



ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KUMARİK ASİTİN OVARYAN KANSER HÜCRESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ

SEDA ÖZKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DİLEK BURUKOĞLU DÖNMEZ

ESKİŞEHİR

2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyuncaengin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Varol Şahintürk'e, tezimin hazırlanmasında benden desteğini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Dilek Burukoğlu Dönmez'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deney çalışmamın her döneminde çalışmaları birlikte yürüttüğümüz, bana araştırma olanağı sağlayan Arş. Gör. Dr. Sedat Kaçar'a, desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Erhan Şahin'e ve her zaman her konuda yanımda olan teknisyen Huri Çınar'a çok teşekkür ederim.

Seda ÖZKAN

ÖZET

KUMARİK ASİTİN OVARYAN KANSER HÜCRESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Amaç: Serbest radikaller ve antioksidanlarla ilgili yapılan çalışmaların önemi her geçen gün daha fazla artmaktadır. Normal şartlarda canlı metabolizmasında serbest radikaller devamlı olarak üretilmektedir ve bu durum antioksidanlarla denge halindedir. Ancak bazı durumlarda bu denge serbest radikaller lehine değişir. Böyle durumlarda organizma serbest radikallerin vücutta meydana getirdiği hasara karşı savunma yapabilmek için antioksidanlara ihtiyaç duyar. Antioksidanların en önemli özelliklerinden biri serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi önlemektir. Son yıllarda antioksidan etkileri bakımından fenolik bileşikler dikkat çekmektedir. Bu çalışmada kullandığımız kumarik asit bir hidrokisinsamik asit türevi olan fenolik bileşiklerdendir. Yapılan bu tez çalışmamızda kumarik asitin ovaryan kanser hücreleri üzerindeki etkilerini inceledik.

Yöntem: Hücre kültürü çalışmamızda OVCAR-3 hücre hattı kullanıldı. RPMI (Roswell Park Memorial Institute) besiyerlerinin içine %10 FBS ve %1 penisilin streptomisin eklenerek OVCAR-3 hücreleri çoğaltıldı. Değişen dozlarda kumarik asit uygulaması sonrası kumarik asitin hücreler üzerine etkileri, sitotoksikite testleri (MTT, Nötral red), inverted mikroskop incelemeleri (Hematoksilen Eozin boyama, immunohistokimyasal boyama) ve yara iyileşmesi testi ile araştırıldı.

Bulgular: Yaptığımız deneylerde kumarik asitin artan dozlarında hücre canlılığının azaldığı, çekirdek ve sitoplazma morfolojisinin bozulduğu, hücre migrasyonunun yavaşladığı, apoptotik yollarda görev alan proteinlerin ifadesinin arttığı tespit edildi.

Sonuç: Sonuç olarak kumarik asitin over kanseri hücre serileri olan OVCAR-3 hücrelerinde sitotoksik ve antimigratuar etkilerini ortaya koymuş olup, tümör hücrelerinde apoptozisi arttırdığını gözlemledik.

Anahtar Sözcükler: Over kanseri, kumarik asit, anti-oksidan, hücre kültürü, serbest radikal, OVCAR-3

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından B tipi proje olarak 2020-11A108 kodu verilerek desteklenmiştir.

ABSTRACT

EFFECTS OF COUMARIC ACID ON OVARIAN CANCER CELL

Aim: The importance of studies on free radicals and antioxidants is increasing day by day. Under normal conditions, free radicals are constantly produced in living metabolism and are in balance with these antioxidants. However, in some cases, this balance shifts in favor of free radicals. In such cases, the organism needs antioxidants to defend against the damage caused by free radicals in the body. One of the most important properties of antioxidants is to prevent oxidative stress caused by free radicals. In recent years, phenolic compounds have attracted much attention in terms of antioxidant effects. The coumaric acid we used in the study is one of the phenolic compounds, a hydroxycinnamic acid derivative. In our experiments, we examined the effects of coumaric acid on ovarian cancer cells.

Method: We used the OVCAR-3 cell line in our cell culture study. OVCAR-3 cells were grown in the medium obtained by adding 10% FBS and 1% penicillin streptomycin into RPMI (Roswell Park Memorial Institute) media. We investigated the effect on cells after application of varying doses of coumaric acid by cytotoxicity tests (MTT, Neutral red), inverted microscope examinations (Hematoxylin-Eosin staining, immunohistochemical staining), and wound healing test.

Results: In our experiments, it was determined that increasing doses of coumaric acid decreased cell viability, deteriorated the morphology of the nucleus and cytoplasm, slowed down cell migration, and increased the expression of proteins involved in apoptotic pathways.

Conclusion: As a result, we observed that coumaric acid showed cytotoxic and antimigratory effects in OVCAR-3 cells, which are ovarian cancer cell lines, and increased apoptosis in tumor cells.

Keywords: Ovarian cancer, coumaric acid, anti-oxidant, cell culture, free radical, OVCAR-3

Supporting Institutions: This study was supported by ESOGU Scientific Research Projects Commission as a B type project with the code of 2020-11A108.

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.2. Serbest Radikallerin Oluşumuna Neden Olan Faktörler.....	4
2.2.1. Endojen Faktörler.....	4
2.2.2. Eksojen Faktörler.....	5
2.3. Serbest Radikal Türleri.....	5
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	6
2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri.....	7
2.3.3. Reaktif Sülfür Türleri.....	7
2.4. Serbest Radikallere Bağlı Olarak Geliştiği Düşünülen Hastalıklar.....	7
2.5. Kanser.....	8
2.5.1. Over Kanseri.....	9
2.5.2. Over Kanseri Risk Faktörleri.....	10
2.6. OVCAR-3.....	11
2.7. Antioksidanlar.....	12
2.7.1. Antioksidan Çeşitleri.....	14
2.7.1.1. Polifenolik Bileşikler.....	16
i. Flavonoidler.....	19
ii. Fenolik Asitler.....	20
a) Hidroksibenzoik Asitler.....	25
b) Hidroksisinamik Asitler.....	25
b.1. Kumarik asit.....	26

3.GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Hücre Hattı ve Kullanılan Besi yeri.....	29
3.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması.....	29
3.3. Hücre Sayımı.....	30
3.4. MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) Testi.....	30
3.5. Nötral Kırmızısı Yöntemi.....	31
3.6.İnverted Mikroskop İncelemesi.....	31
3.7.Hematoksilen-Eozin İncelemesi.....	31
3.8.Migrasyon (Yara İyileşme) Testi.....	32
3.9.Caspase 9 İmmünohistokimya.....	32
3.10. İstatiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. Sitotoksite Sonuçları.....	33
4.1.1. MTT Sonuçları.....	33
4.1.2. Nötral Kırmızısı Sonuçları.....	34
4.2. İnverted Mikroskop Sonuçları.....	36
4.3. Hematoksilen Boyama Sonuçları.....	36
4.4. Migrasyon Deneyi Sonuçları.....	38
4.5. Caspase 9 İmmunohistokimya Sonuçları.....	39
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	46
8.EK	58
8.1. EK 1 -Etik Kurul Kararı	58
9.ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGE VE KISALTMALAR

g :	Gram
L :	Litre
mL :	Mililitre
μL :	Mikrolitre
μM :	Mikromolar
BHA :	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT :	Bütillenmiş hidroksitoluen
BRCA :	Breast Cancer Susceptibility (Göğüs Kanseri Duyarlılık)
CAC :	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
Caco-2 :	Kolon Epitel Hücreleri
DFO :	Deferoksamin
DNA :	Deoksiribonükleik asid
DPPH :	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA :	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS :	Fetal Bovine Serum
GA :	Gallik asit
GPx :	Glutasyon peroksidaz
GR :	Glutasyon redüktaz
Grp :	Glucose Regulated Protein
GSH :	Glutasyon
GST :	Glutasyon-S-Transferaz
LDL :	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MTT :	(3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) Testi
NADPH :	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NICEATM :	The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
PBS :	Phosphate Buffered Saline
RNT :	Reaktif nitrojen türleri
ROT :	Reaktif oksijen türleri
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
RST :	Reaktif sülfür türleri
SOD :	Süperoksit dismutaz

TBHQ : Tertiary butylhydroquinone
UV : Ultraviyole
XO : Ksantin Oksidaz

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	4
Şekil 2.2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	17
Şekil 2.3. Polifenollerin faydalı etkileri.....	18
Şekil 2.4. Temel flavonoid yapısı.....	18
Şekil 2.5. Flavonoidlere ait olan gruplar ve bu gruba dahil olan bazı moleküller.....	19
Şekil 2.6. Fenolik asitlerin genel yapısı.....	20
Şekil 2.7. Fenoliklerin biyosentezi.....	22
Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitlerin molekül yapısı.....	25
Şekil 2.9. Hidroksisünamik asitlerin molekül yapısı.....	25
Şekil 2.10. Bazı hidroksisünamik asit yapıları.....	26
Şekil 2.11. Kumarik asit ve izomerleri.....	27
Şekil 3.1. Çeşitli dozlarda kumarik asit uygulanan OVCAR-3 hücrelerinin MTT sonuçları.....	34
Şekil 3.2. Çeşitli dozlarda kumarik asit uygulanan OVCAR-3 hücrelerinin nötral red sonuçları.....	35
Şekil 3.3. A. Kontrol grubu inverted mikroskop görüntüsü, B. 1250 µM dozunda kumarik asit uygulanan hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü, C. 2500 µM dozunda kumarik asit uygulanan hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü.....	36
Şekil 3.4. Kontrol grubunun hemotoksilen eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri.....	37
Şekil 3.5. 1250 µM kumarik asit uygulanan hücre grubunun hemotoksilen eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri.....	37

Şekil 3.6. 2500 µM kumarik asit uygulanan hücre grubunun hemotoksilen eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri.....	38
Şekil 3.7. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (Kontrol).....	38
Şekil 3.8. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (1250 µM kumarik asit uygulaması sonrası).....	39
Şekil 3.9. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (2500 µM kumarik asit uygulaması sonrası).....	39
Şekil 3.10. Kontrol grubuna ait immünhistokimya boyamaları.....	40
Şekil 3.11. 1250 µM kumarik asit uygulanan hücrelerin caspase 9 immünhistokimya boyamaları.....	40
Şekil 3.12. 2500 µM kumarik asit uygulanan hücrelerin caspase 9 immünhistokimya boyamaları.....	41

TABLolar

Tablo 2.1. Çeşitli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türleri.....	6
Tablo 2.2. Bazı oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri.....	13
Tablo 3.1. MTT testi sonucuna göre farklı dozlarda kumarik asit uygulandıktan sonra hücre canlılık yüzdeleri (0-5000 µM).....	33
Tablo 3.2. Nötral kırmızısı testi sonucuna göre farklı dozlarda kumarik asit uygulandıktan sonra hücre canlılık yüzdeleri (0-5000 µM).....	35

1. GİRİŞ

Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle, sağlık alanında başarılı adımlar atılmış ve hastalıkların tedavisinde gözle görülebilir ilerlemeler yaşanmıştır. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki önemli gelişmeler, sağlık hizmetlerine verilen önemin artması, kaza ve akut hadiselerle hızlı müdahale olanağı, insan ömrünü uzatıp, erken yaşta ölümlerin azalmasını sağlamıştır. Bununla birlikte şehirleşme, sanayileşmenin her geçen gün artması, insanlardaki stres faktörünü arttırmıştır. Yaşanan tüm bu olayların sonucunda strese bağlı olarak çeşitli kronik hastalık vakaları artmıştır. Kronik hastalıklar arasında kanser, son dönemde dünyanın çok sayıda ülkesinde ve ülkemizde kalp hastalıklarına bağlı ölümlerden sonra, ölüm oranı en yüksek ikinci hastalık olarak yer almıştır (Kavradım ve Özer, 2014).

Son yıllarda tedavi yöntemlerindeki iyileşme ve ilerlemelere karşın ne hastalığın insidansında ne de ölüm oranlarında değişme olmamıştır. Kullanılan anti-kanser ilaçlarının ciddi yan etkilerinin olması ve sınırlı etki göstermesinin dışında maliyetleri de oldukça yüksektir. Bu sebeple yan etki oranı düşük, uygun maliyetli ve etkin farmakolojik ajanların belirlenmesi gerekmektedir (Shanmugam vd. 2015). Günümüzde kullanılan ilaçların yan etkileri ağır olabilmektedir. Bazı hastalar bu tedavi komplikasyonlarına bağlı kaybedilmektedir. Kanser tedavisi sürecinde, uygulanan doğal ürünlerle ilgili incelemeler gösteriyor ki bitkilerden elde edilen ürünlerin tedavi edici etkilerinde, toksisite ve yan etki yok denilecek kadar azdır (Zhang vd., 2019).

Canlıların yaşayabilmesi için oksijenin var olması gerektiği yadsınamaz bir gerçektir. Fakat oksijenin canlılar üzerinde etkisi çift yönlüdür. Canlıların üzerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) birçok hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir (Shahidi ve Nacz, 1995; Namiki, 1990). Son yıllarda yapılan araştırmalarla, reaktif oksijen türlerinin (ROT) dokuda sebep oldukları hasarlara, etki mekanizmalarına ve vücut savunma sistemleri üzerindeki etkilerine yoğunlaşmıştır. Bu radikallerin etyolojisinde rol aldığı bilinen fizyopatolojik durumların başında kanser, yaşlanma, diabet, karaciğer hastalıkları gelmektedir (De groot ve Noll 1986).

ROT çeşitleri canlıların metabolizması sırasında ortaya çıkan ürünler olup sağlıklı hücrelerde çeşitli enzimler vasıtasıyla ortadan kaldırılabilmektedir. Ancak çevresel faktörlere bağlı olarak (UV ışınlar, sigara, stress, toksinler, ağır metaller) bu radikallerin miktarı enzimler tarafından detoksifiye edilebilecek sınırların ötesinde

üretilebilmekte ve dokularda birikmektedir. Bu da organizmanın lipid, protein, karbonhidrat, DNA gibi yapısal bileşenlerine zarar vermektedir (Rice, 1991).

Antioksidanlar, vücutta serbest radikallerin sebep olduğu tahribatları engelleme kabiliyetine sahiptir. Serbest radikallerin bazı kimyasal veya fiziksel ajanlara maruz bırakılarak inaktive edilmesini sağlayan, oksidatif stresi var eden etmenleri erteleyen ya da engelleyen antioksidanlara talepte artış gözlenmektedir. Bu artışla birlikte yapılan çalışmalarda aynı oranda fazlalaşmıştır. Bu çalışmalarda bitkilerin birçoğunun antioksidan özelliklere sahip olduğu gözler önüne serilmiştir. Bitkilerin yapısında bulunan fenolik bileşikler, bitkilerin zararlı canlılardan korumanın yanı sıra insan sağlığı içinde vücutta antioksidan aktivitelerinden sorumludur. Fenolik bileşikler; antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikalleri hapsedip oksidatif stresle ilgili kanser gibi hastalıklardan korunmaya yardımcı olur (Bacanlı 2015).

Biyomedikal teknolojiler ile antioksidan ve serbest radikal temizleyici etkileri üzerine çok geniş kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı lipid oksidasyonunun antioksidanlarla önlenerek gıda bozulmasının önlenmesi ile ilgilidir. Bu da gıdaların uzun süre dayanması için önemlidir. Burada çeşitli sentetik antioksidanlar kullanılırken bunların insan vücudu üzerine etkileri konusunda endişeler vardır. Bu yüzden çalışmalar daha çok doğal antioksidanlara yönelmiştir (Harborne 94).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir ya da daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron bulunduran, kararsız yapıda olan, aktivasyon enerjisi düşük, ömürleri kısa olan atom ya da moleküllerdir (Koca ve Karadeniz, 2013). Atom, bir çekirdek, nötron, elektron ve protondan oluşmaktadır. Atomun çekirdeğinde bulunan pozitif yüklü protonlar, atomun etrafındaki negatif yüklü olan elektronların sayısını belirlemektedir. Elektronların kimyasal reaksiyona girmesiyle, atomlar birbirine bağlanır ve yeni moleküllerin oluşması sağlanır (Yurdakul, 2005).

Atomların dış orbitallerindeki elektron sayısı, onun kimyasal davranışını belirleyen en önemli kriterdir (Anonim, 2005c). Kararlı moleküllerin, en dış orbitallerinde kovalent bağ oluşumunu sağlayan ve zıt yönde dönen eşleşmiş iki elektron bulunmaktadır. Bunların dışında bir elektronu eşleşmemiş olan veya en dış orbitallerinde bir elektron içeren moleküller kararsız yapıdadırlar (Rice-Evans, 1991).

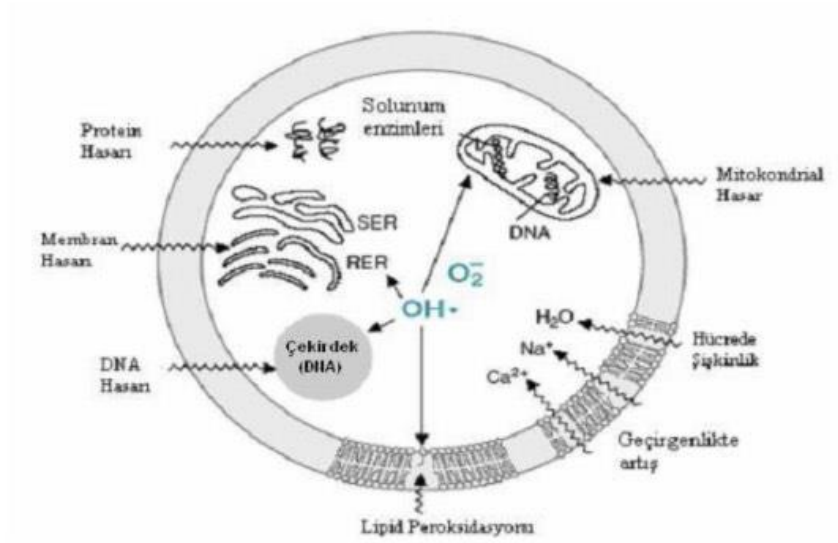
Kuantum kimyasına göre iki elektron bir bağ oluşturur ve bu bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır, ya da ikisi de ayrılır. Eğer bu ayrılan elektronların ikisi de aynı atomda kalırsa oluşan bu yapıya iyon, birisi bir atomda, diğeri diğer atomda kalır ise oluşan yapıya serbest radikal denir (Gümrükçüoğlu, 2005).

Serbest radikaller yağ asitleri, proteinler ve DNA gibi vücudun temel yapı taşları olan biyolojik moleküllerden hidrojen atomu alarak kararlı hale geçerken, hidrojen atomu kaybeden molekül ise kararsız hale geçer ve serbest radikal haline dönüşür. Bu durum ise zincirleme reaksiyona neden olur (Anonim, 2005a; 2005d; Bagchi ve Puri, 1998).

Yeniden kararlı durumuna gelmeye çalışan serbest radikaller bu süreçte vücut dokularına zarar vermektedir (Anonim, 2005a; 2005c; 2005d; Sherman, 1998).

Canlı organizmada serbest radikaller devamlı olarak üretilirler. Bu üretim antioksidan sistem tarafından kontrol altına alınarak denge oluşturulmaya çalışılır. Bazı hastalık durumlarında ise bu denge bozulabilir ve dengenin bozulması ile vücutta oksidatif stres olur. Organizmada oksidatif stresten etkilenen sistemler lipitler, nükleik asitler ve proteinlerdir. Bunların etkilenmesi sonucu diğer pek çok sistem de olumsuz

olarak etkilenir (Onat, 2002; Lambeth, 2004) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat, 2002; Lambeth, 2004).

2.2. Serbest Radikallerin Oluşumuna Neden Olan Faktörler

Organizmadaki serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir (Anonim, 2005d; Cadenas ve Packer, 2002; Sherman, 1998; Yurdakul, 2005).

2.2.1. Endojen (içsel) faktörler

- 1) Serbest radikaller ksantin, oksidaz, lipid peroksidasyonu ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilirler.
- 2) İltihaplanma durumunda sitokinler serbest bırakılır ve bunun sonucunda da nötrofiller ve makrofajlar serbest radikaller üretmeye başlar.
- 3) Düz kas hücreleri, arşidonik metabolizması ve plateletler tarafından serbest radikaller oluşabilir.
- 4) Vücutta oluşan stres, toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilir. Ayrıca kortizol ve katekolamin gibi hormonlar da vücutta stres reaksiyonlarına yol açar. Bu hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilirler.

- 5) Mitokondride oksijenli solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretebilirler.
- 6) İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak ROT ve oksidatif radikaller üretebilir.
- 7) Otooksidasyon reaksiyonları sırasında ksantin oksidaz (XO) ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerle endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından oluşabilir.

2.2.2. Eksojen faktörler

- 8) Karbonmonoksit, formaldehit, toluen, asbest, ozon ve benzen gibi hava kirleticiler,
- 9) Volkanik faaliyetler,
- 10) UV ışınları, gamma ışınları, mikrodalga ışınları, X-RAY
- 11) Alkol kullanımı, sigara kullanımı ve dumanı, egsoz dumanı
- 12) Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler,
- 13) Pişirme sırasında gerçekleşen organik maddelerin yakılması,
- 14) Çeşitli kimyasallar. Örnek olarak; temizlik ürünleri, tiner, boya, böcek ilaçları, parfümler ve tutkalı örnek olarak verebiliriz.

2.3. Serbest Radikal Türleri

En fazla önem arz eden serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleridir (RNT). Bu moleküller, sahip oldukları yüksek reaktivite özelliklerinden dolayı organizmadaki biyolojik makromoleküller olan lipitlere, proteinlere ve DNA'ya oksidatif hasarlar vererek hücrelerin ölümüne sebep olurlar (Yin, 2014). Bu iki serbest radikal türlerinden, ROT insan organizmasında en fazla hasara neden olan türdür (Lobo, 2010) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Çeşitli serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türleri (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

SERBEST RADİKALLER	RADİKAL OLMAYAN REAKTİF TÜRLER
Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	Reaktif Oksijen Türleri (ROT)
O ₂ •	H ₂ O ₂
HO•	HOCl
RO ₂ •	HOBr
RO•	O ₃
HO ₂ •	Δg ¹ O ₂
Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)
NO•	HNO ₂
NO ₂ •	NO ⁺
	NO ⁻
	N ₂ O ₄
	N ₂ O ₃
	ONOO ⁻
	ONOOH
	NO ₂ ⁻
	ROONO
Reaktif Sülfür Türleri (RST)	Reaktif Sülfür Türleri (RST)
RS•	RSH
RSO•	RSSR
RSO ₂ •	RSOH
RSSR•	RS(O)SR
	RS(O) ₂ SR

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

İnsan için oksijen, vazgeçilmez elementlerden biridir. Oksijen organizmada birçok organik molekülün temel yapı taşı oluşturur (Pham-Huy., 2008). Hücrede meydana gelen metabolik reaksiyonlarda, oksijenin çok büyük bir kısmı oksidatif fosforilasyon için harcanır (Cankurtaran, 2005). Harcanan bu oksijenin % 2'si mitokondride ROT'ları meydana getirir (Muller, 2004). ROT'lar, radikal olan ve radikal olmayan oksijen merkezli olarak iki başlık altında incelenir. Radikal olan ROT'lar, süperoksit radikali (O²⁻•), alkoksil radikali (RO•), hidroksil radikali (HO•) ve peroksil (ROO•) radikalidir. Radikal olmayan ROT'lar ise hidrojen peroksit (H₂O₂) ve singlet oksijen (O² ¹Δ_g) dir (Halliwell, 1995; Simon, 2000). Oksijenin normal metabolizmasında bir, iki veya üç elektron ile tepkimeye girmesiyle birlikte en zararlı ROT olan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve H₂O₂ meydana gelir (İşbilir, 2008).

2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

RNT'ler peroksi nitrit ve azotun oksitleri gibi nitrik oksidin oksijen ve süperoksitle tepkimesi sonucu oluşurlar (Saleem ve Ohshima, 2004). Nitrik Oksit Radikali (NO•) ve Peroksinitrit (ONOO⁻) olarak 2 başlıkta incelenir.

2.3.3 Reaktif Sülfür Türleri (RST)

Sülfür merkezli radikallerin biyolojik sistemlerdeki rolleri üzerine yapılan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır.

2.4. Serbest Radikallere Bağlı Olarak Geliştiği Düşünülen Hastalıklar

Serbest radikallerin üretimi eğer serbest radikallerin etkilerini engelleyen veya azaltan antioksidanların kapasitesini aşarsa, vücutta oksidatif stres oluşmaktadır (Scheibmeir ve ark., 2004; Paston ve Raijmakers, 2004; Junqueira ve ark., 2004; Abuja ve Albertini, 2001; Sorg, 2004). Yapılan araştırmalar gösteriyor ki oksidatif stresten dolayı olan sürekli atak çoğu major hastalığın başlamasına ve ilerlemesine neden olmaktadır. Yani serbest radikaller hastalığın ilk oluşum yerinin nedenini oluşturup, buradan da vücuda yayılımını tetiklemektedir (Anonim, 2005d; Sherman, 1998).

ROT'ların vücutta yol açtığı bazı hasarlar (Pisoschi ve Pop, 2015);

- Kanser
- Şeker Hastalığı
- Kalp Hastalığı
- Astım
- Yaşlanma
- Alzheimer Hastalığı
- Merkezi sinir sistemi hastalıkları
- Alzhemimer
- Parkinson

- İnfertiliite
- Romatoid artrit
- İnflamasyon

2.5. Kanser

Kanser 21. yüzyılda da dünyanın her ülkesinde beklenen yaşam süresi kısalması açısından en önemli faktör ve başlıca ölüm sebebidir. Globocan raporu göstermiştir ki 2018 yılında 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon ölüm görülmüştür (Bray vd., 2020). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyadaki 172 ülkenin 91 inde, 70 yaş öncesi ölümlerin ilk veya ikinci sıradaki sebebi kanserlerdir. Ülkelerin gelişmişlik düzeylerine göre görülen kanser tipleri farklılık göstermekle beraber, en gelişmiş ülkelerde bile kanserden ölümler önemli bir sağlık problemidir (Omran AR., 1971). Dünya genelinde her 8 erkekten biri, her 10 kadından biri yaşamları boyunca kansere yakalanacaktır. Sık görülen kanserlerin görülme oranındaki bölgesel değişiklikler sosyal, ekonomik ve hayat tarzındaki değişikliklerin önem arz ettiğini işaret etmektedir. Son çalışmalar göstermiştir ki bilinen hayat tarzına veya çevresel risk faktörlerine maruziyetin önlenmesi veya azaltılması sayesinde yeni kanser vakalarının üçte biri ile beşte birinin önlenebileceğini göstermiştir (İslami F, 2017; Wilson LF, 2017; Brown KF, 2018). Maalesef global olarak bu önemli veri sağlık sistemlerindeki karar vericiler tarafından yeterince dikkate alınmamakta ve kanserlerin önlenmesi sayesinde oluşabilecek sosyal ve ekonomik faydalardan mahrum kalınmaktadır.

Kadınlardaki kanser sıklığı değerlendirildiğinde akciğer, meme ve kolorektal kanserler ilk sırayı almaktadır. Over kanseri ise kanserlerin yüzde 3,3'ünden sorumludur. Ölüm sebebi olarak bakıldığında ise kanserler arasında yüzde 4,4 oranında görülmektedir.

Oksidatif stres kanser gelişiminde önemli bir faktördür. Tanımı oksidanlar olarak bilinen serbest radikaller ve metabolitler ile anti-oksidanlar olarak bilinen koruma mekanizmaları arasındaki dengesizliktir. Bu dengesizlik kritik fonksiyonlardaki hücre harabiyetine ve bunun tüm organizma üzerine olumsuz etkilerine sebep olmaktadır (Ďuračková Z. , 2010).

Kronik inflamasyonun kansere neden olduğu 5000 yıl öncesi geleneksel tıp verilerinde bile geçen genel geçer bir bilgidir. Bu kronik iltihap biyolojik, kimyasal veya fiziksel irritatif faktörlerle gelişebilmektedir (Bartsch H, 2006). Bu iltihabi süreçten kansere geçiş önemli bir araştırma konusudur. Kronik inflamasyon sonucu karsinogenez, hücre transformasyonu, hayatta kalımın uzaması, proliferasyonun uyarılması, invazyon ve metastaz meydana gelebilmektedir (Coussens LM, 2002). Kanserin oluşumundaki üç mekanizma olan başlangıç, promotion ve progresyon aşamalarının her üçünde de oksidatif stresin rolü vardır. Kronik inflamasyon ve kanser ilişkisinin oluşmasında reaktif oksijen radikalleri önemli rol oynar.

2.5.1. Over Kanseri

Jinekolojik maligniteler içerisinde en sık görülen endometrium kanseri olmakla beraber over kanseri ölüm oranı en yüksek olanıdır. Hastaların %65'inden fazlası tanı anında ileri evrededir (Yaginuma,1992). En sık 50-60 yaş arasındaki postmenapozal kadınlarda görülmekle beraber 70 yaş sonrası sıklığı artmaktadır. İnsidansı 40/100.000'dir. Dünyada her yıl 220 binin üzerinde yeni vaka görülmektedir. Over kanserinin ölümcül olma sebeplerinden biri de ilerleyen evrelere kadar belirti vermemeleri ve geç tanı almalarıdır. Bu yüzden "sessiz katil" olarak da isimlendirilir. İlerlemiş yumurtalık kanserinde kilo kaybı, ağrı, bulantı, kusma, karında şişkinlik, nefes darlığı şikayetleri yapmaktadır ki bu semptomlar da genelde gastrointestinal veya üriner sistem kaynaklı patolojilerle karışabilmektedir. Bu da geç tanıya sebep olabilir.

Over kanserinde sağkalım diğer malignitelerdeki gibi hastanın evresiyle ilişkilidir. Evre 1 ve 2 hastalıkta sağkalım %70-90'larda iken, evre 3 veya 4 hastalıkta %20-40'a kadar düşmektedir. Tıp teknolojilerindeki ve cerrahi tedavilerdeki gelişmelere rağmen over kanserindeki mortalite azalmamıştır.

Yukarıda belirtilen mortalite oranlarından anlaşılacağı üzere, erken evrede tanı koyabilmek over kanserine bağlı ölümlerin azaltılmasında kritik öneme sahiptir. Günümüzde over kanseri tanısında ve taramasında fizik muayene, görüntüleme teknikleri, tümör belirteçleri kullanılabilir. Derin yerleşimi ile fizik muayene ile erken tanı koymak oldukça zordur ve genelde ileri evre hastalarda belirgin bulgu verir. Pelvik kitlelerin ultrason ile saptanması over kanseri tanısında önem arz etmekle beraber, iyi huylu ve kötü huylu ayrımı bazen erken evrelerde zor olabilmektedir. Ultrasonografik muayenede kitlenin iki taraflı olması, solid alan içermesi, doppler kan

akımı çalışmalarında artmış kan akımı ve düşük vasküler direnç saptanması kitlelerde malignite ihtimalini yükselten ultrasonografik parametrelerdir. Kanda saptanabilen glikoprotein yapıda bir tümör belirteci olan Ca-125 de tanıda yardımcı olabilmektedir. Bu molekülle ilgili temel problem ise genelde erken evrede düşük seviyelerde olup şüphe uyandırmayacak ölçümlerde saptanmasıdır. Diğer bir problem de bu belirteç yumurtalık kanserine özgü olmayıp endometriozis gibi iyi huylu kitlelerde, sigara içimi gibi durumlarda, menstruasyon sırasında veya karın iç zarlarını ilgilendiren tüm travmatik ve irritatif durumlarda da yüksek çıkabilmektedir. Ca-125 dışında alfa fetoprotein, human epididimal protein, human koryonik gonadotropin gibi farklı tümör belirteçleri de tanımlanmıştır. Tüm bu değerlendirmelere rağmen halen over kanserlerini erken evrede tanımakda güçlük çekilmektedir.

Adenksial bir kitle saptandığında over kanseri akılda tutulması gerekirken, bu kitlelerin ayırıcı tanısında fonksiyonel over kistleri, endometriozis, dermoid kist gibi iyi huylu kitlerler de ekarte edilmelidir. Adneksial alandaki kitleler her zamana yumurtalıklara ait patolojilerle ilişkili olmayıp, uterusu, tüplere, bağırsaklara ait de olabilmektedir.

Fizik muayenede kitlenin yeri, büyüklüğü, kıvamı, hareketli veya sabit oluşu, birlikte asit olup olmadığı değerlendirilebilir. Beş santimetreden büyük, fikse, çift taraflı ve assitin beraber izlendiği kitleler malignite düşündürülen patolojileri düşündürür. Bu yüzden klinikte pelvik ve fizik muayene ile değerlendirme önem arzeder.

2.5.2. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanserinde genetik ve çevresel birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Ailede over kanseri öyküsü, ilk adetin erken yaşta görülmesi, menapozun ortalama yaştan ileri yaşlarda görülmesi, ileri yaş, pelvik inflamatuvar hastalık öyküsü, doğum yapmamış olmak, yüksek yumurtlama döngüsü, ovülasyon indüksiyonu (özellikle uzun süre klomifen sitrat ile indüklenmesi), bazı genetik faktörler over kanseri riskini arttıran faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Longuespée R, 2012). Bunların yanında hastanın infertil olması, menapozal yaşlarda olması, obezite ve sigara kullanımı da riski arttırabilir.

Over kanserlerinin %15'i ailesel %85'i sporadiktir (Romero I, 2012). Genetik olarak BRCA 1, BRCA 2 ya da TP53 mutasyonları over kanserine yakınlıkla ilişkilidir. Meme, endometrium ve kolon kanserleri ile bu genetik yakınlık nedeniyle sıklıkla

ilişkilidirler.

Multiparite, oral kontraseptif kullanımı, tüplerin bağlanmış olması veya histerektomi yapılmış olması ve emzirme over kanseri riskini azaltabilmektedir (Whittemore, 1994). Bu faktörlerden bir kısmı ovulasyonsuz dönemler sağlaması ile yumurtalık kanserini azaltmaktadır. Bu da over yüzey epitel hasarlanmasını azaltmış ve kanser gelişimi azalmıştır (Kramer , 2004). Yapılan doğum sayısı arttıkça over kanseri riskinin de orantılı olarak azaldığı geniş vaka serilerinde gösterilmiştir (Gross, 1994).

Obezite hormon bağımlı tümörler olan endometrium ve meme kanseri risklerini arttırmaktadır. Obezitenin ve artmış vücut kitle endeksinin over kanseri ile ilişkisi de gösterilmiştir (Schouten LJ, 2008 ; Olsen CM, 2007). Olsen ve arkadaşlarının çalışmasında obez kadınlarda epitelial over kanseri riski yüzde 30 artmaktadır (Pavelka JC, 2006). Aynı zamanda obezitesi olan kadınlarda over kanseri seyri daha kötü olmakta ve sağkalım oranı düşmektedir (Goff BA, 2004).

2.6. OVCAR-3

İnsan over kanseri hücre hattı OVCAR-3; Kafkasya kökenli, 60 yaşında, ileri evre over adenokanseri olan hastaların asit sıvısından elde edilen hücrelerden oluşturulmuştur. Hücreler epitelial morfolojiye sahip olup hem atimik farede hem de agarozda klon formasyonu oluşturabilmektedir. Kültüre edilebilen bu hücrelerde kendilerine özgü steroid reseptörleri olan sitoplazmik androjen, östrojen (Hamilton TC, 1983) ve progesteron (Hamilton TC,1982) bağlanma makromolekülleri içermektedir. Anöploid bir dişi den elde edilen bu hücre hattı homojen boyanma bölgesi ve doubleminute kromozomu içeren anormal bir karyotip barındırır (Hamilton TC, 1983). Kromozom analizinde kromozom sayıları anöploid yapı göstermektedir. Sitogenetik analizde belirteç olarak kullanılan N11, N13, N14, N15, N16, N17 ve N22 kromozomları bulunmamaktadır. Bunun yanında belirteç olarak kullanılmayan kromozomların büyük çoğunluğunda yapısal anomaliler, hücreler arasında sayısal ve yapısal nomaliler saptanmıştır. Dizi analizlerinde OVCAR-3 hücre hattında p53 geninde mutasyon (248, Arg--> Gln) saptanmıştır. 743. nükleotidte nokta mutasyonu ile Guanin'in Adenin'le değişmiş olması, 248. kodonda glutamin aminoasidinin arjinin aminoasidinin yerine geçmesine neden olmuştur (Yaginuma Y, 1992).

2.7. Antioksidanlar

Tarihin çok eski dönemlerinden beri, insanlar gıdalardan çeşitli şekillerde faydalanmışlardır. Bazı şifalı bitkilerden elde ettikleri özütlerle birçok hastalığı tedavi etmeye çalışmışlardır. Bu yüzden araştırmacılar da gıdaların içerikleri hakkında araştırmalar yapmaktadırlar. Gıdaların sağlığa olan faydalarından dolayı bu şifalı bitkilerin moleküler içerikleri hakkında, özellikle antioksidan özellikleri nedeniyle birçok araştırma yapılmıştır.

Antioksidanlar sağlık alanının dışında birçok endüstriyel alanda da kullanılmaktadır. Kozmetik sektöründe koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan antioksidanlar aynı zamanda yakıtlara, petrole ve kauçuğa bozunumlarını ve polimerizasyonlarını engellemek için dengeleyici olarak eklenmektedir. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu'nun (CAC) tanımında antioksidanlar “gıdada yağın acılaşmasını ve renk değişimleri gibi oksidasyon tepkimeleri sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar yağların oksidatif bozulmalarını diğer bir deyişle renk, tat, görünüş, koku ve besin değeri gibi en önemli özelliklerinin kaybolmasını önleyerek besinlerin kalitesini korumaktadır. Aynı zamanda küf ve bakterilerin neden olduğu gıda bozulmalarına karşı da iyi bir koruyucudur (İkinci, 2010) (Tablo 2.2).

Antioksidanların en önemli görevi insan vücudunda metabolizma ürünleri sonrasında ortaya çıkan, kısa ömürlü fakat olumsuz etkisi fazlaca olan “serbest radikalleri” nötralize ederek, onları etkisiz hale getirmektedirler (Özgen ve Scheerens, 2006). Normal şartlarda canlı metabolizması sağlıklı iken serbest radikaller ile antioksidanlar denge halindedir. Serbest radikal oluşumu artar ve antioksidan sistem bu kararsız molekülleri ortadan kaldırmada başarısız olursa, serbest radikal saldırısı ve lipit çift tabakalı hücre membranının zarar görmesi ile oksidatif stres kaynaklı hastalıklara yatkınlık gözlenir (Moldovan ve Moldovan, 2004). Antioksidanlar canlı hücrelerde bulunan protein, karbonhidrat, yağ ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu engellemek veya geciktirebilmek amacıyla serbest radikalleri yok etmektedir. Fakat özellikle alkol ve sigara kullanımı, çevre kirliliği, UV ışınları orman yangınları ve X-rays gibi serbest radikal kaynaklarının artışı, bu temel bileşenlerin zarar görmesine yol açarak oksidasyona neden olabilmektedir.

Tablo 2.2. Bazı oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Koca ve Karadeniz, 2003).

Oksidan	Antioksidan
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutatiyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutatiyon
Radyasyon	Ubikinon
Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet	Selenyum
İskemi	Ürik asit
Karsinojenler	E vitamini
	C vitamini
	β- karoten ve diğer karotenoidler

Antioksidanlar, hücreleri korunmak için ilk savunma hattı gibi davranır. Beslenmedeki antioksidanların alımının artması, hücre bütünlüğünün ve ayrıca canlı sistemin normal biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olmaktadır (Kattappagari, Teja, Kommalapati, Poosarla, Gontu, Reddy, 2015).

Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Antioksidanlar vücut tarafından serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretilebildiği gibi, bir kısmı da bitkilerle dışardan alınır. Serbest radikallerin artmasıyla, vücudumuzda bulunan antioksidanlar yetersiz kalabilmekte ve bu da dışardan takviye antioksidanların alınmasını gerektirebilmektedir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar, katalaz, glutatyon peroksidaz ve SOD (superoksit dismutaz) gibi enzimlerdir. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar serbest radikalleri süpürücü etkiyle hareket ederler. Bu etkilerinden dolayı da vücut savunma sistemi artar ve hastalık riski azaltılmış olur (Shinde A, 2012).

Antioksidanlar normal hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan ROT etkisiz hale getirerek koruyucu etki yapar (Sen S, 2010). Bunu da radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyerek yapar (Dündar Y, 1999). Antioksidanların serbest radikallerin fazlasını etkisiz hale getirmek, toksik etkilerinden hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı

sağlamak gibi rolleri vardır (Pham-Huy LA, 2008).

Yapılan araştırmalarda, fazla antioksidan tüketen ve kanında antioksidan maddelerin yoğunluğu fazla olan kişilerde belli dejeneratif hastalıkların daha düşük oranda ortaya çıktığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılan bazı klinik çalışmalarda antioksidan vitamin konsantrasyonu fazla olan kişilerde, bazı kanser ve kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkma olasılığının da azaldığı görülmüştür (Anonim, 2005e).

Antioksidanlar ROT'ların hasarını azaltmada dört farklı şekilde etki eder;

- 1. Süpürme etkisi (Scavenging):** Serbest oksijen radikallerine etki ederek onları tutar ya da daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
- 2. Söndürme etkisi (Quenching):** Oksidanlara bir hidrojen aktarır etkinliklerini azaltır ya da inaktif hale getirir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
- 3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking):** Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engeller.
- 4. Onarma etkisi (Repair):** Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (Gökpınar, 2006).

2.7.1. Antioksidan Çeşitleri

1. Vitamin A ve β -karoten
2. Vitamini C (askorbik asit)
3. Vitamin E ve tokoferoller
4. Süperoksit dismutaz (SOD)
5. Katalaz
6. Glutasyon (GSH)
7. Glutasyon Peroksidaz (Gpx)

8. Glutasyon Redüktaz (GR)
9. Glutasyon-S-Transferaz (GST)
10. Melatonin
11. Ürik asit
12. Albümin
13. Bilirübin
14. Seruloplazmin
15. Ferritin
16. Transferin ve Laktoferrin
17. Haptoglobin ve Hemopeksin
18. Probukol
19. Deferoksamin (DFO)
20. Lipoik Asit
21. Polifenolik bileşikler

i) Flavonoidler

ii) Fenolik asitler

a) Hidroksibenzoik asit Türevleri

I) Gallik asit

II) Protokateşik asit

III) Salisilik asit

IV) Vaniilik asit

V) p-hidroksibenzoik asit

b) Hidroksisinnamik asit Türevleri

I) Kafeik asit

II) Ferulik asit

III) Kumarik asit

IV) tr-sinnamik asit

22. Sentetik antioksidanlar

i) BHT

ii) BHA

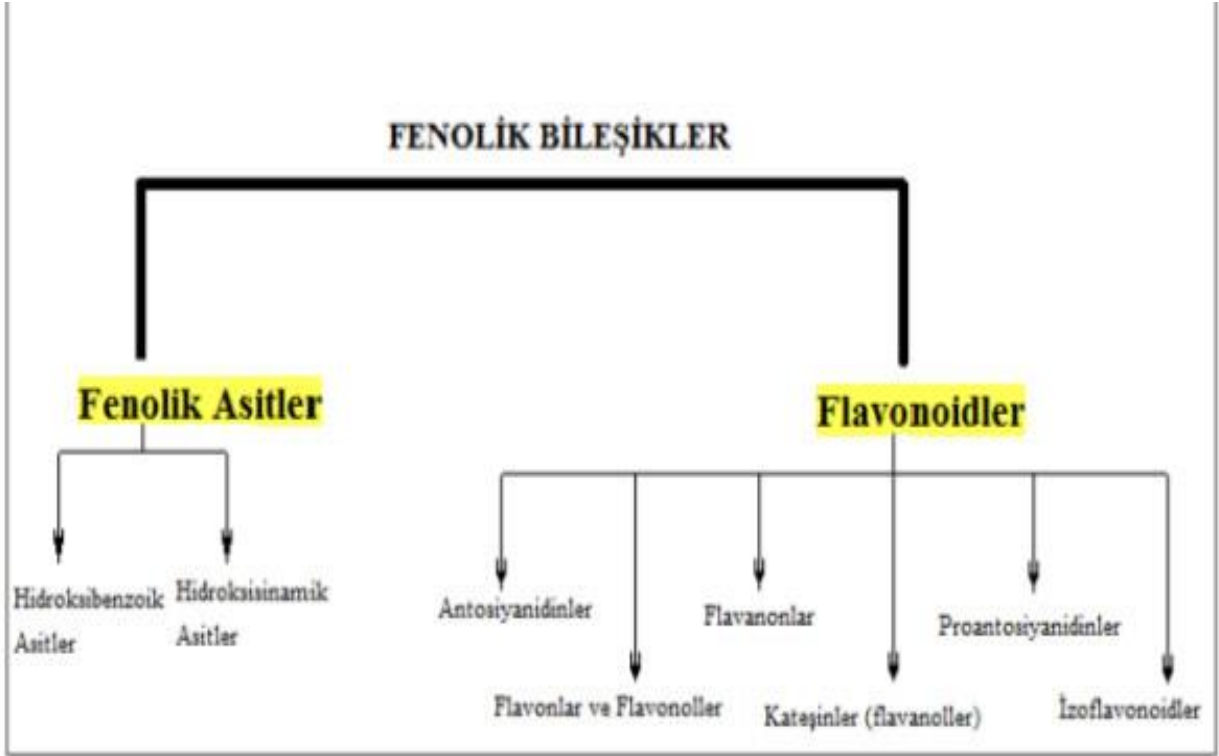
iii) Gallatlar

iv) TBHQ

Vitamin E ve C, karotenoidler ve fenolik bileşikler en çok dikkat çeken antioksidanlardandır. Vitamin C, hipoklorit, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil ve peroksil kökleri ile singlet oksijen formundaki aktif oksijenlerin temizlenmesinde en etkili antioksidandır. Vitamin E ise hidroksil, alkoksil, peroksil kökleri ve singlet oksijen gibi aktif oksijen formlarının neden olduğu oksidasyonu önler. β -karoten antioksidan özelliğini singlet oksijen aktivitesi (vücudun ışığa hassasiyet reaksiyonu) ve peroksil köklerine karşı göstermektedir(Yücel ve Ötleş 2001). Özellikle son zamanlarda araştırmacılar doğal antioksidan olarak değerlendirebileceğimiz, bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklere daha çok ilgi göstermektedirler (Frankel ve Finley 2008, Moon ve Shibamoto 2009).

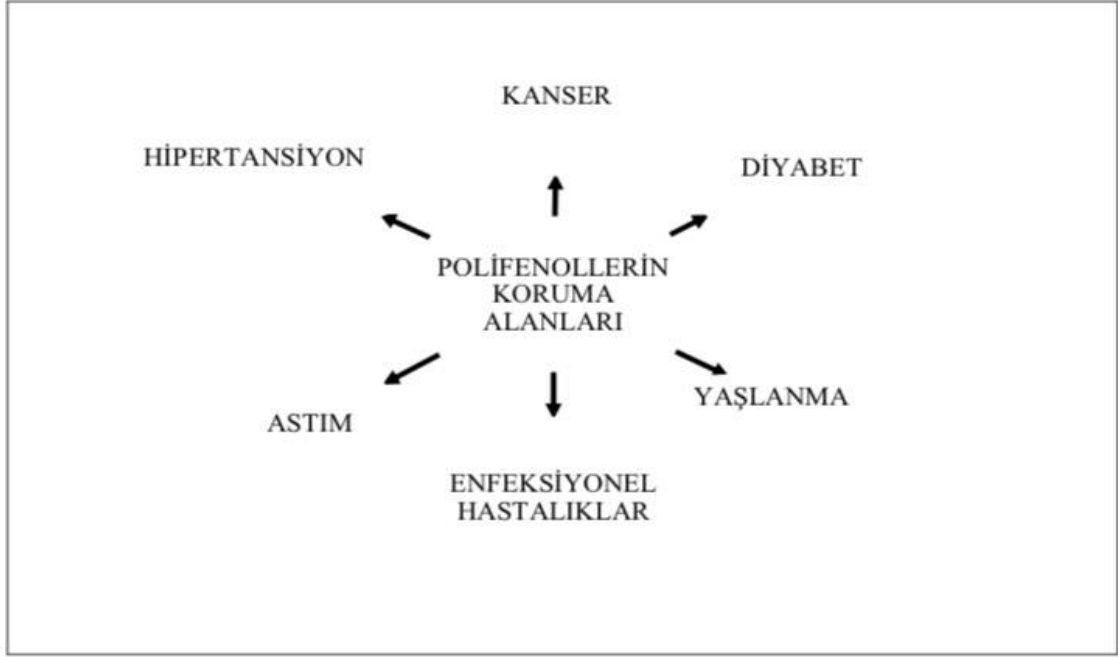
2.7.1.1. Polifenolik bileşikler

Benzen halkası içeren organik maddeler genel olarak fenolik bileşikler olarak adlandırılmakta olup bunlar bitkiler aleminde bulunan ikincil metabolitlerdir (Şekil 2.2.). Kimyasal açıdan flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.(Ho, 1991). Benzoik asitlerin esterleşmesi sonucu oluşan hidrolize olabilen tanenler ve proantosiyandinler (kondense tanenler), tanenler kategorisinde değerlendirilebilir (Ribéreau-Gayon, 2000).

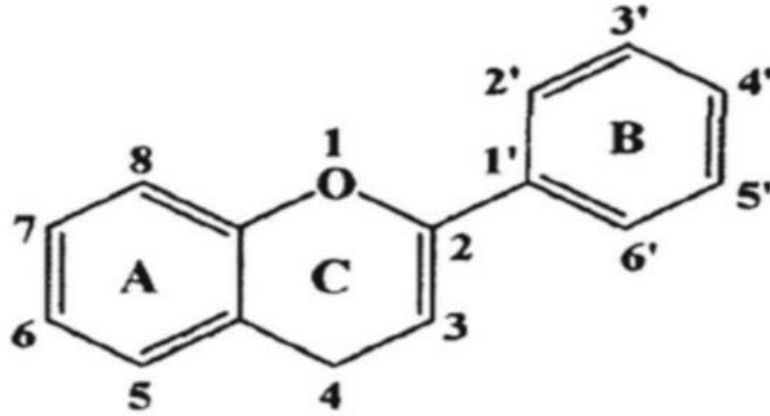


Şekil 2.2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013)

Fenolik bileşiklerin antioksidan ve antikarsinojenik etkileri, yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, koroner kalp hastalıkları ve kansere yakalanma riski ile bu fenolik bileşikler içeren sebze ve meyve tüketimi arasındaki korelasyon gösterilmiş (Şekil 2.3) (Cadenas ve Packer, 2002).



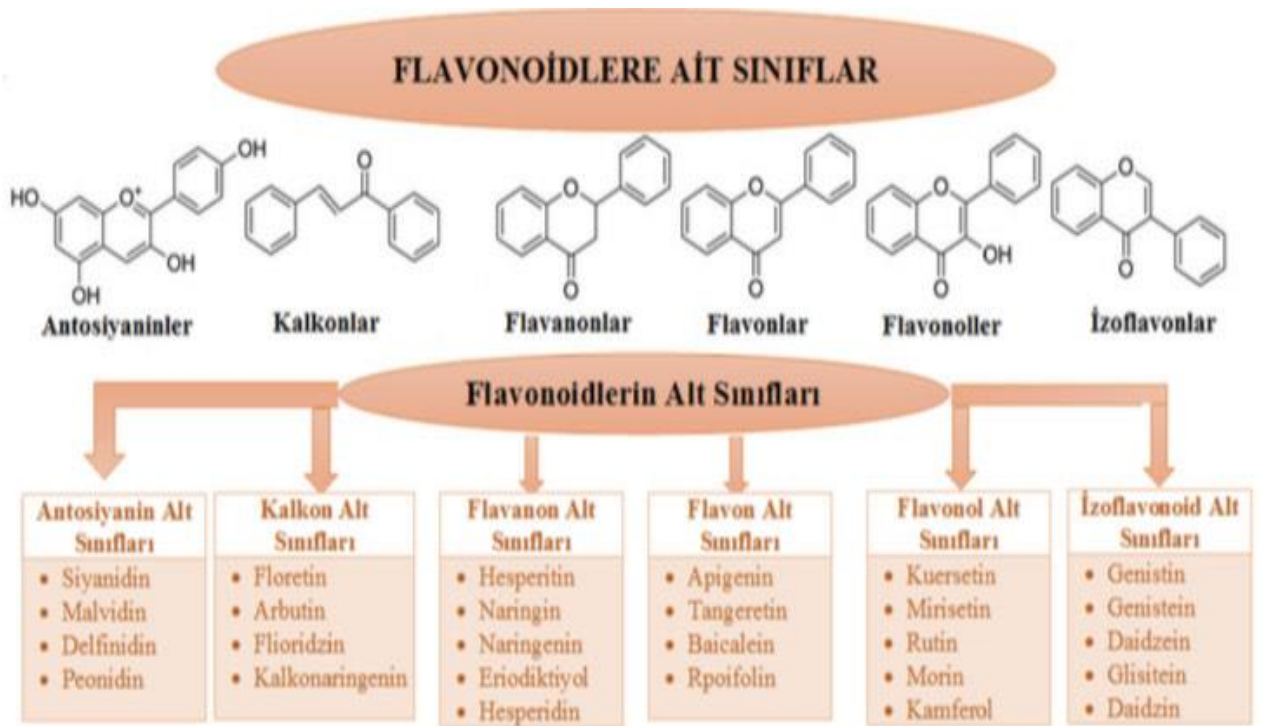
Şekil 2.3. Polifenollerin faydalı etkileri (Pandey ve Rizvi, 2009)



Şekil 2.4. Temel flavonoid yapısı (Muhsiroğlu, 2017).

i. Flavonoidler

Flavonoidler (flavon türevleri) yapısında C6-C3-C6 (difenilpropan) formunda iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşur ve 15 karbon atomu içerirler (Şekil 2.4). Flavonoidler kuvvetli antioksidan özellikler içeren ve bir çok çeşidi olan bitkisel kökenli maddelerdir. Bunları birbirinden ayıran temel özellikler hidroksi sayısı, doymamışlık derecesi ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyidir (Ilçım, 1998). Flavonoidler yapılarına göre 6 gruba ayrılır (Şekil 2.5). Bunlar antosiyaninler, kalkonlar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller ve izoflavonlardır. Flavonoidlere ait olan gruplar ve bu gruplara dahil olan bazı moleküller Şekil 5’de verilmiştir (Panche, 2016).



Şekil 2.5. Flavonoidlere ait olan gruplar ve bu gruba dahil olan bazı moleküller (Panche, 2016).

Bitkilerden elde edilen fenolik bileşiklerin en geniş ve en yaygın grubunu oluşturan fenolik yapıli bileşiklerdir. Bitkilerde yaklaşık 4000'in üzerinde flavonoid yapıli bileşik bulunduğu tespit edilmiştir. Flavon yapısından türevlenmiş bu heterosiklik bileşikler oksidasyon durumları ve substütisyon özellikleri farklı çok büyük

bir sınıftır. Başta pek çok meyve (turunçgiller, elma gibi) ve sebze olmak üzere kırmızı şarap ve soyada yüksek oranda flavonoid yapıları bulunmaktadır (Zand ve ark., 2002).

Antioksidan faaliyetleri taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısı ve konumu ile bağlantılıdır. LDL oksidasyonunun durdurulmasını sağlamaktadırlar. Antioksidatif etkileri yalnızca indirgeme potansiyeline bağlı olmayıp, protein bağlama kapasitesiyle de ilgilidir. LDL üstünde, oksidasyona maruz kalacak alanın yapısına uygunluğu sayesinde oksidatif atağı bloke etmekte ve LDL oksidasyonunu önlemektedir (Aviram ve Fuhrman, 1998; Birt ve ark., 2001). Antioksidan özelliklerinin olduğu gibi pro-oksidan özellik de taşıdıkları da bilinmektedir (Galati ve O'Brien, 2004).

ii. Fenolik Asitler

Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokateşik	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 2.6. Fenolik Asitlerin Genel Yapısı (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

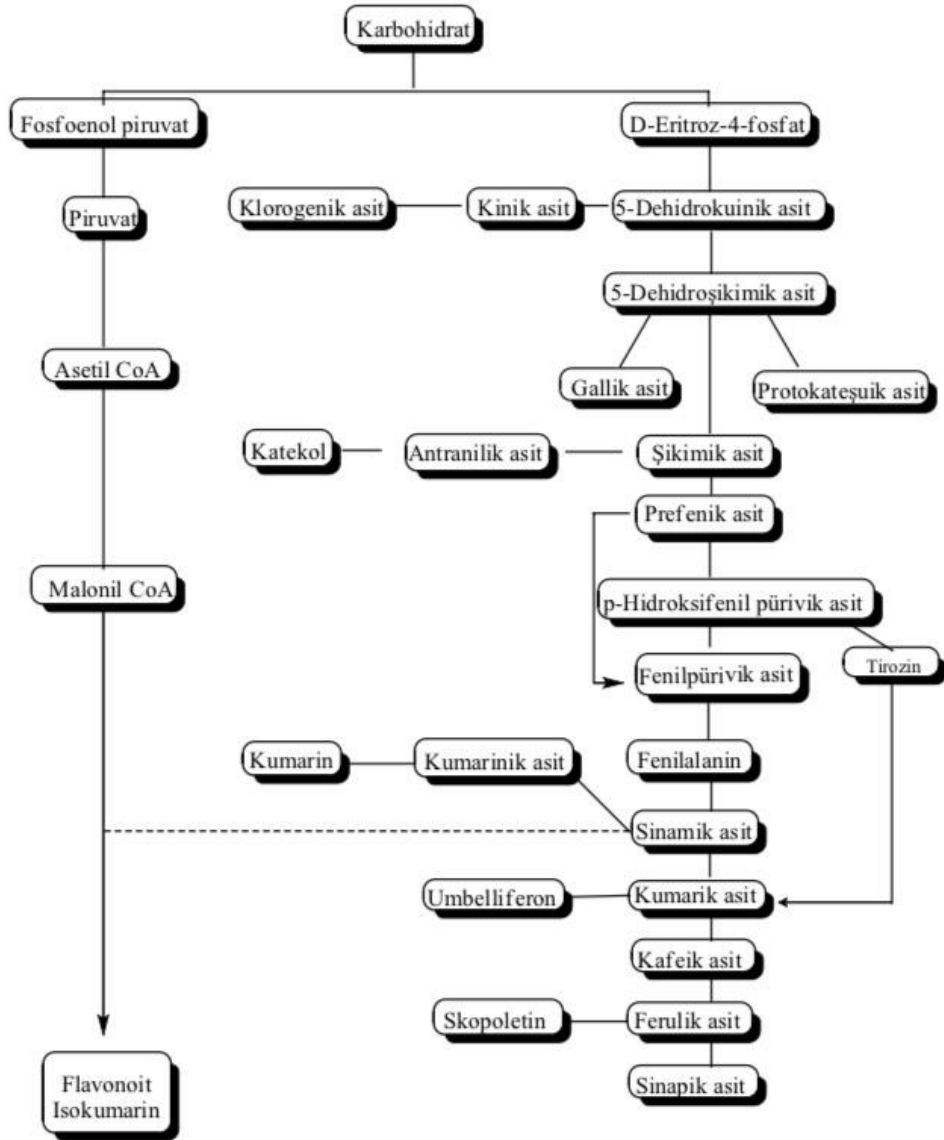
Fenolik asitler, kimyasal yönden hidroksisinnamik (sinamik) ve hidroksibenzoik (benzoik) asitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 6). Hidroksibenzoik asitler C6-C1 (fenilmetan), hidroksisinnamik asitler ise C6-C3 (fenilpropan) yapısındadır (Şekil 2.6). Benzoik asit türevlerine örnek olarak, *p*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, salisilik asit protokateşik asit ve vanilik asit verilebilir. Sinamik asit türevlerine ise kumarik

asit, sinamik asit, ferulik asit ve kafeik asit verilebilir (Ribéreau-Gayon, 2000; Yücel ve Ötleş 2001; Nizamoglu ve Nas 2010).

Fenolik asit bitkiler aleminde yaygın olarak bulunur ve sekonder metabolitlerdir. Genellikle glikozitlerin ya da organik asitlerin esterleri halinde ve bitkide proteinlere veya hücre duvarı polimerlerine bağlı olarak bulunmaktadırlar. Sadece az bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Fenolik asit gibi bileşiklerin gıdalarda bulunması besinlerin stabilitesini, kalitesini besin değerini rengini ve kokusunu belirgin olarak etkilemektedir (Robbins, 2003).

Gıda maddelerinin içinde 500-25000 arasında değişen fitokimyasal bulunmaktadır. Bunların 500 tanesini fenolik bileşikler oluşturur ve sağlıklı olan bu yakın ilişkilerinden dolayı en popüler bileşik grubudur (Acosta-Estrada, 2014). Fenolik bileşikler antioksidatif, antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antiviral özellikler gösterir. Fenolik bileşiklerin oksidasyonun başlamasını önleme, vücutta bulunan dejenere etki gösteren oksijen konsantrasyonunu dengeleme veya direk serbest radikalleri tutup, radikal oksijen türlerinin oluşmasını engelleme gibi antioksidan özellikleri vardır (Zhang, 2016).

Fenolik asitlerin kökü karbonhidratlardır. Fosfenol piruvik asit, glikolitik yolla D-eritros fosfat ile birleşir ve pentos fosfat devresiyle 5-dehidrokuinik asite dönüşür. Bunu klorogenik asit vasıtasıyla sağlar. 5-dehidrokuinik asit, 5-dehidroşikimik asit şekline dönüşür ve protokateşuik asitle, gallik asit oluşur. 5-Dehidroşikimik asit şikimik asit şekline dönüşürken anthranilik asit ve katekol sentezlenir. Şikimik asit, preferik asit şekline dönüşürken p-hidroksifenil, piruvik asit veya fenilpiruvik asite dönüşür. Tirozin p-kumarik ürünlerini, fenilalanin ise sinamik asit ürünlerini verir. Sinamik asit ard arda gelen, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit şekline dönüşür. Kumarik asit, umbelliferon ürününü verir, ferulik asitten ise skopoletin meydana gelir. Diğer taraftan Acetil Co-A, malonil Co-A şekline dönüşürken sinamik asit ilave edilmesiyle beraber çeşitli flavonoidler ve isokumarinler oluşur (Harborne 1964), (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Fenoliklerin biyosentezi (Harborne, 1964).

Fenolik asit içeren pek çok bitki gastrointestinal, damar, mikrobiyal ve viral hastalıklar ayrıca iltihaplı hastalıklar da tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Robbins, 2003). Buğday kepeği (Yu ve Zhou, 2005; Ferguson ve Haris, 1999), şarap (Minussi ve ark., 2003), greyfurt (Gorinstein ve ark., 2004b), üzüm kabuk ve çekirdekleri (Yılmaz ve Toledo, 2004), adaçayı (*Salvia ssp.*) (Bozan ve ark., 2002), Sideritis (Tunalier ve ark., 2004) gibi bitkiler ve tarçın, kimyon, sumak, karabiber gibi baharatlar (Bozan ve ark., 2003), zeytinyağı (Servili ve ark., 2004; Owen ve ark., 2000) gibi bitkisel ürünlerin fenolik asitlerden kaynaklanan antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Minussi ve ark., 2003; Servili ve ark., 2004; Owen ve ark., 2000; Gorinstein ve ark., 2004a; Yu ve Zhou, 2005; Ferguson ve Haris, 1999).

Biberiye, kozmetik sektöründe, losyon, kolonya ve şampuan yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca, biberiyenin çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olduğu da bildirilmektedir (Banyai et al. 2003). Antioksidan özellik bakımından biberiyede bulunan karnozik asit en güçlü antioksidan etkiye sahiptir ve bu etki yaklaşık karnosoldan üç kat, bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA)'dan yedi kat daha fazladır (Richheimer et al. 1996).

Adaçayı ise antioksidan etkiye sahip bir diğer aromatik bitkidir. Yapısındaki en önemli fenolik bileşikler karnosol, rosmadial, karnosik asit, rosmanol, epirosmanol ve metil karnosattır (Cuvelier et al. 1994).

Kekiğe kendine özgü kokusunu verip (Başer 2001) ayrıca ona antioksidan özellik kazandıran bileşenlerde fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler uçucu yağların %78-82'sini oluşturmaktadır (Botsoglou et al. 2003).

Hardal da çok miktarda fenolik bileşikler içerir. Fenolik asitler ve türevleri, yoğunlaştırılmış tannin formuyla ortaya çıkarlar. Hardal unu ve ekstraktlarının güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Pamuk tohumunun metanolik ekstraktlarında ise kuersetin vardır (Shahidi et al.1992).

Ayrıca ülkemizde bol miktarda bulunan zeytin ve yaprakları da fenolik bileşikler içerirler. Bu bitkinin meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktın vazodilatör, antiromatizmal, hipotensif, hipoglisemik, diüretik ve kolesterol düşürücü etkileri olduğu bildirilmiştir ve ekstraktta bulunan luteolin, apigenin gibi flavonoidlerin

antikomplementer aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Pieroni et al. 1996).

Çay ise, fenolik maddelerce zengin içeceklerden birtanesidir. Çay yapraklarının bileşimi klimatolojik, genetik ve kültürel faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir (Katiyar and Mukhtar, 1997). Çayda bulunan polifenoller kuru çayın %35'ini oluştururlar. Çayın fenolik bileşiklerde, lipit peroksidasyonunu önleyerek, serbest radikal giderme özellikleriyle antioksidan etki gösterirler (Mukai et al. 2000). Yapılan çalışmalarda çay tüketiminin kalp krizi, bazı kanserler, koroner kalp hastalıkları ve karaciğer rahatsızlıkları riskini azalttığı gösterilmiştir (Wiseman et al. 1999).

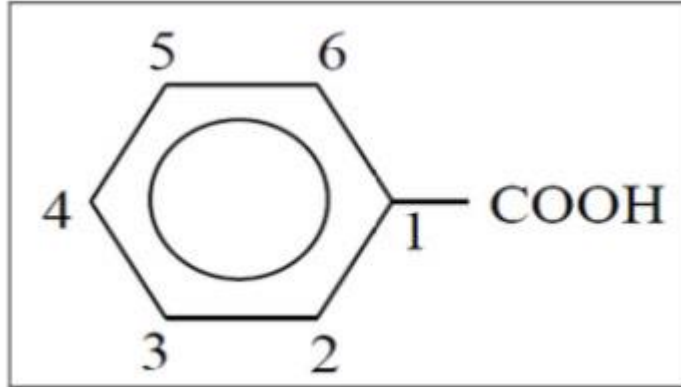
Hidroksisinnamik asit türevlerinin, yapılan çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında, hidroksibenzoik asit türevlerine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Marinova ve Yanishlieva, 2003).

Fenolik asitler antioksidan özelliklerini, hidrojen atomlarını vererek, (Sousa ve ark., 2004) hidroksil, peroksil, singlet oksijen, peroksinitrit radikallerini süpürerek veya geçiş metalleriyle şelat oluşturarak gerçekleştirmektedirler (Cadenas ve Packer, 2002; Lodovici ve ark., 2001; Sroka ve Cisowski, 2003; Javaninardi ve ark., 2003).

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri kimyasal yapılarıyla ilgilidir (Tapiero ve ark., 2002). Etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının bağlanma yerine, sayısına ve karşılıklı pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Sroka ve Cisowski, 2003; Peyrat-Maillard ve ark., 2000).

P-kumarik asit, vanilik asit, kafeik asit, salisilik asit, ferulik asit, gallik asit, p-OH benzoik asit, ve prokateşik asit'in β -karoten-linoleik asit sisteminde antioksidan etkileri ve DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikali üzerinden radikal süpürücü etkileri test edilmiş, -OH grubunun sayısının artmasıyla antioksidan aktivitenin arttığı gözlenmiştir (Peyrat-Maillard ve ark., 2000; Fukumoto ve Mazza, 2000). Metoksil grubu bulunduran fenolik asit türevinin ise, bulundurmayan türevlere göre daha fazla etkili olduğu tesbit edilmiştir (Marinova ve Yanishlieva, 2003; Fukumoto ve Mazza, 2000). Ayrıca hidroksil gruplarının orto-pozisyonundan birbirine bağlı olması aktiviteleri açısından avantaj olarak görülmektedir (Sroka ve Cisowski, 2003).

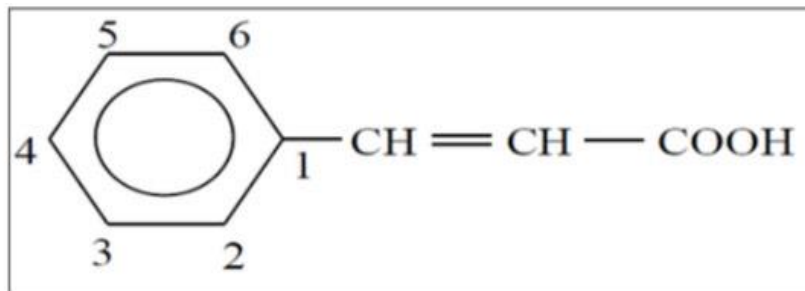
a-Hidroksibenzoik Asitler



Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitlerin molekül yapısı (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Hidroksibenzoik asitler bitkisel gıdaların yapısında genellikle çok az miktarlarda (10 ppm kadar) bulunur ya da hiç bulunmayabilirler (Şekil 2.8). Bunlar arasında salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik, p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit gibi asitler örnek verilebilir. Hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitlerden yağ asitlerinin oksidasyonu ile analog olan bir reaksiyon zinciri sonucunda oluşmaktadır.

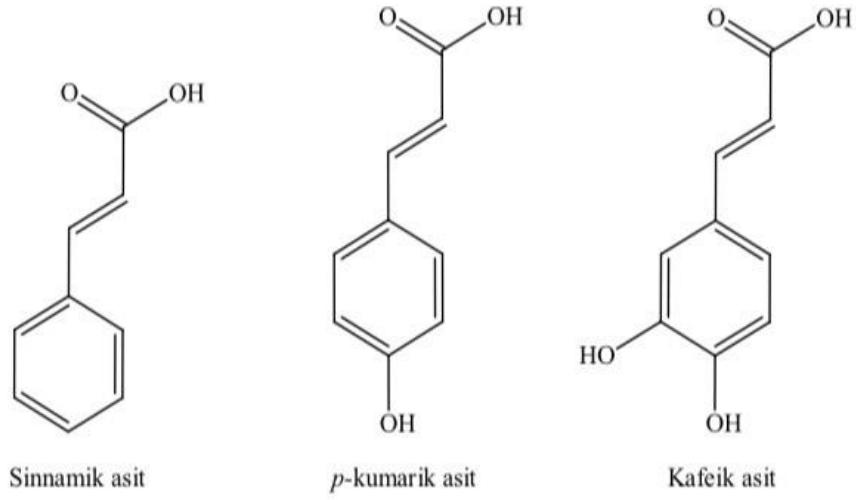
b-Hidroksisünamik Asitler



Şekil 2.9. Hidroksisünamik asitlerin molekül yapısı (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013).

Fenolik asitlerden olan hidroksisünamik asitler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar ve hidroksil grubunun, fenilpropan halkasına bağlanma konumuna ve sayısına göre farklı özellik gösterirler. Bunlar arasında ferulik asit, o-kumarik asit, p-

kumarik asit ve kafeik asit önem taşımaktadır (Şekil 2.9).



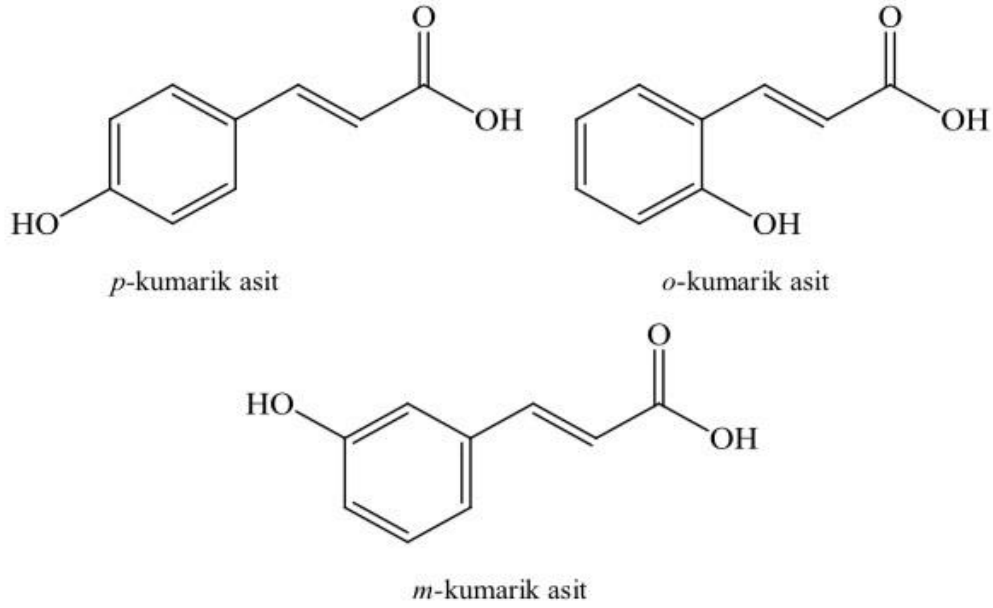
Şekil 2.10. Bazı hidroksisinnamik asit yapıları (Koç S, 2014).

Hidroksisinnamik asitlerin çok az bir miktarı serbest halde bulunurlar, çoğunlukla asit türevleri halindedirler. Gıdalarda hidroksisinnamik asitin esterleri de çok yaygındır.

Hidroksisinnamik asit glikozidleri ve amidleri de pekçok bitkide bulunmaktadır. Bitkilerde hidroksisinnamik asit biyosentezi dört farklı enzim katalizörlüğünde fenilalanin ile başlar ve dört aşamada reaksiyon tamamlanır (Şekil 2.10).

b.1. Kumarik asit

Sinnamik asitten türemiş organik bileşik olan kumarik asit bitkilere rengini, kokusunu ve tatlarını verir. Hidroksi grubunun yerine bağlı olarak orto, meta ve para olmak üzere üç tane izomeri vardır. Molekül formülü $C_9H_8O_3$, molekül ağırlığı ise $164,15 \text{ g.mol}^{-1}$ 'dür (Anonim, 2012) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Kumarik asit ve izomerleri (Koç S, 2014).

Sinnamik asidin yaygın bulunan izomeri olan kumarik asit portakal (Sousa ve ark., 2004), kiraz (Cadenas ve Packer,2002), kahve, çikolata ve şarapta (Abdel-Wahab ve ark., 2003) ayrıca fıstık, domates ve havuç gibi birçok bitkide bulunur. Kumarik asidin tümör önleyici etkide ve apoptotik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Jaganathan vd., 2013).

Ayrıca strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Kanser hücrelerini öldürme potansiyelinin yanında DNA'da oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir. Kullanılan doz yüksek miktarda olduğu zaman toksik etki göstermektedir (Labieniec ve ark., 2003). P-kumarik asidin özellikle mide kanserine karşı oldukça faydalı olduğu bilinmektedir.

P-kumarik asitin, doksuribisin isimli kemoterapotik ilacın kalp dokusu üzerine olan oksidatif strese bağlı toksik etkisini azaltarak koruma sağladığı gösterilmiştir (Abdel-Wahab ve ark., 2003).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, p-kumarik asidin kolon epitel hücrelerine (Caco-2) etkisi araştırılmıştır. 1500 µmol/l konsantrasyonda p-kumarik asitin 24-72 saatlik uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinin çoğalmasını %43-75 oranında önlediği bulunmuştur. Bununla birlikte, p-kumarik asitin kolon kanseri hücrelerinde apoptoz mekanizmasını mitokondriyal ROS sistemi üzerinden aktive eder (Jaganathan vd., 2013).

Janicke ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asit ve p-kumarik asitin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücreleri 1500 µM ferulik asit ile muamele ettikten 2 ve 3 gün sonra Caco-2 hücre canlılığının kontrole göre sırasıyla %75 ve %43 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Aynı şekilde Caco-2 hücreleri 1500 µM p-kumarik asit ile muamale edildikten 2 ve 3 gün sonra hücre sayısı kontrole göre sırasıyla %74 ve %55 oranında azalmıştır. Her iki fenolik asit ile 1 gün sonra G1 fazındaki azalma, S fazında artış; 2 ve 3. günlerde G₂ fazında artış belirlenmiştir (Rosa vd., 2016; Janicke vd., 2005).

p-Kumarik asit hem in vitro hem de in vivo kolon kanseri modellerinde Grp (Glucose Regulated Protein) down-regüle etmiş, UPR aracılı apoptozu da aktive etmiştir. Ayrıca p-kumarik asitin sitokin COX-2, IL-6, TNF-α ve PGE2 ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu önemli ölçüde azalttığını ve ayrıca western blot yöntemiyle analiz edildiği üzere p-p65 ve pIκBα ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, p-kumarik asitin apoptoz indükleyici etkisi sonucunda PERK-eIF2α-ATF-4-CHOP yolunun aktivasyonu yoluyla kanser hücrelerinde Grp78 (78 kDa Glucose Regulated Protein) up-regülasyonunu inhibe ettiği açıklanmıştır (Sharma vd., 2018).

Hidroksisinamik asitlerden kafeik, ferulik, m- ve p-kumarik asitlerin antioksidan, antifibröz, antiviral, antitümör, antitrombotik biyolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmesine rağmen; o-kumarik asitin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır (Sen vd., 2013).

o-kumarik asit çay, kahve, fındık, *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (Compositae), *Mikania glomerata* Spreng, *Medicago sativa* L. (Leguminosae), *Caucalis platycarpos* L. (Apiaceae) ve *Urtica urens* gibi birçok gıda ve bitkide bulunan bir hidroksisinamik asittir. Yapılan çalışmalar o-kumarik asitin antilipidemik, antioksidan ve antikanserojen gibi farklı biyolojik aktivitelerinin olduğunu göstermiştir (Sen vd., 2015).

Kumarik asitin over kanseri üzerine etkileri ile ilgili literatürde yeterli veri yoktur. Yukarıda belirtilen mekanizmalarla, farklı kanser türleri üzerinde gösterildiği üzere kumarik asitin kanser üzerine olumlu etkilerinin over kanserinde de tespit edilmesi muhtemeldir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığından alınan 10.12.2019 tarih ve 19 karar numaralı etik kurul onayı ile yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmamızda kumarik asitin, tip 2 ileri derecede seröz over kanserini modelleyen OVCAR-3 hücre hattı üzerine olan anti-proliferatif, invaziv ve morfolojik etkileri araştırılmak amaçlanmıştır

3.1. Hücre Hattı ve Kullanılan Besi yeri

Çalışmamızda OVCAR-3 hücre hattı kullanıldı. Stok hücre Roswell Park Memorial Institute (RPMI) besiyeri kullanıldı. Bu besiyerine ayrıca %10 FBS (Fetal Bovine Serum) eklenerek hücreler için uygun besiyeri ortamı yaratıldı. Ayrıca mikrobiyal ve fungal enfeksiyonları önlemek için %1 penisilin streptomisin de ilave edildi. Donmuş hücreler çözülüp, hazırladığımız besiyeri içinde %5'lik CO₂ ve 37 ° C de inkübatörde çoğaltıldı.

3.2. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

RPMI besiyeri içerisine ekilen hücrelerin çoğalmaları inverted mikroskopla takip edildi. Besiyeri her 3 günde bir yenilendi. Çoğaltılan hücrelerin yoğunluğu flask tabanının %80-90'ına ulaştığında, hücreler tripsin ile kaldırıldı ve yeni flaslara ekildi. Pasajlama işlemi için önce flaskların içerisindeki besiyeri dökülüp, flask PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. Sonra sırasıyla PBS-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) 1 dakika boyunca uygulandı. Ardından hücrelere 75 cm² flask için 1000 ul, 25 cm² lik flask için 500 ul önceden su banyosunda 37 ° C de bekletilen tripsin eklendi. Hücreler 1 dakika boyunca 37°C %5 CO₂ içeren inkubatorde bekletildi. 1 dakika sonra hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadıkları inverted mikroskopla kontrol edildi. Hücrelerin tabandan ayrıldığına emin olunduktan sonra hücrelerin üzerine, eklenen tripsin miktarının en az 2-3 katı medyum eklenerek tripsin aktivitesi nötralize edildi. Bu karışım önceden hazırlanan besiyeriyle 10 ml'e tamamlanarak 15 mm'lik falcon tüplere alınarak 400 x G'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, üzerindeki süpernatant atılıp, tabandaki hücre çökeltisi üzerine yeni besiyeri eklenerek ve yeni flaslara alınarak %5'lik CO₂ ve 37°C ortamlı inkübatöre koyuldu.

3.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımında en çok kullanılan yöntemlerden biri olan negatif yüklü tripan mavisi ile boyama yapıldı. Canlı olan hücrelerin membranından boya hücre içine girmez ve hücreler mikroskopta parlak renkte görülürler. Canlı olmayan hücrelerin membranları zarar gördükleri için, boyayı içine alır ve mikroskopta mavi renkte görünürler.

Hücre sayımı için flasklardaki tabana yapışan hücrelerin tekrar kaldırılması gerekmektedir. Bunun için tekrar EDTA ve tripsin eklenerek flask tabanındaki hücreleri kaldırıp üzerine 4 ml besiyeri eklenerek 1000 devir/dk'da 10 dk santrifüj edildi. Üzerinde biriken süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre peleti, yeni besiyerinde homojenize edildikten sonra süspansiyondan 50 µl alınıp 50 µl tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Daha sonra hücre sayım cihazının lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı hesaplandı.

3.4. MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliu bromid) Testi

Mossmann (Mosmann, 1983) tarafından tanımlanmış bu yöntem hücre canlılığını tespit etmede yaygın olarak kullanılır. MTT kolorimetrik testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesine dayanır. Canlı hücrelerde dehidrojenaz enzimi aktivitesi gözlemlenirken, ölen hücrelerde gözlemlenmemektedir. Bu test MTT nin hücre içine girip mitokondrideki reaksiyon sonucu formazana indirgenmesine dayanır. Formazan renkli ve suda çözülmeyen bir maddedir. Daha az hücre ve canlılık içeren kuyularda daha az formazan tuzu, daha fazla canlı hücre içeren kuyularda ise daha çok formazan kristali oluşur. MTT'nin formazana indirgenmesi hücre mitokondrisinde gerçekleştiği için bu reaksiyon oranı hücre canlılığını gösterir. MTT boyası PBS (phosphate buffered saline) içinde 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan MTT boyası medyumla 1/10 oranında seyreltilip kuyucuklara 100 mikrolitre miktarında ilave edildi. 3-4 saat %5'lik CO₂ ve 37°C de inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki boya uzaklaştırıldı ve DMSO (Dimetil sülfoksit) ilave edildi. ELISA 'microplate' okuyucuda 570 nanometre dalga boyunda, oluşan formazan absorbansı okutuldu. Farklı miktarlarda kumarik asit verilmiş ve sadece besiyeri verilerek kontrol olarak kullanılmış kuyucuklardan okunan optik yoğunluğa göre hücre canlılığı tespit edildi.

3.5. Nötral Kırmızısı Yöntemi

Nötral kırmızısı lizozomal aktivite yoluyla hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan canlılık testidir. Borenfreund ve Puerner tarafından 1985 yılında bulunmuştur. Nötral kırmızısı analizi, NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2003) tarafından hazırlanan yöntemle yapılır. 40 mg nötral kırmızısı, 10 ml PBS'de çözülüp, stok oluşturuldu. Bu stokta 1/100 oranında seyreltilerek kullanıldı. Hücreler 5×10^3 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekilip, büyütüldükten sonra hazırlanan test madde dozlarından eklenerek inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler kuyucuk başı 100 mikrolitre PBS ile yıkandıktan sonra %1 oranındaki nötral kırmızısı boyası ile 3 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp hücreler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara formazan tuzlarının çözülmesi için 100 mikrolitre DESORB (%1 glacial asetik asit, %49 etanol) aktarılıp, ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerlere göre hücre canlılığı tespit edildi.

3.6. İverted Mikroskop İncelemesi

OVCAR-3 hücreleri, altı kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde ekilip inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1250 ve 2500 μ M dozunda kumarik asit ilave edildi. 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra hücrelerdeki morfolojik değişiklikler inverted mikroskopta incelendi ve kayda alındı.

3.7. Hematoksilen Eozin İncelemesi

Hematoksilin-eozin, hücreleri ve dokuları boyama ve morfolojik farklılıkları incelemeye kullanılan çok yaygın ve vazgeçilmez bir yöntemdir. Hematoksilin bazofilik bir özellik gösterir ve daha çok hücrenin çekirdeğini boyarken, eozin asidofilik bir özellik gösterir ve daha çok hücre sitoplazmasını boyamaktadır. Bizim bu çalışmamızda, altı kuyucuklu plakalarda lameller üzerine hücreler büyütüldü ve 1250 ve 2500 μ M kumarik asit ilave edildi. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler soğuk metanolla fikse edildi ve PBS ile yıkandı. Sonra 5 dakika hematoksilen uygulandı ve çeşme suyunda yıkandı. Distile su ile yıkanan örnekler eozinde 5 dakika bekletildi. Sonrasında distile su yıkanıp kurutuldu ve su bazlı kapatma solüsyonu ile lam üzerine kapatıldı. Işık mikroskopunda hücrelerdeki değişiklikler incelendi.

3.8. Migrasyon (Yara İyileşme) Testi

Altı kuyucuklu plakalar üzerinde hücreler büyütüldü ve yapışmaları sağlandı. Yapışmaları sağlandıktan sonra her bir kuyucuğa sarı pipet ucuyla dikey olarak boydan boya eşit büyüklükte çizgi çekilerek hücreler arası boşluk (yara) oluşumu sağlandı. Takiben PBS'le plaka yıkandı ve yüzeye çıkan hücrelerin temizlenmesi sağlandı. Ardından kumarik asitin belirlediğimiz 1250 ve 2500 μM dozu uygulandı. Ayrıca kumarik asit uygulamadığımız sadece yara oluşturulan kontrol grubu oluşturuldu. İverted mikroskopta 6'lı plakadaki yara (boşluk) kapanması, madde verildikten 24 saat sonra verdiğimiz maddenin hücreler arasındaki boşluğa nasıl etki ettiği fotoğraflandı ve görüntülendi.

3.9. Caspase 9 İmmünohistokimya

Tripsin-EDTA ile kaldırılmış olan hücreler 6'lı plakalar üzerine ekildi. Hücrelere gerekli maddeler verildikten ve üzerinden yeterli süre geçtikten sonra hücreler üzerindeki besiyeri atıldı. Hücreler 6'lı plaklar içerisinde PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler %3.7 formaldehitte fikse edilip ve tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkandıktan sonra triton X ile muamele ettiğimiz hücre üzerlerindeki porların daha açık hale gelmesi sağlandı. Hücrelere Ultra V blok damlatıldı. Sonrasında Ultra V blok boşaltılıp primer antikor aşamasına geçildi. Bir gece 4°C'de bekletilerek primer antikor uygulandı. Ardından PBS ile yıkama yapıp, sekonder antikor uygulandı. Hücreler AEC kromojen ile muamele edildi. Renk değişimi görüldükten sonra kromojeni döküp, PBS ile tekrar yıkama yapıldı. Hücreler su bazlı kapatma mediumu ile kapatma işlemi yapıp mikroskopta incelendi.

3.10. İstatistiksel Analiz

Shapiro-Wilk normalite testi ile değişkenlerin normal dağılım izleyip izlemediği kontrol edilmiştir. Anova testi kullanılarak normal dağılım gösteren veriler arasındaki fark tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Varyansları ANOVA'da Levene's testinde homojen dağılan veriler Tukey çoklu karşılaştırma testi, varyansları homojen dağılmayan veriler Tamhane çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yorumlandı. Normal dağılımını takip etmeyen veri setlerinde Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. $p < 0.05$ ise istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksisite Sonuçları

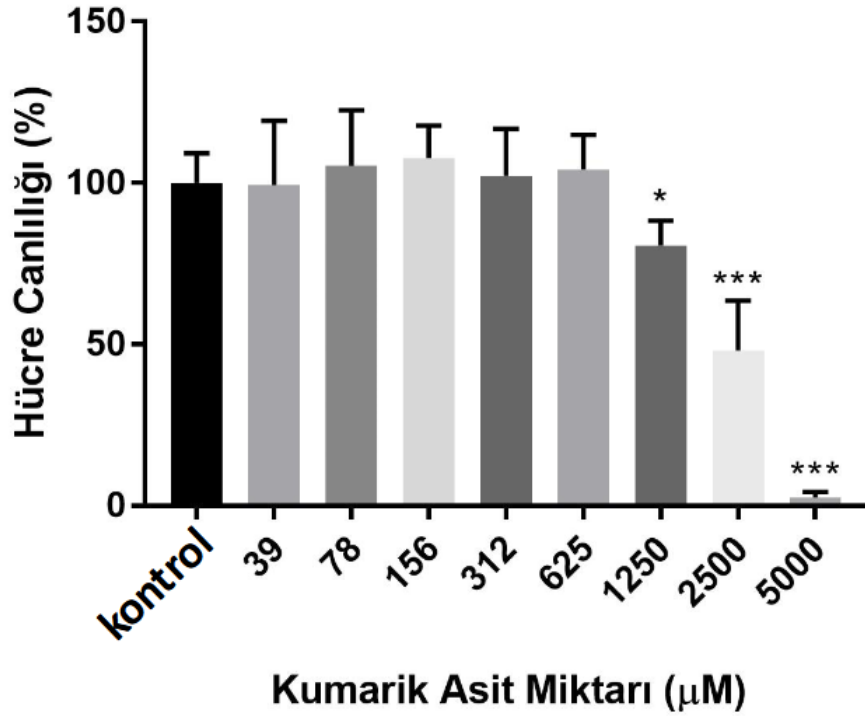
4.1.1. MTT Sonuçları

MTT deneyimizde OVCAR-3 hücrelerine 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 μM şeklinde değişen dozlar uygulandı. Dozlar 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625 μM uygulanan OVCAR-3 hücreleri ile kontrol grubu arasında canlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 3.1). 1250, 2500, 5000 μM uygulanan gruplarda canlılık kontrole göre yüksekti ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.001$). 1250 μM uygulanan grupta canlılık %80.7, 2500 μM uygulanan grupta canlılık %48.1, 5000 μM uygulanan grupta ise canlılık %2.5 olarak saptandı. Doz artışı ile canlılıkta da belirgin azalma izlenmiştir. En düşük canlılık en yüksek doz uygulanan hücre grubunda saptanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. MTT testi sonucuna göre farklı dozlarda kumarik asit uygulandıktan sonra hücre canlılık yüzdeleri (0-5000 μM)

Kumarik Asit Dozları (μM)	Hücre Canlılığı (%) (Ortalama \pm SS)	p değeri
Kontrol	100.0 \pm 9.3	----
39.1	99.3 \pm 20.0	fy
78.1	105.3 \pm 17.3	fy
156.3	107.7 \pm 10.1	fy
312.5	102.2 \pm 14.7	fy
625.0	104.2 \pm 10.7	fy
1250.0	80.7 \pm 7.5	$p<0.05$
2500.0	48.1 \pm 15.6	$p<0.001$
5000.0	2.5 \pm 1.8	$p<0.001$

fy: Fark yok



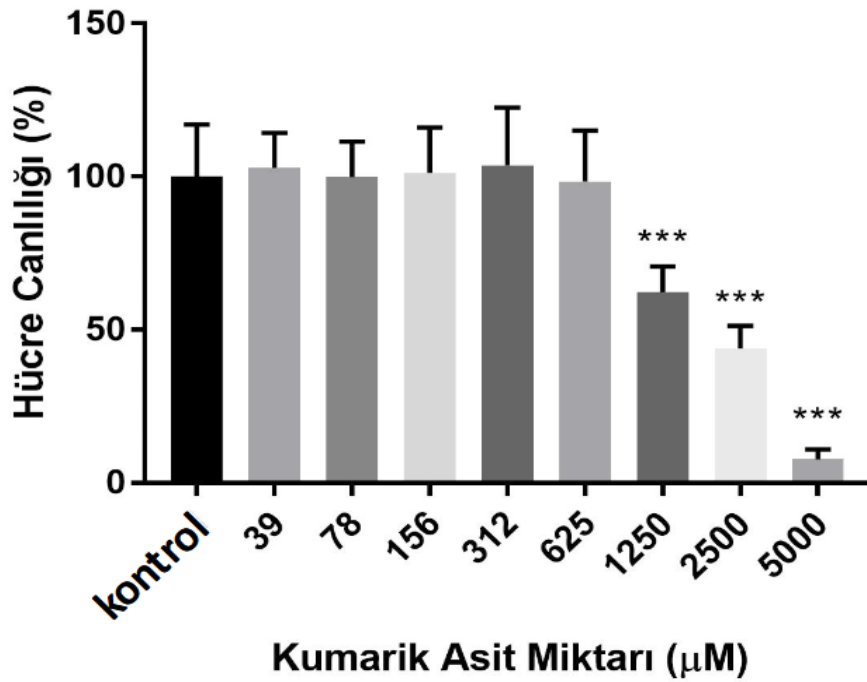
Şekil 3.1. Çeşitli miktarlarda kumarik asit uygulanan OVCAR-3 hücrelerinin MTT sonuçları (* kontrol ile ilgili grup karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark vardır. *** kontrol ile ilgili grup karşılaştırıldığında $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı fark vardır).

4.1.2. Nötral Kırmızısı Sonuçları

39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µM şeklinde değişen dozlar uygulandı. Dozlar 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625 µM uygulanan OVCAR-3 hücreleri ile kontrol grubu arasında canlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 3.2) (Tablo 3.2). 1250, 2500, 5000 µM dozlarında kumarik asit uygulandığında ise canlılık yüzdeleri sırası ile %62.3, %43.9 ve %7.6 olarak saptanmış olup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük saptanmıştır (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). Uygulanan doz arttıkça nötral red uygulamasında hücrelerin canlılık oranlarının orantılı olarak azaldığı izlendi.

Tablo 3.2. Nötral kırmızısı testi sonucuna göre farklı dozlarda kumarik asit uygulandıktan sonra hücre Canlılık yüzdeleri (0-5000 μ M). **fy:** Fark yok.

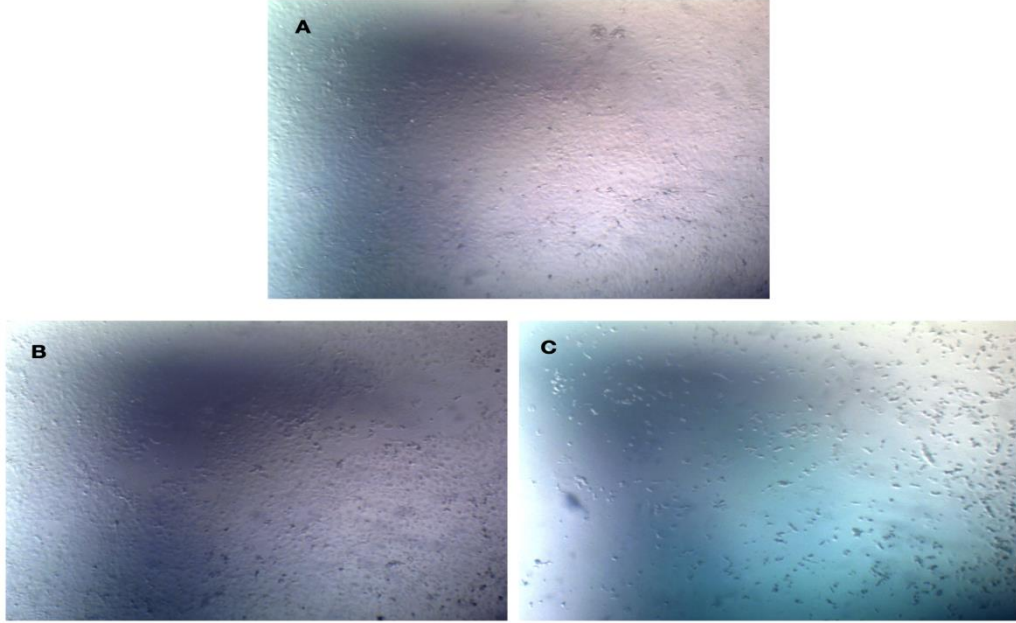
Kumarik Asit Dozları (μ M)	Hücre Canlılığı (%) (Ortalama \pm SS)	p değeri
Kontrol	100.0 \pm 17.1	----
39.1	102.9 \pm 11.5	fy
78.1	99.8 \pm 11.6	fy
156.3	101.2 \pm 14.9	fy
312.5	103.7 \pm 18.9	fy
625.0	98.5 \pm 16.6	fy
1250.0	62.3 \pm 8.4	p<0.001
2500.0	43.9 \pm 7.5	p<0.001
5000.0	7.6 \pm 3.3	p<0.001



Şekil 3.2. Çeşitli dozlarda kumarik asit uygulanan OVCAR-3 hücrelerinin nötral red sonuçları (***) kontrol ile ilgili grup karşılaştırıldığında p<0.001 düzeyinde anlamlı fark vardır).

4.2. İverted Mikroskop Sonuçları

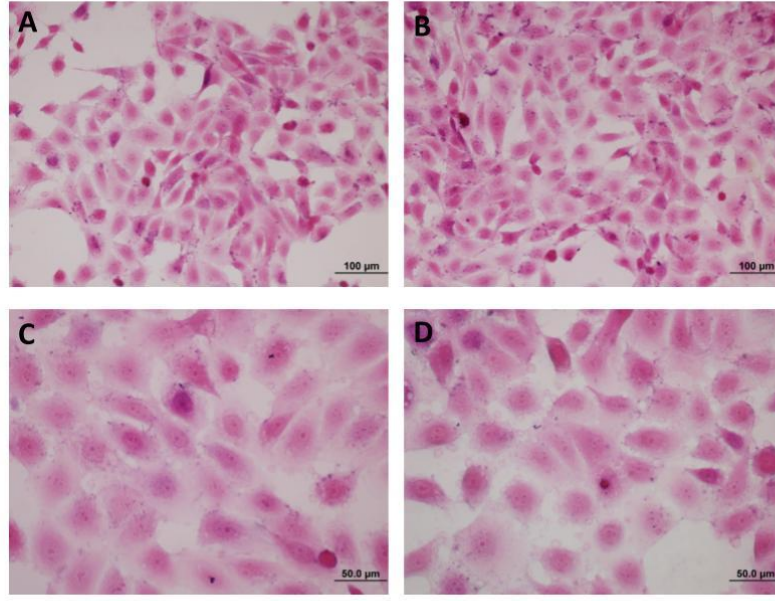
İverted mikroskop incelemelerimiz sonucunda kumarik asitin artan dozlarda uygulanmasına paralel olarak doz arttıkça OVCAR-3 hücre sayılarında da belirgin azalma gözlemlendi (Şekil 3.3).



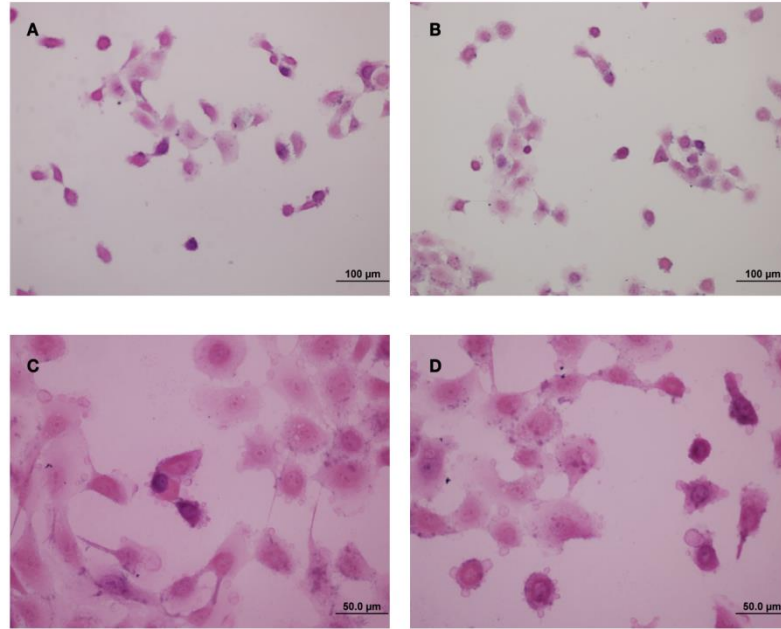
Şekil 3.3. A. Kontrol grubu inverted mikroskop görüntüsü, B. 1250 μ M dozunda kumarik asit uygulanan hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü, C. 2500 μ M dozunda kumarik asit uygulanan hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü.

4.3. Hematoksilen Eozin boyama sonuçları

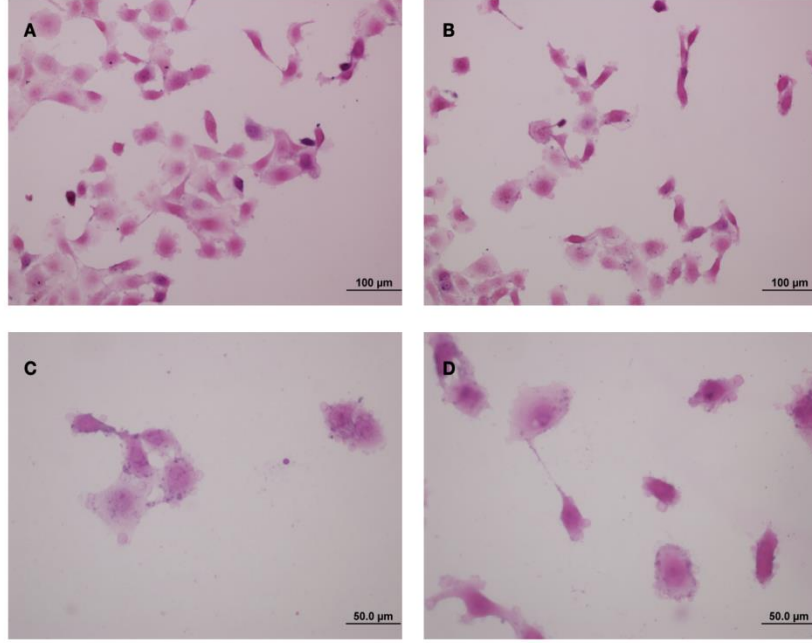
Çalışmamızın hematoksilen eozin boyama sonuçlarına baktığımızda, kontrol grubundaki hücrelerin sitoplazma ve çekirdekleri normal görünümdeydi. Artan dozla beraber hücrelerde hacimsel küçülme, piknotik çekirdek sayısında artma ve hücre yoğunluğunda azalma tespit edildi (Şekil 3.4-3.6).



Şekil 3.4. Kontrol grubunun hematoksilen eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri (ölçek çubuğu A ve B’de 100 µm, C ve D’de 50 µm).



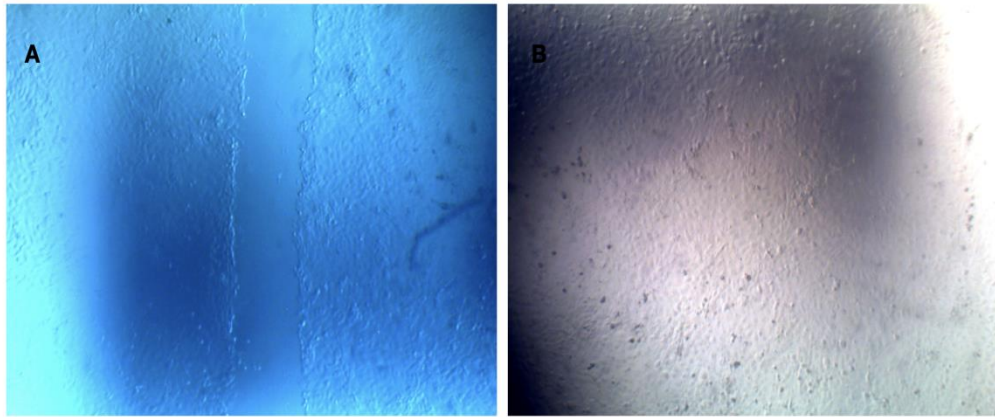
Şekil 3.5. 1250 µM kumarik asit uygulanan hücre grubunun hematoksilen eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri (ölçek çubuğu A ve B’de 100 µm, C ve D’de 50 µm).



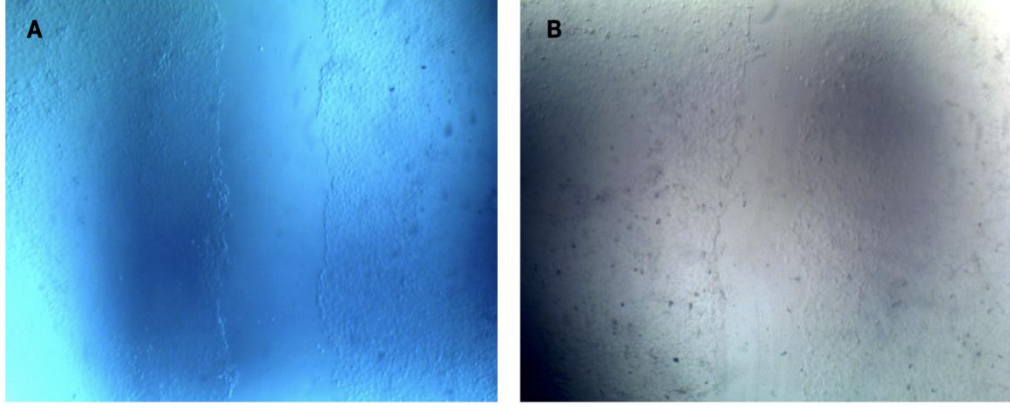
Şekil 3.6. 2500 μ M kumarik asit uygulanan hücre grubunun hematoksilin eozin boyama görüntüleri. A ve B 10x büyütme, C ve D 40x büyütme görüntüleri (ölçek çubuğu A ve B’de 100 μ m, C ve D’de 50 μ m).

4.4. Migrasyon Deneyi Sonuçları

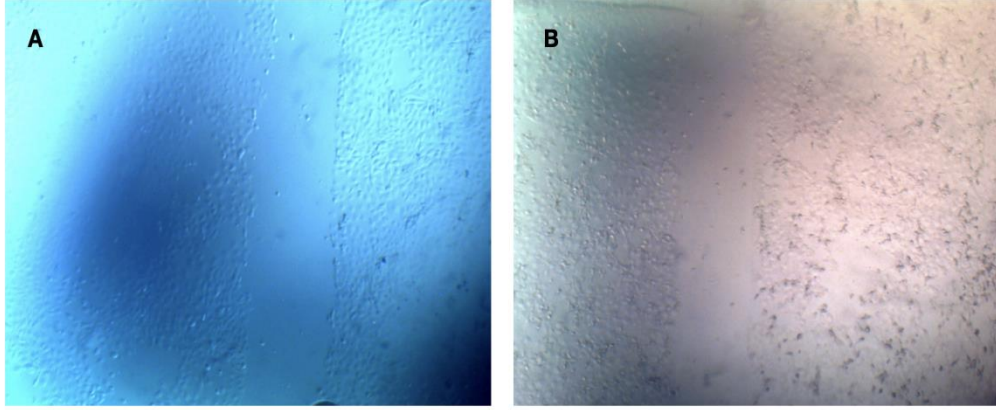
Yaptığımız migrasyon testinde kontrol grubunun (Şekil 3.7) ve kumarik asitin 1250 (Şekil 3.8) ve 2500 (Şekil 3.9) μ M dozlarındaki sonuçları aşağıdaki gibi gözlemlendi. Kumarik asitin 24 saatlik uygulamasında hücre hareketinin artan dozla yavaşladığı görüldü.



Şekil 3.7. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (Kontrol). A. Migrasyon öncesi 10X, B. 24 saat sonraki migrasyon 10X.



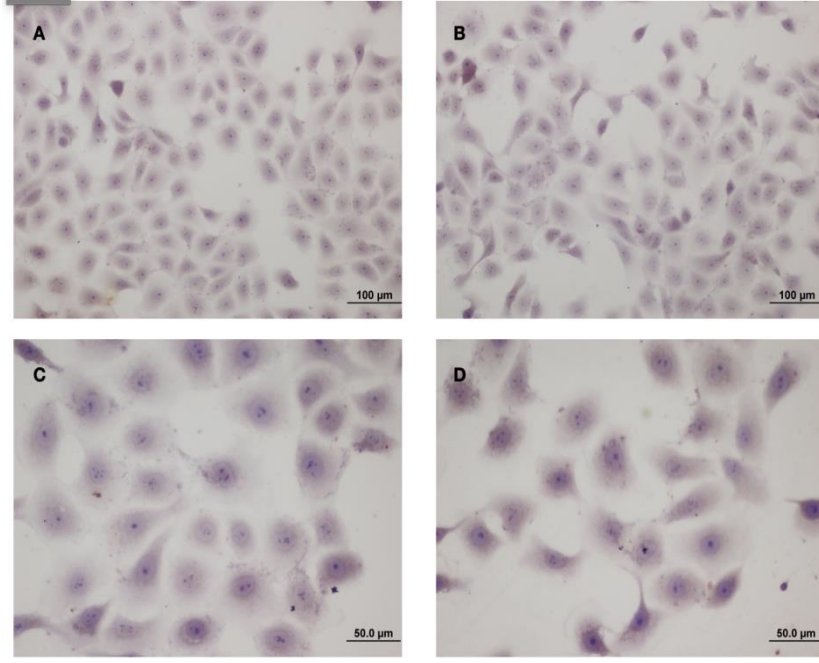
Şekil 3.8. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (1250 µM kumarik asit uygulaması sonrası). A. Migrasyon öncesi 10X, B. 24 saat sonraki migrasyon 10X.



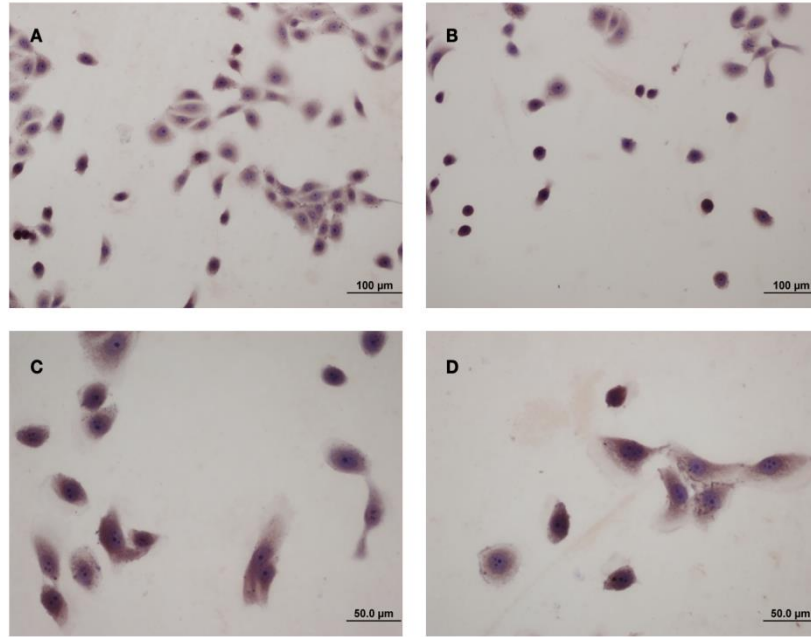
Şekil 3.9. OVCAR-3 hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları (2500 µM kumarik asit uygulaması sonrası). A. Migrasyon öncesi 10X, B. 24 saat sonraki migrasyon 10X.

4.5. Caspase 9 İmmünohistokimya Sonuçları

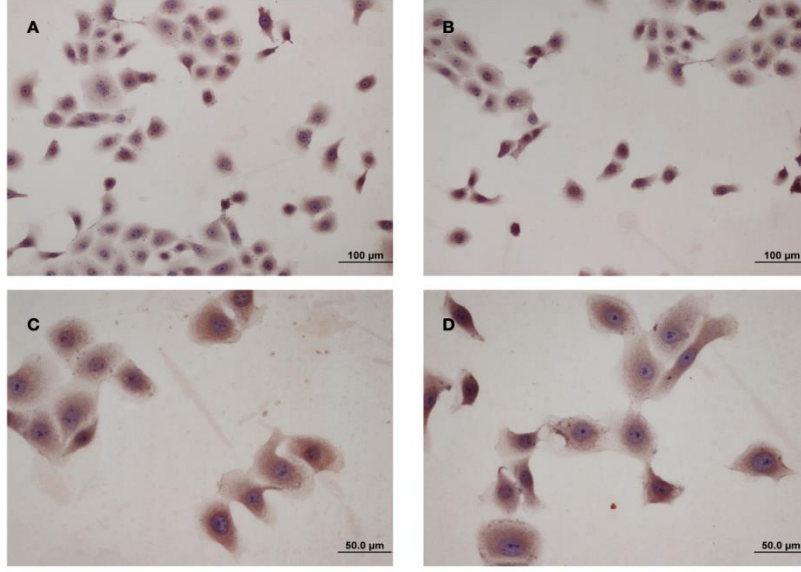
İmmünohistokimya deneylerimizde kontrol, 1250 µM ve 2500 µM kumarik asit uygulanan gruplar oluşturuldu. Apoptotik protein caspase 9'un kontrole kıyasla 1250 µM ve 2500 µM kumarik asit uygulanan gruplarda daha yüksek immün reaksiyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.10-3.12).



Şekil 3.10. Kontrol grubuna ait immünohistokimya boyamaları. A ve B 10X büyütme, C ve D 40X büyütme (ölçek çubuğu A ve B’de 100 µm, C ve D’de 50 µm).



Şekil 36.11. 1250 µM kumarik asit uygulanan hücrelerin caspase 9 immünohistokimya boyamaları. A ve B 10X büyütme, C ve D 40X büyütme (ölçek çubuğu A ve B’de 100 µm, C ve D’de 50 µm).



Şekil 3.12. 2500 µM kumarik asit uygulanan hücrelerin caspase 9 immünohistokimya boyamaları. A ve B 10X büyütme, C ve D 40X büyütme (ölçek çubuğu A ve B’de 100 µm, C ve D’de 50 µm).

5. TARTIŞMA

Tıp alanındaki gelişmeler sayesinde uzayan yaşam sürelerinin sonucunda kronik hastalıklar ve malignitelerin sıklığı giderek artmaktadır. Tüm dünyada ve ülkemizde kalp hastalıklarından sonra en önemli ölüm sebebi kanserdir. Tedavi yöntemlerindeki iyileşmeye rağmen kanser insidansı ve ölüm oranları iyileşmemiştir (Omran AR., 1971). Günümüzde kullanılan kemoterapötik ajanlar ciddi komplikasyonlar ve yan etkilere sebep olabilmektedir.

Over kanseri kadınlarda görülen kanserler arasında 7. sırada olup önemli bir mortalite sebebidir. Prognozu oldukça kötüdür. 5 yıllık sağ kalım oranları %45'in altındadır (Bray vd., 2020). Hali hazırda rutin bir tarama programı olmadığı ve hastaların birçoğu ileri evrede tanı alabildiği için önemli bir sağlık problemi olarak kadın sağlığını tehdit etmektedir. Genellikle evre 3'de tanı almaktadır. Sinsi olarak karın boşluğunda bu evrelere kadar büyümekte, hastada bu aşamaya kadar belirgin bir klinik oluşturmamaktadır (Whittemore, 1994).

Günümüz yumurtalık kanseri tedavileri cerrahi ve kemoterapi ağırlıklıdır. Klasik kemoterapi protokollerine katkısı olan alternatif immünmodülatör tedaviler de gündeme gelmiştir. Kemoterapinin temellerini sitotoksik ve anti-anjiogenez tedaviler oluşturmaktadır. Bu tedavileri destekleyebilecek molekül arayışları halen sürmektedir. Her ne kadar bu tedaviler hastalısız sağ kalımı arttırsalar bile özellikle ileri evre hastalıkta tam iyileşme sağlayamamaktadır. Hastalar devam eden kemoterapi ve cerrahi tedaviler ile daha uzun yaşatılmaya çalışılmaktadır. Bu tedavilerin yan etkileri çok ağır olabilmekte, zaten seyreden bir malignite nedeniyle genel durumu iyi olmayan hastalar bu tedavilerin yan etkilerine bağlı olarak kaybedilebilmektedir. Bu noktada yan etkileri azaltma yönünde yapılabilecek ek(adjuvan) tedaviler de önemli hale gelmektedir. Gerek primer tedavinin olumsuz etkilerini nötrazlie edecek gerekse kendi özgün etki mekanizmaları ile tümör tedavisinde kullanılabilecek ek tedaviler veya yardımcı moleküller hasta konforunu ve yaşam sürelerini uzatabilecektir. Söz konusu ek tedavilerin doğal moleküllerden seçilmesi yan etki ihtimalini azaltıp, söz konusu molekülün eldesi açısından da avantaj sağlayabilecektir. Bu moleküllerden beklenebilecek etki başlı başına antitümör ve anti-migrason etkiler ile tümör sağaltımı sağlaması olabileceği gibi günümüzde kullanılan tedavilere aditif veya summatif bir etki göstererek hasta sağ kalımına olumlu etkide bulunmaları olabilir. Ayrıca kullanılacak kemoterapi doz ve süreleri azaltabilirlerse hastanın yaşam kalitesi ve süresi üzerine

yadsınamayacak katkılar sağlayacaklardır.

Reaktif oksijen radikalleri vücutta bir çok metabolik faaliyette görevli olmakla beraber bu radikallerin aşırı aktivitesi bir çok kronik hastalığa ve kansere sebep olabilmektedir. Bu radikalleri artıran en önemli etkenler çevresel faktörler olup ultraviyole ışınlar, sigara, toksinler ve ağır metaller aşırı üretimlerine sebep olmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin aşırı birikimini önleyen antioksidan maddeler bu nedenle önem arz etmektedir (Anonim, 2005d, Sherman, 1998).

Bu bağlamda kanserin önlenmesi ve prognozu iyileştirici etkileri nedeniyle diet ve sağlıklı besinler gün geçtikçe önemini arttırmaktadır. Günümüzde kanser hücrelerinin apoptozisini arttıran ve çoğalmasını engelleyen doğal yaklaşımlar önemli hale gelmiştir. Son yıllarda besin maddelerinin anti tümör etkileri ilgi uyandırmakta ve üzerine çok sayıda bilimsel çalışma dizayn edilmektedir (Benot-Dominguez, 2021). Özellikle akdeniz diyeti gibi sağlıklı beslenme şekilleri ile kronik hastalıkların ve kanserin sıklığında azalma, beklenen yaşam sürelerinde uzama gibi olumlu etkiler gözlenmiştir (Barak, 2017). Diyetin over kanseri önlenmesi ve kanserin tekrarlamasındaki rolleri üzerine çalışmalar yapılmıştır (Smits, 2015).

Fenolik bileşikler de doğal antioksidanlardır ve birçok araştırmada ve kanser modelinde antioksidan etkileri araştırmaya değer bulunmuştur (Frankel ve Finley 2008, Moon ve Shibamoto 2009). Antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal özellikler gösteren fenolik bileşikler oksidasyonun başlamasını önleyerek, direkt serbest radikalleri tutarak ve radikallerin oluşumunu engelleyerek bu etkileri sağlamaktadır (Zhang , 2016). Polifenollerin pro-oksidan etkilerinin kanser öncesi hücreler ve kanser hücrelerinde kimyasal yolaklar üzerine etki ederek, anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri ile olduğu gösterilmiştir (León-González, 2015). Pro-oksidan bileşikler kanser hücrelerinde reaktif oksijen radikallerinin miktarını arttırarak o hücrelerde hasara sebep olabilmektedir. Reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu regüle eden yolakları anlamak üzerine yapılan aynı zamanda mitokondriyal biogenezis, yağ asidi oksidasyonu ve redoks homeostazisi gibi konular üzerindeki çok sayıda çalışma, polifenoller ve benzer moleküllerin pro-oksidan etkilerinin selektif olarak tümör hücrelerini nasıl yok ettiğini ortaya koymayı hedeflemektedir (Panieri, 2016).

Hidroksisinnamik asit türevlerinin, yapılan çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında, hidroksibenzoik asit türevlerine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir

(Marinova ve Yanishlieva, 2003). Çalışmamızda kullandığımız kumarik asit de hidrokisisinamik asit grubun üyesi olan fenolik asitlerdendir. Kumarik asitin kanser üzerine etkileri kolon, akciğer kanserleri, nöroblastom gibi bir çok kanserde çalışılmış olmasına rağmen over kanseri ile ilgili veri bulunmamaktadır (Janicke vd., 2005, Sharma vd., 2018, Peng W vd. 2015, Shailasree S vd. 2015).

Çalışmamızda artan dozlarda kumarik asitin OVCAR-3 hücre serilerine uygulanması sonucunda kanser hücreleri üzerine etkileri test edilmiştir. Sitotoksik etkileri sırası ile 39.1, 78.1, 156.3, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 μM dozlarında uygulanarak test edilmiştir. MTT analizinde kontrol grubundaki hücreler ile karşılaştırıldığında 1250 μM ve üstündeki dozlarda anlamlı sitotoksikite saptanmıştır. Yine nötral kırmızısı uygulanarak yapılan karşılaştırmalarda da 1250 μM ve üstündeki dozlarda benzer sitotoksik etki gözlenmiştir. İverted mikroskop bulgularımızda sitotoksikite çalışmalarına paralel olarak, belirtilen dozlarda hücre sayısında azalma saptanmıştır. Yine hematoksilen eozin ile yapılan boyamalarda belirtilen dozlar sonrasında, hücre serilerinde hücre sayısı ve yoğunluğunda azalma, piknotik çekirdek sayısında artış izlenmiştir.

Literatür incelendiğinde kolon kanseri hücre serilerinde (Caco-2 hücre serileri) bizim sonuçlarımıza benzer şekilde 1500 μM dozunda %43-75 oranında sitotoksik etki gözlenmiştir (Jaganathan vd., 2013). Janicke ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asit ve p-kumarik asitin, Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde 1500 μM dozunda sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Janicke, 2005).

Çalışmamızda hücre migrasyonunun 1250 ve 2500 μM dozlarında belirgin olarak inhibe olduğu saptanmıştır. Bilindiği üzere tümör gelişimi ve yayılmasında tümör hücrelerinin migrasyonu kritik önem arz etmektedir. Bu mekanizma ile de kumarik asitin tümör gelişimi ve gelişim sonrası progresyonunu engelleyebileceği düşünülebilir. Aynı etki kolon ve akciğer kanseri hücre serilerinde de gösterilmiştir (Bouzaiene NB, 2015).

İmmünohistokimyasal olarak tümör hücrelerini artan kumarik asit maruziyeti sonrasında Caspaz 9 immünreaktivitesi açısından değerlendirdiğimizde; özellikle 1250 ve 2500 μM dozlarda, yine artan dozla belirginleşen Caspaz 9 immünreaktivitesi saptadık. Bu da kumarik asitin apoptotic yolları aktive ederek tümör hücresi aktivitesini azalttığını ortaya koymaktadır. Literatürde p-kumarik asitin kolon kanseri ve nöroblastom tümör hücrelerinde apoptoz mekanizmasını mitokondiral ROS sistemi

üzerinden aktive ettiği gösterilmiştir (Jaganathan, 2013, Shailasree S., 2015).

Çeşitli çalışmalarda gösterilen doz bağımlı OVCAR-3 hücrelerindeki anti tümör etkinlik bu hücre hatlarındaki pro-oksidan sitotoksik etkiye bağlanmıştır. Bu etki amentoflavon, atalantoflavon, isoliensinine, ziyuglikozid, krokin gibi birçok molekülle de benzer şekilde gösterilmiştir (Benot-Dominguez R. 2021). Bitki kaynaklı fitokimyasallar etkisiyle oluşan pro-apoptotik etki bu anti-tümör aktiviteden sorumlu tutulmuştur. Bu da temelde apoptotik prosesler ve hücre döngüsü blokajı ile sağlanmaktadır (Nasimian, 2020).

Çalışmamızda da ortaya koyulduğu gibi kaspaz 9 gibi mitokondrial apoptotik proteinlerde artış ile mitokondri bağımlı intrinsik apoptotik yollar kumarik asitle aktive edilmiştir. Yine benzer başka moleküllerle yapılan çalışmalarda reaktif oksijen radikallerinin üretimi OVCAR-3 hücrelerinde anti-tümoral etki yapan ilk mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Benot-Dominguez, 2021). Pro-oksidan moleküllerin normal hücrelere göre tümör hücrelerinde daha belirgin olarak reaktif oksijen radikallerini kritik seviyelerin üstüne çıkardığı da gösterilmiştir. Bu da tümör hücrelerine spesifik sitotoksitenin anlaşılabilmesi açısından önem arz etmektedir (Reczek, 2017). Kanser hücreleri artmış oksidatif stres durumlarında reaktif oksijen radikallerine daha duyarlı hale gelmektedir. Bu sayede kumarik asit gibi pro-oksidatif moleküllerin reaktif oksijen radikallerini arttırması tümör hücrelerini öldürmektedir. Çok yüksek seviyelerdeki radikaller DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein denatürasyonuna sebep olarak sitotoksositeye sebep olur (Ramsey, 2006).

Çalışmamızda diğer kanser türlerinde olduğu gibi kumarik asitin over kanserinde de benzer dozlarda benzer anti-tümöral, apoptotik ve anti-migratuvar etkilere sahip olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız doğal antioksidanlardan olan ve birçok kanser türünde etkisi gösterilmiş olan kumarik asitin over kanseri hücre serileri olan OVCAR-3 hücrelerinde sitotoksik ve antimigratuar etkilerini ortaya koymuş olup, apoptozisi tümör hücrelerinde arttırdığını göstermiştir. Over kanseri üzerine yapılan ilk çalışma olması açısından bu veri önem arz etmektedir. Bu çalışma ve ötesinde yapılacak çalışmalar, hem doğal antioksidanların over kanseri tedavisinde yer alabilmesi, hem de mevcut tedavilerin etkinliğinin arttırabilmesi, mümkünse kullanılan kemoterapi miktarını ve süresini azaltarak yıkıcı yan etkileri önleyebilmesi potansiyelini ortaya koymak açısından önemlidir. Over kanseri gibi agresif bir kanser türünde doğal antioksidanların da tedavide yer alabilmesi açısından benzer klinik öncesi ve daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.