

**o-Kumarik Asit'in (Trans 2-Hidroksisinnamik Asit)
Apoptoz ve Karsinojen Yolakları ile Ksenobiyotik
Metabolizması Üzerine Etkilerinin Moleküler
Düzeyde Aydınlatılması.**

Proje No: 111T011

Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN

TEMMUZ 2012
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Günümüzde birçok insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin en aza indirilmesi ve çeşitli hastalık etmenlerine karşı koruyucu ajanlar olarak bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasalları sıklıkla tüketmektedirler. Bu yüzden, son yıllarda fitokimyasalların anti-kanserojenik, anti-oksidatif ve anti-mutajenik etkiler gösterdiğini, karsinojenlerin metabolizmasında etken bir role sahip olan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak bu tür maddelerin metabolizmasını değiştirdiğini bildiren birçok bilimsel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu fitokimyasalların çeşitli hastalıklardaki koruyucu ya da iyileştirici rollerinin veya zararlı etkilerinin tanımlanmasına yönelik bilimsel araştırmalar artan bir ilgi ile devam etmektedir. Günümüzde bitkilerden izole edilmiş birçok aktif bitki bileşenleri dünyanın dört bir tarafında yaygın olarak kullanılmakta ve bazı kanser türlerinde ise umut kaynağı olarak görülmektedir. Bitkilerde bulunan bu aktif maddeler grubundan biride fenolik asitlerdir. Fenolik asitler bitki âleminde çok sıklıkla rastlanan önemli sekonder metabolitlerdendir. Fenolik asitler hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki ana alt gruba ayrılırlar. C6-C3 fenilpropan yapısında olan hidroksisinamik asitler, fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, *p*- kumarik asit (4-hidroksisinamik asit) ve *o*-kumarik asittir (2-hidroksisinamik asit). Bu fenolik asitler sebze, meyve, hububat, kuruyemiş, , kahve ve çay da yüksek miktarda bulunduğundan, insanların diyetle birlikte sıklıkla aldıkları bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar kafeik asit, ferulik asit ve *m*- ve *p*-kumarik asidin anti-oksidatif, anti-fibroz, anti-viral, anti-tümör, anti-trombotik anti-hipertansif gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. Buna karşın, *o*-kumarik asidin biyolojik aktivitelerine yönelik çalışmalar literatürde çok azdır. Bu çalışmalar daha çok bu maddenin anti-oksidan ve anti-lipidemik aktiviteleri ile ilgilidir. Bu nedenle, benzer fenolik asitler gibi anti-karsinojenik etki gösterme ihtimalinin yüksek olması ve insanlar tarafından diyetle beraber sık alınması, *o*-kumarik asidi insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Bu çalışmada diyetle sıklıkla alınan ve geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan ısırgan otu, ökse otu, mercanköşkü, zerdeçal, keten tohumu, yaban mersini, kudret narı ve

kuşkonmaz gibi bitkilerde bulunan o-kumarik asidin, anti-karsinojenik etkilerinin ve etki mekanizmalarının saptanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, insan meme kanseri (MCF 7), insan karaciğer kanseri (HepG2) ve insan fibroblast hücre hattında (3T3) sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Antikarsinojenik etki mekanizmalarında rol oynayan hücre döngüsü düzenleyici genler (*siklin D2*, *p21* ve *p16*) ve tümör baskılayıcı genlerin (*p53*, *PTEN*) ekspresyon düzeyleri (mRNA ve protein düzeyleri) tespit edilerek etki mekanizmaları tanımlanmaya çalışıldı. Ayrıca bu fenolik asit'in Apoptoz yollarında çalışan *Bcl-2*, *bax*, *Kaspaz 3* ve *9*, *APAF-1* gibi genlerin ekspresyon ve protein düzeyleri tespit edildi. Tüm bunların yanı sıra o-kumarik asidin HepG2 hücre hattında, prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önem arz eden spesifik sitokrom P450 izozimlerinin ekspresyon ve protein düzeyleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular, o-kumarik asidin MCF-7 hücrelerinde yukarıda belirtilen genlerin ekspresyonlarında değişmelere yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, bu fenolik asidin HEPG2 hücrelerinde CYP450 izozimlerinin ekspresyonlarında ciddi değişimlere sebep olduğu saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar o-kumarik asidin anti-karsinojenik etki göstermesine rağmen kanser oluşum riski, klinik toksite ve ilaçların metabolizmasında bozulmalara sebep olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu yüzden bu sekonder bileşik için doz ayarlanması yapılması gerçeği ortaya konmuştur.

TÜBİTAK AR-GE Eşgüdüm Daire Başkanlığına Hızlı Destek Programı kapsamında sunduğumuz bu çalışma TEMEL BİLİMLER ARAŞTIRMA GRUBU (TBAG) tarafından 111T011 kodu ile desteklenmiştir. TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ.....	15
2 MATERYAL ve METOT.....	24
2.1 Hücre Kültürü ve o-Kumarik Asidin Uygulanması.....	24
2.2 mRNA .Ekspresyon Düzey Tayini.....	24
2.2.1 Hüce Hattında ..Total RNA izolasyonu.....	24
2.2.2 cDNA Sentezi.....	25
2.2.3 Yarı Kantitatif .Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	25
2.3 Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini	28
2.3.1 Trizol Alt Fazından Protein İzolasyonu.....	28
2.3.2 SDS Poliakrilamid jel Elektroforezi (SDS-PAJE).....	29
2.3.3 Western Blot Analizi.....	31
3 BULGULAR.....	33
3.1 Farklı Konsantrasyonlarda o-kumarik Asidin Sitotoksik Etkisi.....	33
3.2 mRNA Ekspresyon Düzey Tayini	37
3.2.1 Hücre Döngüsü, Apoptoz ve Tümör Baskılayıcı Proteinlerin mRNA ve Protein Düzeylerinin MCF-7 ve 3T3 Hücre Hatlarında Tayini.....	38
3.2.2 CYP450 İzozimlerinin Protein ve mRNA Düzeylerinin HepG2 Hücre Hattında Tayini.....	57
4 TARTIŞMA.....	62
5 SONUÇ.....	67
6 KAYNAKLAR.....	68

ÖZET

o-Kumarik Asit'in (Trans 2-Hidroksisinnamik Asit) Apoptoz ve Karsinojen Yolakları ile Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde Aydınlatılması.

Günümüzde birçok insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin giderilmesi ve çeşitli hastalık etmenlerine karşı koruyucu ajanlar olarak bitkisel preparatları ya da normal diyetlerin bileşenleri olan fitokimyasalları sıklıkla tüketmektedirler. Bu çalışma insanların diyetle birlikte sıklıkla aldıkları ve geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitkilerin yapısında yaygın bir şekilde bulunan o-kumarik asitin anti-karsinojenik, apoptotik etkilerinin etki mekanizmaları ile olası diyet-ilaç potansiyelinin belirlenmesini kapsamaktadır. Bu amaçla, o-kumarik asit insan meme kanseri hücre hattına (MCF 7), insan karaciğer kanseri hücre hattına (HepG2) ve insan fibroblast hücre hattında (3T3) uygulandı ve sitotoksik etkileri ve etkin dozları saptandı. Anti-karsinojenik etki mekanizmalarında rol oynayan hücre döngüsü düzenleyici genler (siklin2, CDK4, p21 ve p16) ile onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin (pRb, p53, PTEN) ekspresyon düzeyleri tespit (mRNA ve protein düzeyleri) edilerek transkripsiyonel ve translasyonel etki mekanizmaları tanımlandı. Ayrıca apoptoz yollarında çalışan Bcl-2, bax, Kaspaz 3 ve 9, ve APAF-1 gibi proteinlerin gen ekspresyon ve protein düzeyleri tespit edildi. Tüm bunlara ek olarak, ilaç ve prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önem arz eden spesifik sitokrom P450 izozimlerinin gen ekspresyon ve protein düzeyleri üzerine etkileri belirlendi.

Sitotoksikite sonuçlarına göre, LD50 değerleri, MCF-7 HepG2 ve 3T3 hücreleri için sırasıyla 7,39 mM, 4.95 mM ve 7.96 mM olarak hesaplanmıştır. 3T3 hücrelerine MCF-7 ile karşılaştırma yapabilmek için MCF-7 hücrelerine uygulanan 4.95 mM o-kumarik asit dozu uygulandı. o-kumarik asit apoptoz yolağında görev alan Kaspaz 3 ve bax proteinlerinin mRNA ve protein seviyelerini artırırken (1.59-2.52-kat, $p < 0.05$), bu proteinlerin seviyeleri T3 hattında istatistiksel olarak anlamlı değişmemiştir. MCF-7 hücre hattında Bcl-2'in mRNA ve protein seviyesi sırasıyla 35% ve 48% azalmıştır ($p < 0.05$). 3T3 hücre hattında ise bcl-2'nin protein ve mRNA seviyesi yaklaşık 1.25-kat artmasına rağmen bu artış anlamlı bulunmamıştır. Apoptoz yolağında görev alan Apaf-1 ve kaspaz 9 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri 2 hücre hattında da değişmemiştir. O-kumarik uygulaması sonucunda hücre döngüsünde görev alan siklin D1, D2 ve siklin bağımlı kinaz 2'nin protein ve mRNA seviyeleri her iki hücre hattında da azalış göstermektedir (10-65%). O-kumarik asit tümör baskılayıcı

proteinlerden olan p53 ve PTEN'in mRNA ve protein seviyesini her iki hücre hattında artmasına neden olmuştur (1.55-3.43-kat, $p<0.05$). Retinblastomanın (Rb) mRNA ve protein seviyesinde anlamlı değişimlere yol açmamıştır. Tüm bunlara ek olarak, o-kumarik asit HepG2 hücre hattında CYP1A2, CYP2E1 ve CYP2C9'un mRNA ve protein seviyelerin artmasına sebep olmuştur (1.4-5.24-kat, $p<0.05$). CYP3A4'ün mRNA ve protein seviyesi ise azalmıştır (52 % ve 60%, $p<0.05$).

Tüm bu sonuçlar, o-kumarik asit, kanser oluşumunu ve gelişimini birçok noktadan engelleyerek antikarsinojenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat, kimyasal karsinogeneizde rol alan CYP1A2 ve CYP2E1 gibi proteinlerin o-kumarik asit uygulaması sonucunda indüklenmesi, kullanımdan önce bir doz ayarlanması yapılması gerçeğininide ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: o-kumarik asit, anti-karsinojen etki, apoptotik etki, Sitokrom P450 izozimleri, fitokimyasal-ilaç etkileşimleri, moleküler mekanizma

ABSTRACT

Investigating the effect of *o*-coumaric acid (trans 2-hydroxycinnamic acid) on apoptosis and carcinogen pathways and xenobiotic metabolism with molecular approaches.

Nowadays many people consume frequently herbal remedies or phytochemicals that are constituent of normal diet in order to reduce chemicals' toxic, mutagenic and carcinogenic effects and as a protective agent against various disease factors. The scope of this proposed research project is to determine action mechanism of the anti-carcinogenic, apoptotic effects and possible diet-drug interaction potential of the *o*-coumaric acid that is taken frequently by diet and found in traditional therapeutic medicinal plants widely. For this purpose, *o*-coumaric acid was applied to human breast cancer cell line (MCF-7), human liver cancer cell line (HepG2) and human fibroblast cell line (3T3). So, cytotoxic effects and effective doses was determined. Expression levels of cell cycle regulatory genes involved in anti-carcinogenic mechanisms (cyclin2, Cdk4, p21, and p16) and of oncogenes and tumor suppressor genes (pRb, p53, PTEN) was detected whereby transcriptional and translational mechanisms will be undertaken to clarify. Moreover, expression levels of genes working in the apoptosis pathway such as Bcl-2, bax, caspase 3, 8 and 9 and APAF-1 was identified and thus transcriptional and translational mechanisms will be attempted to define. In addition to all, expression and protein levels of cytochrome P450 isozymes important in drug and procarcinogen/carcinogen metabolism were determined

According to cytotoxicity results, LD50 values were calculated as 7,39 mM, 4.95 mM and 7.96 mM in, MCF-7 HepG2 and 3T3 cells, respectively. Although *o*-coumaric acid was increased the mRNA and protein levels of apoptotic proteins, namely caspase 3 and bax in MCF-7 cells (1.59-2.52-fold, $p < 0.05$), these proteins' mRNA and protein levels was not changed statistically significant in 3T3 cell line. Bcl-2's mRNA and protein levels were decreased 35% and 48% in MCF-7 cells, respectively ($p < 0.05$). Although, protein and mRNA levels of bcl-2 were increased approximately 1.25-fold, this increases were not found statistically significant. Apaf-1 and caspase 9 proteins' expression levels was not changed in both cell lines. The levels of mRNA

and proteins of cell cycle proteins namely cyclin D1, D2 and cyclin dependent kinase 2 were decreased in both cell lines (10-65%). In contrast to these proteins, another cell cycle regulatory protein CDKN2A' mRNA and protein levels were increased nearly 3.0-fold in MCF-7 cell line. On the other hand, mRNA and protein levels of CDKN2A were not changed statistically significant in 3T3 cells. O-coumaric acid caused increase in mRNA and protein levels of tumor suppressor proteins namely P53 and PTEN in both cell lines (1.55-3.43-fold, $p < 0.05$). mRNA and protein levels of Retinoblastoma (Rb) was not changed statistically significant. In addition to these, o-coumaric acid was caused increases in mRNA and protein levels of CYP1A2, CYP2E1 and CYP2C9 in HepG2 cells (1.4-5.24-fold, $p < 0.05$). In contrast to these, CYP3A4's mRNA and protein levels were decreased (52 % and 60%, $p < 0.05$).

All of these results, o-coumaric acid shows anti-carcinogenic acid by preventing cancer formation and development in multiple points. But, o-coumaric acid treatment was induced the CYP1A2 and CYP2E1 which are involved in chemical carcinogenesis so, dose adjustment must be required before usage.

Key Words: o-coumaric acid, anti-carcinogenic effect, apoptotic effect, Cytochrome P450 isozymes, Phytochemical-diet interaction, molecular mechanisms

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kanser tedavisinde Alternatif ve Tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler	16
Şekil 1.2 Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavide kullanılan biyo-etki gösteren aktif fitokimyasallar	19
Şekil 2.1 Trizol ile RNA, DNA ve protein izolasyonu	28
Şekil 3.1 Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin HepG2 hücre canlılığına etkisi.....	33
Şekil 3.2 Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin MCF-7 hücre canlılığına etkisi	33
Şekil 3.3 Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin 3T-3 hücre canlılığına etkisi	34
Şekil 3.4 Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin HepG2 hücre canlılığına etkisi	35
Şekil 3.5 Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin MCF-7 hücre canlılığına etkisi	35
Şekil 3.6. Değişik konsantrasyonlardaki <i>o</i> -kumarik asitin 3T3 hücre canlılığına etkisi	36
Şekil 3.7 İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi	37
Şekil 3.8 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-3 mRNA seviyesine olan ...	38
Şekil 3.9 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-3 protein seviyesine olan etkisi	39
Şekil 3.10 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-9 mRNA seviyesine olan etkisi	40
Şekil 3.11 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-9 protein seviyesine olan etkisi	41
Şekil 3.12 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bax mRNA seviyesine olan etkisi .	41
Şekil 3.13 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında BAX protein seviyesine olan etkisi	42

Şekil 3.14 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	43
Şekil 3.15 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 protein seviyesine olan etkisi	43
Şekil 3.16 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Apaf-1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 3.17 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 protein seviyesine olan etkisi.....	45
Şekil 3.18 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D1 mRNA seviyesine olan etkisi	46
Şekil 3.19 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D1 protein seviyesine olan etkisi	47
Şekil 3.20 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	47
Şekil 3.21 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D2 protein seviyesine olan etkisi.....	48
Şekil 3.22 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDK-2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	48
Şekil 3.23 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDK-2 protein seviyesine olan etkisi.....	49
Şekil 3.24 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDKN2A mRNA seviyesine olan etkisi.....	49

Şekil 3.25 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDKN2A protein seviyesine olan etkisi.....	50
Şekil 3.26 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında p53 mRNA seviyesine olan etkisi.....	51
Şekil 3.27 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında p53 protein seviyesine olan etkisi.....	52
Şekil 3.28 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında PTEN mRNA seviyesine olan etkisi.....	53
Şekil 3.29 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında PTEN protein seviyesine olan etkisi.....	54
Şekil 3.30 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Rb mRNA seviyesine olan etkisi.....	55
Şekil 3.31 <i>o</i> -Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Rb protein seviyesine olan etkisi.....	56
Şekil 3.32 <i>o</i> -Kumarik asit'in insan karaciğer hücre hattında CYP1A2 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi.....	57
Şekil 3.33 <i>o</i> -Kumarik asit'in insan karaciğer hücre hattında CYP2E1 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi.....	58
Şekil 3.34 <i>o</i> -Kumarik asit'in insan karaciğer hücre hattında CYP3A4 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi.....	59
Şekil 3.35 <i>o</i> -Kumarik asit'in insan karaciğer hücre hattında CYP2C9 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi.....	60

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Seçilen CYP450 ve Apoptotik genler için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları	25
Tablo 2.2 RT-PZR Prosedürü	28
Tablo 2.3 SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonlar.....	28

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
CYP450	Sitokrom P450
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonicacid)
APS	Amonyum persülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylthylene-diamine
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
KPi	Potasyum fosfat
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
TCA	Trikloro asetik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
o-CA	o-kumarik asit
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
HepG2	İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
3T3	İnsan fibroblast hücre hattı

1. GİRİŞ

Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ilave olarak, teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte her gün yeni bir ilaç çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla üretilmektedir. Bunun sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Bunun sonucunda insanlar da kanser dahil birçok hastalık oluşmaktadır. Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Günümüzde kanser gelişiminin ve kontrolünün doğal antioksidan, anti-mutajen ve anti-karsinojen maddeler kullanılarak önlenmesi (chemoprevention) giderek artan biçimde önem kazanmaktadır. Bu maddeler ilaç halinde sentetik olarak ya da diyet içerisinde tabii kaynaklı bileşikler halinde bulunmaktadır (Morse ve Stoner, 1993). Fakat birçok bitkinin içinde bulunan doğal kaynaklı anti-oksidan, anti-mutajen ve anti-karsinojen maddelerin önemi son yıllarda giderek artmaya başlamıştır. Fitokimyasallara gösterilen artan ilgi, bu kimyasalların kanser, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patofizyolojik oluşumlarda önemli koruyucu rollere sahip olmalarının yapılan bilimsel çalışmalar ile gösterilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu maddeleri içeren sebze ve meyve tüketiminin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir. (Nestle, 1992, Giuliano, ve Gapstur, 1998, Nestle, 1998). Ayrıca, dünyada ve de Türkiye de pek çok kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra bu maddeleri içeren bitkisel preparatları tamamlayıcı ve alternatif tedavi olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bunun sonucunda, günümüzde bu ürünlere gösterilen ilgi her geçen gün artmakta, hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Bu ürünlerin, ABD'de 5 milyar dolar, dünya genelinde ise 50 milyar dolarlık yıllık ticaret hacmine eriştiği belirtilmektedir (Gruenwald 2000). Ancak halk arasındaki yanlış yaygın kanı bu preparatların doğal olduğu ve zararsız olduğu inancının aksine bu preparatların hayati tehlike arz eden durumlar oluşturmaktadır.

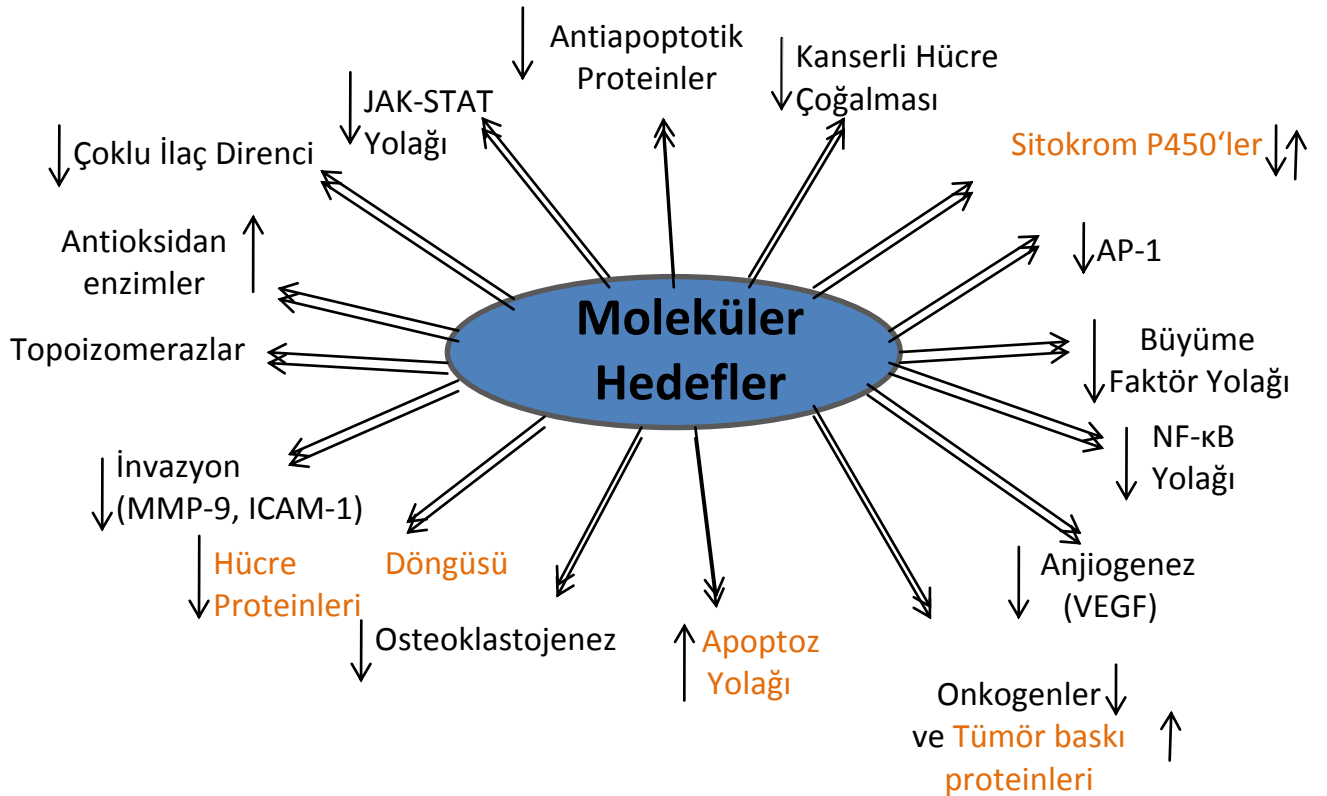
Bitkisel materyallerde bulunan fitokimyasallar kabaca, fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler bitkide serbest ve bağlı formda bulunurlar. Bağlı fenolikler ester, eter ve asetal bağları ile çeşitli bitkisel bileşiklere bağlanmış olabilirler (Xu ve ark., 2007). Bitkilerin büyümesinde ve üremesinde çok önemli görevleri olan bu bileşikler genellikle hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki ana alt gruba ayrılırlar. (Bravo, 1998). Fenolik asitlerden, “hidroksisinamik asitler” grubundaki bileşiklerin yapısı, C6-C3 iskeletine dayanmaktadır. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde hidroksinamik asitlerin büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunurlar. Bu aktif maddeler üzüm, çilek, kayısı, elma, portakal, patates, soğan, sarımsak, turp, soya, havuç gibi sebze ve meyvelerde, buğday, arpa, pirinç gibi hububatlarında, yer fıstığı gibi kuruyemişlerde, pekmez, bal, şarap, kahve ve çay da yüksek miktarda bulunduğundan, insanların diyetleriyle sıklıkla aldıkları bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadır (King ve Young, 1999; Özkan, 1999; Karadeniz ve Ekşi, 2001; Di Mauro ve ark., 2002; Giusti ve Wrolstad, 2003; Robbins, 2003; Turhan ve Yıldız, 2003; Yao ve ark., 2004; Nystrom ve ark., 2005; Göktürk Baydar, 2006; Gorinstein ve ark., 2008; Nilüfer ve Boyacıoğlu, 2008; Christophoridou ve Dais, 2009; Kan ve Bostan, 2010). Ayrıca hidroksisinamik asitler, ülkemizde “Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavide” sıklıkla kullanılan ısırgan otu, ökse otu, zerdaçal, kokulu yonca, kelek otu, kuşburnu, karayemiş, keten tohumu, kuşkonmaz, kudret narı, yaban mersini gibi bitkilerde de bulunmaktadır (Güvenç, 1997; Ayan ve ark., 2004; İşleroğlu ve ark., 2005; Pappas ve Schaich, 2009; Zhang ve ark., 2009;).

Bitkilerdeki fenolik maddelere baktığımız zaman flavonoidler bu maddelerin yaklaşık üçte ikisini içeren baskın sınıf olarak karşımıza çıkmasına rağmen, son yıllarda küçük bir sınıf olan fenolik asitlerin antioksidan özellikleriyle alakalı birçok çalışma dikkatleri bu grup üzerine çekmiştir. Bu maddelerin bitki odaklı yiyeceklerin yapısında kaçınılmaz olarak bulunduğundan dolayı, insanlar diyetlerine göre (diyetlerin sebze, meyve hububat, çay, kahve, baharat oranlarına göre) bu maddelerden günde yaklaşık 25 mg ile 1g arasında almaktadırlar (Clifford, 1999). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalar kafeik asit, ferulik asit ve *m*- ve *p*-kumarik asit gibi fenolik asitlerin anti-fibroz, anti-viral, anti-tümör, anti-trombotik anti-hipertansif gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir (Graf, 1992;

Asanoma ve ark., 1994; Fesen ve ark., 1994; Park ve Kahng, 1995; Hudson ve ark., 2000; Morton ve ark., 2000; Adom and Liu, 2002; Johnson ve ark., 2004; Balasubashini ve ark., 2004; Kampa ve ark., 2004; Chuang ve ark., 2005; Khanduja ve ark., 2006; Ren ve ark., 2009; Maurya ve Devasagayam, 2010; Prasad ve ark., 2010). Buna karşın, o-kumarik asidin biyolojik aktivitelerine yönelik çalışmalar literatürde çok azdır (Owen ve ark., 2000; Yeh ve ark., 2005; Hsu ve Yen, 2007; Hsu ve ark., 2009).

Antikarsinojenik etki ve Fitokimyasal Etkiler (Proje Kapsamında)

Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji teknikleri, kanser biyolojisi ve oluşum mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, birçok bitkisel ajanın hücre içi sinyal yollarındaki hedef proteinlerin ekspresyonlarını etkileyerek tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Şekil 1). Bu proje kapsamında çalışılan, kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan hedef sinyal yolları aşağıda verilmektedir:



Şekil 1.1. Kanser tedavisinde Alternatif ve Tamamlayıcı tedavi olarak kullanılan bitkilerin etkilediği hedef proteinler (**Proje kapsamına çalışılanlar**), (Aggarwal ve ark., 2006'dan uyarlanmıştır)

a. Tümör baskılayıcı genler: Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler) ise kontrolsüz hücre proliferasyonu önlemede yer alırlar. Bu genlerde mutasyonlar sonucunda meydana gelen fonksiyon kaybı tümör gelişimine sebep olabilir. Bu genlerden başlıcaları: Retinoblastoma (Rb), p53, PTEN, BRCA-1 ve BRCA-2, Adenomatöz polipozis koli (APC), VHL, NF-1 ve NF-2 genleridir. Rb hücre siklusunda G1'den S fazına ilerlemesinde fren görevi yapan proteindir. Diğer önemli tümör baskılayıcı gen p53'tür. p53 geni 17. kromozom üzerinde bulunur. 11 ekzondan oluşur. DNA hasarı sonrası ekspresyonu artar ve DNA tamiri tamamlanana kadar hücrenin S fazına girmesini engeller. p53 tümör baskılayıcı gen, insan kanserlerinde en sık mutasyon gözlenen genlerden biridir (Machado-Silva ve ark., 2010).

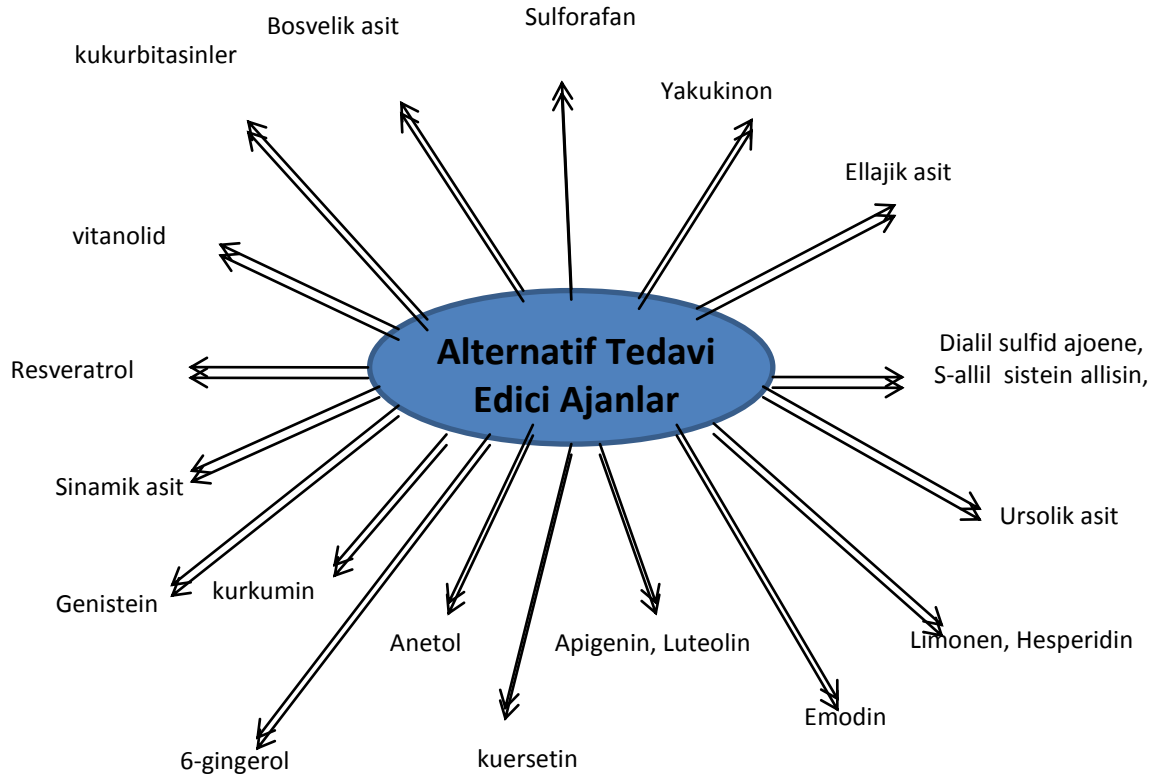
b. Hücre döngüsü düzenleyici proteinleri: Hücre döngüsü döngü evresine göre düzeyleri değişen siklin, siklin bağımlı kinazlar (CDK) siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) proteinleri tarafından kontrol edilir. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Bu proteinler, siklin'e bağlandıklarında aktifleşerek aktif siklin-CDK komplekslerini oluştururlar. Bu kompleks hedef proteinleri fosforile ederek hücre döngünün devamlılığını sağlar (Alberts ve ark., 2002). Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde 11 adet CDK ve 16 adet siklin rol oynamaktadır (Cadabak, 2008). Siklin D ve CDK 4 hücre döngüsünde S fazına geçişte rol alan kompleksi oluşturan iki proteindir. Siklin/CDK kompleksin aktivitesi CDK inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinler Siklin/CDK kompleksi oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe eder. Etkiledikleri CDK ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı CDKI ailesi vardır. Cip/Kip ailesi p21, p27, p57 isimli proteinlerden oluşur ve tüm CDK'ları inhibe ederler. Diğer yandan INK4/ARF ailesi ise p15, p16, p18, p19 proteinlerinden oluşur ve CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder (Cadabak 2008). Tüm bu genlerin ekspresyonlarında ve proteinlerinin miktarlarındaki artış ve ya azalış birçok kanser türünde sık rastlanan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Ekmekci ve ark., 2008)

c. Apoptoz yolları: Apoptoz normal hücre devir oranı, immün sistem, embriyonik gelişim, metamorfoz, hormon bağımlı atrofi ve ayrıca kimyasallara bağlı olarak oluşan hücre ölümünü içeren pek çok biyolojik olayda önemli bir prosestir. Bunun yanında, apoptoz/proliferasyon dengesindeki değişim, Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıkları ve bazı kanser

türlerine neden olmaktadır (Mcphie ve ark., 2003, Cohen, 1997). Apoptoz/proliferasyon dengesi sağlıklı doku homeostazının devamına bağlıdır ve bu dengenin bozulması kanser dahil birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol almaktadır (Mcphie ve ark., 2003). Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptoza gidemeyen hücreler habis hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton ve ark., 2009). Bundan dolayı, son yıllarda, anti tümör ilaç geliştirme araştırmalarında apoptozun indüklenmesi önemli bir strateji haline gelmiştir. Özellikle bitkilerden elde edilen aktif maddeler metastatik hücrelerde apoptoz tetikleyicisi olarak kullanılabilir. (Senderowicz, 2004). Apoptotik süreçte temel olarak iki protein ailesi önemli rol oynarlar. Bunlardan biri Bcl-2 ailesi diğeri ise kaspazlardır. Apoptotik oluşumda büyük önem arz eden mitokondri membran bütünlüğü büyük ölçüde Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir (García-Sáez ve ark., 2010; Gross ve ark., 1999). Bu gen ailesinin üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyaran veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) apoptoz oluşumunu engellerlerken, pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarır (Chipuk ve ark., 2010, Pradelli ve ark., 2010, Wang ve Youle, 2009). Apoptozda yer alan ikinci protein ailesi ise kaspazlardır. Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan aktif merkezlerinde sisteinlerin yer aldığı proteazlardır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) olmak üzere iki gruba ayrılır (Pop ve Salvesen 2009, Franke vd 2003). Kaspazlar apoptoz dışında hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında da görevlidirler (Pop ve Salvesen 2009, Lamkanfil ve ark., 2007).

Fitokimyasalın kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede antikarsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. (Şekil 2). Örneğin, fitokimyasal kullanılarak apoptoz indüklenmesi ve kanser hücrelerin yok edilmesi, kanser tedavisinde çok önemli ve umut vaat edici bir strateji haline gelmiştir. Çeşitli bitkilerden elde edilen fitokimyasalların oral kavite, pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanser hücre hatlarında kaspaz 3'e bağımlı, JNK-c-Jun-FasL-kaspaz-3 sinyal yolağını aktive ederek, Bax/Bcl-2 oranını artırarak, p53 yolağını aktive ederek, mitokondrial yolak aktivasyonu ile (sitokrom c, Bax, Bcl-2, kaspaz 8, kaspaz-9, kaspaz-3), TNF, nitrik oksit sentaz, nükleer faktor Kappa B (NF-kappaB) gibi

proteinlerin seviyelerini değiştirerek apoptozu indükledikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. (Kang ve ark., 2010., Oyagbem ve ark., 2010, Shin ve ark., 2010, Wang ve ark., 2010 Kuang ve ark., 2009, Zhang ve ark., 2009). Ferulik asit, *p*- ve *m*-kumarik asit, kafeik asit gibi fenolik asitlerin insan kanser hücre hatlarında ve deney hayvanlarında Bax, Bcl-2, siklin bağımlı kinazlar, siklin B1, kasein kinaz 2, p53, kaspazlar ve FAS/FASL yolağı yoluyla apoptozu indüklemekte ve anti-karsinojenik etki göstermektedirler (Kampa ve ark., 2003; Chuang ve ark., 2005; Kahnduja ve ark., 2006; Chen ve ark., 2007; Nakajima ve ark., 2009; Chang ve ark., 2010; Balakrishnan ve ark., 2010). Diyetle çok fazla anılan *o*-kumarik asidin anti-karsinojenik aktivitesi ile alakalı çalışma sadece bir tanedir (Hsu ve Yen, 2007). Fakat bu çalışma etki mekanizmasının aydınlatılması ile alakalı olmayıp floresan mikroskop ile apoptoz tayinini kapsamaktadır. Bu alışma ile bu maddenin anti-karsinojenik etki mekanizmaları önceki çalışmayla kıyaslandığı zaman bu kadar kapsamlı bir şekilde ilk defa aydınlatılmaya çalışılacaktır.



şekil 1.2. Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavide kullanılan biyo-etki gösteren aktif fitokimyasallar

Sitokrom P450 ve Fitokimyasal etkileşimleri

Son on yıl süresince, bitkisel preparatlar ya da normal diyetlerin bileşenleri olarak tüketilen fitokimyasallar yüksek dozlarda ve sürekli alındıklarında; karsinojen metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonlarında değişimlere neden olarak karsinojenik maddelerin metabolizmasını değiştirdiği, anti-kanserojenik, anti-oksidatif, anti-mutajenik etkiler gösterdiğini bildiren kanıtlar sunulmuştur (Zhou ve ark. 2003, 2004). Sitokrom P450 (CYP450) enzimleri, hem endojen (yağ asitleri, steroidler vb) hem de ekzojen (ilaçlar, çevresel kirleticiler vb) bileşiklerin metabolizmasında rol alan sitokrom P450-bağımlı monooksijenazların [E.C.1.14.14.1] terminal enzimleridir ve Faz I enzimlerinin önemli bir ailesini teşkil ederler (Cooper ve ark. 1965, Adali ve ark., 1996; Arinç ve ark, 1991, 2000, 2007; Sen ve Arinc 2000; Sen ve ark., 2001; Orellana ve ark.,2001; Yamaori ve ark. 2004; James ve ark. 2005; Semiz ve Sen, 2007, Sen ve Semiz 2007; Ozkarsli ve ark., 2008). Günümüzde klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık % 75'inin ve çok büyük miktarda diyetisel kaynaklı bileşiklerin Faz I bağımlı metabolizmalarını Sitokrom P450 enzimleri gerçekleştirir. İnsanda bulunan 59 CYP450 izozimleri üç genel gruba ayrıştırılabilir. 1) Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3), 2) Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5-51) ve 3) Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi.

Birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidlerin) özgün sitokrom P450 izozimlerini indükledikleri, aktivitelerini artırdıkları veya ketledikleri ve böylelikle ikincil uyarılara olan cevaplarını değiştirdiği bilinmektedir. Birçok karsinojenin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri CYP450 (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir (McLemore 1990, Smith ve ark. 1996, Conney 2003). Oluşan reaktif metabolitler diğer Faz I veya Faz II enzimlerince inaktif ürünlere dönüştürülmektedir. Sonuç olarak, karsinojenlerin bu şekilde detoksifikasyonunda rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ve/veya diğer Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyonu, karsinojenlerin etkilerine karşı bir koruma ve savunma sistemi oluşturabilir.

Sitokrom P450 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 isoformlarının kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokarsinogenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Akciğer kanseri (McLemore ve ark. 1990), kolorektal kanser (Sivaraman ve ark. 1994) ve meme kanseri (Jefcoate ve ark. 2000) gibi karsinogenik oluşumlarda CYP1 isoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan birçok çalışmada çeşitli fitokimyasalların (galangin, theaflavin, kuersetin, genistein, dimetoksiflavon, diosmetin, hidroksiçalkon, biyokanin, flavon vb.) CYP1 isoformlarının ekspresyonlarını veya aktivitelerini inhibe etmeleri ile çeşitli kanser türlerinde önemli baskılayıcı etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (Ciolino ve ark. 1998, Ciolino ve Yeh 1999, Henderson ve ark. 2000, Machala ve ark. 2001, Chan ve ark. 2002, Wang ve ark. 2005, Wen ve ark. 2005). CYP2E1 etanol ile indüklenebilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinogen (özellikle arilaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP isoformudur. CYP1 isoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak ta kontrol edilen ve bu anlamda CYP isoformları arasında farklılık gösteren bir isoformdur. CYP1 ailesinde olduğu gibi çeşitli fitokimyasalların CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek veya protein düzeyini azaltarak nitrozoaminlerin karsinogenik ve mutajenik etkilerini antagonize ettiği gösterilmiştir (Apostolides ve ark. 1997, Shukla ve Taneja 2002, Catteral ve ark. 2003). CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen isoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer alması nedeni ile de hayli önem arz eden bir diğer CYP isoformudur. Çeşitli bitkilerin metanolik veya etanolik ekstraktlarının CYP3A4 aktivitesini modüle ettikleri ve bu bitki bileşenlerinin enzimle etkileştiği gösterilmiştir. (Obach 2000, Bray ve ark. 2002, Zhou ve ark. 2003). Dolayısı ile fitokimyasalların CYP3A4 tarafından metabolize edilen terapötik ajanların etkinliğini azaltarak ya da artırarak etkileme potansiyeline sahip olması ve çok sayıda bileşiğin metabolizmasında yer almasından dolayı bu etkileşimlerin tanımlanması son derece önemlidir.

Literatürde fenolik asitlerin insan kanser hücre hattında P450 sistemini üzerine etkileriyle ilgili sadece bir çalışma vardır (Ferguson ve ark., 2005). Bu çalışmada; ferulik asit ile p-kumarik asidin CYP1A1 enzim aktivitesini insan kolon adenokarsinoma hücre hattında düşürdüğü gösterilmiştir. Benzer şekilde, kısıtlı

sayıda deney hayvanları ile yapılan çalışmalarla, fenolik asitçe zengin bazı bitki ekstralarının P450 sistemini etkilediği gösterilmiştir (Ewertowska ve ark; 2009; Palikova ve ark; 2010).

Sebze, meyve, kuruyemiş gibi alınan bitkisel besinler ile geleneksel tedavi amaçlı kullanılan ısırgan otu, zerdeçal, mercanköşk, keten tohumu gibi bazı tıbbi bitkilerde bulunan o-kumarik asidin (2-hidroksisinamik asit) anti-karsinojenik ve apoptotik etkilerinin etki mekanizmaları ile olası diyet-ilaç potansiyelinin belirlenmesini kapsamaktadır. Bu kapsamda o-kumarik asit değişik dozlarda insan kanser hücre hattı ile kanser olmayan hücre hattına uygulandı ve bu hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri saptandı. Sitotoksite testinden elde edilen verilere göre bu madde hücre hatlarına uygulandı ve daha sonra o-kumarik asidin tümör baskılayıcı proteinlerin, apoptoz yollarındaki proteinlerin ve karsinojen metabolizmasında yer alan ve önem arz eden proteinlerin gen ekspresyon ve protein düzeylerine olan etkileri çalışıldı ve olası etki mekanizmaları tanımlandı.

2. MATERYAL ve METOT

2.1.Hücre Kültürü ve o-Kumarik Asidin Uygulanması

o-Kumarik asidin anti-karsinojenik ve apoptotik etki mekanizmalarının aydınlatılmasında insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve insan fibroblast hücre hattı (3T3), sitokrom P450 izozimlerinin ekspresyon düzeylerinin saptanması için insan karaciğer kanser (HepG2) hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler % 5 Fetal Calf serum (FCS) içeren Dulbecco's modified Eagle (DMEM) ve ya RPMI besi ortamı içerisinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilerek büyütülmeleri sağlandı. o-kumarik asit DMSO içinde çözüldü ve değişik konsantrasyonları hücre dizisi üzerine 48 saat süresince maruz bırakıldı. Bu işlem için büyütülen hücreler 96 kuyulu plakalardan tripsin ile kaldırdı ve steril Falcon tüplere alınarak 1500' rpm de 24 °C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 2 ml besiyer içinde çözümlenerek Tripkan blue (1:1000 sulandırılmış) ile boyanarak Thoma lamında sayımları gerçekleştirildi. 96'lık plakada her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 µl olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. 24 saat hücrelerin plakaya yapışması için CO₂ inkübatöründe bekletildi ve. 24 saatin sonunda besiyeri dökülerek ve değişik konsantrasyonlarda aktif madde kuyucuklara yüklendi. Kontrol grubuna ise sadece besi ortamı veya aynı oranda çözücü eklendi. Tüm kuyucuklar 100 µl'ye besiyeri ile tamamlanarak 48 saat CO₂ inkübatöründe bekletildi ve süre sonunda besiyerleri plakadan uzaklaştırılarak 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi. WST-1 eklendikten 2 saat sonra oluşan renk 450 ve 690 nm de mikropilaka okuyucuda ölçüldü ve bu absorpsiyon değerleri kullanılarak hücreleri %50 öldüren konsantrasyon belirlendi.

2.2.mRNA Ekspresyon Düzey Tayini

2.2.1.Hücre Hattında Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Trizol solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlarına göre gerçekleştirildi ancak kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulandı. Buna göre kontrol ve o-kumarik asit ile muamele edilmiş yaklaşık 1×10^6 hücre 0,3 ml parçalama tamponu ile toplandıktan sonra 18G uçlu steril iğne ile 10 defa çekip bırakılarak bu tampon içinde homojenize edildi. Daha

sonra bu patlatılmış hücreler yeni bir ependorf tüpüne alınıp üzerlerine 600 µl Trizol solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında düşük hızda karıştırıldı. Ardından 100 µl kloroform eklenerek 1 dakika yüksek hızda karıştırıldı. 5 dak oda sıcaklığında ve 5 dak buzda inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. RNA içeren supernatant yeni steril eppendorfa alındı. Ayrıca trizol çöktürmesinden sonra protein izolasyonu için alt protein fazı ayrılıp -20 °C'ye kaldırıldı. Bu işlem sırasında DNA içeren orta faza dokunulmamaya dikkat edildi. Alınan supernatanta eşit hacimde soğuk saf isopranoanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dak inkübe edildi. Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de, 4 °C 'de 5 dak santrifüj edildi. Pelet üzerine 1000 µl %75'lik soğuk etanol eklendi ve oluşan pelet dağıtıldı. 7.500 rpm'de, 4 °C 'de 5 dak santrifüj'den sonra RNA içeren pelet alet çatısı altında kurutuldu ve 75 µl RNAaz'dan arı su içinde çözülerek -80 °C muhafaza edildi. İzole edilen RNA kalitesi %1 agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlendi. Elde edilen RNA'ların 260/280nm ölçümü ile miktarı belirlenerek cDNA sentezi sırasında 5 µg RNA kullanılması sağlandı.

2.2.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve Moloney-Murine Leukemia Virus (MMLV) Ters Transkriptazı (MBI Fermentas, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. cDNA sentezi için 5 µg toplam RNA ve 0.5 µg oligo (dT) primeri karıştırıldı ve son hacmi 11 µl RNAaz içermeyen su ile tamamlandı. Karışım 70 °C 'de 5 dak inkübe edildikten sonra, üzerine 4 µl, 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ ve 50 mM DDT) ve 2 µl dNTP karışımı eklendi. 5 dak, 37 °C'de inkubasyondan sonra 50 ünite MMLV ters transkriptazı eklenerek son hacim 20 µl tamamlandı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42 °C'de 1 sa inkübe edildi ve sonra enzim inhibe edilmek üzere 70 °C'de 10 dak bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -20 °C muhafaza edildi.

2.2.3. Yarı Kantitatif TersTranskriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

o-kumarik asit'in apoptozda, hücre döngüsünde ve ilaç metabolizmasında rol alan proteinlerin gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için mRNA düzeyleri RT-PZR yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak

uygun primer dizileri saptandı ve bu primerler sentezletti. Bu primerlerin nükleotid dizileri ve yapışma sıcaklıkları Tablo 2.1 verilmektedir.

Tablo 2.1. Seçilen CYP450 ve Apoptotik genler için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları

Primer Adı	Primer Dizisi(5'→3')	Yapışma Sıcaklığı (°C)
hCYP1A1F	AGC GGA AGT GTA TCG GTG AGA	58,4
hCYP1A1R	CTG AAT TCC ACC CGT TGC A	
hCYP1A2F	ACT TCG ACC CTT ACA ATC AG	53,3
hCYP1A2R	CAC TGT TCT TGT CAA AGT CC	
hCYP2E1F	GCATCT CTT GCC TAT CCT T	61
hCYP2E1R	ATGGACCTACCTGGAAGGACAT	
hCYP3A4F	GCC TGG TGC TCC TCT ATC TA	54,7
hCYP3A4R	GGC TGT TGA CCA TCA TAA AAG	
HCYP2C9F	CTGGATGAAGGTGGCAATTT	59
HCYP2C9R	AGATGGATAATGCCCCAGAG	
HSiklinD1F	CGCCCCACCCCTCCAG	59
HSiklinD1R	CCGCCAGACCCTCAGACT	
HSiklinD2F	TTCCGCAGTGC TCCTACTTC	60
HSiklinD2R	CGCACTTCTGTTCCTCACAG	
HCDK2F	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG	60
HCDK2R	AGCTCGGTACCACAGGGTCA	
HCDKN2AF	CAGTAACCATGCCCGCATAGA	60
HCDKN2AR	AAGTTTCCCGAGGTTTCTCAGA	
HRBF	ATCTATATTTACCCCCTGAAGAGTC	59
HRBR	TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA	
HP53F	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	61
HP53R	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC	
HPTENF	CCCAGACATGACAGCCATC	58,5
HPTENR	TCTGCAGGAAATCCCATAGC	
HAPAF1F	GTCTGCTGATGGTGCAAGGA	61
HAPAF1R	GATGGCCCGTGTGGATTTTC	
HBAXF	AGAGGATGATTGCCGCCGT	57,5
HBAXR	CAACCACCCTGGTCTTGGATC	
HBCL2F	TGCACCTGACGCCCTTAC	62,5
HBCL2R	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	
HKaspaz3F	GCA GCA AAC CTC AGG GAA AC	61

HKaspaz3R	TGTCGG CAT ACT GTT TCA GCA	
HKaspaz8F	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG	60
HKaspaz8R	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT	
HKaspaz9F	GGCTGTCTACGGCAC AGATGGA	61
HKaspaz9R	CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG	
H18SF*	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	58,4
H18S R*	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	
*Kontrol amaçlı kullanılacak 18S primerleri		

RT-PZR protokolü Tablo 2.2 'de verilmektedir. Reaksiyon ortamı bu tabloya göre hazırlandıktan sonra PZR tüpleri Bioneer Mygenie termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve uygun döngü şartları kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm genler için PZR döngüsü aşağıdaki gibidir:

Ön Denatürasyon

1 döngü: 94 °C 5dakika.

PZR Döngüsü

32-35 döngü: 94 °C 45 saniye (Denatürasyon)
53,3-62,5 °C 1 dakika (Yapışma)
72 °C 1 dakika (Uzama)

Final Uzama

1 döngü: 72 °C 5 dakika

PZR ürününün 5 µl'si % 1,5 veya % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında EtBr boyamayla bantlar gözlemlendi. Bantların densitometrik analizi Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlendi. Her band'ın densitometrik analizi house-keeping gen olan 18S'in densitometrik analizi ile karşılaştırılarak çalışılan proteinlerin mRNA seviyelerinin o-kumarik asit sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

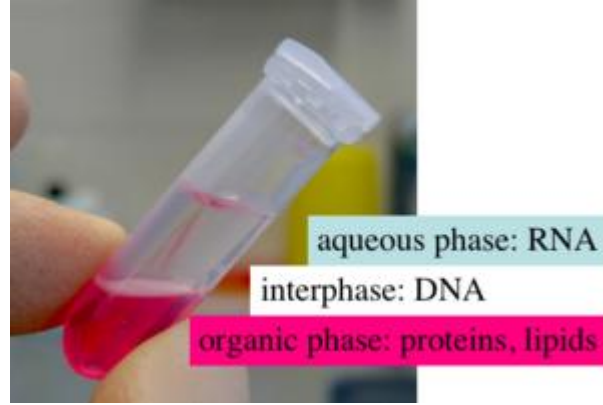
Tablo 2.2. RT-PZR Prosedürü

Bileşenler	Hacim (µl)
10X reaksiyon tamponu	2(µl)
MgCl ₂ (25mM)	3(µl)
İleri Primer (F) (10µM)	1(µl)
Geri Primer (R) (10µM)	1(µl)
dNTP (10mM)	0.5(µl)
Taq polimeraz (2.5U/(µl))	0.5 (µl)
cDNA	1 (µl)
Ultra Saf Su	9 (µl)
Toplam hacim	20 (µl)

2.3. Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini

2.3.1. Trizol Alt Fazından Protein İzolasyonu

Western blot analizi için kullanılacak proteinler Lee ve arkadaşları tarafından tarif edilen method kullanılarak RNA izolasyonu için kullanılan Trizol'ün alt fazından yapıldı (Şekil 2.1) (Lee, 2001). Alınan alt faza 0,15mL %1 gliserol içeren %100 EtOH eklendi ve 5.000 rpm de 5 dak santrifüj edildi. Süpernatant alınıp üzerine %1 gliserol içeren isopropil alkolden 0,75mL eklendi ve 13000 rpm de 10 dak santrifüj edildi. Pelet alınıp cam homojenizatörde 0,2 ml 0,3 M Guanidin-HCl ve %1 gliserol içeren %95 EtOH ile 4 defa homojenize edildi ve 10.000 rpm de tekrar 10 dak santrifüj edildi. Alınan pelet 2 kere 1 mL 0,3 M Guanidin-HCl ve %1 gliserol içeren %95 EtOH eklenerek tekrar cam homojenizatör yardımıyla homojenize edilerek 10000 rpm de 5 dak santrifüj edildi. Oluşan pelete 1 mL %1 gliserol içeren %95 EtOH eklenip vorteksle karıştırıldı ve 10.000 rpm de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklatırılıp pelet havada kurutuldu ve %0,1 mL %8 SDS içeren 0,1M Tris HCl (pH 6,8) ve 0,4 mL saf suda çözüldü. İsole edilen proteinler -20 °C'ye SDS-PAJE'de kullanılmak üzere kaldırıldı.



Şekil 2.1. Trizol ile RNA, DNA ve protein izolasyonu (www. openwetware.org'dan alıntıdır)

2.3.2.SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde Moleküler ağırlığı 30.000 Da küçük proteinler için %10; 30.000 Da büyük proteinler için için %10 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Fermentas “PageRuler Prestained Protein Ladder” moleküler ağırlık standartları olarak kullanılmıştır. Ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.3'te belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 2.3. SDS-PAJE ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

	Ayırıştırıcı Jel (%8,5) CYP İzozimleri için	Ayırıştırıcı Jel (%10) GST İzozimleri için	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	10	1,5
Distile Su (ml)	13,55	12,04	5,88
Ayırıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,015	0,012
Toplam Hacim	30	30	10

Poliakrilamid slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm'lik teflon ayırıcılar ile sabitleyici plastik levhanın ve son olarak kısa camın (12,5 x 16cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki kuyucuğa %2'lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.3'de belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8–9 cm) ulaşınca kadar 10 ml'lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazıkçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15–20 dak süreyle polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten sonra 15 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak'da tamamlandı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile Analiz edilecek proteinlerden (TRIzol® alt fazından izole edilen proteinler) alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı. Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Uygun iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak 40 µl (200 µg hücre lizatları) protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

Sistem Thermo EC 1000–90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741–4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Sisteme aynı anda iki jel sandviçi hazırlanarak aynı anda iki elektroforetik ayırıştırma yapıldı. Elektroforetik ayırıştırmanın yapılacağı iki jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 20 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayırıştırıcı jelle ulaştığında akım 30 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 40 mA'e çıkarıldı (Eğer tek jel kullanılarak elektroforetik ayırıştırma yapılacaksa mA değerleri yarılandı). Elektroforetik ayırıştırma süresince ısınmayı engellemek için sisteme 5°C'ye ayarlanmış Nüve (Nüve Cooling Bath Type BS 302 (S) Esenboğa Yolu 22 km Akyurt 06287 Ankara-Türkiye) Soğutmalı Su Banyosu bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayırıştırma sağlamak için toplam 5-5,5 saat yürütme yapıldı.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Jel uzun cam tabakadan dikkatlice alındı ve oda sıcaklığında 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavis R 250, %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı hem de sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jellerden bazıları fotoğraflandı ve boyası çıkarılmış jeller %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

2.3.3. Western Blot Analizleri

Western blot prosedürü Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi uygulanmıştır. Ancak bizim laboratuvar koşullarımıza göre optimize edilmiştir.

Yukarıdaki bölümlerde tanımlandığı gibi denatüre koşullar altında %4'lük sıkıştırıcı ve %8,5 veya %10'luk ayırıştırıcı jeller içinde elektroforez edildi. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Sonra, jeller transfer tamponu (25

mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılarak ön dengelenme yapıldı.

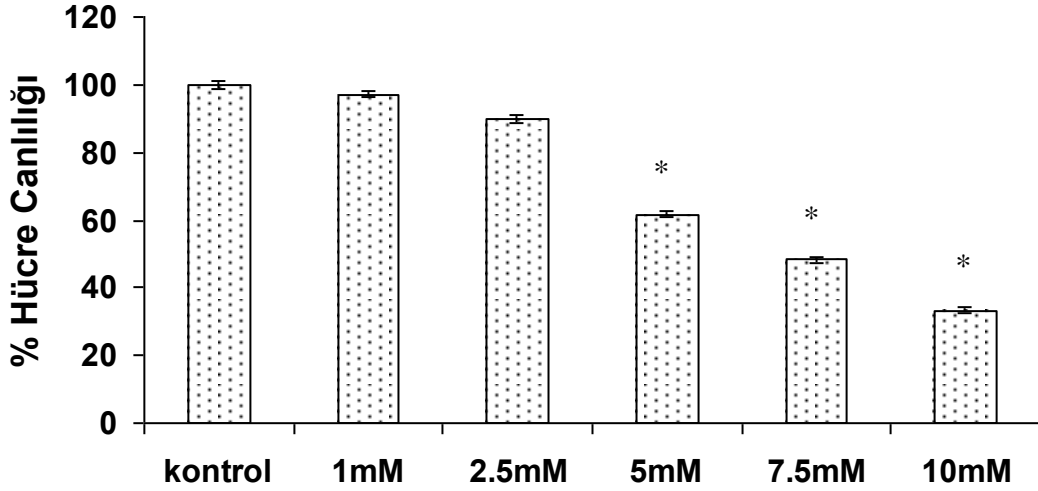
Elektroforetik transfer iBlot Dry Transfer” (Invitrogen Corporation 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008 USA) kullanılarak kuru Western blot yöntemi uygulanarak yapıldı. iBlot cihazın kapağı açılır. Üzerinde naylon membranıda hazır olan Anot Transfer Yığınınını kabı açılır ve plastik küvetiyle beraber cihaza kondu. Jel membranın üzerine dikkatlice ve hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine sistemden çıkan ve distile su ile ıslatılmış olan filtre kağıdı kondu. Üzerinden röle yurgu ile yurgulanarak hava kabarcıkları çıkarıldı. Katot Transfer Yığını açılarak filtre kağıdınının üzerine konuldu. Tekrar önceki gibi yurgulandı. Sistemin süngeri cihazın üst kapağına yerleştirilerek kapak kapatıldı. Cihazdan P2-12 dak programı seçildi ve “start” tuşuna basılarak transfer başlatıldı. Süre sonunda cihaz kapatıldı, hücrenin bağlantısı kesildi ve cihazın kapağı açıldı; üstteki katot yığın, filtre kâğıdı ve jel dikkatlice alındı. Altta kalan membran dikkatlice TBST içine alındı. Bu sistem kısa, hızlı ve etkin bir transfer yöntemidir. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, ‘Blot’, elde edildi.

Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve membran 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5’lik süt tozu) ile çalkalayıcı da inkübe edildi. Süre sonunda 1/200 ve 1/1000 arasında bloklama solusyonu içinde dilue edilmiş anti-human CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9, SiklinD1, SiklinD2, CDK2, CDKN2A, RB, P53, PTEN, APAF-1, BAX, BCL-2, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve 18S primer antikoları membranın üzerine boşaltıldı ve tüm gece inkübe edildi. Daha sonra membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için TBST solüsyonunda her biri 5 dak olmak üzere 3 defa yıkandı. Membran daha sonra 1 saat süreyle işaretleyici enzim-horse radish peroksidaz (anti-rabbit IgG-HRP konjugatı) ile bağı olan ikinci antikolarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi tekrar yıkandı. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için ECL çözeltisi kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatılmıştır ve spesifik protein bantları kemilüminesans duyarlı film kullanılarak belirlenmiştir. Oluşan protein bantlarının densitometrik analizleri Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlenip, yukarıda belirtilen proteinlerin seviyesinin o-kumarik asit sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

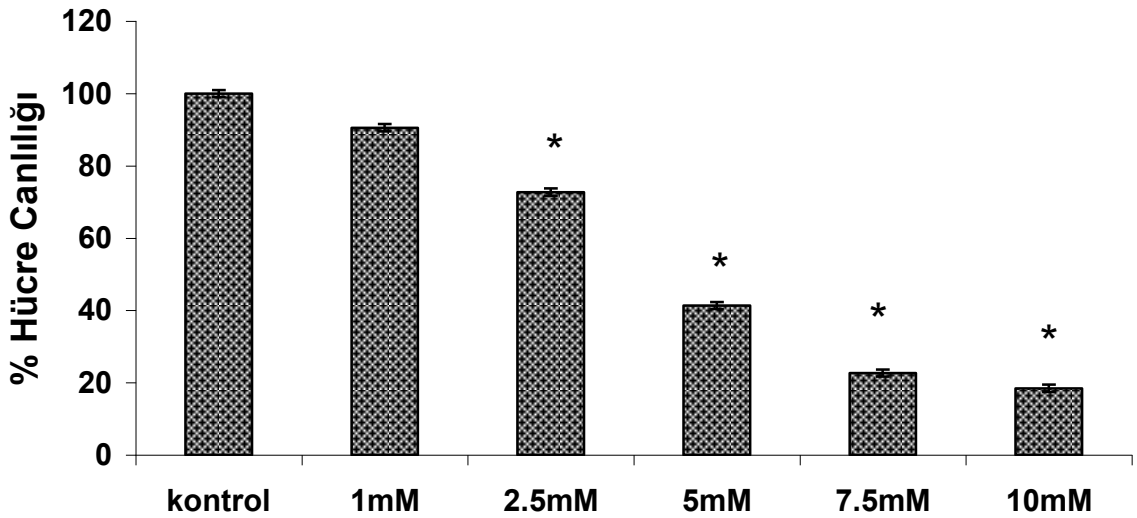
3. BULGULAR

3.1. Farklı Konsantrasyonlarda o-Kumarik Asidin Sitotoksik etkisi

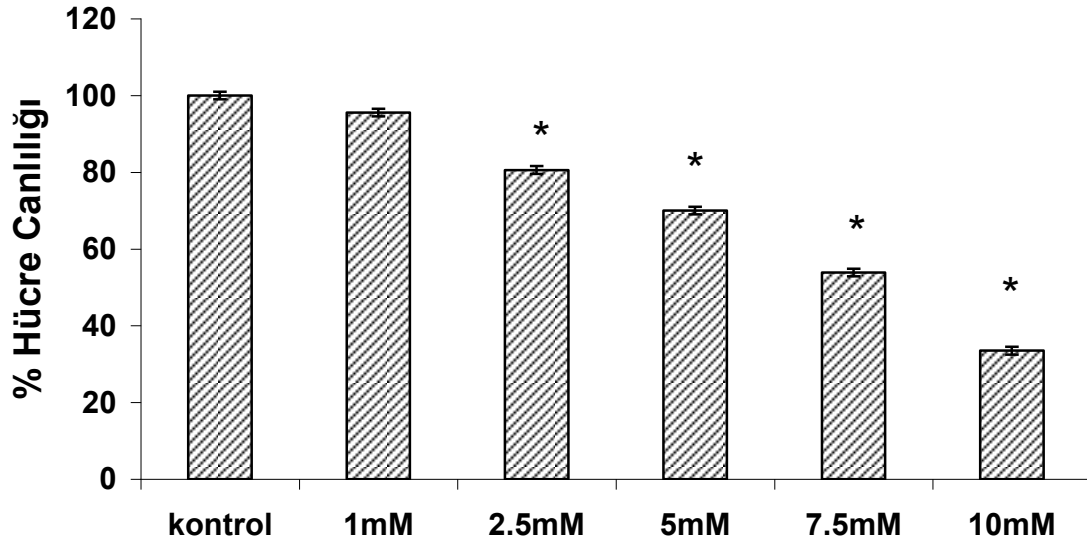
Sitotoksite testi için değişik konsantrasyonda o-kumarik asit suda çözülemediği için hücre kültürü işlemlerinde iyi bir çözücü olarak bilinen dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Daha önce 96'lık plakaya (1x10⁴/kuyucuk) ekilen hücre dizileri üzerine 48 saat süresince değişik konsantrasyonlarda DMSO konsantrasyonu 0.1% olacak şekilde maruz bırakıldı. 48 saatin sonunda 96 kuyu plakadaki hücreler üzerine 10µl WST reaktifi eklenerek hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak 450-690 nm'de 2 saat inkubasyon sonunda ölçüldü. Hiç o-kumarik asit ile muamele etmediğimiz kontrol grubuna ise 0,1% DMSO içeren besi yeri konuldu. o-kumarik asit ile muamele ettiğimiz gruba kontrol grubu ile karşılaştırarak, değişik dozlardaki o-kumarik asidin hücre canlılığına olan etkisi saptandı (Şekil 3.1-3). Şekillerde görüldüğü üzere yüksek konsantrasyonda o-kumarik asit ile muamele edilen gruplarda hücre canlılığı düşük konsantrasyonda o-kumarik asit gruplarındaki hücrelerin canlılık oranlarına göre daha düşük bulundu. Buna göre 5-10 mM arası konsantrasyonlardaki o-kumarik asit tüm hücre hatlarında hücrelerin %50'sinden fazlasının ölüme yol açmıştır. LD50 değerleri, MCF-7 HepG2 ve 3T3 hücreleri için sırasıyla 7,39 mM, 4.95 mM ve 7.96 mM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar 3T3 ve HepG2 hücrelerinin MCF-7 göre o-kumarik asite daha dayanıklı olduğunu bize göstermektedir.



Şekil 3.1. Değişik konsantrasyonlardaki *o*-kumarik asidin HepG2 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve *o*-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

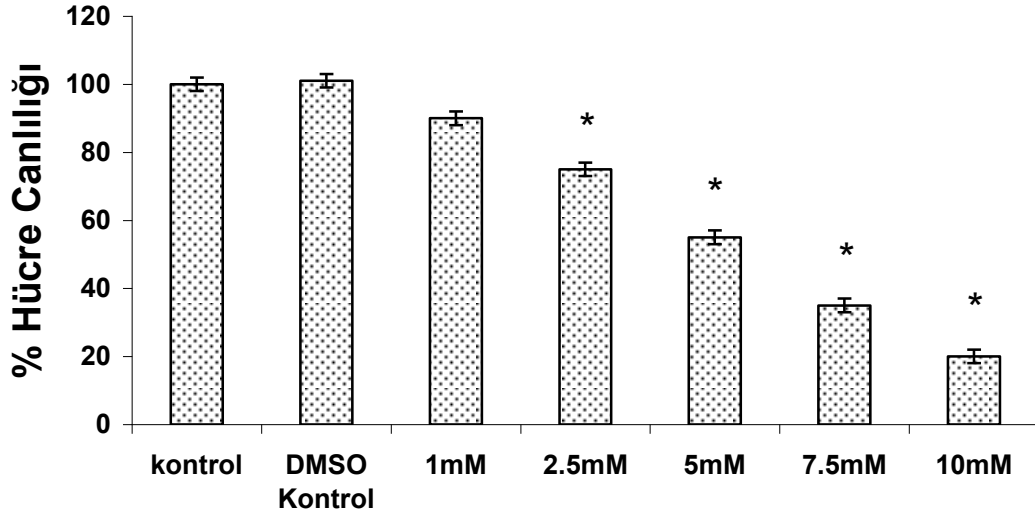


Şekil 3.2. Değişik konsantrasyonlardaki *o*-kumarik asidin MCF-7 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve *o*-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

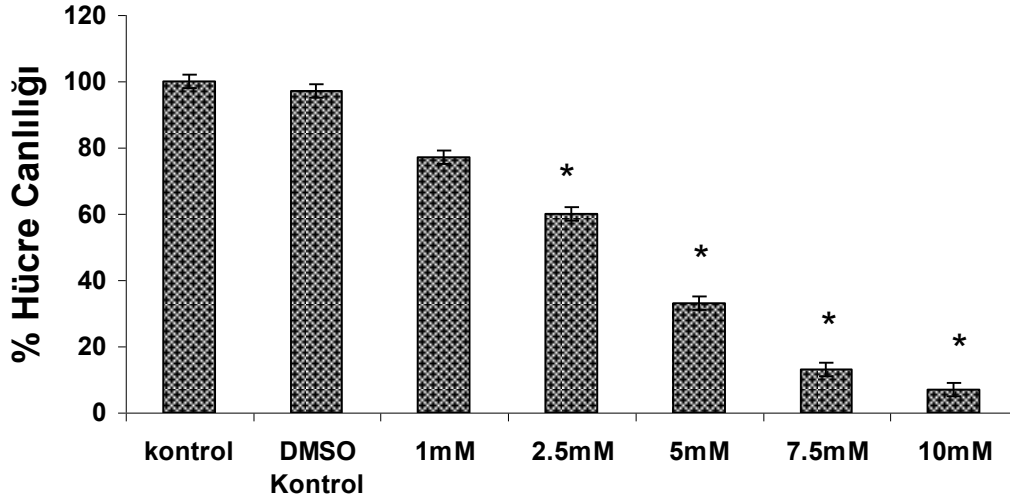


Şekil 3.3. Değişik konsantrasyonlardaki *o*-kumarik asidin 3T-3 hücre canlılığına etkisi. Kontrol grubu 100% alınmış ve *o*-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

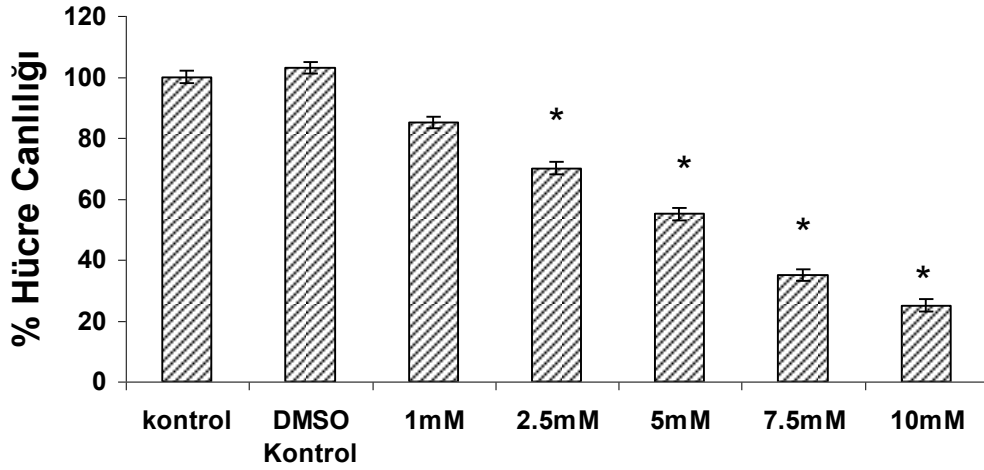
Sitotoksite testlerinin doğrulaması için değişik yaklaşımlar bu süre zarfında laboratuvarımızda denenmiştir. İlk olarak *o*-kumarik asit DMSO olmadan besiyeri içerisinde çözülmeye çalışılmıştır. Bunun için değişik konsantrasyonlarda *o*-kumarik asit besiyerinde pH Sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanarak çözülmüş ve daha sonra 96'lık plakaya (1×10^4 /kuyucuk) ekilen hücre dizileri üzerine 48 saat süresince maruz bırakılmıştır. 48 saatin sonunda her bir kuyucuğa 10µl hazırlanmış olan WST reaktifinden eklenmiş ve 2 saatin sonunda hücrelerin canlılık oranları ELISA okuyucu kullanılarak 450-690nm okumaları yapılarak ölçülmüştür. Deneyle sonucunda yukarıda elde ettiğimiz sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer yandan hücrelerin canlılığını saptamak için değişik konsantrasyonlarda *o*-kumarik asit DMSO içinde hazırlanmış ve son DMSO konsantrasyonu 0,1% olacak şekilde eşit sayıda hücre içeren 96'lık plakaya uygulanmıştır. 48 saat sonunda hücreler kaldırılıp, tripan mavisi ile sayıldı ve sitotoksisite sonuçlarına paralel sonuçlar elde edildi (Şekil 3.4-6).



Şekil 3.4. Değişik konsantrasyonlardaki o-kumarik asidin HepG2 hücre canlılığına etkisi. Canlı hücreler tripan mavisi kullanılarak sayıldı. Kontrol grubu 100% alınmış ve o-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.



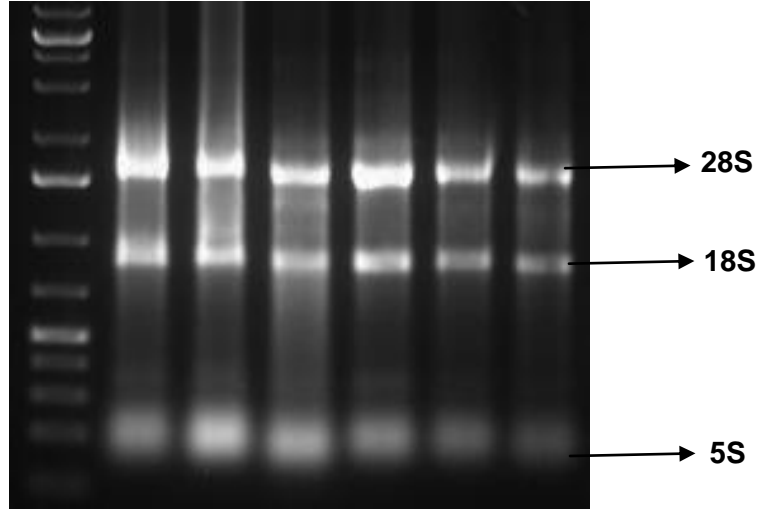
Şekil 3.5. Değişik konsantrasyonlardaki o-kumarik asidin MCF-7 hücre canlılığına etkisi. Canlı hücreler tripan mavisi kullanılarak sayıldı. Kontrol grubu 100% alınmış ve o-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.



Şekil 3.6. Değişik konsantrasyonlardaki o-kumarik asidin 3T3 hücre canlılığına etkisi. Canlı hücreler tripan mavisi kullanılarak sayıldı. Kontrol grubu 100% alınmış ve o-kumarik asit sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir.

3.2. mRNA Ekspresyon Düzey Tayini

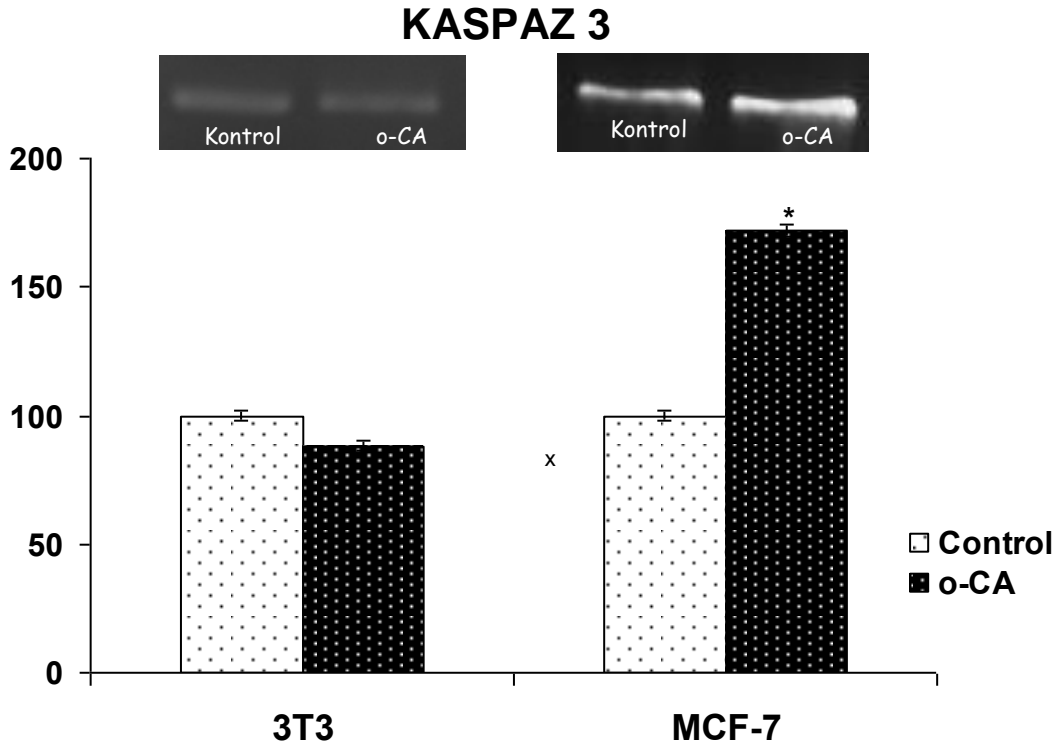
Sitotoksite işlemlerinin ardından LD50 konsantrasyonları HepG2 ve MCF-7 hücrelerine uygulandı. Fakat 7,4 mM o-kumarik asit uygulanmış HepG2 hücrelerinde RNA elde edilemediğinden dolayı, bu hücrelere de MCF-7 hücre hattında olduğu gibi 4.95 mM o-kumarik asit uygulandı. 3T3 hücrelerine ise MCF-7 ile karşılaştırma yapabilmek için MCF-7 hücrelerine uygulanan 4.95 mM o-kumarik asit dozu uygulanmaya karar verildi. Bu uygulamalardan 24 ve 48 saat sonunda hücreler parçalama tamponu ile toplandı. 48 saat sonucunda elde edilen verilerde hücrelerin apoptozdan çıktıkları gözlemlendiğinden bundan sonra 24 saat uygulama yapılmaya karar verildi. 24 saat sonunda toplanan hücrelerden total RNA izolasyonu TRIzol® solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüldüğü gibi iyi bulundu (Şekil 3.7). Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve MMLV RT (MBI Fermentas, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. o-kumarik asidin bazı CYP450 enzimlerine ve bazı apoptotik genlerin gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için mRNA düzeyleri RT-PZR yöntemi ile kantite edildi.



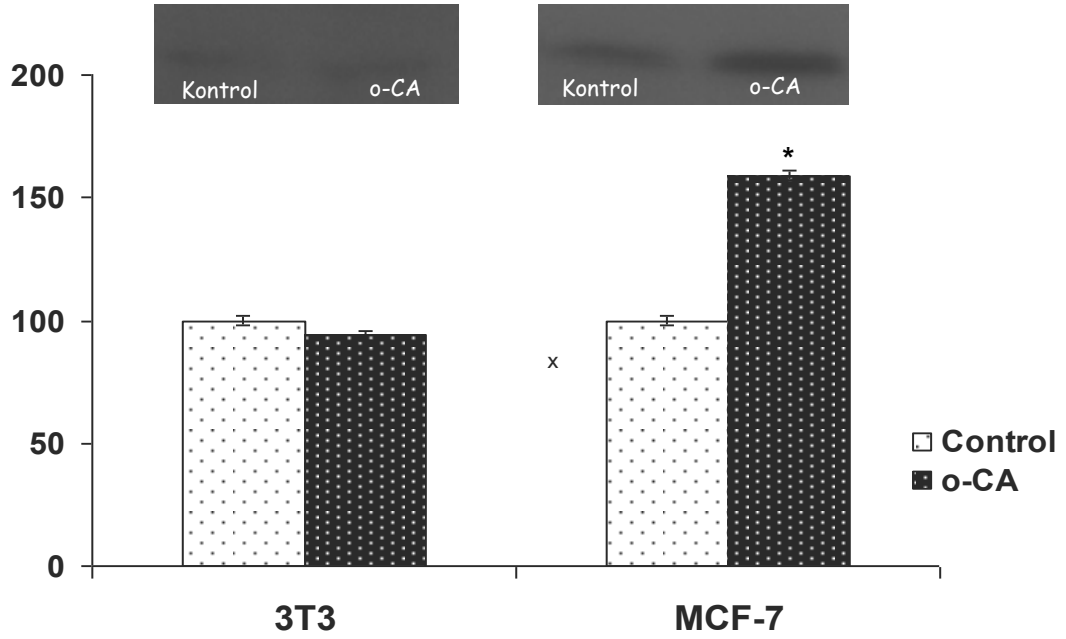
Şekil 3.7. İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi. Hat 1: GeneRuler™ 1kb bp DNA Marker; Hat 2:Kontrol HEPG2; Hat 3: 5 mM 24 saat *o*-kumarik asit; Hat 4: 5 mM 48 saat *o*-kumarik asit; Hat 5:Kontrol MCF-7; Hat 6: 5 mM 24 saat *o*-kumarik asit; Hat 7: 5 mM 48 saat *o*-kumarik asit

3.2. Hücre Döngüsü, Apoptoz ve Tümör Baskılayıcı Proteinlerin mRNA ve Protein Düzeylerinin MCF-7 ve 3T3 Hücre Hatlarında Tayini

Bu çalışmada, *o*-kumarik asidin anti-karsinojenik ve apoptotik etki mekanizmaları insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) kullanılarak belirlendi. *o*-Kumarik asidin apoptoz da görev alan proteinlerden olan Kazpaz-3' ün mRNA ve protein seviyesine olan etkisi Şekil 3.8 ve 3.9'da verilmektedir. Ara rapordaki sonuçların tekrar edilmesi sırasında bu proteinin mRNA seviyesinde farklılıklar gözlemlendi ve sonuçlar tekrar edildi. Buna göre mRNA ve protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda MCF-7 hücre hattında Kazpaz-3' ün mRNA ve protein seviyesinin sırasıyla 1.72- ve 1.59-kat artığı tespit edildi. Diğer taraftan, 3T3 hücre hattında bu proteinin mRNA ve protein seviyesinde % 12 ve % 3 azalışlar gözlemlenmesine rağmen bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



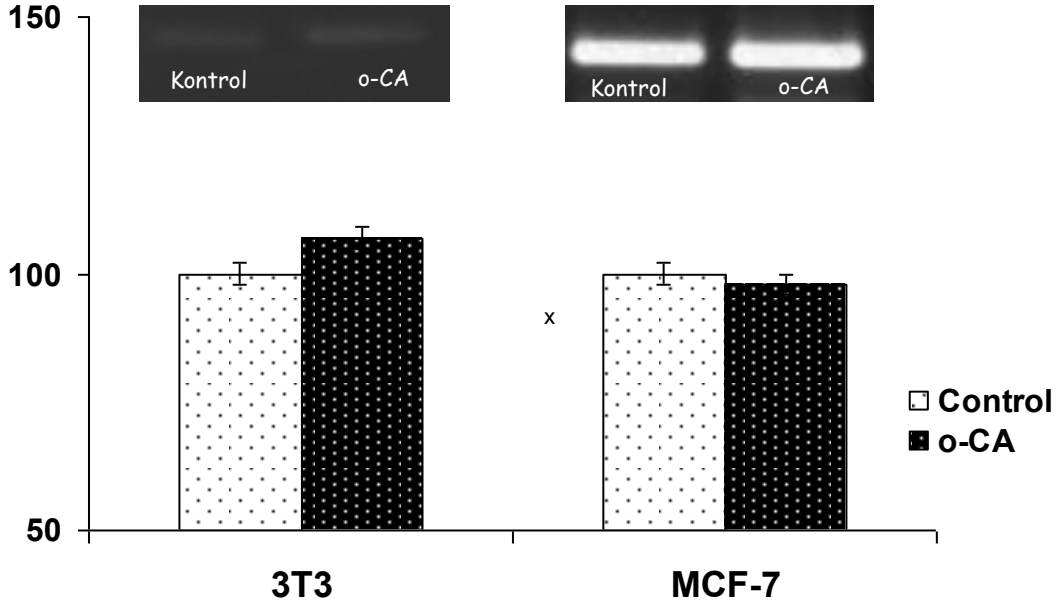
Şekil 3.8. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve insan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-3 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).



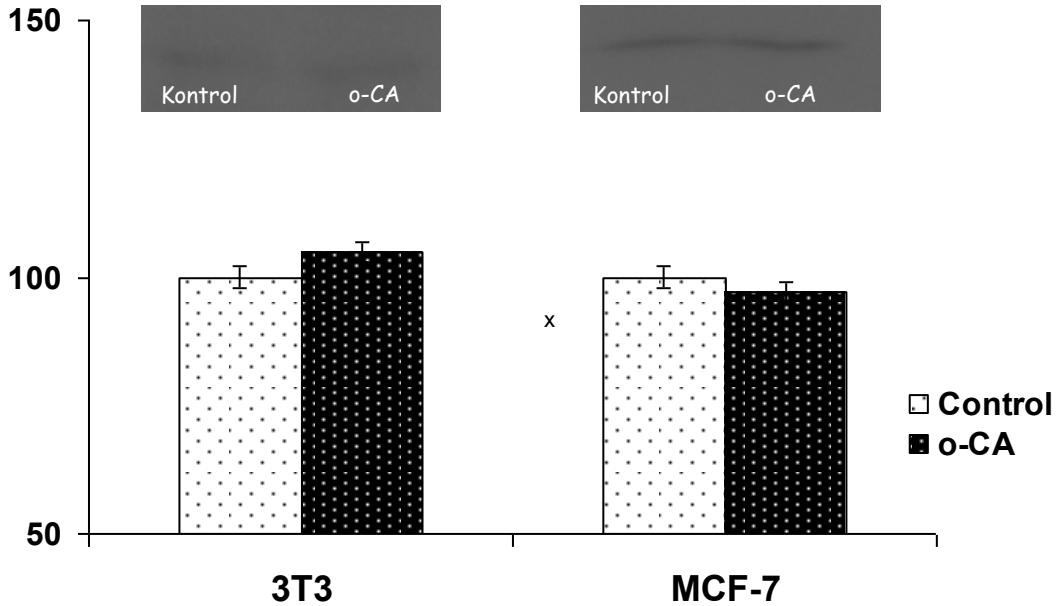
Şekil 3.9. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve insan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-3 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Benzer şekilde, o-kumarik asidin apoptoz da görev alan diğer bir kaspaz olan Kaspaz-9' un mRNA ve protein seviyesine olan etkisi belirlenmiş olup, Şekil 3.10 ve 3.11'de verilmektedir. mRNA ve Protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda MCF-7 hücre hattında Kaspaz-9' un mRNA ve protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan % 2 ve % 3'lük bir azalışlar tespit edilmiştir. 3T3 hücre hattında ise o-Kumarik asit Kaspaz 9'un mRNA ve protein seviyelerinde 1.07- ve 1.05-kat artışla sebep olmuştur. Fakat bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

KASPAZ 9

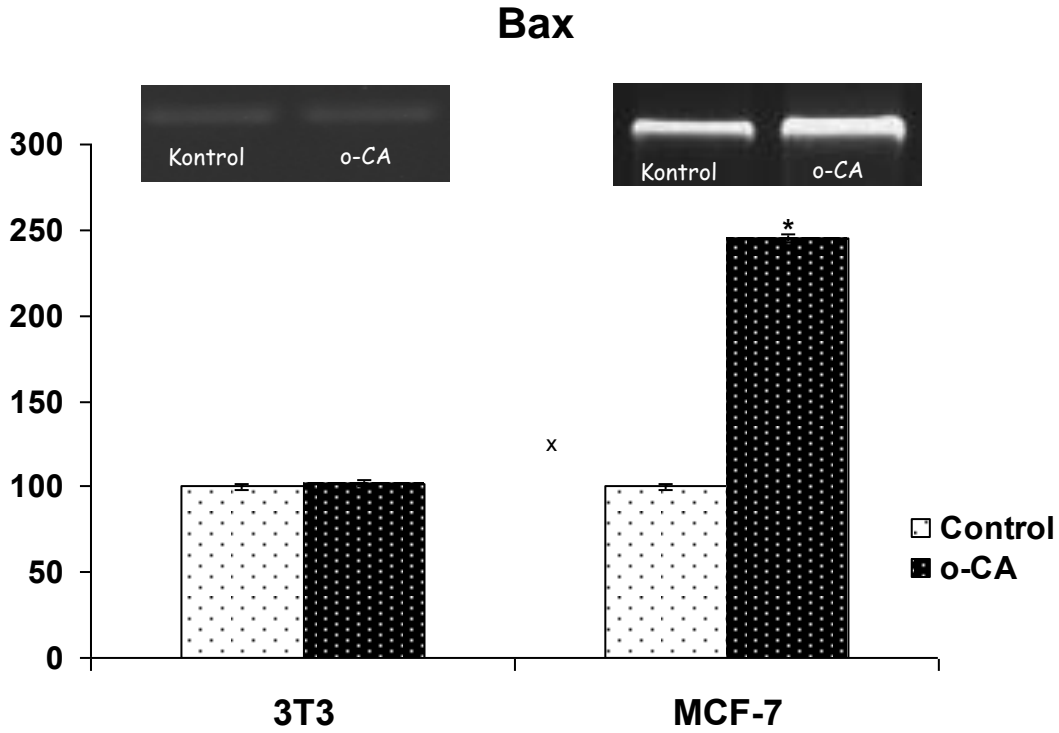


Şekil 3.10. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-9 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüledi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi.

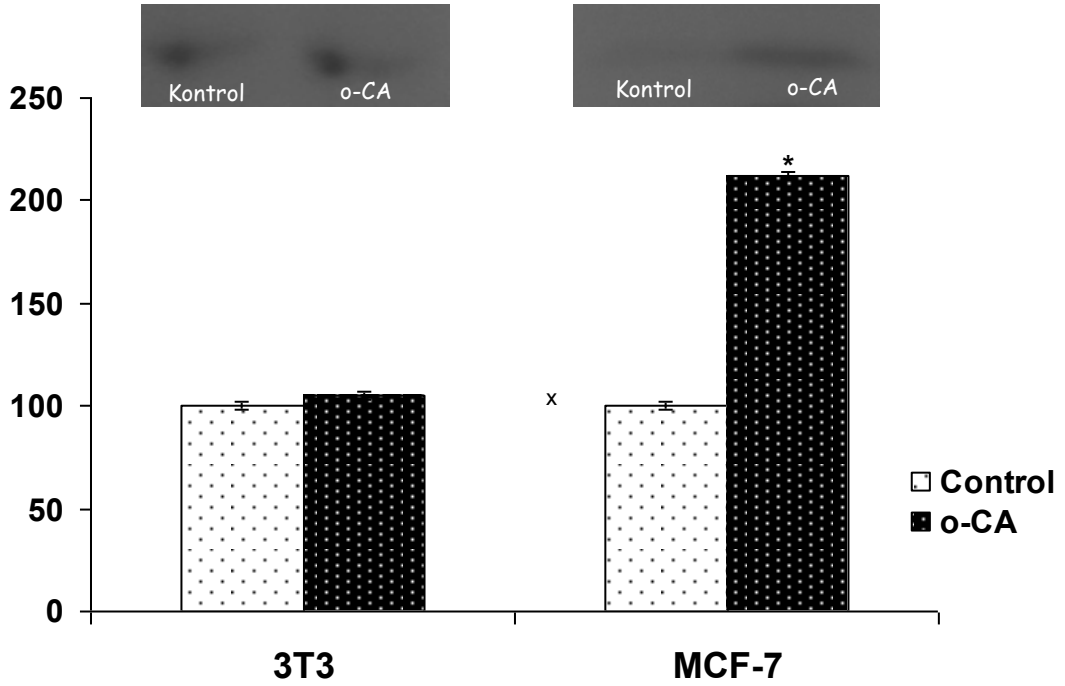


Şekil 3.11. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Kaspaz-9 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır.

Tüm bunların yanı sıra, o-kumarik asidin apoptotik proteinlerden olan Bax'ın mRNA ve protein seviyelerine olan etkileri insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattında (3T3) belirlendi (Sekil 3.12 ve 3.13). Ara rapordaki sonuçların tekrar edildi ve bu tekrarlar sonucunda ara rapor ile farklı sonuçlar bulundu. Birçok tekrardan sonra aşağıdaki sonuçlar elde edildi. Buna göre mRNA ve Protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda MCF-7 hücre hattında Bax'ın mRNA ve protein seviyesinin sırasıyla 2.52- ve 2.15-kat artışı tespit edildi. Diğer taraftan, 3T3 hücre hattında bu proteinin mRNA ve protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Sekil 3.12 ve 3.13).



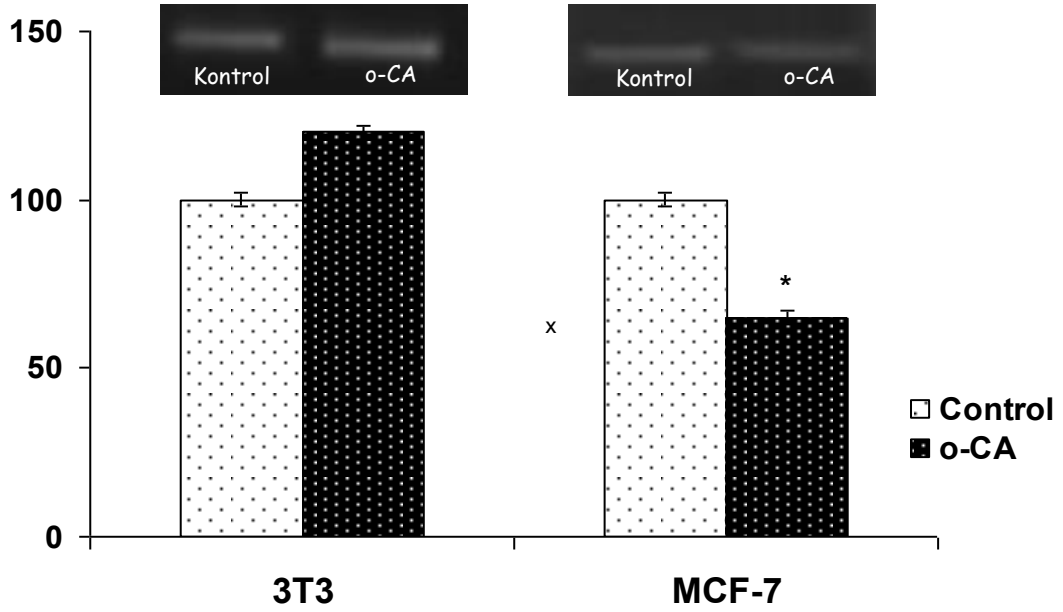
Şekil 3.12. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bax mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).



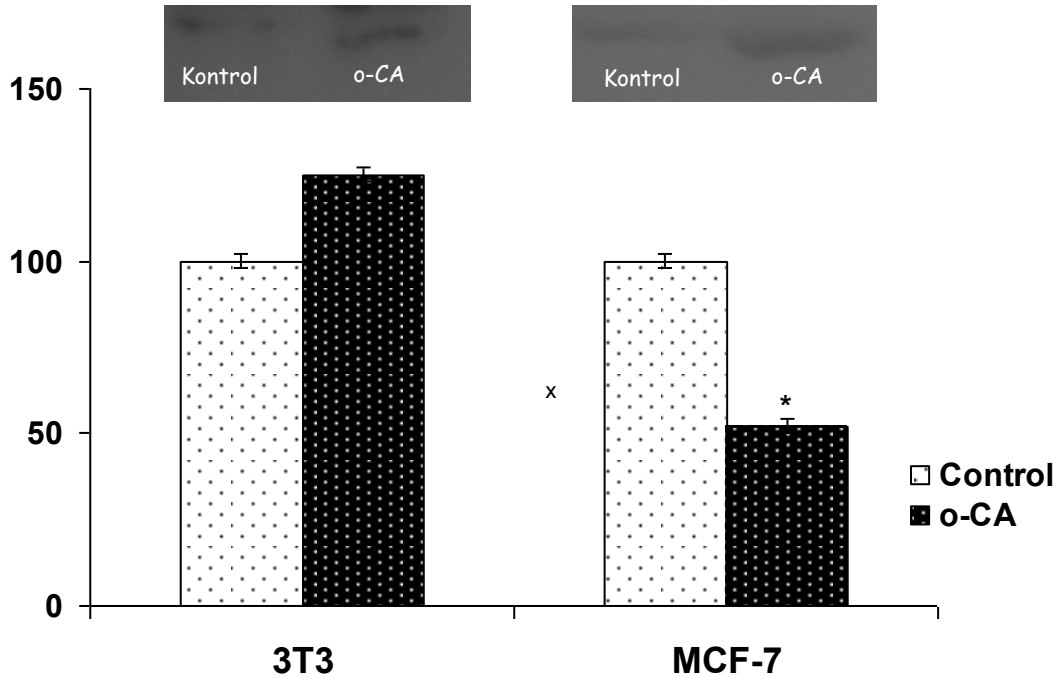
Şekil 3.13. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bax protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Benzer şekilde, o-kumarik asidin apoptoz mekanizmasında görev alan Bcl-2'in mRNA ve protein seviyesine olan etkisi bu çalışma ile belirlenmiştir. Şekil 3.14 ve 3.15'te gösterildiği üzere o-kumarik asit uygulanması sonucunda MCF-7 hücre hattında bcl-2'nin mRNA ve protein seviyesi % 35 ve % 48 azalmıştır ($p < 0.05$). Bu sonuçları aksine, 3T3 hücre hattında o-kumarik asit bcl-2 mRNA ve protein seviyelerinde 1.20- ve 1.25-kat artışla sebep olmuştur. Fakat bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bcl-2

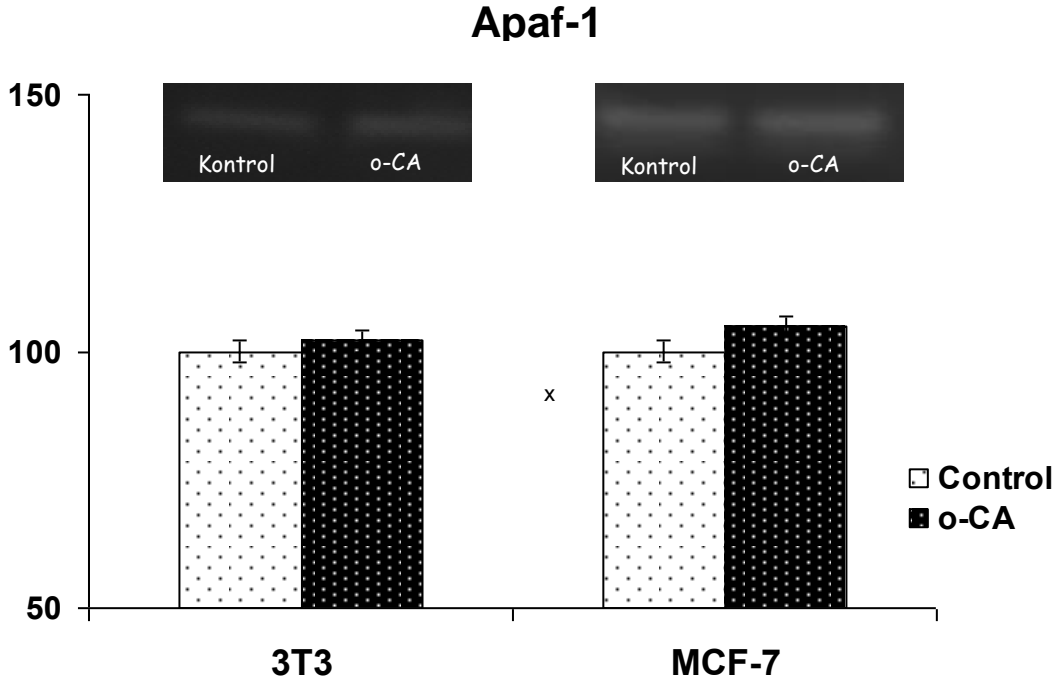


Şekil 3.14. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

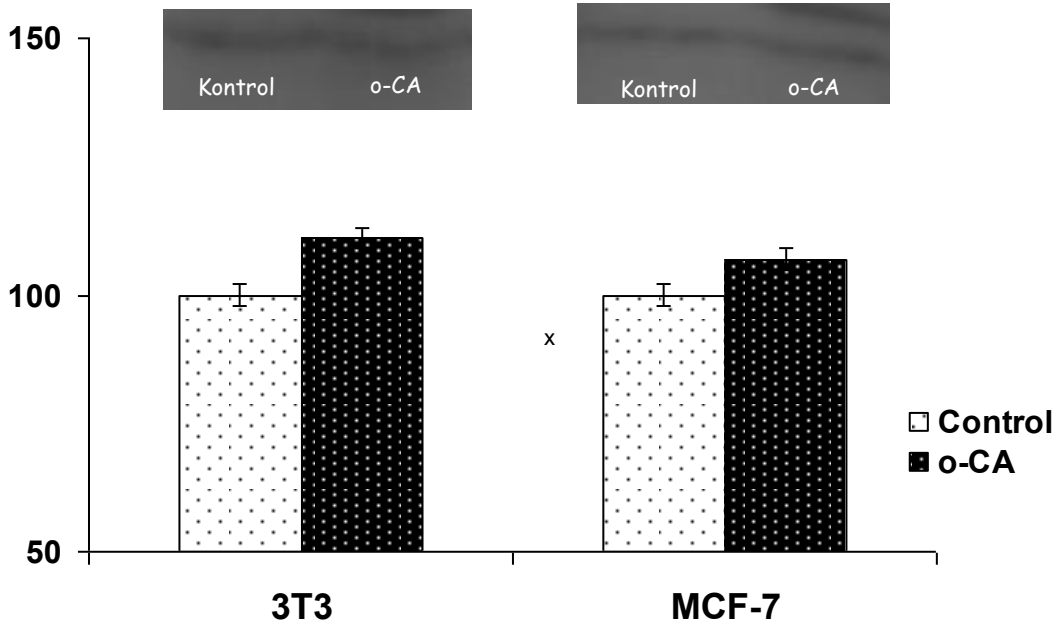


Şekil 3.15. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Apoptoz mekanizmasında görev alan diğer proteinlerden biri olan Apaf-1'in o-kumarik asit uygulaması sonucunda nasıl değiştiği yine bu proje kapsamında belirlenmiştir. Apaf-1'in mRNA ve protein seviyesinde MCF-7 ve 3T3 hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı değişimler belirlenmemiştir. MCF-7 hücre hattında Apaf-1'in mRNA seviyesi sırasıyla 1.05-ve 1.07 kat artarken, 3T3 hücre hattında sırasıyla 1.02- ve 1.11-kat artış gözlemlendi (Şekil 3.16 ve 3.17).



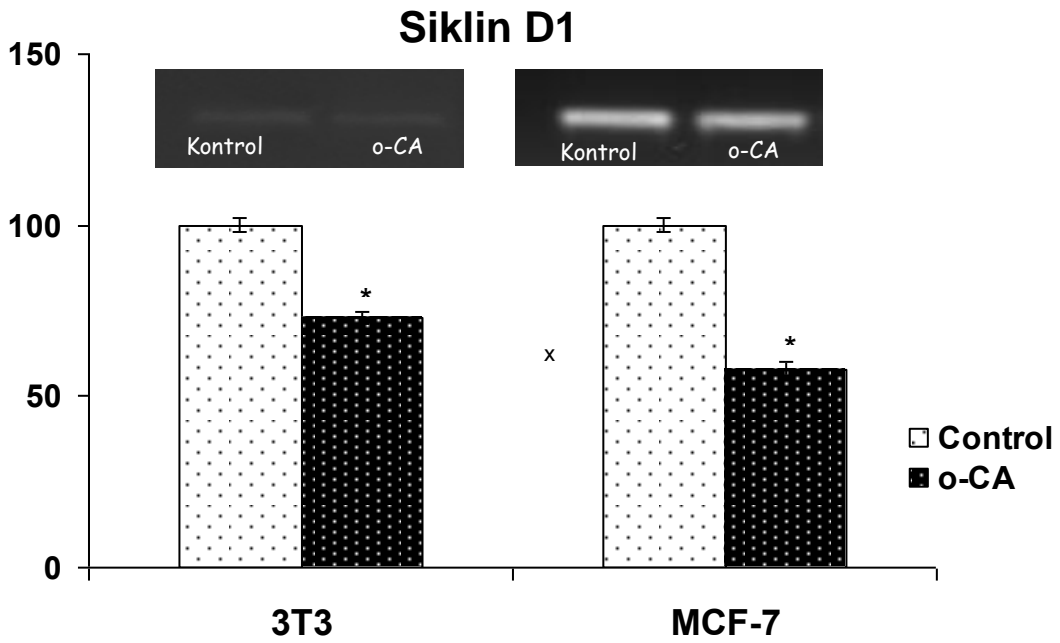
Şekil 3.16. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Apaf-1 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüldü. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır.



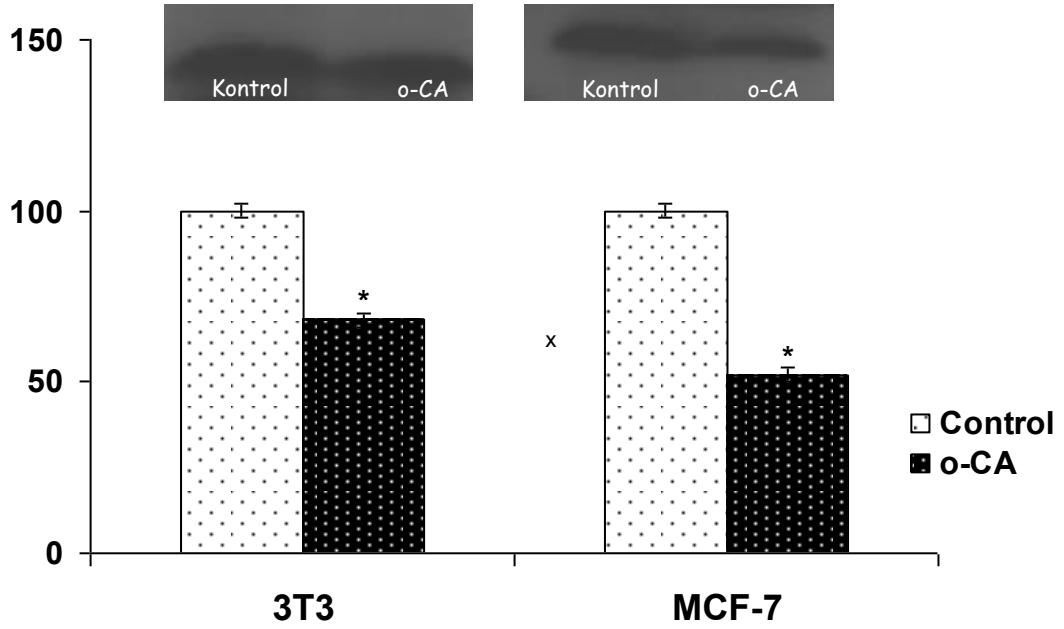
Şekil 3.17. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Bcl-2 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır.

Apoptozda görev alan proteinleri yanı sıra kanser oluşumu ve gelişimi sırasında ekspresyonlarında değişim gözlemlenen ve kanser oluşum mekanizmasında görev alan hücre döngüsü proteinlerinde mRNA ve protein seviyelerinde *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda meydana gelen değişimler bu çalışma ile ilk defa ortaya konmuştur. Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerden olan Siklin D1'in insan meme adenokarsinoma hücre hattında (MCF-7) mRNA ve protein miktarları *o*-kumarik uygulaması sonucunda 42 % ve 48% azalmıştır (Şekil 3.18 ve 3.19). Benzer şekilde, insan fibroblast hücre hattında (3T3) bu proteinin mRNA ve protein seviyesi 27 % 32% azalmıştır ($p < 0.05$). Diğer siklin proteini olan Siklin D2'nin MCF-7 hücre hattında mRNA ve protein seviyesinin 38 % ve 44% azaldığı saptanmıştır. Bu proteinin 3T3 hücre hattında mRNA ve protein seviyesi sırasıyla 10 % ve 11 % azalmasına rağmen bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.20 ve 3.21). Benzer şekilde, hücre döngüsünün kontrolünde rol alan diğer proteinlerinden biri olan Siklin Bağımlı Kinaz-2 (CDK2) *o*-kumarik asit uygulanması

sonucunda MCF-7 hücre hattında mRNA ve protein seviyesi sırasıyla 65% ve 52% azalmıştır ($p<0.05$). Diğer yandan, *o*-kumarik asit bu proteinin mRNA ve protein seviyesi 3T3 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yol açmamıştır (Şekil 3.22 ve 3.23). Yukarıda *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda ekspresyon seviyeleri azalan proteinlerin aksine, hücre döngüsünde görev alan proteinlerden olan CDKN2A (p16) proteini *o*-kumarik asit uygulanması sonucunda MCF hücrelerinde protein ve mRNA seviyeleri anlamlı şekilde artmıştır. 3T3 proteinlerinde ise bu proteinin mRNA ve protein seviyesinde ufak artışlar olmasına rağmen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.24 ve 3.25).

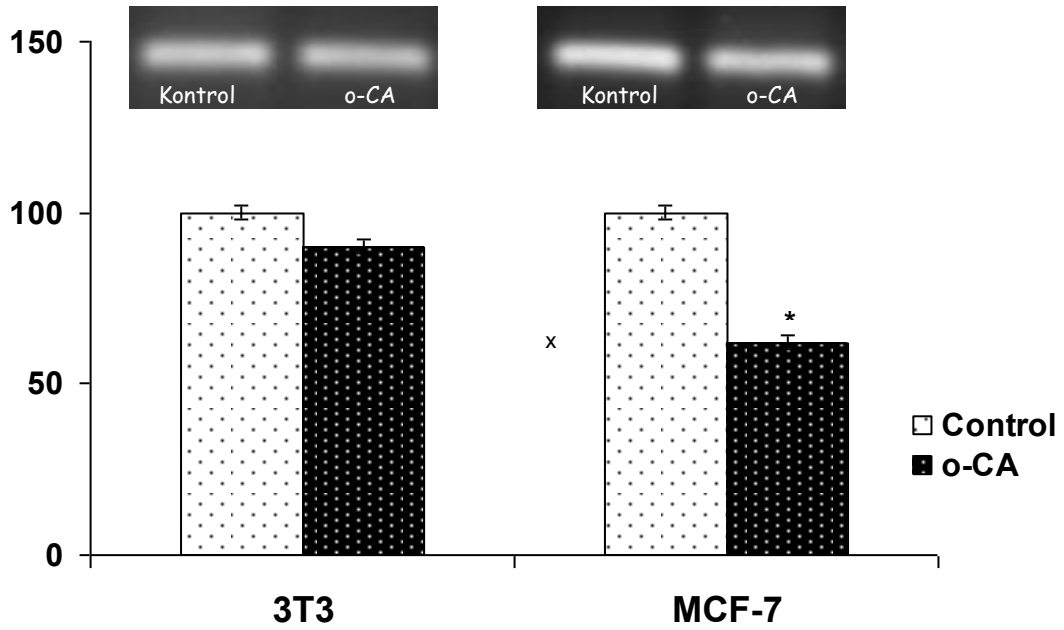


Şekil 3.18. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D1 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

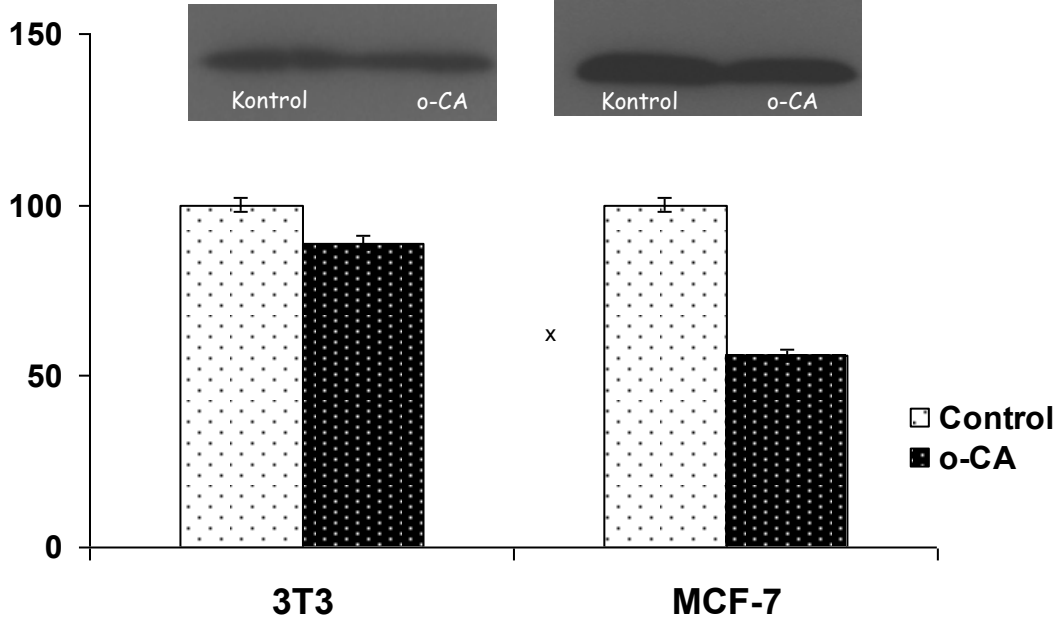


Şekil 3.19. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D1 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Siklin D2

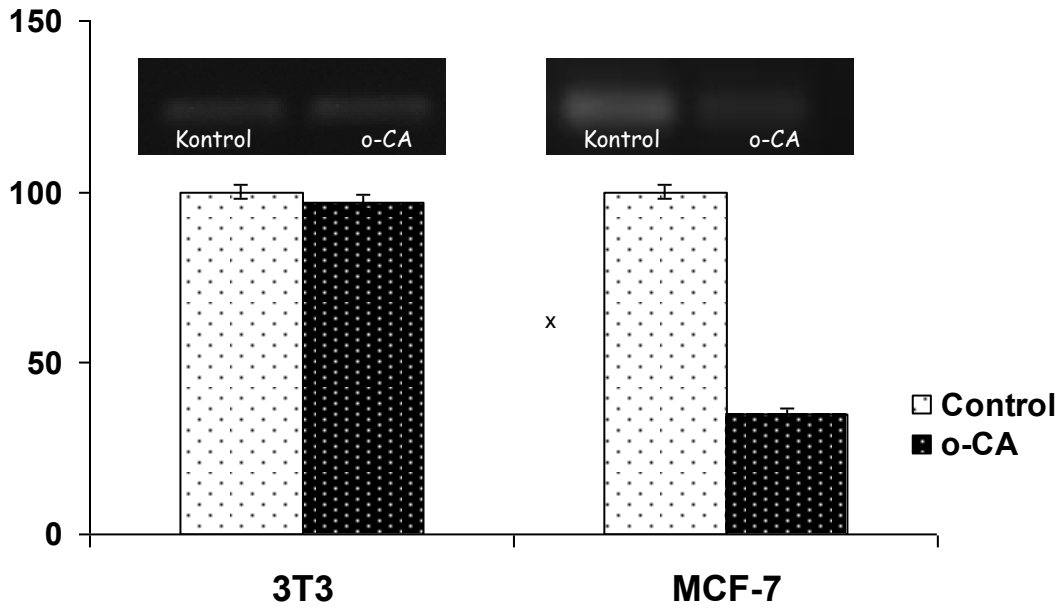


Şekil 3.20. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D2 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 μ l) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüldü. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

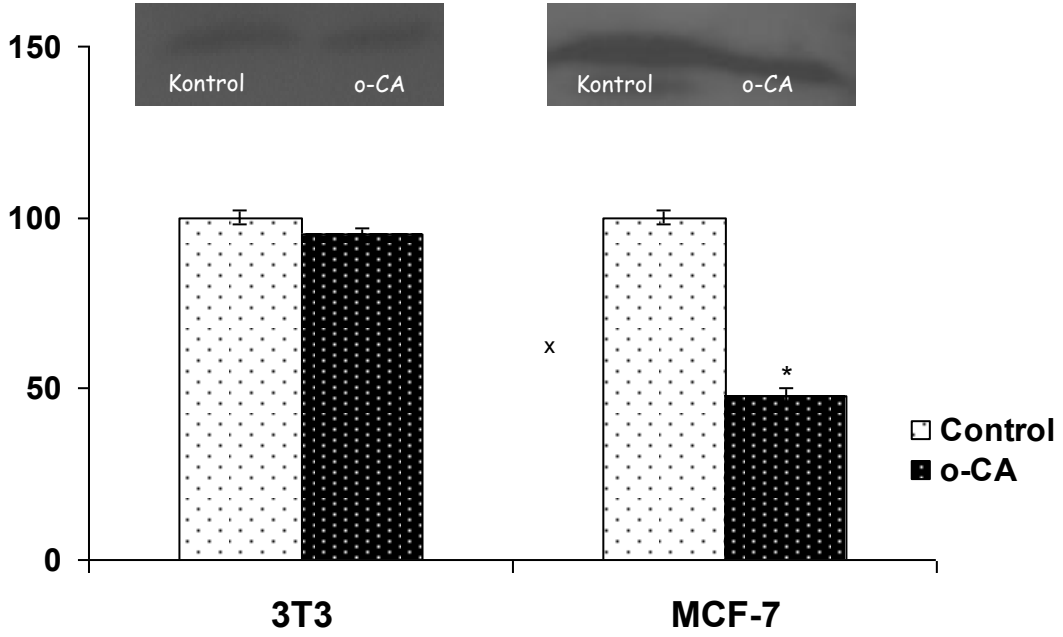


Şekil 3.21. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Siklin D2 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

CDK-2

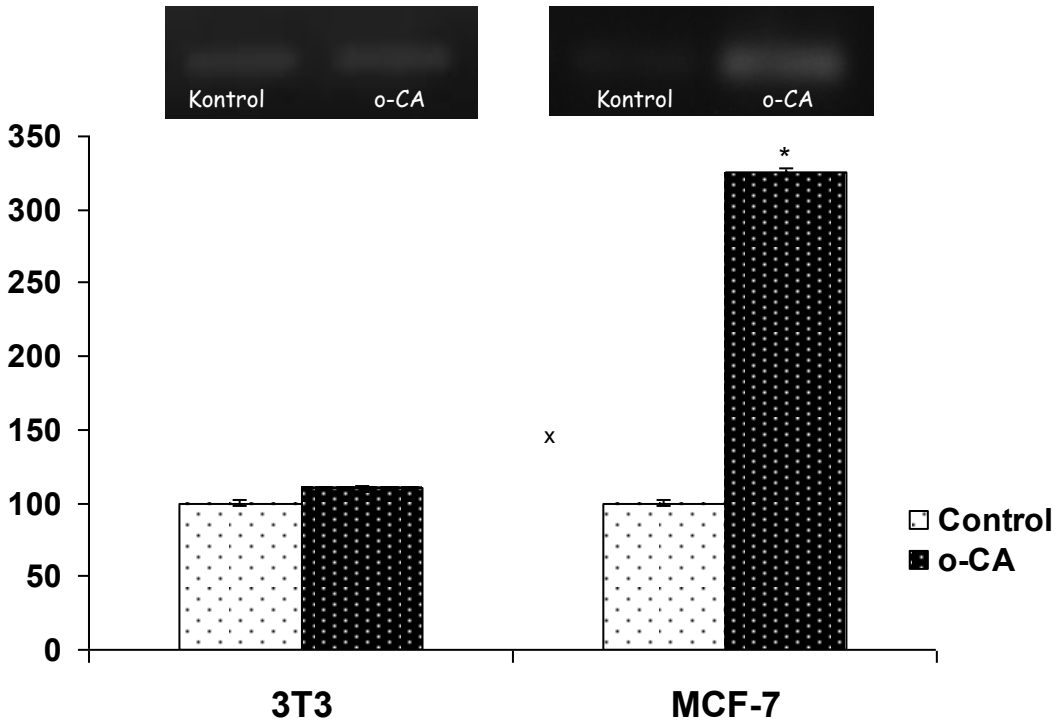


Şekil 3.22. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDK-2 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 μ l) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).



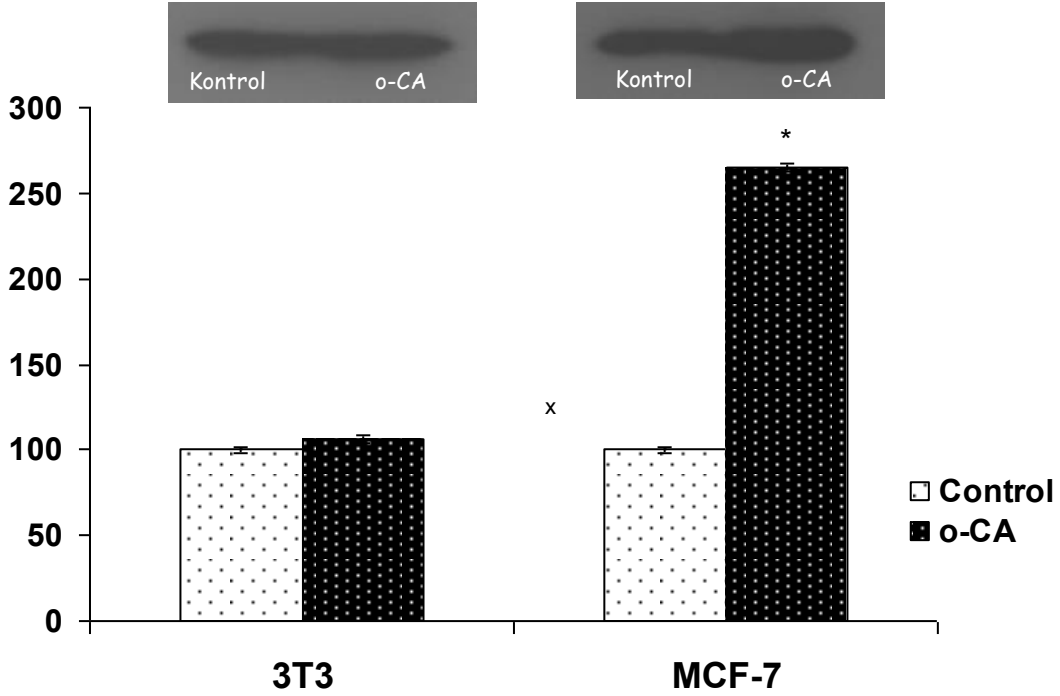
Şekil 3.23. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDK-2 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

CDKN2A



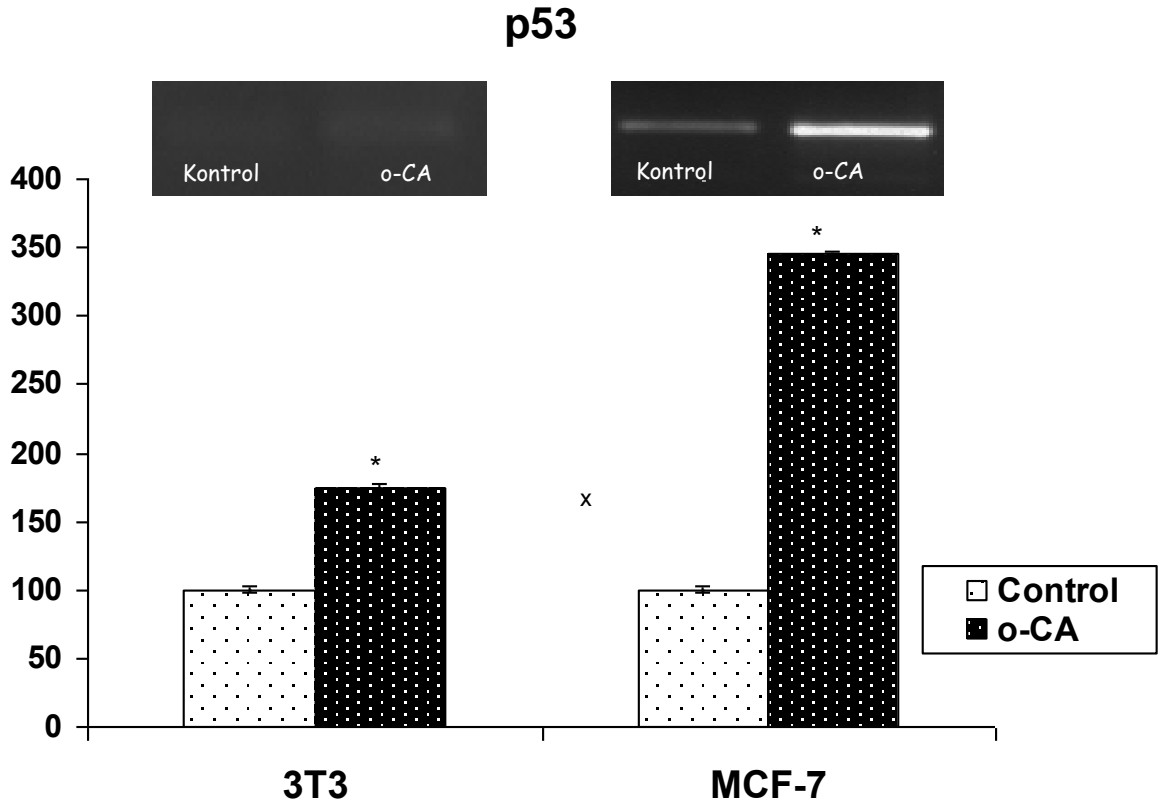
Şekil 3.24. o-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDKN2A mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile

belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

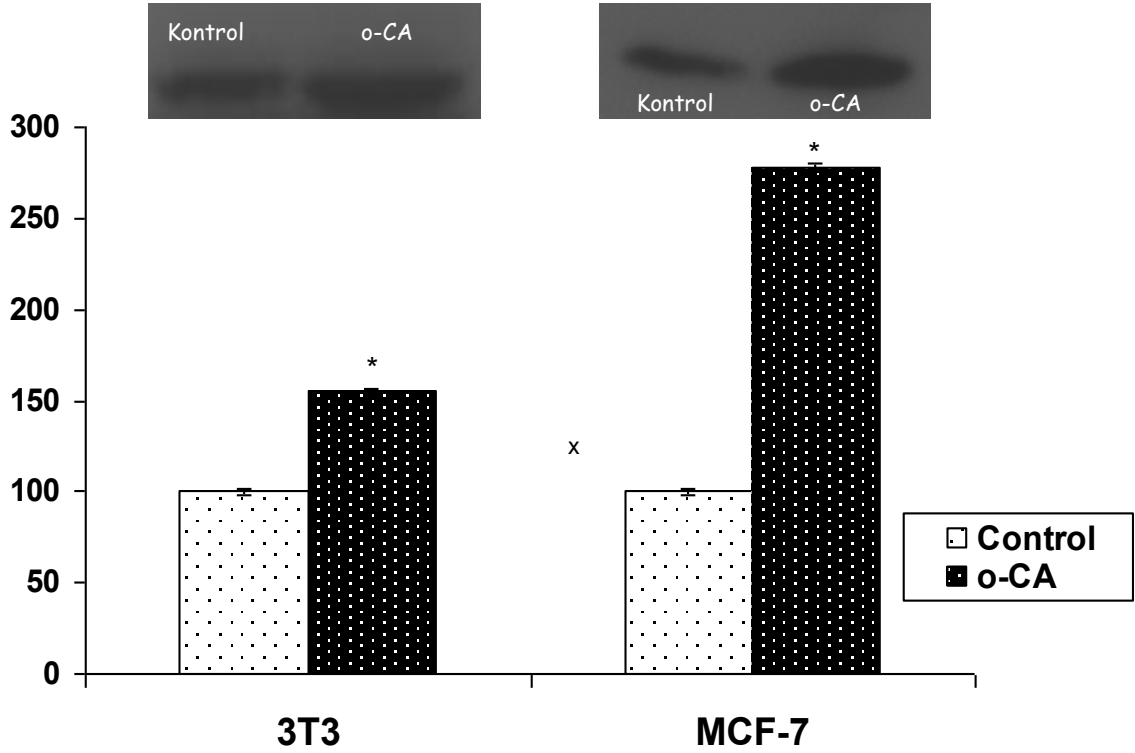


Şekil 3.25. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında CDKN2A protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Apoptoz mekanizması ve hücre döngüsü proteinlerinin yanı sıra, bu çalışma ile tümör baskılayıcı genlerinde *o*-kumarik asit sonucunda nasıl değiştiği bu çalışma ile ilk defa ortaya konulmuştur. *o*-Kumarik asit tümör baskılayıcı proteinlerden olan p53'ün mRNA ve protein seviyelerinde ciddi değişmelere yol açmıştır. MCF-7 hücre hattında p53'ün mRNA ve protein seviyesinde sırasıyla 3.45- ve 2.78-kat artışa neden olmuştur. *o*-Kumarik asit 3T3 hücre hattında p53'ün mRNA ve protein seviyesinde ise 1.75- ve 1.55-kat artışa neden olmuştur (Şekil 3.26 ve 3.27).

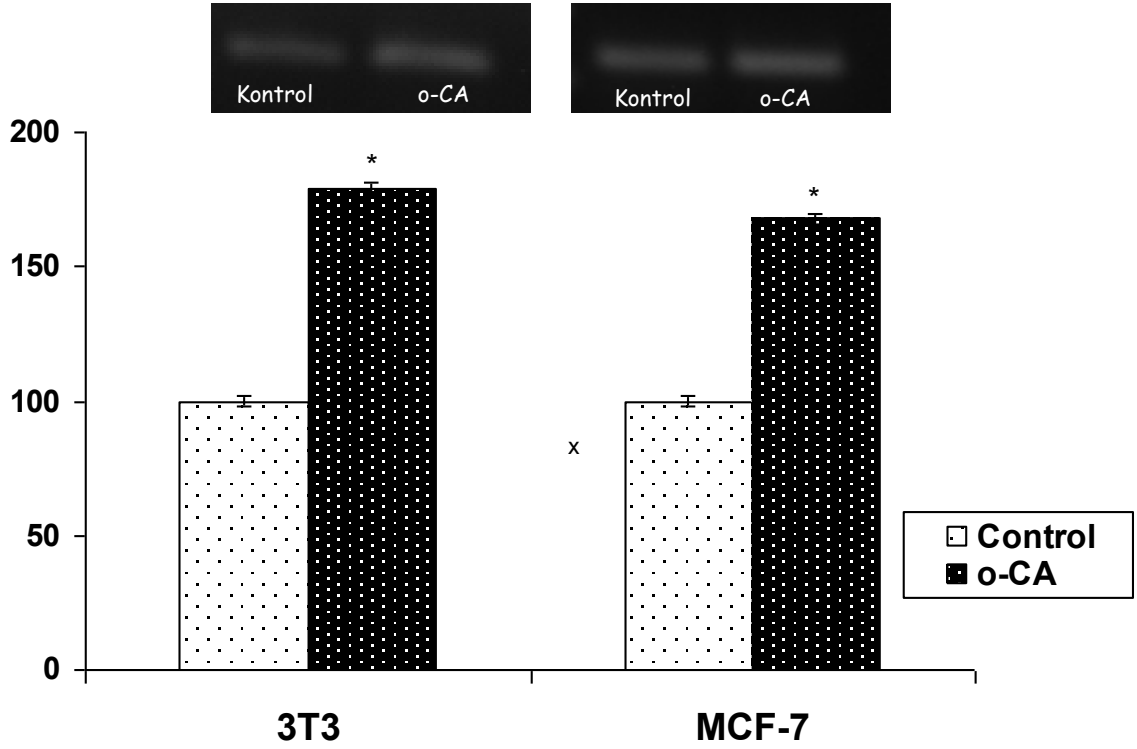


Şekil 3.26. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında p53 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

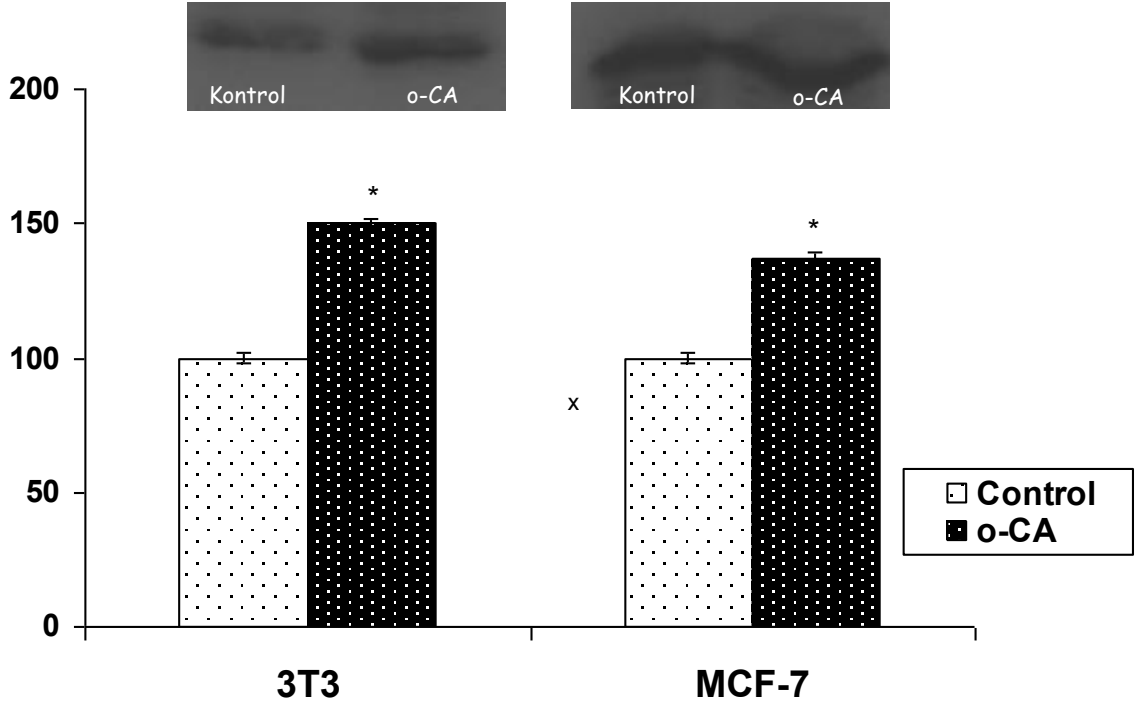


Şekil 3.27. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında p53 protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Bu çalışmada, *o*-kumarik asidin diğer tümör baskılayıcı protein olan PTEN'nin mRNA ve protein seviyesine olan etkisi bu çalışma ile ortaya konulmuştur. MCF-7 hücre hattında PTEN'in mRNA ve protein seviyesi *o*-kumarik asit uygulanması sonucunda 1.68- ve 1.37-kat artmıştır ($p < 0.05$). Benzer şekilde, PTEN'in mRNA ve protein seviyesi 3T3 hücre hattında 1.79- ve 1.5-kat artmıştır (Şekil 3.28 ve 3.29).

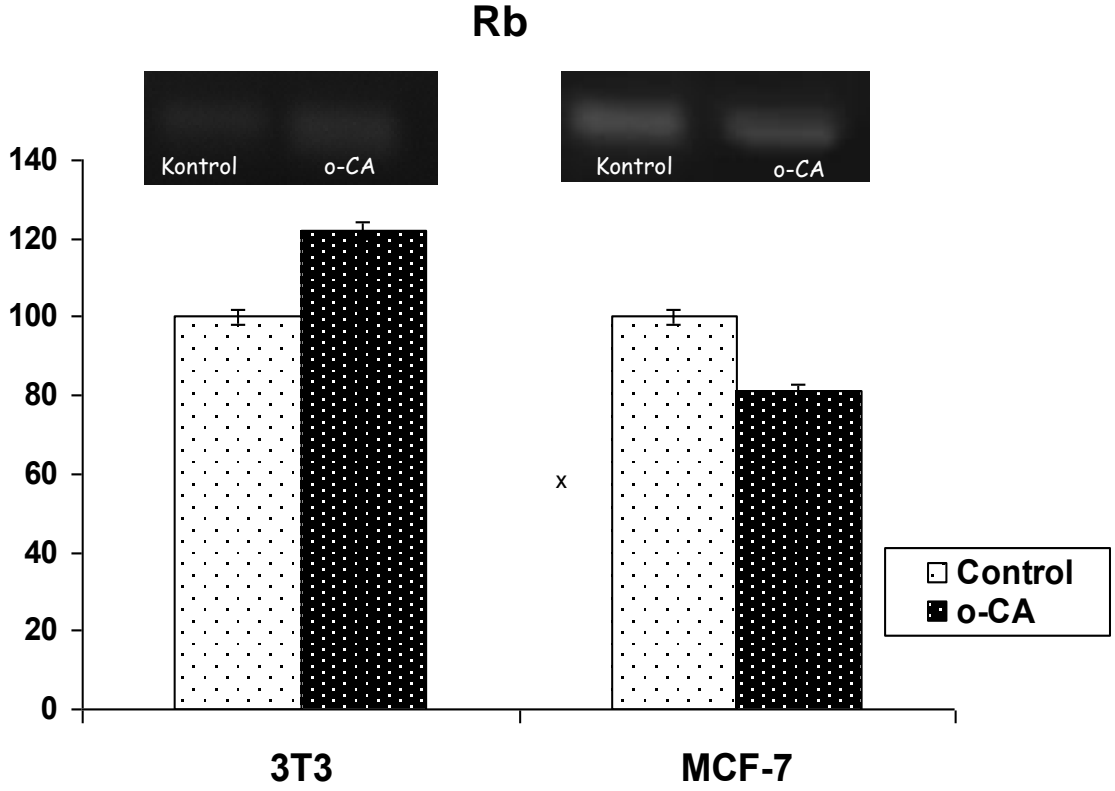


Şekil 3.28. o-Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında PTEN mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

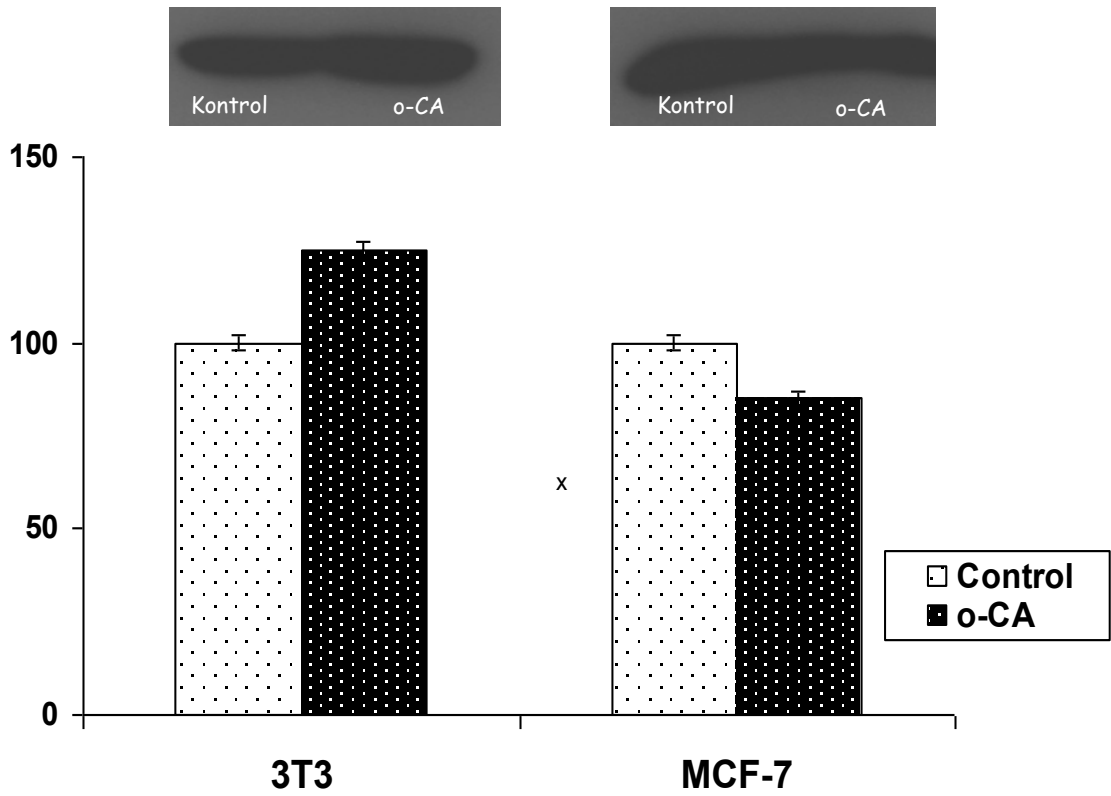


Şekil 3.29. *o*-Kumarik asitin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve İnsan fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında PTEN protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

o-Kumarik asit diğer tümör baskılayıcı proteinlerden olan retinoblastomanın (Rb) mRNA ve protein seviyesini nasıl değiştirdiği bu çalışma ile ortaya konmuştur. MCF-7 hücre hattında Rb'nin mRNA ve protein seviyeleri sırasıyla 19% ve 15% azalmıştır. Fakat bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu azalmaların aksine 3T3 hücre hattında *o*-kumarik asit Rb'nin mRNA ve protein seviyelerini 1.22- ve 1.25-kat artışa sebep olmuştur. Fakat MCF-7 hücre hattında olduğu gibi bu artışlar anlamlı değildir.



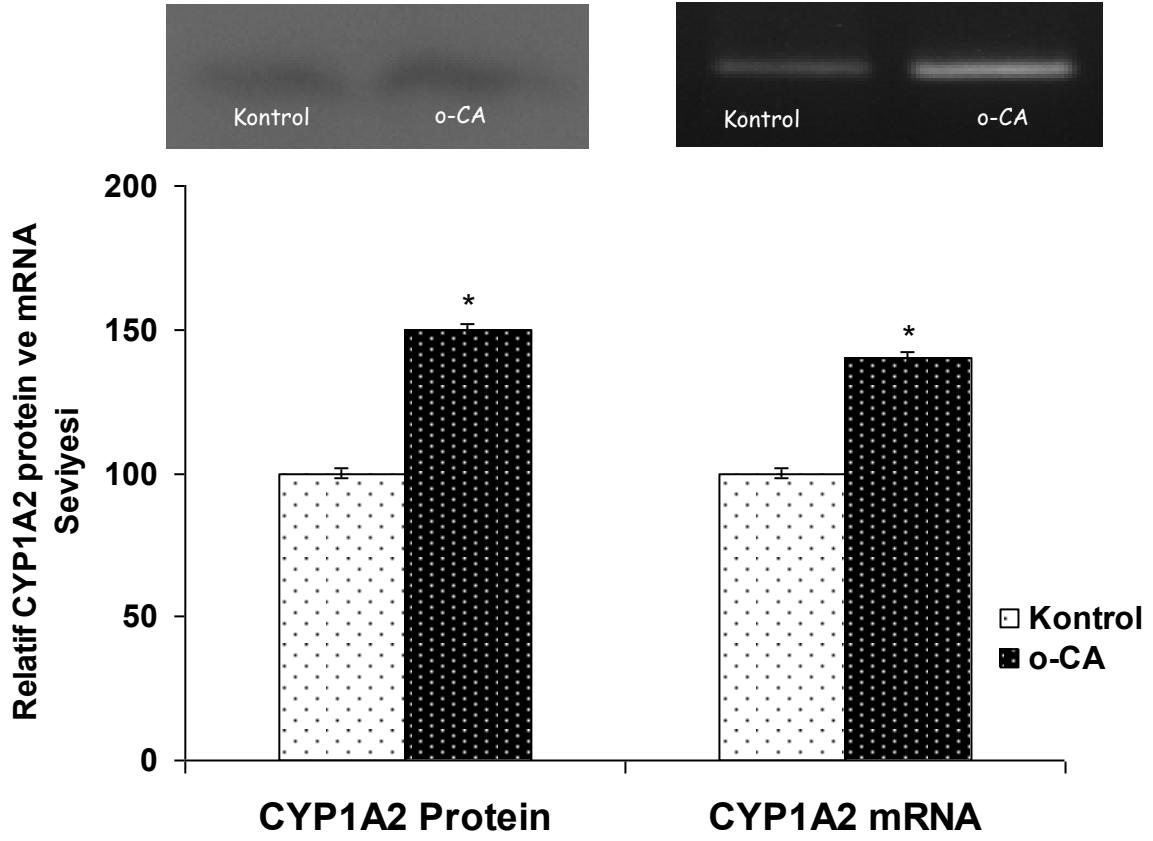
Şekil 3.30. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Rb mRNA seviyesine olan etkisi. PZR ürünleri (10 µl) % 2 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır.



Şekil 3.31. *o*-Kumarik asidin insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve fibroblast hücre hattı (3T3) hatlarında Rb protein seviyesine olan etkisi. Protein bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır.

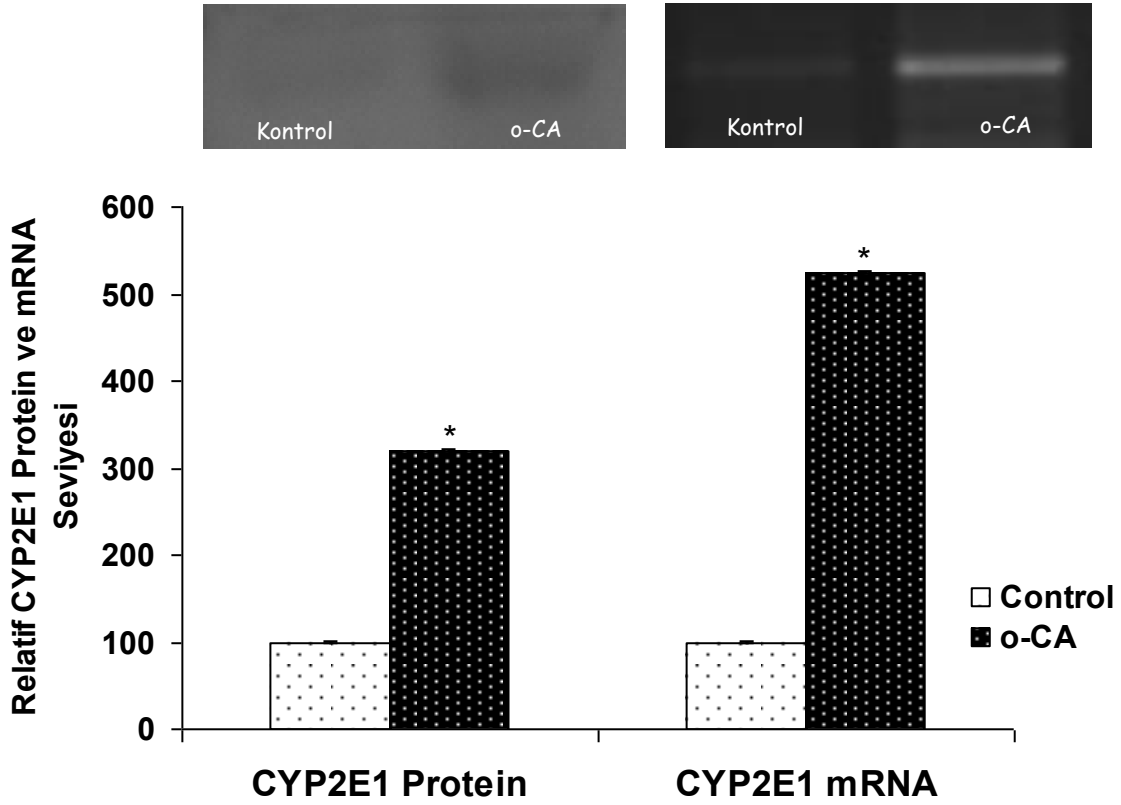
3.2.2. CYP450 İzozimlerinin Protein ve mRNA Düzeylerinin HepG2 Hücre Hattında Tayini

Bu çalışmada *o*-kumarik asidin CYP450 izozimlerinin protein ve mRNA düzeylerine olan etkileri spesifik primer antikolar ve primerler kullanılarak Western blot ve RT-PCR metodları ile belirlendi. *o*-Kumarik asit'in CYP1A2 protein seviyesine olan etkisi Şekil 3.32'de verilmektedir. Protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda CYP1A2 protein seviyesinin *o*-kumarik asit uygulanması sonucunda yaklaşık 1.52-kat arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde, CYP1A2 mRNA seviyesi *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı 1.4-kat artığı tespit edilmiştir. (Şekil 3.32)



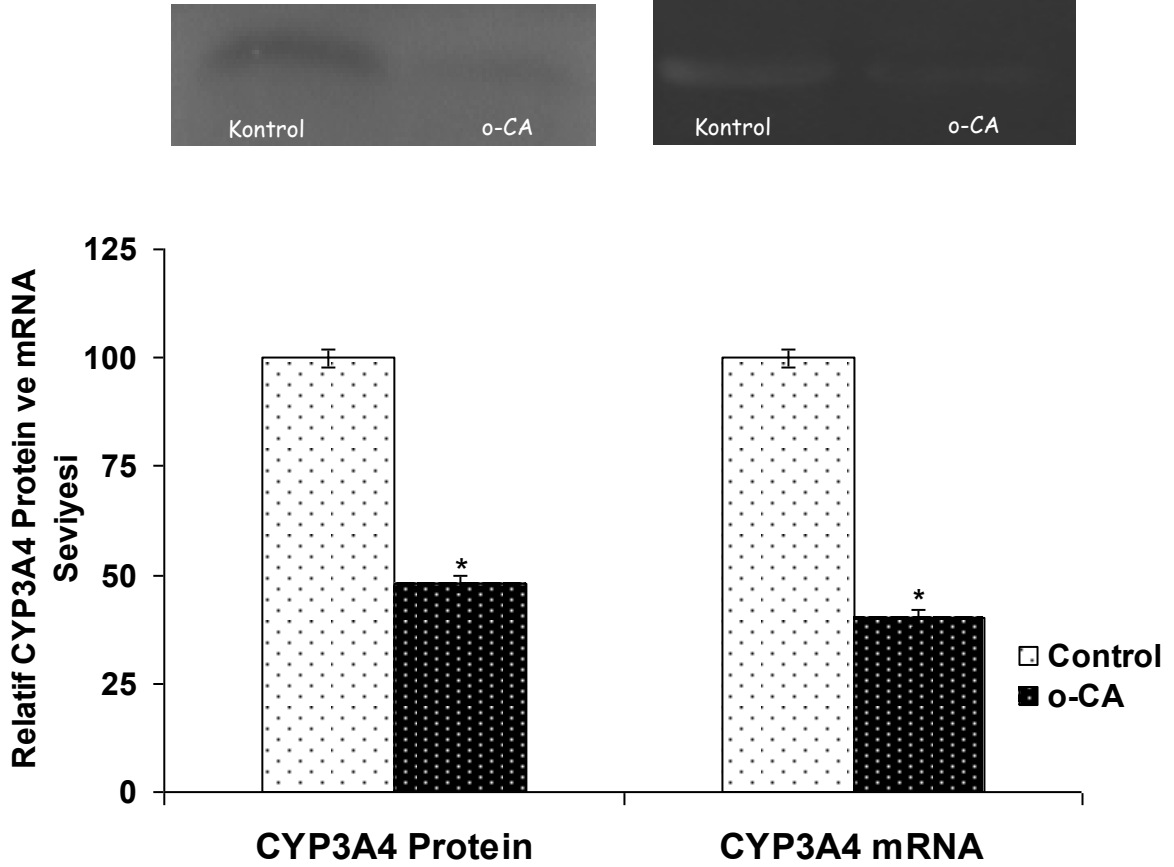
Şekil 3.32. *o*-Kumarik asidin insan karaciğer hücre hattında CYP1A2 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi. Protein ve PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. PZR bantları 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Benzer şekilde *o*-kumarik asidin CYP2E1 protein seviyesi üzerine olan etkisi Western Blot analizi ile belirlendi (Şekil 3.33). Protein bantlarının densitometrik analiz sonuçlarına göre *o*-Kumarik asit CYP2E1 protein seviyesinde 3.2 kat artışa sebep oldu ($p < 0.05$). *o*-Kumarik asit uygulanması sonucunda CYP2E1 mRNA seviyesi 5.24-kat arttırmıştır (Şekil 3.33).



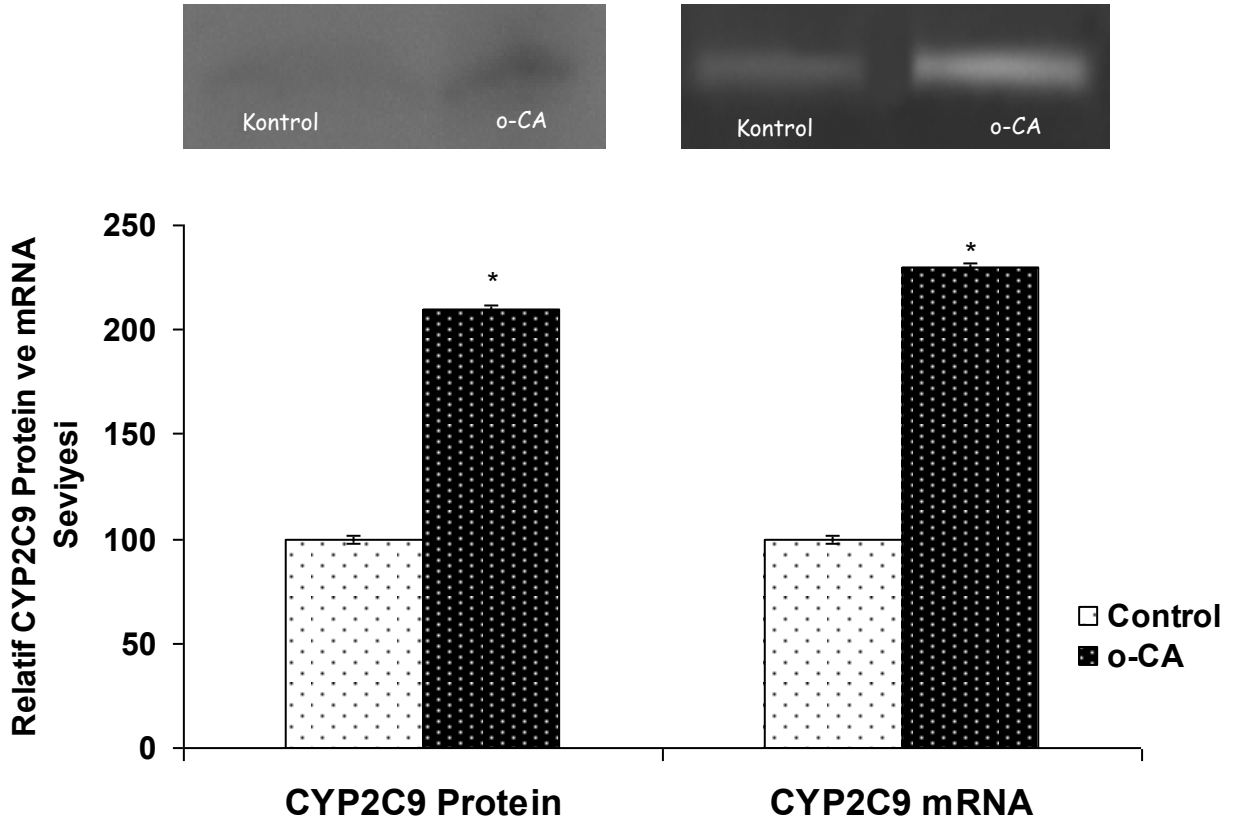
Şekil 3.33. *o*-Kumarik asidin insan karaciğer hücre hattında CYP2E1 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi. Protein ve PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. PZR bantları 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

o-Kumarik asit'in sitokrom P450 izozimlerinden olan CYP3A4'ün protein seviyesine olan etkisi bu çalışma ile insan karaciğer kanser hücre hattında belirlenmiştir. CYP3A4 protein seviyesinde *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda % 52 azalma gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Tüm bunların yanı sıra, *o*-Kumarik asit'in CYP3A4 mRNA seviyesine etkisinin belirlenmesi için uygun koşulların optimizasyonu yapılmıştır. Bu fenolik asit CYP3A4 mRNA seviyesinde % 60 azalmaya neden olmuştur. (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. o-Kumarik asidin insan karaciğer hücre hattında CYP3A4 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi. Protein ve PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. PZR bantları 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

o-Kumarik asit uygulanması sonucunda diğer bir CYP450 izozimi olan CYP2C9'un nasıl değiştiğini bu çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. PZR koşulları CYP2C9 mRNA'sının belirlenmesi için optimize edilmiştir. 24 saat 5 mM o-Kumarik asit uygulaması CYP2C9'un protein ve mRNA seviyesinde sırasıyla 2.1- ve 2.3-kat istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) artışa neden olmuştur (Şekil 3.35).



Şekil 3.35. o-Kumarik asidin insan karaciğer hücre hattında CYP2C9 protein ve mRNA seviyesine olan etkisi. Protein ve PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi. PZR bantları 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100% alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Günümüzde bitkilerden izole edilmiş birçok aktif bitki bileşenleri dünyanın dört bir tarafında yaygın olarak kullanılmakta ve bazı kanser türlerinde ise umut kaynağı olarak görülmektedir. Bitkilerde bulunan bu aktif maddeler grubundan biride fenolik asitlerdir. Fenolik asitler bitki âleminde çok sıklıkla rastlanan önemli sekonder metabolitlerdendir. Bu çalışma ile insanların diyetle birlikte sıklıkla aldıkları ve geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitkilerin yapısında yaygın bir şekilde bulunan o-kumarik asitin anti-karsinojenik, apoptotik etkilerinin etki mekanizmaları ile olası diyet-ilaç potansiyelinin belirlenmiştir.

o-kumarik asidin apoptozda görev alan temel proteinlere olan etkisi ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir. Bu fenolik asit insan meme kanseri hücre hattında (MCF 7) apoptotik proteinlerden bax ve kaspaz 3'ün ekspresyonlarının artmasına neden olurken, bcl-2'bin ekspresyonunun azalmasına neden olmuştur. Bu proteinler insan fibroblast hücre hattında (3T3) ise değişmemiştir. Her iki hücre hattında diğer apoptotik proteinlerden olan Kaspaz- 9 ve Apaf-1'in mRNA ve protein seviyeleri o-kumarik asit uygulanması sonucunda değişmemiştir (Şekil 3.8-3.17). Bu sonuçlar uygulanan dozda kanser hücre hattı olan MCF-7 hücre hattında apoptoz indüklenirken, normal hücre hattı olan 3T3'de indüklenmediğini göstermektedir. Bu sonuç çok önem arz-etmektedir. Çünkü kanser tedavisinde en büyük yan etkilerden biri kimyasal ajanın kanser hücrelerine verdiği zararın yanı sıra normal hücrelere de zarar vermesidir. o-kumarik asit uygulanan dozda bu duruma yol açmaması çok büyük bir avantajdır.

Fitokimyasalın kanser biyolojisinde ve tümör baskılanmasında önemli rol oynayan birçok genin, protein ve gen ekspresyon seviyelerini değiştirdikleri, bu sayede antikarsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. (Şekil1.2). Örneğin, fitokimyasal kullanılarak apoptoz indüklenmesi ve kanser hücrelerin yok edilmesi, kanser tedavisinde çok önemli ve umut vaat edici bir strateji haline gelmiştir. Çeşitli bitkilerden elde edilen fitokimyasalların oral kavite, pankreas, akciğer, deri, tiroid ve göğüs kanser hücre hatlarında kaspaz-3 sinyal yolağını aktive ederek, Bax/Bcl-2 oranını artırarak, mitokondrial yolak aktivasyonu ile (sitokrom c, Bax, Bcl-2, kaspaz 8, kaspaz-9, kaspaz-3), (Kang ve ark., 2010., Shin ve ark., 2010, Wang ve ark., 2010

Zhang ve ark., 2009). Ferulik asit, *p*- ve *m*-kumarik asit, kafeik asit gibi fenolik asitlerin insan kanser hücre hatlarında ve deney hayvanlarında Bax, Bcl-2 ve kaspazlar ile apoptozu indüklemekte ve anti-karsinojenik etki göstermektedirler (Kampa ve ark., 2003; Chuang ve ark., 2005; Kahnduja ve ark., 2006; Chen ve ark., 2007; Nakajima ve ark., 2009; Chang ve ark., 2010; Balakrishnan ve ark., 2010). Diyetle çok fazla anılan *o*-kumarik asidin anti-karsinojenik aktivitesi ile alakalı çalışma sadece bir tanedir (Hsu ve Yen, 2007). Fakat bu çalışma etki mekanizmasının aydınlatılması ile alakalı olmayıp florasan mikroskop ile apoptoz tayinini kapsamaktadır. Bu çalışma ile bu maddenin apoptoz yolağına olan etkisi bu çalışma ile ilk defa ortaya konmuştur.

o-Kumarik asidin hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinden olan Siklin D1, D2, Siklin bağımlı kinaz 2 (CDK-2) ve CDKN2A'ya olan etkileri ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. MCF-7 hücre hattında bu proteinlerden Siklin D1, D2, ve CDK-2'in mRNA ve protein seviyeleri ciddi şekilde düşerken CDKN2A'nın protein ve mRNA seviyesi artmıştır (Şekil 3.18-3.25). 3T3 hücre hattında da değişimler gözlemlenmiş ama bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.18-3.25). Bu sonuçlar uygulanan dozda kanser hücre hattı olan MCF-7 hücre hattında hücre döngüsü düzenleyici proteinlerde *o*-kumarik asit sonucunda ciddi değişimlere neden olurken normal hücre hattı olan 3T3'de değişmediğini göstermektedir. Bu sonuçlar MCF-7 hücrelerinin Siklin D1, D2, ve CDK-2'in azalması ve CDKN2A artması sonucunda G1 fazında durakladığını göstermektedir. Birçok bitki ekstresi benzer şekilde hücre döngüsünü durdurarak kanser oluşumunu engellemektedir (Wahle ve ark., 2010). *o*-Kumarik asit, apoptoz yolağının aktivasyonun yanı sıra, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin de ekspresyonlarını değiştirerek antikarsinojenik etki göstermektedir.

Bu çalışma ile *o*-kumarik asidin tümör baskılayıcı proteinlerden olan p53, PTEN ve Rb'nin mRNA ve protein seviyelerine olan etkileri ilk defa ortaya konmuştur (Şekil 3.26-3.31). MCF-7 hücre hattında p.53 ve PTEN'nin mRNA ve protein seviyeleri 1.4- kat ile 3.43-kat arasında artış göstermiştir. Benzer şekilde 3T3 hücrelerinde de bu proteinler artmış ama bu artış MCF-7 kadar olmamıştır (Şekil 3.26-3.31). Bunların aksine Rb' nin mRNA ve protein seviyeleri her iki hücre hattında da anlamlı şekilde değişmemiştir. Bu sonuçlar, *o*-kumarik asidin tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarını değiştirerek anti-karsinojenik etki gösterebileceğini ortaya

koymuştur. Fakat normal hücreslerin etkilenmemesi için ufak bir doz ayarlanması gerekliliği yine bu çalışma ile saptanmıştır.

Çeşitli bitkilerden elde edilen fitokimyasalların değişik kanser hücre hatlarında kaspaz 3'e bağımlı, p53 yolağını aktive ederek, hücre döngüsü proteinlerinin değiştirerek anti-karsinojenik etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur. Ferulik asit, *p*- ve *m*-kumarik asit, kafeik asit gibi fenolik asitlerin insan kanser hücre hatlarında ve deney hayvanlarında siklin bağımlı kinazlar, siklin D1, p53, yoluyla anti-karsinojenik etki göstermektedirler (Kampa ve ark., 2003; Chuang ve ark., 2005; Kahnduja ve ark., 2006; Chen ve ark., 2007; Nakajima ve ark., 2009; Chang ve ark., 2010; Balakrishnan ve ark., 2010). *o*-kumarik asitin p53, siklinler ve diğer hücre döngüsü proteinleri üzerine etkilerini gösteren çalışma yoktur. Bu çalışma ilk defa *o*-kumarika sitin bu özelliğini de ortaya koymuştur.

Birçok doğal fitokimyasalın (özellikle flavonoidlerin) özgün sitokrom P450 izozimlerini indükledikleri, aktivitelerini artırdıkları veya ketledikleri ve böylelikle ikincil uyarılara olan cevaplarını değiştirdiği bilinmektedir. Birçok karsinojenin DNA gibi makro moleküllere kovalent olarak bağlanabilen reaktif elektrofilik metabolitlere veya inaktif metabolitlere dönüşümleri CYP450 (özellikle CYP1A, CYP1B, CYP2E ve CYP3A) enzimlerince katalizlenmektedir (McLemore 1990, Smith ve ark. 1996, Conney 2003). Oluşan reaktif metabolitler diğer Faz I veya Faz II enzimlerince inaktif ürünlere dönüştürölmektedir. Sonuç olarak, karsinojenlerin bu şekilde detoksifikasyonunda rol alan sitokrom P450 enzimlerinin ve/veya diğer Faz I ve Faz II enzimlerinin indüksiyonu, karsinojenlerin etkilerine karşı bir koruma ve savunma sistemi oluşturabilir.

Bütün P450 izoformlarının içinde CYP1A (CYP1A1 ve CY1A2) karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasında rol oynadığından öncelikli bir yer tutar. Bu iki üye potansiyel mutajenik olan benzo(a)piren, sigara dumanında ve mangalda pişirilmiş yiyeceklerde bulunan aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunda rol oynarlar (Adamson, 1996; Hümmeerich, 2004; Kim, 2005; Ma Lu, 2007). Bu çalışma 'in CYP1A2 izoziminin *o*-kumarik asit uygulanması sonucu etkilediğini gösteren ilk çalışmadır (şekil 3.32). Bu izozimin *o*-kumarik asit ile indüklenmesi sonucunda birçoğu

karsinogenik, mutajenik olan benzo(a)piren, aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunu arttırarak reaktif ara ürünlerin oluşumunu arttırabilir. Bunun sonucunda o-kumarik asidi diyetle alan kişilerde karaciğeri ve diğer bazı organlarında toksisite, mutajenez ve kanser riski artabilir. Bunların yanı sıra, bu çalışma ile CYP1A2'nin o-kumarik asit sonucunda nasıl regüle edildiği hakkında da bilgiler elde edilmiştir. Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) CYP1A ailesi dahil birçok genin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinden sorumlu reseptördür. Bu yüzden, CYP1A2 mRNA seviyelerinde o-kumarik asit sonucunda meydana gelen artış AhR reseptörünün artışından dolayı olabilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ilk defa CYP2E1'in o-kumarik asit uygulanması sonucunda insan karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) arttığını açıkça göstermektedir (Şekil 3.33). P450E1 birçok düşük moleküler ağırlıklı toksik kimyasalın metabolizmasında rol aldığından son yıllarda çok önem kazanmış bir sitokrom P450 izoformudur. Bu izoformun benzen, karbon tetraklorür, ve nitrozaminler gibi birçok ksenobiyotiği elektrofilik, mutajenik ve tümör oluşumuna neden olan metabolitlere dönüştürdüğü bilinmektedir (Yoo, 1988; Guengerich, 1991; Melhman, 1991; Nakajima, 1992; Yamazaki, 1992). o-Kumarik asid'in kullanımı sonucunda CYP2E1'i artırması bu kimyasalın kendi metabolik aktivasyonunun yanı sıra benzen, nitrozaminler, p-nitrofenol, piridin vb. toksik kimyasallarında metabolik aktivasyonunu artırabilir. Bunun sonucunda bu fenolik asidi diyetle alan kişilerde CYP2E1 tarafından metabolize edilen bu kimyasallardan kaynaklı kanser oluşma ve hepatotoksisite riski artabilir. Ayrıca, diğer sitokrom P450 izozimleri ile karşılaştırıldığında, CYP2E1'in regülasyonu çok daha karmaşık olup, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel olaylar ile polimorfizm bu enzimin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Song, 1995). o-Kumarik asit uygulaması sonucunda artan CYP2E1 mRNA seviyesi mRNA sentezinin artışından (transkripsiyonel) ya da mRNA stabilizasyonundan (post-transkripsiyonel) dolayı olması muhtemeldir. Bu iki mekanizmada CYP2E1 regülasyonunda rol oynamaktadır.

CYP2E1 ve CYP1A2 izozimlerinin yanı sıra, o-kumarik asidin CYP3A4 protein ve mRNA seviyelerine olan etkisi HepG2 hücre hattında belirlenmiştir (Şekil 3.34). Bu çalışma, o-kumarik asidin CYP3A4'e olan etkisinin belirlendiği literatürdeki ilk çalışmadır. Karaciğerde ve ince bağırsakta en fazla bulunan izozim olduğundan ve çok çeşitli ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol aldığından dolayı, CYP3A4 önemli

bir P450 izoformudur. Bu protein, antibiyotikler, yatıştırıcılar, kalsiyum kanal blokörleri, HMG KoA redüktaz inhibitörleri AIDS ilaçları ve analjezikler gibi piyasadaki ilaçların %50'sinden fazlasını metabolize eder (Martin, 2003; Arayne, 2005; Van Herwaarden, 2005; Sica, 2006; Sugimoto, 2006; De Wildt, 2007; Klotz, 2007). *o*-Kumarik asit uygulanması sonucunda CYP3A4 protein ve mRNA seviyesi anlamlı şekilde azalmıştır. Bu yüzden, *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda CYP3A4'ün değişmesi ilaç metabolizmasında bozukluklara ve klinik ilaç toksisitesine neden olabilir. Ayrıca, Pregnane X reseptörü (PXR) CYP3A4'ün gen ekspresyonunun regülasyonunu düzenleyen anahtar moleküldür (Waxman, 1999). *o*-Kumarik asit uygulanması sonucunda PXR miktarında azalış, CYP3A4'ün mRNA seviyesindeki azalışa neden olabilir.

Tüm bu Sitokrom P450 izozimlerin yanı sıra, CYP2C9'un protein ve mRNA seviyelerinin *o*-kumarik asit sonucunda nasıl değiştiği HepG2 hücre hattında belirlenmiştir (Şekil 3.35). CYP2C9 kanser ilaçları, antibiyotik gibi piyasadaki ilaçların %20'sinden fazlasını metabolize eden bir izozimdir (DeLisle ve ark., 2011). *o*-Kumarik asit uygulanması sonucunda CYP2C9'un protein ve mRNA seviyesi anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 3.35). Bu yüzden, *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda CYP2C9'un değişmesi ilaç metabolizmasında bozukluklara ve klinik ilaç toksisitesine neden olabilir.

Tüm bu sonuçlar, *o*-kumarik asit, kanser oluşumunu ve gelişimini birçok noktadan engelleyerek antikarsinojenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat kimyasal karsinogenizde rol alan CYP1A2 ve CYP2E1 gibi proteinlerin *o*-kumarik asit uygulaması sonucunda indüklenmesi, kullanımdan önce bir doz ayarlanması yapılması gerçeğininde ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada o-kumarik asidin apoptoz yolağını, hücre döngüsü ve tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonlarını değiştirdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, ilaçlar ve karsinojenler gibi birçok ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alan P450 izozimlerinden CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9 ve CYP3A4 olan etkisi belirlenmiştir. o-kumarik asit, kanser oluşumunu ve gelişimini birçok noktadan engelleyerek antikarsinojenik etki gösterdiği saptanmıştır. Fakat, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9 ve CYP3A4 gibi proteinlerin o-kumarik asit uygulaması sonucunda değişmesi birçok önemli problemi de yanında getirebileceği gerçeğini ortaya çıkarmaktadır. o-kumarik asidin ilaçları ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında önemli rol oynayan bu enzimlerin üzerine etkisi göz önünde bulundurulduğunda bu maddenin alımının düzenlenmesi önem arz etmektedir. Bu sayede o-kumarik asidin insanlarda sebep olabileceği organ toksisitesi, mutajenite ve karsinojenite, ilaç metabolizmasında bozukluklar ve klinik ilaç toksisitesi engellenebilir.

KAYNAKLAR

- ADALI, O., AbuBaker, T., Arınç, E. (1996). Immunological and sub-structural characterization of sheep lung microsomal cytochrome P450LgM2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 363-372.
- ADAMSON RH, Thorgeirsson UP, Sugimura T: Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. *Arch Toxicol Suppl* 1996; 18: 303-318.
- ADOM , K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182–6187.
- AGGARWAL, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seram, N.P., Shishodia, S. And Takada, Y., (2004), Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, 24, 3-60 p.
- ALBERTS B, Alexander J., Jelina L., Martin R., Keith R. and Peter W. (2002) *The Cell, Garland Serunce Pub.*, New York, 34 chapter: 7s.
- APOPTOLIDES, Z., Balentine, D.A., Harbowy, M.E., Hara, Y., Weisburger, J.H. (1997) Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters. *Mutat. Res.* 389:167-172.
- ARINÇ, E., Adalı, O., İşcan, M., Güray, T. (1991). Stimulatory effects of benzene on rabbit liver and kidney microsomal cytochrome P-450 dependent drug metabolizing enzymes. *Arch of Toxicol.* 65: 186-190
- ARINÇ, E., Adalı, O., Gençler-Özkan, A.M. (2000). Induction of N-nitrosodimethylamine metabolism in liver and lung by *in vivo* pyridine treatment of rabbits. *Arch of Toxicol.* 74: 329-334.
- ARINÇ, E., Arslan, Ş., Bozcaarmutlu, A., Adalı O. (2007). Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem Toxicol.* 45: 107-118.

- ASANOMA, M., Takahashi, K., Miyabe, M., Yamamoto, K., Yoshimi, N., Mori, H., & Kawazoe, Y. (1994). Inhibitory effect of topical application of polymerized ferulic acid, a synthetic lignin, on tumor promotion in mouse skin two-stage tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 15, 2069–2071.
- AYAN A. K., Çalışkan Ö., Çırak C Isırganotu (*Urtica spp*)’nun Ekonomik Önemi ve Tarımı OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006,21(3): 357-363
- BALAKRİSHNAN S., Manoharan S., Alias L. M, Nirmal M. R (2010). Effect of curcumin and ferulic acid on modulation of expression pattern of p53 and bcl-2 proteins in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Indian J Biochem Biophys.* 47(1):7-12.
- BALASUBASHINI, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 18, 310–314.
- BLUMENTHAL, M. (1999). Herb market levels after .five years of boom, *Herbal Gram.* 47: 64-65.
- BRAY, B.J., Perry, N.B., Menkes, D.B., Rosengren, R.J. (2002). St. John's Wort Extract Induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster Mouse. *Toxicol. Sci.* 66: 27-33.
- BROVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritionalsignificance. *Nutrition Review*, 56(11), 317–333.
- CABADAK H.(2008) Hücre Siklusu ve Kanser Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*; 9(3) : 51 – 6.
- CATTERALL, F., McArdle, N.J., Mitchell, L., Papayanni, A., Clifford, M.N., Ioannides, C. (2003). Hepatic and intestinal cytochrome P450 and conjugase activities in rats treated with black tea theafulvins and theaflavins. *Food Chem. Toxicol.* 41:1141-1147.
- CHAN, H.Y., Chen, Z.Y., Tsang, D.S., Leung, L.K. (2002). Baicalein inhibits DMBA-DNA adduct formation by modulating CYP1A1 and CYP1B1 activities. *Biomed. Pharmacother.* 56: 269-275.

- CHANG WC, Hsieh CH, Hsiao MW, Lin WC, Hung YC, Ye JC. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2010 Dec;49(4):419-24.
- CHEN CJ, Hsu MH, Kuo SC, Lai YY, Chung JG, Huang LJ (2007). (2E)-N,N-dibutyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide induces apoptosis and cell cycle arrest in HL-60 cells. *Anticancer Res.* Jan-Feb;27(1A):343-9.
- CHIPUK JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 12;37(3):299-310.
- CHRISTOPHORIDOU S, Dais P. (2009) Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chim Acta.* Feb 9;633(2):283-92. Epub 2008 Nov 27.
- CHUANG JY, Tsai YY, Chen SC, Hsieh TJ, Chung JG (2005). Induction of G0/G1 arrest and apoptosis by 3-hydroxycinnamic acid in human cervix epithelial carcinoma (HeLa) cells. ;19(4):683-8
- CIOLINO, H.P., Wang, T.T., Yeh, G.C. (1998). Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* 58: 2754-2760.
- CIOLINO, H.P., Yeh, G.C. (1999). The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br. J. Cancer.* 79: 1340-1346.
- CLIFFORD, M. N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.* 79: 362–372.
- COHEN, G. M., (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16
- CONNAY, A.H. (2003). Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 1-30.

- COOPER, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science*. 22: 400-402.
- DI MAURO, A., Passerinis, A., Rapisarda, P., Maccarone, E., (2002). Distribution of Hydroxycinnamic Acids as a Criterion to Evaluate Variety and Geographical Origin of Italian Orange Juices. *Ital. J. Food Sci.* n. 3, vol. 14. 301–322.
- EKMEKÇİ A, Konaç E, Önen H. İ. (2009) Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık *Marmara Medical Journal*;21(3);282-295
- FESEN MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol.* ;48(3):595-608.
- FRANKE T. F., Hornik C. P., Segev L., Shostak G. A. and Sugimoto C. (2003) PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters. *Oncogene*, 22:8983–8998
- GARCIA-SAEZ AJ, Fuertes G, Suckale J, Salgado J (2010). Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Adv Exp Med Biol.*;677:91-105.
- GIULIANO AR, Gapstur S (1998). Can cervical dysplasia and cancer be prevented with nutrients? *Nutr Rev.* 56(1):9-16.
- GIUSTI, M.M. and Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* 14; 217-225.
- GORINSTEIN S, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Drzewiecki J, Cvikrová M, Martincová O, Katrich E, Trakhtenberg S. (2008) Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *J Agric Food Chem.*;56(12):4418-26.
- GÖKTÜRK B., N.,(2006). Organic Acids, Tocopherols and Phenolic Compositions of Some Turkish Grape Cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 2, 156–159.
- GRAF, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* 13: 436–448.

- GROSS A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13: 1899–1911
- GRUENWALD J, Brendler T, Jaeniche C, Fleming T (2000). PDR For Herbal Medicines. 2. Baskı. Montvale: Thomsan Medical;
- GRUENWALD, J. (2000). The supplement markets in the US and Europe, *Neutrachem. World (July/August)*, 36-37.
- GUENGERICH FP, Kim DH, Iwasaki M: Role of human cytochrome P450 IIEI in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 168-179.
- GÜVENÇ A., (1997) Asparagus L. Türlerinin Taşıdığı Etken Bileşikler ve Kullanılışları, *J. Fac. Pharm. Ankara* 26(1) 52-75, 1997
- HENDERSON, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R. (2000). In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*. 30: 35-251.
- HSU C.-L. and YEN G.-C (2007). Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes *J. Agric. Food Chem.*, 55, 8404–8410
- HSU CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC (2009) Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J Agric Food Chem.* ;57(2):425-31.
- HSU C-L, Yen G-C (2007) Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 52: 53–61
- HUDSON EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(11):1163-70.PMID:11097223

HUMMERICH J, Zohm C, Pfau W: Modulation of cytochrome P450 1A1 by foodderived heterocyclic aromatic amines. Toxicology 2004; 199: 231-240.

İŞLEROĞLU H., Yıldırım Z., Yıldırım M. (2005) Fonksiyonel Bir Gıda Olarak Keten Tohumu GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 22 (2), 23-30

JAMES, M.O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., Celander, M.C. (2005). Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. Aquat Toxicol. 72: 361-371.

JEFCOATE, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. (2000). Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 95-112.

JOHNSON AA, Marchand C, Pommery Y (2004) HIV-1 integrase inhibitors a decade of research and two drugs in clinical trial. Curr Top Med Chem 4(10):1059-1065

KAMPA M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action, Breast Cancer Res. 6 (2004) R63–R74.

KAN T. Saim Bostan Z. (2010) Malatya’da Yetiştirilen Kayısıların (*Prunus armeniaca* L.) Bazı Fenolik Madde İçeriklerinin BAHÇE 39 (1): 21 – 29

KANG S, Park SY, Lee HJ, Yoo YH. TRAIL (2010) upregulates decoy receptor 1 and mediates resistance to apoptosis in insulin-secreting INS-1 cells. Biochem Biophys Res Commun.;396(3):731-5.

KARADENİZ, F. ve Ekşi, A. (2001). Elma Suyunda Fenolik Madde Dağılımı Üzerinde Araştırma. Tarım Bilimleri Dergisi 2001, 7 (3): s. 135-141.

KHANDUJA K. L., Avti P. K., Kumar S., Mittal N, Sohi K. K., Pathak C. M. (2006) Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism Biochimica et Biophysica Acta 1760 283–289

- KIM D, Guengerich FP: Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 27-49.
- KING A, Young G.Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc.* 1999 Feb;99(2):213-8.
- KUANG X, Du JR, Chen YS, Wang J, Wang YN. (2009) Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains. *Pharmacol Biochem Behav.* Jun;92(4):635-41
- KYSE-ANDERSON, J. (1984) Electrophotting of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 10: 203-209
- LAEMMLI UK: (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- LAMKAMFIL, M., Festjens, N., Declerc, W., Bergh, T., Vandenabeele, P., (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiatiton* 14: 44-55.
- MA Q, Lu AY: CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1009-1016.
- MCLEMORE, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., et al. (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1333-1339.
- MACHALA, M., Kubinova, R., Horavova, P., Suchy, V. (2001). Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of *Dracaena cinnabari*:

modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. *Phytother. Res.* 15: 114-118.

MACHODA-SILVA A, Perrier S, Bourdon JC. (2010) p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2010 Feb;20(1):57-62.

MAURYA DK, Devasagayam TP (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol.* (Epub ahead of print) PubMed PMID: 20837085

MCLEMORE, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., Eggleston, J.C., Boyd, M.R., Hines, R.N. (1990). Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1333-1339.

MCPHIE D L, Coopersmith R, Peralta A H, Chen Y, Ivins K J, Manly S P, Kozlowski M R, Neve K A, Neve R L (2003): DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 23 (17): 6914–6927.

MEHLMAN MA: Dangerous properties of petroleum refining products: benzenehealth effects. *Ramazzini Newsletter*,1991; 3: 16-20.

MORSE MA, Stoner GD (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects.*Carcinogenesis.*;14(9):1737-46.

MORTON, L. W.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Byrne, L. (2000) Phenolic acids protect low-density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification *in Vitro*. *Redox Rep.*, 5, 124-125.

NAKAJIMA T, Wang RS, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Vainio H: A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of

benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 251-257.

NAKAJIMA Y, Nishida H, Nakamura Y, Konishi T (2009). Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells by 3,4-dihydroxybenzalacetone isolated from Chaga (*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat). *Free Radic Biol Med.*;47(8):1154-61.

NESTLE M (1998). Broccoli sprouts in cancer prevention. *Nutr Rev.*;56(4 Pt 1):127-30.

NESTLE M.J (1992) Dietary recommendations for cancer prevention: publicpolicyimplementation. *Natl Cancer Inst Monogr.*;(12):153-7.

NYSTROM L, Mäkinen M, Lampi AM, Piironen V Antioxidant activity of steryl ferulate extracts from rye and wheat bran *J Agric Food Chem.* 2005 Apr 6;53(7):2503-10.

OBACH, R.S. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 88-95.

ORELLANA, M., Guajardo, V., Araya, L., Rodrigo, T. (2001). Oxidative stress, microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in the liver of rats treated with acetone. *Comp. Biochem. Physiol.* 128: 503-509.

OWEN RW, Mier W, Giacosa A, Hull W, Spiegelhalder B, Bartsch H. (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Tox*

OYAGBEMI AA, Saba AB, Azeez OI. Molecular targets of [6]-gingerol: Its potential roles in cancer chemoprevention. *Biofactors.* 2010 May-Jun;36(3):169-78.

OZKARSLI M., Sevim H., Şen A. (2008). In vivo effects of *Urtica urens* on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats. *Xenobiotica.* 38: 48-61.

- ÖZKAN G., 1999. Şaraplarda fenolik asitler, prosiyanidiler ve flavanonların tayini için HPLC metodları. *Gıda*, 24(1), 47-51
- PAPPAS E. and Schaich K. M. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:741–781 (2009)
- PARK EH, Kahng JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res* 1999;22:554
- POP C, Salvesen GS. J (2009) *Biol Chem*. Human caspases: activation, specificity, and regulation;284(33):21777-81.
- PRADELLI LA, Bénéteau M, Ricci JE. (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2010 67(10):1589-97. Epub Feb 12.
- PRASAD N. R.; Karthikeyan A. S. Karthikeyan R., Venkata B. (2010) Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line *Mol Cell Biochem* DOI 10.1007/s11010-010-0655-7
- REN N., Kaplan R., Hernandez M., Cheng K., Jin L., Andrew K.P. T., Zhu A. Y., Gan X., Wright S. D., and Quan T.- Cai Phenolic acids suppress adipocyte lipolysis via activation of the nicotinic acid receptor *J Lipid Res.*; 50(5): 908
- ROBBINS RJ. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 51(10):2866–2887.
- SEMİZ A., Şen A. (2007). Antioxidant and chemoprotective properties of *Momordica charantia* L. (bitter melon) fruit extract. *African Journal of Biotechnology*. 6: 273-277.
- SENDEROWICZ, A.M., (2004), *Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies*, *Curr Opin Cell Biol*, 16, 670-678.
- SHIN EM, Kim S, Merfort I, Kim YS. Glycyrol Induces Apoptosis in Human Jurkat T Cell Lymphocytes via the Fas-FasL/Caspase-8 Pathway. *Planta Med*

- SHUKLA, Y., Taneja, P. (2002). Anticarcinogenic effect of black tea on pulmonary tumors in Swiss albino mice. *Cancer Lett.* 176: 137-141.
- SIVARAMAN, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L. (1994). CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54: 3692-3695.
- SMITH, T.J., Guo, Z., Guengerich, F.P., Yang, C.S. (1996). Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis.* 17: 809-813.
- STRATTON, M., Campbell, P., Futreal, A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458: 719–724.
- ŞEN, A., Arınç, E. (2000). Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver (*Liza saliens*) microsomes. *Comp. Biochem. Physiol.* 126C: 235-244.
- ŞEN, A., Hu, C.-H., Urbach, E., Wang-Buhler, J-L., Yang, Y-H., Arınç, E., Buhler, D. R. (2001). Cloning, sequencing and characterization of CYP1A1 cDNA from leaping mullet (*Liza saliens*) liver and implications for the potential functions of its conserved amino acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 243-255
- THOMAS, K.J., Nicholl, J.P., Coleman, P., (2001). Use and expenditure on complementary medicine in England; a population based survey. *Complementary Therapies in Medicine.* 9: 2-11.
- TOVEY, E. R., and Baldo, B. A. (1987) Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis.*, 8: 384-387
- WANG C, Youle RJ. .(2009) The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*;43:95-118.
- WANG WJ, Sun AN, Guo F (2010). Noncanonical NF-kappaB pathway and hematological malignancies. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 18(4):1069-73.

- WANG, H., Wang, Y., Chen, Z.Y., Chan, F.L., Leung, L.K. (2005). Hydroxychalcones exhibit differential effects on XRE transactivation. *Toxicology*. 207: 303-313.
- WEN, X., Walle, U.K., Walle, T. (2005). 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo[a]pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. *Carcinogenesis*. 26: 803-809.
- XU, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D., (2007). Effect of Heat Treatment on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 330-335.
- YAMAORI, S., Yamazaki, H., Iwano, S., Kiyotani, K., Matsumura, K., Honda, G., Nakagawa, K., Ishizaki, T., Kamataki, T. (2004). CYP3A5 contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*. 19: 120-129.
- YAMAZAKI H, Oda Y, Funae Y, Imaoka S, Inui Y, Guengerich FP Shimada T: Participation of rat liver cytochrome P450E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase overexpressing Salmonella typhimurium strain. *Carcinogenesis* 1992; 13: 979-985.
- YAO, L., Jing, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Ramont, K., Lisle, A. ve Xu, Y., (2004). HPLC Analyses of Flavonols and Phenolic Acids in the Fresh Young Shoots of Tea (*Camellia sinensis*) Grown in Australia. *Food Chemistry*, 84 (2): s. 253-263.
- YEH CT, Huang SM, Yen GC (2005). Induction of phenolsulfotransferase expression by phenolic acids in human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric Food Chem*. ;53(12):4766-73.
- YOO JS, Guengerich FP, Yang CS: Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res* 1988; 88: 1499-1504.

ZHANG T, Mi Z, Schor NF. (2009) Role of tyrosine phosphorylation in the antioxidant effects of the p75 neurotrophin receptor. *Oxid Med Cell Longev.* Sep-Oct;2(4):238-46.

ZHOU, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A., Paxton, J.W. (2003). Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab. Rev.* 35: 35-98.

ZHOU, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sciences.* 74: 935-968.

TÜBİTAK**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 111T011
Proje Başlığı: o-Kumarik Asit'in (Trans 2-Hidroksisinnamik Asit) Apoptoz ve Karsinojen Yolakları ile Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde Aydınlatılması.
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Kınıklı Kampüsü 20020, Kınıklı/DENİZLİ
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Atatürk Bulvarı No: 221 06100 Kavaklıdere/ ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1/06/2011 - 1/06/2012
<p>Özet: Günümüzde birçok insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin giderilmesi ve çeşitli hastalık etmenlerine karşı koruyucu ajanlar olarak bitkisel preparatları ya da normal diyetlerin bileşenleri olan fitokimyasalları sıklıkla tüketmektedirler. Bu çalışma insanların diyetle birlikte sıklıkla aldıkları ve geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitkilerin yapısında yaygın bir şekilde bulunan o-kumarik asitin anti-karsinojenik, apoptotik etkilerinin etki mekanizmaları ile olası diyet-ilaç potansiyelinin belirlenmesini kapsamaktadır. Bu amaçla, o-kumarik asit insan meme kanseri hücre hattına (MCF 7), insan karaciğer kanseri hücre hattına (HepG2) ve insan fibroblast hücre hattında (3T3) uygulandı ve sitotoksik etkileri ve etkin dozları saptandı. Anti-karsinojenik etki mekanizmalarında rol oynayan hücre döngüsü düzenleyici genler (siklin2, CDK4, p21 ve p16) ile onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin (pRb, p53, PTEN) ekspresyon düzeyleri tespit (mRNA ve protein düzeyleri) edilerek transkripsiyonel ve translasyonel etki mekanizmaları tanımlandı. Ayrıca apoptoz yolaklarında çalışan Bcl-2, bax, Kaspaz 3 ve 9, ve APAF-1 gibi proteinlerin gen ekspresyon ve protein düzeyleri tespit edildi. Tüm bunlara ek olarak, ilaç ve prokarsinojen/karsinojen metabolizmasında önem arz eden spesifik sitokrom P450 izozimlerinin gen ekspresyon ve protein düzeyleri üzerine etkileri belirlendi.</p> <p>Sitotoksikite sonuçlarına göre, LD50 değerleri, MCF-7 HepG2 ve 3T3 hücreleri için sırasıyla 7,39 mM, 4,95 mM ve 7,96 mM olarak hesaplanmıştır. 3T3 hücrelerine MCF-7 ile karşılaştırma yapabilmek için MCF-7 hücrelerine uygulanan 4,95 mM o-kumarik asit dozu uygulandı. o-kumarik asit apoptoz yolağında görev alan Kaspaz 3 ve bax proteinlerinin mRNA ve protein seviyelerini artırırken (1.59-2.52-kat, p<0.05), bu proteinlerin seviyeleri T3 hattında istatistiksel olarak anlamlı değişmemiştir. MCF-7 hücre hattında Bcl-2'in mRNA ve protein seviyesi sırasıyla 35% ve 48% azalmıştır (p<0.05). 3T3 hücre hattında ise bcl-2'nin protein ve mRNA seviyesi yaklaşık 1.25-kat artmasına rağmen bu artış anlamlı bulunmamıştır. Apoptoz yolağında görev alan Apaf-1 ve kaspaz 9 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri 2 hücre hattında da değişmemiştir. O-kumarik uygulaması sonucunda hücre döngüsünde görev alan siklin D1, D2 ve siklin bağımlı kinaz 2'nin protein ve mRNA seviyeleri her iki hücre hattında da azalış göstermektedir (10-65%). O-kumarik asit tümör baskılayıcı proteinlerden olan p53 ve PTEN'in mRNA ve protein seviyesini her iki hücre hattında artmasına neden olmuştur (1.55-3.43-kat, p<0.05). Retinblastomanın (Rb) mRNA ve protein seviyesinde anlamlı değişimlere yol açmamıştır. Tüm bunlara ek olarak, o-kumarik asit HepG2 hücre hattında CYP1A2, CYP2E1 ve CYP2C9'un mRNA ve protein seviyelerinin artmasına sebep olmuştur (1.4-5.24-kat, p<0.05). CYP3A4'ün mRNA ve protein seviyesi ise azalmıştır (52 % ve 60%, p<0.05).</p> <p>Tüm bu sonuçlar, o-kumarik asit, kanser oluşumunu ve gelişimini birçok noktadan engelleyerek antikarsinojenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat, kimyasal karsinogenizde rol alan CYP1A2 ve CYP2E1 gibi proteinlerin o-kumarik asit uygulaması sonucunda indüklenmesi, kullanımdan önce bir doz ayarlanması yapılması gerçeğinin de ortaya koymaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler: : o-kumarik asit, anti-karsinojen etki, apoptotik etki, Sitokrom P450 izozimleri, fitokimyasal-ilaç etkileşimleri, moleküler mekanizma