunenin 72 saat inkübasyon sonrası hücre hatları üzerine canlılık oranları

Şekil 16a’da görüldüğü üzere 5nolu (7-8debi 120 dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) numunenin 48saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranının H1299 hücre hattı üzerine 100 µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.

Şekil 16b’de görüldüğü üzere 5nolu (7-8debi 120 dk Ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) numunenin 72 saat inkübasyon sonrasında hücre hatları üzerinde çıkan canlılık oranlarına bakıldığında en yüksek canlılık oranının H1299 hücre hattı üzerine 6,25µg/ml konsantrasyonun olduğu saptandı.

Yapılan MTT testleri sonucu elde edilen canlılık verileri sonucunda 5nolu numunenin H1299 hücre hattı üzerinde 48 saat inkübasyon sonucunda canlılık oranını %79’a kadar düşürdüğü (Şekil 16a) saptanmıştır. 3nolu örnekte ise H1299 hücre hattı üzerine en yüksek konsantrasyonda en yüksek canlılık oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 14a ve Şekil 14b). 2-4nolu örnekler ise kontrol grubu olarak belirlediğimiz ozonlanmamış rafine fındık yağı numunesi ile benzer HUVEC hücre hattı üzerinde benzer canlılık oranlarını göstermiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen ozonlanmış fındık yağlarının 2-4nolu örneğinin kontrol olarak seçilen numune ile hemen hemen benzer konsantrasyonlarda canlılık oranlarına sahip olduğu (Şekil 13a – Şekil 13b ve Şekil 15a – Şekil 15b), 3-5nolu ozonlanmış yağ numunelerinin en yüksek konsantrasyonda bile kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstererek canlılık oranlarını düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 14a – Şekil 14b ve Şekil 16a - Şekil 16b). Çalışma kapsamında yapılan tüm çalışmalar yüzde canlılık değerleri olarak Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11 MTT Sonucu Tüm Hücre Hatları, İnkübasyon Süreleri, Konsantrasyonlar ve % Canlılık oranları

Numune Kodları		HUVEC (%Canlılık)		H1299 (%Canlılık)		A549 (%Canlılık)	
		48saat	72saat	48saat	72saat	48saat	72saat
1	100 µg/ml	116,99	99,67	123,68	168,77	126,88	99,40
	50 µg/ml	127,45	104,14	125,21	119,53	116,60	128,74
	25 µg/ml	123,09	104,34	123,82	109,36	102,11	132,37
	12,5 µg/ml	125,38	101,93	113,51	109,24	121,34	121,99
	6,25 µg/ml	130,28	95,80	114,35	101,75	104,48	109,30
2	100 µg/ml	122,11	86,59	121,87	102,69	102,90	110,02
	50 µg/ml	128,87	104,80	112,26	96,96	142,42	102,17
	25 µg/ml	134,86	109,87	103,76	102,81	139,39	107,85
	12,5 µg/ml	143,57	119,35	114,90	102,46	134,52	107,97
	6,25 µg/ml	118,95	93,20	97,77	103,74	124,90	92,87
3	100 µg/ml	127,45	101,20	143,18	112,51	136,10	92,87
	50 µg/ml	122,66	101,20	105,71	88,07	135,57	105,07
	25 µg/ml	127,45	105,54	101,53	99,42	123,98	102,90
	12,5 µg/ml	122,88	100,20	110,31	92,16	110,80	114,86
	6,25 µg/ml	127,89	91,99	96,94	96,14	113,18	105,92
4	100 µg/ml	160,24	110,81	111,28	93,45	114,49	104,47
	50 µg/ml	220,08	230,96	107,39	122,34	127,14	91,18
	25 µg/ml	203,91	256,90	107,25	114,27	136,36	118,72
	12,5 µg/ml	242,82	254,39	130,82	120,70	128,59	120,65
	6,25 µg/ml	204,60	268,48	127,75	114,15	133,60	108,82
5	100 µg/ml	116,34	104,00	165,74	139,65	129,64	116,55
	50 µg/ml	112,09	107,20	107,80	114,39	132,15	116,18
	25 µg/ml	126,15	106,94	101,81	111,35	119,37	106,40
	12,5 µg/ml	125,28	103,07	112,67	110,76	109,09	112,92
	6,25 µg/ml	140,42	104,67	79,11	91,23	111,99	96,26

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda çalışılan numune grupları (1(kontrol), 2, 3, 4, 5) arasında 1 numara (kontrol) ve diğer gruplar arasında (2, 3, 4, 5) hücre hatları, konsantrasyonlar ve inkübasyon süreleri baz alınarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı derecede bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda 4 numaralı numune ile diğer çalışma grupları (1(kontrol), 2, 3, 5) arasında yapılan kıyaslama sonucunda HUVEC hücre hattında 48 saat inkübasyon sonunda diğer gruplar ile kıyaslandığında konsantrasyonlara göre yüzde canlılık oranları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Yapılan istatistik analizi sonucuna göre gruplar arasında canlılık oranları

kıyaslandığında anlamlı olarak çıkan 5 nolu örnek diğer örneklere kıyasla canlılık oranı baz alındığında diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede farklı olduğu ve diğer gruplara göre canlılık yüzdelerinin önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Yapılan Two way ANOVA istatistiksel analizi sonucunda grupların 72 saat inkübasyon süreleri kendi aralarında kıyaslandığında Kontrol (1) ile diğer gruplar (2, 3, 4, 5) arasında anlamlı derecede bir farklılığın olmadığı istatistiksel olarak ortaya konmuştur ($p>0.05$).



BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında 7-8 debide ve ozon uygulama süreleri farklı olan ozonlu fındık yağı numuneleri ve ticari olarak kullanılan ozonlanmamış rafine fındık yağı kullanılmıştır. Ozonlama işleminin ardından yağ içeriğindeki çift bağlı yağ asitleri parçalanmış ve bu parçalanma sonucunda ozonlama süresine paralel olarak artış göstermiştir. Ozonlama ile birlikte çift bağlarda meydana gelen değişim yoğunluğu arttırdığı gibi buna paralel olarak viskozitede artış meydana geldiği görülmektedir. Aktif oksijenlerin neden olduğu yapılardan dolayı peroksit değerlerinde artış meydana gelmiş ve peroksit değerinde yüksek değerlere ulaşılmıştır. İyot değerindeki değişim ozonlamanın gerçekleştiğini gösteren en net göstergedir. Ozonlama süresine bağlı olarak, İyot değeri düşmüştür. İyot değerinin düşüşünün nedeni çift bağ sayısındaki azalmadır. Bu çalışma kapsamında ozon süresinin toksik etki potansiyeline, ozonlamanın toksik etki potansiyeline kontrol grubu olarak ticari ozonlanmamış rafine fındık yağının toksik etki potansiyeline bakılıp değerlendirilerek yeni ozonlanmış yağların rafine ticari fındık yağına (çotanak) göre fonksiyonel ve alternatif bir ürün olduğu araştırıldı.

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında ozonlanmış fındık yağı ile yapılan herhangi bir sitotoksik aktivite potansiyeli çalışması literatürde kaydedilmemiştir. Ozonlu bitkisel yağlar gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerindeki, değeri yüksek terapötik, antibakteriyel ve fungusit etki potansiyellerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (8, 60, 61, 69). Yağlar ile reaksiyonu sonucu ozon gazı, doymamış yağ asitlerinde bulunan karbon-karbon bağları arasında Criegee mekanizmasına göre stabilize olur (62, 63). Bu nedenle ozonlanmış yağlar 4 °C'de 2 yıl boyunca stabil bir şekilde kalabilirler (64). Ozonlanmış zeytinyağı ile yapılan çalışmalarda; ozonlanmış zeytinyağının temel antioksidanlar tarafından yönlendirilen çeşitli biyolojik faydaları olduğu saptanmıştır (65).

Bunun yanında in vitro olarak L929 fare fibroblast hücreleri üzerine ozonlanmış zeytin yağı uygulaması yapılarak sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışma kapsamında sadece ozon uygulamasının hücrelerin viskozitesini etkilemesi sonucunda önemli ölçüde hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiş olup ozonlama süresinin bu viskoziteyi etkilediği belirtilmiştir. Bu çalışma kapsamında bu viskoziteyi azaltmak için ozonlanmış yağ gliserol ile karıştırılarak kullanılmıştır. Bu kapsamda MTT metodu kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarında ozonlanmış zeytinyağının hücre canlılık oranlarının üzerine pozitif bir etkisi olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu ifade edilmiştir (66). Yapılan fareler üzerinde yapılan diğer bir çalışma sonucunda ise ozonlanmış susam yağının kollojen lifler üzerindeki etkisine bakılmış, elde edilen sonuçlara göre hasarlı kollojen liflerin ozonlanmış susam yağı uygulaması ile birlikte kollojen liflerin yenilenme süresinin kısaldığı saptanmıştır (67). Bizim çalışmamızda, ozonlanmış fındık yağlarının HUVEC, H1299, A549 hücre kültürlerinde MTT metodu ile analizleri yapılarak herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda çıkan canlılıklar değerlendirildiğinde ozonlanmış yağların ozonlanmayan rafine yağa göre canlılık oranlarını daha yüksek seviyelerde tuttuğu saptanmıştır.

Sitotoksisite testleri, toksik etkisi bilinmeyen bir numunenin veya maddenin etkileşimi hakkında bilgi verir ve daha sonra yapılması planlanan hayvan deneyleri veya klinik denemelere kaynak oluşturur. Sitotoksisite çalışmalarının temel prensibi canlı/ölü hücre miktarının saptanmasıdır ve yaygın olarak in vitro toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda yeni sentez edilen bu ozonlanmış fındık yağı numunelerinin hücre canlılık oranı kolorometrik yöntem olan MTT ile tespit edilmiştir. 1 (Ozonlanmamış rafine fındık yağı), 2 (7-8 debi, 60dk Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı), 3 (7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı), 4 (7-8 debi, 60 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı), 5 (7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) kodlu numunelerin hiçbirinin HUVEC, H1299, A549 hücre hatları üzerine toksik bir etki göstermediği saptanmıştır.

Sağlıklı insan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC) hücre hattı üzerine bütün numunelerin yüksek konsantrasyonlarının bile (100 µg/ml) hücre canlılığı üzerine herhangi negatif bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Bunun yanında 5 (7-8 debi, 120 dakika ozonlanmış hekzan ekstraksiyonu ile elde edilmiş rafine olmayan fındık yağı) nolu numunenin 6,25 µg/ml konsantrasyonun kanserli hücre hattı üzerinde (H1299) canlılığı %79'a kadar düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer kanser hücre hattı olarak kullanılan A549 hücresi üzerine 3 (7-8 debi, 120 dakika Ozonlanmış rafine olmayan fındık yağı) nolu numunenin 6,25 µg/ml konsantrasyonunun hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir.

Yeni sentez edilen bu ozonlu fındık yağlarının, yağ ekstresi için kullanılan madde veya ozonlama süresi farklılığına bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkilerinin olduğu, bunun yanında sağlıklı insan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC) hücre hattı üzerine toksik herhangi bir etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Değerlendirilen bu veriler doğrultusunda fındık yağının ozonlanmasının toksik bir etkisinin olmaması, güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi, ozonun gerek farmakolojik gerekse de kozmetik etkilerini de bünyesinde bulunduran fonksiyonel bir yağ olarak üretilebileceği, kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Singh B.N, Singh B.R, Singh R.L, Prakash D, Dhakarey R, Upadhyay G, Singh H.B. 2009. Oxidative DNA damage protective activity, anti oxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringaoleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, **47(6)**: 1109–1116.
- 2- Erik, S., Tarıkahya, B. 2004. Türkiye Florası Üzerine. *Kebikeç*, **17**:139-163.
- 3- Kendir, G., Güvenç, A. 2010. Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Hacettepe Ün. Eczacılık Fak. Dergisi*, **30(1)**: 49-80.
- 4- DOĞANAY, H., 1998, Türkiye Ekonomik Coğrafyası. Çizgi Kitabevi Yay., Konya.
- 5- T.C. TARIM ORMAN VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI, 1986, Fındık Tarımı. Ankara, s. 10.
- 6- Parcerisa, J., Richardson, D., Rafecas, M., Condon, R., Boatella, J., 1998. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA), *Journal of chromatography A*, **805**, 259–268.
- 7- Shamma, N.K., Hung, Y.-T., Wang, L.K., 2005. *Handbook of Environmental Engineering, Volume 3: Physicochemical Treatment Processes*, 315-357, The Humana Press Inc., Totowa, NJ,
- 8- Diaz, M.F., Hernandez, R., Martinez, G., Vidal, G., Gomez, M., Fernandez, H. Ve Garces, R., 2006. Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil, *J. Braz. Chem. Soc.*, **17(2)**, 403-407.
- 9- Diaz, M.F., Sazatornil, J.A.G., Ledea, O., Hernandez, F., Alaiz, M., ve Garces, R., 2005. Spectroscopic Characterization of Ozonized Sunflower Oil, *Ozone: Science and Engineering*, **27**, 247-253.
- 10- Sadowska, J., Johansson, B., Johannessen, E., Friman, R., Broniarz-Press, L., ve Rosenholm, J.B., 2008. Characterization of Ozonated Vegetable Oils by Spectroscopic and Chromatographic Methods, *Chemistry and Physics of Lipids*, **151**, 85-91.
- 11- Behzad S, Ebrahim K, Mosaddegh M, Haerid A 2016. *Primula auriculata* extracts exert cytotoxic and apoptotic effects against HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **15(1)**: 311-322.
- 12- Unnati S, Ripal S, Sanjeev A, Niyati A 2013. Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, **11(1)**: 16-23.

- 13- Sarıyar, L. 1998. Bazı Küflerin Fındıkta Lipolitik Aktivitesinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Y.Lisans Tezi, 107s İstanbul.
- 14- Fallico, B., Arena, E., Zappalâ, M. 2003. Rosating of hazelnuts. Role of oil in colour development and hydroxymethylfurfural formation. *Food Chemistry*, 81: 569573.
- 15- Gürses, M. 1997. Farklı Depolama Şartlarının İç Fındıkta Aflatoksin Oluşumuna Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Y. Lisans Tezi, 38s, Ankara.
- 16- Özdemir, M. 1998. Fındıkta Raf Ömrüne Etki Eden Faktörler. *Gıda Teknolojisi* **3(3)**:66-71.
- 17- Demir, C. 1996. Değişik Rutubet ve Sıcaklıklarda Depolanan Fındıkta Aflatoksin Oluşumunun Araştırılması. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Y. Lisans Tezi, 73s, Tekirdağ.
- 18- Nas, S., Gökalp, H. Y., Ünsal, M. 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Ders Kitapları Yayın No: **005**, 329s, Denizli.
- 19- Potter, N. N., Hotchkiss, J. H. 1995. Food Science. United States of America, Chapman & Hall, Thomson Publishing, 608s, Fifth Edition, New York.
- 20- Parcerisa, J., Casals, I., Boatella, J., Condon, R., Rafecas, M. 2000. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A*, **881**: 149-158.
- 21- Benitez-Sánchez, P. L., León-Camacho, M., Aparicio, R. 2003. A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* **218**: 13-19.
- 22- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., Oshima, T. 2003a. Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellena* L.) 1. Compositional Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3790-3796.
- 23- Battino R., 1981. Oxygen and ozone. IUPAC solubility data series. Vol. 7. Oxford data series . VI. 7. Oxford UK: Pergamon Press.
- 24- Bocci V., 2006. Scientific and Medical Aspect of Ozone Therapy. state fo the Art. *A rhives of Medical Research.* **37**:425-435
- 25- Bocci V, Borrelli E, Travagli V Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug *Med.Res. Rev.* 2009; **29(4)**: 646- 82
- 26- Baş, F., Ömeroğlu, S., Türdü, S., Aktaş, S. 1986. Önemli Türk Fındık Çeşitlerinin Bileşim Özelliklerinin Saptanması. *Gıda.* **11(4)**: 195-201.

- 27- Parcerisa, J., Richardson, D., Rafecas, M., Condon, R., Boatella, J. 1998. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *Journal of Chromatography A*, **805**: 259-268.
- 28- Açkurt, F., Özdemir, M., Biringen, G., Löker, M. 1999. Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry* **65**: 309-313.
- 29- Özdemir, M., Açkurt, F., Kaplan, M., Yıldız, M., Löker, M., Gürcan, T., Biringen, G., Okay, A., Seyhan, F. G. 2001. Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability. *Food Chemistry* **73**: 411-415.
- 30- M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sánchez-Pérez, J. Hernández-Méndez., 2001. Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection *Journal of Chromatography A*, **935**, 77-86.
- 31- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C. M., Oshima, T. 2003a. Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) 1. Compositional Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 3790-3796.
- 32- Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., O'Brien, N. M. 2004. Fatty acid profile, Tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **55(3)**: 171-178.
- 33- Bada, J. C., León-Camacho, M., Prieto, M., Alanso, L. 2004. Characterization of oils of hazelnuts from Austrias, Spain. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**: 294-300.
- 34- Lee, C.H., D.S., Lee, S.C., Park, H.J., Lee, D.S., 2004 A coating for use as antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nişin and α -tocopherol. *J. Food Eng.* **62**, 323-329
- 35- Zucco F, Angelis DI, Stamatia A, 1998: Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.
- 36- Gilbert DF, Boutros M, 2016: A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. *Methods Mol Biol*, **1470**, 75-84.
- 37- Riss TL, Moravec RA, 2004: Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn*, **2, 1**, 51- 62.
- 38- Galluzzi L et al, 2009: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, **16**, 1093-1107

- 39- Riss TL, Moravec RA, 2006: Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In “Cell Biology”, Ed; Celis JE, *Elsevier Academic Press*, Burlington.
- 40- Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL, 2007: A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem*, **336(2)**, 197-206.
- 41- Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J, 1993: The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, **160**, 81-88.
- 42- Fan F, Wood KV, 2007: Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Techn*, **5(1)**, 127-136.
- 43- Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR, 2006: Cytotoxicity and cell growth assays. In “Cell biology: a laboratory handbook”, Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
- 44- Borenfreund E, Puerner JA, 1985: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, **24(2-3)**, 119-124.
- 45- Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M, 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocol*.
- 46- O'Connor R, Heenan M, Duffy C, Clynes M, 1998: Miniaturized in vitro methods in toxicity testing. In “Animal Cell Culture Techniques”, Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.
- 47- Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG, 1991: 5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **1, 11**, 611-614.
- 48- Rous, P. (1911). A Sarcoma Of The Fowl Transmissible By An Agent Separable From The Tumor Cells. *J Exp Med*. **13 (4)**, 397–411.
- 49- Akçalı, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi* **25 (3)**, 119-123.

- 50- Travis, WD., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, AG., Geisinger, KR., Yatabe, Y., Beer, DG., Powell, CA., Riely, GJ., Van Schil, PE., Garg, K., Austin, JH., Asamura, H., Rusch, VW., Hirsch, FR., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, RM., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, JP., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, PC., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, JS., Miller, VA., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., Yankelewitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* **6(2)**, 244-85.
- 51- Park, HJ., Zhang, Y., Georgescu, SP., Johnson, KL., Kong, D., Galper, JB., 2006. Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Offer New Insights into the Relationship between Lipid Metabolism and Angiogenesis. *Stem Cell Rev*, **2(2)**:93-102.
- 52- Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Luo, J., Liu, M., Yi, Z., 2012. Usnic Acid Inhibits Breast Tumor Angiogenesis and Growth by Suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 Signaling Pathways. *Angiogenesis* **15**: 421–432.
- 53- Yazır, Y., Dalkılıç, H., 2012. Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç Endotel Hücre Kültürü. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, **15(3)**:137-142.
- 54- Çetin, E. (2011). Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Ökse Otu Ekstraktlarının Apoptotik Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi
- 55- Cevatemre, B. (2012). Fenretinid Ve İndol-3-Karbinol Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Soyları Üzerindeki Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek lisans tezi.
- 56- Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods.* **89 (2)**, 271-27.
- 57- McGahon, AJ., Martin, SJ., Bissonnette, RP., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, RJ., Nishioka, WK., Green, DR. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, Schwartz LM, Osborne BA (Ed.): *Methods in Cell Biology, Cell Death. Academic Press. San Diego*, **46**. 150-181.
- 58- Horakova, K., Sovcikova, A., Semanova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Fre Radic BiolMed.* **30(6)**, 650-64.,
- 59- Doyle, A., Griffiths, JB. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. *John Wiley&Sons.* **57**, 62-64.

- 60- Cirlini, M., A. Caligiani, G. Palla, A. De Ascentiis, and P. Tortini. 2012. "Stability Studies of Ozonized Sunflower Oil and Enriched Cosmetics with a Dedicated Peroxide Value Determination." *Ozone: Science & Engineering* **34** (4), 293–9.
- 61-Georgiev, V., M. Anachkov, T. Batakliiev, and S. Rakovsky. 2013. "Study on the Stoichiometry and Reaction Products of Extra Virgin Olive Oil Ozonation." *Bulgarian Chemical Communications* **45**(B), 203–7.
- 62- Criegee, R. 1975. "Mechanismus Der Ozonolyse." *Angewandte Chemie* **87** (21):765–71.
- 63- Geweely, G. 2006. "Antifungal Activity of Ozonized Olive Oil." *International Journal of Agriculture and Biology* **8**(5), 670–675.
- 64- Valacchi, G., V. Fortino, and V. Bocci. 2005. "The Dual Action of Ozone on the Skin." *British Journal of Dermatology* **153**:1096–100.
- 65- Cerqueira, M., B. Souza, J. Teixeira, and A. Vicente. 2012. "Effect of Glycerol and Corn Oil on Physicochemical Properties of Polysaccharide Films—A Comparative Study." *Food Hydrocolloids* **27**: 175–84.
- 66- Günaydın, Y., Sevim, H., Tanyolaç, D., Gürpınar, A.Ö., 2018. "Ozonated Olive Oil with a High Peroxide Value for Topical Applications: In-vitro Cytotoxicity Analysis with L929 Cells" *Ozone: Science & Engineering* **40**(1): 37-43.
- 67- Valacchi, G., Zanardi, I., Lim, Y., Belmonte, G., Miracco, C., Sticozzi, C., Bocci, V., Travagli, V., (2013) Ozonated oils as functional dermatological matrices: effects on the wound healing process using SKH1 mice. *International Journal of Pharmaceutics*, **458**(1), 65-73.
- 68- Aziz CESUR (2016) "Rafinesiz Fındık Yağının Ozonlanması ve Fiziksel, Kimyasal, Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması" Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Düzce Türkiye.
- 69- Rodríguez, Z. B. Z., R. G. Álvarez, D. Guanche, N. Merino, F. H. Rosales, S. M. Cepero, Y. A. González, and S. Schulz. 2007. "Antioxidant Mechanism Is Involved in the Gastro protective Effects of Ozonized Sunflower Oil in Ethanol-Induced Ulcers in Rats." *Mediators of Inflammation*. 65873.