



**DOĞAL ÜRÜNLERDE BULUNAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN
GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ**

Gökçe TANER

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2015

Gökçe TANER tarafından hazırlanan “Doğal Ürünlerde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

İkinci Danışman : Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Farmasötik Toksikoloji, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan : Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Farmasötik Toksikoloji, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Eşref YÜKSEL

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Farmasötik Toksikoloji, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Doç. Dr. Onur ERDEM

Farmasötik Toksikoloji, Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 26 /02 / 2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gökçe TANER

26.02.2015

DOĞAL ÜRÜNLERDE BULUNAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Gökçe TANER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2015

ÖZET

Bitkilerde ikincil metabolitler olarak bilinen doğal bileşiklerin, oksidatif stres tarafından indüklenen genetik hasara karşı koruyucu etkileri olduğu birçok çalışmada gösterilmektedir. Bitkilerden elde edilen özellikle fenolik yapıdaki kimyasal maddeler antioksidan özellikleri nedeniyle reaktif oksijen bileşiklerini inaktive ederek radikal hasarının önlenmesinde ve tedavisinde önemli rol oynamaktadırlar. Ancak günümüzde bitkisel ürünlerin birçoğunun yapı ve etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamıştır ve birçok bitkisel antioksidan maddenin toksisitelerine ve insan sağlığına olası risklerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Tez çalışması kapsamında fenolik bileşiklerin troloks eşdeğer antioksidan kapasite tayini (TEAK) ile antioksidan özellikleri ve çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO) nötral kırmızı alım yöntemi (NKA) ile olası sitotoksik etkileri belirlenmiş, ayrıca sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda hem genotoksik etkileri hem de oksidatif hasara neden olan ve genotoksik etki potansiyeli bilinen hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı antigenotoksik etkileri insan lenfosit hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) ve mikroçekirdek (MÇ) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerden piknogenol, resveratrol ve rosmarinik asidin düşük konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etkileri olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etkili olabildikleri gösterilmiştir. Vanilik ve sinnamik asit ise araştırılan konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etkiye neden olmamıştır. Diğer yandan araştırılan fenolik bileşiklerin hepsinin primer DNA hasarına ve MÇ oluşumuna neden olan H_2O_2 'nin oluşturduğu DNA hasarını azaltıcı etkileri olduğu belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048

Anahtar Kelimeler : Fenolik bileşikler, genotoksikite, sitotoksikite, troloks eşdeğer antioksidan kapasite, nötral kırmızı alımı, comet, mikroçekirdek

Sayfa Adedi : 201

Danışman : Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

İkinci Danışman : Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF PHENOLIC COMPOUNDS
FOUND IN NATURAL PRODUCTS

(Ph. D. Thesis)

Gökçe TANER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2015

ABSTRACT

It has been shown in many studies that natural compounds in plants known as secondary metabolites, have protective effects against genetic damage induced by oxidative stress. Particularly phenolic phytochemicals from plants play an important role in the prevention and treatment of radical damage by inactivating the reactive oxygen compounds due to their antioxidant properties. However the structure and the activities of many herbal products are not fully elucidated yet and there is not enough data about the toxicity of herbal antioxidants and their possible risks to human health. In this thesis, it was aimed to determine the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of pycnogenol, resveratrol, rosmarinic acid, vanillic acid and cinnamic acid which are phenolic compounds found in natural products. In this thesis, antioxidant properties of phenolic compounds were measured by trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC) and potential cytotoxic effects were evaluated in Chinese hamster ovary (CHO) cells by neutral red uptake method (NRU), as well as at the non-cytotoxic concentrations, both genotoxic and antigenotoxic effects against hydrogen peroxide (H_2O_2), which is known to have genotoxic potential and causes oxidative damage were assessed by single cell gel electrophoresis (Comet) and micronucleus (MN) methods in human lymphocytes. Of these compounds, pycnogenol, resveratrol and rosmarinic acid at low concentrations have been shown to have no cytotoxic and genotoxic effects, but at the high concentrations they show cytotoxic and genotoxic effects. But vanillic acid and cinnamic acid at all studied concentrations did not cause cytotoxicity and genotoxicity. On the other hand it was determined that all of the phenolic compounds have reduced genotoxic effects of H_2O_2 which causes pimer DNA damage and micronucleus formation.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Fenolic compounds, genotoxicity, cytotoxicity, trolox equivalent antioxidant capacity, neutral red uptake, comet assay, micronucleus

Page Number : 201

Supervisor : Prof. Dr. Zeki AYTAÇ

Co-Supervisor : Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım sırasında desteğini ve güvenini her zaman hissettiğim değerli tez danışmanım Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a ve çalışmalarımın her aşamasında, konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, bana yeni ufuklar açan, en zor zamanlarımda beni yeniden cesaretlendiren, hepsinden önemlisi hayatımın her alanında, her anlamda örnek aldığım, en büyük şansım çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN'a;

Bilgi ve deneyimleri ile tezime katkı sağlayan, tez izleme komitesindeki sayın hocalarım Prof. Dr. Eşref YÜKSEL'e ve Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na ve Hacettepe Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalından hocam Prof. Dr. Ahmet BAŞARAN'a;

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, benden yardımlarını ve dostluğunu hiç esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Sevtap AYDIN'a ve her aşamada birlikte çalıştığım doktora öğrencisi arkadaşlarım Deniz ÖZKAN VARDAR ve Zehra SARIGÖL'e; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma; doktora eğitimim sırasında idari süreçlerin sorunsuz ilerlemesini sağlayan Fen Bilimleri Enstitüsü akademik ve idari personeline ve öğrenci işleri personeli Doğan KARA'ya en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Uzun soluklu bir süreç olan doktora eğitimim boyunca, bu süreci benimle birlikte yaşayan ve tüm başarılarımda büyük emekleri olan, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca akademik kariyerime çok büyük katkı sağladığına inandığım, bilimsel bakış açımın değişmesini sağlayan, Fransa/Toulouse INRA Toxalim Araştırma Merkezi Genotoksisite ve Sinyalizasyon laboratuvarındaki yurtdışı çalışmalarımı, “2214/A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı” ile destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e saygılarımla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 05/2011-63 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fenolik Bileşikler	3
2.1.1. Fenolik asitler	4
2.1.2. Flavonoidler	5
2.2. Fenolik Bileşiklerin Önemi.....	7
2.3. DNA Hasarı ve Genomik Kararlılık.....	9
2.3.1. Oksidatif DNA hasarı.....	9
2.3.2. Alkilleyici DNA hasarı	10
2.4. DNA Hasarının Fenolik Bileşikler Tarafından Engellenmesi	10
2.5. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler	16
2.5.1. Piknogenol.....	16
2.5.2. Resveratrol	33
2.5.3. Rosmarinik asit.....	44
2.5.4. Vanilik asit	52

	Sayfa
2.5.5. Sinnamik asit.....	57
2.6. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	61
2.6.1. Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) tayini yöntemi	61
2.6.2. Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi	62
2.6.3. Tek hücre jel elektroforezi yöntemi (comet yöntemi).....	63
2.6.4. Mikroçekirdek yöntemi.....	67
3. MATERYAL VE METOT	71
3.1. Kimyasal Maddeler	71
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	73
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	75
3.3.1. TEAK yönteminde kullanılan çözeltiler.....	75
3.3.2. NKA yönteminde kullanılan çözeltiler.....	75
3.3.3. Comet yönteminde kullanılan çözeltiler.....	76
3.3.4. MÇ yönteminde kullanılan çözeltiler	78
3.4. Yöntemler.....	79
3.4.1. TEAK tayini yöntemi ile antioksidan kapasitenin belirlenmesi	79
3.4.2. NKA yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi	80
3.4.3. Comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesi....	83
3.4.4. MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerin belirlenmesi	84
3.5. İstatistiksel Yöntemler	88
4. BULGULAR	89
4.1. Fenolik Bileşiklerin TEAK Yöntemi ile Antioksidan Kapasitelerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	89

	Sayfa
4.1.1. Piknogenolün TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	89
4.1.2. Resveratrolün TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	91
4.1.3. Rosmarinik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	93
4.1.4. Vanilik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	95
4.1.5. Sinnamik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	97
4.2. Fenolik Bileşiklerin NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	99
4.2.1. Piknogenolün NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	99
4.2.2. Resveratrolün NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	101
4.2.3. Rosmarinik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	102
4.2.4. Vanilik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	104
4.2.5. Sinnamik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	105
4.3. Fenolik Bileşiklerin Comet Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	106
4.3.1. Piknogenolün comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	106
4.3.2. Resveratrolün comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	109
4.3.3. Rosmarinik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	112
4.3.4. Vanilik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	115

	Sayfa
4.3.5. Sinnamik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	118
4.4. Fenolik Bileşiklerin MÇ Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	121
4.4.1. Piknogenolün MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	121
4.4.2. Resveratrolün MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	123
4.4.3. Rosmarinik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	125
4.4.4. Vanilik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	127
4.4.5. Sinnamik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular	129
5. TARTIŞMA	133
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	155
KAYNAKLAR	157
EKLER.....	191
ÖZGEÇMİŞ	194

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. TEAK yöntemine göre troloks ve piknogenolün antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular	89
Çizelge 4.2. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular	91
Çizelge 4.3. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asit antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular	93
Çizelge 4.4. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidin antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular	95
Çizelge 4.5. TEAK yöntemine göre troloks ve sinnamik asidin antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular	97
Çizelge 4.6. NKA yöntemine göre piknogenolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi	100
Çizelge 4.7. NKA yöntemine göre resveratrolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi	101
Çizelge 4.8. NKA yöntemine göre rosmarinik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi	103
Çizelge 4.9. NKA yöntemine göre vanilik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi	104
Çizelge 4.10. NKA yöntemine göre sinnamik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi	105
Çizelge 4.11. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	107
Çizelge 4.12. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	110
Çizelge 4.13. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	113
Çizelge 4.14. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	116

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.15. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	119
Çizelge 4.16. Piknogenol ve piknogenol ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	122
Çizelge 4.17. Resveratrol ve resveratrol ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	124
Çizelge 4.18. Rosmarinik asit ve rosmarinik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları.....	126
Çizelge 4.19. Vanilik asit ve vanilik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	128
Çizelge 4.20. Sinnamik asit ve sinnamik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları.....	130

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı	5
Şekil 2.2. Flavonoidlerin genel yapısı.....	5
Şekil 2.3. Flavonoidlerin yaygın olarak bulunan çeşitli tipleri.....	6
Şekil 2.4. Pknogenol ekstresi içinde bulunan temel prosiyanidinlerin yapısı ve bunların olası oligomerik bileşikleri	17
Şekil 2.5. Resveratrolün yapısal formülü.....	33
Şekil 2.6. Rosmarinik asidin yapısal formülü	45
Şekil 2.7. Vanilik asidin yapısal formülü.....	53
Şekil 2.8. Sinnamik asidin yapısal formülü	57
Şekil 2.9. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikroçekirdek oluşumu	70
Şekil 4.1. TEAK yöntemine göre troloks ve pknogenolün antioksidan kapasiteleri.....	90
Şekil 4.2. TEAK yöntemine göre troloks ve pknogenolün ABTS radikalini oksidasyonuna etkileri	90
Şekil 4.3. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün antioksidan kapasiteleri.....	92
Şekil 4.4. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün ABTS radikalini oksidasyonuna etkileri	92
Şekil 4.5. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asidin antioksidan kapasiteleri	94
Şekil 4.6. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asidin ABTS radikalini oksidasyonuna etkileri	94
Şekil 4.7. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidin antioksidan kapasiteleri	96
Şekil 4.8. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidinABTS radikalini oksidasyonuna etkileri	96
Şekil 4.9. TEAK yöntemine göre troloks ve sinnamik asidin antioksidan kapasiteleri..	98
Şekil 4.10. TEAK yöntemine göre troloks ve sinnamik asidin ABTS radikalini oksidasyonuna etkileri	98

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. NKA yöntemine göre piknogenolün CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	100
Şekil 4.12. NKA yöntemine göre resveratrolün CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	102
Şekil 4.13. NKA yöntemine göre rosmarinik asidin CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	103
Şekil 4.14. NKA yöntemine göre vanilik asidin CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	104
Şekil 4.15. NKA yöntemine göre sinnamik asidin CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	105
Şekil 4.16. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri	108
Şekil 4.17. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	108
Şekil 4.18. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momentı üzerine etkileri	109
Şekil 4.19. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri	111
Şekil 4.20. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	111
Şekil 4.21. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momentı üzerine etkileri	112
Şekil 4.22. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.....	114
Şekil 4.23. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	114
Şekil 4.24. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momentı üzerine etkileri	115
Şekil 4.25. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.....	117
Şekil 4.26. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	117

Şekil	Sayfa
Şekil 4.27. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri	118
Şekil 4.28. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.....	120
Şekil 4.29. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri	120
Şekil 4.30. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H ₂ O ₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri	121
Şekil 4.31. Piknogenol ve piknogenol ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	123
Şekil 4.32. Resveratrol ve resveratrol ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	125
Şekil 4.33. Rosmarinik asit ve rosmarinik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	127
Şekil 4.34. Vanilik asit ve vanilik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	129
Şekil 4.35. Sinnamik asit ve sinnamik asit ile birlikte H ₂ O ₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları	131

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mikroçekirdek içeren insan lenfositlerinin mikroskop görüntüsü.....	87
Resim 3.2. Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) çekirdekli lenfositlerin mikroskop görüntüsü.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μM

Mikromolar

g

Gram

Gy

Gray, iyonize radyasyon birimi

kg

Kilogram

mg

Miligram

ml

Mililitre

mM

Milimolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

(3,4-DHPEA)

3,4-dyhydroxyphenylethanol (dihidroksifeniletanol)

5-LOX

5-lipooksijenaz

8-OHdG

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

8-oksoG

8-oksoguanin

A172

İnsan astrosit hücreleri

A549

İnsan akciğer adenokarsinoma hücresi

ABTS

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)

ALT

Alanin aminotransferaz

AP-1

Aktivatör protein-1

AST

Aspartat transaminaz

ATP

Adenozin trifosfat

BDNF

Brain derived neurotrophic factor

Beyin kökenli nörotrofik faktör

BPDE

Benzo(a)pyrene dilepoxide

CaCo-2

İnsan kolon karsinoma hücre hattı

CAT

Katalaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CCl₄	Karbon tetraklorür
CHO	Chinese hamster ovary cells
	Çin hamsteri ovaryum hücreleri
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
Cr(VI)	Hekzavalan krom
CTGF	Connective tissue growth factor
	Bağ doku büyüme faktörü
Cu⁺²	Bakır
Cyt-B	Sitokalsin B
DHT	Dihidrotestesteron
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMH	1,2-dimetilhidrazin
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNP	Dinitrofenil
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrihidrazil
DU-145	İnsan prostat karsinoma hücresi
ECV304	İnsan umbilikal damar endoteli hücre hattı
EGCG	(-)-epigallokateşin-3-gallate
EMCV	Ensefalomiyokardit virusları
EndoIII	Endonükleaz III
EtBr	Etidiyum bromür
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
Fpg	Formamidopirimidin DNA glikozilaz
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
	Plazma ferrik indirgeyici güç
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz

Kısaltmalar**Açıklamalar**

H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCT115	İnsan kolorektal karsinoma hücre hattı
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HEI-OC1	İnsan işitme hücreleri
Hep-3B	İnsan karaciğer karsinoma hücresi
HepG2	Karaciğer kanser hücresi
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
HL60	Promiyelositik lösemi hücreleri
HMB-2	İnsan melonama hücresi
HNO₃	Nitrik asit
HOCl	Hipokloröz asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPV	İnsan papilloma virüs
HSV	<i>Herpes simplex</i> virüsü
HT-144	İnsan melonoma hücre hattı
HT29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
HT4	Fare hippokampal hücreleri
HTC	Sıçan hepatoma hücre hattı
IC₅₀	% 50 inhibisyon konsantrasyonu
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
J774	Fare makrofaj benzeri hücre hattı
K₂Cr₂O₇	Potasyum dikromat
K-562	İnsan kronik miyeloid lösemi hücresi
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
L1210	Fare lösemi hücreleri
LD₅₀	Letal doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LMPA	Düşük erime noktalı agar

Kısaltmalar**Açıklamalar**

LPH	Lipit hidroperoksit
LPS	Lipopolisakkarit
LT97	İnsan kolon adenoma hücreleri
MCF-10F	İnsan göğüs epitelyal hücre hattı
MCF-7	İnsan göğüs adenokarsinoma hücresi
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MÇ	Mikroçekirdek
MDA	Malondialdehit
MDA-MB-231BO	Kemik iliği kökenli göğüs kanseri hücreleri
MMC	Mitomisin-C
Mn-SOD	Manganez süperoksit dismutaz
MPP	Mitokondriyal membran potansiyeli
mRNA	Mesajcı RNA
MTD	Maksimum tolere edilebilir doz
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-tetrazolyumbromür
N2A	Fare nöroblastoma hücreleri
N3MeA	N3-metiladenin
N3MeG	N3-metilguanin
N7MeG	N7-metilguanin
Na₂EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu
Na₂HPO₄.2H₂O	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NBI	Nükleer bölünme indeksi
NCI-H82	İnsan akciğer karsinoma hücresi
NF-κB	Nükleer faktör κB
NGM	İnsan melanosit hücre hattı
NK	Nötral kırmızı
NKA	Nötral kırmızı alım

Kısaltmalar**Açıklamalar****NMPA**

Normal melting point agarose

Normal erime noktalı agar

NO

Nitrik oksit

NOAEL

No observed adverse effect level

Herhangi bir yan etkinin gözlenmediği düzey

NOS

Nitrik oksit sentaz

O₂

Moleküler oksijen

O₂•⁻

Süperoksit radikal anyonu

O4MeT

O4-metiltimin

O6MeG

O6-metilguanin

OH

Hidroksi

OH•

Hidroksil radikali

ONOO⁻

Peroksinitrit

ORAC

Oxygen radical antioxidant capacity

Oksijen radikali antioksidan kapasite

OxHLIA

Oksidatif hemoliz inhibisyonu testi

PBS

Phosphate buffer saline

Fosfat tamponlu serum fizyolojik

PC-3

İnsan prostat adenokarsinoma hücresi

PHA-M

Fitohemaglutinin-M

PMNL

Polimorfonükleer lenfositler

RAW 264.7

Fare makrofaj hücre hattı

RNA

Ribonükleik asit

RO•

Alkoksil radikali

ROO•

Peroksil radikali

RT-PCR

Real time- polymerase chain reaction

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SDS

Sodyum dodesil sülfat

SH-SY5Y

İnsan nöroblastoma hücreleri

SOD

Süperoksit dismutaz

STZ

Streptozotosin

t_{1/2}

Yarılanma ömrü

Kısaltmalar**Açıklamalar****TBARS**

Tiobarbitürik asit reaktif türleri

t-BHP

Tert-bütil hidroperoksit

TEAK

Troloks eşdeğer antioksidan kapasite

TF

Doku faktörü

TGF- β 1

Dönüştürücü büyüme faktörü-beta1

TNF

Tümör nekroz faktör

TNF- α

Tümör nekroz faktör alfa

U-937

İnsan makrofaj hücresi

UV

Ultraviyole

UVB

Ultraviyole B

V79

Çin hamsteri fibroblast hücresi

VEGF

Damarsal endotelial büyüme faktörü

WHO

Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

Tüm canlıların hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin sürekli olarak üretildikleri ve bunların başta sinyal transdüksiyonu olmak üzere pek çok önemli fizyolojik süreçte rol oynadıkları bilinmektedir. Bununla birlikte reaktif oksijen türlerinin düzeyleri arttığında, genel olarak oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkmakta ve bu durum tüm hücresel bileşenlerin (karbonhidratlar, proteinler, yağlar, nükleik asitler) oksidasyonuna yol açarak kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve kanser gibi çeşitli patolojik durumların başlamasına ve ilerlemesine neden olmaktadır (Halliwell 2007; Kitsati ve diğerleri, 2012).

Son yıllarda oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların gelişiminin koruyucu bileşiklerin alınması ya da diyetel yollarla tüketilmesi ile engellenebileceği veya geciktirilebileceği öne sürülmektedir. Bu güne kadar koruyucu bileşiklerin etkileri ile ilgili çok çeşitli mekanizmalar önerilmiş ancak bu durum henüz tam bir açıklık kazanmamıştır. Bu bileşiklerin antioksidan veya serbest radikal süpürücü olarak etki gösterdikleri yaygın olarak kabul gören görüşlerdendir. Ancak bu görüşün yeterli sayıda deney ile desteklenmesine gerek duyulmaktadır (Kitsati ve diğerleri, 2012).

Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma bitkisel ürünlerce zengin bir diyet ile beslenmenin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğunu ve oksidatif stres ile ilişkili pek çok hastalığa karşı koruduğunu ortaya koymaktadır. Bitkisel kaynaklı ürünlerde vitaminler, fitoöstrojenler, sülfür bileşikler, karotenoidler ve organik asitler gibi çok sayıda yararlı bileşikler bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklı besinler aynı zamanda koruyucu ajanlar olarak ifade edilen çeşitli fenolik bileşikler içermektedir (Manach, Williamson, Morand, Scalbert ve Remesy, 2005). Fenolik bileşikler sebze, meyve, tohumların, çay ve şarap gibi bitkisel kökenli içeceklerin, bitkisel kaynaklı ilaçlarının ve diyet takviyelerinin içerisinde bol miktarda bulunan doğal maddelerdir. İnsanların yaşamın başlangıcından beri flavonoidleri ve diğer diyetel fenolik bileşikler tükettiği bilinmektedir. Bu güne kadar 8000'in üzerinde farklı çeşit doğal olarak oluşan fenolik bileşik tanımlanmıştır ve bu liste halen büyümeye devam etmektedir (Ferguson, Philpott ve Karunasinghe, 2004; Kyselova, 2011).

Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine etkilerinin belirlenmesindeki en önemli zorluklardan biri besinlerde farklı biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda fenolik bileşiğin bulunmasıdır (Cheynier, 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin hem antioksidan hem de

prooksidan etkileri ve bazı hücrelerde fizyolojik işlevlerde zıt etkileri tanımlanmıştır. Fenolik bileşiklerin, antioksidanlar olarak hücre canlılığını artırırken, prooksidanlar olarak apoptozu indükleyebildikleri ve tümör gelişimini engelleyebildikleri de belirtilmektedir (Lambert, Hong, Yang, Liao ve Yang, 2005).

Hücre içinde oluşan serbest radikallerin toksik etkilerinin temel moleküler hedeflerinden biri DNA olduğundan, güncel pek çok araştırmada fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına karşı etkilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir (Lodovici, Guglielmi, Meoni ve Dolara, 2001). Fenolik bileşiklerin *in vivo* ve *in vitro* çeşitli deney sistemlerinde antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkilerinin gözlemlenmesi sağlık üzerine olası etkilerini ve DNA'yı oksidan hasardan koruduğunu desteklemektedir. Bununla birlikte birçok fenolik bileşiğin özellikle yüksek konsantrasyonlarda prooksidan etkiler gösterebilecekleri ve DNA hasarına yol açabildiklerine de dikkat çekilmektedir (Duthie, Collins, Duthie ve Dobson, 1997; Panayiotidis ve Collins, 1997; Prochazkova, Bousova ve Wilhelmova, 2011; Szeto, Collins ve Benzie, 2002; Szeto ve Benzie 2002).

Fenolik yapıdaki bitkisel bileşiklerin yapı-etki ilişkilerini ve mekanizmalarını daha ayrıntılı ortaya çıkarmak, dolayısıyla insan sağlığına olası etki/yan etkilerini aydınlatmak ve yeni kullanım alanlarını belirlemek için ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Bu amaçla bu tez çalışmasında, doğal ürünlerde bulunan ve son yıllarda önemi artan fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında fenolik bileşiklerin troloks eşdeğer antioksidan kapasite tayini (TEAK) ile antioksidan özelliklerinin ve çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO) nötral kırmızı alım yöntemi (NKA) ile olası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, ayrıca sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda hem genotoksik etkilerinin hem de oksidatif hasara neden olan ve genotoksik etki potansiyeli bilinen hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı antigenotoksik etkilerinin insan lenfosit hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (Comet) ve mikroçekirdek (MÇ) yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdeleri gibi tüm kısımlarında bulunabilen sekonder metabolitlerdir. Bitkiler büyüme, lignifikasyon, pigmentasyon, tozlaşma gibi çeşitli süreçlerde ve patojenlere, predatörlere ve çevresel strese karşı direnç sağlamak için ikincil metabolitler olarak fenolik bileşikleri üretirler (Duthie, Gardner ve Kyle, 2003; Fraga, Galleano, Verstraeten ve Oteiza, 2010). Tüm bitkiler, çok farklı nitelik ve miktarlarda fenolik bileşikler bulundurmaktadır (Nizamoğlu ve Nas, 2010). Fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır, devamlı olarak yeni bulunan ve tanımlanan fenolikler de listeye eklenmektedir (Çoşkun, 2006, Nizamoğlu ve Nas, 2010).

Fenolik bileşikler insan ve hayvan diyetinde yer alan ve bitkisel gıdalarda çok yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bilinen vitamin ve minerallerin dışında belki de diyet takviyeleri arasında en çok satılan ve kullanılan ürünlerdir. Bitkisel metabolitlerin bu sınıfı 8000'den fazla bileşiği içermekte ve fenollerin kendisi gibi basit fenollerden, taninler gibi karmaşık yapılu bileşiklere kadar geniş bir dağılım göstermektedirler (Ferguson, 2001).

Yapısal olarak büyük farklılıklarından dolayı bitkilerde ve bunlardan elde edilen ürünlerde binlerce farklı fenolik bileşik bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı; sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi tat unsurlarının oluşmasında etkilidirler. Fenolik bileşiklerden flavonoidlerin geniş bir grubu olan antosiyaninler doğal renk maddeleri olup, sebze, meyve, meyve suları ve şarapların pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumludurlar. Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak da değerlendirilmektedir (Nizamoğlu ve Nas, 2010).

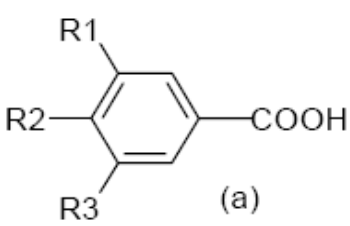
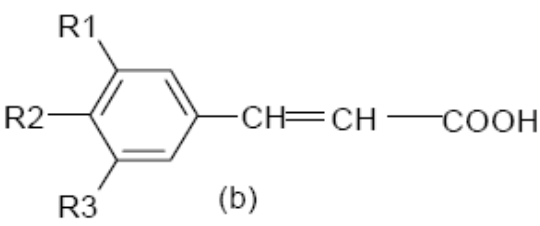
Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle “biyoflavonoid” adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Nizamoğlu ve Nas, 2010).

Tüm fenolik bileşikler, yapısal olarak bir aromatik halka, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu içerebilirler ve basit bir fenolik yapıdan, yüksek oranda polimerize olan bileşiklere kadar çok sayıda yapı çeşitliliğine sahiptirler. Yapılarından dolayı polifenoller olarak da adlandırılabilirler (Balasundram, Sunduram ve Samman, 2006). Ancak genellikle polifenoller, aromatik halka üzerinde çeşitli OH grupları bağlı olan, iki veya daha fazla fenol grubu içeren bileşiklerdir. Bununla birlikte, fenolik asitler ya da fenolik alkoller gibi tek bir fenol halkası içeren moleküller de bu grupta yer almaktadır. Polifenoller fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanlarına göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Polifenoller bitkisel kaynaklı maddelerin en çok çalışılan grubunu oluşturmaktadır. Temel polifenol grupları; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, taninler, kumarinler, kurkuminoidler, gallokateşinler, antosiyanidinler, stilbenler ve lignanlar gibi çok geniş farmakolojik özelliklere sahip birçok alt grubu içermektedir (D'Archivio ve diğerleri, 2007; Liu, 2004). Diğer yandan fenolik bileşiklerle ilgili farklı kaynaklarda çok çeşitli sınıflandırmalar mevcuttur ancak fenolik asitler ve flavonoidler en genel incelenen iki gruptur (Nizamoğlu ve Nas, 2010).

2.1.1. Fenolik asitler

Fenolik bileşiklerin temel grubu olan fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit gibi asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; sinamik asit, kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir.

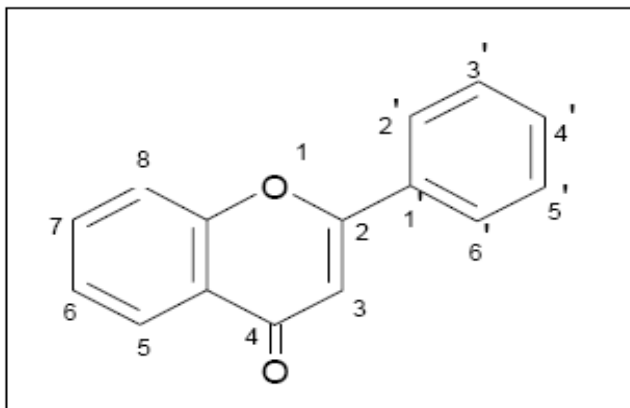
Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.1.'de görülmektedir (Balasundram ve diğerleri, 2006; Nizamoğlu ve Nas, 2010).

							
(a)				(b)			
Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri.

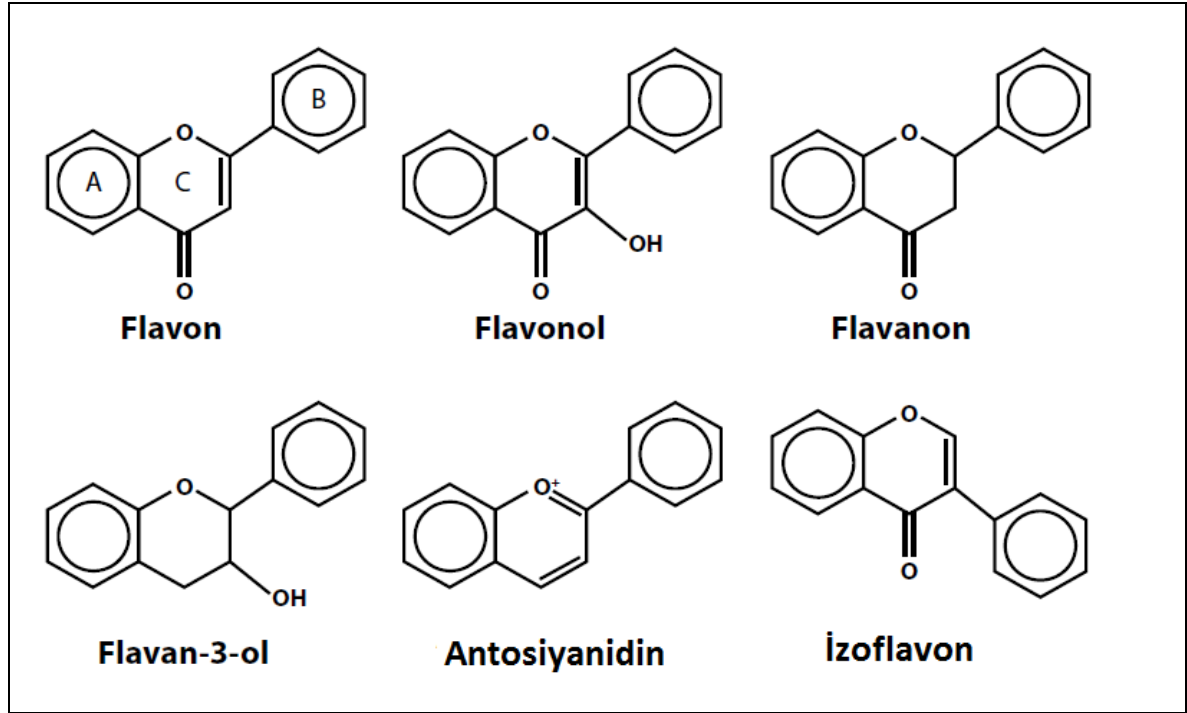
2.1.2. Flavonoidler

Fenolik bileşiklerin diğer bir temel sınıfı olan flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısında karbon iskeletine sahip bileşiklerdir. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir. Flavon türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2.2’de görülmektedir (Nizamoğlu ve Nas, 2010).



Şekil 2.2. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidlerde iki aromatik halka (A ve B) ve bununla bağlantılı genellikle oksijenlenmiş bir heterosiklik halka (C halkası) bulunmaktadır. Flavonoidler oksijenlenmiş heterosiklik yapının oksidasyon derecesine bağlı olarak flavanoller, flavanonlar, flavonlar, flavon-3-oller, izoflavonlar ve antosiyanidinler şeklinde çeşitli alt gruplara ayrılabilir (Şekil 2.3) (Scalbert ve Williamson, 2000).



Şekil 2.3. Flavonoidlerin yaygın olarak bulunan çeşitli tipleri

Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Nizamoğlu ve Nas, 2010). Birçok kaynakta yapısal olarak beş grup altında incelenirler;

- 1- Antosiyanidinler
- 2- Flavonlar ve flavonollar
- 3- Flavanonlar
- 4- Kateşinler ve lökoantosiyanidinler
- 5- Proantosiyanidinler

Bitki biyosentez yolları temel kimyasal yapıdan başlayarak, farklı OH grubu yapısı, metil grupları ve şekerler ile farklı bileşikler oluşturur. Çeşitli durumlarda flavanoid birimlerinin oligomerizasyonu ve polimerizasyonu meydana gelir. Flavonoidlerin oligomerleri ve polimerleri taninler olarak adlandırılır ve kondanse taninler ve hidrolizlenebilir taninler olarak iki sınıfa ayrılır. Kondanse taninler aynı zamanda proantosiyanidinler ve prosiyanidinler olarak da bilinirler ve flavanollerin oligomerleridir. Kimyasal yapıları sadece monomerin çeşidine göre değil, aynı zamanda monomerler arasındaki bağın özelliğine bağlı olarak tanımlanır. Çeşitli oligomerizasyon şekilleri bulunmaktadır ve bazı bitkiler özgün bir oligomerizasyon davranışı gösterirler. Örneğin kakaoda monomerik birimler 4→8 yönünde, çoğunlukla B tipi dimerler oluşturan karbon-karbon bağları yaparlar. Hidrolizlenebilir taninler ise, asitler tarafından bileşenlerine kolayca hidroliz edilen polimerlerdir. Bu polimerler bir poliol tarafından oluşturulan merkezi çekirdek ve bu çekirdek molekül ile kısmen veya tamamen esterleşen bir fenolik karboksilik asit yapısındadırlar. Bu taninler, gallik asit ise gallotaninler veya ellajik asit ise ellajitaninler gibi fenolik karboksilik aside göre sınıflandırılabilir (Scalbert ve Williamson, 2000).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Önemi

Bitkilerdeki yaygın dağılımlarına rağmen, diyetel polifenollerin sağlık üzerine olası etkileri beslenme uzmanlarının dikkatini henüz son zamanlarda çekmeye başlamıştır. 1990'ların ortalarına kadar en yaygın çalışılan antioksidanlar; antioksidan vitaminler, karotenoidler ve minerallerdir. Flavonoidler ve diğer polifenoller ve bunların antioksidan özellikleri ve hastalıklardaki koruyucu, engelleyici etkileri üzerine araştırmalar 1995'ten sonra başlamıştır. Bu tarihten önce yayınlanan kitaplarda, antioksidanlar içinde flavonoidlerden çok fazla söz edilmemiştir. Fenolik bileşiklerle ilgili araştırmalardaki gecikmenin temel nedeni ise oldukça fazla çeşitlerinin bulunması ve kimyasal yapılarının çok karmaşık olmasıdır (D'Archivio ve diğerleri, 2007; Scalbert, Johnson ve Saltmarsh, 2005; Scalbert, Manach, Morand, Remesy ve Jimenez, 2005).

Fenolik bileşikler, hem yenilebilir hem yenilemeyen bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ve antioksidan aktiviteyi de içeren birçok biyolojik etkilere sahiptirler. Meyvelerin, sebzelerin, bitkilerin ve tahılların ham ekstraktları ve diğer bitki materyalleri fenolik maddelerce zengindir ve yağların oksidatif parçalanmasını geciktirerek besinlerin kalitesini ve besinsel değerini korudukları için gıda endüstrisinde de giderek önem kazanmaktadırlar.

Bitkisel ürünlerin antioksidan içeriğinin sağlık üzerindeki etkileri, kalp hastalığı ve kanser gibi hastalıklara karşı koruyuculukları bilim insanları, gıda üreticileri ve tüketiciler arasında giderek önem kazanmakta ve çalışmaları özel sağlık etkileri oluşturan fonksiyonel gıdalara doğru yöneltmektedir (Kähkönen ve diğerleri, 1999).

Polifenoller diyetle alınan en yaygın antioksidanlardır. Antioksidan aktiviteleri temel olarak indirgeyici ajanlara, hidrojen vericilerine ve singlet oksijen süpürücülerine etki etmelerini sağlayan redoks özelliklerine bağlıdır. Ayrıca metalleri bağlama potansiyelleri bulunmaktadır (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley, ve Pridham, 1995). Diyetel yollarla toplam alım miktarları günde 1g kadar yüksek olabilmektedir ki, bu miktar diyetel antioksidanlar olarak bilinen diğer fitokimyasal sınıflarından çok daha fazladır. Bu miktar örnek olarak C vitaminin alımından 10 kat, E vitamini ve karotenoidlerin alımından ise 100 kat daha fazladır (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, ve Jimenez, 2004; Scalbert ve Williamson, 2000). Temel diyetel kaynakları meyveler, meyve suları, çay, kahve ve kırmızı şarap gibi bitkilerden elde edilen içeceklerdir. Sebzeler, tahıllar, çikolata ve kuru bakliyatlar da toplam polifenol alımına katkıda bulunmaktadır (Scalbert ve diğerleri, 2005).

Birçok epidemiyolojik çalışma, meyve ve sebzelerce zengin diyetle beslenen bireylerin kanser, kardiyovasküler hastalıklar, felç ve yaşa bağlı patolojilere karşı daha düşük riske sahip olduklarını ortaya koymaktadır. Meyve ve sebze tüketiminin artırılması birçok kronik hastalığın sıklığının azaltılmasında kolay, pratik ve önemli bir koruyucu yol olarak gözükmektedir (Lodovici ve diğerleri, 2001; Russo, 2007). Bu koruyucu etkiler, vitaminler, karotenoidler ve fenolik asitler gibi çeşitli bileşikler tarafından oluşturulmaktadır. Birçok çalışma polifenolik bileşiklerin bir grubu olan flavonoidlerin potansiyel antioksidan ve serbest radikal tutucu biyolojik aktiviteleri üzerine odaklanmıştır. Bununla birlikte bazı polifenolik bileşiklerin fizyolojik pH'da otooksidanlar veya toksik oksijen radikallerini üreten prooksidanlar olarak etki gösterdiği de iddia edilmektedir. Sugihara, Arakawa, Ohnishi ve Furuno (1999), lipid peroksidasyonu tekniğini kullanarak, flavonoidlerin yüksek demir iyonu konsantrasyonlarında prooksidan aktivite gösterirken, düşük dozlarda antioksidan etkiye sahip olduklarını göstermiştir.

Fenolik bileşiklerin birçoğunun en önemli özelliklerinin antioksidan etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanlarda diyetin önemli bir bileşeni olan bu bileşikler doğal kaynaklı

antioksidanlar olarak tanımlanmakta, ayrıca antiinflamatuvar, antiviral ve antitümör gibi pek çok etki gösterdikleri ve böylece çok çeşitli dejeneratif hastalıklara karşı terapötik ve koruyucu etkilere sahip oldukları bildirilmektedir (Manach ve diğerleri, 2005; Russo, 2007).

Fenolik bileşiklerin koruyucu etkilerini açıklamak için çok çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir. DNA'nın hasardan korunması ve DNA onarım mekanizmalarının düzenlenmesi, mutasyonların ve devamında karsinojenik süreçlerin engellenmesinde önemli bir rol üstlendikleri ve oksidatif stresin istenmeyen yan etkilerini yok ettikleri ileri sürülmektedir (Ramos, Lima ve Pereira-Wilson, 2011).

2.3. DNA Hasarı ve Genomik Kararlılık

2.3.1. Oksidatif DNA hasarı

Endojen ve ekzojen maddeler oksidan duruma karşı hücrel redoks dengesini engelleyerek hasar oluşturmaktadır. Bu dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres sonucu protein, yağ, karbonhidrat ve nükleik asitler gibi farklı moleküllerde lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, membran bozulması ve DNA hasarını içeren çok çeşitli metabolik bozukluklar meydana gelmektedir (Aherne, Kerry ve O'Brien, 2007). Oksidatif stres, çok çeşitli patolojilerin gelişiminde rol oynayabilir ve bir kez mutasyonlara neden olduğunda onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri inaktive eden etkiler oluşturabilir (Allen ve Tresini, 2000; Maynard, Schurman, Harboe, de Souza-Pinto ve Bohr, 2009). Tümör hücrelerinde oksidatif stres, DNA hasarının indüklenmesiyle birlikte daha fazla mutasyonun oluşmasına, büyüme faktörlerinin transkripsiyonunun aktivasyonuna, apoptoz ve proliferasyonda yer alan genlerin düzenlenmesine neden olarak bu hücrelerin lehinde seçici bir rol oynayabilir (Allen ve Tresini, 2000; Karihtala ve Soini, 2007).

Oksidatif stresin önemli bir sonucu olarak meydana gelen DNA hasarı genomik kararsızlığa neden olur. Memeli hücre genomunda her gün 10^4 civarında lezyonun indüklendiği tahmin edilmektedir (Hegde, Hazra ve Mitra, 2008). Oksidatif DNA hasarının okside bazlar, abazik bölgeler (apurinik ve apirimidinik olarak adlandırılan bölgeler) ve DNA zincir kırıkları gibi birçok tipi vardır. Guanin bazının C-8 pozisyonunda

hidroksilasyonu sonucu oluşan 8-oksoguanin (8-okso-7,8-dihidroksiguanin; 8-oksoG) DNA oksidasyonunun en yaygın formlarından biridir ve replikasyonda yanlış baz eşleşmesine neden olarak Guanin-Timin transversiyonuna yol açar. Birçok çalışma insan tümör hücrelerinin normal hücrelere göre artmış 8-oksoG düzeyine sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda tümör hücrelerinde antioksidan düzeylerinin çok düşük olduğu bulunmuştur (Maynard ve diğerleri, 2009).

2.3.2. Alkilleyici DNA hasarı

Oksidatif lezyonların hücresel onarım süreçleri tarafından ortadan kaldırılması genomik kararlılığın sağlanmasında ve mutasyonların azaltılmasında gereklidir. Ancak artan 8-oksoG düzeylerinin artan kanser oranlarını tam olarak yansıtamadığının gösterilmesi, oksidatif stresin tümör gelişiminde tek başına bir neden olarak sayılmaması gerektiğini göstermektedir. Her ne kadar oksidatif hasar en çok çalışılan DNA hasarı olsa da, alkilleyici DNA hasarı da oldukça önemlidir. İnsanların alkilleyici ajanlara maruziyetinde diyet (örneğin gıdalardaki heterosiklik aminlerin varlığı) ve çevre (sigara dumanı ve yanan yakıtların dumanı) etkili olabilir veya alkilleyici DNA hasarı endojen olarak (amidlerin ve aminlerin enterik bakterilerce nitrozasyonu) oluşabilir (Wirtz ve diğerleri, 2010). Alkilleyici ajanlar, N7-metilguanin (N7MeG), N3-metiladenin (N3MeA) ve N3-metilguanin (N3MeG) gibi N alkillenmiş veya O6-metilguanin (O6MeG) ve O4-metilimin (O4MeT) gibi O-alkillenmiş çeşitli DNA katım ürünlerinin oluşmasına neden olur. Genel olarak, O-alkilasyonları daha fazla mutajenik ve genotoksik iken; N-alkilasyonları daha az mutajenik fakat sitotoksiktir (Drablos ve diğerleri, 2004; Kondo, Takahashi ve Ohnishi, 2010). O6MeG metilleyici ajanlar tarafından indüklenen temel pre-mutajenik, pre-karsinojenik ve pre-sitotoksik DNA lezyonudur (Wirtz ve diğerleri, 2010).

2.4. DNA Hasarının Fenolik Bileşikler Tarafından Engellenmesi

Kanseri engelleyebilecek hücresel mekanizmalardan biri, DNA hasarının engellenmesidir. Diyet, DNA hasarının engellenmesinde antioksidan/oksidan dengesini düzenleyerek önemli bir rol oynar. Birçok çalışmada gözlenen koruyucu etki, özellikle fenolik bileşiklerin antioksidan olarak serbest radikal süpürücü veya metal iyonlarını bağlayıcı etki göstermesine bağlı olarak görülmektedir (Anderson, Amarasinghe, Fisher, Mak ve Packer, 2000; Ross and Kasum, 2002). Bu bileşikler ayrıca glutatyon (GSH) gibi antioksidanların

düzeyini arttırarak ve/veya katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak dolaylı bir antioksidan etki gösterebilirler (Alia, Ramos, Mateos, Bravo ve Goya, 2005; Frei ve Higdon, 2003; Lima, Andrade, Seabra, Fernandes-Ferreira ve Pereira-Wilson, 2005; Lima, Fernandes-Ferreira ve Pereira-Wilson, 2006). Fenolik bileşikler aynı zamanda ksenobiyotik metabolizmasında yer alan faz I (aktive edici) ve faz II (detoksifiye edici) enzimleri düzenlerler (Chen ve Kong, 2004; Ferguson ve diğerleri, 2004; Moon, Yang ve Park, 2006; Ross ve Kasum, 2002).

Çok sayıda çalışma, fenolik bileşiklerin antioksidan ve DNA koruyucu özelliklerini göstermektedir. Kuersetin elma, soğan, şarap ve çay gibi çok çeşitli gıdalarda bulunan bir flavonoiddir. Birçok çalışma kuersetinin HepG2 hücrelerinde (Lima ve diğerleri, 2006; Ramos, Lima, Pereira, Fernandes-Ferreira ve Pereira-Wilson, 2008), Caco-2 (Aherne ve O'Brien, 1999) ve HMB-2 hücrelerinde (Horvathova, Chalupa, Sebova, Tothova ve Vachalkova, 2005), insan makrofajlarında (U-937 hücreleri) (Kanupriya ve diğerleri, 2006; Moon, Yang ve Park, 2006), insan lenfositlerinde (Wilms, Claughton, de Kok, ve Kleinjans, 2007) ve L1210 fare lösemi hücrelerinde (Horvathova, Novotny ve Vachalkova, 2003) DNA hasarına karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Wilms, Claughton, de Kok ve Kleinjans (2005), insan lenfositlerinde H₂O₂ ve benzo(a)piren diolepoksit (BDPE) tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarı ve DNA katım ürünlerinin oluşumuna karşı kuersetinin koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *in vivo* deneylerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, dört hafta boyunca kuersetince zengin yaban mersini ve elma suyu karışımı tüketiminin oksidatif DNA hasarı düzeyini ve BDPE-DNA katım düzeyini sırasıyla % 41 ve % 11 oranında azalttığını göstermektedir.

Luteolin (Cai, Rahn ve Zhang, 1997; Horvathova ve diğerleri, 2005; Lima, Fernandes-Ferreira ve Pereira-Wilson, 2006; Min ve Ebeler, 2008; Ramos, Pereira-Wilson ve Collins, 2010), rutin (Moon, Yang ve Park, 2006; Ramos, ve diğerleri, 2008), genistein (Cai, Rahn ve Zhang, 1997), kateşin ve epikateşin (Kanupriya ve diğerleri, 2006) gibi flavonidlerin de çeşitli hücre modellerinde oksidatif DNA hasarına karşı antigenotoksik etkiler gösterdikleri bildirilmiştir.

Ex vivo bir çalışmada, 3 sağlıklı gönüllüden alınan lenfositler, çeşitli diyetel antioksidanlarla ön inkübasyona bırakılmış, kuersetin ve fenolik asitlerden kafeik asit H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarına karşı koruma sağlarken, kateşin, epikateşin, kateşin gallat ve epikateşin gallat ile muamele edildiklerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (Szeto ve Benzie, 2002). Ramos ve arkadaşları kuersetin ve rutin haricinde bir triterpenoid olan ursolik asidin de HepG2 hücrelerinde tert-bütül hidroperoksit tarafından indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Ramos ve diğerleri, 2008). Ursolik asit ve/veya luteolinin lösemi hücreleri, HEI-OC1 işitme hücreleri ve PC12 hücreleri gibi çeşitli hücre hatlarında H_2O_2 , benzo(a)piren ve 3-azido-3-dideoksitimidin tarafından indüklenen hasara karşı DNA'yı korudukları bildirilmiştir (Horvathova ve diğerleri, 2003; Horvathova, Novotny, Tothova ve Vachalkova., 2004; Ovesna, Kozics ve Slamenova, 2006; Yu ve diğerleri, 2009; Noroozi, Angerson ve Lean, 1998; Silva, Gomes ve Coutinho, 2008). Kafeik asidin (3,4-dihidroksi sinamik asit), fotoprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (Devipriya, Sudheer ve Menon, 2008; Benkovic ve diğerleri, 2009). Kafeik asitle ön muameleden sonra UVB (280-320) radyasyona maruz bırakılan insan lenfositlerinde tiobarbitürik asit reaktif bileşikler (TBARS) ve lipit hidroperoksit (LPH) gibi lipit peroksidasyonu gösterge düzeylerinin düşük olduğu gözlenmiş ve ayrıca radyasyon tarafından indüklenen DNA hasarında azalma olduğu belirlenmiştir (Prasad, Jeyanthimala ve Ramachandran, 2009).

Turuncgillerde bulunan bir flavonoid olan naringin, V79 hücrelerinde antigenotoksik etkiler göstermiştir (Jagetia, Jagetia ve Jha, 2007). Birçok şarap, çay, kırmızı meyve, elma, ıspanak ve tahıl gibi çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunan 4-kumarik asidin comet yöntemi ile değerlendirme sonucunda sıçan kolon mukozasında oksidatif DNA hasarını azalttığı görülmüştür (Guglielmi, Luceri, Giovannelli, Dolar ve Lodovici, 2003).

Birçok bitki, meyve ve sebze yaygın olarak bulunan apigeninin wistar albino ratlarda N-nitrozodietilamin ve fenobarbital tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir (Jeyabal, Syed, Venkataraman, Sambandham ve Sakthisekaran, 2005). Rusak ve diğerleri (2010), apigenin, luteolin ve kamferol gibi flavonoidlerin insan periferik lenfositlerinde H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini göstermişlerdir.

Domates güçlü antioksidan etkiye sahip bir karotenoid olan likopenin temel kaynaklarından biridir. Kültür ortamında sıçan hepatositlerinin likopen (1,86; 9,31 ve 18,62 μM) ile ön muamelesinin TBARS ve gamma radyasyon sonucu indüklenen DNA hasarı düzeylerinde önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Hepatositlerin karotenoid ile ön muamelesinden sonra SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin, aynı zamanda GSH ve A, E, C vitaminlerinin düzeylerinin önemli oranda arttığı bildirilmiştir (Srinivasan ve diğerleri, 2007). Fizyolojik konsantrasyonlarda likopen ve beta karoten (0,3-10 μM), 3-morfolinosidnonimin tarafından indüklenen DNA hasarına karşı kobay akciğer fibroblast hücrelerinde de koruyucu etki göstermiştir (Muzandu ve diğerleri, 2006). 8 hafta boyunca likopen takviyesi yapılan sağlıklı gönüllülerde likopen tüketiminin, başlangıçtaki düzeylerle kıyaslandığında lenfositlerde oksidatif DNA hasarını ve idrarda 8-OHdG düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (Devaraj ve diğerleri, 2008). Ayrıca, Zhao ve diğerleri (2006) likopen ve diğer karotenoidlerin insanlarda DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada 37 sağlıklı, sigara içmeyen, postmenopozal dönemdeki bir kadın, 56 gün boyunca karotenoidlerden oluşan bir karışımdan günlük toplam 12 mg (likopen, lutein ve beta karoten; her birinden 4 mg), her karotenoidden (likopen, lutein veya beta-karoten) tek bir 12 mg doz veya plasebo almıştır. Sürecin sonunda lenfositler izole edilmiş ve DNA hasarı comet tekniği ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar karotenoid alan tüm grupların normal ölçümlere göre önemli derecede düşük endojen DNA hasarına sahip olduklarını göstermiştir. Plasebo grubunda ise herhangi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise luteinin farelerde sisplatin tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı comet tekniği ile değerlendirilmiş ayrıca negatif kontrolle kıyaslandığında GSH düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Serpeloni, Grotto, Mercadante, de Lourdes Pires Bianchi, Antunes, 2010). Lorenzo ve diğerleri (2009), düşük konsantrasyonlardaki β -kriptoksantin, Caco-2 ve HeLa hücrelerini H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruduğunu göstermiştir. β -karoten tüketiminin lenfositlerde H_2O_2 tarafından indüklenen zincir kırıklarının sayısını azalttığı da bildirilmiştir (Panayiotidis ve Collins, 1997).

Diyetsel takviye olarak kullanılan astaksantin, siklofosamid muamelesinden 5 gün önce 12,5; 25; 50 mg/kg/gün dozlarında verilmesinin farelerde karaciğer dokusunda antioksidan savunmayı (GSH ve SOD) iyileştirdiği, fare periferik kan lenfositlerinde ve kemik iliği hücrelerinde standart ve enzim (Formamidopirimidin DNA glikozilaz: Fpg; Endonükleaz III: EndoIII) kullanımı ile modifiye comet teknikleri kullanılarak değerlendirilen DNA

hasarında azalma oluşturduğu bildirilmiştir. Astaksantinin aynı zamanda fare kemik iliği hücrelerinde ve periferik kan hücrelerinde kromozom kırıkları ve MÇ oluşumu frekansını azalttığı, erkek farelerde üreme hücrelerinde siklofosfamide karşı antigenotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Tripathi ve Jena, 2008).

Birçok çalışma polifenollerce zengin bitki ekstrelerinin, oksidatif maddeler tarafından indüklenen zincir kırıklarını ve 8-OHdG oluşumunu engellediğini ortaya koymaktadır (Ramos, Azqueta, Pereira-Wilson ve Collins, 2010). *Salvia officinalis* L. (adaçayı), *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ve *Origanum vulgare* L. (kekik) gibi bazı bitkiler kolon hücrelerinde DNA hasarına karşı koruyucu etkiler göstermektedir (Aherne, Kerry ve O'Brien 2007). Örneğin yeşil çay birçok polifenolik antioksidan içermektedir ve bunların sağlık üzerine etkileri birçok çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Sıçanlara 5 gün boyunca günde 6,5 mg/kg vücut ağırlığı yeşil çay ekstresi verildiğinde lenfosit, kolonosit ve hepatositlerde DNA oksidasyonu azalmıştır (Kager ve diğerleri, 2010). Yeşil çayın genom koruyucu etkisi yalnızca *in vitro* ve *in vivo* deneylerde değil aynı zamanda insanlarda yapılan bazı deneysel çalışmalarla da görülmüştür. Günde 2x150 ml % 1 yeşil çay alan sağlıklı gönüllülerden izole edilen insan lenfositlerinde başlangıçtaki oksidatif DNA hasarında azalma olduğu standart ve Fpg enzimi kullanılarak yapılan comet tekniği ile gösterilmiştir (Han, Wong ve Benzie, 2011).

Yeşil çayın yararlı etkilerinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni, (-)-epigallocateşin-3-gallat'dır (EGCG). Düşük konsantrasyonlarda (2-100 µM) EGCG ile muamele edilen insan periferik lökositlerinde, bleomisin tarafından indüklenen kırıklarda ve EndoIII duyarlı bölgelerde azalma olduğu bildirilmiştir (Glei ve Pool-Zobel, 2006).

Elma insanlar tarafından en çok tüketilen meyvelerdendir ve dolayısıyla insan diyetindeki polifenollerin en önemli kaynaklarından biridir. Kimyasal koruyucu etkileri hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Koch ve diğerleri, 2009; Veeriah ve diğerleri, 2008). Elma suyunun antioksidan ve antiproliferatif etkilerinin olduğu, aynı zamanda insan kolon hücrelerinde glutatyon S-transferaz T2 (GSTT2) gen ekspresyonunu artırma özelliği olduğu bulunmuştur (Petermann ve diğerleri, 2009). Elma ekstresi ayrıca LT97 (Miene, Klenow, Veeriah, Richling ve Glei, 2009), HT29, HCT115 and CaCo-2 hücreleri (McCann ve diğerleri, 2007; Schaefer ve diğerleri, 2006) gibi insan kolon hücrelerinde oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Üzüm suyunun da benzer şekilde

antigenotoksik aktivitesi bulunmaktadır (Dani ve diğeri, 2009). Zeytinyağının antikarsinojenik etkilerinde de içeriğindeki fenolik bileşiklerin etkili olduğu öne sürülmektedir. Fabiani ve diğeri (2008), doğal zeytinyağından elde edilen karmaşık bir fenol karışımının ya da bazı izole bileşiklerinin (örneğin hidroksitirozol, [3,4-dihidroksifenil-etanol (3,4-DHPEA)]), insan periferik kan mononükleer hücrelerinde ve promiyelositik lösemi hücrelerinde (HL60) H_2O_2 'ye karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, incelenen konsantrasyonlarda zeytinyağının normal günlük tüketimi ile kolaylıkla ulaşılan değerler olması nedeniyle dikkat çekmektedir.

İnsanlardaki bazı çalışmalar sonucunda hem izole bileşiklerin hem de meyve ve sebze tüketiminin periferik lenfositlerde koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir. Pool-Zobel, Bub, Muller, Wollowski ve Rechkemmer (1997), havuç suyu takviyesinin pirimidinlerin oksidasyonunda azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Porrini ve Riso, (2000) likopence zengin olan domates takviyesinin lenfositlerde H_2O_2 tarafından indüklenen DNA hasarına karşı korumayı artırdığını bildirmişlerdir. 14 gün boyunca meyve ve sebze yönünden zengin bir diyetin de lenfositlerde oksidatif hasara karşı DNA koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Thompson ve diğeri, 1999).

Sigara içenlerde ve içmeyenlerde brokolinin oksidatif DNA hasarını azalttığı bildirilmiştir (Riso, Martini, Visioli, Martinetti ve Porrini, 2009). Bir başka çalışmada, 4 veya 8 hafta yaban mersini diyetiyle beslenen Sprague-Dawley sıçanlarda yaban mersini diyetinin 8 hafta sonunda lenfositlerde antioksidan kapasiteyi değiştirmedeği ancak oksidatif hasara karşı DNA korumasını artırdığı gözlenmiştir (Del Bo ve diğeri, 2010). Dulebohn ve diğeri (2008) ise aynı hayvan modelini kullandıkları çalışmada 3 hafta boyunca yaban mersini tüketiminin karaciğerde GST aktivitesini artırdığını ve oksidatif DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, *in vitro* çalışmaların aksine yaban mersini tüketiminin kısa süreli takviye çalışmalarında faz II enzim aktivitelerini önemli derecede arttıramadığı bildirilmiştir.

Yukarıda kısaca belirtildiği gibi birçok bitki ve izole bileşikler çeşitli deneysel modellerde DNA'da koruyucu etkiler göstermektedir, ancak bu diyetel ajanların bazı koşullar altında DNA hasarını indükleyebildiklerinin de akılda tutulması önemlidir. Diyetel ajanların DNA koruyucu (genoprotektif) ve DNA hasarı oluşturunca (genotoksik) etkileri arasındaki

denge, konsantrasyonlarına, inkübasyon süresine ve hücre tipine bağlı olduğu belirtilmektedir (Rusak ve diğerleri, 2010).

2.5. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler

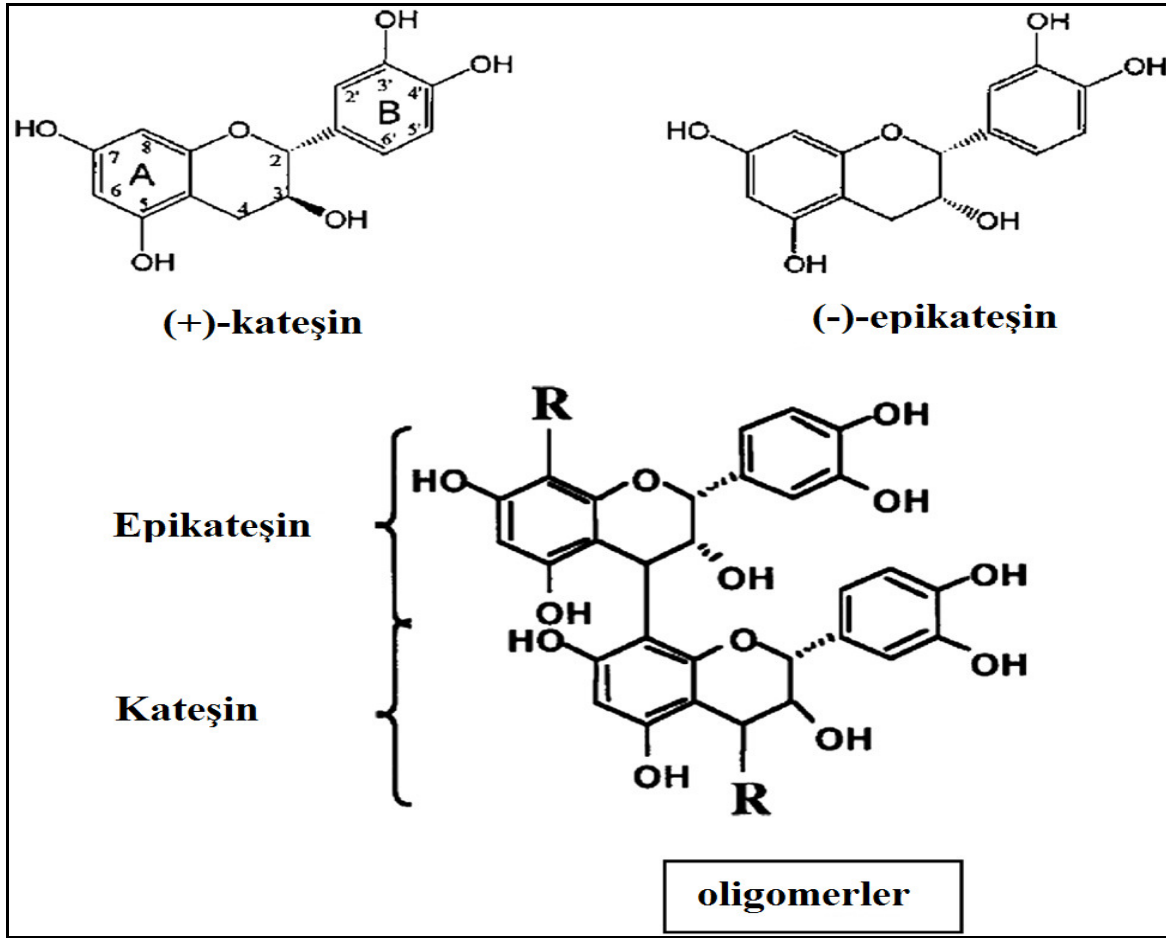
Bu tez çalışmasında önemli biyolojik özellikleri olduğu varsayılan ve son yıllarda önemleri artan bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asit araştırılmıştır.

2.5.1. Piknogenol

Piknogenol son yıllarda biyolojik aktiviteleri nedeniyle oldukça ilgi çeken ve Fransa'nın güneybatı sahillerinde yetişen Fransız sahil çamı *Pinus pinaster*'den (yaygın olarak bilinen adıyla *Pinus maritima*) elde edilen, standardize edilmiş bir bitki ekstresidir. % 65-75 oranında çeşitli zincir uzunluklarında kateşin ve epikateşin alt ünitelerini taşıyan prosiyanidinleri içeren kompleks bir karışımdır (Şekil 2.4). Yapısındaki diğer bileşenler ise polifenolik monomerler, fenolik veya sinamik asitler ve bunların glikozitleridir (D'Andrea, 2010; Rohdewald, 2002).

Coclebut, yoğunlaştırılmış tanenler, Evelle® (C ve E vitamini, karetenoidler, selenyum, çinko, aminoasitler, glikozaminoglikanlar, yaban mersini ekstresi, Piknogenol®), Fransız sahil çam kabuğu ekstresi (French maritime pine bark extract), Fransız sahil çamı kabuğu (French *Pinus maritima* bark), lökosiyanidinler, *P. pinaster*, *P. maritima*, oligomerik proantosiyanın kompleksi (oligomeric proanthocyanidin complexes: OPCs), Prelox® (L-arjinin aspartat ve piknogenol karışımı), Zinopin® (Piknogenol® ve standardize zencefil kökü ekstresi) gibi ürünlerde piknogenol bulunmaktadır.

Piknogenol ilk olarak flavan-3-ol türevlerini içeren flavanoidler sınıfını ifade eden genel bir tanım olarak ortaya atılmıştır. Antik Yunancada yoğunlaştırılmış anlamındaki “puknos” ve sınıf ya da aile anlamındaki “genos” kelimelerinden türetildiği söylenmektedir. Bu terim bilimsel isim olarak kullanılmıştır ancak şu anda *Pinus maritima*'dan ekstrakte edilen prosiyanidinlerden oluşan özel bir karışımı ifade etmektedir ve “Pycnogenol®” geleneksel adıyla patenti alınmıştır (D'Andrea, 2010; Masquelier, Michaud, Laparra ve Dumon, 1979; Packer, Rimbach ve Virgili, 1999).



Şekil 2.4. Piknogenol ekstresi içinde bulunan temel prosiyanidinlerin yapısı ve bunların olası oligomerik bileşikleri

Ağaçların çeşitli kısımlarının, fenolik bileşikler açısından önemli kaynaklar olabildiği bilinmektedir. Bazı fenolik bileşikler kozalaklıların iğnelerinden, huş ağacı, ladin ve çam ağaçlarının kabuklarından; beyaz ve gümüş huş ağacının yapraklarından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Piknogenol, en fazla çalışılan fenolik ağaç ekstresidir (Kahkönen ve diğerleri, 1999).

Çam kabuğu ekstresi, *Pinus maritima* kabuklarının ilk olarak su ile ekstraksiyonu ve devamında çözünmeyen bazı bileşenlerinin elimine edilmesi için etil asetat yıkaması ile hazırlanmaktadır (Packer ve diğerleri, 1999).

Piknogenol günümüzde, tüm dünyada besin takviyesi olarak kabul görmekte ve kronik inflamasyondan, dolaşım bozukluklarına, birçok fizyolojik hastalığın tedavisinde kullanılan bir bitkisel ürün olarak değerlendirilmektedir. Uzun yıllardır Avrupa ve Kuzey

Amerika’da geleneksel tıpta, özellikle inflamatuvar hastalıklarda ve yara iyileşmesinde kullanılmaktadır (Packer ve diğerleri, 1999).

Birçok çalışmada piknogenol bileşenlerinin biyoyararlanımlarının yüksek olduğu belirtilmiştir. Piknogenol bütün bir karışım olarak, içeriğindeki saflaştırılmış bileşenlerin tek başına gösterdikleri biyolojik aktiviteden çok daha fazla etkiye sahiptir. Bileşenlerinin sinerjistik etki gösterdikleri iddia edilmektedir (D’Andrea, 2010; Rohdewald, 2002).

Farmakokinetik özellikleri

Çam kabuğu ekstresi kurutulduğunda kahverengimsi bir toz halindedir, kuru ve karanlık bir ortamda kararlı olarak uzun süre kalabilir. Proantosiyanidinlerce zengin bir ekstre, suda yüksek oranda çözünür. Oral olarak alımının ardından kolaylıkla absorbe edilir ve vücut dokularındaki dağılımı hızlıdır. Grimm ve diğerleri (2006a, 2006b) tarafından yapılan araştırmalarda 24 saat boyunca flavonoid içermeyen bir diyetle beslenen 11 gönüllüye tek doz olarak 300 mg çam kabuğu ekstresi verilmiştir. 14 saat sonra bu gönüllülerin kan örnekleri alınmış ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak analiz edilmiştir. Plazma analizleri, maksimum konsantrasyonlarda kateşin (107 ng/ml), kafeik asit (17 ng/ml), ferulik asit (15 ng/ml), taksifolin (33 ng/ml) ve delta-(3,4-dihidroksi-fenil)-gamma-valerolakton adı verilen bir metabolitin (4 ng/ml) bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca 10 adet bilinmeyen bileşik tanımlanarak plazma düzeyleri belirlenmiştir. Deney daha sonra 5 gönüllüye yeniden 200 mg çam kabuğu ekstresi verilerek tekrarlanmış ve 4 saat sonunda plazma örnekleri alınmıştır. Kararlı haldeki plazma örneklerinin analizleri, karaciğerdeki faz II metabolizmasının göstergesi olan sülfat ve/veya glukuronik asit konjugatları şeklindeki bileşiklerin varlığını ortaya koymuştur.

İstenmeyen etkileri

Piknogenol ile ilgili, 40 yıldan fazla bir süredir yayınlanmış çok sayıda araştırma ve derleme makalesinde, ürünün güvenli ve etkin olduğu bildirilmiştir (Kim ve diğerleri, 2012). Rohdewald (2002), piknogenolün oldukça düşük akut ve kronik toksisiteye sahip olduğunu vurgulamıştır. Ayrıca 2010 yılında yayınlanan bilimsel ve klinik bir monografıta da genel olarak güvenli olduğu bildirilmiştir. Bu gözlem, sağlıklı bireyleri ve özel bir hastalığı olan hasta gruplarını içeren 70 klinik çalışmada gözlenmiş olan verilere

dayanmaktadır. Yan etkilerin sıklığı hastalarda ve sağlıklı bireylerde sırasıyla % 2,4 ve % 0,19 olarak bildirilmiştir. Bildirilen yan etkiler gastrointestinal rahatsızlıklar, baş ağrısı, baş dönmesi ve bulantı olabilmektedir. Yüksek dozlarda bile belirgin bir yan etki gözlenmemiştir. Piknogenolün günlük olarak 20-100 mg, aylar süren kronik kullanımlarında ve 100-300 mg akut kullanımlarında toksik olmadığı kabul edilmektedir (Maimoona, Naeem, Saddiqe ve Jameel, 2011).

Kim ve diğerleri (2012), sıçanlarda siklofosfamid tarafından indüklenen gelişimsel toksisite üzerine piknogenolün etkilerini araştırmışlardır. Siklofosfamid uygulaması fetal ve plasental ağırlıklarda azalmaya, fetal malformasyonlarda artışa neden olmuştur. Ayrıca hepatik dokularda malondialdehit (MDA) konsantrasyonunda artış, GSH oranında ve CAT aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Diğer yandan ratlarda gebelik sürecinde piknogenol uygulaması, siklofosfamid tarafından indüklenen embriyo-fetal gelişimsel toksisitede iyileşmeye neden olmuştur. Siklofosfamid ile birlikte piknogenolün uygulanması ile, hepatik dokularda MDA ve GSH konsantrasyonları ve CAT aktivitesi etkilenmeden kalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları tekrarlanan piknogenol uygulamasının sıçanlarda siklofosfamid tarafından indüklenen embriyo-fetal gelişimsel toksisiteye karşı yararlı etkiler gösterdiğini ve piknogenolün bu koruyucu etkisinin hem lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi hem de antioksidan aktiviteyi arttırması sayesinde gerçekleştiğini göstermiştir. Ancak piknogenol ile ilgili araştırmaların sayısı artıyor olsa da destekleyen klinik araştırmalara ve insanlardaki antioksidan ve biyolojik özelliklerini açıklayan ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyolojik etkileri

Piknogenolün biyolojik etkileri çok çeşitli *in vitro* ve *in vivo* hayvan ve insan deneylerinde araştırılmış ve birçok araştırma makalesinde ve derlemede çeşitli hastalıklar üzerindeki terapötik etkileri bildirilmiştir (D'Andrea 2010; Rohdewald, 2002; Packer ve diğerleri, 1999). Antioksidan aktivitesi özellikle *in vitro* olarak hücre kültürü teknikleri ile gösterilmiştir (Packer ve diğerleri, 1999). *In vivo* çalışmalar genellikle farmakolojik etkileri ile ilişkilidir. Bu etkileri özellikle antiinflamatuvar ve kardiovasküler sistem üzerindeki etkilerini içermektedir. Kanseri, hipertansiyon, hepatotoksisite, immün hastalıklar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Packer ve diğerleri, 1999; Rohdewald, 2002; Yang ve diğerleri, 2008).

Kardiyovasküler sistem bozuklukları olan bireylerde piknogenol desteği, trombosit agregasyonunu azaltmaktadır (Wang ve diğerleri, 1999). Deneysel olarak inflamatuvar bağırsak hastalıkları olan hayvanlarda sahil çamı kabuklarından elde edilen ekstraktların antiinflamatuvar etkisi görülmüştür (Mochizuki ve Hasegawa, 2004). Astım hastalarında piknogenol desteği sonrasında idrar ve serum lökotrien konsantrasyonlarında azalma olduğu gözlenmiş, menstural ağrısı olan kadınlarda analjezik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Kohama ve diğerleri, 2004).

Ayrıca, D'Andrea (2010), piknogenolün terapötik uygulamaları ile ilgili derlemesinde, kronik venöz yetmezliği, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, kramp ve kas ağrıları, diyabet, diyabetik mikroanjyopati, erektil disfonksiyon, diş eti kanamaları ve plakları, yüksek kan basıncı, yüksek kolesterol, erkek infertilitesi, menopozal belirtiler, migren, osteoartrit, uzun süreli uçak yolculuklarında kan pıhtılaşması ve ödem, retinopati, sistemik lupus, venöz bacak ülserleri gibi çok farklı durumlarda piknogenolün etkili olduğunu bildirmiştir.

Serbest radikal süpürücü özellikleri ve antioksidan aktivitesi

Bileşenlerinin temel kimyasal yapısına dayanarak piknogenolün en önemli özelliği çok güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olması (Bors ve Michel, 2002; Rohdewald, 2002) ve çok etkili serbest radikal süpürücü özelliğinin bulunmasıdır (Guo, Zhao ve Packer, 1999).

Piknogenolün aktivitesinin moleküler temeli çok çeşitli olmakla birlikte, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpürücü özelliği temel etkisi olarak görülmektedir (D'Andrea, 2010). İçeriğindeki fenolik asitler, polifenoller ve özellikle flavanoidler, bir veya daha fazla OH grubu taşıyan, bir veya daha fazla aromatik halkadan oluşmuştur ve bu nedenle fenoksil radikallerini oluşturarak potansiyel birer serbest radikal tutucu olarak görev yaparlar (Rice-Evans, Miller ve Pananga, 1996).

Oligofenolik bileşiklerin, monomerik flavonlar ve flavonollerle karşılaştırıldığında daha yüksek antioksidan kapasite gösterdikleri bildirilmektedir. Kateşinlerin ve prosiyanidinlerin kateşol ve pirogallol yapılarının fazla olması radikal süpürücü özelliklerini artırmaktadır. Ayrıca flavon ve flavonoller, futil redoks döngüsünde reaktif oksijen türlerinin oluşumu nedeniyle o-kinonlar potansiyel prooksidanlar olduğundan mükemmel

radikal süpürücülerdir. Bunun tersine başlangıçta semikinon radikallerinden oluşan prosiyanidinler ve gallat *o*-kinonlar çeşitli yollarla origomerik bileşikleri üretebilmektedir. Piknogenol oluşumundaki bu fenolik eşleşme reaksiyonları ve nükleofilik eklenmeler, ayrıca piknogenolün yapısındaki OH gruplarının sayısı ve bununla orantılı olarak yüksek radikal tutucu özelliği, güçlü antioksidan özelliğini sağlamaktadır (D'Andrea, 2010).

Jerez, Tourino, Sineiro, Torres ve Nunez (2007), çam kabuğu ekstrelerinden *Pinus pinaster* Aiton ve *Pinus radiata* D. Don var. *radiata*'yı radikal süpürücü özellikleri açısından kıyaslamışlar ve piknogenolün elde edildiği *Pinus pinaster*'in daha güçlü radikal süpürücü özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Piknogenolün antioksidan kapasitesi, çok sayıda çalışmada *in vitro* ve *in vivo* şartlarda ve hücre kültürü modellerinde, çeşitli metotlarla belirlenmiştir (Packer ve diğerleri, 1999). Özellikle hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu ve bu sayede oksidatif stresle bağlantılı birçok hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Kahkönen ve diğerleri, 1999). Piknogenol hücresel antioksidan sistemin bir elemanı olarak gösterilmektedir ve bu sayede genlerin hücresel redoks durumu tarafından düzenlenen ifadesini etkilemektedir (Emerit, 1994; Nelson, Lau, Ide ve Rong, 1998; Packer, 1991). Yapılan pek çok çalışmadan ortaya çıkan, tam bir karışım halindeki piknogenolün aynı miktardaki tek bir saf bileşeninden daha fazla biyolojik etki göstermesidir. Bu durum piknogenolün antioksidan kapasitesi ve enzim inhibisyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar ile de destelenmektedir (D'Andrea, 2010). Piknogenol ekstresi NF-kB bağımlı gen ekspresyonunun inhibisyonuna ve çeşitli enzimlerin aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır (Packer ve diğerleri, 1999). Ayrıca birçok biyolojik etkisinin proteinlere özel olarak bağlanabilme yeteneğine bağlı olduğu bildirilmiştir (D'Andrea, 2010).

Piknogenolün ve benzeri çam kabuğu ekstrelerinin antioksidan özellikleri sayesinde tüm biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri bulunmaktadır (Maimoona, Naeem, Saddiqe ve Jameel, 2011). Voss, Horakova, Jakstadt, Kiekebusch ve Grune (2006), çam kabuğu ekstresinin proteinleri oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Ansari, Keller ve Scheff (2008) ise piknogenolün insan nöroblastoma SH-SY5Y hücre kültürlerinde akrolein tarafından indüklenen sitotoksositeye ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir.

Piknogenolün antioksidan aktivitesi sayesinde gıdaların saklanması da kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Ahn, Grum ve Fernando (2006), 3 gün süreyle dolapta saklanan pişmiş etler üzerinde 3 farklı antioksidanın etkilerini araştırmışlardır. ActiVin (üzüm çekirdeği ekstresi), piknogenol ve biberiyenin aktivitesi değerlendirilmiştir. Herhangi bir antioksidan uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında, oksidatif durumu stabilize edici aktivitenin sırasıyla üzüm çekirdeği ekstresi, piknogenol ve biberiye şeklinde olduğu bildirilmiştir.

Busserolles ve diğerleri (2006), prosiyanidince zengin ekstrelerin *in vivo* olarak sıçanlarda oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sıçanlara üzüm ekstresi ve çam ekstresi ilave edilmiş diyetler, 8 haftalık süre boyunca, yemek sonrası, tek doz olarak uygulanmıştır. Sonuçta 8 hafta süreyle üzüm ekstresi ve çam ekstresi uygulanan gruplarda kontrole kıyasla plazma total antioksidan kapasitesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ancak, kalp dokusunun peroksidasyona karşı duyarlılığı ve plazma TBARS konsantrasyonlarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Frontela-Saseta ve diğerleri (2011) de, piknogenol ile zenginleştirilmiş meyve sularının kolon karsinoma hücrelerinde (Caco-2) antioksidan aktivitelerini ve antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Çam kabuğu ekstresi ile zenginleştirilmiş olan taze ve sindirilmiş ananas suyu ve kırmızı meyve sularında total fenolik konsantrasyon incelendiğinde, piknogenol ile zenginleştirilmiş olanlarda sindirimin ardından fenolik bileşik içeriğinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. ABTS ve oksijen radikali absorbans kapasitesi metodları ile belirlenen antioksidan kapasitenin sindirilmiş piknogenolce zengin örneklerde, sindirim öncesi aynı örneklerle göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, piknogenolce zenginleştirilmiş meyve sularının, 24 ve 72 saat arasındaki inkübasyonlarda daha fazla antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir. Meyve sularının piknogenol ile zenginleştirilmesinin, *in vitro* gastrointestinal koşullarda yüksek kararlı yapıdaki fenolik bileşiklere kaynak sağladığı düşünülmektedir.

Piknogenolün hücresel sistemleri, özellikle endotelial kültür hücreleri ve makrofajları, koruma kapasitesi de araştırılmıştır. Sığır endotelial hücrelerinde 20-80 µg/ml piknogenolün ön muamelesinin, hücreleri tertbütildihidroperoksit (t-BHP) tarafından indüklenen hücre hasarı ve lipid peroksidasyona karşı önemli oranda koruduğu bildirilmiştir. Piknogenol 60 µg/ml konsantrasyonda t-BHP muamelesinin ardından laktat

dehidrojenaz (LDH) salınımını tamamen inhibe etmiştir ve bu durum oksidatif stres tarafından indüklenen sitotoksiteyi önemli derecede koruduğunu göstermektedir. Ayrıca, piknogenolün antioksidan aktivitesine bağlı olarak TBARS oluşumunun önemli derecede azaldığı da bildirilmiştir (Rong, Li ve Lau, 1995). Aynı hücresel sistemde piknogenol hem singlet oksijen hem de H_2O_2 üretimini doza bağlı olarak azaltmış ve süperoksit üreten sistem olarak ksantin/ksantin oksidaz muamelesinin ardından H_2O_2 birikim oranını azaltmıştır (Wei, Peng ve Lau, 1997).

Gandin ve diğerleri (2009), insan akciğer karsinoma hücrelerinde piknogenol muamelesinin hücresel redoks sistemleri üzerinde önemli etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Piknogenol uygulanan hücrelerde, oksidatif strese karşı endojen savunma enzimleri olan tioredoksin redüktaz ve GPx aktiviteleri % 50 azalmıştır. Bu iki enzim H_2O_2 ve selenyum muamelesinin ardından önemli derecede artmaktadır, bununla birlikte piknogenol varlığında selenyum aracılı reaktif oksijen türleri etkin bir şekilde azalmaktadır. Dahası selenyum muamelesinin ardından piknogenol ilavesi tioredoksin aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu bazal düzeye düşürmektedir. Bunun tersine GPx aktivitesi etkilenmemektedir. Tioredoksin ve GPx regülasyonu arasındaki bu tutarsızlık tioredoksin transkripsiyonunun öncelikle oksidatif stres tarafından indüklenebileceğini gösterebilir ki, bu durum tioredoksinin tümörler ve inflamatuvar koşulları da içeren çeşitli patolojik koşullarda indüklendiği göz önüne alındığında piknogenol gibi toksik olmayan bir antioksidanın düzenleyici görevine dikkat çekmektedir.

Daunorubisin tarafından indüklenen kardiyotoksositeye karşı kuersetin, naringenin, piknogenol ve sentetik antioksidan troloksun koruyucu etkisi araştırılan bir çalışmada, doksorubisin ile 24 saat muamelenin ardından test edilen konsantrasyonlarda, kuersetin ve naringenin kardiyomiyosit canlılığını arttırarak benzer hücre koruyucu etkiler gösterdiği saptanmıştır. Piknogenol çalışılan üç flavonoid arasında en düşük etkiye sahip olsa da, troloks ile kıyaslandığında araştırılan tüm flavonidler daha yüksek koruyucu etki göstermiştir (Mojzisoğlu, Sarıssky, Mirossay ve Martinka ve Mojzis, 2009).

Yang ve diğerleri (2008), piknogenolün karbon tetra klorür (CCl_4) tarafından indüklenen oksidatif stres ve hepatotoksositeye karşı etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, her biri 6 sıçandan oluşan 4 grup oluşturulmuştur; sadece distile su ve mısır yağı verilen çözücü kontrol grubu, 14 gün boyunca intraperitoneal olarak distile su ve sonrasında tek doz CCl_4

(1,25 mg/kg) alan CCl₄ grubu, 14 gün boyunca intraperitoneal olarak sırasıyla 10 mg/kg ve 20 mg/kg piknogenol ve devamında tek doz CCl₄ (1,25 mg/kg) alan CCl₄ ve piknogenol 10 ve piknogenol 20 grubu. Hepatotoksisiteyi belirlemek için, CCl₄ muamelesinden 24 saat sonra serum aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin amino transferaz (ALT) aktiviteleri ve hepatik MDA ve GSH konsantrasyonları ve CAT, SOD, GST aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre, tek doz CCl₄ uygulamasının serum AST ve ALT aktivitesini önemli derecede artırdığı bildirilmiştir. Bu grupta hepatosellüler dejenerasyon/ nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğunluk, sünozoidal dilatasyon şeklinde gösterilen histopatolojik değişimler ve dolayısıyla yoğun bir karaciğer hasarı olduğu gözlenmiştir. İlâveten hepatik dokuda MDA konsantrasyonunda artış ve GSH, CAT, SOD ve GST’de düşüş bildirilmiştir. Bununla birlikte CCl₄ tarafından indüklenen artan AST ve ALT konsantrasyonları ve histopatolojik hepatik lezyonlar ve karaciğer toksisitesi, CCl₄ muamelesinden önce uygulanan piknogenol ile doza bağlı olarak önemli derecede engellenmiştir. Ayrıca piknogenolün ön muamelesi, CCl₄ uygulamasının ardından hepatik dokularda MDA ve GSH düzeylerinin, CAT, SOD ve GSH aktivitelerinin değişmeden kalmasını sağlamış ve sonuç olarak CCl₄ tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı etkin bir koruyuculuk göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, piknogenol muhtemelen lipid peroksidasyonunu engelleyerek ve antioksidan kapasiteyi yükselterek koruyucu etki göstermektedir.

Hekzavalan krom [Cr(VI)] toksisitesinin, aşırı serbest radikal üretimi ile ilişkili oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Parveen, Khan ve Siddiqui (2009), sıçanlarda piknogenolün [Cr(VI)] tarafından indüklenen toksisiteye karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. K₂Cr₂O₇ ile muamele edilen sıçanların böbrek homojenatlarında, artan TBARS, MDA ve protein karbonilin piknogenol muamelesi ile önemli derecede azaldığı ve GSH düzeyi ve CAT aktivitesinin azaltılarak oksidatif dengenin sağlandığı belirlenmiştir. Buna göre piknogenolün K₂Cr₂O₇ tarafından indüklenen oksidatif nefrotoksisiteye karşı etkili bir koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür.

Kanser tedavisinde abdominal bölgeye uygulanan radyoterapinin intestinal mukozada şiddetli hasara neden olduğu bilinmektedir. Radyasyonunun zararlı etkileri reaktif oksijen türlerinin oluşumu tarafından indüklenen zararlı etkilere bağlanmaktadır. Piknogenolün güçlü antioksidan özelliği sayesinde hasara karşı iyileştirici etkisi olabileceği ileri sürülmüştür (de Moraes Ramos ve diğerleri, 2006). Işınla muamele edilen sıçanlara 15 Gy

radasyon verilmeden önce oral olarak piknogenol verildiğinde, mukozal tabakaların daha iyi durumda olduğu gözlenmiştir. Bu durum piknogenolün radyasyona karşı güvenli bir koruyucu olabileceğini ortaya koymaktadır.

İskemi reperfüzyon hasarına karşı etkileri

Şehirli ve Şener (2009), piknogenolün iskemi reperfüzyon tarafından indüklenen oksidatif renal hasara karşı koruyucu etkilerini *in vivo* olarak araştırmışlardır. İskemi reperfüzyon uygulaması sıçanlarda doku GSH düzeyi ve Na⁺, K⁺-ATPaz aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olurken, renal MDA düzeyinde ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artışa neden olmuştur. Benzer şekilde iskemi reperfüzyon gruplarında serum kreatinin ve kan üre azot ve interlökin-1 β , interlökin-6 ve TNF- α düzeyleri kontrole kıyasla önemli derecede artmıştır. Piknogenol uygulanan gruplar ise iskemi reperfüzyon tarafından indüklenen tüm bu biyokimyasal parametrelerde ve de histopatolojik değişimlerde düzelme göstermişlerdir.

Antiinflamatuvar etkileri

Piknogenolün proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu inhibe edici etkileri ve mekanizması Cho, Yun, Packer ve Chung (2001) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada interlökin-1 β için RAW 264.7 hücreleri ve interlökin-2 için Jurkat E6.1 hücreleri seçilmiştir. Piknogenol RAW 264.7 hücrelerinde H₂O₂ tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine karşı güçlü bir serbest radikal süpürücü etki göstermiştir. ELISA, immunoblot analizleri ve karşılaştırmalı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PCR) sonuçları lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 hücreleri piknogenol ile önceden muamele edildiğinde, interlökin-1 β ve mRNA düzeylerinin doza bağlı olarak azaldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca interlökin-1 β ekspresyonunda yer alan nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi temel faktörlerin de piknogenol tarafından bloke edildiği bildirilmiştir. Piknogenolün insan T hücre hattı Jurkat E6.1 hücrelerinde, forbol 12-miristat 13-asetat ve iyonomisin (PMA/Io) tarafından indüklenen interlökin-2 gen ekspresyonunu inhibe edici etkisi ise farklı bulunmuştur. Piknogenolün, posttranskripsiyonel düzenleme ile PMA/Io tarafından indüklenen interlökin-2 mRNA üzerine bozucu bir etkisi vardır. Bu çalışmanın sonuçları biyoflavonoidlerin birçok

inflamatuvar, otoimmün ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde terapötik ajanlar olarak çok geniş bir spektrumda kullanılabileceklerini ortaya koymaktadır.

Kemirgen makrofaj hücre hattında (J774 hücreleri) piknogenol doza bağlı olarak zimosan tarafından indüklenen oksidatif hasarı ve lipoprotein oksidasyonunu azaltmıştır (Nelson, Lau, Ide ve Rong, 1998). Bu bulgu, piknogenolün kronik inflamatuvar ve kardiyovasküler hastalıklardaki olası terapötik rolünü de desteklemektedir ve piknogenolün doğrudan makrofaj aktivitesinin ve inflamasyonun düzenlenmesindeki etkilerini belirten diğer yayınlarla uyumludur (Blazso, Gabor ve Rohdewald, 1997; Virgili, Kobuchi ve Packer, 1998).

Piknogenolün insan polimorfonükleer lökositlerinde araşidonik asit metabolizması üzerindeki antiinflamatuvar etkisi Canali, Comitato, Schonlau ve Virgili (2009) tarafından gözlenmiştir. 35-50 yaş aralığındaki sağlıklı gönüllülere 5 gün boyunca günlük 150 mg piknogenol verilmiştir. Piknogenol muamelesinin COX-1 gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilişkili olarak 5-lipooksijenaz (5-LOX) ve COX-2 gen ekspresyonu ve fosfolipitlerin aktivitesini bloke ettiği bildirilmiştir. 5-LOX ve 5-LOX aktive edici protein arasındaki karşılıklı bağımlılık piknogenol tarafından engellenmiştir. Buna göre, insan polimorfonükleer lökositlerinde piknogenolün antiinflamatuvar cevabı, lökotrien biyosentezini azaltan COX-2 ve 5-LOX gen ekspresyonundan kaynaklanmaktadır.

Schafer ve diğerleri de (2006), gönüllülerde piknogenol takviyesinin serum örneklerindeki COX-1 ve COX-2 aktivitesini baskılayıcı etkilerini araştırmışlardır. 5 gün boyunca oral olarak 200 mg piknogenol verilen 5 sağlıklı gönüllüden kan örnekleri alınmıştır. COX-1 ve COX-2 aktivitesinin orta derecede inhibe edildiği saptanmıştır. Daha sonra 10 gönüllüye 300 mg piknogenol tek doz olarak verilmiş ve sindirimin ardından 30 dakika sonra kan örnekleri toplanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde hem COX-1 hem de COX-2 inhibisyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu inhibisyon, insanlarda piknogenolün antiinflamatuvar aktivitesini desteklemektedir.

Choi ve Yan (2009) tarafından, bağışıklık sistemi aracılı alerjik reaksiyonları baskılayarak, piknogenolün potansiyel bir antialerjik ilaç olarak etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. immünglobülin E (IgE) aracılı immün cevapta uyarılan histamin ve diğer sitokinlerin salınması piknogenol tarafından inhibe edilmiştir. Bu çalışmada hem *in vivo*

hem de *in vitro* modeller kullanılmıştır. Sıçanlarda, ekstrenin oral olarak verilmesi, anti dinitrofenil (DNP) IgE aracılı pasif deri anafilaksisini önemli derecede engellemiştir. Anti DNP IgE ile tetiklenen sıçan peritoneal mast hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmada ise, sıçan mast hücrelerinde doza bağlı olarak histamin salınımında azalma, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve interlökin-6 salgılanması ve protein ekspresyonunun inhibe edilmesi, mast hücrelerinde kalsiyum alımının azalması ve NF- κ B aktivasyonunun baskılanması gözlenmiştir.

Piknogenolün antiinflamatuvar aktivitesi sıçan modelinde karajenan tarafından indüklenen inflamasyonda etkileri gözlenerek değerlendirilmiştir (İnce Yeşil-Çeliktaş, Karabay-Yavaşoğlu ve Elgin, 2009). Antiinflamatuvar aktivite için parametre olarak fare patilerindeki ödem incelenmiştir. Karajenan enjeksiyonu öncesinde ve değişik aralıklarla sonrasında ödem hacmi ölçülmüştür. Buna göre intraperitoneal olarak uygulanan piknogenolün doza bağlı olarak enjeksiyondan 2, 3, 4, 5 ve 6 saat sonra ödeme bağlı şişmeyi engellediği bildirilmiştir. Piknogenol sırasıyla 75 ve 100 mg/kg dozlarda ve uygulamadan 2 ve 4 saat sonra en etkili antiinflamatuvar etkiyi göstermiştir.

Antimikrobiyal etkileri

Helicobacter pylori suşlarının antibiyotiklere karşı direnci göz önüne alınarak, bu enfeksiyona karşı alternatif bir tedavi olarak piknogenolün etkisi Rohdewald ve Beil (2008) tarafından incelenmiştir. Gastrik hücreler, piknogenol ve *Helicobacter pylori* *in vitro* şartlarda inkübe edilmiştir. 12,5 μ g/ml piknogenol, *Helicobacter pylori*'nin büyümesini inhibe etmiştir. 125 μ g/ml piknogenol ile kontrol değerinde % 10 azalma gözlenmiş ve 3 saatlik inkübasyonun ardından aynı konsantrasyonda gastrik hücrelere bağlanma % 70'e düşmüştür. Buna göre piknogenol anlamlı ancak yine de sınırlı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Klinik uygulamalar için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Pişmiş kırmızı etlerde *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı *Pinus pinea* kabuğu ekstresinin ve piknogenolün antimikrobiyal etkileri kıyaslamalı olarak incelenmiştir. Çiğ etlere *S. aureus* ve % 1 konsantrasyonda çam kabuğu ekstreleri uygulanmıştır. Daha sonra etler 9 gün boyunca 4°C'de bekletilmiştir. 6 ve 9 gün sonunda yapılan ölçümlerde bakteri sayısının azaldığı ve kabuk ekstrelerinin antimikrobiyal etkisi olduğu bildirilmiştir ve bu

ekstrelerin gıda endüstrisinde doğal koruyucular olarak kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür (Hameş-Kocabaş ve diğerleri, 2008).

Antiviral etkileri

NF- κ B bağımlı gen ekspresyonunun inhibisyonu piknogenolün antiinflamatuvar etkisini göstermektedir. Matsumori, Higuchi ve Shimada, (2007), piknogenolün viral miyokardit üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada piknogenolün viral replikasyonu azaltarak ve pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayarak viral miyokardit üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiği gözlenmiştir. Piknogenolün artan dozlarıyla birlikte 7. günde ölçülen miyokardiyal infiltrasyon ve nekroz, kontrole göre önemli derecede azalmıştır. 100 mg/kg piknogenol muamelesi tümör nekroz faktörü, tip-1 prokollajen, kök hücre faktörü ve mast hücresi triptazının gen ekspresyonunu önemli oranda baskılamıştır. Piknogenolün proinflamatuvar sitokinlerin ve mast hücresi ilişkili düzenleyicilerin ekspresyonunu inhibe ederek ve böylece inflamasyonu ve miyokardiyal nekrozu artırarak, viral replikasyon üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu bildirilmiş ve piknogenolün viral miyokarditte önemli bir ajan olabileceği ileri sürülmüştür.

İnsan HIV-1 virus replikasyonunun da piknogenol tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Piknogenol intraselüler antioksidan protein, mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) ekspresyonunda artış ve ribozomal S6 proteinin fosforilasyonunda inhibisyon gibi önemli değişikliklere neden olmaktadır. Mn-SOD'un ektopik ekspresyonu, HIV-1 replikasyonunu inhibe ettiği ve bu nedenle piknogenolün yeni anti-HIV-1 ajanı olarak kullanılabileceği iddia edilmektedir (Feng ve diğerleri, 2008).

Antidiyabetik etkileri

DeneySEL ve klinik birçok araştırma, piknogenolün antidiyabetik etkilerini ortaya koymaktadır. Maritim, Dene, Sanders ve Watkins III (2003), güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı piknogenolün streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. 14 gün boyunca her gün intraperitoneal (i.p) olarak 10 mg/kg (vücut ağırlığı) piknogenol verilen diyabetik sıçanlarda, piknogenolün kan glukoz konsantrasyonlarını önemli oranda azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca oksidatif stresin biyokimyasal göstergeleri karaciğer,

böbrek ve kalpte değerlendirilmiş, diyabetik sıçanlarda artan hepatik CAT aktivitesinin piknogenol ile normal düzeylerine döndüğü, ayrıca piknogenol muamelesinin diyabetik sıçanlarda indirgenmiş GSH düzeylerini artırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar STZ ile diyabet indüklenen sıçanlarda piknogenolün hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarını iyileştirdiğini iddia etmektedir.

Parveen, Khan, Mujeeb ve Siddiqui (2010) de, tip 2 diyabetik sıçanlarda karaciğerdeki hiperglisemik hasara karşı piknogenolün koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sıçanlarda intraperitoneal STZ enjeksiyonunun ardından 2 hafta süreyle yüksek yağlı bir diyet uygulanarak diyabet oluşumu indüklenmiştir. Diyabet oluşumunun ardından sıçanlara 4 hafta süreyle i.p 10 mg/kg piknogenol uygulanmıştır. 4 haftalık sürenin sonunda karaciğerde biyokimyasal ve histopatolojik inceleme yapılmıştır. Yüksek yağlı diyet ve STZ ile diyabet indüklenen sıçanlarda glikozillenmiş hemoglobin düzeyleri önemli derecede artmış, bununla birlikte hepatik glikojen düzeyi azalmıştır. Piknogenolün diyabetli sıçanların karaciğerlerindeki TBARS, MDA, protein karbonil, GSH ve antioksidan enzimler GST, CAT, SOD, GPx ve glutatyon redüktaz (GR) üzerinde düzenleyici etki gösterdiği saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar histopatolojik bulgular ile de desteklenmekte ve piknogenolün diyabet tedavisinde etkin olabileceği ileri sürülmektedir.

Kim, Kim ve Yokozawa (2011), piknogenolün yüksek glikoz ile muamele sonucu renal tübül hücrelerinde oluşan oksidatif stres ve inflamasyonu baskılayarak, apoptozu düzenlediğini bildirmişlerdir. Piknogenolün, renal hücrelerde yüksek glikoz muamelesi ile indüklenen morfolojik değişimleri ve hücre canlılığındaki azalmaları istatistiksel olarak önemli derecede baskıladığı iddia edilmiştir. Piknogenol anti-apoptotik etkisi ile apoptotik hücre ölümünü engellemiş, lipid peroksidasyonu, toplam reaktif oksijen türlerini, süperoksidi ($\cdot\text{O}_2$), nitrik oksidi (NO), peroksinitriti (ONOO^-), proinflamatuvar olarak indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ve NF- κ B translokasyonunu baskılayarak anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkiler göstermiştir.

Androjen sentezi üzerine etkileri

Piknogenolün nikotin, koenzim Q 10 ve fitoöstrojenler ile interaktif antioksidan etkileri hücre kültürü ortamında araştırılmıştır. İnsan periosteal fibroblastları ve osteoblastları, koenzim Q 10 (20 $\mu\text{g/ml}$), çam kabuğu ekstresi (150 $\mu\text{g/ml}$) ve fitoöstrojenler (10 ve 40

$\mu\text{g/ml}$) varlığında ve yokluğunda, tek başına ve nikotin ($250 \mu\text{g/ml}$) ile birlikte ^{14}C -testosteron ile inkübe edilmiştir. Testosteron metabolitleri inkübasyon sonunda, ince tabaka kromatografisi ile ayrılmış ve radyoizotop tarayıcı kullanılarak tanımlanmıştır. Buna göre piknogenolün tek başına ve nikotin ile birlikte her iki hücre tipinde fizyolojik olarak androjen dihirotestesteron (DHT) sentezini uyarabildiği bildirilmiştir. (Figuro, Soory, Cerero ve Bascones, 2006)

Kansere karşı etkileri

Piknogenolün koruyucu etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, over hücrelerine ve polimorfonükleer nötrofillere talk ve talk muamelesinin ardından piknogenol uygulanmıştır. Bu çalışmada hücre canlılığının ölçülmesi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve neoplastik transformasyonun belirlenmesi için yumuşak agar yöntemi kullanılmıştır. Neoplastik transformasyonun indüklenmesi, artan hücre proliferasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile over hücrelerinde talkın etkisi zamana bağlı iken, nötrofillerde doza bağlı olduğu; piknogenol uygulandığında talk tarafından indüklenen aktivitelerin engellendiği ve piknogenolün kansere karşı koruyucu etkili olabileceği bildirilmiştir (Buzzard ve Lau, 2007).

Belcaro ve diğerleri (2008), piknogenolün onkolojide kullanılan kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin neden olduğu yan etkileri hafifletebileceğini bildirmişlerdir. İki grup kanser hastasından bir grup 150 mg piknogenol alırken diğer grup plasebo grubu olarak kalmıştır. Piknogenol verilen ve radyoterapi alan 25 hasta, 21 plasebo grubu ile kıyaslandığında, araştırılan tüm yan etkilerin sıklığının daha düşük olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde piknogenol verilen 34 kemoterapi alan hasta, 30 kişilik kontrol grubu ile kıyaslandığında daha iyi hissettikleri gözlenmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen tüm hastalar, başlangıç aşamasında kemoterapi alan hastalardır. Piknogenol uygulaması bu hastalarda, kemoterapi toleransını artırıcı etki sağlamış ve hastanede geçirilen süreyi azaltmıştır.

Hücre ölümü ve hücre canlılığı üzerine etkileri

Piknogenolün çeşitli tiplerdeki proapoptotik uyarılardan sonra hücre ölümü ve canlılığını etkileyebildiği belirtilmektedir. Yüksek miktardaki glutamat, kemiricilerde glutamat reseptörlerine sahip olmayan nöronal hippokampal HT4 hücrelerinde sistein taşınımını

engelleyerek oksidatif stresi tetiklemektedir. Bu durum GSH azalmasına, lipid peroksidasyona ve sonuçta sıçan adrenal feokromasitoma (PC12) hücrelerinde hücre ölümüne neden olmaktadır. HT4 hücreleri piknogenol ile muamele edildiğinde, hücresel GSH düzeyinde herhangi bir etki olmadan hücre canlılığında önemli bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Glutamat tarafından indüklenen bu sitotoksikite modelinde piknogenolün koruyucu etkisinin, gerçekte azalan glutatyonun yerine geçerek serbest radikal süpürücü etkisiyle veya kalsiyum ve sinyal transdüksiyonunu düzenleyerek meydana geldiği öne sürülmüştür (Kobayashi, Han ve Packer, 2000). Lenfoma lenfositlerinde (U937 hücre hattı) yapılan diğer çalışmalarda ise piknogenol ile ön muamelenin, seramid C2 muamelesinin ardından apoptoza uğrayan hücre oranında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Nardini, Scaccini, Packer ve Virgili, 2000).

Genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Krizková, Chovanová, Duracková ve Krajcovic, (2008) piknogenolün *in vitro* antimutajenik aktivitesini araştırmışlardır. Bu araştırmada piknogenolün akridin oranj ve ofloksasinin farklı mekanizmalarla fotosentetik bir flagellat olan *Euglena gracilis*'de neden oldukları mutajeniteyi engelleyip engellemediği incelenmiştir. Piknogenolün 100 µg/ml konsantrasyonda her iki maddenin neden olduğu mutajeniteyi önemli oranda azalttığı, bildirilmiştir. Luminol bağımlı fotokimyasal yöntem kullanılarak piknogenolün etkili bir antioksidan olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca spektrofotometrik olarak, piknogenolün akridin oranja bağlandığı tespit edilmiştir. Rohdewald (2002) de, piknogenol ile ilgili derlemesinde Ames testinde mutajenik etkisi olmadığını bildirmiştir.

Piknogenolün DNA hasarına neden olmadığı ve oksidatif hasara karşı DNA'yı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Rohdewald, 2002). Fare kemik iliği hücrelerinde MÇ testi sonuçlarına göre 1500 mg/kg piknogenol, kromozomal anormalliklere neden olmamaktadır. Aynı şekilde insan lenfositlerinde 600 µg/mL konsantrasyona kadar kromozomal anormalliklere neden olmadığı bildirilmiştir (Rohdewald, 2005). Bu sonuçlar, piknogenolün DNA hasarına neden olmadığını göstermektedir. Ayrıca Nelson, Lau, Ide ve Rong, (1998) piknogenolün 7,5 µg/mL konsantrasyona kadar plazmit DNA'sını kırıklara karşı koruduğunu bildirmiştir.

Jeong, Seo ve Jeong (2009), piknogenola benzer bir materyal olan ve çam iğnelerinden elde edilen ekstrelerin, antioksidan aktiviteleri yoluyla, OH radikali tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarı ve apoptoza karşı etkilerini araştırmışlardır. Ekstrelerin OH radikali ve hücre içi reaktif oksijen türlerine karşı güçlü bir süpürücü etkisi olduğunu ve demir iyonunu şelatladığını bildirmişlerdir. Çam ekstrelerinin hücreleri p21 ve BAX protein ekspresyonunu azaltarak ve Bcl-2 proteinini artırarak oksidatif hasardan koruduğu, çam iğnelerinden elde edilen ekstrelerin kansere karşı koruyucu etkili ajanların ortak özellikleri gibi antioksidan ve DNA koruyucu etkiler gösterdiklerini ileri sürmektedir.

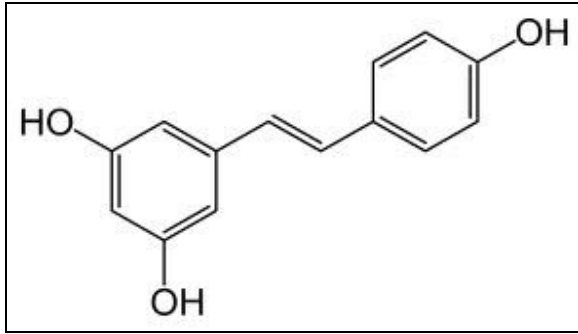
Kim ve Park (2004), piknogenolün *in vitro* olarak DNA hasarına karşı ve SOD ve CAT eksikliği olan mutant *E. coli* hücrelerinde SOD ve HP1 ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada piknogenolün DNA'yı fenton reaksiyon radikallerine karşı koruyup koruyamadığının belirlenmesi için, Puc 19 plazmit DNA'sında demir ve H₂O₂ tarafından oluşturulan OH radikali ile hasar oluşturulmuştur. DNA hasarı, agaroz jel elektroforezi kullanılarak süper sarmal DNA miktarındaki azalma ile belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre fenton reaksiyonu devam ederken uygulanan 50 µg/ml piknogenol, fenton reaksiyonu ile oluşan oksiradikallere karşı DNA hasarını engelleyememiştir. Ancak piknogenol fenton reaksiyonu başlamadan önce uygulandığında, DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir. Buna göre koruyucu etkinin radikallerin süpürülmesinden ziyade demirin şelatlanması ile gerçekleşebileceği öne sürülmektedir. Ancak bu çalışmada da doza ve süreye bağlı olarak piknogenolün DNA kırılmalarına neden olabildiği bildirilmiştir. Oksidatif stres koşulları altında SOD enzimini indüklediğinin gözlenmesinin ardından, piknogenolün DNA hasarına karşı olası prooksidan etkileri, SOD sentezleyemeyen mutant *E. coli* hücrelerinde araştırılmıştır. Her ne kadar piknogenol DNA hasarını artırmasa da, oksidatif stres aracılı DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermemiştir. Bu çalışma piknogenolün çeşitli koşullar altında *in vitro* ve *in vivo* oksidatif stres aracılı DNA hasarını arttırabileceğini ortaya koymaktadır.

2.5.2. Resveratrol

Genel bilgiler

Resveratrol (3,4',5-trihidroksi-stilben), üzümde, kırmızı meyvelerde, tohumlarda ve birçok bitkide kök, gövde ve yapraklarda bulunan stilben grubu, flavonoid olmayan bir polifenoldür (Baur ve Sinclair, 2006; Paolillo, Romano Carratelli ve Rizzo, 2011; Soleas, Diamandis ve Goldberg, 1997).

Resveratrolün (CAS NO:501-36-0) kimyasal formülü: $C_{14}H_{12}O_3$, molekül ağırlığı: 228,24 gramdır. Sinonimleri trans-3,4,5-trihidroksistilben; 3,4',5-trihidroksi-trans-stilben; 5-((1E)-2-(4-hidroksifenil)ethenil)-1,3-benzendiol; 5-((E)-2-(4-hidroksifenil) ethenil) benzen-1,3-dioldür. Yapısal formülü Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Resveratrolün yapısal formülü

Resveratrol bitkilerde fungal enfeksiyonlar ve diğer çevresel stres koşulları altında sentezlenmektedir ve fitoaleksinin özelliği gösteren bir bileşik olarak tanımlanmaktadır. “Phytoalexin”, Yunanca bir terim olup, “phyton” bitki, “alexein” koruyucu anlamındadır.

Resveratrolün, bitkileri hastalıklara karşı korumasının yanı sıra; son yıllarda antifungal, antimikrobiyal, antitümör ve antioksidan etkileri ile insanlarda da fitoaleksinin etkisi gösterdiği anlaşılmıştır (Baur ve Sinclair, 2006; Keskin, Noyan ve Kunter, 2009).

Resveratrol, ilk olarak 1930’lu yılların başlarında tıbbi bir bitki olan *Veratrum grandifolium* Lo es. fil.’de tanımlanmıştır. Çin ve Japon bilim adamları başta olmak üzere, birçok bilim adamı tarafından sağlık üzerine etkileri uzun yıllar araştırılmıştır ve günümüzde en çok çalışılan fenolik bileşiklerden biridir. *Polygonum cuspidatum* bitkisinin

de köklerinden elde edilen resveratrol, Japonya ve Çin’de halk tarafından “kojo-kon” adıyla bilinen geleneksel bir ilaç olarak; hipertansiyon, damar tıkanıklığı, cilt iltihabı ve alerji gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Creasy ve Creasy, 1998; Goldberg, Ng, Yan, Karumanchiri, Soleas ve Diamandis, 1996; Keskin ve diğerleri, 2009). 90’lı yılların başında, kırmızı şarabın kalp-damar hastalıklarında koruyucu etkilerinin, içeriğindeki resveratrol ile ilişkilendirilmesi, resveratrolü kısa sürede ilgi çekici bir molekül haline getirmiştir. İlk kez antikarsinogenik etkisinin rapor edildiği 1997’den itibaren resveratrol ile ilgili klinik ve deneysel çalışmalar büyük hız kazanmıştır. Günümüzde, antioksidan etki, kardiyovasküler koruma, nörolojik hastalıkların tedavisi gibi pek çok biyolojik ve farmakolojik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Borriello, A., Cucciolla, F., Ragione, D., Galletti, P, 2010; Chachay ve diğerleri, 2011; Fremont, 2000).

Bu güne kadar yapılan çalışmalar dikkate alındığında; 72’den fazla bitki türünde resveratrol bulunduğu belirlenmiştir (Acquaviva ve diğerleri, 2002; Dong, 2003; Keskin ve diğerleri, 2009). Bu bitki türlerinden; asma, dut, yaban mersini, yer fıstığı ve Antep fıstığı en başta gelenlerdir. Asmalar diğer bitki türleri ile karşılaştırıldığında; yüksek resveratrol içeriği ve taze veya işlenmiş ürünlerinin (şarap, sirke, kuru üzüm, pekmez, vb.) yaygın tüketimi nedeni ile önem kazanmaktadır. Özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuk kısmında yüksek miktarda resveratrol bulunmaktadır (Keskin ve diğerleri, 2009).

Farmakokinetiği ve biyoyararlanımı

Caco-2 insan ince bağırsak hücre hattında yapılan deneylerden ve gönüllü deneklerden elde edilen verilerle, resveratrolün diyetle alındığında büyük oranda absorbe olduğu kanıtlanmıştır. Pasif difüzyonla eritrositlere alınabildiği ve UDP-glukuronosil transferaz ve aril-sülfataz enzimlerinin etkisiyle glukuronik asit ve sülfata bağlandığı bildirilmiştir (Bircan, 2014; Brown ve diğerleri, 2009).

Resveratrol ısıya dayanıklı olması nedeniyle, birçok yiyecek çeşidinde aktif formunu (trans-resveratrol) koruyabilmekte, ağız yoluyla alındıktan hemen sonra sindirilmekte ve hızla kana karışmaktadır. Günlük 375 ml kırmızı şarap tüketilmesi, 50 adet kırmızı-siyah renkli üzüm tanesinin yenmesi, ya da ticari önem kazanmış resveratrol içerikli ekstrelerin içilmesiyle resveratrolün koruyucu etkisinden yararlanılabileceği iddia edilmektedir (Keskin ve diğerleri, 2009).

Resveratrolün biyolojik etkileri, oral dozunun ne kadarının bağırsaklardan absorbe edildiği ile ilgilidir. Perfüze edilmiş sıçan ince bağırsağında, oral olarak uygulanan resveratrolün % 20,5'inin lümenenden absorbe edildiği ve biyoyararlanımının % 20,5 olduğu gösterilmiştir (Bradamante, Barengi ve Villa, 2004). Andlauer, Kolb, Siebert ve Fürst (2000), resveratrolün bağırsaklardan alımını, izole sıçan ince bağırsağı perfüzyon modelini kullanarak çalışmışlar, lümenenden uygulanan resveratrolün % 46'sının ince bağırsak tarafından emilirken, % 21'inin vasküler bölgede (mezenterik dolaşımda), % 2'sinin bağırsak dokusunda olduğunu gözlemişlerdir. Absorbe olan resveratrolün, resveratrol glukuronite konjuge olduğu (% 16,8) ve değişmeyen trans-resveratrol oranının sadece % 3,4 olduğu bulunmuştur. Bertelli, Giovanni, Stradi, Bertelli ve Tillement (1996) 6,5 mg/L resveratrol içeren kırmızı şarap alımından sonra resveratrolün absorpsiyon oranını araştırmışlar, resveratrolün çok çabuk absorbe olarak ve şarap tüketiminden yaklaşık 60 dakika sonra enterositlerde en üst konsantrasyona ulaştığını göstermişlerdir. Walle, Hsieh, DeLegge, Oatis ve Walle (2004) tarafından gönüllü insanlarda [14C]-trans-resveratrolün oral uygulamasının absorpsiyon, biyoyararlanım ve metabolizmasının incelendiği çalışmada da, resveratrolün % 70 oranında absorbe edildiği bulunmuştur.

Resveratrolün yarı ömrü oldukça kısadır (8-14 dakika) ve organizmaya alındıktan sonra büyük oranda metabolize edilmektedir. İntravenöz (i.v) olarak verilen resveratrolün insanlarda 30 dakika içinde konjugatlarına dönüştüğü, organizmada ortalama kalma süresinin 33,83 dakika olduğu hesaplanmıştır (Walle, Hsieh, DeLegge, Oatis ve Walle, 2004). Bağırsakta ve karaciğerde çok hızlı bir şekilde glukuronat ve sülfonat konjugatlarına metabolize edildiği için, plazmadaki serbest resveratrol konsantrasyonu oldukça düşüktür. 25 mg oral dozdan sonra kanda sadece eser miktarda (5 ng/ml) değişmeyen trans-resveratrol saptanabilmiştir (Bircan, 2014). Diğer polifenolik ksenobiyotiklerde olduğu gibi resveratrol de karaciğerde faz II enzimleri tarafından metabolize edilmektedir. Trans-resveratrol için başlıca metabolitler; trans-resveratrol-3-O-glukuronit, trans-resveratrol-3-sülfat, trans-resveratrol-4'-sülfat, trans-resveratrol-3,5-disülfat, trans-resveratrol-3,4'-disülfat ve trans-resveratrol-3,4',5-trisülfat'tır (Udenigwe, Ramprasath, Aluko ve Jones, 2008).

Polifenollerin sağlık üzerine etkileri diyetel yollarla alım miktarlarına ve biyoyararlanımlarına bağlı olarak büyük değişkenlik göstermektedir (Bisht, Wagner ve Bulmer, 2010).

Resveratrol oldukça kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir ve literatürde 32 nM'dan 100 µM konsantrasyona ve 100 ng'dan 1500 mg/kg doza kadar çok çeşitli aralıklarda çalışıldığı *in vitro* ve *in vivo* araştırmaları bulunmaktadır (Baur ve Sinclair, 2006).

Toksik etkileri

Resveratrolün maksimum tolere edilebilir dozu (MTD) tam olarak belirlenememiştir, ancak kemiricilerde çok iyi tolere edilebilmektedir. Sıçanlarda 700-1.000 mg/kg/gün'e kadar herhangi bir toksik etkisi gözlenmemiştir ve 100 mg/kg/gün'e kadar olan dozlar çalışmalarda güvenle kullanılmaktadır (Baur ve Sinclair, 2006). Juan, Vinardell ve Planas (2002) 28 gün boyunca yüksek doz (20 mg/kg/gün) oral resveratrol uygulamasının Sprague-Dawley sıçanlarda hematolojik veya histopatolojik bir değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir. Bu doz, bir insanın 1 bardak kırmızı şaraptan alacağı resveratrol miktarının ~1.000 katı daha fazladır (Juan, Vinardell ve Planas, 2002). Benzer bir çalışmada, erkek ve dişi CD sıçanlarda 28 gün süreyle 300 mg/kg/gün oral resveratrol uygulamasının herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır (Udenigwe ve diğerleri, 2008). Williams, Burdock, Edwards, Beck ve Bausch (2009) tarafından embriyo-fetal gelişimi için herhangi bir yan etkinin gözlenmediği düzey (No observed adverse effect level, NOAEL) 750 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir.

İnsanlarda resveratrolün kronik uygulamasının toksisitesine ilişkin yeterli veri bulunmamaktadır. Kısa dönem (29 gün) yüksek dozlarda (2,5 veya 5 g/gün) resveratrol uygulaması sadece geçici gastrointestinal bozukluğa yol açmıştır. Diğer kısa dönem veya akut çalışmalarda önemli yan etkilere rastlanılmamıştır. Bu çalışmalarda, 70 kg ağırlığında bir insan için 5 g'lık tek doz ya da 48 saat için her 4 saate 1, 150 mg resveratrol uygulaması yan etkiye neden olmamıştır. Bununla birlikte, kronik hastalıkların tedavisi/önlenmesi birkaç ay veya yıl gerektiren bir süreçtir ve bu nedenle uzun dönem toksisite çalışmaları önemlidir (Bircan, 2014; Borriello, Cucciollo, Ragione, ve Galletti, 2010; Vang ve diğerleri, 2011).

Biyolojik etkileri

Pek çok çalışmada, resveratrolün antikarsinojenik, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan etkileri olduğu vurgulamaktadır (Bisht ve diğerleri, 2010; Chakraborty, Gupta, Ghosh ve Roy, 2010; Kairisalo ve diğerleri, 2011). Resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanser üzerine yoğunlaşmış olup, kanserin pek çok aşamasında durdurucu ve engelleyici özelliği olduğu belirlenmiştir. Resveratrol, antiinflamatuvar, trombosit kümeleşmesini engelleme ve kolesterolü düşürme gibi etkileriyle koroner kalp hastalıkları riskini de azaltmaktadır. Bunların yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalarda, resveratrolün Alzheimer hastalığı üzerinde de iyileştirici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Bradamante ve diğerleri, 2004; Marambaud, Zhao, ve Davies, 2005).

Resveratrolün biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri arasında; enerji metabolizmasının düzenlenmesi, trombosit aggregasyonunun inhibisyonu, vazodilatasyonun sağlanması, lipit metabolizmasının düzenlenmesi, östrojenik aktivite, yaşlanma karşıtı etkileri, insülin ve glukoz homeostazının sağlanması sayılabilmektedir (Bircan, 2014; Bradamante ve diğerleri, 2004).

Son yıllarda resveratrolce zengin kırmızı şarabın sağlık üzerine etkisi en çok tartışılan konuların başında gelmektedir. Fransız paradoksu olarak adlandırılan, Güney Fransa’da yüksek miktarda doymuş yağ tüketimine rağmen koroner kalp hastalıklarının az görülmesi olayı, bu bölgedeki kırmızı şarap tüketim alışkanlığı ve kırmızı şarabın doğal olarak içerdiği resveratrol ile ilişkilendirilmektedir (Hao ve He, 2004; Sovak, 2001).

Resveratrol antiinflamatuvar ve antikoagulan özelliğe sahip olup arterioskleroz (damar sertliği) ve kalp hastalıklarına karşı koruma sağlar. Bu hastalıklara karşı koruma, resveratrolün düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu inhibe etmesinden ve trombosit kümeleşmesini (agregasyonunu) bloke etmesinden kaynaklanmaktadır (Gerogiannaki-Christopoulou, Athanaspoulos, Kyriakidis, Gerogiannaki, Spanos, 2006). Damar sertliğinin gelişiminde LDL’nin oksidasyonu önemlidir. Antioksidan aktiviteye sahip olan resveratrol, LDL oksidasyonunu inhibe ederek damar sertliğinin ilerlemesine karşı koruma sağlar, reaktif oksijen türlerinin üretimini ve lipit peroksidasyonunu azaltır (King, Bomser ve Min, 2006). Resveratrol prostaglandin üretimini, siklogenaz-2 ve nükleer faktör-B aktivitesini inhibe ederek inflamasyonu azaltarak kalp hastalığı ve

kansere karşı koruma sağlamaktadır (Sovak, 2001). Aromatik grup içeren birçok bileşik, rezonans yapıları yoluyla stabil radikaller oluşturarak antioksidan rol oynarlar. Resveratrol içerdiği iki aromatik grup nedeniyle antioksidan aktiviteye sahip olup, oksidatif stresin yol açtığı hücresel hasar ve hastalıkları önlemekte veya geciktirmektedir. Oksidatif stresten kaynaklanan hücre ölümlerini azaltır. Oksidatif stresin neden olduğu aşırı hasar, apoptoza uğrayan hücreleri teşvik eder. Resveratrol, retinada pigment epitelyum hücrelerindeki oksidatif stresi azaltarak yaşlılarda körlüğe yol açan maküler dejenerasyonun görülme sıklığını düşürür (King, Bomser ve Min, 2006). Tümörün başlangıç, ilerleme ve yayılma safhalarını inhibe eder. Antiproliferatif etkiye (hücre çoğalmasını önleyici) sahip olduğu iddia edilmektedir (Gerogiannaki-Christopoulou ve diğerleri, 2006). Resveratrolün koroner kalp hastalıkları ve kanser yanında, nörodejeneratif hastalıkları önleyici etkisi de bilinmektedir. İskemik ataklarda hipokampal bölgedeki nöronları koruduğu, östrojenik aktiviteye sahip olarak menopoz sonrası kemik erimesini önlediği bildirilmiştir (Sovak, 2001).

Antioksidan etkisi

Resveratrol, çeşitli antioksidan enzimlerin uyarılması yoluyla antioksidan kapasiteyi arttıran ve etkili bir serbest radikal yakalayıcısı olan doğal bir antioksidandır. H_2O_2 ile aktive edilmiş insan lenfositlerinde 10-100 μM resveratrolün GSH miktarını arttırdığı, benzer bir çalışmada lenfositlerde μM konsantrasyonlarda, GPx, GST, GR, CAT gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. 0,1 mM konsantrasyona kadar etkili bir 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali yakalayıcısıdır. UV radyasyon sonucu H_2O_2 'den oluşan hidroksil radikalini yakalayarak sitokrom c oksidasyonunu önlediği belirtilmiştir. LPS ile stimüle edilmiş makrofajlar tarafından üretilen H_2O_2 ve O_2^- üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir (Bradamante ve diğerleri, 2004; Kalantari ve Das, 2010; Kraft, Parisotto, Schempp ve Efferth, 2009; Pandey ve Rizvi, 2010).

Resveratrolün, lipid peroksidasyonun önlenmesinde önemli antioksidan etkilere sahiptir. $OH^\bullet$ ile lipid peroksidasyon oluşturulan RAW 264.7 hücrelerinde resveratrolün hücre membranını peroksidasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Geçiş metallerini, özellikle Cu^{+2} iyonlarının şelatlanması yoluyla, fenton reaksiyonu ürünlerini ve metal-indüklü lipid peroksidasyonu baskıladığı bilinmektedir (Delmas, Jannin ve Latruffe, 2005).

Resveratrol, oksidatif stres koşullarında eritrosit membranlarını protein karbonillerinin oluşumuna karşı koruduğu gösterilmiştir. Pandey ve diğerleri (2010) tarafından, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir. İnsan trombositlerinde, proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonunu belirgin şekilde önlediği belirtilmiştir (Pandey ve Rizvi, 2010).

Resveratrolün, antioksidan etkilerinin yanı sıra, konsantrasyona ve hücre tipine bağlı olarak prooksidan etkilerinin de gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır. İnsan lösemi hücrelerinde, ROS (özellikle $O_2^{\cdot-}$) üretimini indüklerken; prostat kanser hücrelerinde ROS üretiminde doz bağımlı olarak azalmaya sebep olmuştur. Resveratrolün diğer polifenoller gibi peroksidaz enzimleri tarafından metabolize edildiği ve bunun sonucunda oluşan fenoksi radikallerinin, özellikle Cu^{+2} iyonları varlığında prooksidan etki göstererek oksidatif reaksiyonları katalizleyebildiği belirtilmiştir (Bradamante ve diğerleri, 2007; Cucciolla ve diğerleri, 2007; Pervaiz, 2003).

Antimikrobiyal etkileri

Resveratrolün; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis*'e karşı antimikrobiyal etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, farelerde yapılan çalışmalarda *Herpes simplex* virüs-1 (HSV-1) ve HSV-2 enfeksiyonlarına karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir (Baur ve Sinclair, 2006).

Antiinflamatuvar etkileri

Svajger ve Jeras (2012) resveratrolün antiinflamatuvar etkileri ile ilgili derlemelerinde, resveratrolün immün sistem ile ilişkili çok çeşitli inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta terapötik bir potansiyele sahip olduğuna dair kanıtlar olduğunu bildirmişlerdir. İnsanlar üzerindeki klinik çalışmalar eksik olsa da, hayvan modellerindeki çalışmalardan elde edilen sonuçlar resveratrolün deneysel inflamatuvar artrit, otoimmün miyokarditte ve otoimmün ensefalomiyelitte iyileştirici etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu

alışmalar aynı zamanda resveratrolün temel inflamatuvar moleküller üzerindeki inhibe edici etkilerini gösteren birçok *in vitro* deney ile desteklenmektedir.

Resveratrolün, proinflamatuvar aracılarn sentez ve salınımını inhibe ederek, eikazonoidlerin sentezindeki düzenlemelerle ve bazı aktive immün hücrelerin inhibisyonu yoluyla inflamasyon sürecinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bircan, 2014). Resveratrolün, makrofajlar, polimorfonükleer lenfositler (PMNL) ve bunlarla ilişkili proinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Resveratrolün inflamasyonda önemli rol oynayan NF-κB aktivitesini düzenlediği bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda, TNF-α aktivasyonunu düzenlediği, adezyon moleküllerinin üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, IL-1, 6, 8 gibi sitokinlerin ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'in mRNA gen ekspresyonlarını ve salınımını promotor aktiviteyi inhibe ederek kontrol edebildiği bildirilmiştir. Resveratrolün, T hücreleri tarafından üretilen IL-2 ve TNF-α'ya karşı, makrofajlar tarafından üretilenlere göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Bircan, 2014; Brown ve diğerleri, 2009; Kalantari ve Das, 2010).

Resveratrolün, lenfosit üretimi ve proliferasyonu üzerinde baskılayıcı etkileri de bulunmaktadır. Ancak, immün fonksiyon için gerekli olan lenfosit aktivasyonu üzerindeki etkileri geri dönüşümlüdür ve kalıcı etki bırakmadığı rapor edilmiştir. İnflamasyon modellerindeki tüm bu baskılayıcı etkilerine karşın, sahip olduğu antimikrobiyal aktivitesi dikkate alındığında, resveratrolün bir taraftan inflamatuvar yanıtı düzenlerken, diğer taraftan spesifik immün yanıtı artırdığı söylenmektedir (Bircan 2014; Baur ve Sinclair, 2006; Kalantari ve Das, 2010).

Antikarsinojenik etkileri

Resveratrolün kanserden koruyucu etkisi ilk kez Jang ve diğerleri (1997) tarafından tespit edilmiştir. Topikal resveratrol uygulamasının farelerdeki cilt tümörlerinin sayısını azalttığı ve kanser oluşumunun 3 önemli safhasında (başlama, gelişme ve ilerleme) engelleyici etki gösterdiği belirlenmiştir.

Resveratrolün farklı kanser tiplerinde, önleyici ve/veya tedavi edici etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Çeşitli kemirici modellerinde, sistemik resveratrol uygulamasının tümör oluşumu ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde,

insan deri, prostat, meme, akciğer ve kolon kanser, lösemi, melanoma hücre hatlarında koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, resveratrolün kanserden koruyucu etkilerini aşağıda verilen mekanizmalarla gerçekleştirdiği söylenebilir; apoptozun indüksiyonu/inhibisyonu, hücre döngüsündeki kontrol noktalarının düzenlenmesi, Faz I ve II enzimlerinin düzenlenmesi yoluyla detoksifikasyonun artırılması ve kanserojen maddelerin aktivasyonunun bloke edilmesi, otofaji, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği sayesinde DNA hasarının önlenmesi/onarılması, antianjiyogenik etkisi ile tümör büyümesi ve metastazın önlenmesi (Bircan, 2014; Çatalgöl, Batirel, Taga ve Kartal-Özer, 2012).

Genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Resveratrolün insan lenfositlerinde H_2O_2 tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, resveratrolün 10-100 μM konsantrasyon aralığında insan lenfositlerinde sitotoksik etki göstermediği ayrıca H_2O_2 tarafından indüklenen DNA hasarının resveratrol tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir. Çalışılan konsantrasyon aralığında resveratrolün doza bağlı olarak GSH düzeylerini ve GPx, GR, GST aktivitelerini artırırken CAT aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu veriler insan lenfositlerinde H_2O_2 tarafından oluşturulan DNA hasarında resveratrolün koruyucu etkisinin GSH düzeyindeki artış ve antioksidan enzim aktivitelerindeki iyileştirici etki ile açıklanabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, resveratrolün 10 μM konsantrasyonda H_2O_2 üzerinde koruyucu bir etkisi olmadığını 100 μM konsantrasyonda ise sadece % 2 süpürücü aktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir deyişle aslında H_2O_2 resveratrol tarafından elimine edilmemekte, resveratrolün H_2O_2 tarafından indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu etkisini antioksidan enzim aktivitesini artırarak gerçekleştirmekte olduğu iddia edilmektedir (Yen, Duh ve Lin, 2003).

De Salvia, Festa, Ricordy, Perticone ve Cozzi (2002), CHO hücrelerinde H_2O_2 tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı resveratrolün etkilerini comet ve kromozom anormallikleri yöntemi ile incelemişlerdir. Bu çalışmada resveratrolün tek başına comet yönteminde primer DNA hasarına sebep olmadığı, bununla birlikte kromozom anormallikleri yönteminde yüksek dozda DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. H_2O_2 ile birlikte kombine olarak uygulandığı kültürlerde ise primer DNA hasarını ve fiske olmuş DNA hasarını farklı şekillerde etkilediği bildirilmiştir. Comet yöntemi sonuçlarına göre

resveratrolün, H₂O₂ ile birlikte eş zamanlı uygulandığında koruyucu bir etki göstermediği ancak H₂O₂ uygulamasından 3 saat önce uygulandığında primer DNA hasarını tamamen engellediği bildirilmiştir. Kromozom anormallikleri yönteminde ise H₂O₂ ile eş zamanlı olarak uygulandığı protokolde koruyucu etki gösterdiği, H₂O₂ muamelesinden 3 saat önce uygulandığında hem toplam kromozom hasarını hem de anormal hücre yüzdesini artırdığı gösterilmiştir. Resveratrolün hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteye sahip olduğu ve bu özelliklerin askorbik asit gibi birçok doğal antioksidan maddede görüldüğü bildirilmiştir. Resveratrolün etkilerinin uygulama dozları, deney koşulları ve kullanılan test sistemlerine bağlı olarak çok farklı olabileceği bildirilmektedir.

Türkez ve Şişman (2011), *in vitro* insan lenfosit kültürlerinde resveratrolün aflatoksin B₁ tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimi testleri ile araştırmışlar, resveratrolün aflatoksin B-1'in neden olduğu kardeş kromatit değişimi frekansını ve kromozom hasarını azaltarak koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, resveratrol (10, 15, 25, 40, 75 ve 100 µM) uygulanan grupların kontrol gruplarına kıyasla hücre başına düşen kardeş kromatit değişimi ve kromozom anormalliği oranının değişmediği ve mutajenik ve klastojenik etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sonuçların, Stagos ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Stagos ve diğerleri (2007) de resveratrolün tek başına uygulanmasının insan lenfositlerinde genotoksik olmadığını ve kardeş kromatit değişimini indüklemeyi bildirmişlerdir. Sgambato ve diğerleri (2001), resveratrolün birçok genotoksik ajanın neden olduğu oksidatif DNA hasarını engelleyerek antimutajenik ve antikanserojenik bir ajan olarak etki edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Diğer taraftan Matsuoka, Furuta, Ozaki, Fukuhara ve Miyata (2001), resveratrolün kobay akciğer hücre hattında kardeş kromatit değişimini indüklediğini fakat kromozom anormalliklerine neden olmadığını bildirmişlerdir. Resveratrolün C6 glioma hücrelerinde de H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Quincozes-Santos ve diğerleri (2007)). Yan ve diğerleri (2011) de resveratrolün insan lenfosit kültürlerinde etanol tarafından indüklenen DNA hasarına karşı önemli bir koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Resveratrolün insan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin ve radyasyon tarafından indüklenen kromozom hasarına karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da, lenfositlere 0-219 μ M resveratrol uygulanmıştır. Resveratrolün kromozomal anormallik ve kardeş kromatit değişimi yöntemiyle tespit edildiği gibi, incelenen tüm konsantrasyonlarda radyasyon tarafından indüklenen hasarı azaltıcı etkisi olduğu ve maksimum korumanın 2,19 μ M konsantrasyonda gerçekleştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, resveratrolün tek başına uygulandığı tüm test konsantrasyonlarında kontrole kıyasla kardeş kromatit değişimi frekanslarını artırdığı saptanmıştır. Sitogenetik indekslere göre (mitotik indeks ve proliferasyon indeksi) düşük konsantrasyonların hücre çoğalmasını artırırken yüksek konsantrasyonların insan lenfositlerinde büyümeyi negatif olarak etkilediği iddia edilmiştir (Sebastia ve diğerleri, 2013).

Attia (2012), resveratrolün sisplatin tarafından oluşturulan DNA hasarı ve apoptoza karşı antigenotoksik ve antiapoptotik etkilerini fare somatik ve germinal hücrelerin *in vivo* olarak araştırmıştır. Bu çalışmada, DNA hasarı fare kemik iliğinde alkali comet ve MÇ tekniği ile belirlenmiş, ayrıca germ hücrelerindeki genotoksik etkinin belirlenmesi için sperm hücrelerinde ve spermatositlerde kromozomal analizler yapılmıştır. Apoptoz anneksin V/propidium iyodid boyaması, nötral comet testi, DNA fragmentasyon tekniği gibi çeşitli yöntemlerle incelenmiştir. Reaktif oksijen türlerinin düzeyi, lipid peroksidasyonu, GSH düzeyi ve idrarla atılan 8-OHdG ölçümleri de yapılmış ve farelerin resveratrol ile ön muamelesinin sisplatin tarafından indüklenen genotoksisite ve apoptozu önemli derecede azalttığı bulunmuştur. 7-14 gün boyunca, 50 ve 100 mg/kg gavaj yoluyla verilen resveratrolün yüksek dozda koruyucu etkisinin daha fazla olduğu ve doza bağlı etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca sisplatin muamelesinden önce uygulanan resveratrol biyokimyasal olarak belirlenen oksidatif hasar göstergelerini iyileştirdiği iddia edilmiştir.

Resveratrolün DNA koruyucu etkileri ile ilgili çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Resveratrolün 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-p-dioksin veya östradiol ile muamele edilmiş MCF-10F hücrelerine eş zamanlı olarak uygulanması ile östrojen metabolizmasını ve DNA katım ürün oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lu ve diğerleri, 2008). Benzo (α)piren tarafından indüklenen sperm DNA hasarı ve hücre ölümü resveratrolün eş zamanlı muamelesi ile engellenmiştir. Resveratrol sperm DNA'sında B α P-diol-epoksit katım oluşumunu ve apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü inhibe etmiştir (Revel ve diğerleri, 2001). Başka bir çalışmada, 30 hafta boyunca 8 mg/kg/gün resveratrolün 1,2-

dimetilhidrazin (DMH) ile birlikte oral takviye edilmesi sıçan lökositlerini DMH tarafından indüklenen DNA hasarına ve oksidatif strese karşı korumuştur. Resveratrolün comet yöntemiyle saptanan değişimleri azalttığı ve antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GR, GPx ve GST) aktivitelerini düzenlediği bildirilmiştir (Sengottuvelan, Deeptha ve Nalini, 2009). Resveratrol, böbrekte serbest radikal oluşumuna neden olarak karsinojenik etki gösteren potasyum bromatın indüklediği DNA hasarına karşı 8-OHdG düzeyini azaltarak koruyucu etki göstermektedir (Cadenas ve Barja, 1999). Resveratrol ayrıca felç yatkınlığı olan sıçanlarda kas hücrelerinde 8-OHdG düzeylerini düşürerek oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir (Mizutani, Ikeda, Nishikata ve Yamori, 2000). Bununla birlikte resveratrolün UVA maruziyeti ile eş zamanlı olarak uygulanması HaCa T insan keratonositlerinde 8-OHdG oluşumunu artırmış ve DNA zincir kırıklarına ve hücre ölümüne yol açmıştır (Seve ve diğerleri, 2005).

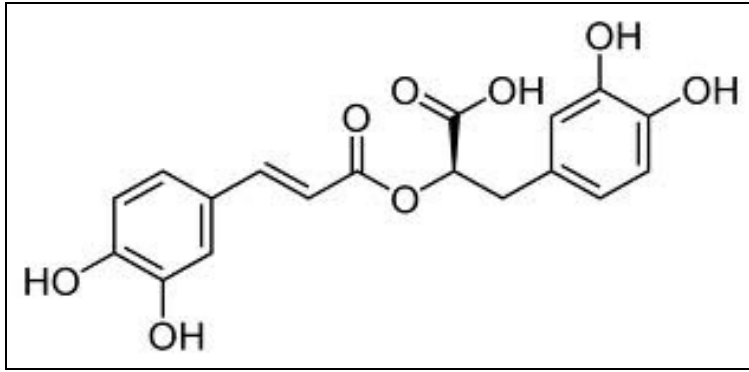
Resveratrolün moleküler ve biyokimyasal etki mekanizmaları çeşitlilik göstermektedir. Resveratrolün, çoklu ilaç direnç proteini, topoizomera II, DNA polimeraz, östrojen reseptörleri, tubulin ve F1-ATP gibi çeşitli hücre sinyal proteinine bağlandığı gösterilmiştir. Resveratrolün, aynı zamanda NF- κ B, STAT3, HIF-1 alfa, beta-katenin ve PPAR gama gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive ederek Bcl-2, Bcl-XL, XIAP ve survivin gibi antiapoptotik gen ürünlerini baskılamakta (protein kinazları inhibe etmekte (src, PI3K, JNK, ve AKT), antioksidan enzimlerin aktivitesini artırmakta, inflamatuvar göstergeler (NF, COX-2, iNOS, ve CRP) ile anjiyogenik ve metastatik gen ürünlerinin (MP, VEGF, katepsin D ve ICAM-1) aktivitesini baskılamakta ve hücre siklusunu düzenleyen genler (53, Rb, PTEN, siklinler ve CDK) üzerine düzenleyici etki gösterdiği iddia edilmektedir (Keskin ve diğerleri, 2009).

2.5.3. Rosmarinik asit

Genel bilgiler

Rosmarinik asit (α -O-kaffeoil-3,4-dihidroksifenil laktik asit); biberiye, adaçayı gibi tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunan, fenolik asit yapısında bir ikincil metabolittir (Martinez-Tome ve diğerleri, 2001). Her ikisi de orto pozisyonunda iki OH grubu taşıyan iki fenolik halka içeren ve doğal olarak oluşan hidroksillenmiş bir bileşiktir. İki fenolik halka arasında akarbonil grup, doymamış bir çift bağ ve karboksilik asit grubu yer almaktadır.

Rosmarinik asidin (CAS NO: 20283-92-5) kimyasal formülü: $C_{18}H_{16}O_8$, molekül ağırlığı 360,31 gramdır. Sinonimleri; benzenpropanoik asit, α -(((2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)-1-okso-2-propen-1-yl)oksi)-3,4-dihidroksi-, (aR)-; Benzenepropanoik asit, Benzenepropanoik asit, α -(((2E)-3-(3,4-dihidroksifenil)-1-okso-2-propenil)oksi)-3,4-dihidroksi-, (aR)-(9CI); α -((3-(3,4-dihidroksifenil)-1-okso-2-propenil)oksi)-3,4-dihidroksi-, (R-(E))-; sinnamik asit, 3,4-dihidroksi-, 2-ester 3-(3,4-dihidroksifenil) laktik asittir. Yapısal formülü Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Rosmarinik asidin yapısal formülü

1958 yılında iki İtalyan kimyacı Scarpati ve Oriente bu bileşiği ilk kez izole etmişler ve izole ettikleri *Rosmarinus officinalis* bitkisinden dolayı rosmarinik asit olarak adlandırmışlardır (Scarpati ve Oriente, 1958). Rosmarinik asit özellikle *Boraginaceae* familyası ve *Lamiaceae* familyasının *Nepetoideae* alt familyası türlerinde tespit edilmiştir (Petersen ve Simmonds, 2003). Bitki türleri üzerinde yapılan araştırmalar rosmarinik asidin eğrelti otları ve boynuz otları gibi basit yapılı kara bitkilerinden, birçok yüksek yapılı bitki türüne kadar 26 familyanın bitkilerinde bulunduğunu ortaya koymuştur (Petersen ve diğerleri, 2009).

Rosmarinik asit, kafeik asit ve 3,4-dihidropenillaktik asidin esteridir. Rosmarinik asit için literatürde ilk olarak “kafeik asit oligomerleri” ifadesi kullanılmıştır. Ancak rosmarinik asit, kafeik asit dimeri değil, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin esteridir (Petersen ve Simmonds, 2003). Ancak literatürde bileşiğin farklı gruplarını ayırt etmek için yaygın olarak kafeik asit dimer, trimer, tetramer ve pentamerleri ifadesi kullanılmaktadır (Bulgakov, Inyushkina ve Fedoreyev, 2012).

İkincil metabolitlerin kafeik asit metabolitleri olarak adlandırılan grup; rosmarinik asit ve türevlerini, ayrıca klorojenik asit gibi birçok kafeik asit metabolitlerini içermektedir. Rosmarinik asidin gıda katkısı olarak kullanımından kozmetik ve tıpta kullanımına kadar pek çok uygulama alanı mevcuttur (Al-Sereiti, Abu-Amer ve Sen, 1999; Bulgakov ve diğerleri, 2012; Park, Uddin, Xu, Kim ve Lee, 2008).

Biyoyararlanımı ve toksik etkileri

Rosmarinik asidin biyoyararlanımı oldukça yüksektir, i.v verilmesini takiben kan dolaşımından hızlı bir şekilde elimine edilmektedir ($t_{1/2}$ = 9 dakika). Faredeki i.v. LD₅₀ değeri 569 mg/kg olarak bildirilmiştir ve düşük bir toksisiteye sahip olduğu söylenebilir (Parnham ve Kesselring, 1985).

Farmakolojik etkileri

Tıbbi bitki, ot ve baharatlarda çeşitli miktarlarda bulunan rosmarinik asit için birçok biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Rosmarinik asit ve bunun bileşeni olan kafeik asit güçlü bir antioksidan olarak görev yapar (Ho, Wang, Wei, Huang ve Huang, 2000; Liu, Zhang, Wang ve Wang, 1992). Serbest radikal süpürücü ve lipit peroksidasyonu engelleyici önemli antioksidan özellikleriyle bilinmektedir. Bunun dışında antiviral, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümör ve kardiyoprotektif etkiler olmak üzere birçok etkisi bilinmektedir (Petersen ve Simmonds, 2003). Aynı zamanda apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Hur, Suh, Kim ve Won, 2007).

Rosmarinik asidin antidepresan (Takeda, Tsuji, Inazu, Egashira ve Matsumiya, 2002), hepatoprotektif (Osakabe ve diğerleri, 2002), anti-inflamatuvar (Osakabe, Yasuda, Natsume ve Yoshikawa, 2004), antianjiyotik (Huang ve Zheng, 2006), antitümör (McKay ve Blumberg, 2006), ve HIV-1-baskılayıcı özellikler (Dubois ve diğerleri, 2008) gibi birçok biyoaktivitesinin olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca bronşial astım, spazmojenik rahatsızlıklar, peptik ülser, karaciğer toksisitesi, arterioskleroz, iskemik kalp hastalığı, katarakt, kanser ve düşük sperm sayısı gibi pek çok hastalığa karşı terapötik potansiyeli olduğu iddia edilmektedir (Al-Sereiti ve diğerleri, 1999). Birbirinden bağımsız iki ayrı mekanizma olarak inflamatuvar cevabın inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerinin süpürülmesi ile

mevsimsel alerjik rinokonjuktiviti engellediği de bildirilmiştir (Osakabe ve diğerleri, 2004).

Farklı konsantrasyonlarda rosmarinik asit koyunların diyetine katıldığında kuzu etlerindeki antioksidan oranlarının iyileştirilmesini sağladığı gösterilmiştir (Moñino, Martinez, Sotomayor, Lafuente ve Jordan, 2008). Ayrıca çorbalardan, kozmetik ürünlerine kadar birçok değişik üründe kokulu bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Martinez-Tome ve diğerleri, 2001).

Melissa officinalis'in rosmarinik asit içeren ekstreleri *Herpes simplex* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar antiinflamatuvar özelliklerinin lipoksijenazların ve siklooksijenazların inhibisyonuna ve rosmarinik asidin kopleman yolağı ile etkileşimine dayandığını ileri sürmektedir (Parnham ve Kesselring, 1985; Petersen ve Simmonds, 2003).

Rosmarinik asidin bilişsel performansı geliştirici etkisi olduğu da bildirilmektedir. Rosmarinik asidin bilişsel yetenekleri arttırıcı etkisinin prolil oligopeptidazı inhibe edici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Park, Park, Kim, Jung ve Ryu, 2010). Amyloid- β agregasyonunun inhibisyonu Alzheimer hastalığında önemli bir terapötik tedavi yaklaşımıdır. Hamaguchi, Ono, Murase ve Yamada (2009) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, oral rosmarinik asidin, *in vivo* şartlarda çeşitli amyloid- β birikim yollarını etkileyerek Alzheimer hastalığı patolojisinin gelişimini engellediğini göstermiştir. Rosmarinik asidin mikromolar düzeyindeki düşük konsantrasyonlarda, nöronları koruyucu etkisi olduğu da bildirilmiştir (Fallarini ve diğerleri, 2009). Amyotrofik lateral skleroz motor nöronları etkileyen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Pre-septomatik safhada rosmarinik asidin farelerde intraperitonal olarak verilmesi motor nöronların hasarını istatistiksel olarak önemli derecede geciktirmiş ve yaşam süresini artırmıştır (Shimojo, Kosaka, Noda, Shimizu ve Shirasawa, 2010).

Lee ve diğerleri (2008) insan dopaminerjik nöronal hücre hattı (SH-SY5Y) ile yaptıkları bir çalışmada rosmarinik asidin H_2O_2 tarafından indüklenen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve apoptotik hücre ölümünü istatistiksel olarak önemli derecede engellediğini bildirmişlerdir. Rosmarinik asidin Bax ve Bcl-2 genlerinin regülasyonunu değiştirdiğini ve antioksidan enzim hemoksijenaz-1 (HO-1) enzimini stimüle ettiğini göstermişlerdir.

Ayrıca HO-1 enziminin uyarılması protein kinaz A (PKA) ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolları ile ilişkilidir. Sonuç olarak rosmarinik asidin oksidatif stres koşulları altında apoptotik süreçleri düzenleyerek nöronal hücreler üzerinde koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir.

H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı sarı lavanta (*Lavandula viridis* L'Her) ekstresi ve temel bileşeni olan rosmarinik asidin A172 insan astrosit hücre hattındaki nöroprotektif etkilerini ve serbest radikal birikimini azaltıcı etkilerini bildirmişlerdir. Ayrıca CAT aktivitesinin araştırılması neticesinde bu koruyucu etkinin katalazdan kaynaklanmadığı ve diğer intraselüler mekanizmaların etkili olabileceği öne sürülmüştür (Costa, Sarmiento, Gonçalves ve Romano, 2013).

Ghaffari ve diğerleri (2014) de nöronal hücrelerde oksidatif strese bağlı olarak hücre ölümü üzerinde rosmarinik asidin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. N2A fare nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen toksisitenin nötralizasyon mekanizması; MTT, LDH aktivitesi, mitokondrial membran potansiyeli (MMP), intraselüler reaktif oksijen türleri ve comet tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca moleküler düzeyde çeşitli nöronal moleküler göstergeler RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre N2A fare nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen sitotoksikite, rosmarinik asit tarafından baskılanmıştır. Rosmarinik asit LDH parçalanmasını, mitokondrial membran potansiyelini ve intraselüler reaktif oksijen türleri azaltmada oldukça etkin bir özellik göstermiştir. Rosmarinik asit, N2A fare nöroblastoma hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen genotoksikiteyi engellemiş ve sitotoksikiteye karşı tirozin hidroksilazın ve beyin kökenli nörotrofik faktörün (BDNF) düzenlenmesini uyararak koruyucu etki göstermiştir.

Kim ve diğerleri (2009) rosmarinik asidin retinopati modeli oluşturulmuş farelerde retinal neovaskülarizasyona karşı antianjiyojenik etkili olduğunu, rosmarinik asidin retinal endotelial hücrelerin proliferasyonunu doza bağlı olarak önemli derecede engellediğini bildirmişlerdir.

Rosmarinik asidin antifibrotik etkileri de bildirilmiştir. Karbon tetraklorür (CCl₄) tarafından indüklenen sıçan karaciğer fibrozis modelinde, rosmarinik asit fibrozis derecesini azaltmış ve histopatolojik morfolojinin biyokimyasal göstergelerinde iyileşmeye

neden olmuştur. Bu etkilerin olası mekanizmasının karaciğer dönüştürücü büyüme faktörü-beta1 (TGF- β 1) ve bağ doku büyüme faktörü (CTGF) ekspresyon düzeyindeki azalma olabileceği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2010).

Rosmarinik asidin insan dermal fibroblastlarında transkripsiyon faktörü NF- κ B nin TNF- α tarafından indüklenen aktivasyonunu (Lee ve diğerleri, 2006) ve SH-SY5Y hücrelerinde NF- κ B translokasyonunu engellediği (Fallarini ve diğerleri, 2009) gösterilmiştir.

Antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri

Rosmarinik asit polifenolik yapısı nedeniyle hem antioksidan hem de prooksidan özellik gösterebilir (Bors, Michel, Stettmaier, Lu ve Foo, 2004). Rosmarinik asit A ve B olarak gösterilen iki difenolik halkaya sahiptir ve bunlar otooksidasyon ile o-kinonlara okside olarak serbest radikal oluşturabilirler. Otokatalitik mekanizma ile süperoksit ve H₂O₂ oluşturdıkları bilinmektedir. Aynı zamanda o-kinonlar peroksidazın substratı olarak çeşitli serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır (Pirker ve diğerleri 2009). Diğer yandan rosmarinik asidin protein kinaz A sinyalizasyon yolağı aracılığıyla melanin biyosentezinde yer alabileceği açıklanmıştır (Lee, Kim ve Park, 2007). Başka bir çalışmada melanoma hücrelerinde polifenol oksidazın ve devamında melanin biyosentezinin rosmarinik asit varlığında aktive edildikleri açıklanmaktadır (Sanchez-Campillo ve diğerleri, 2009). Antioksidan aktivitesi olduğu bildirilen bitkiler arasında biberiye, sadece lezzet verici bir baharat olarak değil aynı zamanda gıdalarda antioksidan, besin takviyesi ve kozmetiklerde de çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Calabrese ve diğerleri, 2000; Zheng ve Wang 2001).

Genel olarak biberiye bitkisindeki antioksidan moleküllerin serbest radikal süpürücü olarak etki ettikleri, apoptoz ve tümör oluşumu, hücre içi haberleşme, transdüksiyon veya karaciğerdeki ksenobiyotiklerin metabolize edilmesi gibi fizyolojik süreçlerde yer alan çeşitli enzimatik sistemlerin gen ekspresyonunun veya aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayabildikleri belirtilmektedir (Perez-Fons ve diğerleri 2006; Singletary 1996; Singletary, MacDonald ve Wallig, 1996).

Erkan, Ayrancı ve Ayrancı (2008), biberiye ekstresi, çörek otu (*Nigella sativa*) uçucu yağı, karnosik asit, rosmarinik asit ve sesamolün antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu

çalışmada üç saf bileşiğin ve iki bitki ekstresinin etkileri DPPH• ve ABTS•⁺ radikal süpürücü aktivite tayini ve ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemi ile belirlenmiştir. Her üç yöntemde de biberiye ekstresi çörek otundan elde edilen uçucu yağlardan daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir. Saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sıralamalarının ise farklı yöntemlerde farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu sıralama DPPH yönteminde rosmarinik asit < sesamol < karnosik asit; ABTS testinde sesamol < rosmarinik asit < karnosik asit ve FTC testinde rosmarinik asit < karnosik asit < sesamol şeklinde olduğu bildirilmiştir. Bu farklılık her bir bileşiğin yapısal özelliklerinden ve farklı radikal tutucu özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada ayrıca biberiye ekstresinin ve çörekotu yağının fenolik içerikleri belirlenmiş, biberiye ekstresinin çörekotu yağına göre çok daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Bu durum aynı zamanda biberiye ekstresinin neden daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu açıklamaktadır.

Basmacıoğlu-Malayaoğlu (2010) biberiyenin antioksidan etkisi üzerine yaptığı derlemede, antioksidan aktivite üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonuçlarının, bitkinin yetiştiği bölgeye, hasat zamanına, kullanılan bitki kısmına, fenolik yapıya ve konsantrasyona, ekstraksiyon yöntemine, ürün ve oksidasyon koşullarına, analitik yöntem ve hayvan türüne göre farklılık gösterdiğini bildirmiştir.

Rosmarinik asidin antioksidan aktivitesinin membran stabilizasyonunu ve radikal ilerlemesini engelleyerek membranın oksidatif hasara karşı korunması ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir (Pérez-Fons, Garzón ve Micol, 2010). Bu çalışma rosmarinik asidin lipozomların fiziksel ve oksidatif stabilizasyonunu artırıcı etkisi ile uyumludur (Panya ve diğerleri, 2010). Rosmarinik asit aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin üretimini ve IL-6 salınımını azaltmakta ve insan keratinositlerinde UVB'nin neden olduğu hasarı engellemektedir (Vostálová, Zdarilová ve Svobodová, 2010).

Kansere karşı etkileri

Paluszcak, Krajka-Kuzniak ve Baer-Dubowska (2010) hayvanlara diyetleri ile birlikte uzun süreli olarak rosmarinik asit verildiğinde kansere karşı kimyasal koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Xu, Jiang, Ji ve Liu (2010) rosmarinik asidin insanda MDA-MB-231BO kemik iliği kökenli göğüs kanseri hücrelerinin göçünü engellediğini ve temel olarak NF- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin yolunun reseptör aktivötörü aracılığı ile ve aynı zamanda IL-8 ekspresyonunu baskılayarak göğüs karsinomlarından kemik metastazını engellediğini göstermişlerdir.

Genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Rosmarinik asidin genotoksik ve antigenotoksik etkilerine ilişkin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Kimyasal olarak indüklenmiş kromozom hasarı ve kaybına, ayrıca primer DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Rosmarinik asidin çeşitli dozlarının antitümoral ajan doksorubisine karşı mutajenik ve/veya antimutajenik etkilerini *in vivo* olarak Swiss farelerin periferik kan hücrelerinde MÇ yöntemi ile araştırmışlardır. Rosmarinik asidin üç farklı dozu (50, 100, 200 mg/kg) ile muamele edilen farelerde, kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Rosmarinik asitle kombine olarak doksorubisin verilen hayvanlarda sadece doksorubisin verilen hayvanlara kıyasla MÇ frekansında önemli bir azalma gözlenmiştir. Her ne kadar bu koruyucu etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmese de, doksorubisin toksisitesine karşı rosmarinik asidin güçlü antioksidan aktivite gösterdiği iddia edilmiştir (Furtado, Fernandes de Almeida, Furtado, Cunha ve Tavares, 2008).

Furtado, Araujo, Resende, Cunha ve Tavares (2010), V79 hücrelerinde MÇ ve comet yöntemlerini kullandıkları *in vitro* çalışmalarda da doksorubisinin oluşturduğu DNA hasarına karşı rosmarinik asidin farklı konsantrasyonlarında (0,28; 0,56; 1,12 mM) koruyucu etkisi incelenmiştir. Rosmarinik asidin uygulama konsantrasyonlarında tek başına genotoksik etkili olmadığını, bununla birlikte doksorubisin tarafından indüklenen MÇ frekansını ve DNA hasarını istatistiksel olarak önemli derecede azalttığını ve antigenotoksik etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada doksorubisin tarafından oluşturulan DNA hasarındaki azalmanın, rosmarinik asidin antioksidan aktivitesinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Furtado ve diğerleri, 2010).

Pereira ve diğerleri (2005), comet yöntemini kullanarak rosmarinik asidin Wistar sıçanların beyin dokusu ve periferik kan hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığını belirlemişlerdir. De Oliveira ve diğerleri (2012) ise farelerde etanol tarafından indüklenen

DNA hasarına karşı rosmarinik asidin koruyucu etkilerini comet ve MÇ testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada 100 mg/kg rosmarinik asidin antijenotoksik kapasitesi etanolden önce, eş zamanlı ve sonra uygulanarak periferik kan ve beyin hücrelerinde comet yöntemiyle, kemik iliği hücrelerinde ise MÇ yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar rosmarinik asidin etanol tarafından indüklenen DNA hasarının derecesini, her iki dokuda ve tüm farklı uygulama sürelerinde azaltabildiğini göstermiştir.

Ghaffari ve diğerleri (2014), N2A nöronal hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı rosmarinik asidin koruyucu etkisini incelemişler ve hücreleri 12 saat süreyle 1-25 µM rosmarinik asit ile devamında 24 saat 100 µM H₂O₂ ile muamele etmişlerdir. Sonuçlar comet yöntemiyle değerlendirilmiş ve buna göre kuyruk uzunluğu değerlerinin 25 µM rosmarinik asit uygulanan hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde aynı düzeyde olduğu bildirilmiştir. 1-25 µM konsantrasyon aralığında rosmarinik asit uygulanmasının ardından 100 µM H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarı azalmıştır. 25 µM rosmarinik asit uygulanan hücrelerde bu azalma her ne kadar kontrol düzeyinde olmasa da H₂O₂ uygulanan grupla kıyaslandığında istatistiksel olarak daha az orandadır. Apoptotik hücre ölümü hücrelerdeki büzülme, çekirdekçiğin kondanase olması gibi morfolojik değişimlerle ve kaspaz ve nükleaz aktivasyonu ve nükleer onarım polimerazlarının inaktivasyonu gibi mekanizmalarla karakterize edilen ve sonuç olarak kromozomal DNA'nın bozulması ve hücre ölümü ile sonlanan süreçtir. Comet yöntemi ile DNA'daki hasar ve rosmarinik asidin bu hasara karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir.

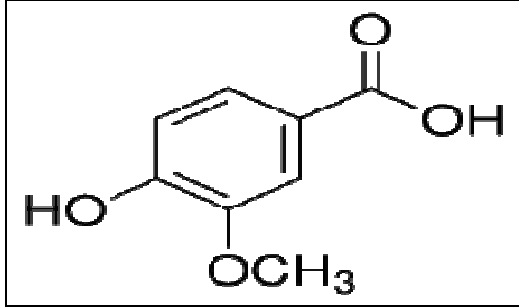
Rosmarinik asidin antijenotoksik etkileri ile ilgili benzer sonuçlar, rosmarinik asidin (25 µM) insan lenfositlerinde gamma ve UV radyasyon tarafından indüklenen MÇ frekansını azalttığını belirleyen Del Bano ve diğerleri (2006) ve Sanchez-Campillo ve diğerleri (2009) tarafından da bildirilmiştir.

2.5.4. Vanilik asit

Genel bilgiler

Vanilik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), vanilyada bulunan doğal bir bitkisel ikincil metabolittir (Shyamala, Madhava Naidu, Sulochanamma ve Srinivas, 2007). Gıdalarda lezzet verici ajan olarak kullanılan benzoik asit türevi bir fenolik bileşiktir.

Vanilik asidin (CAS NO: 121-34-6) kimyasal formülü: $C_8H_8O_4$, molekül ağırlığı: 168,16 gramdır. Sinonimleri 3-Metoksi-4-Hidroksibenzoik asit; 4-Hidroksi-3-metoksibenzoik asit; 2-Metoksi-4-karboksifenol; m-Metoksi-p-hidroksi-benzoik asittir. Yapısal formülü Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Vanilik asidin yapısal formülü

Vanilik asit vanilyanın ferulik aside dönüşümü sırasında oluşan okside formudur (Civolani, Barghini, Roncetti, Ruzzi ve Schiesser, 2000; Lesage-Meessen, Delattre ve Haon, 1996). Vanilik asit en yüksek miktarda geleneksel Çin tıbbında da kullanılan *Angelica sinensis* köklerinde tespit edilmiştir. Ayrıca *C. murale* L. (Batish, Lavanya, Pal Singh ve Kohli, 2007), *Melilotus messanensis* (Macias, Simonet, Galindo ve Castellano, 1999), *Juglans regia* L. (Zhang, Liao, Moore, Wu ve Wang, 2008) gibi bitkilerde de tanımlanmıştır.

Vanilik asit, adrenalin ve noradrenalinin önemli bir endojen metabolitidir ve aldehit formda olan vanilyanın temel metabolik ürünü olarak tanımlanmaktadır (Gonzalez-Baro, Parajon-Costa, Franca ve Pis-Diez, 2008). İnsanlarda yeşil çay tüketiminin ardından en yaygın bulunan metabolit vanilik asittir (Pietta ve diğerleri, 1998). Ayrıca kahve, çikolata ve yeşil çay tüketiminin ardından idrarda kafeik asidin metabolik ürünü olarak bulunmaktadır (Falconnier ve diğerleri, 1994).

Biyolojik etkileri

Vanilik asit, antimikrobiyal (Yemis, Pagotto, Bach ve Delaquis, 2011) ve antimalarial (Rechner, Spencer, Kuhnle, Hahn ve Rice-Evans, 2001) aktiviteye sahip olması ve karsinogenezi (Aziz, Farag, Mousa ve Abo-Zaid, 1998; Guimaraes ve diğerleri, 2007; Kampa ve diğerleri, 2004, Vetrano ve diğerleri, 2005), apoptozu (Huang, Chuang, Wu ve Yen, 2008a; Huang ve diğerleri, 2008b) ve inflamasyonu (Itoh ve diğerleri, 2009) inhibe

edici özellikler göstermesi gibi çok çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Ancak esas olarak sahip olduğu hoş kremi kokusu ile kozmetiklerde ve lisanslı bir gıda katkısı (WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA no. 959) olarak yaygın kullanımı ile popüler hale gelmiştir (Gitzinger ve diğerleri, 2011).

Vanilik asidin seçici olarak bazı yılan zehiri proteinlerinin antikoagulan etkilerini engellediği belirlenmiştir (Dhananjaya ve diğerleri, 2006).

Huang ve diğerleri (2008a), diyabetik nöropatinin ilerlemesi sırasında 14 farklı fenolik asidin metilglioksal ile indüklenmiş N2A hücrelerindeki apoptoza karşı biyolojik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın verileri metilglioksalin N2A hücrelerinde mitokondri membran potansiyelindeki ve Bax/Bcl-2 oranındaki değişimler, kaspaz-3'ün aktivasyonu ve PARP parçalanması ile apoptozu indüklediğini göstermektedir. Sonuçlar metilglioksalin ile indüklenmiş N2A hücre apoptozuna karşı en iyi engelleyici etkiyi vanilik asidin gösterdiğini bildirmektedir. Buna bağlı olarak vanilik asidin diyabetik nöropatinin neden olduğu yan etkilerin engellenmesinde hücre koruyucu etkiler oluşturabileceği öne sürülmektedir (Huang ve diğerleri, 2008a). Aynı araştırma ekibi yaptığı bir sonraki çalışmada vanilik asidin N2A hücrelerinin apoptozunu baskılayabildiğini ve metilglioksal aracılı glikasyon sistemini bloke ederek diyabetik nöropatiyi engelleyebildiğini göstermişlerdir (Huang ve diğerleri, 2008b).

Prince, Dhanasekar ve Rajakumar (2011), vanilik asidin isoproterenol tarafından indüklenmiş miyokard enfarktüsli sıçanlarda biyokimyasal parametreler üzerine koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada sıçanlar 10 gün boyunca günlük 5 ve 10 mg/kg vanilik asit ile muamele edilmişlerdir. Bu ön muamelenin ardından 100 mg/kg isoproterenol verilen sıçanlarda miyokardiak enfarktüs indüklenmiştir. Isoproterenol, serum kreatin kinaz aktivitesini, ayrıca serumda ve kalpte kolesterol, trigliserit, serbest doymuş yağların düzeyini arttırmıştır. Sıçanlarda serum LDL kolesterol artarken, HDL kolesterol düzeyleri azalmıştır. Bunun yanı sıra plazma ve karaciğerdeki 3-hidroksi-3-metil glutaril-koenzim-A redüktaz aktivitesi yükselmiş, lesitin kolesterol açıl transferaz aktivitesi düşmüştür. Isoproterenol verilen sıçanlarda B hücre lösemi/lenfoma-2 (bcl-2) geninin miyokardiyal ekspresyonu azalmış ve bcl-2 ile ilişkili-x (bax) geninin miyokardiyal ekspresyonu artmıştır. Vanilik asit sıçanlarda tüm biyokimyasal parametreleri pozitif yönde değiştirmiş ayrıca miyokardiyal enfarktüs oranını azaltmıştır.

Antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri

Vanilik asidin, toksik potansiyelleri olan sentetik antioksidanların yerine doğal bir antioksidan olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Zhang ve diğerleri, 2008). Tai, Sawano, Yazama ve Ito (2011) çeşitli yöntemlerle vanilyanın antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Vanilyanın ABTS•⁺ radikali süpürücü etkisi incelendiğinde askorbik asit ve Trolokstan daha güçlü bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ancak, DPPH radikali veya galvinoxil radikali süpürücü etki göstermemiştir. Ayrıca ORAC ve oksidatif hemoliz inhibisyonu yönteminde (OxHLIA) yine askorbik asit ve troloksdan daha güçlü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Farelerde vanilyanın oral yoldan verilmesi plazmanın vanilya konsantrasyonunu ve antioksidan aktivitesini arttırmaktadır (Tai ve diğerleri, 2011).

In vitro çalışmalar vanilik asidin potansiyel serbest radikal süpürücü etkisini desteklemektedir. Prince ve diğerleri (2011) isoproterenol tarafından indüklenmiş miyokard enfarktüsülü sıçanlarda vanilik asidin biyokimyasal parametreler üzerindeki iyileştirici etkisini serbest radikal süpürücü etkisi ile gösterdiğini bildirmişlerdir.

Antiinflamatuvar etkileri

Vanilik asidin, insan lenfositlerinde proliferasyon aktivitesini ve insan periferik kan mononükleer hücrelerinde interferon gamma sekresyonunu arttırıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chiang, Ng, Chiang, Chang ve Lin, 2003).

Vanilik asidin konkanavalinA-indüklü karaciğer hasarında, karaciğer inflamasyonu üzerine baskılayıcı etkisine bağlı olarak hepatoprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (Itoh ve diğerleri, 2009).

Itoh ve diğerleri (2010), vanilik asidin farelerde CCl₄ tarafından indüklenen kronik karaciğer hasarına karşı da hepatoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Vanilik asidin güçlü radikal süpürücü etkisi ile tekrarlanan CCl₄ muamelesi sırasında hepatositleri oksidatif strese karşı koruduğu ve karaciğer inflamasyon ve fibrogenezini baskıladığı öne sürülmüştür (Itoh ve diğerleri, 2010).

Kim ve diğerleri (2011), vanilik asidin fare peritoneal makrofajlarında LPS ile indüklenen inflamatuvar yanıtlara karşı etkilerini araştırmışlardır. Vanilik asidin LPS tarafından

indüklenen TNF- α ve IL-6 artışını engellediği ortaya koyulmuştur. İnflamatuvar süreçte fare peritoneal makrofajlarında COX-2 ve nitrik oksit düzeyleri artmış bununla birlikte vanilik asit artmış olan COX-2 düzeyi ve prostoglandin E₂ ve nitrik oksit üretimini, ayrıca NF- κ B ve kaspaz-1 aktivasyonunu baskılamıştır. Bu araştırmanın sonuçları ile vanilik asidin farmakolojik etkilerine dikkat çekilmiş ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (Kim ve diğerleri, 2011).

Kim, Kim, Um ve Hong (2010) ise çalışmalarında vanilik asit tedavisinin ülseratif kolit modelinde inflamatuvar araçların düzeylerini ve klinik belirtileri önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir.

Genotoksik ve antigenotoksik etkileri

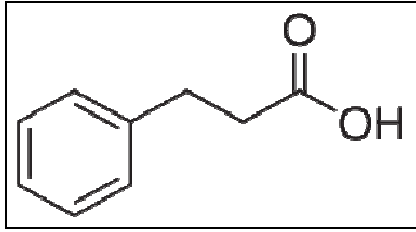
Erdem ve diğerleri (2012), vanilik asidin *in vitro* insan periferik kan lenfosit kültüründe mitomisin-C (MMC) tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini MÇ ve comet yöntemleri ile incelemişlerdir. MMC tarafından indüklenen genotoksik hasara karşı, 1 μ g/ml vanilik asidin hem DNA hasarını hem de MÇ içeren hücre frekansını istatistiksel olarak önemli oranda azalttığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada aynı zamanda yüksek konsantrasyondaki vanilik asidin (2 μ g/ml) tek başına genotoksik etki oluşturabileceği bildirilmiştir. Buna bağlı olarak vanilik asidin, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında, DNA ve kromozomlardaki oksidatif hasarı engelleyebileceği belirtilmiştir.

Vanilik asidin antigenotoksik özellikleri daha önceki çalışmalarda bildirilmiş antioksidan özellikleri ile açıklanabilir (Tai ve diğerleri 2011, 2012). Vanilik asidin deneysel olarak karsinogenez oluşturulmuş olan sıçanlarda kimyasal koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Tsuda ve diğerleri, 1994). Vanilik aside kıyasla vanilyanın antimutajenik, antioksidan ve antikarsinojenik özellikleri daha detaylı olarak araştırılmıştır (Tai ve diğerleri, 2011; Kumar, Sharma ve Mishra, 2012). Diğer yandan vanilyanın okside formu olan vanilik asidin, vanilyadan daha fazla serbest radikal süpürücü etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Sasaki ve diğerleri, 1990). *In vivo* şartlarda vanilyanın fare kemik iliğinde MMC tarafından indüklenen MÇ frekansını azalttığı bildirilmiştir (Inouye ve diğerleri, 1998). *In vitro* bir araştırmada ise vanilyanın V79 hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı bildirilmiştir (Tamai, Tezuka ve Kuroda, 1992).

2.5.5. Sinnamik asit

Genel bilgiler

Sinnamik asidin (CAS NO: 140-10-3) kimyasal formülü: $C_9H_8O_2$ molekül ağırlığı: 148,16 gramdır. Trans sinnamik asit sinonimleri 3-fenil-2-propenoik asit; trans-3-fenillakrilik asittir. Yapısal formülü şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8. Sinnamik asidin yapısal formülü

Sinnamik asit, birçok meyve, sebze ve çiçekte, ayrıca propolis ve kahvede yaygın olarak bulunan bir fenolik asittir. Özellikle tarçın yağından elde edilmektedir ve adını tarçın bitkisinden almaktadır, bununla birlikte sentetik olarak da üretilmektedir. (Balasundram ve diğerleri, 2006). Beyaz, kristalimsi ve düşük yoğunlukta tatlı, bal benzeri bir aromadır. Bitkisel kaynaklı gıdaları içeren besinlerle günlük diyetde yüksek oranda sinnamik asit türevleri ve kafeik asit esterleri tüketilmektedir (Rechner ve diğerleri, 2001).

Sinnamik asit doğada yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin temel sınıfı olan hidroksisinnamik asitlerdendir. Tüm hidroksisinnamik asitler yan zincirde çift bağ bulunan ve böylece cis ve trans formu olan C_6C_3 karbon iskeletine sahiptir. En yaygın ve en iyi bilinen hidroksisinnamik asitler sinnamik asit, kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asittir (El-Seedi ve diğerleri). Sinnamik asit, karboksil grubu ile biten üç karbonlu bir yan zincire sahiptir, şikimat ve fenilpropanoid yolaklarında önemli bir ara üründür. Fenilpropanoid yolağında fenilalaninin deaminasyonu ile sentezlenir. Fenilpropanoidler fenilalanin temelli bitkisel bir metabolit sınıfıdır. Fenilalanin ilk olarak sinnamatlar, kumarinler, kafeik asitler, ferulik asitler ve sinapik asitlere dönüştürülür. Tüm bu asitlerin öncüsü olan sinnamik asit, diğer bölgelere daha kolay taşınmasını sağlayan daha ucucu bileşiklerin ana bileşenidir. Sinnamik asit ve türevleri tatlandırıcıların, parfümlerin, sentetik boyaların ve farmasötiklerin önemli bileşenleridir (Natella, Nardini, Di Felice ve Scaccini, 1999; Bickers ve diğerleri, 2005).

Toksik etkileri

Ekmekçioğlu, Feyertag ve Marktl (1998) sinnamik asidin Caco-2 hücrelerinde IC₅₀ konsantrasyonunun 4-5 mM arasında olduğunu göstermişlerdir. Daha önceki *in vivo* çalışmalar sinnamik asidin akut letal dozunun (LD₅₀) farede 160-220 mg/kg (i.p), sıçanlarda 2,5 g/kg (oral) ve tavşanda 5 g/kg (dermal) olduğunu göstermektedir. Buna göre sinnamik asidin düşük bir toksisiteye sahip olduğu görülmektedir (Opdyke, 1975).

Biyolojik etkileri

Sinnamik aldehit ve bunun türevi olan sinnamik asit, Çin tıbbında önemli bir yeri olan *Cinnamomum cassia*'nın temel kimyasal bileşenleridir (Patra ve diğerleri, 2012). Yaygın olarak bilinen adıyla tarçın sadece önemli bir baharat değil aynı zamanda güçlü bir antioksidandır (Shan, Cai, Sun ve Corke, 2005). Sindirim yoluyla alındığında genellikle güvenilir olduğu ve antimikrobiyal (Lopez, Sanchez, Batlle ve Nerin, 2005), antidiyabetik (Dugoua ve diğerleri, 2007), antioksidatif (Lee ve diğerleri, 2004) ve anti-inflamatuvar (Liao ve diğerleri, 2012) gibi pek çok farmakolojik özellik gösterdiği bildirilmiştir. Kim, Campbell, Mahomey, Chan ve Molyneux (2004), sinnamik asidin ve m-kumarik asit, p-kumarik asit ve kafeik asit gibi türevlerin antifungal etkilerini de bildirmişlerdir.

Sinnamik asidin hepatoprotektif ve antimalarial aktiviteye sahip olduğu da belirtilmektedir (Jung, Lee, Park, Jeon ve Choi, 2006). Bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan doğal bir ürün olan propolisin de antibakteriyel, antiviral, antifungal, antioksidan, antiinflammatuar, yara iyileştirici, doku yenileyici ve anestezik özelliklerinde sinnamik asit ve türevlerinin, aromatik asitler ve esterlerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Kartal, Yıldız, Kaya, Kurucu ve Topçu, 2003; Uzel ve diğerleri, 2005).

Tarçın ve tarçın yağının sulu ekstratlarının kalp dokusu hasarını ve izopreterenol tarafından indüklenen kan akışı değişimlerini azalttığı bildirilmiştir (Kubavat ve Asdaq, 2009). Önceki çalışmalarda sinnamik asidin iskemi/reperfüzyon hasarındaki etkileri gösterilmiştir. Sinnamik asidin iskemik kalp hasarında potansiyel bir terapötik ajan olabileceği öne sürülmektedir (Song, Li, Sun ve Wang, 2013).

Lee ve diğerkleri (2003), sinnamik asidin ve yeşil çayda bulunan polifenoller gibi diyetsetel yollarla alınan birçok doğat antioksidan bileşğin mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağını aktive ettiklerini göstermişlerdir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda bu bileşiklerin normal hücrelerde apoptozu indükleyen kaspaz sinyal kaskadını aktive ettikleri bildirilmiştir.

Li, Wen, He ve He (2006), sinnamik asidin endotelyal hücrelerde (insan umbilikal damar endoteli kökenli hücre hattı, ECV304) TNF- α tarafından indüklenen doku faktörü ekspresyonu üzerine etkilerini ve ilişkili mekanizmalarını araştırmışlardır. Sinnamik asidin TNF- α tarafından indüklenen hücreseel doku faktörü (TF) aktivitesini konsantrasyona bağılı olarak önemli derecede arttırdığını bildirmişlerdir. Sinnamik asit aynı zamanda TF mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. Western blot analizleri ile bu etkinin NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu ile gerçekleştiğı belirlenmiştir.

Liu, Hudgins, Shack, Yin ve Samid (1995), sinnamik asidin insan melonoma hücre kültürlerinde tümör metastazı ve immünojenite ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek tümör hücrelerinin farklılaşmasını indüklediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sinnamik asidin 1- 4,5 mM konsantrasyonlarda glioblastoma, melanoma, prostat ve akciğer karsinoma hücrelerinin hücre proliferasyonunu % 50 azalttığı bildirilmiştir.

Patra ve diğerkleri (2012), siklofosamid tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı sinnamik asidin koruyucu etkilerini swiss albino farelerde *in vivo* olarak araştırmışlardır. Sinnamik asidin kemik iliğı ve dalak hücrelerinde siklofosamid tarafından indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda hem kemik iliğı hem de karaciğerde lipit peroksidasyonu düzeylerine ve SOD, CAT ve GST aktivitelerinin ölçümlerine göre antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca sinnamik asidin serbest radikal süpürücü etkisi olup olmadığı *in vitro* olarak da değerlendirilmiştir. Bu amaçla sinnamik asit ekstrelerinin H₂O₂, süperoksit radikali (O₂•⁻) ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü etkilerini araştırmışlardır. Buna göre sinnamik asidin konsantrasyonu arttıkça, DPPH, H₂O₂ ve süperoksit anyonu süpürücü etkisinin de arttığı bildirilmiştir (Patra ve diğerkleri, 2012).

Diğerk çalışmalar sinnamik asit türevi olan kafeik asit fenil esterin, farklı oral karsinoma hücrelerinde sitotoksik aktivite gösterdiğini (Lee, Liao, Chen ve Yang, 2000) ve V79

hücrelerinde H_2O_2 'nin neden olduğu hasara karşı DNA'yı koruduğunu bildirmektedir (Nakayama, Yamada, Osawa ve Kawakishi, 1996).

Sinamik asidin mutajenik etkileri *Salmonella typhimurium*'da, *Escherichia coli*'de ve *Basillus subtilis*'de Rec yöntemi ile araştırılmış ve mutajenik olmadığı bildirilmiştir (Azizan ve Blevins, 1995; Kuroda, Yoo ve Ishibashi, 1984; Sekizawa ve Shibamoto, 1982).

Genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Çeşitli sinamik asit türevlerinin (trans-sinamik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kafeik asidin metil ve propil esterleri) H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı hücreleri koruyucu etki kapasiteleri araştırılmış, her bir bileşiğin etkin koruyucu özelliklerinin, hücreler arası boşluğu geçme ve hücreler arası demiri şelatlama yeteneklerine bağlı olduğunu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre fenolik asidin aromatik halkasında orthohidroksi grubunun bulunması, oksidatif stres koşullarında hücresel DNA'nın korunmasını sağlamaktadır. Bileşiğin lipofilitesi arttıkça, hücresel membranları geçmesi sağlanacağı için koruma daha etkili olmaktadır. Fenolik asitler konsantrasyonlarına ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücreleri farklı şekillerde etkilemektedirler. Yüksek konsantrasyonlarda veya uzayan inkübasyon sürelerindeki maruziyetleri, aynı fenolik asitlerin DNA hasarını arttırmakta ve genotoksik etki göstermektedir (Kitsati ve diğerleri, 2012).

Niero ve Machado-Santelli (2013), sinamik asidin sitotoksik ve genotoksik etkilerini insan melanoma hücre hattı HT-144 hücrelerinde ve insan melanosit hücre hattında (NGM) incelemişlerdir. Hücre canlılık testlerinde sinamik asidin IC_{50} değerinin HT-144 hücrelerinde 2,4 mM olduğu bununla birlikte melanositlerin daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Hücre büyümesinin inhibisyonu muhtemelen DNA sentezinin inhibisyonuna neden olan DNA hasarları ve nükleer aberasyonlar ve sonrasında apoptozun indüklenmesi ile ilişkilidir. Aktive edilmiş kaspaz 3 boyaması yöntemiyle HT-144 hücrelerinde 3,2 mM sinamik asidin 24 saatlik inkübasyonu sonunda apoptozun indüklendiği belirlenmiştir. Yine HT-144 hücrelerinde sinamik asidin 0,4 ve 3,2 mM konsantrasyonlarının kontrole kıyasla MÇ frekansını artırdığı bildirilmiştir. Aynı şekilde 3,2 mM sinamik asit NGM hücrelerinde de MÇ içeren hücre frekansını arttırmıştır. Buna göre, sinamik asidin

melanoma hücrelerinde anti-proliferatif etkileri olduğu bununla birlikte melanositlerde artan MÇ frekansının genotoksik etkilere neden olmasından dolayı daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir (Niero ve Machado-Santelli, 2013).

Maistro, Angeli, Andrade ve Mantovani (2011), sinnamik asit ve türevleri, kafeik asit ve ferulik asidin genotoksik ve klastojenik potansiyelini sıçan hepatoma doku hücrelerinde (HTC) *in vitro* olarak comet ve MÇ yöntemleri ile araştırmışlardır. Her bir fenolik bileşiğin 3 farklı konsantrasyonu (50, 500 ve 1500 μ M) HTC hücrelerine 24 saat süre ile uygulanmıştır. Sinnamik asit, kafeik asit ve ferulik asidin comet yönteminde DNA hasarına neden olmadıkları, bununla birlikte MÇ testinde her üç fenolik bileşiğin MÇ frekansında artışa neden olduğu ve HTC hücrelerinde klastojenik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Maistro ve diğerleri, 2011).

2.6. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) tayini ile antioksidan aktiviteleri belirlendikten sonra sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik özellikleri araştırılmıştır. Fenolik bileşiklerin sitotoksitesi nötral kırmızı alımı yöntemi, genotoksik ve antigenotoksik aktiviteleri ise comet ve MÇ yöntemleri ile araştırılmıştır.

2.6.1. Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) tayini yöntemi

Kimyasal maddelerin antioksidan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) yöntemidir (Lien, Ren, Bui ve Wang, 1999; Rice-Evans, Miller ve Paganga, 1996).

TEAK, kimyasal bir bileşiğin antioksidan kapasitesinin standart veya kontrol olarak E vitamininin suda çözünen analog formu olan sentetik antioksidan troloks (($\pm$)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırmalı olarak ölçülmesidir.

Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathoan (1993) tarafından tanımlanan yöntemde antioksidan kapasite ABTS (2,2'-azino-bis (3etilbenz-tiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak renksizleştirme tekniği şeklinde ölçülür (Miller ve diğerleri, 1993; van den Berg, Haenen, van den Berg ve Bast, 1999).

Diğer antioksidan kapasite tayini yöntemleri; troloksu standart olarak kullanan difenilpikrilhidrazil (DPPH) yöntemi, oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC) ve plazma ferrik indirgeme yeteneği (FRAP) tayinidir. Bu yöntemler arasında, TEAK yöntemi özellikle yiyecek, içecek ve besin desteklerinin antioksidan kapasite tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang, Ou ve Prior, 2005).

ABTS oksidatif bir ajan varlığında, koyu mavi-yeşil renkli monokasyon radikal formuna ($ABTS^{\bullet+}$) dönüşen bir kromojendir. Antioksidan özellikteki bir kimyasalla karıştırıldığında $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonu indirgenerek renksiz formuna dönüşür. Renginin açılması yani dekolorizasyonun derecesi $ABTS^{\bullet+}$ indirgenme düzeyi ile ilişkilidir. Bu özelliğe dayanarak hücresiz bir ortamda spektrofotometrik ölçümlerle antioksidan aktivite belirlenebilmekte ve antioksidan olduğu bilinen troloks ile kıyaslamalı olarak kapasite tayini yapılabilmektedir (Sashidhara, Singh, Srivastava ve Puri, 2011).

TEAK yöntemi oldukça hızlı ve kolay bir yöntemdir ve antioksidan aktivite aynı zamanda bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir (van den Berg, Haenen, van den Berg, van der Vijgh ve Bast, 2000). Bununla birlikte yöntemle ilgili bazı sorunlar da söz konusudur. En önemli sorunlardan biri, çok yüksek antioksidan konsantrasyonlarının çok yüksek ABTS konsantrasyonunu gerektirmesi ve bu yüksek konsantrasyonlarda yüksek absorbans görülmesine neden olmasıdır. Bu durum konsantrasyon aralığının geniş tutulmasına yol açmaktadır. Yöntemle ilgili bir diğer sorun ise yöntemin uygulandığı sıradaki koşul farklılıklarından ve antioksidan madde ile $ABTS^{\bullet+}$ arasındaki reaksiyon için beklenen sürede gerçekleşmemesinden dolayı farklı sonuçların çıkmasıdır (Arts ve diğerleri, 2004).

2.6.2. Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi

NKA yöntemi, biyomedikal ve çevresel pek çok uygulamada yaygın olarak kullanılan, hücre yaşam ve canlılık duyarlılığını ve hücre hasarını gösteren bir sitoksisite yöntemidir (Borenfreund ve Puerner, 1985; Repetto, del Peso ve Zurita, 2008).

Borenfreund ve Puerner'in geliştirdiği NKA yöntemi, supravital bir boya olan nötral kırmızı (3-amino-m-dimetilamino-2-metil-fenazin hidroklorür) boyasının canlı hücrelere girişi ve bağlanması esasına dayanmaktadır. Kolorimetrik bir yöntem olan NKA yönteminde, kültür ortamındaki canlı hücrelerce alınan ve elektrostatik olarak lizozomal

matriskteki anyonik bölgelere bağlanan katyonik nötral kırmızı boyasının lizozomlardaki birikim miktarı ve böylece hücre sayısı değerlendirilir (Andreoli, Gigante, Nunziata, 2003; Bulychiev, Trouet, ve Tulkens 1978; Weyermann 2005).

Nötral kırmızı noniyonik difüzyon ile hücre membranını kolaylıkla geçen bir boyadır. Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızı alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri ayırmayı mümkün kılar (Komissarova, Saha ve Rossman, 2004). Ksenobiyotiklerin etkisi ile gerçekleşen bazı değişiklikler nötral kırmızı boyasının alımında ve bağlanmasında azalma ile sonuçlanabilir. Bu durumda bu testin de temeli olan şekilde canlı, hasarlı veya ölü hücrelerin ayırılması sağlanabilmektedir. Sağlıklı memeli hücreleri kültür ortamına ekildiklerinde devamlı olarak bölünerek sayılarını artırırlar. Toksik bir kimyasal madde bu sürece etki ederek, hücre sayısını etkileyecek şekilde büyüme oranının azalmasına yol açar. Sitotoksiste, kimyasal maruziyetinin ardından hücre bütünlüğünün bozulmasına ve büyüme inhibisyonuna sebep olarak nötral kırmızı boyasının alımında doza bağlı bir azalma ile gösterilir. Sonuç olarak nötral kırmızı boyası yalnızca canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikir ve boyanın lizozomlarda birikmesi hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Fotakis ve Timbrell, 2006; Lasarow, Isseroff ve Gomez, 1992; Yano ve Marcondes 2005).

NKA sitotoksiste deneyi, diğer yöntemler ile kıyaslandığında, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte ucuz bir yöntemdir (Popiolkiewicz, Polkowski, Skierski, Mazurek, 2005; Weyermann, Lochmann ve Zimmer, 2005).

2.6.3. Tek hücre jel elektroforezi yöntemi (Comet yöntemi)

Tek hücre jel elektroforezi ya da yaygın olarak bilinen adıyla comet yöntemi, *in vitro*, *in vivo* ve *ex vivo* sistemlerin tümüne uygulanabilen ve tek bir hücredeki DNA hasarını ve onarımını değerlendirebilen bir tekniktir (Cemeli, Baumgartner ve Anderson, 2009). Comet yöntemi son yıllarda özellikle genotoksiste testlerinin uygulanmasında moleküler epidemiyoloji, ekogenotoksikoloji çalışmalarında, DNA hasarının ve onarımının araştırılmasında oldukça önemli standart bir yöntem haline gelmiştir. Teknik kolaylığı, hassaslığı, kullanışlılığı, hız ve ekonomik yönleri ve yayınlara sağladığı katkılarla dikkat çekmektedir (Cemeli ve diğerleri, 2009; Collins, 2004).

Tek hücre jel elektroforezi yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından, tek hücre DNA hasarını görüntülemek amacıyla, mikroelektroforetik bir teknik olarak geliştirilmiştir (Ostling ve Johanson, 1984). Teknik daha sonra Singh ve diğerleri tarafından alkali şartlarda DNA'nın çift zincir yapısının açılmasını içerecek şekilde modifiye edilmiştir (Singh, McCoy, Tice ve Schnider, 1988).

Memeli hücrelerinde DNA kırıklarını inceleyen ve ölçen basit, hızlı ve hassas bu yöntemde, fiziksel veya kimyasal bir ajana maruz kalan az sayıda hücre agaroz kaplı mikroskop lamaları üzerine gömülerek lize edildikten sonra elektroforeze tabi tutulur; elektrik akımı uygulanması kırılmış ve hafiflemiş DNA parçacıklarının çekirdekten hızla göçünü sağlar. DNA, bağlayıcı floresans bir boya ile boyanır. Görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldız benzediklerinden "comet" diye adlandırılan bu görüntüler değerlendirilir (Cemeli ve diğerleri, 2009; Collins, Dobson, Dušinská, Kennedy ve Stetina, 1997; Tice ve diğerleri, 2000).

Tek hücre jel elektroforez yöntemi, tek bir hücrede DNA hasarının doğrudan tayininin yanı sıra bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da tayinine olanak sağlar. Herhangi bir tedavi sırasında hücrelerin heterojen cevabının ve radyoterapi ve kemoterapi tedavi protokollerinde tümör cevabının öngörülmesine yardımcı olabilir (Singh ve diğerleri, 1988).

Tek hücre jel elektroforezi yöntemi, DNA hasar ve onarımını ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceler ve tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen her ökaryotik hücrede DNA hasar ve onarımını tespit edebilir (Collins, Dobson, Duinska, Kennedy ve Stetina, 1997; Singh ve diğerleri, 1988).

Tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda farklı laboratuvarlarda çeşitli modifikasyonlarla uygulanan, özellikle tek ve çift zincir kırıklarının tayinini kolaylaştıran bir yöntemdir. Tek ve çift zincir kırıklarının tayini için nötral lizis ve tek zincir kırıkları için alkali lizis uygulanmaktadır. Alkali şartlardaki DNA göçü hem çift hem de tek zincir kırıkları ile ilişkilidir, tek zincir kırıkları ise tamamlanmamış onarım bölgeleri ve alkali oynak bölgelerle ilişkilidir. Comet tekniğinin alkali versiyonu daha geniş bir spektrumdaki hasarın belirlenmesindeki etkisinden dolayı daha başarılı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Zaten pek çok genotoksik ajan çift zincir kırıklarından daha fazla oranda tek

zincir kırıkları ve alkali oynak bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (Fairbairn, Olive ve O'Neill, 1995; Tice ve diğerleri, 2000).

Alınan dokularda ve biyolojik sıvılarda DNA hasar ve onarımını ölçmek için, örneklerden izole edilen bir hücre süspansiyonu ek bir hasara veya onarıma uğratmayacak şekilde hazırlanmalıdır. *In vitro* araştırmalar herhangi bir hücre tipine kolaylıkla uygulanabilmektedir ancak bu yöntemde en fazla insan lenfosit hücresi kullanılmaktadır. Çünkü hem kan kolaylıkla alınabilmekte hem de lenfositler kolayca izole edilebilmektedir. Aynı zamanda, lenfositler çeşitli organları hedef alan ajanlar tarafından oluşturulan genotoksisite için iyi bir örnektir. Ancak pek çok parametrenin lenfosit cevabını etkilediği; donörün yaşı, fiziksel aktivitesi, sigara içip içmediği gibi olası faktörlerin hücre cevabında farklılık yaratabildiği ve bireyler arası farklılıkların olabileceği unutulmamalıdır. En büyük zorluk, bu hücrelerin hasar düzeyinin ve onarım kapasitesinin diğer doku hücrelerinden farklılık göstermesinden dolayı verilerin yorumlanmasıdır. Genellikle, lenfositler DNA hasarını oldukça yavaş onanırlar ve hücrelerdeki ve organlardaki hasarın tamamı lenfositler kullanılarak tespit edilemeyebilir. Ayrıca yaşam stili, diyet, ilaç kullanımı, hava kirliliği, mevsim, iklim ve egzersiz gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenen DNA hasarı düzeyinde bireyler arasında da büyük farklar gözlenebilmektedir. Ayrıca, lenfositler *in vitro* şartlarda sınırlı canlılık göstermekte ve fitohemaglutinin gibi bir mitojen ile inkübasyonu gerektirmektedir (Angerer, Ewers ve Wilhelm 2007; Collins ve diğerleri, 2008; Dusinska and Collins, 2008). Lenfositler en çok kullanılan hücre tipi olmakla birlikte, çalışmaya bağlı olarak sperm, bukkal, nasal, epitelyal ve plasental hücreler de kullanılmaktadır (Anderson, 2001). *In vivo* hayvan çalışmalarında kan, karaciğer, nazal mukoza hücreleri de kullanılabilir (Tice ve diğerleri, 2000).

Comet tekniği, insan lenfositlerinde oksidatif stres ile ilişkili durumların belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Anderson, Yu, Phillips ve Schmezer, 1994). Aynı zamanda *in vivo* oksidatif stresin belirlenmesindeki özellikleri nedeniyle birçok patolojinin, diyetel etkilerin, mesleki maruziyetlerin ve çevresel kirliliğin izleme çalışmalarında gösterge olarak kullanılmaktadır (Anderson, 2001; Cemeli ve diğerleri, 2009).

Tek hücre jel elektroforez yönteminde çok az sayıda hücre gerektiğinden küçük hacimde insan biyopsi örneklerinde, deney hayvanlarının herhangi bir dokusunda DNA

kırılmalarının boyutlarını saptamak olasıdır. Ayrıca işlem hızlıdır, birkaç saat içinde gerçekleşir ve duyarlılığı yüksektir. Yöntemdeki uygulama farklılıklarının çoğu elektroforez esnasında görülür ve uygulanan voltaj, elektroforez zamanı, tampondaki tuz konsantrasyonu ve DNA hasar düzeyi değerlendirmesi ile ilişkilidir. Comet yöntemi, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile çekirdekten salınması prensibine dayanır. Kuyruklu yıldız "comet" oluşum şekillerini değerlendirmek ve tayinini yapmak için pek çok farklı çalışma yapılmaktadır. Değerlendirme tekniklerinin en basiti hasar boyutuna dayalı bir şekilde hücreleri amprik olarak gözle kaydetmektir. Gözlemler için 515-600 nm'lik eksitasyon filtreli epi-floresan mikroskop kullanılır. Hücredeki DNA en basit şekliyle, hasarlı, hasarsız şeklinde görünüşlerine göre değerlendirilebilir. DNA hasarı; DNA göçü, comet kuyruk uzunluğu, comet baş çap, comet alanı, kuyruk momenti olarak da değerlendirilir. Görüntü analizi daha detaylı ve geniş incelemeye otomatik olarak sağlamaktadır (Collins ve diğerleri 1997; Singh ve diğerleri, 1988; Tice, Andrews ve Singh, 1990; Tice ve diğerleri, 2000).

DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan kromozom aberasyonu, MÇ ve kardeş kromatit değişimi gibi klasik sitogenetik yöntemler arasında comet yöntemi en yaygın olarak kullanılan tekniktir. Bu yöntem diğer genotoksisite testlerine kıyasla bazı avantajlara sahiptir; DNA hasarını tek hücre seviyesinde belirleyebilir, örnek başına daha az sayıda hücre gerektirir, tek hücre süspansiyonu halinde elde edildiği sürece herhangi bir hayvan doku hücresi kullanılabilir, çoğalmakta olan veya çoğalmayan herhangi bir hücre kullanılabilir, düşük düzeylerdeki DNA hasarı yüksek hassasiyette belirlenebilir, çok düşük miktarlarda test maddesi gerektirir, çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları, alkali labile bölgeler, tamamlanmamış abazik onarım bölgeleri ve çapraz bağlanmalar gibi çok çeşitli DNA hasar tiplerinin belirlenmesini sağlar, düşük maliyetlidir (Hartmann ve diğerleri, 2003; Speit, Witton-Davies, Heepchantree, Trenz ve Hoffmann, 2003).

Tüm bu önemli, büyük avantajlarının yanı sıra comet yönteminin de bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Yüksek orandaki DNA hasarını ve 50 kb'dan küçük DNA fragmentlerini belirleyememekte, bundan dolayı apoptotik hücrelerin ayırımı zor olmaktadır (Nossoni, 2008).

Comet tekniğinin çeşitli modifikasyonları diğer DNA hasarı tiplerinin belirlenmesini ve ayrıca DNA onarımı oranının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Spesifik DNA onarım

enzimlerini kullanarak, baz hasarı düzeyindeki kırıklara dönüşecek farklı baz değişimleri belirlenebilir. Bu durumda Endo III, Fpg ve AlkA sırasıyla okside pirimidinleri, modifiye purinleri ve alkil purin bazlarını belirlemek için kullanılabilir. Bu modifikasyonlarla birlikte comet tekniği hem oksidatif hem de alkilleyici DNA hasarının belirlenmesi için kullanılabilir. Hücrelerin DNA onarım kapasitesi, hücresel onarım tekniği ile onarım kinetiklerinin takip edilmesi veya spesifik hasarlı hücresel substratlar kullanarak *in vitro* olarak baz ve nükleotid kesip çıkarma onarımının belirlenmesi gibi modifiye comet yöntemleri kullanılarak ölçülebilir. Comet tekniğinin bu çeşitli modifikasyonları, diyetimizde yer alan çeşitli fitokimyasalların kemopreventif potansiyelini belirlemede başarılı bir şekilde kullanılabilir. Diyetle alınan kimyasallar, ökaryotik hücrelerdeki DNA'yı oksidatif ve alkilleyici ajanların etkisinde koruyabilir ve ayrıca DNA onarımını düzenleyebilir. Primer hücre kültürleri, insan hücre hatları, hayvan modelleri ve insan biyoizleme çalışmaları gibi farklı deneysel sistemlerden elde edilen veriler diyetel fitokimyasalların DNA hasarı ve onarımı üzerine etkileri hakkında bilgi sağlamaktadır (Ramos ve diğerleri, 2011).

2.6.4. Mikroçekirdek yöntemi

Genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi de, mikroçekirdek (MÇ) yöntemidir. MÇ yöntemi, hassas ve güvenilir bir yöntem olup kromozom kayıplarının ve kırıklarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Fenech, 2000). MÇ'ler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam bir kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MÇ sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler de kromozom kırıkları oluşturarak MÇ oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Fenech, 2000; Ford, Schultz ve Correll, 1988; Vanderkerken, Vanparys, Verschaeve ve Volders 1989; Vanparys, Vermeiren, Sysmans ve Temmerman, 1990).

MÇ yöntemi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı

sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir yöntem olmuştur (Majer, Laky, Knasmuller ve Kassie, 2001).

Demirel ve Zamani (2002), MÇ yöntemi ve kullanım alanları ile yaptıkları derlemede bu yöntem ile ilgili olarak, 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlandığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar (Heddle ve Countryman, 1976; Högstädt ve Karlsson, 1985; Von Ledebur ve Schmid, 1973) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MÇ'lerin büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MÇ'lerin asentrik kromozomal parçalar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MÇ'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Eastmond ve Tucker (1989) aynı amaçla antikinetokor antikorları kullanarak kinetokor pozitif MÇ'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MÇ'lerin ise asentrik kromozom parçası içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları, klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır.

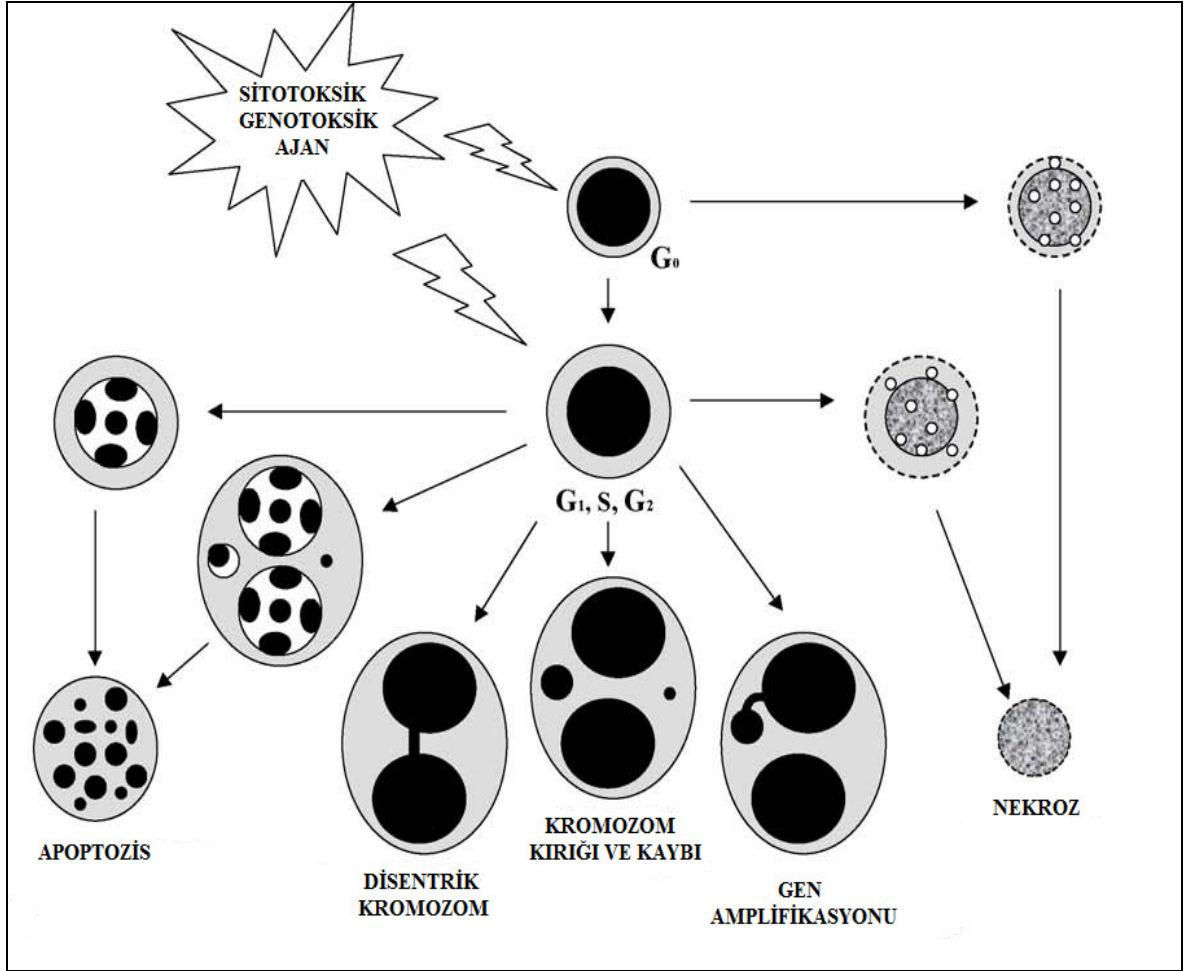
Daha sonraları Fenech ve Morley (1985, 1986) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) yöntemi, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Sitokinezi durdurmak üzere küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılmaktadır (Fenech ve Morley, 1985). Cyt B, aktin polimeraz inhibitörü olan bir maddedir. Bu özelliği ile nükleer bölünmeyi durdurmadan, mitotik sitokinezi yani sitoplazmanın bölünmesini durdurur. Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, sitoplazma bölünmesi (sitokinez) durur ve binükleer hücreler ortaya çıkar. MÇ'ler, spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadır. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya anojenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iç ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara çekilmeyerek, hücre bölünmesi sonunda aynı sitoplazma içinde, hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluşturur (Fenech 2000). Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift

çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MÇ bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir.

MÇ yönteminde insan periferik lenfosit kültürleri sıklıkla kullanılmaktadır. Migliore ve diğerleri (1989), *in vitro* çalışmalarda izole lenfositler yerine, tam kanın kültüre alınmasının daha iyi sonuç sağladığını bildirmişlerdir.

Heddle ve Countryman (1976), MÇ değerlendirmesinde dikkate alınması gereken bazı kriterler belirlemişlerdir. Buna göre değerlendirmede; MÇ çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması; boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması; sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'lerin sayılması esas alınmaktadır.

Günümüzde MÇ metodu, genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplazmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekroz ve apoptozun basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Fenech, 2000, 2006).



Şekil 2.9. Sیتotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikroçekirdek oluşumu (Fenech, 2000)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler

2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS)	Sigma
6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkromon-2-karboksilik asit	Aldrich
Asetik Asit	Sigma
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dulbecco's Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik	Biological Industries
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Sigma
Etidiyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol (Etanol)	Sigma-Aldrich
Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum (Na_2EDTA)	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	Biological Industries
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biological Industries
Fitohemaglutinin-M (PHA-M)	Biological Industries
Formaldehit	Sigma-Aldrich
Formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) Enzimi	Eckert
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) Tableti	Sigma
Giemsa	Merck
Heparin (sodyum tuzu)	Sigma
Hidrojen peroksit (% 35)	Merck
Hidroklorik asit (% 37)	Merck
Histopaque-1077	Sigma

İmmersiyon yağı	Merck
L-Glutamin	Sigma
Metil alkol (Metanol)	Sigma-Aldrich
Nitrik asit (HNO ₃)	Sigma-Aldrich
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
Nötral Kırmızı	Sigma
Penisilin/Streptomisin	PAA
Piknogenol®	Horphag (İsviçre)
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Horasan Kimya
Potasyum Peroksidisulfat	Sigma
Resveratrol	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	Sigma
Rosmarinik asit	Sigma-Aldrich
Sinamik asit	Sigma-Aldrich
Sitokalsin B	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris	Sigma
Vanilik asit	

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

6 ve 96 Kuyucuklu Plaklar	Greiner
Buz Kırma Makinesi	Scotsman
Buzdolabı	Beko
Comet Bilgisayar Yazılımı 3.0	Perceptive Software
Deiyonize Su Cihazı	Barnstead
Derin Dondurucu (-20°C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Distile Su Cihazı	Mes
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P25
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hassas Terazî	Mettler Toledo
Inverted Mikroskop 1X71	Leica
Karbondioksit (CO ₂) İnkübatörü	Heraeus Instruments
Lam (26x76 mm)	Marienfeld
Lamel (24x60 mm)	Marienfeld
Manyetik Karıştırıcı	StuartScientific
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikropipetler	Finnpipette, Biohit,
Mikropipetler	Gilson, Eppendorf
Mikrosantrifüj	Hettich
Otoklav	Rodwell Monarch

pH metre	NEL pH980
pH metre elektrodu	Hanna HI 1131
Santrifüj	Janetzki T30
Sayım lamı (Neubauer)	Marienfeld
Sekiz kanallı mikropipet (50-300 µl)	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Rotina 420R
Spektroflorometre	Spectramax
Steril enjektör (2 ve 10 ml'lik)	Set inject
Steril Kabin	Heraus
Steril pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml'lik)	Greiner Bio-One
Steril Santrifüj Tüpleri	Greiner
Steril Tüpler	Corning
Su Banyosu	Termal Laboratuvar Aletleri
Terazi	Schimadzu Libror
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
UV-VIS Spektrofotometre	Schimadzu
Vorteks	Heidolph Reax 2000
Yatay Çalkalayıcı	Edmund Bühler
Yatay Hücre Kültürü Şişesi	TPP

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. TEAK yönteminde kullanılan çözeltiler

14 mM 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) Çözeltisi

38,6 mg ABTS 5 ml distile suda çözüldü. +4°C'de saklandı.

4.9 mM Potasyum Peroksidisülfat Çözeltisi

6,66 mg potasyum peroksidisülfat 5 ml distile suda çözüldü. +4°C'de saklandı.

2.5 mM 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkromon-2-karboksilik asit (Troloks) Çözeltisi

6,45 mg troloks 10 ml etanolde çözüldü. Çözelti karanlıkta taze hazırlandı. Bu çözeltiden etanol ile gerekli seyreltmeler yapılarak 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 100; 200 ve 400 µM konsantrasyonda troloks çözeltileri hazırlandı.

3.3.2. NKA yönteminde kullanılan çözeltiler

Besi ortamı

500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) üzerine 50 ml (% 10) FBS ve 5 ml (% 1) penisilin/streptomisin eklendi. +4°C'de saklandı.

Fiksasyon (sabitleme) çözeltisi

100 ml etil alkol, 2 ml asetik asit ve 98 ml distile su karıştırılarak hazırlandı. +4°C'de saklandı.

Nötral kırmızı (NK) stok çözeltisi

20 mg NK boyası 5 ml FBS içermeyen besi yeri içerisinde çözüldü. Su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklandı.

Nötral kırmızı (NK) standart çözeltisi

Deney gününden bir gün önce 625 µl NK stok çözeltisi 50 ml FBS içermeyen besi yeri ile karıştırılarak hazırlandı. Membran filtreden süzüldü. 37°C’de 18 saat süreyle inkübe edildi.

3.3.3. Comet yönteminde kullanılan çözeltiler200 mM disodyum etilendiamin tetraasetik asit (Na₂EDTA) çözeltisi

14,89 g Na₂EDTA 200 ml distile suda çözüldü. pH 10’a ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Düşük erime noktalı agar (LMPA) çözeltisi

125 mg LMPA sıcak su banyosu kullanılarak 25 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklandı.

Elektroforez tampon çözeltisi

1705 ml soğuk distile su, 52,8 ml 10 N NaOH ve 8,8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı. Deney günü taze hazırlandı.

Etanol çözeltisi (% 50)

% 99,8’lik mutlak etanol çözeltisinden 150,3 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml’ye tamamlandı.

Etanol çözeltisi (% 75)

% 99,8’lik mutlak etanol çözeltisinden 225,5 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml’ye tamamlandı.

Etidiyum bromür (EtBr) çözeltisi

10 mg EtBr 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden boyama sırasında 1 ml alınıp distile suyla 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Fosfat tamponlu serum fizyolojik çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü. 4°C'de saklandı.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi

% 35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9,7 µl alındı, 990,3 µl distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak 0,1 M H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. 1 hafta süresince 4°C'de saklanabilen çözeltiden deney günü 20 µl alınıp 1980 µl PBS ilave edilerek 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

Normal erime noktalı agar (NMPA) çözeltisi

500 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak 50 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C'de saklandı.

Nötralizasyon tampon çözeltisi

48,5 mg Tris 750 ml distile suda çözülüp çözelti pH'sı 7,5'a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Stok lizis çözeltisi

146,1 NaCl, 37,2 g Na₂EDTA, 1,2 g Tris 500 ml distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenip çözelti pH'sı 10'a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi.

Çözeltinin son hacmi distile su ile 890 ml'ye tamamlanıp maddeler çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Lizis çözeltisi

178 ml stok lizis çözeltisi, 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlandı, kullanılacağı zamana kadar 4°C’de bekletildi ve deney sırasında soğuk çözelti kullanıldı.

3.3.4. MÇ yönteminde kullanılan çözeltiler

Kromozom besi ortamı

500 ml RPMI 1640 üzerine 100 ml FBS, 12,5 ml PHA-M, 10 ml L-Glutamin ve 10 ml penisilin/streptomisin eklendi. Stok besiyeri 15 ml’lik vidalı kapaklı steril tüpler içine 5’er ml paylaştırıldı, -20°C’de saklandı.

Giemsa boyası

11,34 g KH_2PO_4 250 ml distile suda çözülerek tampon A (pH:4,8) ve 7,37 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile suda çözülerek tampon B hazırlandı (pH:9.3). 5 ml tampon A, 5 ml tampon B, 5 ml Giemsa boyası ve 85 ml distile su karıştırılarak % 5’lik Giemsa boyası hazırlandı. Çözeltinin pH değeri 6,8’e ayarlandı.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi

% 35’lik H_2O_2 çözeltisinden 9,7 μl alındı, 990,3 μl distile su ile 1 ml’ye tamamlanarak 0,1 M H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. 1 hafta süresince 4°C’de saklanabilen çözeltilerden deney günü 112 μl alınıp 888 μl su eklenerek 11,2 mM çözelti hazırlandı. 11,2 mM çözeltilerden 50 μl alınarak besi ortamına eklendiğinde, 5600 μl toplam besi ortamı içinde H_2O_2 ’nin son konsantrasyonunun 100 μM olması sağlandı.

Hipotonik potasyum klorür (KCl) çözeltisi

1,397 g potasyum klorür 250 ml suda çözüldü. 4°C’de saklandı.

Nitrik asit (HNO₃) çözeltisi

% 65'lik nitrik asitten 68,75 ml alındı, distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 1N çözelti hazırlandı. Koyu renk şişede, oda sıcaklığında saklandı.

Sabitleme çözeltisi

3:1 oranında metanol-glasiyel asetik asit karışımı taze olarak hazırlandı.

Sitokalsin B (Cyt-B) çözeltisi

5 mg toz halindeki sitokalsin-B 7,375 ml DMSO içinde çözüldü. Küçük hacimler halinde -20°C'de saklandı. Bu stoktan 50 µl besi ortamına eklenerek son konsantrasyonun 6 µg/ml olması sağlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. TEAK yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Bu tez çalışmasında TEAK yöntemi kullanılarak piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asidin antioksidan kapasite tayini gerçekleştirildi. Bu amaçla,

- Troloks, piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asidin 1 mM 10 ml stok çözeltileri hazırlanmış ve her bir madde için bu ana stoklardan etanol ile dilüe edilerek 2-400 µM konsantrasyon serileri hazırlandı.
- 1 ml 14 mM ABTS ve 1 ml 4,9 mM potasyumperoksidisülfat çözeltileri hazırlanarak karıştırıldı ve bu karışım bir gece buzdolabında bekletildi.
- Bu çözelti karışımı çalışmadan hemen önce 734 nm'de UV floresan spektrofotometrede yaklaşık 1,4 absorbans değeri verecek şekilde mutlak etanolle seyreltildi.
- Spektrofotometrede kör olarak mutlak etanolle sıfır ayarı yapıldı.
- 96 kuyucuklu plakalarda tüm kimyasal maddelerin çeşitli konsantrasyonları, eşit miktarlarda ABTS ile birlikte eklendikten sonra karışmaları için 2-3 dakika beklendi.
- 100 µl mutlak etanolle 100 µl dilüe ABTS-potasyumperoksidisülfat karışımının 734 nm'de UV floresan spektrofotometrede absorbans değeri ölçüldü

- 100 µl dilüe ABTS-potasyumperoksidisülfat ile 100 µl 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarda troloks karışımının 734 nm’de UV floresan spektrofotometrede absorbens değeri ölçüldü.
- 100 µl dilüe ABTS-potasyumperoksidisülfat ile 100 µl 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarda piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asit karışımının 734 nm’de UV floresan spektrofotometrede absorbens değeri ölçüldü.
- Tüm uygulamalar 3 kez tekrarlandı. Spektrofotometrede ölçülen absorbens değerleri tüm uygulamalar için ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplandı.
- Troloks çözeltilerinin absorbens değerleri ile piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asit çözeltilerinin verdiği absorbens değerleri ABTS çözeltisi ile kıyaslanarak inhibisyon değerleri belirlendi. İnhibisyon değerlerinin belirlenmesi amacıyla aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{Inhibisyon} = 100 - \left(100 \times \frac{\text{Madde Çözeltisinin Absorbansı}}{\text{ABTS Çözeltisinin Absorbansı}} \right)$$

- Piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin troloks ile eşdeğer olan konsantrasyonlarının oksidan ABTS’ye karşı antioksidan aktiviteleri kıyaslamalı olarak grafik üzerinde gösterildi.

3.4.2. NKA yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi

Piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve trans-sinamik asidin NKA yöntemi ile hücre kültürü ortamında sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için hassas hücreler olan Çin Hamsteri Ovaryum (CHO) hücreleri kullanılmıştır. CHO-K1/An 1 adlı bu hücreler, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türkiye Şap Enstitüsü Müdürlüğü hücre bankasından satın alınmış ve çoğaltılarak deneylerde kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır. Epitelyal hücre benzeri olan ve tek tabaka halinde tutunan CHO hücreleri, her bir çalışma için dondurularak saklanmış olan hücrelerden yeniden çoğaltılarak kullanılmıştır. Hücrelerin ileri alt kültürler olmamasına, çok fazla bölünme geçirmiş yaşlı hücrelerin kullanılmamasına dikkat edilmiştir.

- Çalışma öncesinde 37°C'ye getirilmiş olan su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek hücreler oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra her işlem steril şartlarda ve laminar kabin içerisinde yapıldı.
- Steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atıldı. Bu yıkama aşaması ile saklama ortamındaki DMSO uzaklaştırıldı.
- Kalan hücre pelleti hacimce % 90 Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM), % 10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), % 1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
- Kültür ortamındaki hücrelerin 37°C'ye ayarlanmış % 5 CO₂'li ve nemli etüv içerisinde büyümeleri sağlandı.
- 2-3 günlük bu süre içerisinde hücreler ve besiyeri inverted mikroskopta kontaminasyon durumu ve doygunluğu açısından kontrol edildi.
- Büyümeye bırakılan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları büyüklüğe ulaştıklarında ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 10 ml ılık PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerine 5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletildi, hücreler yapıştıkları yerden kalkana kadar kültür kabının tabanına hafif hafif vuruldu.
- Steril bir tüpe 10 ml besiyeri konularak, tripsin sayesinde zeminden ayrılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eklendi.
- Hücre süspansiyonu 1000 devir/dakika hızda 25°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı çalışma kabini altında uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 10 ml besiyeri ile dikkatlice karıştırıldı.
- Bu aşamada elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 900 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) eklenerek iyice karıştırıldı.
- Neubauer tipi hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerine lamel yerleştirildi ve yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu kapiler etkiyle dolduruldu.
- Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz görüntülü yaşayan hücreler sayıldı.

- Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Yaşayan Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)} = A \times B$$

A: Sayılan yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldığından toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı tespit edilmiştir)

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

- Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan (Sayılan hücre sayısı $\times 10^5$ hücre/ml) sonra hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara besiyeri kullanılarak hücre süspansiyonu seyreltildi.
- 96 kuyucuklu plakalara çoklu pipetler kullanılarak 200 μ l 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. İlk iki sıra kontrol olarak boş bırakıldı, hücreler 3-12. sıralara ekildi.
- Plaka etüve kaldırılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklendi.
- 24 saat sonra yine steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldı.
- Bu esnada steril tüplerde besiyeri içerisinde çalışılması planlanan test çözeltileri hazırlandı. Ana stoktan seyreltmeler yapılarak her biri 5 ml 8 farklı doz hazırlandı ve 200 μ l/ kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklendi.
- 12 sıradan oluşan plate üzerinde ilk iki sıra kontrol ve protein ölçümü standartları için boş bırakıldı, 3. sıra kontrol ve 4. sıra çözücü kontrol olarak eklendikten sonra 5-12. sıralara artan doz serisi olacak şekilde incelenecek bileşiklerden hazırlanan 8 doz eklendi.
- Uygulama konsantrasyonları ile muamele edilen hücreler 18 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- Bir sonraki gün çalışma sırasında kullanılmak üzere nötral kırmızı çözeltisi (100 ml besiyeri+ 1250 μ l Nötral kırmızı stok çözeltisi) hazırlanarak inkübasyona bırakıldı.
- 18 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyeri boşaltıldı. Bir gün önceden hazırlanan nötral kırmızı çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 μ l eklenerek 3 saat daha inkübasyon yapıldı.
- Süre sonunda boya ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 3-4 kez ılık PBS ile yıkandı. Süzgeç kağıdına vurarak plakalar kurutuldu.

- Tüm hücrelere 200 µl % 50 metil alkol, % 1 glasiyel asetik asit ve % 49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklendi.
- Plaka çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile çalkalandı.
- Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları plak okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutuldu.
- Bu deneyin her aşaması, boya ışıktaki bozulduğu için, mümkün olduğunca karanlıkta yapıldı.
- Her bir fenolik bileşik için çalışma farklı zamanlarda en az 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar 3 çalışmanın ortalaması olarak hesaplandı.

3.4.3. Comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin tek hücre jel elektroforezi (comet) yöntemi ile genotoksik ve H₂O₂ tarafından oluşturulan genetik hasara karşı olası antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferik kan lenfosit kültürleri kullanılmıştır. Her bir çalışma için kan; sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan, 23-30 yaşlarında üç bayan donörden temin edilmiştir. Gönüllülerden kan almak amacıyla, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (Ek 1).

- İçinde heparin bulunan steril bir enjektörle alınan kan örneği 1:1 oranında PBS ile seyreltildi.
- Seyreltilmiş kan örneği lenfosit ayırıcı çözelti (Ficoll) eklenerek santrifüj edildi.
- Ficoll üzerinde ince bir tabaka halinde bulunan lenfositler alındı.
- Alınan lenfositler steril tüpe konarak üzerine PBS eklendi, tekrar santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipteki hücreler PBS içinde karıştırılarak homojen bir çözelti elde edildi.
- Hücrelere piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asit için belirlenen konsantrasyonlar eklenerek PBS ile son hacim 1 ml ye tamamlandı.
- İncelenen bileşikler içeren hücre çözeltisi 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Fenolik bileşiklerin antigenotoksik etkilerini incelemek için inkübasyondan sonra hücrelere DNA hasarı oluşturmak üzere, 50 µM H₂O₂ eklenerek 5 dakika buz banyosunda inkübe edildi.

- Hücreler düşük erime ısılı agar ile karıştırılarak daha önceden normal erime ısılı agar ile kaplanmış olan lamlara yayılarak üzerine lamel kapatıldı.
- Lamlar buz üzerinde bekletilerek agarın katılaşması sağlanıp, agar üzerindeki lamel agar tabakası bozulmadan dikkatlice alındı.
- Lamlar daha önceden hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisi içine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
- Lizis işlemi sonrası lamlar elektroforez tankında soğuk elektroforez tamponu içinde 20 dakika bekletildi, takiben 25 V 300 mA akım verilerek 20 dakika elektroforez işlemi uygulandı.
- Elektroforezden sonra lamlar 15 dakika süreyle nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
- Bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
- Lamlar üzerine etidium bromür çözeltisi ilave edilip lamel kapatıldıktan sonra floresan mikroskop altında incelendi.
- Her deneyde örnekler çift olarak çalışıldı ve ayrıca tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak ayrı zamanlarda 3 kez tekrarlandı.
- Her lamda 100 hücre ve ayrı zamanlardaki 3 ayrı tekrarlı çalışma için toplamda 300 hücre comet bilgisayar analiz programı (Comet Analysis Software, version 3.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) ile değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlendi.

3.4.4. MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin MÇ yöntemi ile genotoksik ve H₂O₂ tarafından oluşturulan genetik hasara karşı olası antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferik kan lenfosit kültürleri kullanılmıştır. Her bir çalışma için kan; sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan, 24-30 yaşlarında üç bayan donörden temin edilmiştir. Gönüllülerden kan almak amacıyla, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (Ek 1).

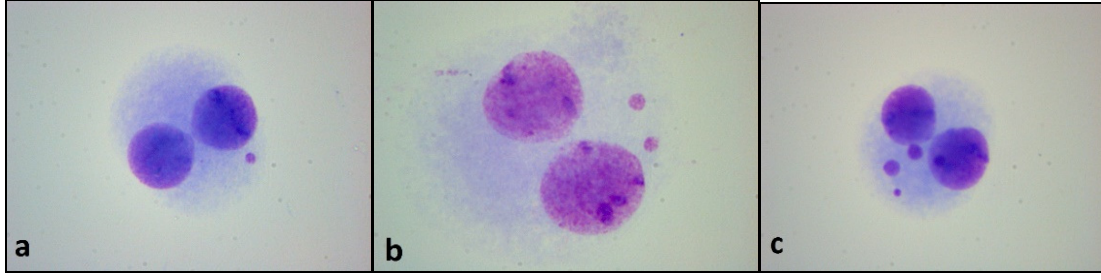
- Donörlerden alınan kan 1/10 oranında heparinize edildi.
- Periferik kanın 0,5 ml'si, içerisinde 5 ml'lik kromozom ortamı bulunan (RPMI 1640+ FCS+ PHA-M+ L-Glutamin+ Penisilin-streptomisin) tüplere ekildi.
- Tüpler 37°C'deki etüve 45° eğik şekilde yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı. Kültürdeki hücrelerin toplam inkübasyon süresi 72 saattir (3 hücre bölünmesi).
- Kültür başlangıcından 24 saat sonra fenolik bileşiklerin belirlenen konsantrasyonları hem tek başına hem de 100 μ M H₂O₂ ile birlikte besiyerine eklendi. Böylece inkübasyon süresince 48 saat kültür ortamında kalmaları sağlandı. Bu esnada negatif kontrol, çözücü kontrol ve 100 μ M H₂O₂ içeren pozitif kontrol kültürleri de hazırlandı.
- Kültür süresince sabah akşam olmak üzere tüpler yavaşça altüst edilerek çalkalandı.
- Kültürün 44. saatinde sitokinezi engellemek için tüm kültürlerle 50 μ l Cytochalasin-B (6 μ g/ml) eklendi. Bu aşamadan sonra kültür tüplerinin ışık alması engellendi.
- 72 saatlik sürenin sonunda inkübasyon sonlandırıldı. Tüpler, 10 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildi, ardından üstte kalan süpernatant bir pastör pipeti yardımıyla dip kısımdaki hücreler kaldırılmadan dikkatlice atıldı.
- Geriye kalan 0,5-0,7 ml'lik kısım vorteks yardımıyla homojenize edildikten sonra, tüplere 4°C'deki 0,075 M KCl hipotonik çözeltisinden 5 ml damla damla ve çok yavaş şekilde vorteks üzerinde karıştırılarak ilave edildi ve sonra buzdolabında 5 dakika bekletildi.
- Tüpler buzdolabından çıkarılarak, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra, tüplere, 5'er ml 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften ilave edildi ve buzdolabında 15 dakika bekletildi.
- Aynı işlem iki kez daha uygulandı ve her fiksatiften sonra tüpler 5 dakika buzdolabında bekletildi.
- 3. Fiksasyon aşamasında sitoplazmanın korunması amacıyla son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde formaldehit ilave edildi.
- Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atıldı, geriye kalan hücre çözeltisi (0,5-0,7 ml) pipetle yavaşça homojenize edildi.
- Önceden 1N HNO₃'de temizlenerek buzdolabında % 70 etil alkolde bekletilmiş ve sonrasında kurulanmış lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla damlatılarak süspansiyonun yayılması sağlandı.
- Preparatlar, kuruması için 24 saat oda sıcaklığında toz olmayacak kapalı bir kap içinde ya da etüvde bırakıldı.

- MÇ'lerin gözlenmesi amacıyla hazırlanmış olan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa (pH: 6,8) boyası ile 12-15 dakika boyandı.
- Boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın akması için üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek yıkandı ve dik bir şekilde kurumaya bırakıldı.
- Tüm bu işlemler farklı donörlerden alınan kanlarla 3 tekrarlı olarak yapıldı. Her bir konsantrasyon için her çalışmadan 1000, toplamda 3000 binükleat hücre MÇ frekansı belirlemek üzere ışık mikroskobunda sayıldı.
- Ayrıca nükleer bölünme indeksi belirlemek amacıyla her konsantrasyon için 3 ayrı kültürden 500 hücre (toplamda 1500 hücre) sayıldı.

MÇ frekansı ve nükleer bölünme indeksinin saptanması

Sitokinezi-blok metodu ile MÇ yönteminde, mitoz geçiren hücrelerde; sitokalsin-B ile sitokinez durdurulur. Böylece çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak ayırt edilebilir. MÇ incelemesi sırasında sitoplazma bölünmesini tamamlayamamış, çift çekirdekli hücreler esas alınır, çünkü bu hücreler, incelenen bileşiklerin eklenmesinden sonra bölünen hücrelerdir. Tek çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler ise incelenen bileşiklerin eklenmesinden kaynaklanmayan, başlangıçta lenfosit hücrelerinde mevcut olan veya spontan oluşan MÇ'lerdir. Vericilere ait her bir preparattan 1000 tane iki çekirdekli hücre, MÇ içerip içermediği yönünden incelenir.

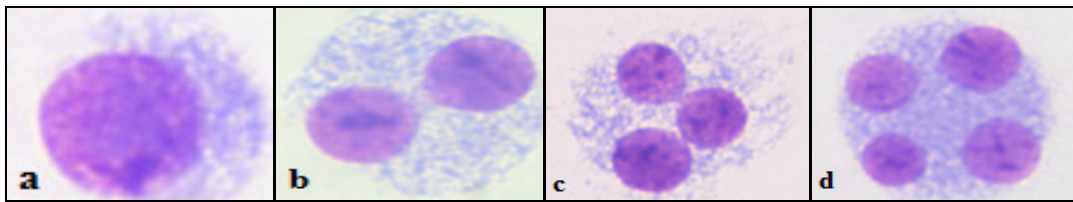
Heddle ve Countryman'ın kriterlerine göre; MÇ boyutu çekirdeğin % 20'sinden fazla, % 5'inden az olmamalıdır, MÇ boya alma yoğunluğu esas çekirdek ile aynı olmalıdır, sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler sayılmalıdır. MÇ frekansı $[1 \times (1\text{MÇ}) + 2 \times (2\text{MÇ}) + 3 \times (3\text{MÇ})] / n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MÇ sayısı (MÇ/hücre) olarak belirlenir.



Resim 3.1. Mikoroçekirdek içeren insan lenfositlerinin mikroskop görüntüsü
a) bir mikoroçekirdek, b) iki mikoroçekirdek, c) üç mikoroçekirdek (100x)

MÇ yönteminde kullanılan sitokalsin-B hücre bölünmesini durdururken nükleer bölünme üzerine etki etmediği bilinmektedir. Böylece sitokinezi bloke edilmiş olan hücreler içerdikleri çekirdek sayısına göre değerlendirilerek nükleer bölünme indeksi (NBİ) hesaplanabilmektedir. Bir kez bölünen hücreler iki çekirdeğe, iki kez bölünen hücreler ise üç veya dört çekirdeğe sahiptir. Fitohemaglütinin (PHA) uyarısına cevap veren ancak bölünmesini tamamlamamış olan hücrelerde ise yalnızca bir çekirdek bulunmaktadır (Fimognari, Berti, Iori, Cantelli-Forti ve Hrelia, 2005).

Nükleer bölünme indeksi hesaplamalarında tüm hücreler sayılır. Hiç bölünme geçirmemiş tek çekirdek bulunan hücreler N1, iki çekirdek bulunan hücreler N2, üç çekirdek bulunan hücreler N3, dört veya daha fazla çekirdek bulunan hücreler ise N4 olarak belirlenir. $[1 \times (N_1) + 2 \times (N_2) + 3 \times (N_3 + N_4)] / n$ (n=incelenen toplam hücre) formülü ile nükleer bölünme indeksi hesaplanır.



Resim 3.2. Bir (a), iki (b), üç (c) ve dört (d) çekirdekli lenfositlerin mikroskop görüntüsü.

MÇ yönteminde fenolik bileşiklerin çeşitli konsantrasyonları için hazırlanan lamlardan ışık mikroskobu altında sayımlar yapılmıştır. Her uygulama için 1000 çift çekirdekli hücre, 3 ayrı dönörden yapılan tekrarlı çalışmalarda toplam 3000 hücre MÇ içerip içermediği yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca her bir çalışmada 500 hücre, toplamda 1500 hücre de çekirdek sayısına göre sayılarak NBİ hesaplanmıştır.

3.2.5. İstatistiksel yöntemler

Bu tez çalışmasında TEAK yönteminde, her bir fenolik bileşiğin belli konsantrasyonun ABTS ile karıştırıldığında indirgeme sonucu verdiği absorbans değerleri, antioksidan bir madde olan troloksun aynı konsantrasyonlarda ABTS ile verdiği absorbans değerleri ile istatistiksel olarak SPSS 15.0 bilgisayar programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Tek hücre jel elektroforez yönteminde, tüm veriler SPSS 15.0 bilgisayar programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD testi kullanılarak değerlendirilmiş, uygulama grupları kontrol ve pozitif kontrol ile karşılaştırılarak istatistiksel anlamlılıkları belirlenmiştir.

MÇ yönteminde elde edilen veriler negatif kontrol, çözücü kontrol ve pozitif kontrol (H_2O_2) ile z testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fenolik Bileşiklerin TEAK Yöntemi ile Belirlenen Antioksidan Kapasitelerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.1.1. Piknogenolün TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Piknogenolün 2- 200 μM konsantrasyon aralığındaki 9 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200 μM), oksidan olan ABTS çözeltisine karşı antioksidan aktivitesi incelenmiş ve antioksidan etkisi eşdeğer konsantrasyonlardaki troloksun antioksidan aktivitesi ile kıyaslanmıştır. 2 μM ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda piknogenol, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0.05$). (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

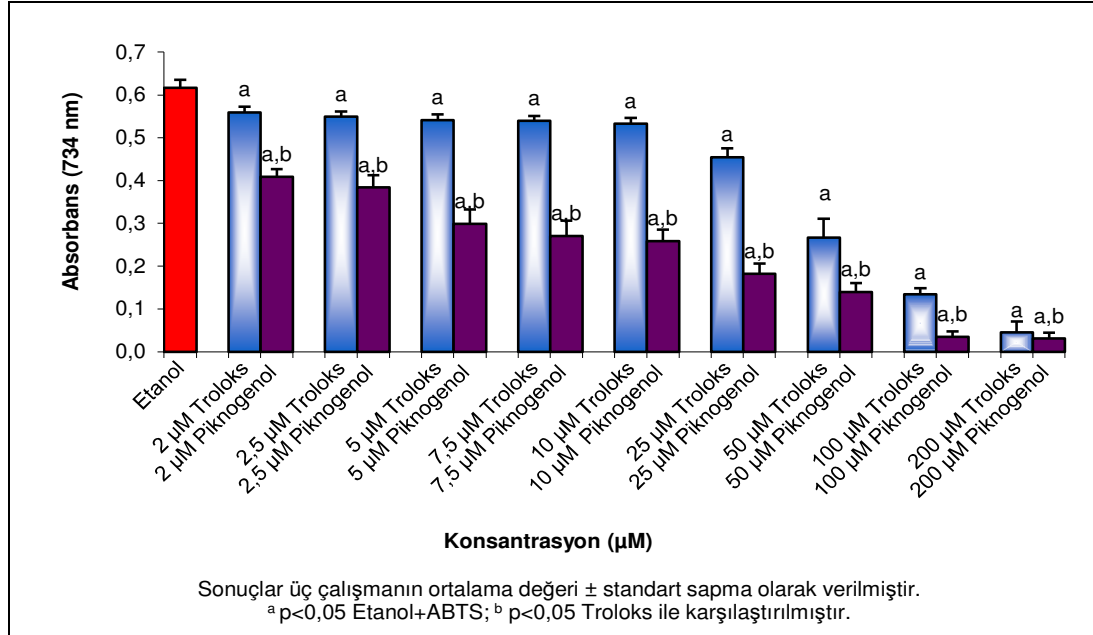
Çizelge 4.1. TEAK yöntemine göre troloks ve piknogenolün antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular *

		Çözeltilerin Verdiği Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)
1	Etanol+ABTS	0,616 $\pm$ 0,019
2	2 μM Troloks+ABTS	0,560 $\pm$ 0,013 ^a
2	2 μM Piknogenol+ABTS	0,408 $\pm$ 0,019 ^{a,b}
3	2,5 μM Troloks+ABTS	0,549 $\pm$ 0,012 ^a
3	2,5 μM Piknogenol+ABTS	0,384 $\pm$ 0,029 ^{a,b}
4	5 μM Troloks+ABTS	0,542 $\pm$ 0,012 ^a
4	5 μM Piknogenol+ABTS	0,299 $\pm$ 0,034 ^{a,b}
5	7,5 μM Troloks+ABTS	0,539 $\pm$ 0,011 ^a
5	7,5 μM Piknogenol+ABTS	0,270 $\pm$ 0,036 ^{a,b}
6	10 μM Troloks+ABTS	0,533 $\pm$ 0,013 ^a
6	10 μM Piknogenol+ABTS	0,258 $\pm$ 0,027 ^{a,b}
7	25 μM Troloks+ABTS	0,454 $\pm$ 0,021 ^a
7	25 μM Piknogenol+ABTS	0,182 $\pm$ 0,024 ^{a,b}
8	50 μM Troloks+ABTS	0,267 $\pm$ 0,045 ^a
8	50 μM Piknogenol+ABTS	0,139 $\pm$ 0,022 ^{a,b}
9	100 μM Troloks+ABTS	0,134 $\pm$ 0,014 ^a
9	100 μM Piknogenol+ABTS	0,034 $\pm$ 0,013 ^{a,b}
10	200 μM Troloks+ABTS	0,045 $\pm$ 0,025 ^a
10	200 μM Piknogenol+ABTS	0,031 $\pm$ 0,014 ^{a,b}

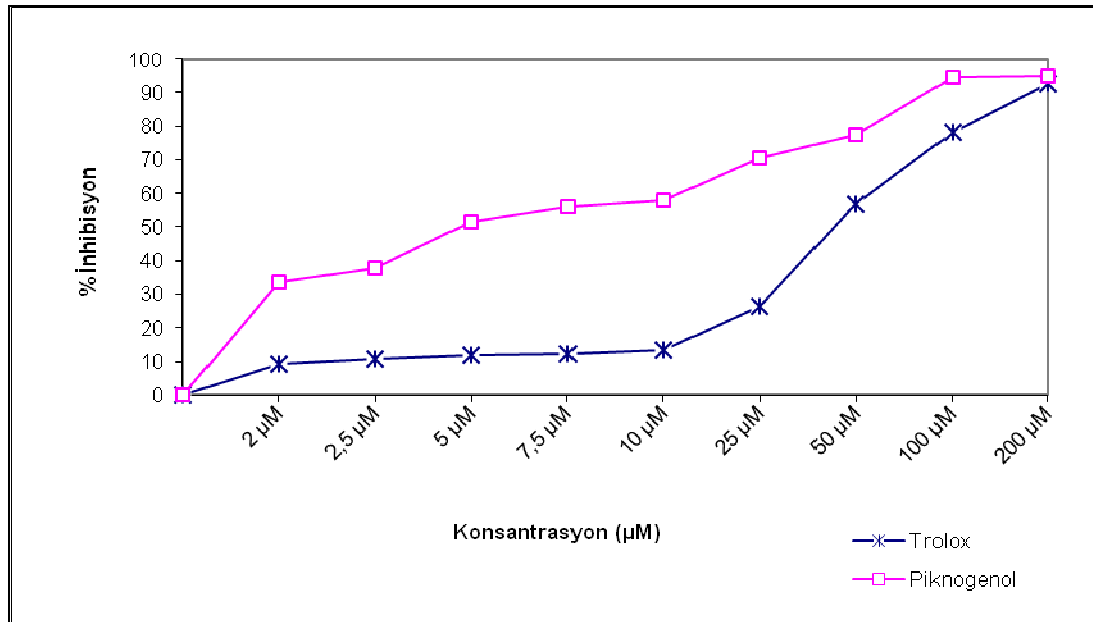
*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,05$ Etanol+ABTS; ^b $p<0,05$ Troloks ile karşılaştırılmıştır.

Piknogenolün çalışılan tüm konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin, eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.1. TEAK yöntemine göre troloks ve piknogenolün antioksidan kapasiteleri



Şekil 4.2. TEAK yöntemine göre troloks ve piknogenolün ABTS radikalının oksidasyonuna etkileri

4.1.2. Resveratrolün TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

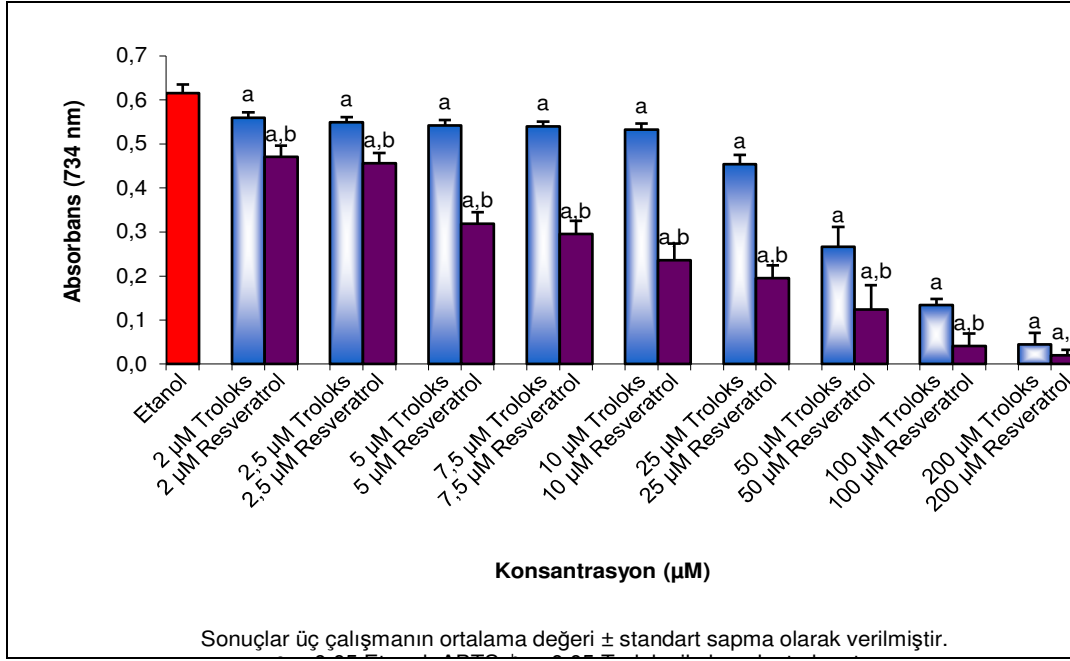
Resveratrolün 2- 200 μ M konsantrasyon aralığındaki 9 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200 μ M), oksidan olan ABTS çözeltisine karşı antioksidan aktivitesi incelenmiş ve resveratrolün antioksidan etkisi, eşdeğer konsantrasyonlardaki troloksun antioksidan aktivitesi ile kıyaslanmıştır. 2 μ M ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda resveratrol, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0,05$). Resveratrolün antioksidan aktivitesinin, tüm konsantrasyonlarda eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu da saptanmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.2. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular*

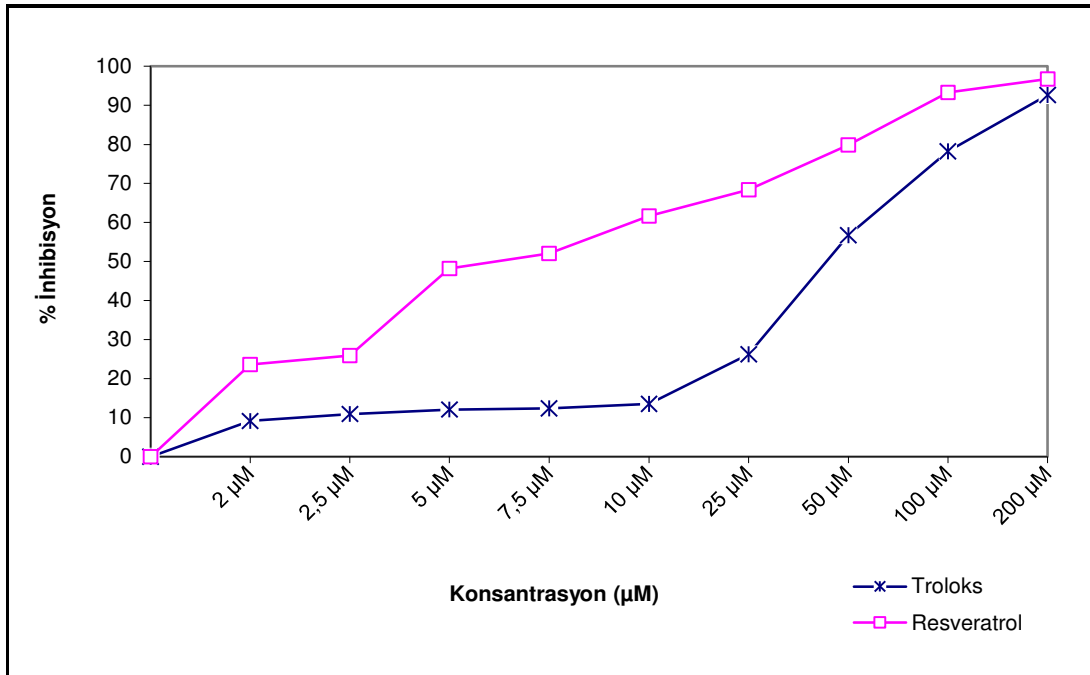
		Çözeltilerin Verdiği Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)
1	Etanol+ABTS	0,616 $\pm$ 0,019
2	2 μ M Troloks+ABTS	0,560 $\pm$ 0,013 ^a
2	2 μ M Resveratrol+ABTS	0,470 $\pm$ 0,025 ^{a,b}
3	2,5 μ M Troloks+ABTS	0,549 $\pm$ 0,012 ^a
3	2,5 μ M Resveratrol+ABTS	0,457 $\pm$ 0,023 ^{a,b}
4	5 μ M Troloks+ABTS	0,542 $\pm$ 0,012 ^a
4	5 μ M Resveratrol+ABTS	0,319 $\pm$ 0,026 ^{a,b}
5	7,5 μ M Troloks+ABTS	0,539 $\pm$ 0,011 ^a
5	7,5 μ M Resveratrol+ABTS	0,295 $\pm$ 0,030 ^{a,b}
6	10 μ M Troloks+ABTS	0,533 $\pm$ 0,013 ^a
6	10 μ M Resveratrol+ABTS	0,236 $\pm$ 0,038 ^{a,b}
7	25 μ M Troloks+ABTS	0,454 $\pm$ 0,021 ^a
7	25 μ M Resveratrol+ABTS	0,195 $\pm$ 0,030 ^{a,b}
8	50 μ M Troloks+ABTS	0,267 $\pm$ 0,045 ^a
8	50 μ M Resveratrol+ABTS	0,124 $\pm$ 0,055 ^{a,b}
9	100 μ M Troloks+ABTS	0,134 $\pm$ 0,014 ^a
9	100 μ M Resveratrol+ABTS	0,041 $\pm$ 0,028 ^{a,b}
10	200 μ M Troloks+ABTS	0,045 $\pm$ 0,025 ^a
10	200 μ M Resveratrol+ABTS	0,020 $\pm$ 0,012 ^{a,b}

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0.05$ Etanol+ABTS; ^b $p<0.05$ Troloks ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.3. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün antioksidan kapasiteleri



Şekil 4.4. TEAK yöntemine göre troloks ve resveratrolün ABTS radikalının oksidasyonuna etkileri

4.1.3. Rosmarinik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

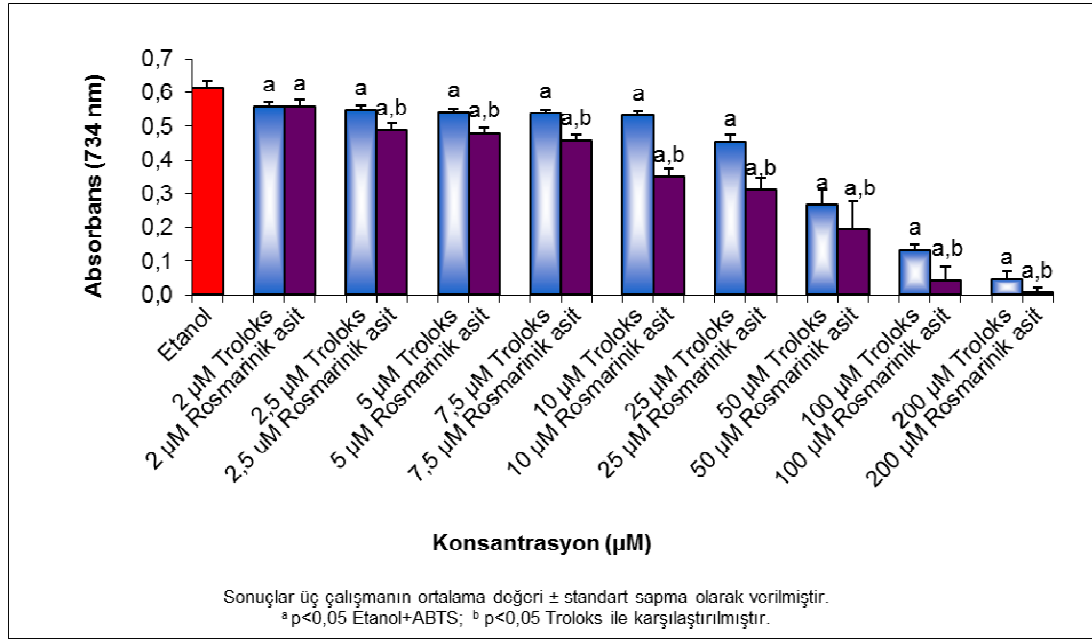
Rosmarinik asidin 2- 200 μ M konsantrasyon aralığındaki 9 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200 μ M), oksidan olan ABTS çözeltisine karşı antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca rosmarinik asidin antioksidan etkisi, eşdeğer konsantrasyonlardaki troloksun antioksidan aktivitesi ile kıyaslanmıştır. 2 μ M ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda rosmarinik asit, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0,05$). Rosmarinik asidin antioksidan aktivitesinin, 2 μ M konsantrasyon harici tüm konsantrasyonlarda eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu da saptanmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.3, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asidin antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular*

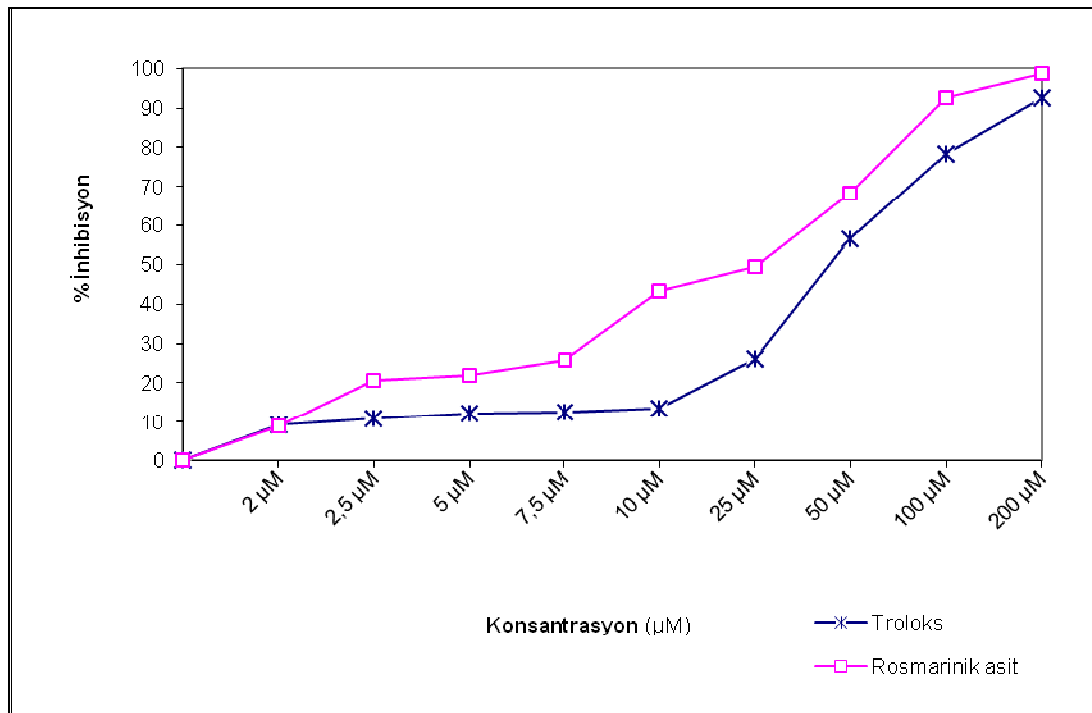
		Çözeltilerin Verdiği Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$standart sapma)
1	Etanol+ABTS	0,616 $\pm$ 0,019
2	2 μ M Troloks+ABTS	0,560 $\pm$ 0,013 ^a
2	2 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,561 $\pm$ 0,017 ^a
3	2,5 μ M Troloks+ABTS	0,549 $\pm$ 0,012 ^a
3	2,5 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,490 $\pm$ 0,019 ^{a,b}
4	5 μ M Troloks+ABTS	0,542 $\pm$ 0,012 ^a
4	5 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,481 $\pm$ 0,015 ^{a,b}
5	7,5 μ M Troloks+ABTS	0,539 $\pm$ 0,011 ^a
5	7,5 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,458 $\pm$ 0,020 ^{a,b}
6	10 μ M Troloks+ABTS	0,533 $\pm$ 0,013 ^a
6	10 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,350 $\pm$ 0,026 ^{a,b}
7	25 μ M Troloks+ABTS	0,454 $\pm$ 0,021 ^a
7	25 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,311 $\pm$ 0,036 ^{a,b}
8	50 μ M Troloks+ABTS	0,267 $\pm$ 0,045 ^a
8	50 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,195 $\pm$ 0,083 ^{a,b}
9	100 μ M Troloks+ABTS	0,134 $\pm$ 0,014 ^a
9	100 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,045 $\pm$ 0,037 ^{a,b}
10	200 μ M Troloks+ABTS	0,045 $\pm$ 0,025 ^a
10	200 μ M Rosmarinik asit+ABTS	0,007 $\pm$ 0,014 ^{a,b}

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,05$ Etanol+ABTS; ^b $p<0,05$ Troloks ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.5. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asidin antioksidan kapasiteleri



Şekil 4.6. TEAK yöntemine göre troloks ve rosmarinik asidin ABTS radikalının oksidasyonuna etkileri

4.1.4. Vanilik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

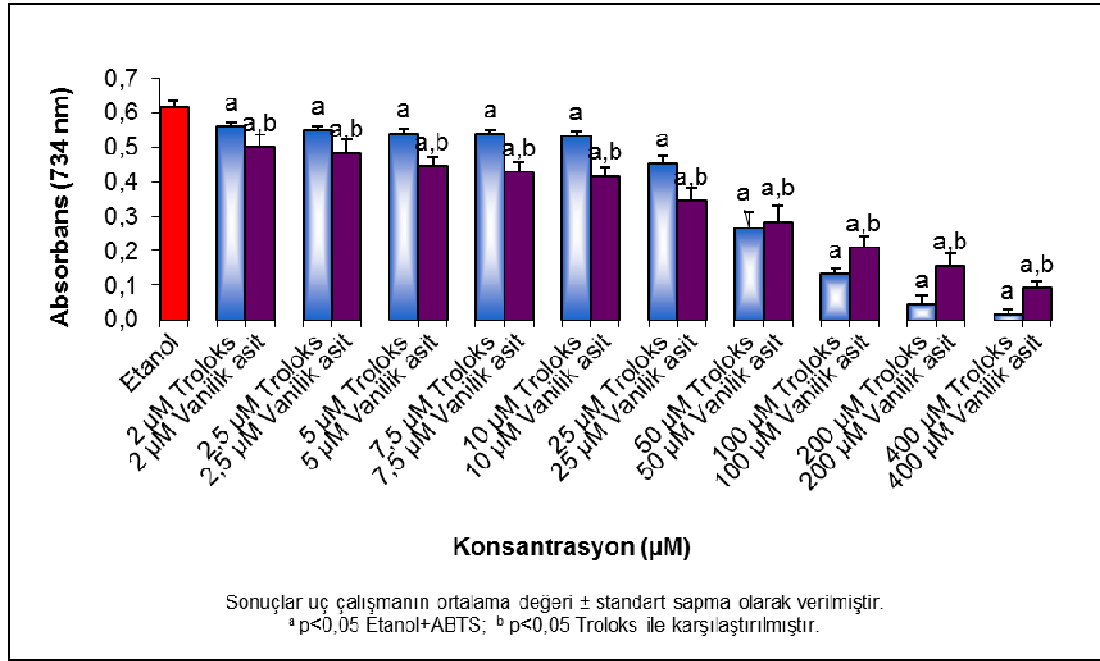
Vanilik asidin 2- 400 μM konsantrasyon aralığındaki 10 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 μM), oksidan olan ABTS çözeltisine karşı antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca vanilik asidin antioksidan etkisi, eşdeğer konsantrasyonlardaki troloksun antioksidan aktivitesi ile kıyaslanmıştır. 2 μM ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda vanilik asit, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p < 0,05$). Vanilik asidin düşük konsantrasyonlarda (2-25 μM) antioksidan aktivitesinin eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu, ancak vanilik asidin yüksek konsantrasyonlarda (50-400 μM) troloksa göre daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$) (Çizelge 4.4, 4.7 ve Şekil 4.8).

Çizelge 4.4. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidin antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular. *

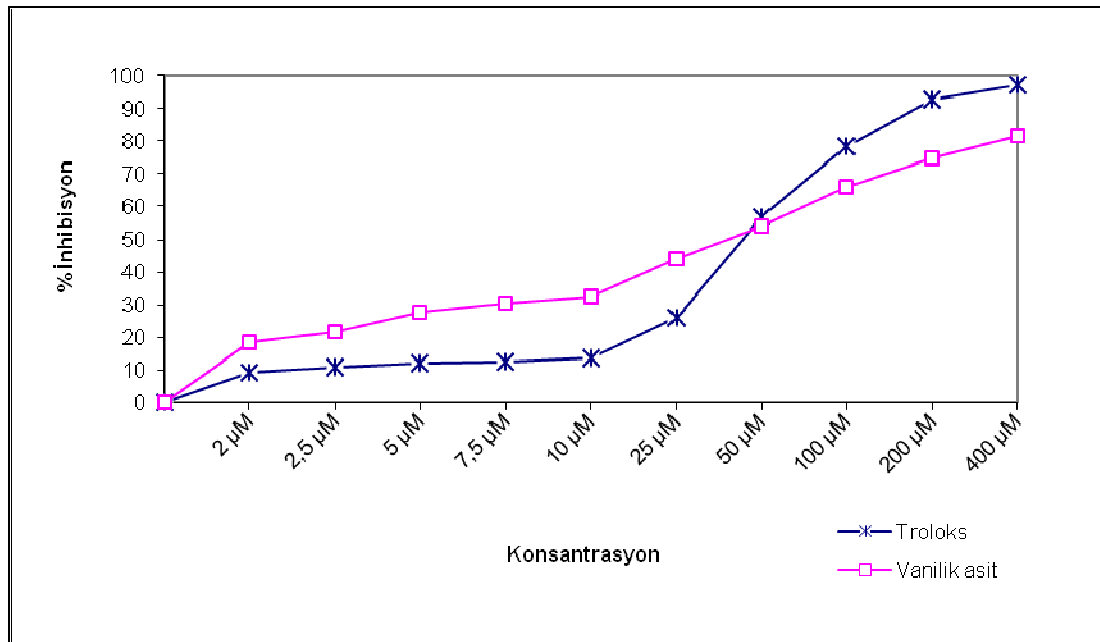
		Çözeltilerin Verdiği Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)
1	Etanol+ABTS	0,616 $\pm$ 0,019
2	2 μM Troloks+ABTS	0,560 $\pm$ 0,013 ^a
2	2 μM Vanilik asit+ABTS	0,501 $\pm$ 0,034 ^{a,b}
3	2,5 μM Troloks+ABTS	0,549 $\pm$ 0,012 ^a
3	2,5 μM Vanilik asit+ABTS	0,483 $\pm$ 0,039 ^{a,b}
4	5 μM Troloks+ABTS	0,542 $\pm$ 0,012 ^a
4	5 μM Vanilik asit+ABTS	0,446 $\pm$ 0,025 ^{a,b}
5	7,5 μM Troloks+ABTS	0,539 $\pm$ 0,011 ^a
5	7,5 μM Vanilik asit+ABTS	0,428 $\pm$ 0,028 ^{a,b}
6	10 μM Troloks+ABTS	0,533 $\pm$ 0,013 ^a
6	10 μM Vanilik asit+ABTS	0,416 $\pm$ 0,027 ^{a,b}
7	25 μM Troloks+ABTS	0,454 $\pm$ 0,021 ^a
7	25 μM Vanilik asit+ABTS	0,344 $\pm$ 0,041 ^{a,b}
8	50 μM Troloks+ABTS	0,267 $\pm$ 0,045 ^a
8	50 μM Vanilik asit+ABTS	0,283 $\pm$ 0,048 ^{a,b}
9	100 μM Troloks+ABTS	0,134 $\pm$ 0,014 ^a
9	100 μM Vanilik asit+ABTS	0,210 $\pm$ 0,033 ^{a,b}
10	200 μM Troloks+ABTS	0,045 $\pm$ 0,025 ^a
10	200 μM Vanilik asit+ABTS	0,156 $\pm$ 0,037 ^{a,b}
11	400 μM Troloks+ABTS	0,016 $\pm$ 0,016 ^a
11	400 μM Vanilik asit+ABTS	0,092 $\pm$ 0,021 ^{a,b}

*Soniclar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p < 0,05$ Etanol+ABTS; ^b $p < 0,05$ Troloks ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.7. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidin antioksidan kapasiteleri



Şekil 4.8. TEAK yöntemine göre troloks ve vanilik asidin ABTS radikalının oksidasyonuna etkileri

4.1.5. Sinnamik asidin TEAK yöntemi ile antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

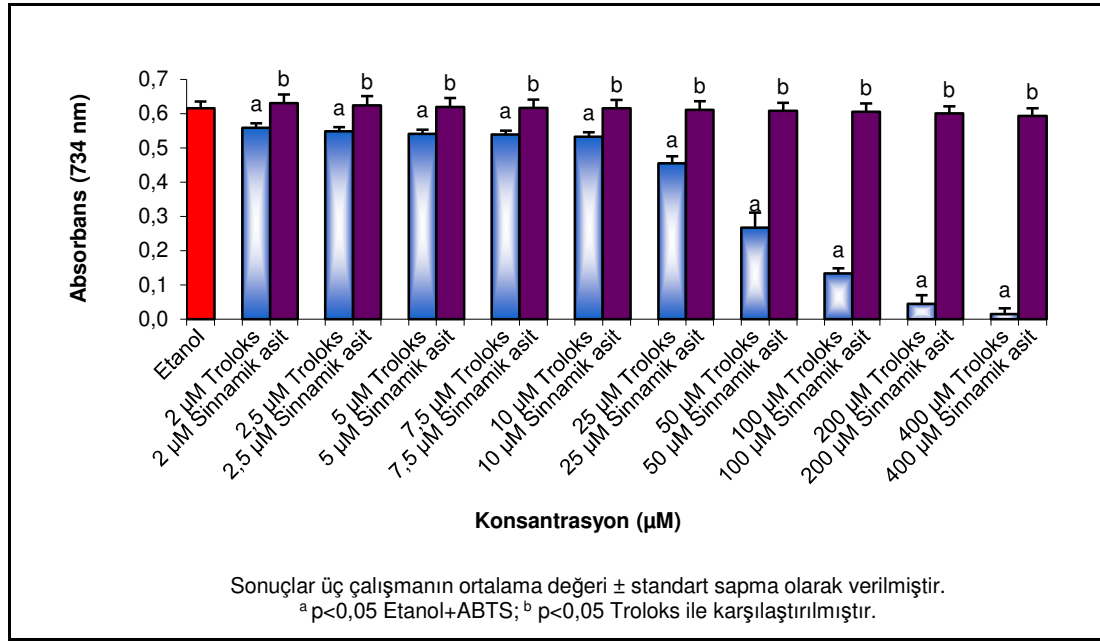
Sinnamik asidin 2- 400 μM konsantrasyon aralığındaki 10 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 μM), oksidan olan ABTS çözeltisine karşı antioksidan aktivitesi incelenmiş ve antioksidan etkisi, eşdeğer konsantrasyonlardaki troloksun antioksidan aktivitesi ile kıyaslanmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda sinnamik asidin oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

Çizelge 4.5. TEAK yöntemine göre troloks ve sinnamik asidin antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular. *

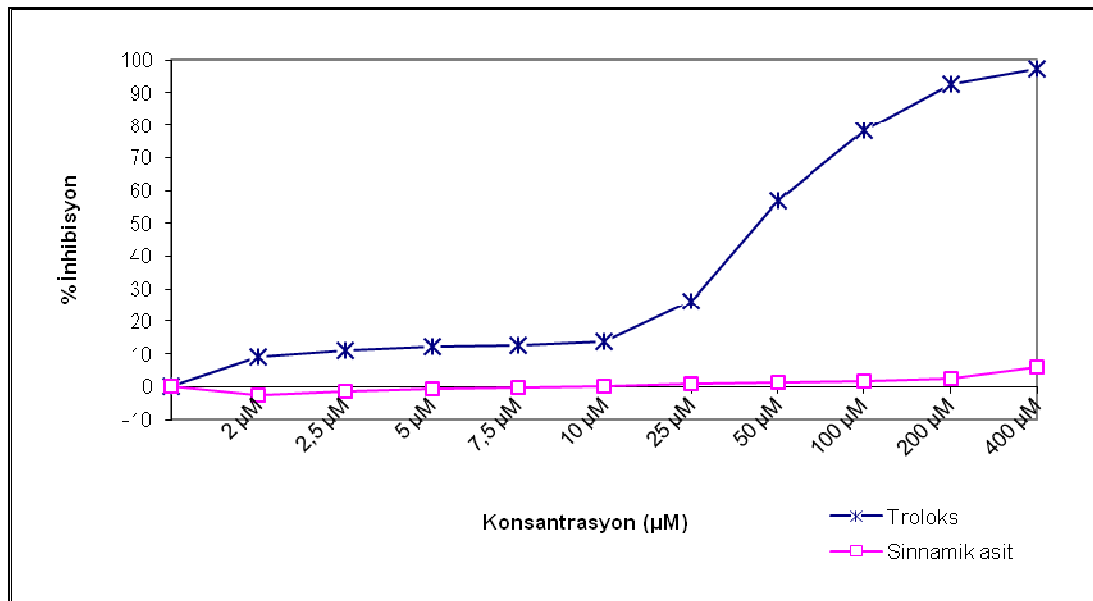
		Çözeltilerin Verdiği Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)
1	Etanol+ABTS	0,616 $\pm$ 0,019
2	2 μM Troloks+ABTS	0,560 $\pm$ 0,013 ^a
2	2 μM Sinnamik asit+ABTS	0,631 $\pm$ 0,025 ^b
3	2,5 μM Troloks+ABTS	0,549 $\pm$ 0,012 ^a
3	2,5 μM Sinnamik asit+ABTS	0,625 $\pm$ 0,027 ^b
4	5 μM Troloks+ABTS	0,542 $\pm$ 0,012 ^a
4	5 μM Sinnamik asit+ABTS	0,620 $\pm$ 0,025 ^b
5	7,5 μM Troloks+ABTS	0,539 $\pm$ 0,011 ^a
5	7,5 μM Sinnamik asit+ABTS	0,617 $\pm$ 0,024 ^b
6	10 μM Troloks+ABTS	0,533 $\pm$ 0,013 ^a
6	10 μM Sinnamik asit+ABTS	0,616 $\pm$ 0,024 ^b
7	25 μM Troloks+ABTS	0,454 $\pm$ 0,021 ^a
7	25 μM Sinnamik asit+ABTS	0,612 $\pm$ 0,025 ^b
8	50 μM Troloks+ABTS	0,267 $\pm$ 0,045 ^a
8	50 μM Sinnamik asit+ABTS	0,609 $\pm$ 0,024 ^b
9	100 μM Troloks+ABTS	0,134 $\pm$ 0,014 ^a
9	100 μM Sinnamik asit+ABTS	0,606 $\pm$ 0,024 ^b
10	200 μM Troloks+ABTS	0,045 $\pm$ 0,025 ^a
10	200 μM Sinnamik asit+ABTS	0,601 $\pm$ 0,021 ^b
11	400 μM Troloks+ABTS	0,016 $\pm$ 0,016 ^a
11	400 μM Sinnamik asit+ABTS	0,593 $\pm$ 0,023 ^b

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p < 0,05$ Etanol+ABTS; ^b $p < 0,05$ Troloks ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.9. TEAK yöntemine göre troloks ve sinamik asidin antioksidan kapasiteleri



Şekil 4.10. TEAK yöntemine göre troloks ve sinamik asidin ABTS radikalinin oksidasyonuna etkileri

Piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin TEAK yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitelerini kendi aralarında değerlendirdiğimizde antioksidan aktivite sıralaması, genel olarak piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit ve vanilik asit şeklindedir. Sinnamik asit çalışılan konsantrasyonlarda, oksidan özellikteki ABTS radikale karşı antioksidan aktiviteye sahip değildir. Veriler kıyaslandığında piknogenol ve resveratrolün antioksidan kapasitelerinin birbirine yakın olduğu söylenebilir. Özellikle düşük konsantrasyonları olmak üzere bazı konsantrasyonlarda (2, 2.5, 5, 7.5, 25, 100 μM) piknogenolün antioksidan kapasitesi resveratrole göre daha yüksek iken, bazı konsantrasyonlarda (10, 50, 200 μM) ise resveratrolün antioksidan kapasitesi piknogenole göre daha yüksektir. Rosmarinik asit ise çalışılan en yüksek konsantrasyonunda (200 μM) piknogenol ve resveratrol'den daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir.

4.2. Fenolik Bileşiklerin NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

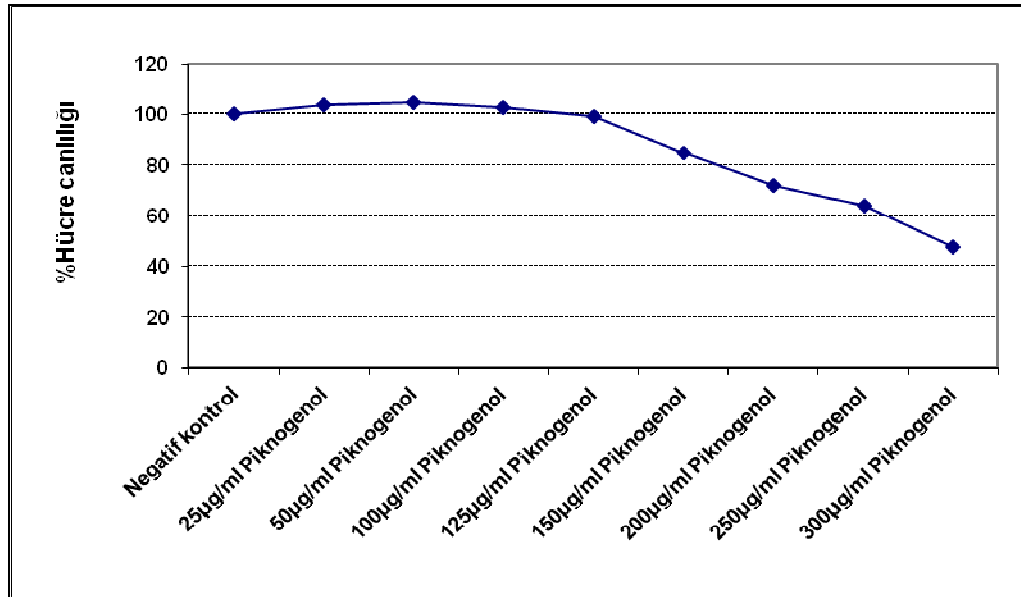
4.2.1. Piknogenolün NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Piknogenolün 8 farklı konsantrasyonunun (25, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/ml}$) CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. NKA deneyi sonuçlarına göre; piknogenol 25-125 $\mu\text{g/ml}$ uygulama konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermemiş ancak 150 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundan itibaren sitotoksik etki başlamıştır. 300 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda ise hücre canlılığı % 50'nin altına düşmüştür (Çizelge 4.6, Şekil 4.11). Piknogenolün CHO hücrelerinde IC_{50} değeri 285 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. NKA yöntemine göre piknogenolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi *

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
1	(-) Kontrol	0,425 $\pm$ 0,017	100
2	25 μ g/ml Piknogenol	0,441 $\pm$ 0,028	103,7
3	50 μ g/ml Piknogenol	0,445 $\pm$ 0,012	104,7
4	100 μ g/ml Piknogenol	0,437 $\pm$ 0,029	102,9
5	125 μ g/ml Piknogenol	0,422 $\pm$ 0,015	99,3
6	150 μ g/ml Piknogenol	0,362 $\pm$ 0,031	85,1
7	200 μ g/ml Piknogenol	0,306 $\pm$ 0,026	71,9
8	250 μ g/ml Piknogenol	0,271 $\pm$ 0,023	63,8
9	300 μ g/ml Piknogenol	0,202 $\pm$ 0,021	47,5

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.11. NKA yöntemine göre piknogenolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi

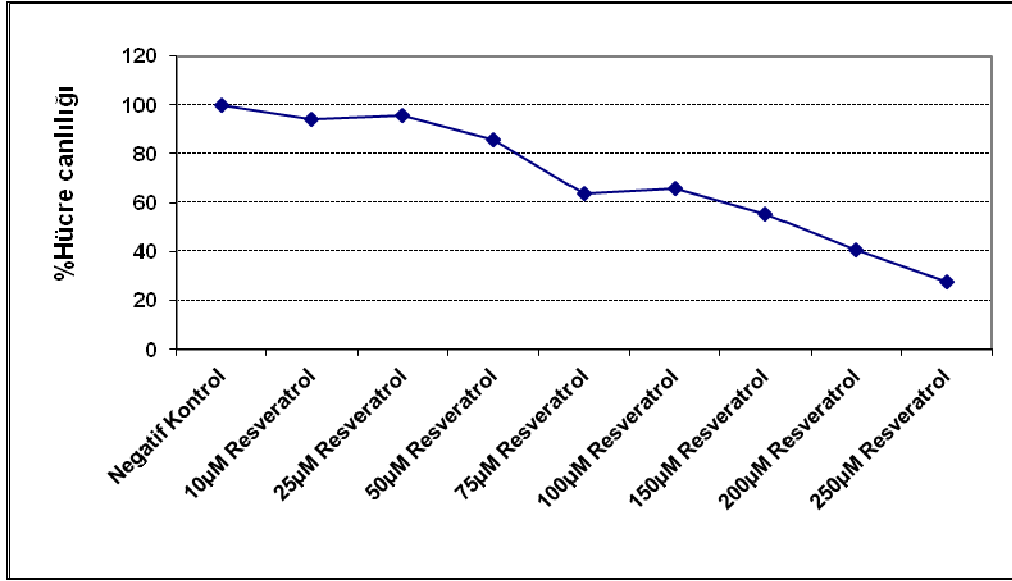
4.2.2. Resveratrolün NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Resveratrolün 8 farklı konsantrasyonunun (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 μ M) CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirildiğinde 10 ve 25 μ M'lık konsantrasyonlarında hücre canlılığında bir değişme gözlenmezken, 50 μ M konsantrasyondan itibaren sitotoksik etki başlamış ve 150 μ M konsantrasyondan sonra hücre canlılığı hızlı bir şekilde düşmüştür. 200 μ M ve üzeri konsantrasyonda ise hücre canlılığı % 50'nin altına düşmüştür (Çizelge 4.7, Şekil 4.12). Resveratrolün CHO hücrelerinde IC₅₀ değeri 165 μ M olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7. NKA yöntemine göre resveratrolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi *

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
1	(-) Kontrol (% 1 DMSO)	0,476 $\pm$ 0,014	100
2	10 μ M Resveratrol	0,447 $\pm$ 0,012	93,86
3	25 μ M Resveratrol	0,457 $\pm$ 0,020	95,91
4	50 μ M Resveratrol	0,409 $\pm$ 0,015	85,89
5	75 μ M Resveratrol	0,302 $\pm$ 0,027	63,49
6	100 μ M Resveratrol	0,312 $\pm$ 0,010	65,58
7	150 μ M Resveratrol	0,263 $\pm$ 0,018	55,31
8	200 μ M Resveratrol	0,194 $\pm$ 0,013	40,78
9	250 μ M Resveratrol	0,131 $\pm$ 0,024	27,44

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.12. NKA yöntemine göre resveratrolün CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi

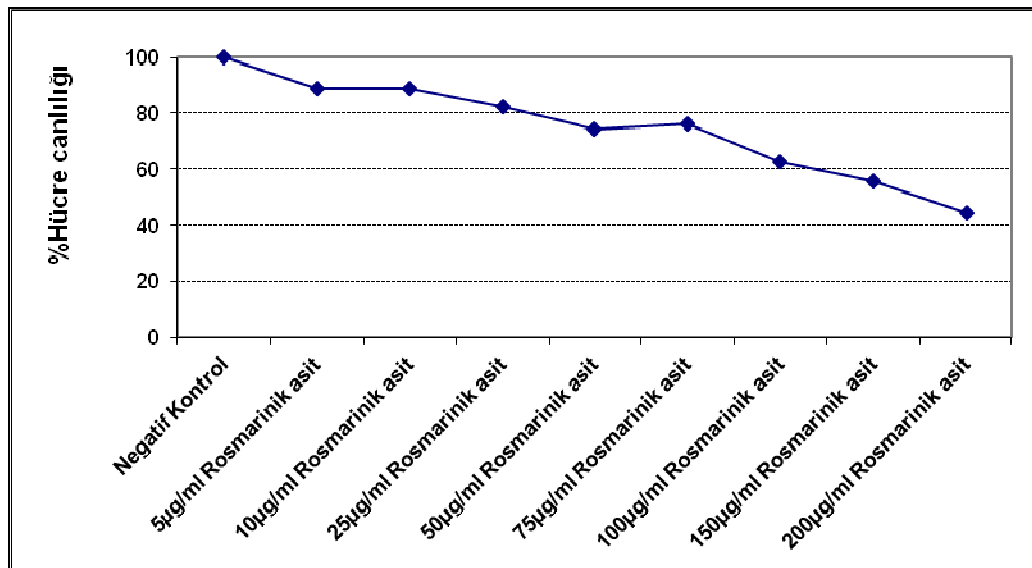
4.2.3. Rosmarinik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Rosmarinik asidin 8 farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/ml) CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, rosmarinik asidin uygulamasında 50-150 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve 200µg/ml konsantrasyonda % 50'nin altına düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.13). Rosmarinik asidin CHO hücrelerindeki IC₅₀ 167 µg/ml değeri olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.8. NKA yöntemine göre rosmarinik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi *

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
1	(-) Kontrol (%1 DMSO)	0,489 $\pm$ 0,011	100
2	5 μ g/ml Rosmarinik asit	0,435 $\pm$ 0,023	89,01
3	10 μ g/ml Rosmarinik asit	0,434 $\pm$ 0,016	88,67
4	25 μ g/ml Rosmarinik asit	0,402 $\pm$ 0,007	82,26
5	50 μ g/ml Rosmarinik asit	0,364 $\pm$ 0,021	74,53
6	75 μ g/ml Rosmarinik asit	0,373 $\pm$ 0,019	76,18
7	100 μ g/ml Rosmarinik asit	0,307 $\pm$ 0,015	62,75
8	150 μ g/ml Rosmarinik asit	0,272 $\pm$ 0,018	55,55
9	200 μ g/ml Rosmarinik asit	0,218 $\pm$ 0,013	44,63

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.13. NKA yöntemine göre rosmarinik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi

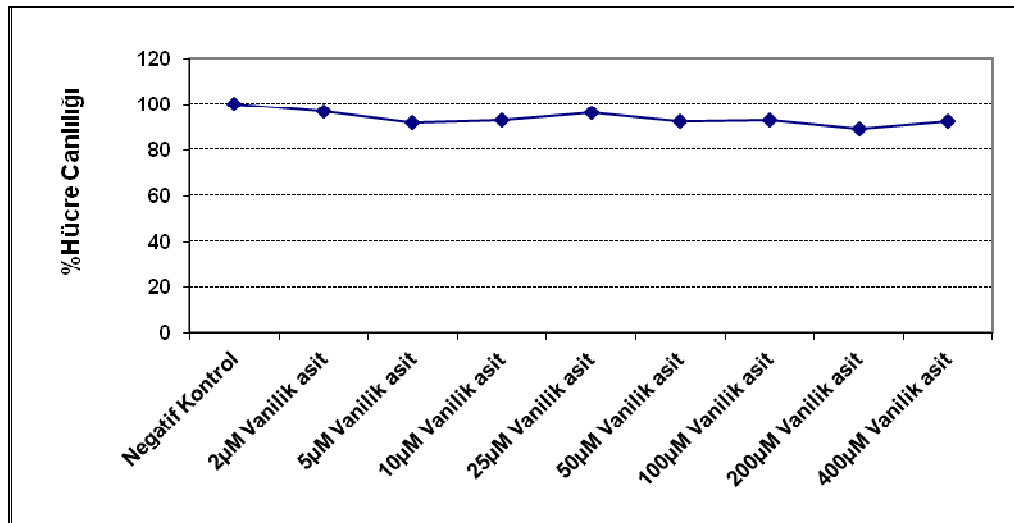
4.2.4. Vanilik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Vanilik asidin 8 farklı konsantrasyonunun (2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 μ M) CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. vanilik asit 2-400 μ M uygulama konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.14).

Çizelge 4.9. NKA yöntemine göre vanilik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi *

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
1	(-) Kontrol (% 1 DMSO)	0,406 $\pm$ 0,022	100
2	2 μ M Vanilik asit	0,394 $\pm$ 0,014	96,9
3	5 μ M Vanilik asit	0,372 $\pm$ 0,026	91,6
4	10 μ M Vanilik asit	0,378 $\pm$ 0,034	93,1
5	25 μ M Vanilik asit	0,392 $\pm$ 0,035	96,5
6	50 μ M Vanilik asit	0,375 $\pm$ 0,019	92,3
7	100 μ M Vanilik asit	0,378 $\pm$ 0,011	93,1
8	200 μ M Vanilik asit	0,363 $\pm$ 0,019	89,3
9	400 μ M Vanilik asit	0,375 $\pm$ 0,013	92,2

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.14. NKA yöntemine göre rosmarinik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi

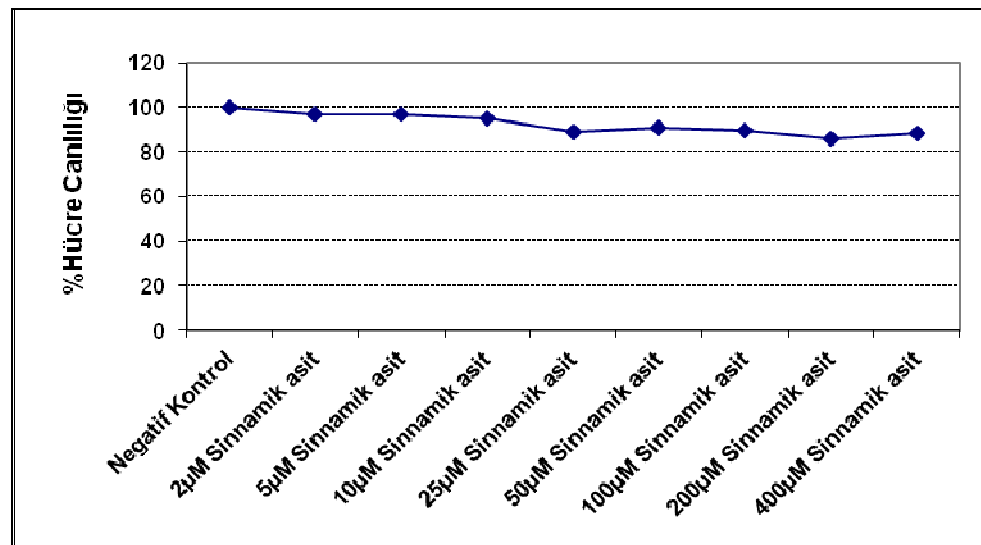
4.2.5. Sinnamik asidin NKA yöntemi ile sitotoksitesinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Sinnamik asidin 8 farklı konsantrasyonunun (2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 μM) CHO hücrelerindeki sitotoksik etkisi NKA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Nötral kırmızısı alımı deneyi sonuçlarına göre; sinnamik asit 2-400 μM uygulama konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.15).

Çizelge 4.10. NKA yöntemine göre sinnamik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri ($\pm$ standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%)
1	(-) Kontrol (% 1 DMSO)	0,406 $\pm$ 0,022	100
2	2 μM Sinnamik asit	0,394 $\pm$ 0,005	96,9
3	5 μM Sinnamik asit	0,393 $\pm$ 0,003	96,7
4	10 μM Sinnamik asit	0,387 $\pm$ 0,011	95,2
5	25 μM Sinnamik asit	0,361 $\pm$ 0,049	88,7
6	50 μM Sinnamik asit	0,368 $\pm$ 0,040	90,5
7	100 μM Sinnamik asit	0,364 $\pm$ 0,024	89,7
8	200 μM Sinnamik asit	0,350 $\pm$ 0,010	86,1
9	400 μM Sinnamik asit	0,359 $\pm$ 0,033	88,4

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.15. NKA yöntemine göre sinnamik asidin CHO hücrelerinde sitotoksik etkisi

4.3. Fenolik Bileşiklerin Comet Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.3.1. Pknogenolün comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Pknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.11’de ve Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18’de gösterilmiştir.

Pknogenolün 6 farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50, 100, 150 $\mu g/ml$) sağlıklı insan lenfositlerine uygulanması sonrasında, düşük konsantrasyonlarında (5-50 $\mu g/ml$) negatif kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesinde DNA hasarı oluşturmadığı belirlenmiştir. Pknogenolün en yüksek iki konsantrasyonunun (100 ve 150 $\mu g/ml$) ise DNA hasarına neden olduğu ve DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinin hepsinde istatistiksel olarak önemli artışa neden olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

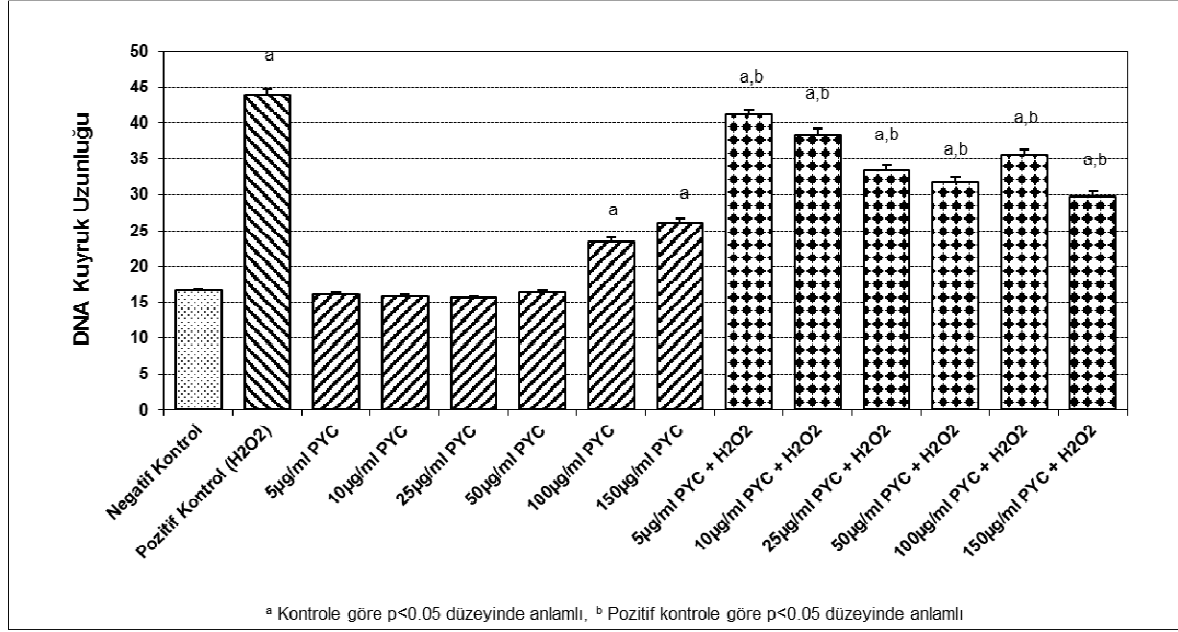
Pknogenol muamelesinin ardından H_2O_2 uygulanan lenfosit örneklerinin hepsinde, tek başına H_2O_2 uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilen DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma meydana getirmiştir. Sonuç olarak pknogenol çalışılan tüm konsantrasyonlarda lenfositlerde H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermiştir.

Çizelge 4.11. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

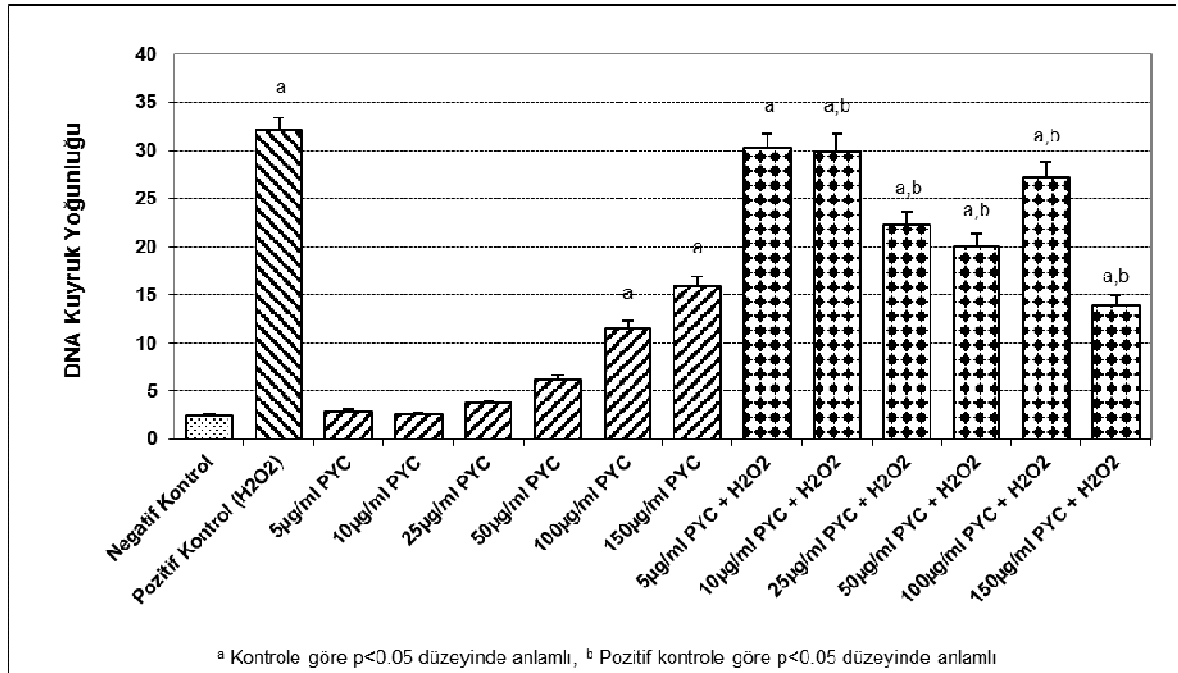
	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol (PBS)	16,73±0,19	2,38±0,24	0,29±0,03
Pozitif kontrol (H₂O₂)	43,98±0,64 ^a	32,03±1,42 ^a	8,13±0,40
5µg/ml Piknogenol	16,18±0,20	2,90±0,26	0,33±0,03
10µg/ml Piknogenol	15,87±0,19	2,58±0,25	0,28±0,03
25µg/ml Piknogenol	15,63±0,21	3,71±0,28	0,41±0,03
50µg/ml Piknogenol	16,40±0,28	6,16±0,50 ^a	0,75±0,09
100µg/ml Piknogenol	23,40±0,58 ^a	11,43±0,84 ^a	2,27±0,21 ^a
150µg/ml Piknogenol	26,11±0,58 ^a	15,89±1,00 ^a	3,10±0,26 ^a
5µg/ml Piknogenol+H₂O₂	41,21±0,72 ^{a,b}	30,23±1,43 ^a	7,64±0,41 ^a
10µg/ml Piknogenol+H₂O₂	38,36±0,85 ^{a,b}	29,89±1,78 ^{a,b}	7,20±0,55 ^{a,b}
25µg/ml Piknogenol+H₂O₂	33,32±0,76 ^{a,b}	22,35±1,34 ^{a,b}	5,39±0,38 ^{a,b}
50µg/ml Piknogenol+H₂O₂	31,76±0,74 ^{a,b}	20,04±1,30 ^{a,b}	5,07±0,41 ^{a,b}
100µg/ml Piknogenol+H₂O₂	35,53±0,85 ^{a,b}	27,23±1,58 ^{a,b}	7,70±0,50 ^a
150µg/ml Piknogenol+H₂O₂	29,70±0,78 ^{a,b}	13,91±1,02 ^{a,b}	3,32±0,31 ^{a,b}

* Dört çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

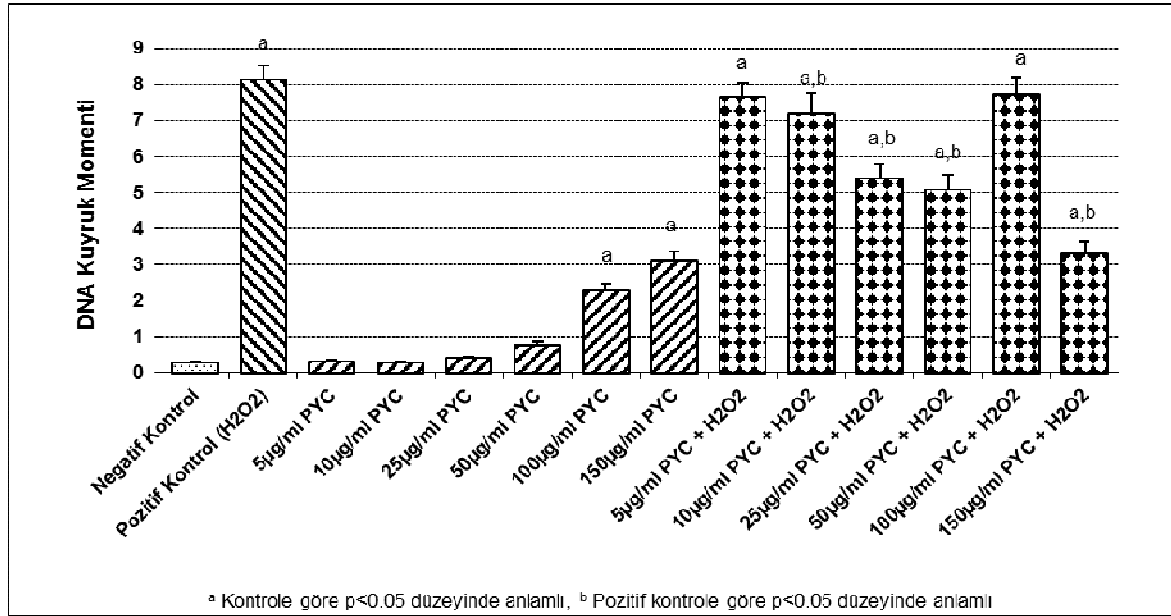
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.16. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.17. Piknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.18. Pknogenolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri

4.3.2. Resveratrolün comet yöntemi ile genotoksik ve antijenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.12’de ve Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Resveratrolün beş farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) sağlıklı insan lenfositlerine tek başına uygulamasının sonrasında tüm dozlarında kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesine göre DNA hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Resveratrol muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilen DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) bir azalma olduğu belirlenmiştir.

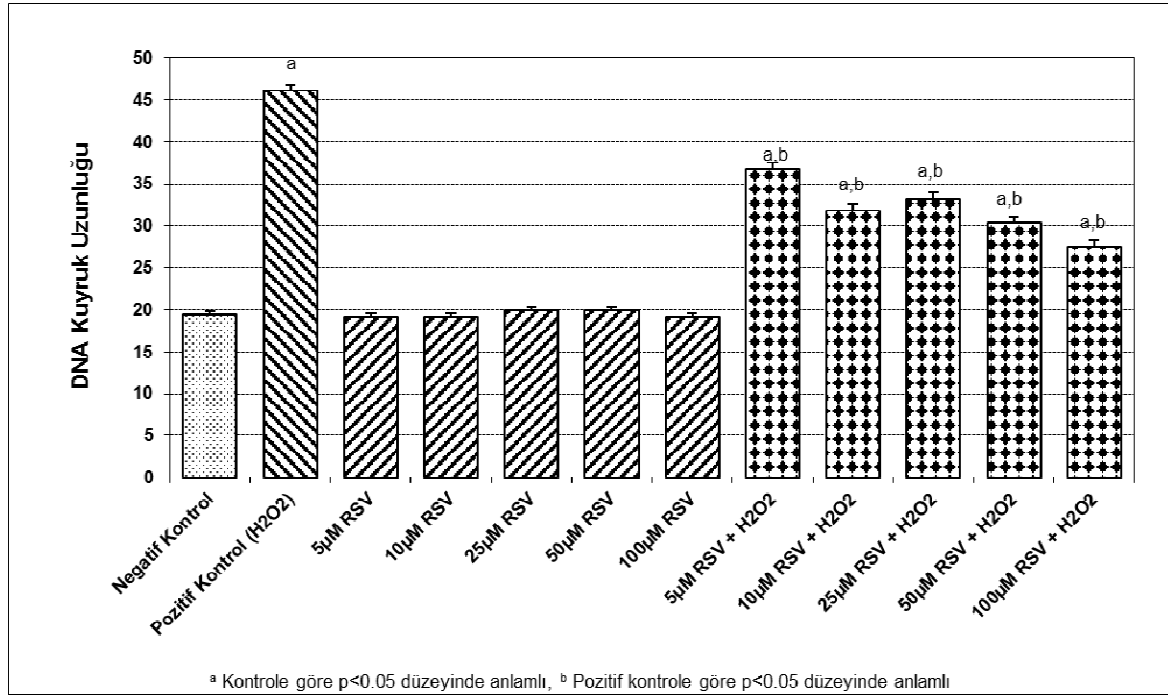
Sonuç olarak resveratrolün, uygulanan tüm konsantrasyonlarında lenfositlerde H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.12. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

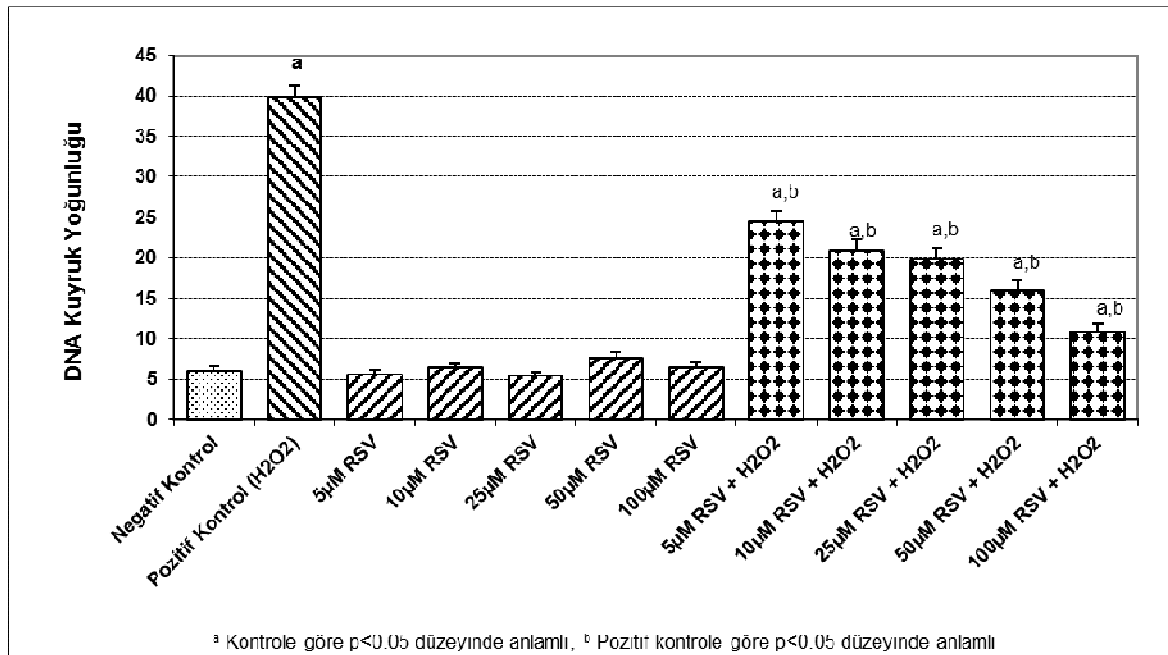
	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Kontrol (% 5 DMSO)	19,45 ± 0,36	6,08 ± 0,49	0,90 ± 0,08
Pozitif kontrol (H₂O₂)	46,16 ± 0,69 ^a	39,84 ± 1,48 ^a	10,59 ± 0,45 ^a
5µM Resveratrol	19,09 ± 0,39	5,65 ± 0,58	0,87 ± 0,11
10µM Resveratrol	19,16 ± 0,40	6,45 ± 0,51	0,93 ± 0,08
25µM Resveratrol	19,94 ± 0,43	5,40 ± 0,50	0,83 ± 0,10
50µM Resveratrol	19,88 ± 0,45	7,68 ± 0,66	1,14 ± 0,11
100µM Resveratrol	19,10 ± 0,42	6,44 ± 0,61	0,94 ± 0,13
5µM Resveratrol +H₂O₂	36,71 ± 0,83 ^{a,b}	24,42 ± 1,39 ^{a,b}	6,11 ± 0,40 ^{a,b}
10µM Resveratrol +H₂O₂	31,80 ± 0,83 ^{a,b}	20,89 ± 1,38 ^{a,b}	4,89 ± 0,40 ^{a,b}
25µM Resveratrol +H₂O₂	33,11 ± 0,85 ^{a,b}	19,84 ± 1,30 ^{a,b}	4,55 ± 0,36 ^{a,b}
50µM Resveratrol +H₂O₂	30,37 ± 0,70 ^{a,b}	15,97 ± 1,23 ^{a,b}	3,09 ± 0,29 ^{a,b}
100µM Resveratrol +H₂O₂	27,52 ± 0,73 ^{a,b}	10,81 ± 0,98 ^{a,b}	2,15 ± 0,25 ^{a,b}

* Üç çalışmanın ortalama değerleridir

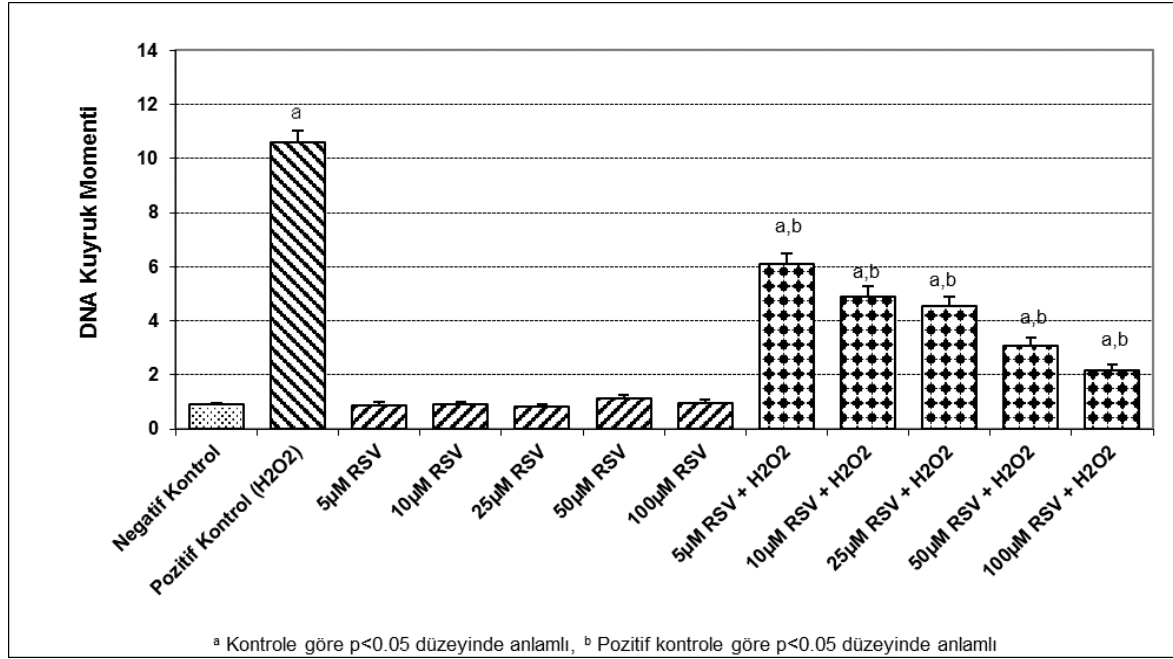
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.19. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.20. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.21. Resveratrolün sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri

4.3.3. Rosmarinik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

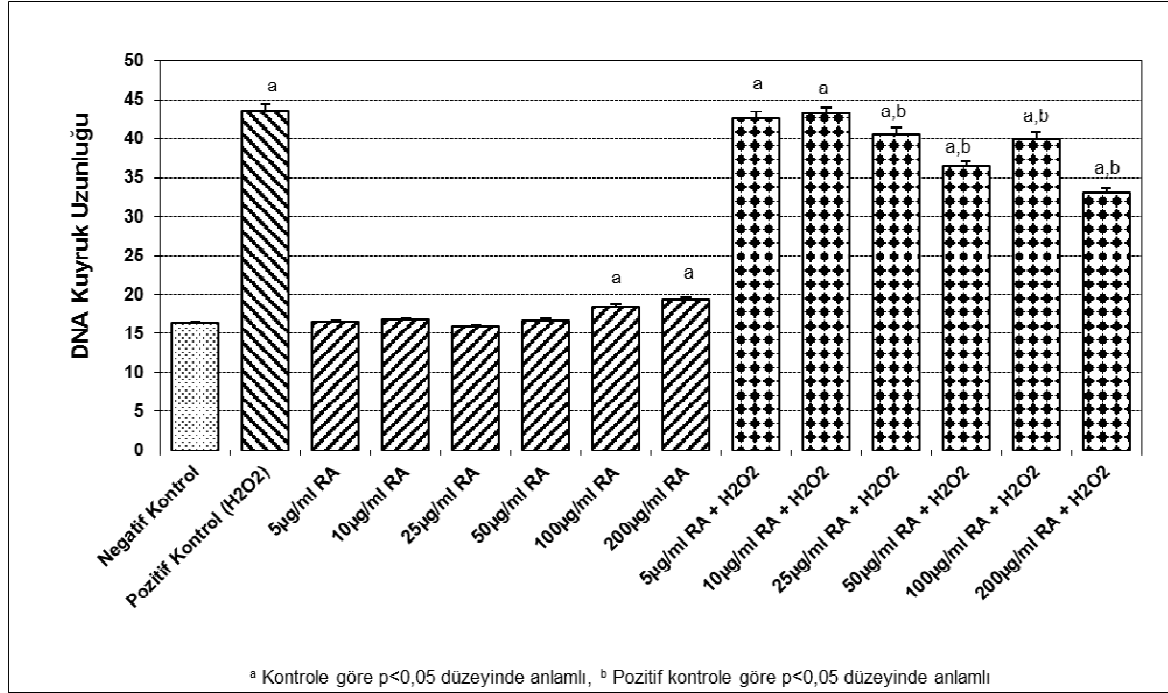
Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular Çizelge 4.13 ve Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24’de gösterilmiştir. Buna göre rosmarinik asidin sağlıklı insan lenfositlerinde düşük konsantrasyonlarında (5-50 µg/ml) negatif kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesinde DNA hasarı oluşturmadığı belirlenmiştir. Rosmarinik asidin en yüksek iki konsantrasyonunun (100 ve 200 µg/ml) ise kuyruğu uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinin hepsinde istatistiksel olarak artışa neden olduğu ve DNA hasarına neden oldukları görülmüştür. Bununla birlikte rosmarinik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan gruplar, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük dozlarda (5 ve 10 µg/ml) koruyucu etki göstermediği, ancak yüksek dozlarda (25-200 µg/ml) DNA hasarında bir azalma olduğu yani koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

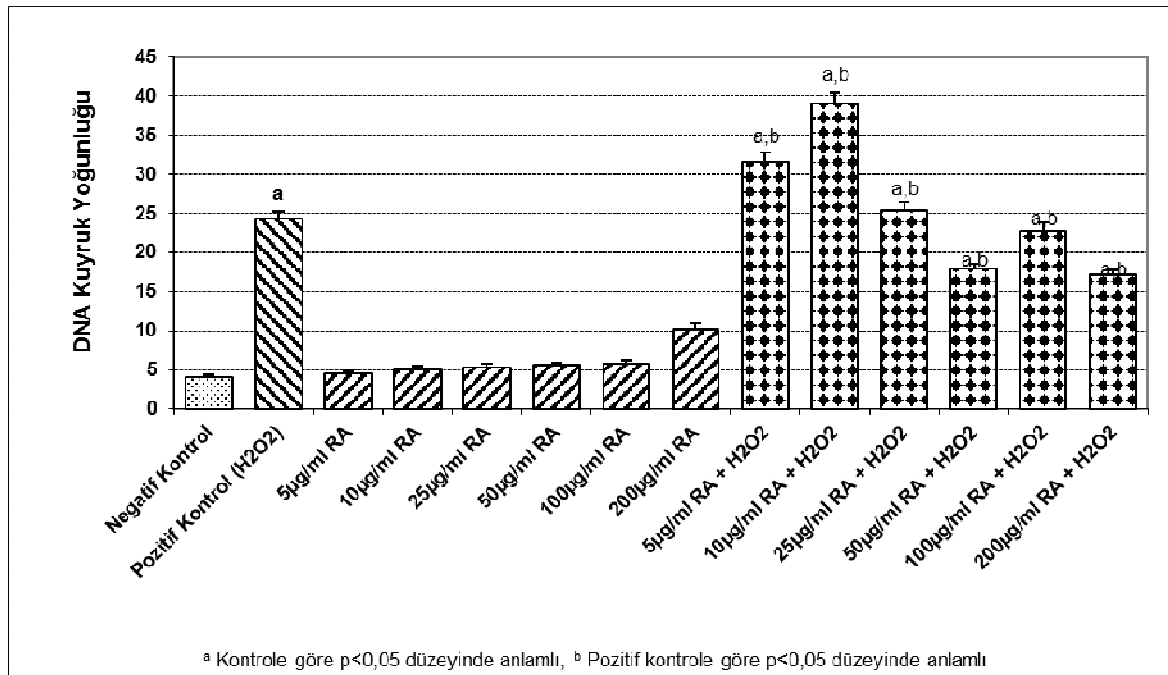
	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol (PBS)	16,38 ±0,12	4,04 ±0,30	0,48 ±0,39
Pozitif kontrol (H₂O₂)	43,56 ±0,81 ^a	24,26 ±1,00 ^a	5,90 ±0,31 ^a
5µg/ml Rosmarinik asit	16,46 ±0,15	4,56± 0,33	0,55 ±0,04
10µg/ml Rosmarinik asit	16,78 ±0,17	5,03 ±0,37	0,62 ±0,05
25µg/ml Rosmarinik asit	15,97 ±0,15	5,37 ±0,39	0,65 ±0,05
50µg/ml Rosmarinik asit	16,65 ±0,22	5,55 ±0,40	0,73 ±0,07
100µg/ml Rosmarinik asit	18,38 ±0,41 ^a	5,80 ±0,47	0,79 ±0,07
200µg/ml Rosmarinik asit	19,30 ±0,39 ^a	10,20± 0,66 ^a	1,46 ±0,13 ^a
5µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	42,53 ±0,86 ^a	31,62 ±1,20 ^{a,b}	8,23 ±0,37 ^{a,b}
10µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	43,23 ±0,82 ^a	39,03 ±1,36 ^{a,b}	10,51 ±0,42 ^{a,b}
25µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	40,57 ±0,87 ^{a,b}	25,36 ±1,07 ^a	6,47 ±0,30 ^a
50µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	36,42 ±0,67 ^{a,b}	17,87 ±0,81 ^{a,b}	3,68 ±0,19 ^{a,b}
100µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	39,84 ±1,00 ^{a,b}	22,81 ±1,06 ^a	5,82 ±0,32 ^a
200µg/ml Rosmarinik asit +H₂O₂	33,02 ±0,54 ^{a,b}	17,08 ±0,69 ^{a,b}	3,30 ±0,14 ^{a,b}

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

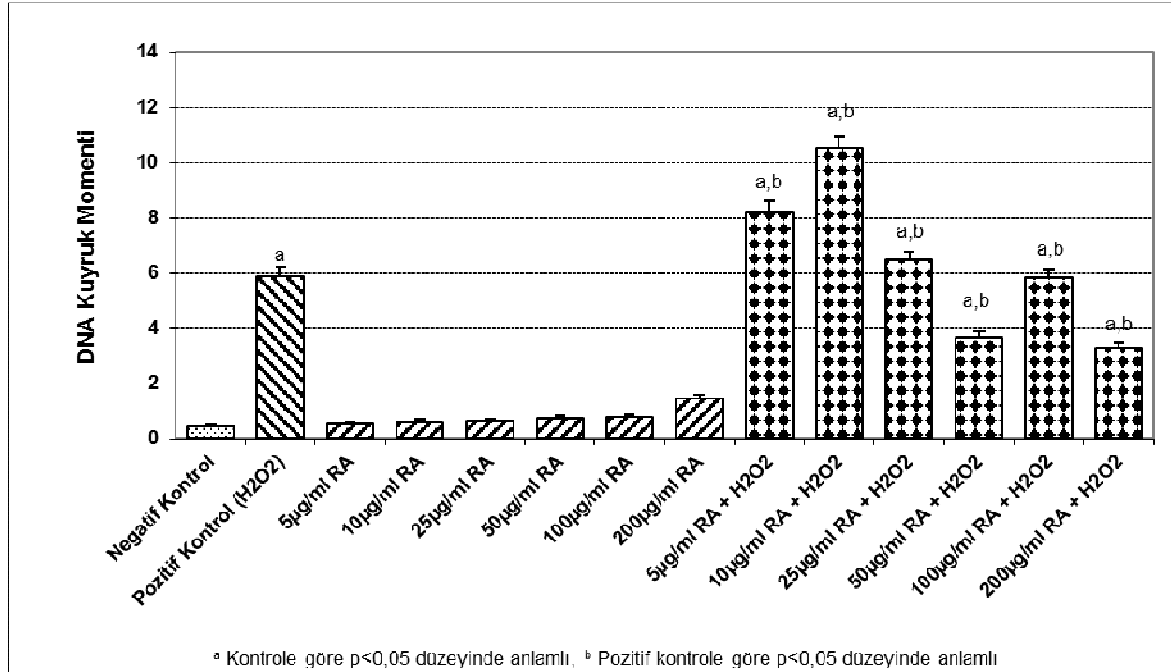
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.22. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.23. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.24. Rosmarinik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri

4.3.4. Vanilik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

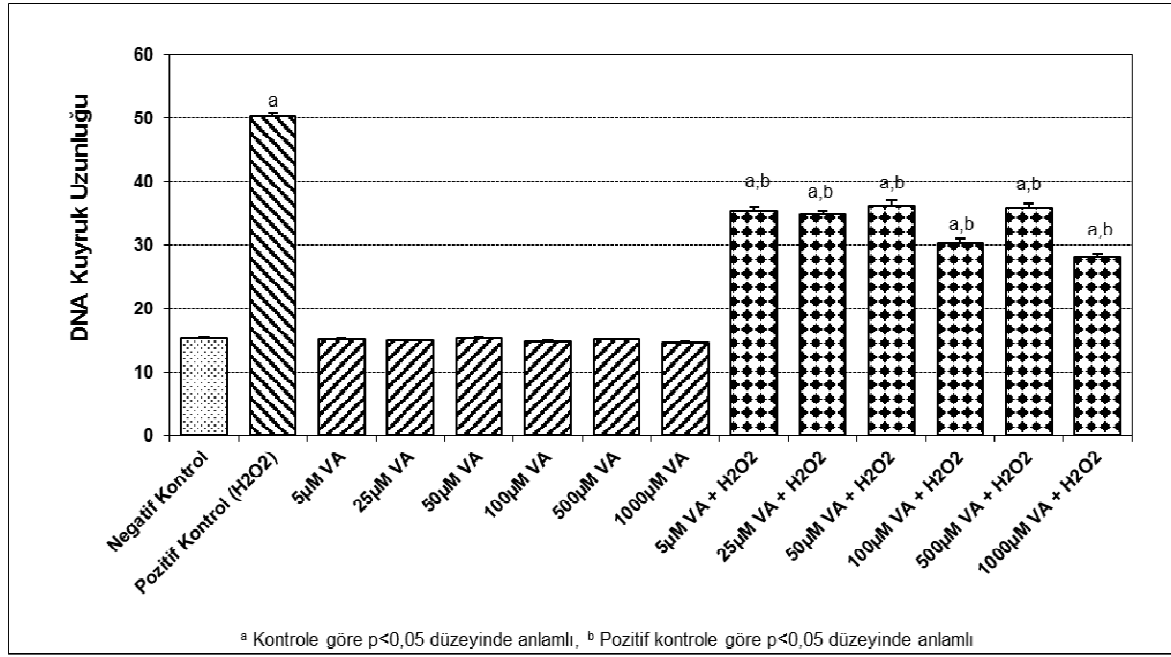
Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.14'te ve Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Buna göre tek başına vanilik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5, 25, 50, 100, 500 ve 1000 µM) sağlıklı insan lenfositlerinde kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesine göre DNA hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Bununla birlikte vanilik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilen DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak vanilik asit uygulanan tüm konsantrasyonlarında lenfositlerde H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermiştir.

Çizelge 4.14. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

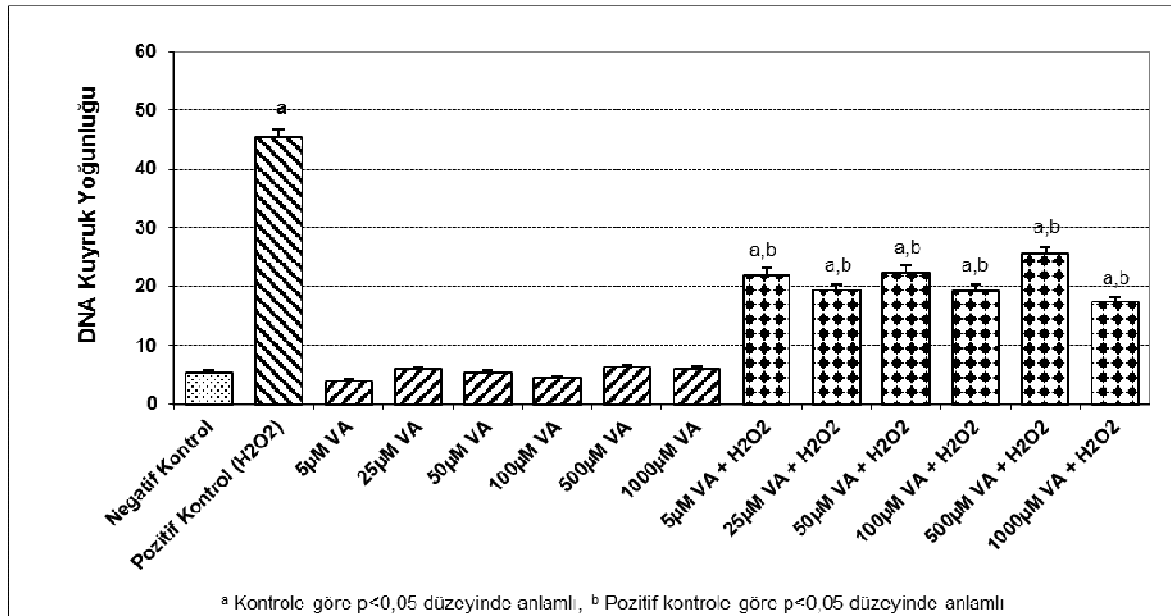
	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol(PBS)	15,36±0,13	5,26±0,4	0,55±0,05
Pozitif kontrol (H₂O₂)	50,36±0,54 ^a	45,47±1,27 ^a	12,10±0,39 ^a
5µM Vanilik asit	15,14±0,12	3,93±0,31	0,44±0,04
25µM Vanilik asit	14,96±0,11	5,81±0,40	0,64±0,05
50µM Vanilik asit	15,41±0,12	5,28±0,38	0,60±0,05
100µM Vanilik asit	14,87±0,10	4,45±0,35	0,48±0,04
500 µM Vanilik asit	15,12±0,12	6,24±0,49	0,73±0,06
1000 µM Vanilik asit	14,71±0,13	5,95±0,46	0,67±0,06
5µM Vanilik asit +H₂O₂	35,29±0,73 ^{a,b}	22,04±1,07 ^{a,b}	4,18±0,22 ^{a,b}
25µM Vanilik asit +H₂O₂	34,76±0,60 ^{a,b}	19,35±0,96 ^{a,b}	3,91±0,22 ^{a,b}
50µM Vanilik asit +H₂O₂	36,24±0,79 ^{a,b}	22,46±1,07 ^{a,b}	4,40±0,24 ^{a,b}
100µM Vanilik asit +H₂O₂	30,34±0,57 ^{a,b}	19,03±1,06 ^{a,b}	3,23±0,21 ^{a,b}
500µM Vanilik asit +H₂O₂	35,89±0,63 ^{a,b}	25,65±1,17 ^{a,b}	5,07±0,29 ^{a,b}
1000µM Vanilik asit +H₂O₂	28,14±0,51 ^{a,b}	17,32±0,93 ^{a,b}	2,72±0,17 ^{a,b}

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

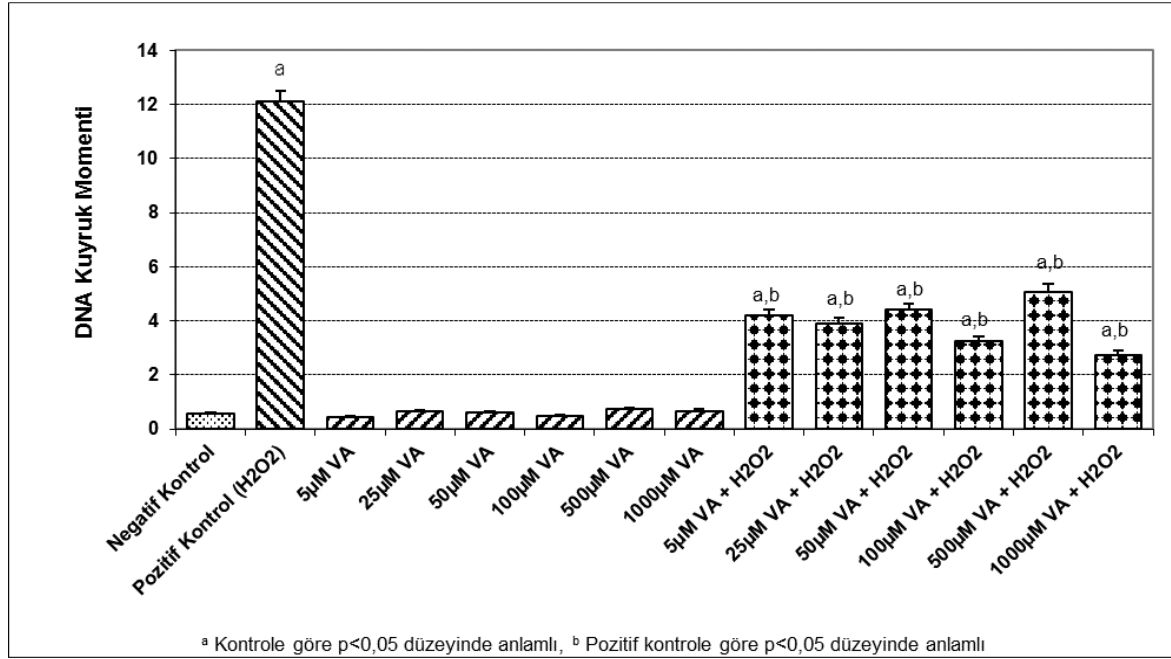
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.25. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.26. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H_2O_2 ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.27. Vanilik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri

4.3.5. Sinnamik asidin comet yöntemi ile genotoksik ve antijenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

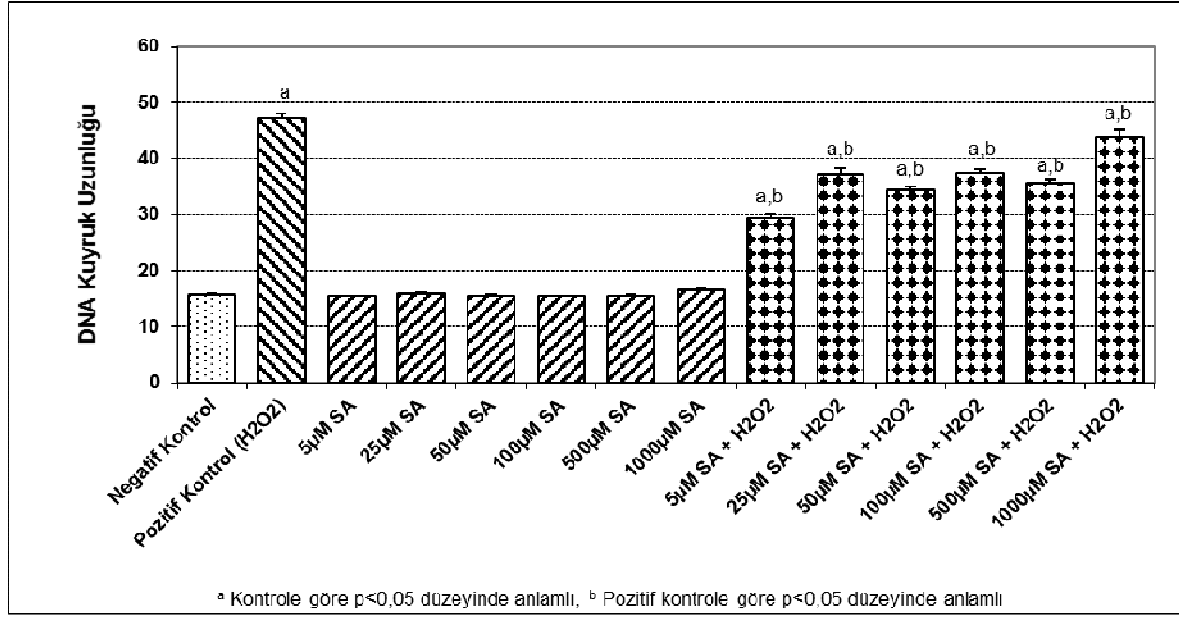
Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular Çizelge 4.15'te ve Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Buna göre sinnamik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5, 25, 50, 100, 500 ve 1000 µM) sağlıklı insan lenfositlerinde çalışılan tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmesine göre DNA hasarı oluşturmadağı görülmüştür. Bununla birlikte sinnamik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilen DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak sinnamik asit uygulanan tüm konsantrasyonlarında lenfositlerde H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermiştir.

Çizelge 4.15. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

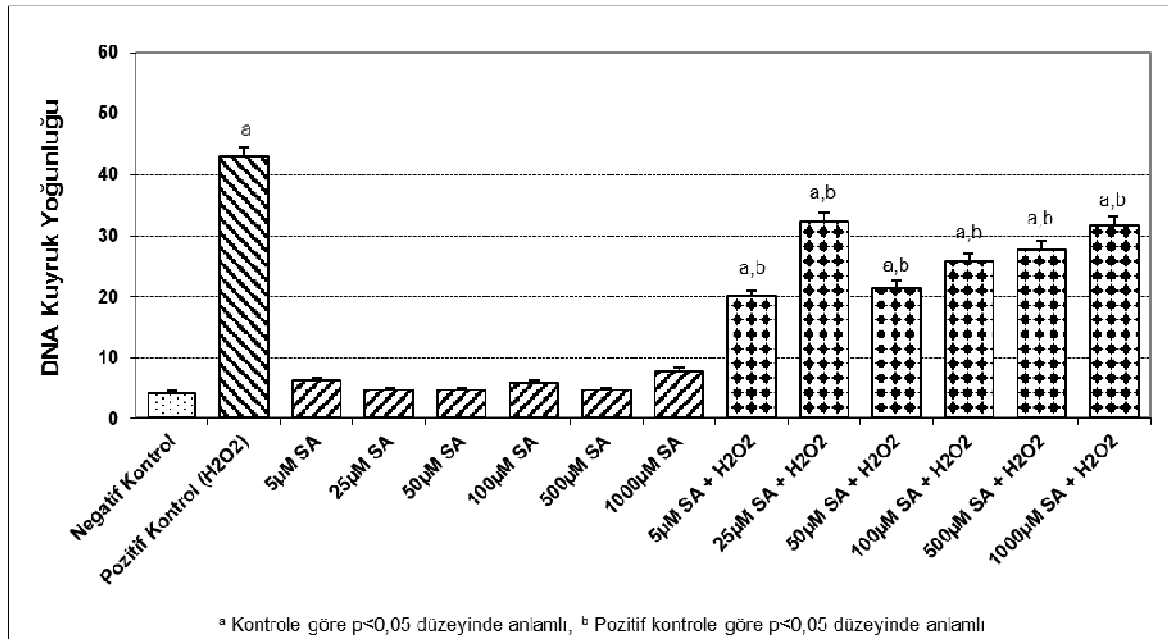
	Kuyruk Uzunluğu ±standart hata	Kuyruk Yoğunluğu ±standart hata	Kuyruk Momenti ±standart hata
Negatif Kontrol (PBS)	15,81±0,15	4,16±0,33	0,46±0,04
Pozitif kontrol (H₂O₂)	47,23±0,88 ^a	42,98±1,49 ^a	11,36±0,47 ^a
5µM Sinnamik asit	15,49±0,13	6,14±0,47	0,68±0,06
25µM Sinnamik asit	15,97±0,11	4,67±0,40	0,53±0,05
50µM Sinnamik asit	15,62±0,10	4,65±0,36	0,51±0,04
100µM Sinnamik asit	15,46±0,13	5,85±0,45	0,66±0,05
500 µM Sinnamik asit	15,53±0,14	4,64±0,38	0,52±0,05
1000 µM Sinnamik asit	16,52±0,18	7,74±0,56 ^a	0,91±0,08
5µM Sinnamik asit +H₂O₂	29,48±0,60 ^{a,b}	20,07±0,98 ^{a,b}	3,43±0,19 ^{a,b}
25µM Sinnamik asit +H₂O₂	37,34±0,88 ^{a,b}	32,27±1,51 ^{a,b}	7,49±0,44 ^{a,b}
50µM Sinnamik asit +H₂O₂	34,30±0,78 ^{a,b}	21,45±1,14 ^{a,b}	3,94±0,23 ^{a,b}
100µM Sinnamik asit +H₂O₂	37,46±0,66 ^{a,b}	25,73±1,20 ^{a,b}	5,19±0,29 ^{a,b}
500µM Sinnamik asit +H₂O₂	35,70±0,57 ^{a,b}	27,83±1,22 ^{a,b}	5,44±0,31 ^{a,b}
1000µM Sinnamik asit +H₂O₂	43,81±1,26 ^{a,b}	31,56±1,55 ^{a,b}	8,42±0,56 ^{a,b}

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

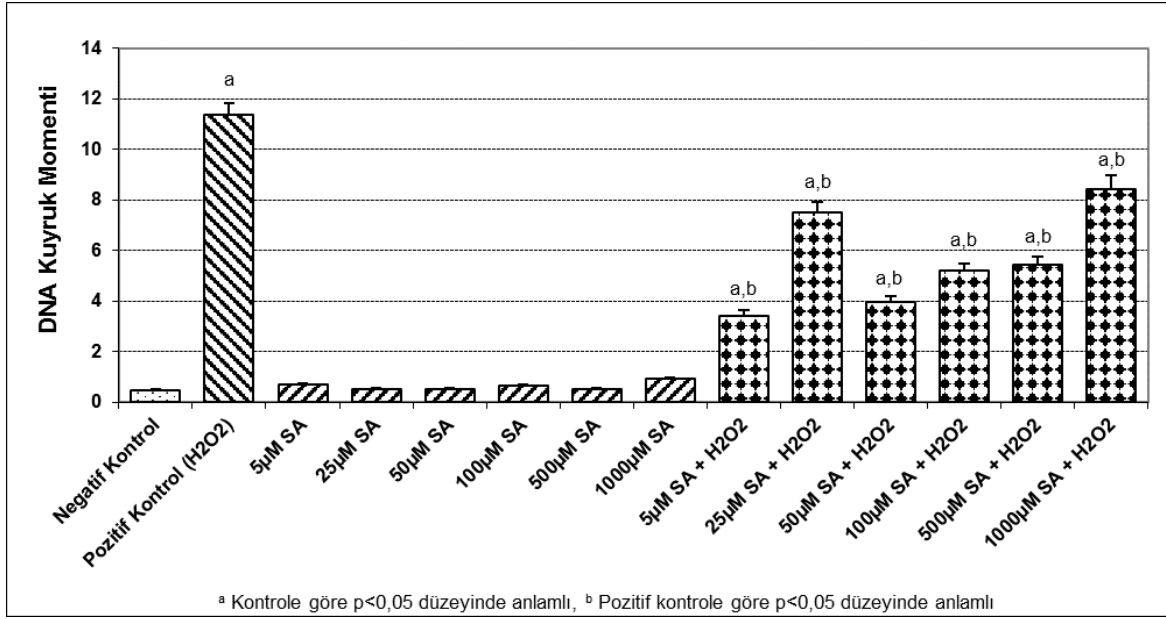
^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4.28. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.29. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk yoğunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.30. Sınnamik asidin sağlıklı lenfositlerde ve H₂O₂ ile oksidatif hasar indüklenen lenfositlerde comet kuyruk momenti üzerine etkileri

4.4. Fenolik Bileşiklerin MÇ Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

4.4.1. Pıknogenolün MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Pıknogenolün tek başına ve H₂O₂ ile birlikte uygulandığı insan lenfositlerindeki % MÇ değerleri ve nükleer bölünme indeksleri Çizelge 4.16’da gösterilmiştir. Pıknogenolün, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tek başına düşük konsantrasyonlarında (5-50 µg/ml) MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir.

Pıknogenolün yüksek iki konsantrasyonunda ise (100 ve 150 µg/ml) kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p<0,05) oluşturduğu belirlenmiştir. Sadece H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda % MÇ frekansı kontrole göre önemli derece bir artış (p<0,05) göstermiştir.

H₂O₂ ile birlikte pıknogenol uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma en düşük doz harici tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir (p<0,05) (Çizelge 4.16, Şekil 4.31).

Çizelge 4.16. Piknogenol ve piknogenol ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

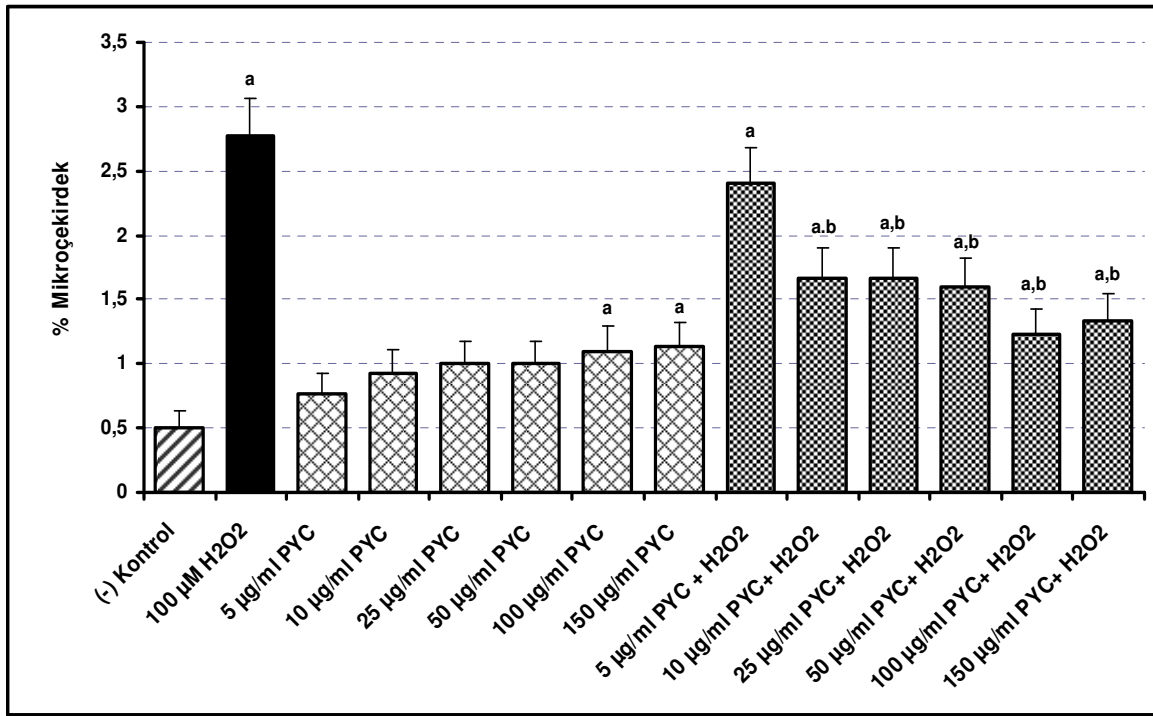
Uygulama Grubu	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı			MÇ/10 ³ hücre	% MÇ±SH	Nükleer Bölünme İndeksi
	(1)	(2)	(3)			
(-) Kontrol	11	2	-	5	0,50±0,13	1,83±0,35
100 µM H ₂ O ₂	63	10	-	27,6	2,76±0,30 ^a	1,72±0,34
5 µg/ml Piknogenol	19	2	-	7,7	0,77±0,16	1,70±0,33
10 µg/ml Piknogenol	24	2	-	9,3	0,93±0,18	1,76±0,34
25 µg/ml Piknogenol	24	3	-	10	1,00±0,18	1,70±0,33
50 µg/ml Piknogenol	28	1	-	10	1,00±0,18	1,81±0,34
100 µg/ml Piknogenol	24	3	1	11	1,10±0,19 ^a	1,73±0,34
150 µg/ml Piknogenol	30	2	-	11,3	1,13±0,19 ^a	1,61±0,32
5 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	57	6	1	24	2,40±0,28 ^a	1,71±0,34
10 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	44	3	-	16,7	1,67±0,23 ^{a,b}	1,64±0,33
25 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	34	8	-	16,7	1,67±0,23 ^{a,b}	1,66±0,33
50 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	38	5	-	16	1,60±0,23 ^{a,b}	1,70±0,33
100 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	37	-	-	12,3	1,23±0,20 ^{a,b}	1,75±0,34
150 µg/ml Piknogenol+ H ₂ O ₂	36	2	-	13,3	1,33±0,21 ^{a,b}	1,65±0,33

^a Kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

Sonuç olarak piknogenol düşük konsantrasyonlarında insan lenfositlerinde genotoksik bir etki göstermezken, yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki oluşturduğu ancak piknogenolün H₂O₂'nin neden olduğu MÇ oluşuma karşı koruyucu antigenotoksik bir etki gösterdiği saptanmıştır.

Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde piknogenol ve H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda kontrole göre nükleer bölünme indeksinde bir düşüş gözlenmekle birlikte bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.16).



^a Kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.31. Pknogenol ve pknogenol ile birlikte H_2O_2 uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

Pknogenol için yapılan genotoksisite testleri değerlendirmesinde MÇ yöntemi ile comet yöntemi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

4.4.2. Resveratrolün MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Resveratrolün 5 farklı konsantrasyonunun tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığında resveratrolün tüm konsantrasyonlarında (5-100 μM) MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. H_2O_2 uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansı kontrole göre önemli derecede bir artış göstermiştir. H_2O_2 ile birlikte resveratrol uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ($p < 0,05$). Sonuç olarak resveratrol 5-100 μM konsantrasyon aralığında insan lenfositlerinde genotoksik bir etki oluşturmamakta ayrıca H_2O_2 'nin neden olduğu MÇ oluşuma karşı koruyucu antigenotoksik bir etki göstermektedir (Çizelge 4.17, Şekil 4.32).

Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde resveratrol ve H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda kontrole göre nükleer bölünme indeksinde doza bağlı bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.17).

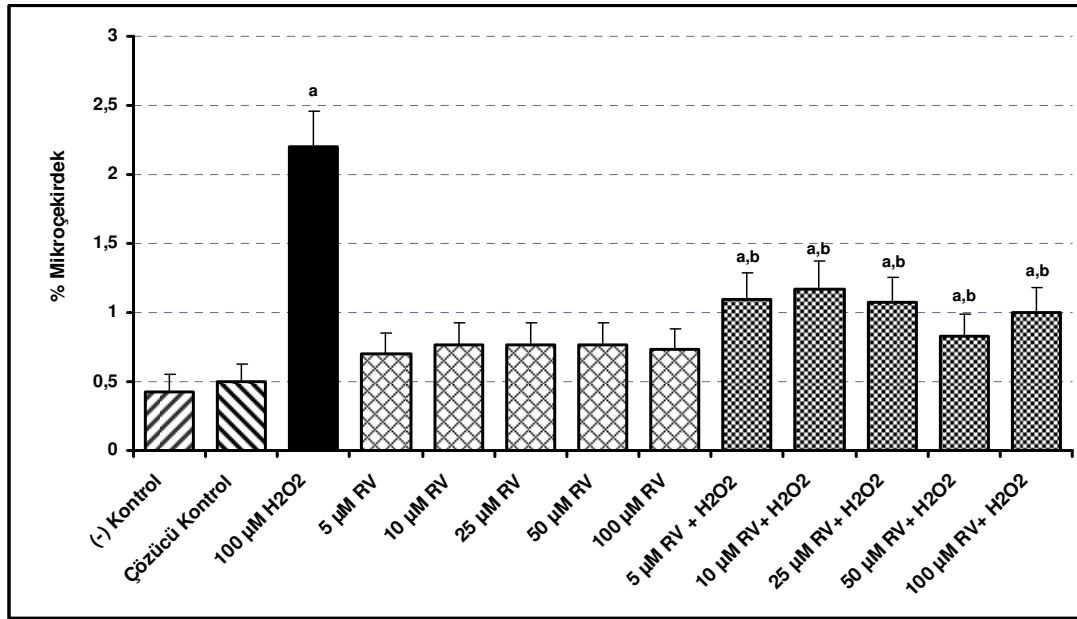
Resveratrol için yapılan genotoksisite testleri değerlendirmesinde MÇ yöntemi ile comet yöntemi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.17. Resveratrol ve resveratrol ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

Uygulama Grubu	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı			MÇ/10 ³ hücre	% MÇ±SH	Nükleer Bölünme İndeksi
	(1)	(2)	(3)			
(-) Kontrol	11	1	-	4,33	0,43±0,12	1,91±0,35
Çözücü Kontrol (%1 DMSO)	13	1	-	5,00	0,50±0,13	1,81±0,34
100 µM H ₂ O ₂	47	8	1	22,00	2,20±0,26 ^a	1,68±0,33
5 µM Resveratrol	19	1	-	7,00	0,70±0,15	1,77±0,34
10 µM Resveratrol	23	-	-	7,67	0,77±0,16	1,75±0,34
25 µM Resveratrol	21	1	-	7,67	0,77±0,16	1,68±0,33
50 µM Resveratrol	23	-	-	7,67	0,77±0,16	1,56±0,32
100 µM Resveratrol	22	-	-	7,33	0,73±0,15	1,32±0,28
5 µM Resveratrol + H ₂ O ₂	31	1	-	11,00	1,10±0,19 ^{a,b}	1,78±0,34
10 µM Resveratrol + H ₂ O ₂	35	-	-	11,66	1,17±0,20 ^{a,b}	1,72±0,34
25 µM Resveratrol + H ₂ O ₂	26	3	-	10,67	1,07±0,19 ^{a,b}	1,59±0,32
50 µM Resveratrol + H ₂ O ₂	23	1	-	8,33	0,83±0,16 ^{a,b}	1,56±0,32
100 µM Resveratrol + H ₂ O ₂	26	2	-	10,00	1,00±0,18 ^{a,b}	1,38±0,30

^a Kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)



a Çözücü kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.32. Resveratrol ve resveratrol ile birlikte H_2O_2 uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

4.4.3. Rosmarinik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Rosmarinik asidin konsantrasyonlarının tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında rosmarinik asidin düşük konsantrasyonlarında (5-50 $\mu\text{g/ml}$) MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Rosmarinik asidin yüksek iki konsantrasyonunda ise (100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$) kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

H_2O_2 uygulanan gruplarda % MÇ frekansı kontrole göre önemli derece bir artış ($p < 0,05$) göstermiştir. H_2O_2 ile birlikte rosmarinik asit uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ($p < 0,05$). Sonuç olarak rosmarinik asit düşük konsantrasyonlarında insan lenfositlerinde genotoksik bir etki göstermezken sadece yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki oluşturmaktadır. Bununla birlikte rosmarinik asit H_2O_2 'nin neden olduğu MÇ oluşuma karşı koruyucu antigenotoksik bir etki göstermektedir (Çizelge 4.18, Şekil 4.33).

Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde rosmarinik asit ve H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda kontrole göre nükleer bölünme indeksinde bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.18).

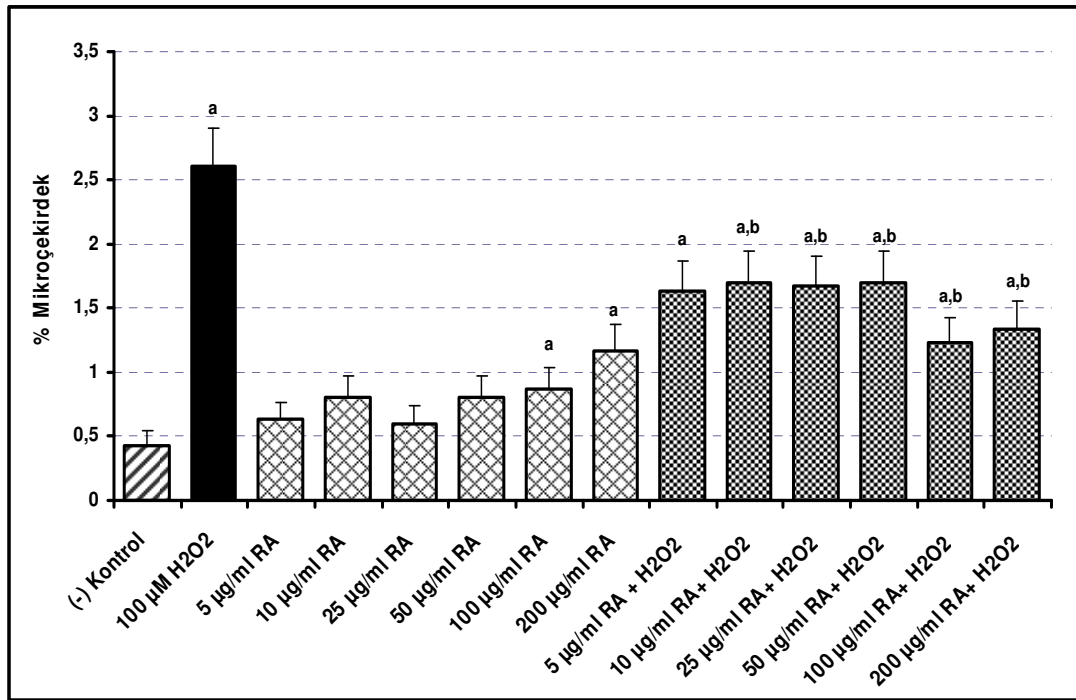
Rosmarinik asit için yapılan genotoksisite testleri değerlendirmesinde MÇ yöntemi ile comet yöntemi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.18. Rosmarinik asit ve rosmarinik asit ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

Uygulama Grubu	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı		MÇ/10 ³ hücre	% MÇ±SH	Nükleer Bölünme İndeksi
	(1)	(2)			
(-) Kontrol	13	-	4,33	0,43±0,12	1,72±0,33
100 µM H ₂ O ₂	62	8	26,00	2,60±0,30 ^a	1,66±0,33
5 µg/ml Rosmarinik asit	13	3	6,33	0,63±0,14	1,51±0,32
10 µg/ml Rosmarinik asit	22	1	8,00	0,80±0,17	1,51±0,32
25 µg/ml Rosmarinik asit	18	-	6,00	0,60±0,14	1,52±0,32
50 µg/ml Rosmarinik asit	24	-	8,00	0,80±0,17	1,56±0,32
100 µg/ml Rosmarinik asit	20	3	8,67	0,87±0,17 ^a	1,52±0,32
200 µg/ml Rosmarinik asit	25	5	11,67	1,17±0,20 ^a	1,51±0,32
5 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	37	6	16,33	1,63±0,24 ^{a,b}	1,60±0,32
10 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	45	3	17,00	1,70±0,24 ^{a,b}	1,59±0,32
25 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	40	5	16,67	1,67±0,24 ^{a,b}	1,57±0,32
50 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	45	3	17,00	1,70±0,24 ^{a,b}	1,58±0,32
100 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	35	1	12,33	1,23±0,20 ^{a,b}	1,51±0,32
200 µg/ml Rosmarinik asit + H ₂ O ₂	32	4	13,33	1,33±0,22 ^{a,b}	1,45±0,32

^a Kontrole göre istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde anlamlı (z testi)



^a Kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.33. Rosmarinik asit ve rosmarinik asit ile birlikte H_2O_2 uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

4.4.4. Vanilik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Vanilik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5-1000 μM) tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığında MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. H_2O_2 uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansı kontrole göre önemli derece bir artış göstermiştir ($p < 0,05$). H_2O_2 ile birlikte vanilik asit uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma en düşük doz harici tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ($p < 0,05$).

Sonuç olarak vanilik asit tüm uygulama konsantrasyonlarında insan lenfositlerinde genotoksik bir etkiye neden olmamakta bununla birlikte H_2O_2 'nin neden olduğu MÇ oluşuma karşı koruyucu antigenotoksik bir etki göstermektedir (Çizelge 4.19, Şekil 4.34).

Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde vanilik asit ve H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda kontrole göre nükleer bölünme indeksinde bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.19).

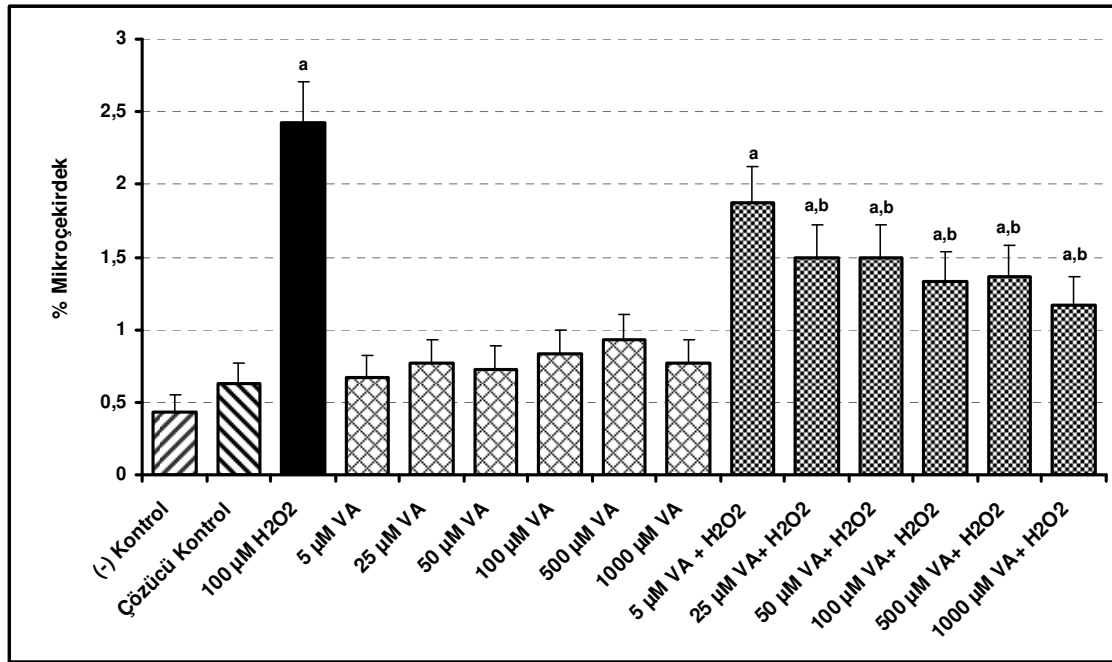
Vanilik asit için yapılan genotoksisite testleri değerlendirmesinde MÇ yöntemi ile comet yöntemi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.19. Vanilik asit ve vanilik asit ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

Uygulama Grubu	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı		MÇ/10 ³ hücre	% MÇ±SH	Nükleer Bölünme İndeksi
	(1)	(2)			
Negatif Kontrol	13	-	4,33	0,43±0,12	1,88±0,35
Çözücü Kontrol (%1 DMSO)	17	1	6,33	0,63±0,14	1,76±0,34
100 µM H ₂ O ₂	65	4	24,33	2,43±0,28 ^a	1,84±0,35
5 µM Vanilik asit	18	1	6,67	0,67±0,15	1,76±0,34
25 µM Vanilik asit	19	2	7,67	0,77±0,16	1,76±0,34
50 µM Vanilik asit	20	1	7,33	0,73±0,16	1,75±0,34
100 µM Vanilik asit	25	-	8,33	0,83±0,17	1,81±0,34
500 µM Vanilik asit	28	-	9,33	0,93±0,18	1,74±0,34
1000 µM Vanilik asit	21	1	7,67	0,77±0,16	1,74±0,34
5 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	46	10	18,67	1,87±0,25 ^a	1,80±0,34
25 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	41	2	15,00	1,50±0,22 ^{a,b}	1,76±0,34
50 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	37	4	15,00	1,50±0,22 ^{a,b}	1,79±0,34
100 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	36	2	13,33	1,33±0,21 ^{a,b}	1,75±0,34
500 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	41	-	13,67	1,37±0,21 ^{a,b}	1,73±0,34
1000 µM Vanilik asit+ H ₂ O ₂	33	1	11,67	1,17±0,20 ^{a,b}	1,69±0,33

^a Çözücü kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)



^a Çözücü kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.34. Vanilik asit ve vanilik asit ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

4.4.5. Sinnamik asidin MÇ yöntemi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular

Sinnamik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5-1000 µM) tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığında MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansı kontrole göre önemli derece bir artış göstermiştir ($p < 0,05$). H₂O₂ ile birlikte sinnamik asit uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). Sonuç olarak sinnamik asidin çalışılan konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde genotoksik bir etkiye neden olmadığı ve H₂O₂'nin neden olduğu MÇ oluşuma karşı koruyucu antigenotoksik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.35).

Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde sinnamik asit ve H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda kontrole göre nükleer bölünme indeksinde bir düşüş gözlenmiş, ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.15).

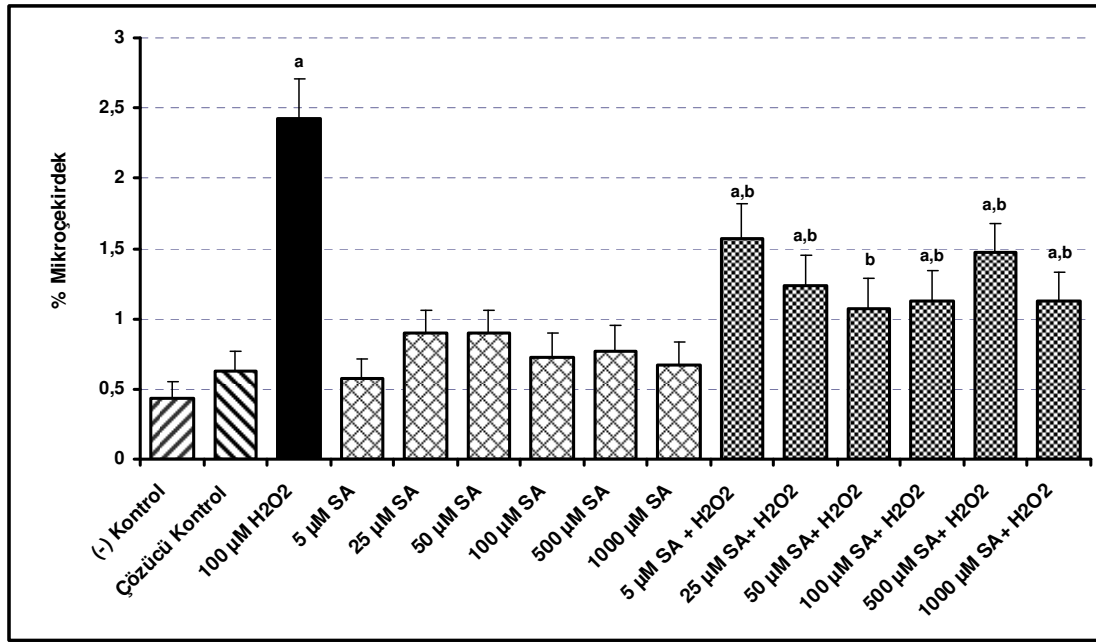
Sinnamik asit için yapılan genotoksisite testleri değerlendirmesinde MÇ yöntemi ile comet yöntemi sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.20. Sinnamik asit ve sinnamik asit ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

Uygulama Grubu	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı		MÇ/10 ³ hücre	% MÇ±SH	Nükleer Bölünme İndeksi
	(1)	(2)			
Negatif Kontrol	13	-	4,33	0,43±0,12	1,88±0,35
Çözücü Kontrol (%1 DMSO)	17	1	6,33	0,63±0,14	1,76±0,34
100 µM H ₂ O ₂	65	4	24,33	2,43±0,28 ^a	1,84±0,35
5 µM Sinnamik asit	15	1	5,67	0,57±0,14	1,77±0,34
25 µM Sinnamik asit	25	1	9,00	0,90±0,17	1,78±0,34
50 µM Sinnamik asit	25	1	9,00	0,90±0,17	1,80±0,34
100 µM Sinnamik asit	22	-	7,33	0,73±0,16	1,83±0,35
500 µM Sinnamik asit	23	-	7,67	0,77±0,16	1,73±0,34
1000 µM Sinnamik asit	20	-	6,67	0,67±0,15	1,71±0,33
5 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	41	3	15,67	1,57±0,23 ^{a,b}	1,76±0,34
25 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	35	1	12,33	1,23±0,20 ^{a,b}	1,79±0,34
50 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	30	1	10,67	1,07±0,19 ^b	1,80±0,34
100 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	34	-	11,33	1,13±0,19 ^{a,b}	1,75±0,34
500 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	44	2	14,67	1,47±0,22 ^{a,b}	1,73±0,34
1000 µM Sinnamik asit + H ₂ O ₂	32	1	11,33	1,13±0,19 ^{a,b}	1,74±0,34

^a Çözücü kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)



^a Çözücü kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

^b Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.35. Sinnamik asit ve sinnamik asit ile birlikte H₂O₂ uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları

5. TARTIŞMA

Tüm organizmaların hücreleri çevresel kirleticiler, ilaçlar, radyasyon gibi ksenebiyotiklerin ve endojen metabolizma sonucu üretilen reaktif oksijen türlerinin istenmeyen etkileri altındadır. Hücrelerdeki bu dışsal ve içsel etkenlere maruziyetin bir sonucu olarak DNA hasarı oluşmaya başlar. DNA hasarı uygun şekilde onarılmadığı takdirde, başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın patogenezinde rol oynayan mutasyonlara neden olur. Tüm organizmalar nesilden nesile genomik kararlılığın sağlanması için, hücre içerisine kanserojen maddelerin alımının inhibe edilmesi, detoksifikasyon yolak ve enzimlerinin uyarılması, DNA hasarını engelleyen hücresel savunma mekanizmalarının ve DNA onarımının artırılması, hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi, sinyal iletim yolları üzerine etkilerin düzenlenmesi apoptozun uyarılması gibi çok çeşitli mekanizmaları kullanırlar (de Kok, van Breda ve Manson, 2008; Pan, Ghai ve Ho, 2008).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, tüm bu süreçlerde pek çok diyetel bileşimin düzenleyici moleküller olarak yer aldığını göstermiştir. Epidemiyolojik çalışmalar ve laboratuvar verileri meyve ve sebze tüketiminin, sağlık üzerine yararlı etkileri olduğunu ve pek çok kanser türünün gelişimini engellediğini ortaya koymaktadır (Wu ve diğerleri, 2004). Tüm tümörlerin % 30-40 kadarının doğru bir beslenme ve yaşam tarzı ile engellenebileceği tahmin edilmektedir (Ramos ve diğerleri, 2011). Diyetle alınan fenolik bileşiklerin potansiyel serbest radikal süpürücü etkili antioksidan ve antiproliferatif maddeler gibi rol oynayarak ve antioksidan aktivite göstererek sağlık üzerine önemli etkiler sağladıkları varsayılmaktadır (Lacikova ve diğerleri, 2009; Yañez ve diğerleri, 2004).

Diyet ve yaşam tarzının kanser etiolojisinde önemli bir rolü olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Son yıllarda da herhangi bir hastalığın tedavisi yerine engellenmesine yönelik çalışmaların artırılması gerektiği yaygın kabul gören görüşlerdendir. Yapılan çeşitli çalışmalarda sebze, meyve ve baharatların dengeli tüketiminin özellikle kolon kanseri başta olmak üzere kanser gelişimi riskinde azalma gibi sağlık üzerine yararlı etkileri olabileceği öne sürülmüştür (Terry ve diğerleri, 2001). Koruyucu etkilerin çoğunun polifenoller, terpenler ve alkaloidler gibi bitkilerde çeşitli düzeylerde bulunan fitokimyasallar tarafından oluşturulduğu iddia edilmektedir (Barth ve diğerleri, 2005). Örneğin flavonoidlerin özellikle gastrointestinal kanal, ağız içi ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin engellenmesinde potansiyel bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kuo,

1996). Dünya Kanser Araştırmaları Fonu (The World Cancer Research Fund; WCRF), diyet ve kanserin engellenmesi ile ilgili 2007 yılında yayınlanan raporunda, sebze ve meyvelerin genel olarak ağız, farinks, larinks, özofagus, akciğer ve mide kanserlerini engelleyebileceğini ve nasofarinks, pankreas, karaciğer ve kolorektal kanserlerinde de meyvelerin koruyucu etkileri olabileceğine dair sınırlı verilerin olduğunu belirtmiştir (Ramos ve diğeri, 2011).

Diyet bileşiklerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antimutajenik ve enzim düzenleyici gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelerinden sorumlu farklı yapısal özellikleri vardır. Bu yapısal özellikleri ve etkileri nedeniyle diyetin düzenlenmesinin, kanser ve diğeri genetik hastalıkların engellenmesinde izlenebilecek bir strateji olabileceği bildirilmektedir (Heo, Sohn ve Au, 2001).

Polifenoller antioksidan özelliklerine bağılı olarak hücresel bileşenleri oksidatif hasara karşı koruyabilmekte ve böylece oksidatif stresle ilişkili birçok dejeneratif hastalığın riskini azaltmaktadır (D'Archivio ve diğeri, 2007). Bulgular polifenollerin kalp damar hastalıkları, kanser, osteoporozun engellenmesindeki katkılarını güçlü bir şekilde desteklemekte ve diyabet, nörodejeneratif hastalıklar gibi pekçok hastalıktaki koruyucu rollerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte bu konudaki bilgilerimizin genel populasyon veya bazı özel hastalık grupları için henüz çok sınırlı ve çelişkili olduğu görülmektedir (Scalbert ve diğeri, 2005b).

Günümüzde halen bitkisel ürünlerin birçoğunun yapı ve etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamıştır. Aynı zamanda birçok bitkisel antioksidan maddenin toksisitelerine ve insan sağığına olası risklerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bazı bitkisel ürünlerin *in vitro* bakteri sistemlerinde ve hücre kültürlerinde mutajenik olabildikleri, DNA hasarını indükledikleri belirtilmişse de tersini belirten bulgular da bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen fenolik fitokimyasallar antioksidan özellikleri nedeniyle reaktif oksijen bileşiklerinin zararlı etkilerine karşı organizmanın korunmasında ve radikal hasarına bağılı bozuklukların tedavisinde önemli rol oynamaktadırlar. Ancak bitkilerde yaygın bulunan fenolik bileşiklerin hem antioksidan hem de prooksidan etkileri olabileceği, kimyasal özelliklerinin ve etkilerinin tam olarak belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir (Hadi ve diğeri, 2007).

Bu tez çalışmasında doğal ürünlerde bulunan ve son yıllarda önemi ve dolayısıyla kullanımları artan fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin aynı zamanda antigenotoksik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında fenolik bileşiklerin troloks eşdeğer antioksidan kapasite tayini (TEAK) ile antioksidan özellikleri ve çin hamsteri over hücrelerinde (CHO) nötral kırmızı alım yöntemi (NKA) ile sitotoksik etkileri belirlenmiştir. İnsan lenfosit hücrelerinde sitotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarında genotoksik etkileri ve oksidatif hasara neden olan ve genotoksik etki potansiyeli bilinen H₂O₂'ye karşı antigenotoksik etkileri tek hücre jel elektroforez (Comet) ve mikroçekirdek (MÇ) yöntemleri ile araştırılmıştır.

Son yıllarda hastalıkların önlenmesinde diyetin katkısını anlamak için uzun süreli maruziyet çalışmaları yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalar çok fazla zaman ve masraf gerektirmesi gibi sıkıntılar yaratmaktadır (Davis and Milner, 2007). Bu nedenle ucuz, kolay ve hızlı değerlendirme olanağı sağlayan *in vitro* yöntemler tercih edilmektedir. Hücre kültürlerinde fenolik bileşikler yaygın olarak çalışılmaktadır ancak gözlemlenen sonuçlar oldukça tartışmalıdır. Aynı bileşik için hem koruyucu, hem antiproliferatif ve sitotoksik etkiler bildirilmektedir. Bu bileşiklerin etkin konsantrasyonları, hücre tipi, her bir deneyde kullanılan hücre sayısı ve inkübasyon süresi gibi çok çeşitli faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu durumda fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının kıyaslanması bu parametrelerin sabit tutulması ile mümkün olabilir. Bundan dolayı her ne kadar gerçek fizyolojik konsantrasyonlar ile kıyaslanamasa da, hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar olası biyokimyasal etkiler ve mekanizmalar hakkında değerli bilgiler vermektedir (Kitsati ve diğerleri, 2012). Ayrıca deney hayvanı kullanımı ile ilgili etik şartlar dikkate alındığında, çalışmaların *in vitro* olarak gerçekleştirilmesinin önemi vurgulanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin troloks eşdeğer antioksidan kapasite tayini (TEAK) ile *in vitro* antioksidan özellikleri araştırılmıştır. TEAK yöntemi, kimyasal maddelerin, özellikle yiyecek, içecek ve besin desteklerinin, antioksidan kapasite tayini için ve antioksidanlar tarafından süpürülen radikallerin konsantrasyonlarının ölçülmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan

yöntemlerden birisidir (Huang ve diğerleri, 2005; Lien ve diğerleri, 1999; Rice-Evans ve diğerleri, 1996). TEAK yöntemi oldukça hızlı ve kolay bir yöntemdir ve belirlenen antioksidan kapasite kimyasal maddelerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir (van den Berg ve diğerleri, 2000). Çalışmamızda piknogenol, resveratrol ve rosmarinik asidin 2- 200 μM konsantrasyon aralığındaki, vanilik asit ve sinnamik asidin ise 2- 400 μM konsantrasyon aralığındaki konsantrasyonlarının antioksidan aktivitesi incelenmiştir.

Çalışmamızda piknogenol ve resveratrol 2 μM ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0.05$). Piknogenolün ve resveratrolün antioksidan aktivitesinin, çalışılan tüm konsantrasyonlarda eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bileşenlerinin temel kimyasal yapısına da dayanarak piknogenolün en önemli özelliğinin çok güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olması (Bors ve Michel, 2002; Rohdewald, 2002) ve çok etkili bir serbest radikal süpürücü (Guo, Zhao ve Packer, 1999) olması olduğu vurgulanmaktadır. Piknogenolün antioksidan kapasitesi, çok sayıda çalışmada *in vitro* ve *in vivo* şartlarda ve kültüre edilmiş hücre modellerinde, çok çeşitli yöntemlerle belirlenmiştir (Packer ve diğerleri, 1999). Özellikle hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu ve bu sayede oksidatif stresle bağlantılı birçok hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Kahkönen ve diğerleri, 1999).

Resveratrol de birçok kaynakta hem çeşitli antioksidan enzimlerin uyarılması yoluyla antioksidan kapasiteyi artıran, hem de etkili bir serbest radikal yakalayıcısı doğal bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. 0,1 mM konsantrasyona kadar etkili 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali yakalayıcısıdır. UV radyasyon sonucu H_2O_2 'den oluşan hidroksil radikalini yakalayıp sitokrom c oksidasyonunu önlediği belirtilmiştir (Bradamante ve diğerleri, 2004; Kalantari ve Das, 2010; Kraft ve diğerleri, 2009; Pandey ve Rizvi, 2010).

Piknogenol ve resveratrolün antioksidan etkilerinin yüksek olduğu bulgusu literatürdeki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

Bu çalışmada rosmarinik asit, 2 μM ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0.05$). Ayrıca rosmarinik asidin antioksidan aktivitesinin, 2 μM konsantrasyon harici tüm konsantrasyonlarda

eşdeğer konsantrasyondaki troloksa göre daha fazla olduğu da saptanmıştır ($p<0,05$). Genel olarak biberiye bitkisindeki fenolik yapıdaki moleküllerin antioksidan ve serbest radikal süpürücü olarak etki ettikleri bildirilmiştir. Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis*) ve rosmarinik asit taşıyan ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu belirtilmektedir (Erkan, Ayrancı ve Ayrancı, 2008). *In vitro* ve *in vivo* çalışma sonuçları, bitkinin yetiştiği bölgeye, hasat zamanına, kullanılan bitki kısmına, fenolik yapıya ve konsantrasyona, ekstraksiyon yöntemine, ürün ve oksidasyon koşullarına, analitik yöntem ve hayvan türüne göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Basmacıoğlu-Malayaoğlu, 2010).

Çalışılan maddelerden vanilik asit de 2 μM ve üzerindeki tüm konsantrasyonlarda, oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermiştir ($p<0,05$). Ancak eşdeğer konsantrasyonlardaki troloks ile karşılaştırıldığında, vanilik asidin antioksidan aktivitesinin düşük konsantrasyonlarda (2-25 μM) troloksa göre daha fazla olduğu, yüksek konsantrasyonlarda (50-400 μM) ise daha düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde Tai, Sawano, Yazama ve Ito (2011), çeşitli metodları kullanarak vanilyanın antioksidan aktivitesini askorbik asit ve troloks ile kıyaslamalı olarak araştırmışlardır. 20 μM vanilyanın ABTS radikali süpürücü etkisi incelendiğinde askorbik asit ve troloksdan daha güçlü bir aktivite gösterdiği ancak DPPH radikali veya galvinoksil radikali süpürücü etki göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca ORAC yönteminde ve oksidatif hemoliz inhibisyonu yönteminde de (OxHLIA) askorbik asit ve troloksdan daha güçlü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Tai ve diğerleri, 2011).

Bu tez çalışmasında diğer fenolik bileşiklerden farklı olarak sinnamik asidin 2- 400 μM konsantrasyon aralığındaki 10 farklı konsantrasyonunun (2, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 μM), oksidan özellikteki ABTS'ye karşı antioksidan aktivite göstermediği gözlenmiştir. Sinnamik asidin TEAK ve ORAC yöntemlerinin kullanıldığı birçok araştırmada negatif kontrol olarak da kullanıldığı görülmektedir (Breksa ve Manners, 2006). Bununla birlikte fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri kullanılan test yöntemi ve oksidan madde tipine göre farklılıklar göstermektedir. Sinnamik asit bazı *in vitro* ve *in vivo* test sistemlerinde güçlü bir antioksidan olarak bulunmuştur (Shan ve diğerleri, 2005). Özellikle fenolik hidroksil grubu taşıyan birçok sinnamik asit türevinin, iyi bilinen antioksidanlar oldukları ve güçlü serbest radikal süpürücü özellikleri nedeniyle sağlık üzerine çok sayıda yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (Sova, 2012).

Natella ve diğerkleri (1999), sinnamik asit ve benzoik asidin dört farklı türevini antioksidan aktiviteleri açısından karşılaştırmış ve sinnamik asit türevlerinin daha güçlü antioksidan etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar aromatik eklentileri açısından farklı bileşikleri (p-hidroksi, p-hidroksimetoksi, p-hidroksidimetoksi, dihidroksi) kıyaslamışlardır. Antioksidan aktivite peroksil radikalini yakalama kapasitesini belirleyen yarışmalı kinetik test ve 2,2'-azobis(amidinopropan) dihidroklorid ile başlatılan veya Cu(II) tarafından katalizlenen LDL oksidasyonu kullanılarak ölçülmüştür. Her iki yöntemde de sinnamik asitlerin, benzoik asit benzerlerine göre daha etkili olduğu bildirilmiştir. Aromatik yapıya göre ise kinetik testte, antioksidan aktivite p-hidroksi< p-hidroksimetoksi< dihidroksi< p-hidroksidimetoksi şeklindedir. Örneğin kinetik testte kafeik asit (dihidroksisinnamik asit), sinapik asitten (p-hidroksidimetoksisinnamik asit) daha düşük antioksidan kapasiteye sahiptir. Bunun aksine LDL sisteminde dihidroksi asitler p-hidroksidimetoksi asitler ile eşit ve daha yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen verilere göre, piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin TEAK yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitelerini kendi aralarında değerlendirdiğimizde eşdeğer konsantrasyonlarındaki antioksidan aktivite sıralaması, genel olarak piknogenol $\geq$ resveratrol > rosmarinik asit > vanilik asit şeklindedir. Sinnamik asit çalışılan konsantrasyonlarda, oksidan özellikteki ABTS radikaline karşı antioksidan aktivite göstermemiştir. Bu kıyaslamaya göre, piknogenol ve resveratrolün antioksidan kapasitelerinin birbirine yakın olduğu söylenebilir. Özellikle düşük konsantrasyonları olmak üzere bazı konsantrasyonlarda (2, 2.5, 5, 7.5, 25, 100 μ M) piknogenolün antioksidan kapasitesi resveratrole göre daha yüksek iken, bazı konsantrasyonlarda (10, 50, 200 μ M) ise resveratrolün antioksidan kapasitesi piknogenole göre daha yüksektir. Rosmarinik asit ise çalışılan en yüksek konsantrasyonunda (200 μ M) piknogenol ve resveratrol'den daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir.

Araştırılan fenolik bileşikler diğerk tüm fenolik bileşikler gibi çok çeşitli yollarla antioksidan aktivite gösterme yeteneğindedirler. Fenolik hidroksil grupları iyi hidrojen donörleridir ve hidrojen donörü olan antioksidanlar reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile reaksiyona girebilirler ve yeni radikallerin oluşum döngüsünü kırabilirler (Pereira, Valentão Pereira ve Andrade, 2009). Başlangıçtaki radikal türleri ile etkileşimin devamında ilk radikalden daha kararlı bir kimyasal yapı olarak antioksidanın radikal formu üretilir. Fenoliklerin hidroksil gruplarının benzen halkasının π elektronları ile etkileşimi

moleküllere, daha kararlı serbest radikallerin üretilmesi gibi, çok özel nitelikler kazandırmaktadır. Göreceli olarak daha uzun ömürlü olan bu radikallerin oluşumu radikal aracılı oksidasyon süreçlerini düzenleyebilmektedir (Parr ve Bolwell, 2002).

Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi aynı zamanda, serbest radikallerin üretiminde yer alan metal iyonlarını şelatlanma yeteneklerine bağlıdır (Yang, Landau, Huang ve Newmark, 2001). Bununla birlikte fenolikler metalleri şelatlayıp katalitik aktivitelerini arttırarak veya metalleri azaltıp böylece serbest radikal üretimini arttırarak prooksidan olarak etki edebilirler (Croft, 1998). Sonuç olarak, fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarından kaynaklanan bu oksidan ve prooksidan özellikleri ve antioksidan kapasiteleri aracılığıyla birçok biyolojik ve farmakolojik etki gösterdikleri belirtilmektedir (Pereira ve diğerleri, 2009).

Fenolik bileşiklerle ilgili araştırmalarda diğer bir önemli konu hücre hasarı ve çoğalması üzerine etkilerinin belirlenmesidir. Bu tez çalışmasında piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asidin sitotoksik etkileri, hassas ve yüzeye bağımlı olarak çoğalan hücreler olan Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO), nötral kırmızı alım yöntemi (NKA) ile belirlenmiştir. Sağlıklı memeli hücreleri kültür ortamına ekildiklerinde, devamlı olarak bölünerek sayılarını artırırlar. Ancak ortama eklenen bir kimyasal madde farklı şekillerde bu sürece etki ederek, hücre sayısını etkileyecek şekilde büyüme oranının artmasına ya da azalmasına yol açar. NKA yöntemi, biyomedikal ve çevresel pek çok uygulamada yaygın olarak kullanılan, hücre yaşam ve canlılık hassasiyetini ve hücre hasarını gösteren bir sitoksisite testidir (Borenfreund ve Puerner, 1985; Repetto ve diğerleri, 2008).

Bu tez çalışması sonuçlarına göre; piknogenol 25-125 µg/ml uygulama konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerine herhangi bir sitotoksik etki göstermemiş ancak 150 µg/ml konsantrasyonundan itibaren sitotoksik etki başlamıştır. 300 µg/ml piknogenol konsantrasyonunda ise hücre canlılığı % 50'nin altına düşmüştür. Piknogenolün CHO hücrelerindeki IC₅₀ değeri 285 µg/ml olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Youm ve Kim (2003), piknogenolün hücreler üzerine doza bağlı bir sitotoksik etkisi olduğunu ve 5 µg/ml konsantrasyonda uygulandığında hücre canlılığının kontrole göre az bir oranda daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Piknogenolün çeşitli tiplerdeki proapoptotik uyarılardan sonra hücre ölümü ve canlılığını etkileyebildiği bildirilmiştir (Kobayashi ve diğerleri, 2000; Nardini ve diğerleri, 2000).

Bu tez çalışmasında CHO hücrelerine resveratrolün uygulandığı NKA deneyi sonuçlarına göre, 10 ve 25 μM 'lık konsantrasyonlarında hücre canlılığı normal düzeyde iken, 50 μM konsantrasyondan itibaren sitotoksik etki başlamış ve 150 μM konsantrasyondan sonra hücre canlılığı hızlı bir şekilde düşmüştür. 200 μM ve üzeri konsantrasyonda ise hücre canlılığı % 50'nin altına düşmüştür. Resveratrolün CHO hücrelerindeki IC_{50} değeri 165 μM olarak bulunmuştur.

Resveratrolün doza bağlı olarak mitojen/antijen tarafından indüklenen lenfosit çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (Gao, Xu, Janakiraman ve Chapman, 2001). Diğer yandan resveratrolün genel olarak normal hücre hatlarından ziyade hücre tipine bağlı bir etkiyle, kanser hücre hatlarına sitotoksik etkili olduğu bildirilmektedir. Resveratrol ile ilgili *in vitro* hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, antikanser özelliğinin çeşitli hücre hatlarında G1 fazında veya S-G2 fazı geçişinde hücre döngüsü durdurucu özelliği veya apoptozu tetikleyici özelliği ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Dong, 2003).

Çalışmamızla benzer şekilde Murias ve diğerleri (2005), resveratrol ve 3', 4 ve 5' pozisyonlarında hidroksil grupları taşıyan analogları ile yaptıkları sitotoksisite deneylerinde HL-60 hücrelerinde 10-100 μM konsantrasyon aralığında doza bağlı sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ohyama ve diğerleri (1999), yapı-aktivite ve sitotoksisite ilişkilerini açıklamak üzere, doğal olarak oluşan 4 resveratrol dimeri, 5 trimeri ve 2 tetramerinin ve asetat türevlerinin insan tümör hücre hatlarına (nasofarinks karsinoma, akciğer karsinoma, ileoçekal karsinoma, melanoma, meme kanseri ve yumurtalık kanseri hücreleri) karşı sitotoksik etkilerini kıyaslamalı olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada trimer ve tetramer asetatları sitotoksik etki göstermezken, resveratrol dimerlerinin asetilasyonu sitotoksik aktiviteyi artırmıştır. Diğer yandan bazı asetillenmemiş oligomerler sitotoksik etki göstermemektedir. Genel bir açıklama olarak yapının lipofilikliğindeki artışın hücre alımını artırdığı bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında rosmarinik asit uygulamasının, NKA deneyi sonuçları incelendiğinde, 5-25 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığı normal iken 50-150 µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığının doza bağlı olarak azaldığı ve 200µg/ml konsantrasyonda % 50'nin altına düştüğü görülmüştür. Rosmarinik asidin CHO hücrelerindeki IC₅₀ değeri 167 µg/ml olarak bulunmuştur.

Yeşil-Çelikaş, Sevimli, Bedir ve Vardar-Sukan (2010), *Rosmarinus officinalis*'ten elde edilen rosmarinik asit ve karnosik asidin sitotoksik etkilerini, NCI-H82 (insan akciğer karsinoma hücresi), DU-145 (insan prostat karsinoma hücresi), Hep-3B (insan karaciğer karsinoma hücresi), K-562 (insan kronik miyeloid leukema hücresi), MCF-7 (insan meme adenokarsinoma hücresi), PC-3 (insan prostat adenokarsinoma hücresi) ve MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinoma hücresi) gibi çeşitli kanser hücre hatlarında MTT testi ile incelemişlerdir. Hücreler 48 saat süreyle 6,25 ve 100 µg/ml rosmarinik asit ile muamele edilmiştir. Her ne kadar *Rosmarinus officinalis*'ten elde edilen ekstrakterler farklı hücre hatlarında farklı oranlarda sitotoksik etkilere yol açtılsa da kıyaslamalı olarak değerlendirildiğinde 12,5 ve 47,55 µg/ml aralığındaki düşük IC₅₀ değerleri ile K-562 hücre hattının en hassas hücre hattı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre biberiye bitkisinin antikanser diyetler için iyi bir aday olabileceği ileri sürülmüştür.

Bu tez çalışmasında vanilik asit ve sinnamik asidin de NKA yöntemi ile 8 farklı konsantrasyonunun (2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 µM) CHO hücrelerindeki hücre canlılığı ve çoğalması üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. NKA deneyi sonuçlarına göre; hem vanilik asit hem de sinnamik asit çalışılan 2-400 µM konsantrasyon aralığında hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir.

Babich ve Visioli (2003), içlerinde vanilik asit ve sinnamik asidin de olduğu, zeytinyağından elde edilen 9 farklı fenolik asidi, oral kavite dokularından elde edilen çeşitli insan hücrelerinde NKA yöntemi ile kıyaslamalı olarak incelemişlerdir. Kullanılan hücre hatları normal dişeti fibroblastları, nontümörojenik dişeti epitelyal hücreler ve tükürük bezinden elde edilen karsinoma hücreleridir. Fenolik bileşikler 2-10 mM konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir. Bu üç hücre hattının fenolik bileşiklere karşı göreceli olarak duyarlılıklarında bir farklılık bildirilmemiştir. Genel olarak tüm hücre tipleri için sinnamik asidin vanilik aside kıyasla hücrelere daha toksik olduğu gösterilmiştir.

Niero ve Machado-Santelli (2013), sinnamik asidin IC_{50} değerinin HT-144 hücrelerinde 2,4 mM olduğunu bildirmişlerdir. Hücre büyümesinin inhibisyonu muhtemelen DNA sentezinin inhibisyonuna neden olan DNA hasarları ve nükleer anormallikler ve sonrasında apoptozun indüklenmesi ile ilişkili olduğu açıklanmıştır. Aktive edilmiş kaspaz 3 boyaması yöntemiyle HT-144 hücrelerinde 3,2 mM sinnamik asidin 24 saatlik inkübasyonu sonunda apoptozun indüklendiği belirlenmiştir.

Akao ve diğerleri (2003), propolisten elde edilen sinnamik asit türevi bileşiklerin insan tümör hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada propolisten elde edilen bakkarin ve drupanin adlı iki sinnamik asit türevinin 30 mM üzerindeki konsantrasyonlarda insan tümör hücre hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ederek ve özellikle apoptoza yol açarak antitümör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu  alışma ile benzer şekilde, Mishima, Ono, Araki, Akao ve Nozawa (2005) araştırmalarında Brezilya bal arısı propolisinden elde edilen bu iki bileşiğin fare sarkoma S-180 hücrelerinde de hücre çoğalmasını inhibe edici etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hücre içinde oluşan serbest radikallerin başlıca hedeflerinden biri DNA olduğundan, güncel pek çok araştırmada fenolik bileşiklerin yalnızca sitotoksik etkilerinin değil, aynı zamanda oksidatif DNA hasarına karşı genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır (Lodovici ve diğerleri, 2001). Diğer yandan antioksidan bileşikler çeşitli maddeler ile bir arada uygulandığında, onların DNA hasarına etkilerini değiştirebilmektedir. Diyetel ajanlar tarafından DNA hasarının engellenmesi ve/veya DNA onarım aktivitesinin arttırılması, mutasyonların ve devamında karsinogenik süreçlerin engellenmesi için önemli bir stratejidir. Bu durum fenolik bileşiklerin DNA hasarına neden olan maddelere karşı antigenotoksik etkilerinin değerlendirmesini de gerektirmektedir. Diyetle yararlı etkileri olan fitokimyasalların takviyesi ile organizmadaki konsantrasyonları artmaktadır, bu durum da fitokimyasalların genotoksisite/ antigenotoksisite deneylerinde farklı konsantrasyon aralıklarında değerlendirilmesini gerektirmektedir. Fizyolojik konsantrasyonlarda yararlı ve güvenli olabilen bir fitokimyasal, yüksek konsantrasyonlarda toksik etkili olabilmektedir (Ramos ve diğerleri, 2011). Bu amaçla bu tez çalışmasında da fenolik bileşikler sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkileri açısından değerlendirilmiştir. Piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asit farklı konsantrasyon aralıklarında antioksidan özellikleri

ve sitotoksik etkileri belirlendikten sonra, genotoksik ve antigenotoksik etkileri sitotoksik etkili olamayan konsantrasyonlarda test edilmiştir.

Bu tez çalışmasında fenolik bileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkileri, insan lenfosit kültürlerinde comet ve MÇ yöntemleri ile araştırılmıştır. Diyetel fitokimyasalların etkilerinin araştırılmasında bu iki yöntem en sık tercih edilen genotoksisite yöntemlerindendir (Ramos ve diğerleri, 2011). Hücrelerde oksidatif olayların neden olduğu genetik hasarı ve antioksidanlar tarafından oluşturulan iyileştirici cevapları belirlemek üzere son yıllarda comet testi etkin ve hızlı bir yöntem olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Anderson, 1996). *In vitro*, *in vivo* ve hatta insan çalışmalarına kadar birçok deneysel modelde comet testi aracılığı ile diyetel ajanların DNA hasarına karşı (oksidatif ve/veya alkileyici) koruyucu etkiler gösterme potansiyelinde oldukları gösterilmiştir. Daha az olmakla birlikte bir kısım yayınlarda da diyetin DNA onarımının düzenlenmesindeki etkileri bildirilmiştir. Diyetel ajanların kemoterapi üzerine etkilerinin anlaşılması için tüm bu çalışmalarda comet tekniğinin yararlı bir yöntem olacağı belirtilmektedir (Ramos ve diğerleri, 2011). MÇ testi de genotoksik (klastojenik) ya da genotoksik olmayan (aneujenik-turbojenik) kimyasal maddeleri saptamada uzun zamandır kullanılan yöntemlerdendir. MÇ'ler hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmanları veya tüm bir kromozom kaybını göstermektedir. Bu nedenle *in vitro* MÇ testi, mutajenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir ve kimyasal maddelerin DNA hasarı üzerine etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Fenech 2000).

Genotoksisitenin değerlendirilmesi, mutajenin DNA ile etkileşiminin ve DNA üzerindeki etkilerinin farklı aşamalarında gerçekleştirilmektedir. Kimyasal mutajenler için DNA bağlanma kapasitesi DNA katım ürünleri yönünden değerlendirilebilir. Doğrudan DNA kırıklarına yol açma kapasitesi alkali tek hücre jel elektroforezi (comet) yöntemi ile belirlenir. Hücre döngüsündeki aşamaya, onarım kapasitesine, hücrelerin genetik geçmişine ve uygulanan mutajenin tipine göre indüklenen DNA hasarının yalnızca bir bölümü kalıcı mutasyonlara dönüşebilir. Bu kromozom ve/veya genom mutasyonları interfaz ve metafaz aşamasındaki hücrelerde MÇ veya kromozom aberasyonları gibi yöntemlerle belirlenebilir. Bu yöntemlerin sonuçlarının kıyaslanması kromozom ve/veya genom mutasyonlarına dönüştürülen DNA kırık miktarının belirlenmesini sağlayabilir. Dolayısıyla *in vitro* deneylerde comet ve MÇ yöntemlerinin bir arada uygulanması,

genotoksik etkilerin belirlenmesinde mutajenitenin ve klastojenitenin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında ve etkili en düşük konsantrasyonun belirlenmesinde özellikle önerilmektedir (Van Goethem, Lison ve Kirsch-Volders, 1997). Dolayısıyla bu tez çalışmasında piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinamik asidin genotoksik ve antigenotoksik etkileri hem comet hem de MÇ testleri ile değerlendirilmiştir.

Piknogenolün comet yönteminde 6 farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50, 100, 150 µg/ml) sağlıklı insan lenfositlerine uygulanması sonrasında, düşük konsantrasyonlarında (5-50 µg/ml) negatif kontrole kıyasla DNA hasarı oluşturmadığı, en yüksek iki konsantrasyonunun (100 ve 150 µg/ml) ise DNA hasarına neden olduğu görülmüştür. Comet testi ile benzer şekilde MÇ yönteminde de piknogenolün düşük konsantrasyonlarında (5-50 µg/ml) MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı ancak en yüksek iki konsantrasyonunda ise (100, 150 µg/ml) kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0,05$) oluşturduğu belirlenmiştir.

Piknogenol ile ilgili az sayıdaki çalışmada genellikle DNA hasarına neden olmadığı bildirilmiştir (Rohdewald, 2002). *In vivo* araştırmalarda fare kemik iliği hücrelerinde MÇ yöntemi sonuçlarına göre 1500 mg/kg piknogenolün, kromozomal anormalliklere neden olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde insan lenfositlerinde 600 µg/ml konsantrasyona kadar kromozomal anormalliklere neden olmadığı bildirilmiştir (Rohdewald, 2005). Piknogenolün genotoksik etkili olmadığı ve özellikle düşük dozlarında güvenli şekilde kullanılabileceği söylenmektedir. Bu araştırmada sadece yüksek konsantrasyonlarda belirlenen zayıf genotoksik etkisinin ise güçlü bir antioksidan olduğu bilinen bu maddenin prooksidan etkisi de olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda comet yönteminde piknogenol muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan grupların hepsinde, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirilen DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde MÇ testinde H₂O₂ ile birlikte piknogenol uygulanan tüm gruplarda % MÇ frekansında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak piknogenol, uygulanan tüm konsantrasyonlarında lenfositlerde H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etki göstermiştir.

Bu tez çalışmasının verileri ile benzer şekilde piknogenolün DNA hasarına karşı antimutajenik ve antigenotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir (Rohdewald, 2002). Çam iğne ekstrelerinin OH radikali ve hücre içi reaktif oksijen türlerini süpürücü güçlü bir etkisi olduğu ve demir iyonunu şelatladığı, hücreleri p21 ve BAX protein ekspresyonunu azaltarak ve Bcl-2 proteinini artırarak oksidatif hasardan koruduğu iddia edilmiştir (Jeong, Seo ve Jeong, 2009).

Aydın, Ünsal, Şekeroğlu, ve Gülbahar (2011) piknogenolün sıçan kemik iliğinde sisplatin tarafından indüklenen kromozomal aberasyonların sıklığını düşürdüğünü ve mitotik indeksi yükselttiğini bildirmişler, sisplatin toksisitesine karşı, piknogenolün yararlı bir koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Genel olarak piknogenolün oksidatif stres tarafından indüklenen çok çeşitli patolojik koşullara karşı birçok yararlı etkisi olduğu bildirilmiştir (Maritim, Sanders ve Watkins III; 2003; Mochizuki ve Hasegawa, 2004). Piknogenolün içeriğindeki fenolik bileşiklerin kateşol yapısı, oksijen metabolizmasında önemli bir rol alan bakır ve demir gibi geçiş metallerini şelatlama yeteneğine sahiptir (Cao, Sofic ve Prior, 1997). Piknogenolün, reaktif oksijen türlerinin oluşumunda rol oynayan siklooksijenaz, protein kinaz C, NADH oksidaz, lipoksijenaz, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği bilinmektedir (Moini, Guo ve Packer, 2000). Piknogenol ayrıca askorbil radikallerini yeniden oluşturmakta ve endojen E vitamini ve glutasyonu oksidatif stresten korumaktadır (Rimbach, Virgili, Park ve Packer, 1999; Virgili, Kobuchi ve Packer, 1998). Piknogenolün gen ekspresyonunu, enzim ve diğer moleküller üzerinde rolü olduğu birçok yayında bildirilmektedir (Maritim, Dene, Sanders ve Watkins III, 2003; Moini, Guo ve Packer, 2000; Rimbach ve diğerleri, 1999).

Bu tez çalışmasında resveratrolün beş farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) genotoksik ve antigenotoksik etkileri comet ve MÇ yöntemleriyle araştırılmıştır. Comet yönteminde sağlıklı insan lenfositlerine resveratrolün tek başına uygulamasının DNA hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Resveratrol muamelesinin ardından H_2O_2 uygulanan tüm gruplarda, tek başına H_2O_2 uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde MÇ testinde, resveratrolün tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığında resveratrolün (5-100 μ M) MÇ oluşumunda

anlamalı bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansı kontrole göre önemli derecede artmış, H₂O₂ ile birlikte resveratrol uygulanan tüm gruplarda ise % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Sonuç olarak, resveratrol 5-100 µM konsantrasyon aralığında insan lenfositlerinde genotoksik etki oluşturmamakta ayrıca H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarına ve MÇ oluşuma karşı koruyucu bir etki göstermektedir.

Literatürde resveratrolün genotoksik ve antigenotoksik etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Yen ve diğerleri (2003), resveratrolün insan lenfositlerinde H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini araştırmışlar ve bulgularımıza benzer şekilde 10-100 µM konsantrasyon aralığında sitotoksik ve genotoksik etki göstermediğini ayrıca H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarının resveratrol tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Çalışılan konsantrasyon aralığında resveratrolün doza bağlı olarak GSH düzeylerini ve GPx, GR, GST aktivitelerini artırırken CAT aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsan lenfositlerinde H₂O₂ tarafından oluşturulan DNA hasarında resveratrolün koruyucu etkisinin GSH düzeyindeki artış ve antioksidan enzim aktivitelerindeki iyileştirici etki ile açıklanabileceği belirtilmiştir.

Resveratrol; uygulama dozları, deney koşulları ve kullanılan test sistemlerine bağlı olarak çok farklı etkiler gösterebilmektedir. Resveratrolün CHO hücrelerinde de tek başına DNA hasarına sebep olmadığı, bununla birlikte yüksek dozda DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Ancak resveratrolün, H₂O₂ ile birlikte eş zamanlı uygulandığında koruyucu bir etki göstermediği, H₂O₂ uygulamasından 3 saat önce uygulandığında primer DNA hasarını tamamen engellediği gösterilmiştir (De Salvia ve diğerleri, 2002).

Türkez ve Şişman (2011), *in vitro* insan lenfosit kültürlerinde resveratrolün aflatoksin B₁ tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini kromozom anormallikleri ve kardeş kromatit değişimi testleri ile araştırmışlar ve resveratrolün aflatoksin B₁'in neden olduğu kardeş kromatit değişimi frekansını ve kromozom hasarını azaltarak koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada resveratrolün (10, 15, 25, 40, 75 ve 100 µM) uygulandığı gruplarda kontrol gruplarına kıyasla hücre başına düşen kardeş kromatit değişimi ve kromozom anormalliği oranının değişmediği ve resveratrolün mutajenik ve klastojenik etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçların aynı zamanda Stagos ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Stagos ve diğerleri

(2007) resveratrolün tek başına uygulanmasının insan lenfositlerinde genotoksik olmadığını ve kardeş kromatit değişimini indüklediğini bildirmişlerdir. Sgambato ve diğerleri (2001), resveratrolün birçok genotoksik ajanın neden olduğu oksidatif DNA hasarını engelleyerek antimutajenik ve antikanserojenik bir ajan olarak etki edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Bunun tersine Matsuoka ve diğerleri (2001), resveratrolün Çin hamsteri akciğer hücre hattında kardeş kromatit değişimini indüklediğini fakat kromozom anormalliklerine neden olmadığını bildirmişlerdir. Yan ve diğerleri (2011) de resveratrolün insan lenfosit kültürlerinde etanol tarafından indüklenen DNA hasarına karşı önemli bir koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Quincozes-Santos ve diğerleri (2007), resveratrolün C6 glioma hücrelerinde H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif stres koşulları altında DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Resveratrolün DNA koruyucu etkileri ile ilgili çok çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Bisht ve diğerleri, 2010). Resveratrolün 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-p-dioksin veya östradiol ile muamele edilmiş MCF-10F hücrelerine eş zamanlı uygulanması ile östrojen metabolizmasını ve DNA katım ürünü oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lu ve diğerleri, 2008). Benzo(α)piren tarafından indüklenen sperm DNA hasarı ve hücre ölümü resveratrolün yine eş zamanlı muamelesi ile engellenmiştir. Resveratrol sperm DNA'sında BaP-diol-epoksit oluşumunu ve apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü inhibe etmiştir (Revel ve diğerleri, 2001). Başka bir çalışmada, 8 mg/kg/gün resveratrolün 30 hafta boyunca 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile birlikte oral olarak takviye edilmesi sıçan lökositlerini DMH tarafından indüklenen DNA hasarı ve oksidatif strese karşı korumuştur. Resveratrolün antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GR, GPx ve GST) düzeylerini düzenlediği bildirilmiştir (Sengottuvelan, Deeptha ve Nalini, 2009). Reaktif oksijen türlerinin oluşumu baz oksidasyon ürünlerinin oluşumunu arttırarak DNA hasarına sebep olur. Örneğin 8-okso-7,8-dihidro-2-deoksiguanozin (okso8dG), guanin içeren bölgelerin C-8 hidroksilasyonu ile oluşan baz oksidasyon ürünlerinden biridir ve okso8dG oranı DNA hasarının en önemli göstergelerinden biridir (Floyd, 1990). Resveratrol, böbrekte serbest radikal oluşumuna neden olarak karsinojenik etki gösteren potasyum bromatın indüklediği DNA hasarına karşı okso8dG düzeyini azaltarak koruyucu etki göstermektedir (Cadenas ve Barja, 1999). Resveratrol ayrıca felç yatkınlığı olan sıçanların kas hücrelerinde okso8dG düzeylerini düşürerek oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir (Mizutani ve diğerleri, 2000). Bununla birlikte resveratrolün UVA maruziyeti ile eş zamanlı olarak

uygulanması HaCaT insan keratınositlerinde okso8dG oluşumunu arttırmış ve DNA zincir kırıklarına ve hücre ölümüne yol açmıştır (Seve ve diğeri, 2005).

Resveratrolün moleküler ve biyokimyasal etki mekanizmaları çeşitlilik göstermektedir. Resveratrolün, çoklu ilaç direnç proteini, topoizomeraz II, DNA polimeraz, östrojen reseptörleri, tubulin ve F1-ATP gibi çeşitli hücre sinyal proteinine bağılandığı gösterilmiştir. Resveratrol, aynı zamanda çeşitli transkripsiyon faktörlerini (NF- κ B, STAT3, HIF-1 alfa, beta-katenin ve PPAR gama) aktive ederek antiapoptotik gen ürünlerini (Bcl-2, Bcl-XL, XIAP ve survivin) baskılamakta, protein kinazları (src, PI3K, JNK, ve AKT) inhibe etmekte, antioksidan enzimlerin (CAT, SOD ve hemooksijenaz-1) aktivitesini artırmakta, inflamatuvar belirteçler (NF, COX-2, iNOS, ve CRP) ile anjiyogenik ve metastatik gen ürünlerinin (MP, VEGF, katepsin D ve ICAM-1) aktivitesini baskılamakta ve hücre siklus genleri (53, Rb, PTEN, siklinler ve CDK) üzerine düzenleyici etki göstermektedir (Keskin ve diğeri, 2009).

Çalışmamızda rosmarinik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5, 10, 25, 50, 100, 200 μ g/ml) sağıklı insan lenfositlerine uygulanması sonrasında, düşük konsantrasyonlarında (5-50 μ g/ml) negatif kontrole kıyasla DNA hasarı oluşturmadığı ancak en yüksek iki konsantrasyonunun (100 ve 200 μ g/ml) DNA hasarında istatistiksel olarak artışa neden olduğu görülmüştür. Rosmarinik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan gruplar, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında, düşük dozlarda koruyucu etki görülmeyişi, yüksek dozlarda DNA hasarında bir azalma olduğu yani koruyucu etki gösterdiğı belirlenmiştir. Bu çalışmada MÇ testinin sonuçları da comet testi ile uyumludur. Rosmarinik asidin tek başına uygulandığı gruplar, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında düşük konsantrasyonlarında (5-50 μ g/ml) MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı, yüksek iki konsantrasyonunda ise (100 ve 200 μ g/ml) kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu belirlenmiştir. H₂O₂ ile birlikte rosmarinik asit uygulanan tüm gruplarda ise tek başına H₂O₂ uygulanan gruplara kıyasla % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Sonuç olarak rosmarinik asit düşük konsantrasyonlarında insan lenfositlerinde genotoksik etki göstermezken sadece yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki oluşturmaktadır. Bununla birlikte rosmarinik asit, H₂O₂'nin neden olduğu DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir.

Bu çalışma ile benzer şekilde rosmarinik asidin genotoksik ve antigenotoksik etkilerine ilişkin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Rosmarinik asidin hem kimyasal maddelerle indüklenmiş kromozom hasarı ve kaybına, hem de primer DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Furtado ve diğerleri (2010), doksorubisine karşı rosmarinik asidin koruyucu etkilerini V79 hücrelerinde MÇ ve comet yöntemleri ile araştırmışlardır. Rosmarinik asidin tek başına genotoksik etkili olmadığı, bununla birlikte doksorubisin tarafından indüklenen MÇ frekansını ve DNA hasarını istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Rosmarinik asidin çeşitli dozlarının doksorubisine karşı antimutajenik etkileri *in vivo* olarak Swiss farelerin periferik kan hücrelerinde MÇ yöntemi ile araştırılmıştır. Rosmarinik asidin üç farklı dozu (50, 100, 200 mg/kg) ile muamele edilen farelerde, kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Rosmarinik asitle birlikte doksorubisin verilen hayvanlarda sadece doksorubisin verilen hayvanlara kıyasla MÇ frekansında önemli bir azalma gözlenmiştir. Her ne kadar bu koruyucu etkinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmese de, doksorubisin toksisitesine karşı rosmarinik asidin etkisinin güçlü antioksidan aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Furtado ve diğerleri, 2008).

Pereira ve diğerleri (2005), comet yöntemini kullanarak rosmarinik asidin Wistar sıçanların beyin dokusu ve periferik kan hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığını belirlemişlerdir. De Oliveira ve diğerleri (2012) ise farelerde etanol tarafından indüklenen DNA hasarına karşı rosmarinik asidin koruyucu etkilerini, comet ve MÇ testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada 100 mg/kg rosmarinik asidin antigenotoksik kapasitesi etanolden önce, eş zamanlı ve sonra uygulanarak, periferik kan ve beyin hücrelerinde comet, kemik iliği hücrelerinde ise MÇ yöntemleriyle belirlenmiştir. Sonuçlar rosmarinik asidin etanol tarafından indüklenen DNA hasarının derecesini, her iki dokuda ve tüm farklı uygulama zamanlarında azaltabildiğini göstermiştir.

Rosmarinik asidin, N2A nöronal hücrelerde de H_2O_2 tarafından indüklenen genotoksositeye karşı koruyucu etkisi comet yöntemi ile araştırılmıştır. Hücreler 12 saat süreyle 1-25 μM rosmarinik asit ile, devamında 24 saat 100 μM H_2O_2 ile muamele edilmiştir. 25 μM rosmarinik asit uygulanan hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla hasar olmadığı, 1-25 μM konsantrasyon aralığında rosmarinik asit uygulanmasının ardından 100 μM H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarının azaldığı gözlenmiştir. 25 μM rosmarinik asit

uygulanan hücrelerde bu azalma her ne kadar kontrol düzeyinde olmasa da istatistiksel olarak daha az orandadır (Ghaffari ve diğerleri, 2014).

Rosmarinik asidin antigenotoksik etkileri ile ilgili bulgularımız rosmarinik asidin (25 μ M) insan lenfositlerinde gamma ve UV radyasyon tarafından indüklenen MÇ frekansını azalttığını belirleyen Del Bano ve diğerleri (2006) ve Sanchez-Campillo ve diğerlerinin (2009) bulgularıyla da benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, diğer fenolik bileşiklerle benzer şekilde vanilik asidin altı farklı konsantrasyonunun (5, 25, 50, 100, 500 ve 1000 μ M) genotoksik ve antigenotoksik etkileri comet ve MÇ yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre hem comet hem de MÇ testlerinde sağlıklı hücrelerde tek başına vanilik asit uygulamasının DNA hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Bununla birlikte comet testinde vanilik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde MÇ testinde H₂O₂ ile birlikte vanilik asit uygulanan tüm gruplarda % MÇ frekansında azalma gözlenmiştir. Bu azalma en düşük doz harici tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Sonuç olarak vanilik asit insan lenfositlerinde genotoksik bir etkiye neden olmamakta, ancak H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarı ve MÇ oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir.

Bu çalışma ile benzer şekilde, Erdem ve diğerleri (2012), vanilik asidin *in vitro* insan periferik kan lenfosit kültüründe mitomisin-C (MMC) tarafından indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini incelemişler, 1 μ g/ml konsantrasyonda vanilik asidin MMC tarafından indüklenen DNA hasarını ve MÇ içeren hücre frekansını istatistiksel olarak önemli oranda azalttığını ancak yüksek konsantrasyondaki vanilik asidin (2 μ g/ml) tek başına genotoksik etki oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Vanilik asit, sahip olduğu hidroksil grubu sayesinde antioksidan etki göstermektedir (Tai ve diğerleri, 2012). Vanilik asidin deneysel olarak karsinogenez oluşturulmuş olan sıçanlarda da koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Tsuda ve diğerleri, 1994). Literatürde vanilik asidin doğrudan genotoksik ve antigenotoksik özelliklerini araştıran çok sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Ancak vanilyanın antimutajenik, antioksidan ve antikarsinojenik özellikleri daha detaylı olarak araştırılmıştır (Tai ve diğerleri, 2011; Kumar ve diğerleri, 2012). Aslında vanilyanın okside formu olan vanilik asit, vanilyadan

daha fazla serbest radikal süpürücü etki göstermektedir (Sasaki ve diğerleri, 1990). *In vivo* şartlarda vanilyanın fare kemik iliğinde MMC tarafından indüklenen MÇ frekansını azalttığı bildirilmiştir (Inouye ve diğerleri, 1998). *In vitro* bir araştırmada ise vanilyanın V79 hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir (Tamai, Tezuka ve Kuroda, 1992).

Bu tez çalışmasında son olarak sinnamik asidin genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Sinnamik asidin sağlıklı lenfositlerde altı farklı konsantrasyonunun (5, 25, 50, 100, 500 ve 1000 µM) uygulaması sonucunda DNA hasarı oluşturmadığı, bununla birlikte sinnamik asit muamelesinin ardından H₂O₂ uygulanan tüm gruplarda, tek başına H₂O₂ uygulanmış olan pozitif kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) bir azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde MÇ testinde sinnamik asidin uygulandığı gruplarda negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında MÇ oluşumunda anlamlı bir artışa neden olmadığı, H₂O₂ ile birlikte uygulandığında ise % MÇ frekansında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma sağladığı gözlenmiştir.

Kitsati ve diğerleri (2012), bu tez çalışması ile benzer şekilde çeşitli sinnamik asit türevlerinin (trans-sinamik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kafeik asidin metil ve propil esterleri) H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı hücreleri koruyucu etki kapasitelerini araştırmışlardır. Her bir bileşiğin etkin koruyucu özelliklerinin, hücreye girme ve hücre içindeki demiri şelatlama yeteneklerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre fenolik asidin aromatik halkasında orto-hidroksi grubunun bulunması oksidatif stres koşullarında hücresel DNA'nın korunmasını sağlamaktadır.

Literatürde sinnamik asidin özellikle yüksek dozlarında genotoksik etkileri olabileceğini gösteren yayınlar bulunmaktadır. Niero ve Machado-Santelli (2013), sinnamik asidin genotoksik etkilerini insan melanoma hücre hattı HT-144 hücrelerinde ve insan melanosit hücre hattında (NGM) incelemişlerdir. 3,2 mM sinnamik asit NGM hücrelerinde MÇ frekansını artırmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar sinnamik asidin melanoma hücrelerinde anti-proliferatif etkileri olduğunu bununla birlikte melanositlerde artan MÇ frekansının genotoksik etkilere neden olmasından dolayı daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Maistro ve diğ erleri (2011), sinnamik asit ve türevleri, kafeik asit ve ferulik asidin sıçan hepatoma doku hücrelerinde (HTC) comet yönteminde genotoksik etkiye neden olmadığını ancak M  testinde her üç fenolik bileşiğin M  frekansında artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna göre bu fenolik bileşiklerin HTC hücrelerinde klastojenik etkiye sahip olabilecekleri bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında araştırılan tüm fenolik bileşiklerin M  testinde nükleer bölünme indeksi de sayılmıştır. Fenolik bileşiklerin uygulandığı tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla bir azalma olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Genel olarak diyet destekleri içinde en yaygın olarak kullanılan grup fenoller olmasına rağmen bu bileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar halen yeterli değildir ve yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar tartışmalıdır (Maistro ve diğ erleri, 2011). Fenolik bileşiklerin moleküler mekanizmalarının detaylı bir şekilde anlaşılması etkilerinin belirlenmesinde oldukça  onemlidir. Fenolik bileşiklerin ve tüm diğ er bitkisel gıda desteklerinin artan orandaki tüketiminin zararsız olmayacağı bilinmelidir (Mennen, Walker, Bennetau-Pelissero, 2005). Yapılan araştırmalara göre tannik asit, kumarin, vanilin, kafein ve sinnamik aldehit gibi fenolik bileşiklerin memeli hücrelerinde mutajenik etkileri olduğu bildirilmiştir (Ferguson, van Zijl, Holloway, Jones, 1985; Sanyal, Darroudi, Parzefall, Nagao ve Knasmüller, 1997). Fenolik bileşiklerin yüksek dozlardaki genotoksik etkileri; DNA interkalasyonu, DNA topoizomerez II hasarı, serbest radikal üretimi ve anahtar enzimlerin inhibisyonu gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Stopper, Schmitt ve Kobras, 2005).

Fenolik bileşiklerin etkileri altında yatan mekanizmaların tam ve doğru şekilde açıklanabilmesi için farklı hücre kültürlerinde, farklı yöntemlerin uygulanması da  onemlidir. Yapılan bazı çalışmalarda etkisi incelenen fenolik bileşiklerin comet yöntemiyle genotoksik etki göstermedikleri ancak M  testinde klastojenik etkili oldukları belirlenmişlerdir. Comet testi, primer DNA hasarının göstergesidir ve DNA katımlarının veya zincir kırıklarının mutasyon oluşumu sırasında genellikle ilk basamak olarak meydana geldikleri, hasar sonrasında onarılabilecekleri bilinmektedir (Brendler-Schwaab ve diğ erleri, 2005). Diğ er yandan M  yapıları genellikle hücre bölünmesi sırasında kromozomal parçacıkların kaybı ile ortaya çıkan klastojenik bir etkidir (Salamone ve diğ erleri, 1980). M  aynı zamanda tüm bir kromozom kaybı ile de ortaya çıkabilir ki bu

anojenik etkiler comet testi ile tespit edilememektedir. Maistro ve diğerleri (2011) araştırmalarında fenolik asitlerden kafeik, ferulik ve sinamik asidin HTC hücrelerinde MÇ testinde klastojenik etki gösterdiğini bildirmeleri bu durumu desteklemektedir. Bununla birlikte fenolik asitler oldukça geniş bir alanda terapötik etkiler göstermektedir ve bu bileşiklerin hem yüksek veya kümülatif dozlarının, hem de düşük dozlarının insan sağlığı üzerine etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

Birçok fenolik bileşiğin izole olarak genotoksik etki oluştururken (Noel, Kasinathan ve Rath, 2006), diğer bileşiklerle bir arada olduğunda genotoksik etkiyi iyileştirici, engelleyici etkiler gösterebildiği unutulmamalıdır (Siddique ve Afzal, 2009). Bu tez çalışmasında araştırılan fenolik bileşikler, genotoksik etki potansiyeli bilinen H_2O_2 'ye karşı antigenotoksik etkileri açısından değerlendirilmiştir. H_2O_2 , oksidatif stres sırasında üretimi artan ve proteinlere, nükleik asitlere, hücre membranlarına zarar verdiği ve kanser, yaşlanma ve ayrıca birçok kronik nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu bilinen bir bileşiktir (Daroui, Desai, Li, Liu ve Liu, 2004). H_2O_2 aslında çiftleşmemiş elektronları olmadığı için kendisi bir serbest radikal değildir (Yen ve diğerleri, 2003). Ancak H_2O_2 'nin özellikle Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikali aracılığıyla oksidatif DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1992; Josephson, Silverman, Lakatta, Stern ve Zweier, 1991). *In vivo* koşullarda H_2O_2 , O_2 nin iki değer indirgenmesi ile doğrudan veya O_2^- nin tek değer indirgemesi ile dolaylı olarak üretilir. H_2O_2 , oksijenin ksantin oksidaz, ürikaz, D-amino asit oksidaz, α -hidroksi asit oksidaz gibi çok çeşitli oksidazlar tarafından indirgenmesiyle oluşan temel üründür. H_2O_2 , CAT ve peroksidaz gibi redoks aktif metal kompleksleri tarafından katalizlenen bir reaksiyonla H_2O ve O_2 ye ayrışır. H_2O_2 ayrıca O_2^- ile reaksiyona girerek, Fe^{+2} varlığında hidroksil radikali üreten Haber-Weiss reaksiyonunu başlatır (Ray ve Hussain, 2002). Hidroksil radikali ise DNA hasarına neden olan en önemli serbest radikaldir (Tsuda, 1981).

H_2O_2 'nin mutajenik ve kanserojenik olduğu; hayvanlarda kanser oluşumu ile ilişkili olduğu birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Andreoli, Leopardi, Rossi ve Crebelli, 1999; Pryor, 1986). Karsinogenezin başlama ve ilerleme safhalarında rol aldığı bilinmektedir (Birnboim, 1986). Ayrıca kromozom anormallikleri, kardeş kromatit değişimi, tek zincir kırıkları ve çift zincir kırıkları şeklinde çeşitli formlarda DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Prise, Davies ve Michael, 1989; Sofni ve Ishidate, 1984; Thibodeau ve Paquette, 1999; Tsuda, 1981; Siddique ve Afzal, 2009).

Bu tez çalışmasında da H_2O_2 , hem comet testinde hem de MÇ testinde DNA hasarına neden olmuştur. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan konsantrasyonları ile uyumlu olarak comet testinde 50 μM H_2O_2 uygulanan tüm gruplar, kontrol grubu ile kıyaslandığında kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmelerinin hepsinde istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmuştur. Aynı şekilde MÇ testinde 100 μM H_2O_2 uygulanan tüm gruplarda, kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir.

İnsan lenfosit kültürlerinde 50, 100, 200 μM H_2O_2 'nin doza bağlı olarak lipit peroksidasyonunu ve MÇ frekansını artırdığını bildirilmiştir. Oksidatif stres sırasında üretilen iyon radikalleri, lipit peroksidasyon olarak bilinen zincir reaksiyona neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu tarafından üretilen aldehitler ise DNA katım ürünlerine ve lipit hidroperoksitlerini (LOOH) oluşturarak tek ve çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (Devipriya, Sudheer, Srinivasan ve Menon, 2008; Siddique, Beg ve Afzal, 2009).

Bu çalışmada genel olarak piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin çeşitli konsantrasyonlarının H_2O_2 ile birlikte uygulandığı gruplar, tek başına H_2O_2 uygulanan grup ile kıyaslandığında DNA hasarında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Yapılan birçok çalışma doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin, artan düzeylerde H_2O_2 'ye maruz kalan nükleer DNA'yı ve temel hücresel yapıları koruyucu özelliklerinin, hücreler arası demire bağlanma kapasitelerine bağlı olduğunu göstermiştir (Kitsati ve diğerleri, 2012; Doulias ve diğerleri, 2005; Melidou ve diğerleri, 2005; Nousis ve diğerleri, 2005). Ayrıca tüm fenolik bileşikler (fenolik asitler, polifenoller ve özellikle flavanoidler) bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan, bir veya daha fazla aromatik halkadan oluşmuştur; bu sayede fenoksil radikallerini oluşturarak potansiyel birer serbest radikal tutucu olarak görev yaparlar (Rice-Evans, Miller ve Pananga, 1996).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkilerde ikincil metabolitler olarak bilinen doğal bileşiklerin, oksidatif stres tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı koruyucu etkileri olduğu birçok çalışmada gösterilmektedir. Bu nedenle özellikle son 20 yıldır bitkisel içeriklerin izolasyonu, tanımlanması ve antigenotoksik özelliklerinin belirlenmesi temel araştırma alanlarından biri haline gelmiştir (Soltani ve diğerleri, 2009). Günümüzde halen bitkisel ürünlerin birçoğunun yapı ve etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamıştır, aynı zamanda birçok bitkisel antioksidan maddenin toksisiteleri ve insan sağlığına olası riskleri hakkında da yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bazı bitkisel ürünlerin mutajenik olabildikleri, DNA hasarını indükledikleri belirtilmişse de tersini belirten bulgular da bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen özellikle fenolik kimyasallar antioksidan özellikleri nedeniyle reaktif oksijen bileşiklerinin zararlı etkilerine karşı organizmanın korunmasında ve radikal hasarına bağlı bozuklukların tedavisinde önemli rol oynamaktadırlar. Ancak bitkilerde yaygın bulunan fenolik bileşiklerin hem antioksidan hem de prooksidan etkileri olabilir, kimyasal özelliklerinin ve etkilerinin tam olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında doğal ürünlerde ve diyetimizdeki birçok sebze ve meyvenin bileşiminde bulunan ve son yıllarda kullanımları artan fenolik bileşiklerden piknogenol, resveratrol, rosmarinik asit, vanilik asit ve sinnamik asidin antioksidan özellikleri, sitotoksik, genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden piknogenol, resveratrol ve rosmarinik asidin düşük konsantrasyonlarda sitotoksik ve genotoksik etkileri olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik ve genotoksik etkili olabildikleri gösterilmiştir. Vanilik asit ve sinnamik asit ise araştırılan konsantrasyonlarında sitotoksik ve genotoksik etkiye neden olmamıştır. Diğer yandan araştırılan fenolik bileşiklerin hepsinin primer DNA hasarına ve MÇ oluşumuna neden olan H_2O_2 'ye karşı DNA hasarını azaltıcı etkileri olduğu belirlenmiştir. Antigenotoksik ajanların antikanserojenik olabileceği düşünüldüğünde, bu fenolik bileşiklerin kanser tedavisinde büyük yarar sağlayabilecekleri göz ardı edilmemelidir.

Bu tez çalışmasındaki veriler *in vitro* deneyler ile elde edilmiştir. Bununla birlikte deneylerde kullanılan modele ve tüm bir bitkinin veya sadece izole bileşiklerin kullanılmasına bağlı olarak sonuçların farklı olabileceği unutulmamalıdır. Hücre kültürlerinden ve hayvan modellerinden elde edilen veriler, insanlardaki etkiyi tam olarak

ortaya koyamayabilmektedir. Ayrıca bitkiler ve bunlardan elde edilen izole bileşikler aynı biyolojik etkileri göstermeyebilmektedir. Bir gıdanın ve/veya bunun içerdği bileşiklerin koruyucu etkisi, fitokimyasalların emilimi, metabolizması, dağılımı ve atılımına dayanmaktadır. Fitokimyasalların farmakokinetiğine ilişkin veriler kısıtlıdır. Aynı bitki türlerinde fitokimyasal içerikleri bitkinin genotipine, bitkinin yetiştirildiği yere ve yılın hangi sezonunda toplandığına bağlı olarak değişmektedir. Diyetel bileşenlere maruziyet süresi ve yoğunluğu da hücrel cevabı etkilemektedir. Bu nedenle maruziyet dozu ve süresi gıdalarla ilgili çalışmalarda bulguları yorumlarken dikkate alınmalıdır. Doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerin insan sağlığına olan etkilerini belirlemek, yapı işlev ilişkilerini açıklamak ve uygun kullanım dozlarını belirlemek için daha ayrıntılı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aherne, S. A. and O'Brien, N. M. (1999). Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and Hep G2 cells. *Nutrition and Cancer*, 34, 160-166.
- Aherne, S. A., Kerry, J. P. and O'Brien, N. M. (2007). Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 97, 321-328.
- Ahn, J., Grum, I. U. and Fernando, L. N. (2006). Antioxidant properties of natural Plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, 67, 1364-1369.
- Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Yoko Araki, Y., Mishima, S. and Nozawa, Y. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(7), 1057-1059.
- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L. and Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 119-128.
- Allen, R.G. and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology in Medicine*, 28, 463-499.
- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M. and Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-130.
- Anderson, D. (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350, 103-108.
- Anderson, D. (2001). Factors that contribute to biomarker responses in humans including a study in individuals taking Vitamin C supplementation. *Mutation Research*, 481, 337-347.
- Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J. and Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, 307, 261-271.
- Anderson, R. F., Amarasinghe, C., Fisher, L. J., Mak, W. B. and Packer, J. E. (2000). Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radical Research*, 33, 91-103.
- Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K. and Fürst, P. (2000). Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 26(2), 47-55.

- Andreoli, C., Gigante, D. and Nunziata, A. (2003). A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in vitro*, 17(5), 587-594.
- Andreoli, C., Leopardi, P., Rossi, S. and Crebelli R. (1999). Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methane sulfonate in human lymphocytes, analysis by alkaline single gel electrophoresis and cytogenetic methods. *Mutagenesis*, 14, 497-503.
- Angerer, J., Ewers, U. and Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring, state of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 201-228.
- Ansari, M. A., Keller, J. N. and Scheff, S. W. (2008). Protective effect of Pycnogenol in human neuroblastoma SH-SY5Y cells following acrolein-induced cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1510-1519.
- Arts, M. J., Sebastiaan Dallinga, J., Voss, H. P., Haenen, G. R. and Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567-570.
- Attia, S. M. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 741(1), 22-31.
- Aydın, B., Ünsal, M., Şekeroğlu, Z. A. and Gülbahar, Y. (2011). The antioxidant and antigenotoxic effects of Pycnogenol® on rats treated with cisplatin. *Biological Trace Element Research*, 142(3), 638-650.
- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A. and Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93, 43-54.
- Azizan, A. and Blevins, R. D. (1995). Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as revealed by the Ames Salmonella/microsomal assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 248-258.
- Babich, H. and Visioli, F. (2003). *In vitro* cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco*, 58(5), 403-407.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products, antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 191-203.
- Barth, S. W., Fahndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K. and Rechkemmer, G. (2005). Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*, 26, 1414-1421.

- Basmacıoğlu-Malayaoğlu, H. (2010). Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) antioksidan etkisi. *Hayvansal Üretim*, 51(2), 59-67.
- Batish, D. R., Lavanya, K., Pal Singh, H. and Kohli, R. K. (2007). Root-mediated allelopathic interference of nettle-leaved goosefoot (*Chenopodium murale*) on wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 37-44.
- Baur, J. A. and Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The *in vivo* evidence", *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6): 493-506.
- Belcaro, G., Cesarone, M. R., Genovesi, D., Ledda, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., Pellegrini, L., Gizzi, G., Ippolito, E., Dugall, M., Cacchio, M., Di Renzo, A. and Stuard, S. (2008). Pycnogenol may alleviate adverse effects in oncologic treatment. *Panminerva Medica*, 50(3), 227-234.
- Benkovic, V., Knezevic, A. H., Orsolic, N., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, F. and Kopjar, N. (2009). Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents, *in vitro* study on human white blood cells. *Phytotherapy Research*, 23, 1159-1168.
- Bertelli, A. A., Giovanni, L., Stradi, R., Bertelli, A. and Tillement, J. P. (1996). Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after shortterm or prolonged administration of red wines to rats. *International Journal of Tissue Reactions*, 18(2-3), 67-71.
- Bickers, D., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J.M., Rogers, A.E., Saurat, J. H., Sipes, I. G., Smith, R. L., Tagami, H. (2005). A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 799-836.
- Bircan, F. S. (2014). Fruktöz diyeti ile metabolik sendrom oluşturulan sıçanların kalp ve karaciğerinde resveratrolün antioksidan etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 46-86.
- Birnboim, H. C. (1986). DNA strand breaks in human leukocytes induced by superoxide anion, hydrogen peroxide and tumor promoters are repaired slowly compared to breaks induced by ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 7, 1511-1517.
- Bisht, K., Wagner, K. H. and Bulmer, A. C. (2010). Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, 278, 88-100.
- Blazso, G., Gabor, M. and Rohdewald, P. (1997). Antiinflammatory activities of procyanidin containing extract from *Pinus pinaster* Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie*, 52, 380-382.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24 (2), 119-124.

- Borriello, A., Cucciolla, F., Ragione, D. and Galletti, P. (2010). Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(8), 618-625.
- Bors, W. and Michel, C. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 57-69.
- Bradamante, S., Barengi, L. and Villa, A. (2004). Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22(3), 169-188.
- Breksa, A. P. and Manners, G. D. (2006). Evaluation of the Antioxidant Capacity of Limonin, Nomilin, and Limonin Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4 (11), 3827-3831.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S. and Speit, G. (2005). The *in vivo* comet assay, use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20, 245-254.
- Brown, L., Kroon, P. A., Das, D. K., Das, S., Tosaki, A., Chan, V., Singer, M. V. and Feick, P. 2009. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 33(9), 1513-1523.
- Bulgakov, V. P., Inyushkina, Y. V. and Fedoreyev, S. A. (2012). Rosmarinic acid and its derivatives, biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(3), 203-217.
- Bulychev, A., Trouet, A. and Tulkens, P. (1978). Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 115(2), 343-355.
- Busserolles, J., Gueux, E., Balasińska, B., Piriou, Y., Rock, E., Rayssiguier, Y. and Mazur, A. (2006). *In vivo* antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 76(1), 22-27.
- Buzzard, A. R. and Lau, B. H. (2007). Pycnogenol reduces talc-induced neoplastic transformation in human ovarian cell cultures. *Phytotherapy Research*, 21, 579-586.
- Cadenas, S. and Barja, G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1531-1537.
- Cai, Q., Rahn, R. O. and Zhang, R. (1997). Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*, 119, 99-107.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Geraci, D. and Andmorganti, P. (2000). Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *International Journal on Tissue Reactions*, 22, 5-13.

- Canali, R., Comitato, R., Schonlau, F. and Virgili, F. (2009). The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol® in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *International Immunopharmacology*, 9(10), 1145-1149.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids, Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22,749-760.
- Cemeli, E., Baumgartner, A. and Anderson, D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, 681, 51-67.
- Chachay, V. S., Kirkpatrick, C. M., Hickman, I. J., Ferguson, M., Prins, J. B. and Martin, J. H. (2011). Resveratrol-Pills to replace a healthy diet? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(1), 27-38.
- Chakraborty, A., Gupta, N., Ghosh, K. and Roy, P. (2010). *In vitro* evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicology in vitro*, 24, 1215-1228.
- Chen, C. and Kong, A. N. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1505-1516.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-229S.
- Chiang, L. C., Ng, L. T., Chiang, W., Chang, M.Y. and Lin, C. C. (2003). Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Medica*, 69, 600-604.
- Cho, K. J., Yun, C. H., Packer, L. and Chung, A. S. (2001). Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928,141-156.
- Choi, Y. H. and Yan, G. H. (2009). Pycnogenol inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells. *Phytotherapy Research*, 23, 1691-1695.
- Civolani, C., Barghini, P., Roncetti, A.R., Ruzzi, M. and Schiesser, A. (2000). Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2311-2317.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Duinska, M., Kennedy, G. and Stetina, R. (1997). The comet assay, what can it really tell us? *Mutation Research*, 375(2), 183-193.

- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C. and Stetina, R. (2008). The comet assay, topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143-151.
- Costa, P., Sarmiento, B., Gonçalves, S. and Romano, A. (2013). Protective effects of *Lavandula viridis* L'Hér extracts and rosmarinic acid against H₂O₂-induced oxidative damage in A172 human astrocyte cell line. *Industrial Crops and Products*, 50, 361-365.
- Coşkun, F. (2006). Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 27-33.
- Creasy, L. L. and Creasy, M. T. (1998). Grape chemistry and the significance of resveratrol: An overview. *Pharmaceutical Biology*, 136(1), 8-13.
- Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 435-442.
- Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V. and Ragione, F. D. (2007). Resveratrol from basic science to the clinic. *Cell Cycle*, 6(20), 2495-2510.
- Çatalgöl, B., Batirel, S., Taga, Y. and Kartal-Özer, N. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 141.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43 (4), 348-361.
- D'Andrea, G. (2010). Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81, 724-736.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Umezu, F. M., Pasquali, M. A., Salvador, M., Moreira, J. C. and Henriques, J. A. (2009). Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice--organic and conventional in adult rats. *Journal of Medicinal Food*, 12, 1111-1118.
- Daroui, P., Desai, S. O., Li, T. K., Liu, A. A. and Liu, L. F. (2004). Hydrogen peroxide induces topoisomerase in mediated DNA Damage and cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 14587-14595.
- Davis, C. D. and Milner, J. A. (2007). Biomarkers for diet and cancer prevention research, potentials and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28, 1262-1273.
- e Kok, T. M., van Breda, S. G. and Manson, M. M. (2008). Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *The European Journal of Nutrition*, 47(2), 51-59.

- de Moraes Ramos, F. M., Schonlau, F., Novaes, P. D., Manzi, F. R., Boscolo, F. N. and de Almeida, S. M. (2006). Pycnogenol protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytotherapy Research*, 20, 676-679.
- de Oliveira, N. C. D., Sarmiento, M. S., Nunes, E. A., Porto, C. M., Rosa D. P., Bona, S. R., Rodrigues, G., Marroni, N.P., Pereira, P., Picada, J.N., Ferraz, A.B.F., Thiesen, F.V. and Da Silva, J. (2012). Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1208-1214.
- De Salvia, R., Festa, F., Ricordy, R., Perticone, P. and Cozzi, R. (2002). Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H₂O₂ in mammalian cells *in vitro*. *Toxicology Letters*, 135(1), 1-9.
- Del Bano, M. J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Lorente, J., Martin-Gil, R., Acevedo, C. and Alcaraz, M. (2006). Radioprotective–antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 2064-2068.
- Del Bo, C., Martini, D., Vendrame, S., Riso, P., Ciappellano, S., Klimis-Zacas, D. and Porrini, M. (2010). Improvement of lymphocyte resistance against H₂O₂-induced DNA damage in Sprague-Dawley rats after eight weeks of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet. *Mutation Research*, 703, 158-162.
- Delmas, D., Jannin, B. and Latruffe, N. (2005). Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 377-395.
- Demirel, S. ve Zamani, A.G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 123-127.
- Devaraj, S., Mathur, S., Basu, A., Aung, H. H., Vasu, V. T., Meyers, S. and Jialal, I. (2008). A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition*, 27, 267-273.
- Devipriya, N., Sudheer, A. R. and Menon, V. P. (2008). Caffeic acid protects human peripheral blood lymphocytes against gamma radiation-induced cellular damage. *The Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22, 175-186.
- Devipriya, N., Sudheer, A. R., Srinivasan, M., Menon, V. P. (2008). Quercetin ameliorates gamma radiation induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research*, 654, 1-7.
- Dhananjaya, B. L., Nataraju, A., Rajesh, R., Raghavendra Gowda, C. D., Sharath, B. K., Vishwanath, B. S. and D'Souza, C. J. M. (2006). Anticoagulant effect of *Naja naja* venom 5'nucleotidase, Demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid. *Toxicon*, 48(4), 411-421.

- Dong, Z. (2003). Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 145-150.
- Doulias, P. T., Nousis, L., Zhu, B. Z., Frei, B. and Galaris, D. (2005). Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radical Research*, 39, 125-135.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G. and Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA- repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amsterdam)*, 3, 1389-1407.
- Dubois, M., Bailly, F., Mbemba, G., Mouscadet, J.F., Debyser, Z., Witvrouw, M. and Cotellet, P. (2008). Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: discovery discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 2575-2579.
- Dugoua, J. J., Seely, D., Perri, D., Cooley, K., Forelli, T., Mills, E. and Koren, G. (2007). From type 2 diabetes to antioxidant activity, a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 837-847.
- Dulebohn, R. V., Yi, W., Srivastava, A., Akoh, C.C., Krewer, G. and Fischer, J. G. (2008). Effects of blueberry (*Vaccinium ashei*) on DNA damage, lipid peroxidation, and phase II enzyme activities in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11700-11706.
- Dusinska M., Collins A. (2008). The Comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191-205.
- Duthie, G. G., Gardner, P. T. and Kyle, J. A. (2003). Plant polyphenols, are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 599-603.
- Duthie, S. J., Collins, A. R., Duthie, G. G. and Dobson, V. L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research*, 393, 223-231.
- Eastmond, D. A. and Tucker, J. D. (1989). Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13, 34-43.
- Ekmekçioğlu, C., Feyertag, J. and Marktl, W. (1998). Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 128(2), 137-144.

- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Anna-Karin Borg-Karlson, A. K. and Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10877-10895.
- Emerit, I. (1994). Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer, possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 99-109.
- Erdem, M. G., Cinkılıç, N., Vatan, O., Yılmaz, D., Bağdaş, D. ve Bilaloglu, R. (2012). Genotoxic and Anti-Genotoxic Effects of Vanillic Acid Against Mitomycin C-Induced Genomic Damage in Human Lymphocytes *In Vitro*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 4993-4998.
- Erkan, N., Ayranci, G. and Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract, blackseed (*Nigella sativa*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F. and Morozzi, G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *Journal of Nutrition*, 138, 1411-1416.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K. L. (1995). The comet assay, a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.
- Falconnier, B., Lapiere, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G. and Asther, M. (1994). Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937, Identification of metabolic pathways, *Journal of Biotechnology*, 37, 123-132.
- Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoroso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, S. and Lombardi, G. (2009). Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *British Journal of Pharmacology*, 157, 1072-1084.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, 455 (1), 81-95.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios*, 43, 233-246.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes, Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation, *Mutation Research*, 161, 193-198.

- Feng, W. Y., Tanaka, R., Inagaki, Y., Saitoh, Y., Chang, M. O., Amet, T., Yamamoto, N., Yamaoka, S. and Yoshinaka, Y. (2008). Pycnogenol, a procyanidin-rich extract from french maritime pine, inhibits intracellular replication of HIV-1 as well as its binding to host cells, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61, 279-285.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475 (1), 89-111.
- Ferguson, L. R., Philpott, M. and Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198, 147-159.
- Ferguson, L. R., van Zijl, P., Holloway, W. D. and Jones, W. T. (1985). Condensed tannins induce micronuclei in cultured V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 158, 89-95.
- Figuro, E., Soory, M., Cerero, R. and Bascones, A. (2006). Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, coenzyme Q10, pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. *Steroids*, 71(13-14), 1062-1072.
- Fimognari, C., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G. and Hrelia, P. (2005). Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 582(1), 1-10.
- Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 1447-1450.
- Ford, J. H., Schultz, C. J. and Correll, A. T. (1998). Chromosome elimination in micronuclei, A common of hypoploidy. *The American Journal of Human Genetics*, 43, 733-740.
- Fotakis, G., and Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V. and Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *The American Journal of Human Genetics*, 31, 435-445.
- Frei, B. and Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*, evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*, 133, 3275S-3284S.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663-673.
- Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C. A., Peso-Echarri, P., Ros-Berruazo, G., Martínez-Graciá, C., Canali, R. and Virgili, F. (2011). Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with pycnogenol in colon carcinoma cells. The effect of *in vitro* gastrointestinal digestion. *Phytotherapy Research*, 25, 1870-1875.

- Furtado, M. A., Fernandes de Almeida, L. C., Furtado, R. A., Cunha, W. R. and Tavares, D. C. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research*, 657, 150-154.
- Furtado, R. A., Araujo, F. R. R., Resende, F. A., Cunha W. R. and Tavares D. C. (2010). Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 254-259.
- Gandin, V., Nyström, C., Rundlöf, A. K., Jönsson-Videsater, K., Schönlau, F., Hörkkö, J., Björnstedt, M. and Fernandes, A. P. (2009). Effects of the antioxidant Pycnogenol® on cellular redox systems in U1285 human lung carcinoma cells. *FEBS Journal*, 276, 532-540.
- Gao, X., Xu, Y. X., Janakiraman, N. and Chapman, R. A. (2001). Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochemical Pharmacology*, 62(9), 1299-1308.
- Ghaffari, H., Venkataramana, M., Ghassam, B. J., Chandra Nayaka, S., Nataraju, A., Geetha, N. P. and Prakash, H. S. (2014). Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A Cells. *Life Sciences*, 113, 7-13.
- Gitzinger, M., Kemmer, C., Fluri, D.A., El-Baba, M. D., Weber, W. and Fussenegger, M. (2011). The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research*, 1-15
- Glei, M. and Pool-Zobel, B. L. (2006). The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3- gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicology in vitro*, 20, 295-300.
- Goldberg, D. M., Ng, E., Yan, J., Karumanchiri, A., Soleas, G.J. and Diamandis, E.P. (1996). Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars, *The Journal of Wine Research*, 7(1), 13-24.
- Gonzalez-Baro, A. C., Parajon-Costa, B. S., Franca, C. A. and Pis-Diez, R. (2008). Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid, *Journal of Molecular Structure*, 889, 204-210.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanaspoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A. and Spanos, M. (2006). Trans-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Chemistry*, 17, 700-706.
- Grimm, T., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z. and Hogger, P. (2006a). Inhibition of NF-κB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Journal of Inflammation*, 3, 1-6.

- Grimm, T., Skrabala, R., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durakova, Z. and Hogger, P. (2006b). Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clinical Pharmacology*, 3, 4-16.
- Guglielmi, F., Luceri, C., Giovannelli, L., Dolara, P. and Lodovici, M. (2003). Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *British Journal of Nutrition*, 89, 581-587.
- Guimarães, C. M., Gião, M. S., Martinez, S. S., Pintado, A. I., Pintado, M. E., Bento, L. S. and Malcata, F. X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *Journal of Food Science*, 72, C039-C043.
- Guo, Q., Zhao, B. and Packer, L. (1999). Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1308-1312.
- Hadi, S. M., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Sharmim, U. and Ullah, M. F. (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 370-376.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update, *FEBS Letters*, 307, 108-112.
- Hamaguchi, T., Ono, K., Murase, A. and Yamada, M. (2009). Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *American Journal of Pathology*, 175, 2557-2565.
- Hameş-Kocabaş, E. E., Yeşil-Çeliktaş, Ö., İşleten, M. and Vardar-Sukan, F. (2008). Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked meat. *Gıda*, 33, 123-127.
- Han, K. C., Wong, W. C. and Benzie, I. F. (2011). Genoprotective effects of green tea (*Camellia sinensis*) in human subjects, results of a controlled supplementation trial. *British Journal of Nutrition*, 105, 171-179.
- Hao, H. D. and He, L. R. (2004). Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol, *Journal of Medicinal Food*, 7, 290-298.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. and Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18, 45-51.

- Heddle, J. A. and Countryman, R. I. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321-332.
- Hegde, M. L., Hazra, T. K. and Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single- strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18, 27-47.
- Heo, M. Y., Sohn, S. J. and Au, W. W. (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, 488, 135-150.
- Ho, C.T., Wang, M., Wei, G.J., Huang, T. C. and Huang, M. T. (2000). Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors*, 13, 161-166.
- Horvathova, K., Chalupa, I., Sebova, L., Tothova, D. and Vachalkova, A. (2005). Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutation Research*, 565, 105-112.
- Horvathova, K., Novotny, L. and Vachalkova, A. (2003). The free radical scavenging activity of four flavonoids determined by the comet assay. *Neoplasma*, 50, 291-295.
- Horvathova, K., Novotny, L., Tothova, D. and Vachalkova, A. (2004). Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, 51, 395-399.
- Högstedt, B. and Karlsson, A. (1985). The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, 156, 229-232.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6), 1841-1856.
- Huang, S. M., Chuang, H. C., Wu, C. H. and Yen, G. C. (2008a). Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2A cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(8), 940-949.
- Huang, S. M., Hsu, C. L., Chuang, H. C., Shih, P. H., Wu, C. H. and Yen, G. C. (2008b). Inhibitory effect of vanillic acid on methylglyoxal-mediated glycation in apoptotic Neuro-2A cells. *Neurotoxicology*, 29, 1016-1022.
- Huang, S. S. and Zheng, R. L. (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Letters*, 239, 271-280.
- Hur, Y. G., Suh, C. H., Kim, S. and Won, J. (2007). Rosmarinic acid induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients via mitochondrial pathway. *Journal of Clinical Immunology*, 27, 36-45.
- Hur, Y. G., Yun, Y. and Won, J. (2004). Rosmarinic acid induces p53-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *Journal of Immunology*, 172, 79-87.

- Inouye, T., Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Watanebe, M., Ohta, T. and Shirasu, Y. (1988). Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin. *Mutation Research*, 202, 93-95.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M. and Yagi, K. (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1215-1219.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., Tamesada, M. And Yagi, K. (2010). Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄- induced Liver Injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 983-987.
- İnce Yeşil-Çeliktaş, O., Karabay-Yavaşoğlu, N. U. and Elgin, G. (2009). Effects of Pinus brutia bark extract and Pycnogenol® in a rat model of carrageenan induced inflammation. *Phytomedicine*, 16, 1101-1104.
- Jagetia, A., Jagetia, G. C. and Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *Journal of Applied Toxicology*, 27, 122-132.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Jeong, J. B., Seo, E. W. and Jeong, H. J. (2009). Effect of extracts from pine needle against oxidative DNA damage and apoptosis induced by hydroxyl radical via antioxidant activity, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2135-2141.
- Jerez, M., Tourino, S., Sineiro, J., Torres, J. L. and Nunez, M. J. (2007). Procyanidins from pine bark. Relationship between structure, composition and antiradical activity. *Food Chemistry*, 104, 518-527.
- Jeyabal, P. V., Syed, M. B., Venkataraman, M., Sambandham, J. K. and Sakthisekaran, D. (2005). Apigenin inhibits oxidative stress-induced macromolecular damage in N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Molecular Carcinogenesis*, 44, 11-20.
- Josephson, R. A., Silverman, H. S., Lakatta, E. G., Stern, M. D. and Zweier, J. L. (1991). Study of the mechanisms of Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2354-2361.
- Juan, M. E., Vinardell, M. P. and Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Journal of Nutrition*, 132(2), 257-260.
- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Jeon, S. M. and Choi, M. S. (2006). Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/ db mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318, 476-483.

- Kager, N., Ferk, F., Kundi, M., Wagner, K. H., Misik, M. and Knasmüller, S. (2010). Prevention of oxidative DNA damage in inner organs and lymphocytes of rats by green tea extract. *European Journal of Nutrition*, 49, 227-234.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kairisalo, M., Bonomo, A., Hyrskyluoto, A., Mudo, G., Belluardo, N., Korhonen, L. and Lindholm, D. (2011). Resveratrol reduces oxidative stress and cell death and increases mitochondrial antioxidants and XIAP in PC6.3-cells, *Neuroscience Letters*, 488(3), 263–266.
- Kalantari, H. and Das, D. K. (2010). Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*, 36(5), 401-406.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. and Castanas, E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells, potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, 6, R63-R74.
- Kanupriya, Dipti, P., Sharma, S.K., Sairam, M., Ilavazhagan, G., Sawhney, R. C. and Banerjee, P.K. (2006). Flavonoids protect U-937 macrophages against tert-butylhydroperoxide induced oxidative injury. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1024-1030.
- Karihtala, P. and Soini, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, 115, 81-103.
- Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S. and Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 69-73.
- Keskin, N., Noyan, T. ve Kunter, B. (2009). Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29(5), 1273-1279.
- Kim, J. H., Campbell, B. C., Mahomey, N. E., Chan, K. L. and Molyneux, R. J. (2004). Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7814-7821.
- Kim, J. H., Lee, B. J., Kim, J. H., Yu, Y. S., Kim, M. Y. and Kim, K. W. (2009). Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21(WAF1) expression. *European Journal of Pharmacology*, 615, 150-154.

- Kim, M. C., Kim, S. J., Kim, D. S., Jeon, Y. D., Park, S. J., Lee, H. S., Um, J. Y. and Hong, S. H. (2011). Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(3), 525-532.
- Kim, S. H., Lee, I. C., Lim, J. H., Moon, C., Bae, C. S., Kim, S. H., Shin, D. H., Park, S. C., Kim, H. C. and Kim, J. C. (2012). Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 109-115.
- Kim, S. J., Kim, M. C., Um, J. Y. and Hong, S. H. (2010). The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules*, 15, 7208-7217.
- Kim, Y. G. and Park, H. Y. (2004). The effects of pycnogenol on DNA damage *in vitro* and expression of superoxide dismutase and HP1 in *Escherichia coli* SOD and catalase deficient mutant cells. *Phytotherapy Research*, 18, 900-905.
- Kim, Y. J., Kim, Y. A. and Yokozawa, T. (2011). Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2196-2201.
- King, R. E., Bomser, J. A. and Min, D. B. (2006). Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 65-70.
- Kitsati, N., Fokas, D., Ouzouni, M. D., Mantzaris, M. D., Barbouti, A. and Galaris, D. (2012). Lipophilic Caffeic Acid Derivatives Protect Cells against H₂O₂-Induced DNA Damage by Chelating Intracellular Labile Iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7873-7879.
- Kobayashi, M. S., Han, D. and Packer, L. (2000). Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radical Research*, 32(2), 115-124.
- Koch, T. C., Briviba, K., Watzl, B., Fahndrich, C., Bub, A., Rechkemmer, G. and Barth, S. W. (2009). Prevention of colon carcinogenesis by apple juice *in vivo*, impact of juice constituents and obesity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1289-1302.
- Kohama, T., Suzuki, N., Ohno, S. and Inoue, M. (2004). Analgesic efficacy of French maritime pine bark extract in dysmenorrhea, an open clinical trial. *Journal of Reproductive Medicine*, 49, 828-32.
- Komissarova, E. V., Saha, S. K. and Rossman, T. G. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(1), 99-107.
- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K. and Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 543-531.

- Kraft, T. E., Parisotto, D., Schempp, C. and Efferth, T. (2009). Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 49(9), 782-799.
- Krizková, L., Chovanová, Z., Duracková, Z., and Krajcovic, J. (2008). Antimutagenic *in vitro* activity of plant polyphenols, Pycnogenol® and *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). ***Phytotherapy Research***, 22, 384-388.
- Kubavat, J. B. and Asdaq, S. M. (2009). Role of *Sidacordifolia* L. Leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury. ***Journal of Ethnopharmacology***, 124, 162-165.
- Kumar, R., Sharma, P. K. and Mishra, P. S. (2012). A review on the vanillin derivatives showing various biological activities. ***International Journal of PharmTech Research***, 4, 266-279.
- Kuo, S. M. (1996). Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. ***Cancer Letters***, 110, 41-48.
- Kuroda, Y., Yoo, Y. S. and Ishibashi, T. (1984). Antimutagenic activity of food additives. ***Mutation Research***, 130(5), 369-369.
- Kyselova, Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. ***Journal of Interdisciplinary Toxicology***, 4(4), 173-183.
- Lacikova, L., Jancova, M., Muselik, J., Masterova, I., Grancai, D. and Fickova, M. (2009). Antiproliferative, cytotoxic, antioxidant activity and polyphenols contents in leaves of four *Staphylea* L. species, ***Molecules***, 14, 3259-3267.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G., Liao, J. and Yang, C. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols, evidence from laboratory investigations. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 81, 284S-291S.
- Lasarow, R. M., Isseroff, R. R., Gomez, E. C. (1992). Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. ***Journal of Investigative Dermatology***, 98(5), 725-729.
- Lee, H. J., Cho, H. S., Park, E., Kim, S., Lee, S. Y., Kim, C. S., Kim, D. K., Kim, S. J. and Chun, H. S. (2008). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. ***Toxicology***, 250(2), 109-115.
- Lee, J., Jung, E., Kim, Y., Lee, J., Park, J., Hong, S., Hyun, C. G., Park, D. and Kim, Y. S. (2006). Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF- α -induced upregulation of CCL11 and CCR3. ***British Journal of Pharmacology***, 148, 366-375.
- Lee, J., Kim, Y. S. and Park, D. (2007). Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signalling. ***Biochemical Pharmacology***, 74, 960-968.

- Lee, S., Han, J. M., Kim, H., Kim, E., Jeong, T. S., Lee, W. S. and Cho, K. H. (2004). Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA, cholesterol acyltransferase-1 and -2 activity, and decrease of HDL-particle size. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4677-4681.
- Lee, Y. J., Kuo, H. C., Chu, C. Y., Wang, C. J., Lin, W. C. and Tseng, T. H. (2003). Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(12), 2281-2289.
- Lee, Y. J., Liao, P. H., Chen, W. K. and Yang, C. Y. (2000). Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Letters*, 153(1-2), 51-56.
- Lesage-Meessen, L., Delattre, M. and Haon, M. Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P., Asther, M. (1996). A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*, 50, 107-113.
- Li, G. S., Jiang, W. L., Tian, J. W., Qu, G. W., Zhu, H. B. and Fu, F. H. (2010). *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*, 17, 282-288.
- Li, X., Wen, Z., He, X. And He, S. (2006). Effects of cinnamic acid on expression of tissue factor induced by TNF- α in endothelial cells and its mechanisms. *Journal of the Chinese Medical Association*, 69(5), 207-212.
- Liao, J. C., Deng, J. S., Chiu, C. S., Hou, W. C., Huang, S. S., Shie, P. H. and Huang, G. J. (2012). Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents *in vitro* and *in vivo*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 429320.
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H. and Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3), 285-294.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 383-389.
- Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage, relevance of glutathione levels. *Life Science*, 79, 2056-2068.
- Liu, G. T., Zhang, T. M., Wang, B. E., Wang, Y. W. (1992). Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochemical Pharmacology*, 43, 147-152.

- Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q. and Samid, D. (1995). Cinnamic acid, a natural product with potential use in cancer intervention, *International Journal Of Cancer*, 62(3), 345-350.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni and M., Dolara, P. (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1205-1210.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. (2005). Solid and vapor-phase antimicrobial activities of sex essential oils, susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6939-6946.
- Lorenzo, Y., Azqueta, A., Luna, L., Bonilla, F., Dominguez, G. and Collins, A. R. (2009). The carotenoid beta-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis*, 30, 308-314.
- Lu, F., Zahid, M., Wang, C., Saeed, M., Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. (2008). Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. *Cancer Prevention Research*, 1, 135-145.
- Macias, F. A., Simonet, A. M., Galindo, J. C. G. and Castellano, D. (1999). Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry*, 50, 35-46.
- Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z. and Jameel, K. (2011). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 261-277.
- Maistro, E. L., Angeli, J. P. F., Andrade, S. F. and Mantovani, M. S. (2011). *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. *Genetics and Molecular Research*, 10 (2), 1130-1140.
- Majer, B. J., Laky, B., Knasmuller, S. and Kassie, F. (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, 489, 147-72.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols, food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies¹⁻³. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230S-342S.
- Marambaud, P., Zhao, H., Davies, P. (2005). Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37377-37382.

- Maritim, A., Dene, B. A., Sanders and Watkins III, J. B. (2003). Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(3), 193-199.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. and Watkins III, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(3), 24-38.
- Martinez-Tome, M., Jimenez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R. and Murcia, M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, 64, 1412-1419.
- Masquelier, J., Michaud, J., Laparra, J. and Dumon, M. C. (1979). Flavonoides and pycnogenols. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 49, 307-311.
- Matsumori, A., Higuchi, H. and Shimada, M. (2007). French maritime pine bark extract inhibits viral replication and prevents development of viral myocarditis. *Journal of Cardiac Failure*, 13, 785-791.
- Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K. and Miyata, N. (2001). Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutation Research*, 494(1-2), 107-113.
- Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C. and Bohr, V. A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30, 2-10.
- McCann, M. J., Gill, C. I., O' Brien, G., Rao, J. R., McRoberts, W. C., Hughes, P., McEntee, R. and Rowland, I. R. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1224-1230.
- McKay, D. L. and Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20, 619-633.
- Melidou, M., Riganakos, K. and Galaris, D. (2005). Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide, the role of iron chelation. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1591-1600.
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 326S-329S.
- Miene, C., Klenow, S., Veeriah, S., Richling, E. and Glei, M. (2009). Impact of apple polyphenols on GSTT2 gene expression, subsequent protection of DNA and modulation of proliferation using LT97 human colon adenoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1254-1262.

- Migliore L., Nieri M., Amodio, S. and Loprieno, N. (1989). The human lymphocyte micronucleus assay: A comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 227, 167-172.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84 (4), 407-412.
- Min, K. and Ebeler, S. E. (2008). Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 96-104.
- Mishima, S., Ono, Y., Araki, Y., Akao, Y. and Nozawa, Y. (2005). Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(6), 1025-1030.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Nishikata, T. and Yamori, Y. (2000). Phytoestrogens attenuate oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 18, 1833-1840.
- Mochizuki, M. and Hasegawa, N. (2004). Therapeutic efficacy of pycnogenol in experimental inflammatory bowel diseases. *Phytotherapy Research*, 18, 1027-1028.
- Moini, H., Guo, Q. and Packer, L. (2000). Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich French maritime pine bark extract, pycnogenol: Effect on xanthine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5630-5639.
- Mojzisova, G., Sarissky, M., Mirossay, L., Martinka, P. and Mojzis, J. (2009). Effects of flavonoids on daunorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblasts. *Phytotherapy Research*, 23, 136-139.
- Moñino, I., Martinez, C., Sotomayor, J. A., Lafuente, A. and Jordan, M. J. (2008). Polyphenolic transmission to segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 3363-3367.
- Moon, H. K., Yang, E. S. and Park, J. W. (2006). Protection of peroxynitrite-induced DNA damage by dietary antioxidants. *Archives of Pharmacal Research*, 29, 213-217.
- Murias, M., Jäger, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., Nohl, H. and Gille, L. (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure–activity relationship. *Biochemical Pharmacology*, 69(6), 903-912.
- Muzandu, K., Ishizuka, M., Sakamoto, K. Q., Shaban, Z., El Bohi, K., Kazusaka, A. and Fujita, S. (2006). Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215, 330-340.

- Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1996). Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H₂O₂-induced cytotoxicity and DNA single-strand breaks in Chinese hamster V79 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(2), 316-318.
- Nardini, M., Scaccini, C., Packer, L. and Virgili, F. (2000). *In vitro* inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474(2), 219-225.
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M. and Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants, structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1453-1459.
- Nelson, A. B., Lau, B. H., Ide, N. and Rong, Y. (1998). Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radical induced DNA damage, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 1-6.
- Niero, E. L. O and Machado-Santelli, G. M. (2013). Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32, 31-45.
- Nizamoğlu, N. M. ve Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 20-35.
- Noel, S., Kasinathan, M. and Rath, S.K. (2006). Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in vitro*, 20, 1168-1172.
- Noroozi, M., Angerson, W. J. and Lean, M. E. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 1210-1218.
- Nossoni, F. (2008). Single-cell gel electrophoresis (comet assay), methodology, potential applications, and limitations in cancer research. *Basic Biotechnology eJournal*, 4, 30-35.
- Nousis, L., Doulias, P. T., Aligiannis, N., Bazios, D., Agalias, A., Galaris, D. and Mitakou, S. (2005). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 39, 787-795.
- Ohya, M., Tanaka, T., Ito, T., Iinuma, M., Bastow, K. F. and Lee, K. H. (1999). Antitumor agents: cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(20), 3057-3060.
- Opdyke, D. L. (1975). Monographs on fragrance raw materials. *Food and Cosmetics Toxicology*, 13(4), 449-457.
- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M. and Yoshikawa, T. (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*, 25, 549-557.

- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Sanbongi, C., Kato, Y., Osawa, T. and Yoshikawa, T. (2002). Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN)-sensitized mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 798-806.
- Ostling, O. and Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- Ovesna, Z., Kozics, K. and Slamenova, D. (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research*, 600, 131-137.
- Packer, L. (1991). Interactions among antioxidants in health and disease, vitamin E and its redox cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200, 271-276.
- Packer, L., Rimbach, G. and Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 704-724.
- Paluszczak, J., Krajka-Kuzniak, V. and Baer-Dubowska, W. (2010). The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 192, 119-125.
- Pan, M. H., Ghai, G. and Ho, C. T. (2008). Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 43-52.
- Panayiotidis, M. and Collins, A. R. (1997). *Ex vivo* assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Radical Research*, 27, 533-537.
- Pandey, K. B. and Rizvi, S. I. (2010). Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(3), 293-296.
- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D. J. and Decker, E. A. (2010). Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5679-5684.
- Paolillo, R., Romano Carratelli C. and Rizzo, A. (2011). Effect of resveratrol and quercetin in experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International Immunopharmacology*, 11(2), 149-156.
- Park, D. H., Park, S. J., Kim, J. M., Jung, W. Y. and Ryu, J. H. (2010). Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*, 81, 644-648.
- Park, S. U., Uddin, M. R., Xu, H., Kim, Y. K. and Lee, S. Y. (2008). Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4959-4965.

- Parnham, M. J. and Kesselring, K. (1985). Rosmarinic acid. *Drug Future*, 10, 756-757.
- Parr, A. J. and Bolwell, J. P. (2002). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80, 985-1012.
- Parveen, K., Khan, M. R. and Siddiqui, W. A. (2009). Pycnogenol prevents potassium dichromate (K₂Cr₂O₇)-induced oxidative damage and nephrotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 343-350.
- Parveen, K., Khan, M. R., Mujeeb, M. and Siddiqui, W. A. (2010). Protective effects of Pycnogenol® on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 186, 219-227.
- Patra, K., Bose, S., Sarkar, S., Rakshit, J., Jana, S., Mukherjee, A., Roy, A., Mandal, D. P. and Bhattacharjee, S. (2012). Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chemico-Biological Interactions*, 195, 231-239.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. and Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., Brum, L. F. S., Picada, J. N. and Ardenghi, P. (2005). Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological Research*, 52, 199-203.
- Pérez-Fons, L., Garzón, M. T. and Micol, V. (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 161-171.
- Pervaiz, S. (2003). Resveratrol: From grapevines to mammalian biology. *FASEB Journal*, 17(14), 1975-1985.
- Petermann, A., Miene, C., Schulz-Raffelt, G., Palige, K., Holzer, J., Glei, M. and Bohmer, F. D. (2009). GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1245-1253.
- Petersen, M. and Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K. H., Sander, M., Weitzel, C. and Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70, 1663-1679.
- Pietta, P. G., Simonetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P. and Bombardelli, E. (1998). Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors*, 8, 111-118.

- Pirker, K. F., Kay, C. W. M., Solze, K., Tunega, D., Rechenauer, T. G. and Goodman, B. A. (2009). Free radical generation in rosmarinic acid investigated by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radical Research*, 43, 47-57.
- Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Muller, H., Wollowski, I. and Rechkemmer, G. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans, first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18, 1847-1850.
- Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J. S., Mazurek, A. P. (2005). *In vitro* toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Letters*, 229(1), 67-75.
- Porrini, M. and Riso, P. (2000). Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *Journal of Nutrition*, 130, 189-192.
- Prasad, N. R., Jeyanthimala, K. and Ramachandran, S. (2009). Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 95, 196-203.
- Prince, P. S. M., Dhanasekar, K. and Rajakumar, S. (2011). Preventive effects of vanillic acid on lipids, bax, bcl-2 and myocardial infarct size on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats, A biochemical and *in vitro* study. *Cardiovascular Toxicology*, 11(1), 58-66.
- Prise, K. M., Davies, S. and Michael, B. D. (1989). Cell killing and DNA damage in Chinese hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide, *International Journal of Radiation Biology*, 55, 583-592.
- Prochazkova, D., Bousova, I. and Wilhelmova, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Pryor, W. A. (1986). Oxy radicals and related species, their formation, life times and reactions. *Annual Review of Physiology*, 48, 657-667.
- Quincozes-Santos, A., Andreazza, A.C., Nardin, P., Funchal, C., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2007). Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology*, 28, 886-891.
- Ramos, A. A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C. and Collins, A. R. (2010). Polyphenolic compounds from Salvia species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7465-7471.
- Ramos, A. A., Lima, C. F. and Pereira-Wilson, C. (2011). DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention, what do we know? *Selected Topics in DNA Repair*, 237-270.

- Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells, evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*, 177, 66-73.
- Ramos, A. A., Pereira-Wilson, C. and Collins, A. R. (2010). Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research*, 692, 6-11.
- Ray, G. and Hussain, S. A. (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogens. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 1213-1232.
- Rechner, A. R., Spencer, J. P. E., Kuhnle, G., Hahn, U. and Rice-Evans, C. A. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1213-1222.
- Repetto, G., del Peso, A. and Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J. F. and Casper, R. F. (2001). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reproductive Toxicology*, 15, 479-486.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J and Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rimbach, G., Virgili, F., Park, Y.C. and Packer, L. (1999). Effect of procyanidins from *Pinus maritima* on glutathione levels in endothelial cells challenged by 3-morpholinosydnonimine or activated macrophages. *Redox Report*, 4, 171-177.
- Riso, P., Martini, D., Visioli, F., Martinetti, A. and Porrini, M. (2009). Effect of broccoli intake on markers related to oxidative stress and cancer risk in healthy smokers and nonsmokers. *Nutrition and Cancer*, 61, 232-237.
- Rohdewald, P. (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40, 158-168.
- Rohdewald, P. (2005). Pycnogenol protects DNA against oxidative damage *in vivo*. *Phytotherapy Research*, 19 (3), 262-262.
- Rohdewald, P. and Beil, W. (2008). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by pycnogenol. *Phytotherapy Research*, 22, 685-688.

- Rong, Y., Li, L. and Lau, B. H. (1995). Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury, *Biotechnology Therapeutics*, 5, 117-126.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids, bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Rusak, G., Piantanida, I., Masic, L., Kapuralin, K., Durgo, K. and Kopjar, N. (2010). Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 188, 181-189.
- Russo, G. L. (2007). Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 74, 533-544.
- Salamone, M., Heddle, J., Stuart, E. and Katz, M. (1980). Towards an improved micronucleus test, studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research*, 74, 347-356.
- Sanchez-Campillo, M., Gabaldon, J.A., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Del Bano, M. J., Alcaraz, M., Vicente, V., Alvarez, N. and Lozano, J. A. (2009). Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 386-392.
- Sanyal, R., Darroudi, F., Parzefall, W., Nagao, M. and Knasmüller, S. (1997). Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens. *Mutagenesis*, 12, 297-303.
- Sasaki, Y. F., Ohta, T., Imanishi, H., Watanabe, B., Matsumoto, K., Kato, T. and Shirasu, Y. (1990). Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by x-rays in mice. *Mutation Research*, 243, 299-302.
- Sashidhara, K. V., Singh, S. P., Srivastava, A. and Puri, A. (2011). Identification of the antioxidant principles of *Polyalthia longifolia* var. *pendula* using TEAC assay. *Natural Product Research*, 25(9), 918-926.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Johnson, I. T. and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols, antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Scarpati, M. L. and Oriente, G., (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*). *Rice Science*, 28, 2329-2333.

- Schaefer, S., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F. and Janzowski, C. (2006). Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 24-33.
- Schafer, A., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z. and Hogger, P. (2006). Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime Pine bark extract (Pycnogenol), *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 5-9.
- Sebastià, N., Almonacid, M., Villaescusa, J.I., Cervera, J., Such, E., Silla, M. A., Sorino, J. M., Montoro, A. (2013). Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: An *in vitro* evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 391-395.
- Sekizawa, J. and Shibamoto, T. (1982). Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutation Research*, 101, 127-140.
- Sengottuvelan, M., Deeptha, K. and Nalini, N. (2009). Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 193-201.
- Serpeloni, J. M., Grotto, D., Mercadante, A. Z., de Lourdes Pires Bianchi, M. and Antunes, L. M. (2010). Lutein improves antioxidant defense *in vivo* and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. *Archives of Toxicology*, 84, 811- 822.
- Seve, M., Chimienti, F., Devergnas, S., Aouffen, M., Douki, T., Chantegrel, J., Cadet, J. and Favier, A. (2005). Resveratrol enhances UVA-induced DNA damage in HaCaT human keratinocytes. *Medicinal Chemistry*, 1, 629-633.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F. I. and Cittadini, A. (2001). Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 496(1-2),171-180.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- Shimojo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., Shimizu, T. and Shirasawa, T. (2010). Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 88, 896-904.
- Shyamala, B. N., Madhava Naidu, M., Sulochanamma, G. and Srinivas, P. (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7738-7743.

- Siddique, Y. H. and Afzal, M. (2009). Protective effect of apigenin hydrogen peroxide induced genotoxic damage on cultured human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of Applied Biomedicine*, 7, 35-43.
- Siddique, Y. H., Beg, T. and Afzal, M. (2009). Protective effect of ascorbic acid against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(3), 294-300.
- Silva, J. P., Gomes, A. C. and Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601, 50-60.
- Singh, N. P., McCoy, M. C., Tice, R. and Schnider, E. L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Singletary, K., MacDonald, C. and Wallig, M. (1996). Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and *in vivo* DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters*, 104, 43-48.
- Singletary, K. W. (1996). Rosemary extract and carnosol stimulate rat liver glutathione-S-transferase and quinone reductase activities. *Cancer Letters*, 100, 139-144.
- Sofni, T. and Ishidate, M. (1984). Induction of chromosomal aberrations in cultured Chinese hamsters cells superoxide generation system. *Mutation Research*, 140, 27-31.
- Soleas, G. J., Daimandis, E. P. and Goldberg, D. M. (1999). Resveratrol, a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91-113.
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., JHaghighi, F. and Berhavan, J. (2009). Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress, *Cell Biology and Toxicology*, 25, 291-296.
- Song, F., Li, H., Sun, J. and Wang, S. (2013). Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 125-130.
- Sova M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), 749-767.
- Sovak, M. (2001). Grape extract, resveratrol, and its analogs: A review. *Journal of Medicinal Food*, 4, 93-105.
- Speit, G., Witton-Davies, T., Heepchantree, W., Trenz, K. and Hoffmann, H. (2003). Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research*, 542, 33-42.

- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Pillai, K. R., Kumar, P. R., Sudhakaran, P. R and Menon, V. P. (2007). Lycopene as a natural protector against γ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes *in vitro*. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects***, 1770(4), 659-665.
- Stagos, D., Spanou, C., Margariti, M., Stathopoulos, C., Mamuris, Z., Kazantzoglou, G., Magiatis, P. and Kouretas, D. (2007). Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 55(13), 5246-5252.
- Stopper, H., Schmitt, E. and Kobras, K. (2005). Genotoxicity of phytoestrogens. ***Mutation Research***, 574, 139-155.
- Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M. and Furuno, K. (1999). Anti-and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. ***Free Radical Biology and Medicine***, 27, 1313-1323.
- Svajger, U. and Jeras, M. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. ***International Reviews of Immunology***, 31,202-222.
- Szeto, Y. T. and Benzie, I. F. (2002). Effects of dietary antioxidants on human DNA *ex vivo*. ***Free Radical Research***, 36, 113-118.
- Szeto, Y. T., Collins, A. R. and Benzie, I. F. F. (2002). Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure. ***Mutation Research***, 500, 31-38.
- Şehirli, A. O. and Şener, G. (2009). Protective effects of pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. ***Renal Failure***, 31, 690-697.
- Tai, A., Sawano, T. and Ito, H. (2012). Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. ***Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry***, 76, 314-318.
- Tai, A., Sawano, T., Yazama, F. and Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1810, 170-177.
- Takeda, H., Tsuji, M. Inazu, M., Egashira, T. and Matsumiya, T. (2002). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. ***European Journal of Pharmacology***, 449, 261-267.
- Tamai, K., Tezuka, H. and Kuroda, Y. (1992). Direct modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes induced by EMS and H₂O₂ in cultured Chinese hamster cells, ***Mutation Research***, 268, 231-237.

- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L. and Wolk, A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 525-533.
- Thibodeau, P. A. and Paquette, B. (1999). DNA damage induced by catechol estrogens in the presence of copper (II), generation of reactive oxygen species and enhancement by NADH. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1367-1377.
- Thompson, H. J., Heimendinger, J., Haegele, A., Sedlacek, S. M., Gillette, C., O'Neill, C., Wolfe, P. and Conry, C. (1999). Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, 20, 2261-2266.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay, guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Tice, R. R., Andrews, P. W. and Singh, N. P. (1990). The single cell gel assay, a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science*, 53, 291-301.
- Tripathi, D. N. and Jena, G. B. (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 248, 96-103.
- Tsuda, H. (1981). Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. *Japanese Journal of Genetics*, 58, 1-8.
- Tsuda, H., Uehara, N., Iwahori, Y., Asomoto, M., Ligo, M., Nagao, M., Matsumoto, K., Ito, M. and Hirono, I. (1994). Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo (4, 5) quinoline in the rat. *Japanese Journal of Cancer Research*, 85, 1214-1219.
- Türkez, H. and Şişman, T. (2011). The genoprotective activity of resveratrol on aflatoxin B1-induced DNA damage in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology & Industrial Health*, 28(5) 474-480.
- Udenigwe, C. C., Ramprasath, V. R., Aluko, R. E. and Jones, P. J. (2008). Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews*, 66(8), 445-454.
- Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, Ö., Çogulu, D., Gençay, Ö. and Salih, B. (2005). Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*, 160, 189-195.
- van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H. and Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517.

- van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., van der Vijgh, W. and Bast, A. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, 70(3), 391-395.
- Van Goethem, F., Lison, D. and Kirsch-Volders, M. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1), 31-43.
- Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, M. and Volders, K. (1989). The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4, 6-11.
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D. K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H., Ma, Q., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J. M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T. and Wu, J. M. (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *Plos One*, 6(6), e19881.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research*, 244, 95-103.
- Veeriah, S., Balavenkatraman, K. K., Bohmer, F., Kahle, K., Glei, M., Richling, E., Scheppach, W. and Pool-Zobel, B. L. (2008). Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *European Journal of Nutrition*, 47, 226-234.
- Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L. and Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 35372-35381.
- Virgili, F., Kobuchi, H. and Packer, L. (1998). Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (pycnogenol): Scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1120-1129.
- Von Ledeber, M. M. and Schmid, W. (1973). The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutation Research*, 19, 109-117.
- Voss, P., Horakova, L., Jakstadt, M., Kiekebusch, D. and Grune, T. (2006). Ferritin oxidation and proteasomal degradation, protection by antioxidants. *Free Radical Research*, 40, 673-683.
- Vostálová, J., Zdarilová, A. and Svobodová, A. (2010). *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 302, 171-181.

- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E. and Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. ***Drug Metabolism and Disposition***, 32(12), 1377-1382.
- Wang, S., Tan, D., Zhao, Y., Gao, G., Gao, X. and Hu, L. (1999). The effects of Pycnogenol on the microcirculation, platelet function and ischemic myocardium in patients with coronary artery diseases. ***European Bulletin of Drug Research***, 7, 19-25.
- Wei, Z., Peng, Q. and Lau, B. H. S. (1997). Pycnogenol enhances endothelial cell antioxidant defences. ***Redox Report***, 3, 147-155.
- Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. ***International Journal of Pharmaceutics***, 288 (2), 369- 376.
- Williams, L. D., Burdock, G. A., Edwards, J. A., Beck, M. and Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. ***Food and Chemical Toxicology***, 47(9), 2170-2182.
- Wilms, L. C., Cloughton, T. A., de Kok, T. M. and Kleinjans, J. C. (2007). GSTM1 and GSTT1 polymorphism influences protection against induced oxidative DNA damage by quercetin and ascorbic acid in human lymphocytes *in vitro*. ***Food and Chemical Toxicology***, 45, 2592-2596.
- Wilms, L. C., Cloughton, T.A., de Kok, T.M. and Kleinjans, J. C. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. ***Mutation Research***, 582, 155-162.
- Wirtz, S., Nagel, G., Eshkind, L., Neurath, M. F., Samson, L. D. and Kaina, B. (2010). Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. ***Carcinogenesis***, 31, 2111-2117.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. and Prior, S. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. ***American Journal of Clinical Nutrition***, 52, 4026-4037.
- Xu, Y., Jiang, Z., Ji, G. and Liu, J. (2010). Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. ***Planta Medica***, 76, 956-962.
- Yan, Y., Yang, J., Chen, G., Mou, Y., Zhao, Y., Pan, L., Ma, C., Liu, X. and Wu, C. (2011). Protection of resveratrol and its analogues against ethanol induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. ***Mutation Research***, 721(2), 171-177.
- Yañez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Canteras, M. and Teruel, J. A. L. (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines, relationship between structure and activity. ***Nutrition and Cancer***, 49, 191-199.

- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T. and Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381-406.
- Yang, Y. S., Ahn, T. H., Lee, J. C., Moon, C. J., Kik, S. H., Jun, W., Park, S. C., Kim, H. C. and Kim, J. C. (2008). Protective effect of pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 380-387.
- Yano, C. L. and Marcondes, M. C. C. G. (2005). Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1378-1384.
- Yemis, G. P., Pagotto, F., Bach, S. and Delaquis, P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species, *Journal of Food Protection*, 74, 2062-2069.
- Yen, G. C., Duh, P. D. and Lin, C. W. (2003). Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radical Research*, 37(5), 509-514.
- Yeşil-Çeliktaş, O., Sevimli, C., Bedir, E. and Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), 158-163.
- Youm, J. A. and Kim, Y. G. (2003). Examination of the antioxidant potential of pycnogenol under conditions of oxidative stress in *Escherichia coli* mutants deficient in HP1 and superoxide dismutase activities. *Journal of Microbiology*, 41(1), 28-33.
- Yu, H. H., Hur, J. M., Seo, S. J., Moon, H. D., Kim, H. J., Park, R. K. and You, Y. O. (2009). Protective effect of ursolic acid from *Cornus officinalis* on the hydrogen peroxide- induced damage of HEI-OC1 auditory cells. *American Journal of Chinese Medicine*, 37, 735-746.
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T. and Wang Z. (2008). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 113, 160-165.
- Zhao, X., Aldini, G., Johnson, E. J., Rasmussen, H., Kraemer, K., Woolf, H., Musaeus, N., Krinsky, N. I., Russell, R. M. and Yeum, K. J. (2006). Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 163-169.
- Zheng, W. and Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolics compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

EKLER

EK-1. Girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurul onayı

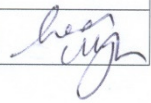
	
GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU	
DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Doğal Ürünlerde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Zeki AYTAÇ		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	Doktora Tezi ☐	
	İLAC DIŞI ARAŞTIRMA	☒	☐ İLAC DIŞI GİRİŞİMSEL ☒ İLAC DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN 5.Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	SİGORTA	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 258	Toplantı tarihi: 13.06.2012
	Üniversitemiz Fen-Edebiyat Fakültesinde Prof.Dr.Zeki Aytaç'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Doktora Tezi olan Klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

EK-1. (devam) Girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurul onayı

Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TANER, Gökçe
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 25.08.1981, Kayseri
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (312) 202 14 53
 Faks : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : gtaner@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2015
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2007
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2004
Lise	Ankara Atatürk Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-Halen	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik A.D. Ankara, Türkiye	Araştırma Görevlisi
2013-2013	INRA/TOXALIM Gıda Toksikolojisi Araştırma Merkezi Genotoksisite&Sinyalizasyon Laboratuvarı Toulouse/Fransa	Misafir Araştırmacı

Yabancı Dil

İngilizce (İyi derecede, ÜDS:80/YDS: 73,75)
 Fransızca (Başlangıç seviyesi A1, Gazi Tömer)

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI-Core, SCI-Expanded)

1. Tokaç, M., Aydın, S., Taner, G., Özkardeş, A.B., Yavuz Taşlıpınar, M., Doğan, M., Dünder, H.Z., Kılıç, M., Başaran, A.A., Başaran, N. (baskıda). Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene in acute cholestasis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, (DOI: 10.3906/sag-1404-57).
2. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T., Başaran, A.A., Başaran, N. (baskıda). Does rosmarinic acid treatment have protective role against sepsis-induced damage in wistar albino rats? *Human and Experimental Toxicology*
3. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Sarıgöl, Z., Şahin, T., Başaran, A.A., Başaran, N., Aydın, M. (baskıda). Resveratrol treatment protects rat kidney and liver from sepsis-induced oxidative damage. *Acta Gastro-enterologica Belgica*
4. Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., Sarıgöl, Z., Şahin, T.T., Başaran, A.A., Başaran, N., (2014). Modulating Effects of Pycnogenol® on Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Sepsis in Rats. *Phytotherapy Research*, 28, 1692-1700.
5. Taner, G., Yeşilöz, R., Özkan Vardar, D., Şenyiğit, T., Özer, Ö., Degen, G.H., Başaran, N. (2014). Evaluation of the Cytotoxic and Genotoxic Potential of Lecithin/Chitosan Nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 16 (2), 2220.
6. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T.T., Başaran, A.A., Başaran N. (2014). The Protective Role Of Ferulic Acid On Sepsis-Induced Oxidative Damage In Wistar Albino Rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, 774-782.
7. Taner, G., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A.A., Başaran, N. (2013). Assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of pycnogenol in *in vitro* mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 203-208.
8. Tokaç, M., Taner, G., Aydın, S., Özkardeş, A.B., Dünder, H.Z., Yavuz Taşlıpınar, M., Arıkök, A.T., Kılıç, M., Başaran, A.A., Başaran, N. (2013). Protective effects of curcumin on oxidative stress parameters and DNA damage induced by biliary obstruction in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 28-35.
9. Aydın, S., Tokaç, M., Taner, G., Arıkök, A.T., Dünder, H.Z., Özkardeş, A.B., Yavuz Taşlıpınar, M., Kılıç, M., Başaran, A.A., Başaran, N. (2013). Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Lycopene in Obstructive Jaundice. *Journal of Surgical Research*, 182(2), 285-295.
10. Ünal, F., Taner, G., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S. (2013). Antigenotoxic Effects of Lipoic Acid Against Mitomycin-C On Human Lymphocyte Cultures. *Cytotechnology*, 65(4), 553-565.

11. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Şahin, T.T., Başaran, A.A., Başaran, N. (2013). Protective Effects of Resveratrol on Sepsis-induced DNA Damage in the Lymphocytes of Rats. *Human and Experimental Toxicology*, 32(10), 1048-1057.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Bacanlı, M., Taner, G., Başaran A.A., Başaran, N. (baskıda). Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri. *Türkiye Klinikleri Eczacılık Bilimleri Dergisi*

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan sözlü bildiriler

1. Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Use of the standart and Fpg modified comet assay for the detection of the role of pycnogenol in sepsis induced DNA damage. *10th International Comet Assay Workshop (ICAW 2013)*, Porto/Portekiz.
2. Başaran, N., Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A. (2013). Evaluation of some phenolic compounds on sepsis-induced DNA damage by alkaline comet assay. *10th International Comet Assay Workshop (ICAW 2013)*, Porto/Portekiz.
3. Taner, G., Özkan-Vardar, D., Şenyiğit, T., Özer, Ö., Başaran, N. (2012). Evaluation of the genotoxic effects of Lecithin/Chitosan nanoparticles by micronucleus assay in human lymphocytes. *Nanosafety Congress: "Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms and Workshop on Genotoxicity Tests to Assess Human Toxicity"*, Antalya-Kemer/ Türkiye.
4. Yeşilöz, R., Taner, G., Degen, G.H., Başaran, N. (2012). Assessment of *in vitro* genotoxic and cytotoxic effects of titanium dioxide nanoparticles. *Nanosafety Congress: "Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms and Workshop on Genotoxicity Tests to Assess Human Toxicity"*, Antalya-Kemer/ Türkiye.
5. Taner, G., Aytaç, Z., Aydın, S., Başaran, A., Başaran, N. (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of plant polyphenols in human lymphocytes by the alkaline comet assay, *ICAW 2011 (9. International Comet Assay Workshop)*, Kuşadası/ Türkiye.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan poster bildiriler

1. Taner, G., Sarıgöl, Z., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2014). *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of cinnamic acid. *ESTIV 2014 (18th International Congress on in vitro Toxicology)*, Egmond aan Zee, Hollanda.

2. Taner, G., Özkan Vardar, D., Başaran, A., Başaran, N. (2014). Effects of Resveratrol on Titanium Dioxide Induced Cytotoxicity. *NANOTOX 2014 (7th International Nanotoxicology Congress)*, Antalya, Türkiye.
3. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Göktaş, H.G., Şahin, T., Başaran, A.A., Başaran, N. (2014). Effects of ferulic acid on oxidative stress parameters in livers and kidneys of Wistar albino rats. *EUROTOX 2014 (50th Congress of the European Societies of Toxicology)*, Edinburg, İngiltere.
4. Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., Şahin, T., A. Başaran, A., Başaran, N. (2013). Modulating effects of pycnogenol on sepsis induced dna damage in the liver and renal tissue cells of rats. *EUROTOX 2013 (49th Congress of the European Societies of Toxicology)*, İnterlaken/İsviçre.
5. Taner, G., Özkan Vardar, D., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Use of *in vitro* assays to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of vanillic acid. *EUROTOX 2013 (49th Congress of the European Societies of Toxicology)*, İnterlaken/ İsviçre.
6. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Antigenotoxic effects of ferulic acid on sepsis-induced DNA damage in the liver and kidney of wistar albino rats, *EUROTOX 2013 (49th Congress of the European Societies of Toxicology)*, İnterlaken/ İsviçre.
7. Sarıgöl, Z., Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Cytotoxicity of pycnogenol and resveratrol in CHO and HeLa cell lines. *EUROTOX 2013 (49th Congress of the European Societies of Toxicology)*, İnterlaken/ İsviçre.
8. Özkan Vardar, D., Taner, G., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Assessment of the Protective effects of resveratrol on titanium dioxide induced DNA damage by comet assay, *10th International Comet Assay Workshop (ICAW 2013)*, Porto/ Portekiz.
9. Özkan Vardar, D., Taner, G., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Comparative protective effects of curcumin and resveratrol against titanium dioxide induced DNA damage. *2nd International Conference on Occupational & Environmental Toxicology (ICOETox 2013)*, Porto/ Portekiz.
10. Sarıgöl, Z., Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., A.Başaran, A., Başaran, N. (2013). Evaluation of the cytotoxicity of some phenolic compounds in CHO, HeLa and BT 474 cell lines. *Cellular & Molecular Mechanisms of Toxicity, Gordon Research Conferences*, Andover, New Hampshire, Amerika Bileşik Devletleri.
11. Taner, G., Özkan Vardar, D., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2013). Evaluation of genotoxic/antigenotoxic potential of vanillic acid by cytokinesis blocked micronucleus assay. *XII. International Congress of Toxicology (ICT 2013)*, Seoul/ Güney Kore.
12. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2013). The effects of resveratrol on sepsis induced DNA damage. *XII. International Congress of Toxicology (ICT 2013)*, Seoul/ Güney Kore.

13. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Şahin, T., A. Başaran, A., Başaran, N. (2013). Protective effects of ferulic acid on the sepsis induced DNA damage in the liver and kidney cells of rats. *XII. International Congress of Toxicology (ICT 2013)*, Seoul/Güney Kore.
14. Taner, G., Aydın, S., Bacanlı, M., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Can pycnogenol prevent the sepsis induced DNA damage in wistar albino rats? *EEMS 2012, 42nd European Environmental Mutagen Society Annual Conference*, Varşova/Polonya.
15. Özkan Vardar, D., Taner, G., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Assessment of the protective effects of curcumin on titanium dioxide induced DNA damage by comet assay. *EEMS 2012, 42nd European Environmental Mutagen Society Annual Conference*, Varşova/Polonya.
16. Sarıgöl, Z., Taner, G., Yılmaz, N., Aydın, S., Ündeğer Bucurgat, Ü (2012). Assessment of genotoxic effects of herbicide pendimethaline by comet and micronucleus assays. *EEMS 2012, 42nd European Environmental Mutagen Society Annual Conference*, Varşova/Polonya.
17. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Protective effects of rosmarinic acid on sepsis-induced DNA damage in the lymphocytes of rats. *EEMS 2012, 42nd European Environmental Mutagen Society Annual Conference*, Varşova/Polonya.
18. Taner, G., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Evaluation of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of pycnogenol in *in vitro* mammalian cells. *Nanosafety Congress: "Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms and Workshop on Genotoxicity Tests to Assess Human Toxicity"*, Antalya-Kemer/ Türkiye.
19. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Modulating effects of ferulic acid on DNA damage induced by polymicrobial sepsis in the lymphocytes of wistar albino rats. *Nanosafety Congress: "Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms and Workshop on Genotoxicity Tests to Assess Human Toxicity"*, Antalya-Kemer/ Türkiye.
20. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Assessment of resveratrol on sepsis-induced oxidative DNA damage in whole blood cells of Wistar albino rats by Comet assay. *Nanosafety Congress: "Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms and Workshop on Genotoxicity Tests to Assess Human Toxicity"*, Antalya-Kemer/ Türkiye.
21. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Assessment of antioxidant activity of 11 phenolic compounds using the TEAC assay", *10th international symposium on pharmaceutical sciences (ISOPS-10 2012)*, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Ankara, Türkiye.

22. Aydın, S., Taner, G., Tokaç, M., Başaran, A., Başaran, N. (2011). Protective effect of lycopene on oxidative DNA damage induced by cholestasis. *ICAW 2011 (9. International Comet Assay Workshop)*, Kuşadası/ Türkiye.
23. Taner, G., Tokaç, M., Özkardeş, A.B., Aydın, S., Başaran, N. (2011). Protective effects of curcumin on DNA damage induced by bile duct ligation. *EUROTOX 2011 (47th Congress of the European Societies of Toxicology)*, Paris/ Fransa.
24. Taner, G., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, N. (2011). Genotoxic and antigenotoxic effects of pycnogenol in human lymphocytes assessed by the alkaline comet assay. *EUROTOX 2011 (47th Congress of the European Societies of Toxicology)*, Paris/ Fransa.
25. Taner, G., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S. (2009). Antigenotoxic effects of lipoic acid against mitomycin-c on human lymphocyte cultures. *10th International Conference On Environmental Mutagens, 39th Annual Meeting Of The European Environmental Mutagen Society*, Floransa/ İtalya.
26. Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Taner, G., Yılmaz, S., Çelik, M. (2009). Genotoxicity testing of aclonifen *in vivo* and *in vitro*. *10th International Conference On Environmental Mutagens, 39th Annual Meeting Of The European Environmental Mutagen Society*, Floransa/ İtalya.
27. Saraç, Ö., Filiz, F., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Taner, G., Aksoy, H., Yılmaz, S. (2009). Genotoxic and antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechine gallate (EGCG) against mitomycin-c induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro*. *10th International Conference On Environmental Mutagens, 39th Annual Meeting Of The European Environmental Mutagen Society* Floransa/ İtalya.
28. Taner, G., Çömez, Ö., Özkan, D., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. (2005). *In vitro* cytogenetic studies on the effect of fungicide hexaconazole. *II. International Environmental Protection Symposium*, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya/Türkiye .

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan sözlü bildiriler

1. Başaran, N., Bacanlı, M., Taner, G., Sarıgöl, Z., Başaran, A. (2013). Farklı hücre tiplerinde fenolik yapıdaki doğal bileşenlerin sitotoksikite değerlendirmesi. *1. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Kongresi*, Çeşme Altın Yunus Hotel/ İzmir.
2. Taner, G., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S. (2008). Lipoik asit ve ferulik asidin insan lenfosit kültüründe mitomisin-c'ye karşı antigenotoksik etkileri. *19. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Trabzon.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan poster bildiriler

1. Taner, G., Sarıgöl, Z., Aydın, S., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of rosmarinic acid in *in vitro* mammalian cells. 8. *Uluslararası katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, Beldibi, Kemer/Antalya.
2. Taner, G., Özkan Vardar, D., Aytaç, Z., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Modulating effects of vanillic and trans-cinnamic acids on hydrogen peroxide induced genotoxicity in the comet assay. 8. *Uluslararası katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, Beldibi, Kemer/Antalya.
3. Sarıgöl, Z., Yılmaz, N., Taner, G., Aydın, S., Ündeğer Bucurgat, Ü. (2012). Evaluation of genotoxic effects of herbicide pendimethaline by comet assay. 8. *Uluslararası katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, Beldibi, Kemer/Antalya.
4. Aydın, S., Bacanlı, M., Taner, G., Şahin, T., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Protective effect of resveratrol on sepsis-induced DNA damage in the liver and renal tissue cells of rats. 8. *Uluslararası katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, Beldibi, Kemer/Antalya.
5. Bacanlı, M., Aydın, S., Taner, G., Başaran, A., Başaran, N. (2012). Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of ferulic acid. 8. *Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi*, Beldibi- Kemer/Antalya.
6. Taner, G., Yeşilöz, R., Özkan Vardar, D., Şenyiğit, T., Özer, Ö., Degen, G.H., Başaran, N. (2012). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of lecithin/chitosan nanoparticles. *NanoTR-VIII. (8. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı)*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
7. Tokaç, M., Aydın, S., Özkardeş, A.B., Taner, G., Kılıç, M., Başaran, N. (2011). Deneysel tıkanma ikterinde likopenin oksidatif DNA hasarı üzerine etkileri. 6. *Cerrahi Araştırma Kongresi*, Sheraton Otel, Ankara.
8. Yeşilöz, R., Taner, G., Şenyiğit, T., Özer, Ö., Başaran, N. (2011). Genotoxicity of lecithin/chitosan nanoparticles in human lymphocytes assessed by the alkaline comet assay. *NanoTR-VII 2011 (7.Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı)*, Sabancı Üniversitesi, İstanbul.
9. Demirtaş, F., Taner, G., Ünal, F., Suludere, Z., Erol, Ö., Ünal, H.İ., Yüzbaşıoğlu, D. (2010). Titanium dioxide (TiO₂) genotoxicity in human lymphocytes assessed by the alkaline comet assay. *NanoTR-VI 2010 (6. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı)*, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Çeşme/İzmir.
10. Gökçe, H., Yüzbaşıoğlu, D., Taner, G., Ünal, F. (2010). Comet testinde insan periferik kan lenfositlerinin dondurularak kullanımı için bir metod denemesi. 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Pamukkale Üniversitesi/Denizli.

11. Saraç, Ö., Taner, G., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. (2010). Kafeik asit fenetil esterinin hidrojen peroksit'e karşı antienetoksik etkileri. 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Pamukkale Üniversitesi/Denizli.
12. Saraç, Ö., Taner, G., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. (2010). Kafeik asit fenetil esterinin genotoksik ve mitomisin-c'ye karşı antienetoksik etkilerinin mikronükleus testi ile değerlendirilmesi. 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Pamukkale Üniversitesi/Denizli.
13. Saraç, Ö., Ünal, F., Taner, G., Yüzbaşıoğlu, D. (2010). (-)-Epigallokateşin gallat'ın mitomisin-c kaynaklı mikronükleus oluşumuna karşı antienetoksik etkileri. 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Pamukkale Üniversitesi/Denizli.
14. Filiz, F., Ünal, F., Taner, G., Yüzbaşıoğlu, D. (2010). A Vitamininin (retinol) insan lenfosit kültürlerinde genotoksik ve metil metan sülfonata karşı antienetoksik etkilerinin kardeş kromatit değişimi testi ile belirlenmesi. 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Pamukkale Üniversitesi/Denizli, 2010.

Popüler Bilim Yayınları

1. Taner, G. (2002). Yanar-Döner Çiçeği Yok Olmasın. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 420, TÜBİTAK.
2. Taner, G. (2003). Doğal Hayatı Koruma Topluluğu- Biyoloji Sergisi. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 422, TÜBİTAK.
3. Taner, G. (2003). Bilgi ve Dostluğun Buluşması: Biyoloji Öğrencileri Platformu. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 423, TÜBİTAK.
4. Taner, G. (2003). Krom Kirliliğinin Yabancı Yaşama Etkileri. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 426, TÜBİTAK.
5. Taner, G. (2003). Kemirgenler ve Ekosistem. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 429, TÜBİTAK.
6. Taner, G. (2003). Kromozom Anomalileri ve Doğum Öncesi Tanı. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 430, TÜBİTAK.
7. Taner, G. (2004). Genotoksikoloji. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 442, TÜBİTAK.
8. Taner, G. (2005). Biyologların Mesleki Gelişimi. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 448, TÜBİTAK.
9. Taner, G. (2005). Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma. *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayı: 453, TÜBİTAK.
10. Taner, G. (2013). Bilimsel Etkinliklerin Ardından: 2012 Advanced Toxicology Course. *Toksikoloji Bülteni*, Türk Toksikoloji Derneği Yayın Organı, sayı:36.

Hobiler

Tiyatro, Opera ve Bale, Sinema, Müzik



GAZİ GELECEKTİR..