

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 1 DİYABET *IN VITRO* MODELİNDE *CINNAMOMUM CASSIA*
EKSTRELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Gizem ÇANAKLI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

İZMİR
2016

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 1 DİYABET *IN VITRO* MODELİNDE *CINNAMOMUM CASSIA*
EKSTRELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Programı

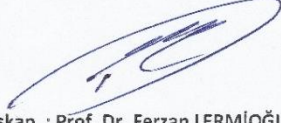
Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Gizem ÇANAKLI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

İZMİR
2016

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ



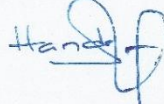
Başkan : Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD



Üye : Prof. Dr. Sema BURGAZ

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD



Üye : Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji AD

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 12.05.2016

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda özveri ile destek olan, bilimsel anlamda fikirleri ve deneyimleri ile bana yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a,

Tez çalışmamda bana bilgileriyle ve deneyimleriyle her zaman yardımcı olan ve laboratuvarının imkanlarını sunan, gülyüzünü hiç eksik etmeyen değerli hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e,

Yüksek lisans eğitimimin ders aşamasında bilgilerinden yararlandığım ve önerileriyle bana ışık tutan, anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a, Sayın Prof. Dr. Hilmi ORHAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI'ya,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, yüksek lisans sürecimde deneysel çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana büyük katkı sağlayan ve önerilerini benimle paylaşan doktora öğrencisi Börte AĞRAP'a, deneysel çalışmamda bana yardımlarıyla katkı sağlayan ekip arkadaşım Araş. Gör. Müzeyyen ÇELİKSÖZ'e,

Lisansüstü eğitimde birlikte olduğum, güzel paylaşımlara ortak olduğumuz Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı üyesi tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam, bursiyer olarak yer aldığım TÜBİTAK 112S120 nolu projenin bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu projeyi destekleyen TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu'na ve katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaşamım boyunca sevgi ve destekleriyle daima yanımda olan aileme sonsuz sevgi ve teşekkürler...

İZMİR, 18.04.2016

Gizem ÇANAKLI

ÖZET

TİP 1 DİYABET *IN VITRO* MODELİNDE *CINNAMOMUM CASSIA* EKSTRELERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tip 1 diyabet (T1DM) hastalarında oksidatif stres artışının hastalığa bağlı komplikasyonların gelişiminde rol oynadığına ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Oksidatif stres artışının oksidatif DNA hasarının artmasına neden olduğu, DNA onarım kapasitesinin yeterli olmaması nedeniyle bu durumun kanser gelişim sürecine katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle çalışmalar diyabet hastalarında oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruyucu ilaç ve doğal kaynakların araştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır.

Tarçın (cinnamon); antidiyabetik ve anti-tümör özellikleri de içeren çeşitli biyolojik etkinliklere sahip olduğu bilimsel çalışmalarla ortaya konmuş olan bitkisel kaynaklı bir üründür. Son yıllarda özellikle diyabet hastaları tarafından insülin direncinin azaltılması, kan glukoz ve lipid düzeylerinin düzenlemesi amacıyla gıda destek ürünü ya da çay formlarında kullanılmaktadır. Etkilerini araştırdığımız *Cinnamomum cassia* (*C. cassia*) ticari preparatlarda yaygın olarak bulunan tarçın türüdür. Çalışmamızda 1- Tip 1 diyabet *in vitro* modelinde *C. cassia* kabuklarından hazırlanan ekstrelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve apoptotik aktivitelerinin araştırılması; 2- Sitotoksik ve apoptotik etkisi olmayan ekstre ya da ekstrelerin endojen ve H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması; 3- Bu etkilerinin reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşumuyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada ekstrelerin IC₅₀ değerleri WST-1 testi ile saptanmıştır. Apoptotik aktivite tayini akım sitometresinde Annexin V/PI ve TUNEL testleri ile gerçekleştirilmiştir. Apoptotik aktivite göstermeyen butanol ve su ekstrelerinin endojen ve H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkileri alkali komet yöntemi ile araştırılmış, TUNEL yöntemi ile doğrulanmıştır. ROS oluşumu üzerindeki etkileri akım sitometrisinde DCF-DA testi ile tayin edilmiştir. Sonuçlar *C. cassia* su ekstresinin Tip 1 diyabet *in vitro* hücre modelinde H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini ve bu etkisinin ROS oluşumunu azaltmasıyla ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Cinnamomum cassia*; DNA hasarı; Tip 1 diyabet; apoptoz; comet testi

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *CINNAMOMUM CASSIA* EXTRACTS ON TYPE 1 DIABETES *IN VITRO* MODEL

There are a large number of studies suggesting that increased oxidative stress plays a pivotal role in the development of complications of diabetes in patients with Type 1 diabetes mellitus (T1DM). It is alleged that increased oxidative stress induces oxidative DNA damage and that it may contribute the development of cancer due to insufficient DNA repair capacity. Therefore, studies focused on investigation of the protective drugs and herbal products against to oxidative stress and DNA damage in diabetic patients.

Cinnamon is a herbal product that its diverse biological activities including antidiabetic and anti-tumor properties has been proved by scientific studies. In recent years, it is particularly used by diabetic patients in the form of tea and food supplement in an attempt to decrease insulin resistance and regulate blood glucose and lipid levels. *Cinnamomum cassia* (*C. cassia*) is a cinnamon species commonly presents in commercial cinnamon preparations. The purposes of our study were; 1- To investigate the effects of *C. cassia* bark extracts on cell viability and the apoptotic activities of the extracts on type 1 diabetes *in vitro* model; 2- To investigate of the effects of the extract(s) with no apoptotic activity on endogenous and H₂O₂-induced oxidative DNA damage; 3- To investigate the implication of reactive oxygen species (ROS) generation on these effects.

In the present study, IC₅₀ values of the extracts were determined by WST-1 test. Annexin V/PI and TUNEL tests were performed for determination of apoptotic activities, by using flow cytometry. The effects of butanol and water extracts with non-apoptotic activities on endogenous and H₂O₂-induced oxidative DNA damage were determined by alkali comet assay and confirmed by TUNEL test. The effects on the production of ROS were investigated by DCF-DA test using flow cytometry. Our results showed that the *C. cassia* water extract has protective effect against to H₂O₂-induced oxidative DNA damage and that this effect might be related to its reducing effect on ROS production in T1DM *in vitro* cell model.

Keywords: *Cinnamomum cassia*; DNA damage; Type 1 diabetes mellitus; apoptosis; comet assay

İçindekiler

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	III
ÖNSÖZ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
Tablolar Dizini.....	X
Şekiller Dizini.....	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
I.GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1 TARÇIN.....	3
II.1.1 Tarçının Tarihi.....	3
II.1.2 Tarçın Türleri	3
II.1.3 Tarçının Kullanımı	4
II.1.4 Tarçın Kabuğu Bileşenleri	5
II.1.5 Tarçının Farmakokinetiği ve İlaç Etkileşimleri.....	7
II.1.6 Biyolojik Aktiviteleri.....	7
II.1.6.1 Anti-inflamatuvar Aktivitesi.....	7
II.1.6.2 Antimikrobiyel Aktivitesi	8
II.1.6.3 Antiviral Aktivitesi	8
II.1.6.4 Antifungal Aktivitesi	8
II.1.6.5 Antioksidan Aktivitesi.....	9
II.1.6.6 Antitümör Aktivitesi	9
II.1.6.7 Antidiyabetik Aktivitesi	10
II.1.6.8 Diğer Etkileri	11
II.1.7 Toksisitesi.....	12
II.2 DİYABET HASTALIĞI (DIABETES MELLITUS)	13

II.2.1 Tip 1 Diyabet	14
II.2.2 Tip 2 diyabet.....	14
II.2.3 Diyabetin Diğer Tipleri	15
II.2.4 Oksidatif Stres ve Diyabet	15
II.3 ROS TAYİN YÖNTEMLERİ.....	19
II.3.1 DCF-DA Testi.....	19
II.4 DNA HASARI.....	19
II.4.1 DNA Hasarı Tayin Yöntemleri	20
II.5 HÜCRE ÖLÜMÜ.....	22
II.5.1 Apoptoz Tayin Yöntemleri	22
II.6 ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	24
II.6.1 Alkali Komet Yöntemi	24
II.6.2 Akım Sitometrisi (Flow Sitometri).....	25
II.7 HÜCRE CANLILIK VE PROLİFERASYON TESTLERİ.....	28
II.7.1 Sitotoksite Testleri.....	28
II.7.1.1 Tripan Mavisi Testi	29
II.7.2 Hücre Proliferasyonu Testleri	29
II.7.2.1 WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil) 2-(4-nitrofenil) 2H-5-tetrazolyo] 1,3-benzen disülfonat) Testi	31
III. GEREÇ ve YÖNTEM.....	32
III.1 GEREÇLER.....	32
III.1.1 Kullanılan Kimyasallar	32
III.1.2 Kullanılan Gereçler.....	33
III.1.3 Kullanılan Çözeltiler	33
III.1.3.1 Alkali Komet Testinde Kullanılan Çözeltiler.....	33
III.1.3.2 Diklorofluoressein (DCF-DA) Testinde Kullanılan Çözeltiler	34
III.1.3.3 TUNEL Testinde Kullanılan Çözeltiler	34

III.1.4 Materyal.....	34
III.2 YÖNTEMLER	35
III.2.1 Hücre Kültürü	35
III.2.2 Ekstre Hazırlanışı	36
III.2.3 Tripan Mavisı Testi.....	37
III.2.4 Hücre Aktivasyon Çalışması.....	37
III.2.5 WST-1 Testi.....	37
III.2.6 Deney Protokolü	38
III.2.7 Anneksin V / Propidyum İyodür Testi.....	38
III.2.8 TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi.....	38
III.2.9 Alkali Komet Yöntemi	39
III.2.10 DCF-DA Testi	40
III.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	40
IV. BULGULAR.....	41
IV.1 EKSTRAKSİYON VERİMLERİ	41
IV.2 HÜCRE AKTİVASYON ÇALIŞMA SONUÇLARI	41
IV.2.1 WST-1 Testi Sonuçları	42
IV.3 ANNEKSİN V/PI ve TUNEL TEST SONUÇLARI.....	45
IV.4 ALKALİ KOMET DENEY SONUÇLARI	49
IV.5 TUNEL, Anneksin V/PI ve DCF-DA Test Sonuçları.....	52
V. TARTIŞMA	58
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ	79

Tablolar Dizini

Tablo 1. T1DM hücre hatlarının özellikleri.....	35
Tablo 2. <i>C. cassia</i> ekstraksiyon verimleri	41
Tablo 3. T1DM hücrelerinin aktivasyon çalışma sonuçları*	42
Tablo 4. T1DM hücre hatlarında ekstrelerin 24 saat inkübasyon sonrası IC ₅₀ ve IC ₂₀ değerleri	45
Tablo 5. GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI analiz sonuçları*	45
Tablo 6. GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI analiz sonuçları*	46
Tablo 7. T1DM hücre hatlarında TUNEL analiz sonuçları*	46
Tablo 8. Ekstrelerin T1DM hücre hatlarında Anneksin V/PI yöntemine göre apoptotik ve nekrotik indeksleri.....	46
Tablo 9. Ekstrelerin T1DM hücre hatlarında TUNEL yöntemine göre apoptotik indeksleri	46
Tablo 10. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin DNA hasarı üzerindeki etkileri*	50
Tablo 11. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin T1DM hücre hatlarında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri* ..	52
Tablo 12. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen canlılık ve apoptoz üzerindeki etkileri*	54
Tablo 13. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen canlılık ve apoptoz üzerindeki etkileri*	55
Tablo 14. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin T1DM hücre hatlarında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerindeki etkileri*	56

Şekiller Dizini

Şekil 1. Sinnamil grubu içeren bileşikler	5
Şekil 2. Endosiklik çift bağ içeren bileşikler.....	6
Şekil 3. Konjuge olmayan ekzosiklik çift bağ içeren bileşikler	6
Şekil 4. Hidroksi sübstitüe alifatik bileşikler.....	6
Şekil 5. Oksiran, 2-piranon ve piran grupları içeren bileşikler	6
Şekil 6. Akım sitometri şematığı	27
Şekil 7. WST-1'in formazana dönüşümü (EC: Elektron eşleme reaktifi RS: Mitokondriyel süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid).	31
Şekil 8. Ekstrelerin GM01838 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi.....	43
Şekil 9. Ekstrelerin GM02765 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi.....	44
Şekil 10. GM01838 hücre hattında ekstrelerin apoptotik indeksleri.....	47
Şekil 11. GM02765 hücre hattında ekstrelerin apoptotik indeksleri.....	47
Şekil 12. <i>C. cassia</i> su ekstresinin GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI analiz histogramı	48
Şekil 13. <i>C. cassia</i> su ekstresinin GM01838 hücre hattında TUNEL analiz histogramı	48
Şekil 14. GM01838 hücre hattında komet analizinin floresan mikroskopundaki görüntüleri*	50
Şekil 15. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi	51
Şekil 16. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi	51
Şekil 17. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri	53
Şekil 18. <i>C. cassia</i> butanol ve su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri	53

Şekil 19. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve total apoptoz oranları (%)’nın grafiksel gösterimi..... 54

Şekil 20. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve total apoptoz oranları (%)’nın grafiksel gösterimi..... 55

Şekil 21. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerine etkileri 56

Şekil 22. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerine etkileri 57



KISALTMALAR LİSTESİ

8-OHdG	8-Hidroksi-2'- Deoksiguanozin
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AMPK	5' Adenozin Monofosfat-Aktive Protein Kinaz
AP1	Aktivatör Protein 1
CAD	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
CAT	Katalaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
DCF	Diklorofluoressein
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FBS	Fetal Bovine Serum
F-dUTP	Floresan Etiketli Dezoksiüridin Trifosfat Nükleotidler
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
GDM	Gestasyonel Diyabet
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon-S-transferaz
H ₂ DCFDA	2'7'Diklorodihidrofluoressein-Diasetat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HbA1c	Hemoglobin A1c, Glikozile Hemoglobin
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	High Density Lipoprotein
HOX-1	Hem oksijenaz-1
HPLC-ECD	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi - Elektrokimyasal Detektör
IC ₂₀	Hücre canlılığında % 20 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon
IC ₅₀	Hücre canlılığında % 50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon
ICAD	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL-6	İnterlökin-6
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

LDH	Laktat Dehidrogenaz
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MDA	Malondialdehit
MHCP	Metil Hidroksi Kalkon Polimerleri
NaCl	Sodyum Klorür
NAD+	Okside Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NaOH	Sodyum Hidroksit
NFκB	Nükleer faktör-kappa B
NHMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
NMA	Normal Erime Noktalı Agaroz
NO	Nitrik Oksit
NT-3	Nörotropin-3
PBS	Fosfat Tampon Çözeltili
PKC	Protein Kinaz C
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
PS	Fosfatidil Serin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
TDI	Tolere Edilebilen Günlük Alım Düzeyi
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör α
TrxR	Tiyoredoksin Redüktaz
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick-End Labeling
WST	Water Soluble Tetrazolium

I.GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM; diyabet hastalığı) tüm dünyada en sık görülen, morbidite ve mortaliteye neden olan kronik hastalıklardan birisidir. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte dünyada diyabet prevalansı hızla artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre 2015 yılı itibari ile dünyadaki diyabetli birey sayısı 415 milyon iken bu sayının 2040 yılında % 55 oranında artarak 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Bu artışın başlıca nedenleri nüfus artışı, yaşlanma ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucu obezite ve fiziksel inaktivitenin artmasıdır. 2013 yılında yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP-II) çalışması sonuçlarına göre ülkemizde tip 2 diyabet prevalansı % 13.7 olarak bulunmuştur. IDF'in 2035 yılı tahminlerine göre Türkiye, diyabetli nüfus itibarı ile diyabetin en yüksek olacağı dünyadaki ilk 10 ülke arasına girecektir. Dünyada artık bir epidemi olarak nitelendirilen diyabet, insan sağlığını olumsuz etkilemekte, yaşam kalitesini ciddi anlamda bozmaktadır. Sonuç olarak iş gücü kaybı ile birlikte bakım ve tedavi masrafları ülke ekonomisini de olumsuz yönde etkilemektedir.

DeneySEL ve klinik çalışmalar diyabet hastalığında ROS oluşumunun arttığını ve diyabet hastalığının başlamasının oksidatif stresle yakın ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek düzeyde serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmalarının azalmasının neoplastik dönüşümü de içeren diyabet komplikasyonlarının başlaması ve ilerlemesinden sorumlu olduğunu destekleyen çok sayıda veri bulunmaktadır. Tip 1 diyabette hücre içi glutatyon gibi antioksidan komponentlerin aşırı tüketimine bağlı olarak enzimatik/nonenzimatik antioksidan korunmanın azaldığı, flavonlar, karotenoidler, E ve C vitaminleri gibi antioksidan bileşiklerin düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Antioksidanların ya da direkt olarak serbest radikalleri süpürücü ajanların ROS reaksiyonlarının oluşum ya da ilerlemelerini azaltabilecekleri ve sonuç olarak oksidatif stresi azaltarak diyabet ve komplikasyonların oluşum ve ilerlemesini engelleyebilecekleri hipotez edilmiştir.

Tarçının antioksidan, antidiyabetik ve anti-tümör özelliklere sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur. Diyabet hastaları tarafından insülin direncinin azaltılması, kan glukoz ve lipid düzeylerinin düzenlenmesi amacıyla çay formunda ya da gıda destek ürünü olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak diyabet hastalarındaki yararına ilişkin kanıtlar yeterli değildir ve FDA tarafından ilaç olarak onay almamıştır. Diğer taraftan son yıllarda tarçın ekstrelerinin *in vitro* olarak çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktivite gösterdiği moleküler düzeyde gösterilmiştir. *C. cassia* kabuk ekstre ve bileşenlerinin

etkilerine ilişkin çalışmalar daha çok antidiyabetik ve antikanser etkileri ile mekanizmalarına yönelik çalışmalardır. Kullanımının diğerk hücrelerdeki etkilerine ilişkin bilgiler yetersizdir.

Daha önce laboratuvarımızda *C. cassia* kabuklarından hazırlanan farklı ekstrelerin çeşitli hücre hatlarında ve sağılıklı insan periferel kan lenfositlerinde antioksidan, pro-oksidan ve sitotoksik aktivitelere ilişkin çalışmalar yapılmıştır. Tip 1 diyabette *C. cassia*'nın oksidatif stres ve ROS oluşumuna karşı etkilerinin araştırıldığı *in vivo* ya da *in vitro* araştırmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında *C. cassia* kabuk ekstrelerinin Tip 1 diyabet hastalarında oksidatif stres oluşumuna karşı koruyucu etkilerini ve olası sitotoksik/apoptotik etkilerini *in vitro* olarak araştırmayı amaçladık. *In vitro* alışma modeli olarak Coriell Enstitüsü (NewJersey, ABD) koleksiyonundan sağılanan insan periferel kan lenfosit hücre hatlarını kullandık. Bu hücreler Tip 1 diyabetli gönüllülerin periferel kan lenfositlerinin Epstein Barr virüsü ile transfeke edilmesi ile hazırlanan immortalize hücrelerdir. Bu tip hücre hatlarının hücrelerin alındığı bireye özgü metabolik yolakları temsil ettiğı gösterilmiştir. Çalışma konumuzla ilgili olarak bu hücre hatlarının kullanıldığı bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle belirtilen hücre hatlarında *C. cassia* ekstrelerinin etkilerinin araştırılması çalışmamızı özgün kılmaktadır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1 TARÇIN

Tarçın; *Lauraceae* (Defnegiller) familyasında yer alan, yaprak dökmeyen çok yıllık bir ağaçtır. Tarçın baharatı ağacın gövde ve dal kabuklarının dış kısmı sıyrıldıktan sonra kalan iç kabuğun kurutup öğütülmesiyle elde edilir; kabuklarının iç içe konularak rulo gibi kıvrılmasıyla da çubuk tarçın elde edilir (1).

II.1.1 Tarçının Tarihi

Tarçın insanlık tarihinin en eski baharatlarından biridir. Kullanımı M.Ö 2800 yıllarına dayanmaktadır. Tarçın hakkında en eski bilgilere Çin kaynaklarında ulaşılmıştır. Tarçın önceleri Çin dilinde “kwai” olarak geçmekteydi. İncil’de bunun Musa Peygamber tarafından vaftiz amacıyla başa sürülen kutsal yağın bir bileşeni olduğundan bahsedilir. Tarçın o dönemlerde sindirim ve solunum sistemindeki rahatsızlıklarında kullanılmıştır. Ayrıca Romalılar tarafından cenaze törenlerinde ölü bedenlerin kokusunu uzaklaştırmak amacıyla, Mısırdaki ise mumyalama işlemlerinde kullanılmıştır; bunun yanında koku ve tat özelliklerinden de yararlanılmıştır (2). Tarçın antik dönemlerde hükümdarlara ve tapınaklara hediye olarak sunulan ve zenginlik göstergesi olan önemli bir baharattı (3).

Tarçın, Çin’den Fenikelilere, sonraki tarihlerde Araplara ulaşmıştır. Orta çağlarda tarçının kaynağı Araplar tarafından Batı dünyasına karşı gizli tutulmuştur. Bu baharatın Sri Lanka’da yetiştirildiğinden ilk kez 1270’de bahsedilmiştir (4). Hindistan deniz yolunun keşfi ile Portekizliler 16. yy’ın başlarında baharat ticaretini ele geçirmişler ve Arap egemenliğini sona erdirmişlerdir (5). O yıllarda tarçın ticaretinde öncelikle Portekizliler, ardından Hollandalılar ve 1815’de İngilizler hüküm sürmüştür. Günümüzde tarçın, temel olarak Negombo’dan Matara’ya kadar uzanan Sri Lanka kıyılarında yetiştirilmektedir (2).

II.1.2 Tarçın Türleri

Bugüne kadar tarçının yaklaşık 250 türü tanımlanmıştır. En çok kullanılan iki türü *Cinnamomum cassia* (*C. cassia*; *C. aromaticum*) ve *Cinnamomum zeylanicum* (*C. zeylanicum*; *C. verum*)’dur.

Cinnamomum, Malezya ve Endonezya dillerinde tatlı ağaç anlamına gelen “*kayu manis*” sözcüğünden Yunancaya geçen “*κιννάμωμον kinnámōmon*” kelimesinden köken almıştır. *Cassia* adı Latin kökenli olup İbranice kabuktan çıkarılan anlamındaki “*qātsa*” sözcüğünden türetilmiştir (6).

C. cassia “Çin Tarçını” olarak da bilinir; Çin, Vietnam ve Endonezya’da yetişir. *C. zeylanicum* (*C. Verum*, Sri Lanka tarçını ya da Seylan tarçını) “Gerçek tarçın” olarak bilinir ve Sri Lanka (Seylan) ve güney Hindistan’a özgüdür. Dünyada yıllık üretimi 27,500–35,000 ton olan tarçının önemli kısmını bu iki tür oluşturur (7). Daha az olarak kullanılan diğer bazı türler, çoğunlukla Endonezya ve Sumatra’da yetişen *C. burmannii* (Korintje, Padang cassia veya Endonezya tarçını), Vietnam’da yetişen *C. loureiroi* (Saygon tarçını, Vietnam tarçını), Avustralya’da yetişen *C. oliveri*, Yeni Gine’de yetişen *C. Papua* ve Hindistan ve Nepal’de yetişen *C. tamala*’dır. Dünyada tarçın üretimi en fazla Sri Lanka’da yapılmaktadır (8).

C. cassia kabuğu içeriğinde yüksek miktarda bulunan sinnamaldehit (% 5-6) nedeniyle kırmızımsı koyu kahverengi renktedir; 2-3 mm kalınlıkta tek tabakalı sert katmandan oluşur. Keskin aromaya sahiptir ve ağızda yakıcı lezzet bırakır. % 1-5 kumarin içermektedir. Ülkemizde ve diğer Avrupa ülkeleri ve ABD’de bulunan ticari tarçın preparatları ucuz olması nedeniyle *C. cassia* içerirler ya da *C. zeylanicum* ile karıştırılmış formda bulunurlar. Seylan tarçın kabuğu ise açık kahverengi renkte, ince ve kolay kırılabilir yapıdadır. *C. cassia*’ya göre daha güzel aromaya sahiptir; kokusu hafiftir. Kumarin içeriği düşüktür (% 0,01) (9).

II.1.3 Tarçının Kullanımı

Tarçının çok eski yıllardan beri halk hekimliğinde gastrointestinal rahatsızlıklarda (gaz giderici olarak, karın ağrıları, şişkinlik, diyare gibi durumlarda), geçici yorgunluklarda, antibakteriyel ve antihelmintik olarak, soğuk algınlığı ve grip vakalarında kullanıldığı bilinmektedir (10). Çin Tıbbında cinsel güçsüzlük, diyare, üriner inkontinans, romatizma, nefes darlığı, menopoza, menstural düzensizliklerde abortus amacıyla, nöroprotektif olarak ve diyabet hastalığında, ayrıca immün sistemi güçlendirmek için; Hint tıbbında sindirim sistemi rahatsızlıkları, diyare gibi durumlarda kullanıldığına ilişkin kayıtlar bulunmaktadır (11,12).

Son yıllarda yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda tarçının insülin direncini azalttığı, kolesterol, trigliserit ve kan glukoz düzeylerinde düşmeye neden olduğuna dair veriler elde edilmiştir (13). Bu nedenle metabolik sendrom, insülin direnci, tip 1 ve tip 2 diyabet, hiperlipidemi ve artrit gibi hastalıklar için önleyici ve terapötik destek olarak kullanılmaktadır. Ancak yararlılığı konusunda yeterli kanıt olmadığı için tarçının ilaç olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmamıştır.

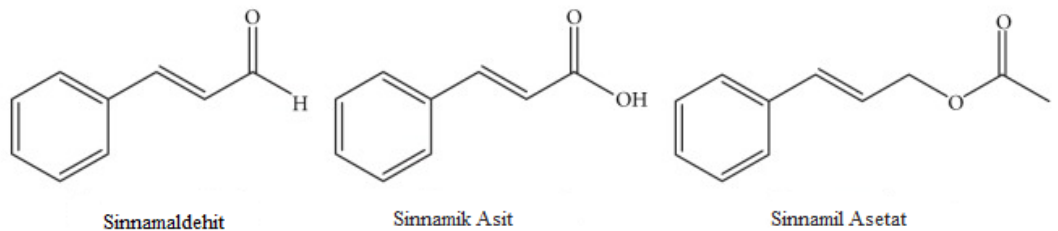
Günümüzde tarçın tat, koku özellikleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Kötü kokuyu giderici ve oral enfeksiyonları önleyici özellikleri nedeniyle gargara, diş macunu gibi kişisel hijyen ürünlerinin bileşeni olarak, bunun yanında yine antibakteriyel özellikleri ve hoş kokusu nedeniyle parfümlerde ve diğer kozmetik

ürünlerinde kullanılmaktadır. Tadı ve esansiyel yağlarının gıdalardaki bakterilere karşı antimikrobiyel aktivitesi nedeniyle gıda matrislerinde, şurup ve pastillerde kullanımı mevcuttur (14,15).

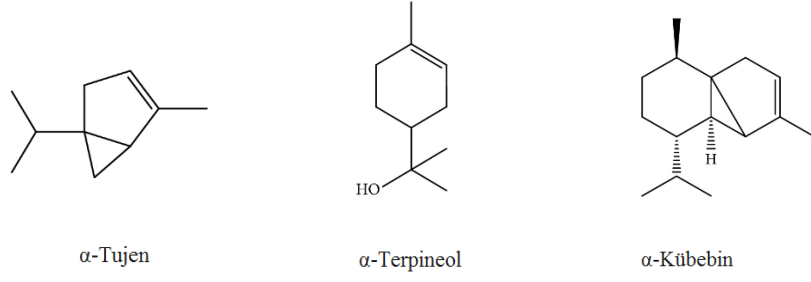
II.1.4 Tarçın Kabuğu Bileşenleri

Tarçın çeşitli reçine özelliğindeki bileşiklerden ve çok sayıda esansiyel yağlardan oluşur. Tarçın kabuğunda çok sayıda flavonoidler, glikozidler, kumarinler, alkaloidler, antrakınonlar, steroidler, tanenler ve terpenoidler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda geniş çeşitlilikte *trans*-sinnamaldehit, sinnamik asit, sinnamil asetat, öjenol, kafur, L-borneol, karyofilen oksit, β -karyofilen, L-bornil asetat, linalool, metil kavikol, E-nerolidol, α -kübebin, α -terpineol, terpinolen ve α -tujen gibi esansiyel yağların varlığı bildirilmiştir (18,19).

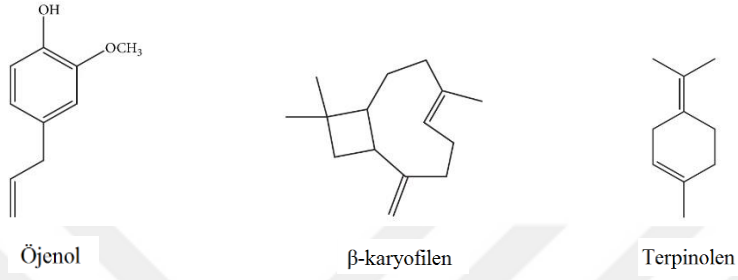
C. cassia kabuğunda % 1-4 oranında bulunan uçucu yağın temel bileşenleri sinnamaldehit (% 75-90), *o*-metoksi-sinnamaldehit (% 10-11) ve kumarindir. Düşük konsantrasyonlarda 32 bileşik daha saptanmıştır. Kabukta ayrıca tanen ve sinzeylanol, sinzeylanin gibi insektisit etkinliğe sahip diterpenler bulunur. Sinkasyol A-B gibi diğer diterpen türevleri glikozid ve serbest aglikonlar şeklinde bulunmaktadır. *C. cassia* kabuğunda ayrıca ferulik asit, salisilik asit, vanilik asit, siringik asit gibi çeşitli organik asitler ve % 4-5 oranında müsilaj olduğu saptanmıştır (16,17). He ve ark. *C. cassia* kabuğunda yüksek içerikte sinnamaldehit (13.01–56.93 mg/g) varlığını bildirmişlerdir (18). Tarçının keskin tadı ve kokusu tarçının esansiyel yağlarından, özellikle de kabuktaki esansiyel yağların yaklaşık % 90'ını oluşturan sinnamaldehitten gelir. Şekil 1-5'te tarçının bazı bileşenlerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir (7).



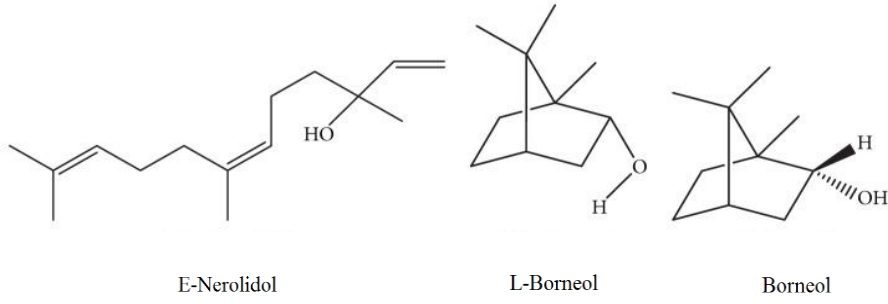
Şekil 1. Sinnamil grubu içeren bileşikler



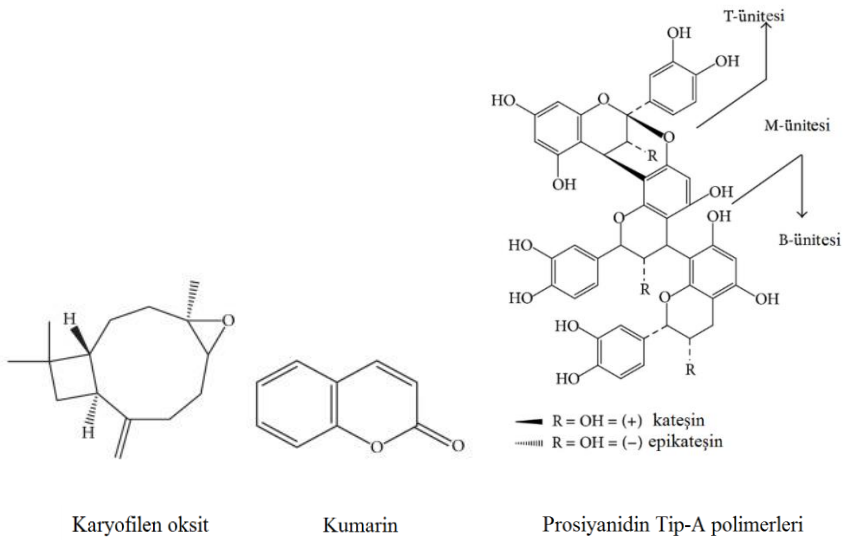
Şekil 2. Endosiklik çift bağ içeren bileşikler



Şekil 3. Konjuge olmayan ekzosiklik çift bağ içeren bileşikler



Şekil 4. Hidroksi süstitüe alifatik bileşikler



Şekil 5. Oksiran, 2-piranon ve piran grupları içeren bileşikler

II.1.5 Tarçının Farmakokinetiği ve İlaç Etkileşimleri

Tarçın kabuğunun sıcak su ile infüzyonunda bulunan sinnamik asitin *in vivo* farmakokinetik verileri mevcuttur (19). Esansiyel yağlardaki sinnamik asite ait farmakokinetik veriler bulunmamaktadır. Tarçın kabuğunun sıcak su infüzyonu ile alındığında sinnamik asitin oral biyoyararlanımı artmaktadır. Sinnamaldehit oksidasyona oldukça yatkındır. Sinnamaldehitin sıçanlara verilmesi sonrası idrar örneklerinde hippurik asit, benzoik asit ve sinnamik asit bulunmuştur (20).

Bir araştırmada *Ramulus Cinnamomi*'nin kaynatılması yoluyla sıçanlara oral uygulamayla verilen 7.4 g/kg sinnamik asit ile (7.62×10^{-5} mol/kg sinnamik asit ve 1.77×10^{-5} mol/kg sinnamaldehit içeren), benzer şekilde kaynatılarak oral uygulama ile sıçanlara verilen 7.62×10^{-5} mol/kg saf sinnamik asitin farmakokinetikleri karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar sinnamik asitin hızlıca absorbe edilip hippurik asite metabolize olduğunu ve *Ramulus Cinnamomi*'deki sinnamik asitin biyoyararlanımının saf sinnamik asitten fazla olduğunu göstermişlerdir. Sıçanlara 3.79×10^{-4} mol/kg sinnamaldehitin intragastrik uygulamasından sonra, sinnamaldehit midede ve ince barsakta kısmen, karaciğerde ise kana absorbe olmadan önce neredeyse tamamen sinnamik asite metabolize olmuştur (21).

In vitro bir çalışmada *C. cassia* kabuğunun (2 g/100 ml) tetrasiklin hidroklorürün çözünmesini önemli derecede geciktirdiği gösterilmiştir. Jelatin kapsüllerindeki HCl yalnızca su kullanıldığında 30 dakikada %97 oranında çözünürken *C. cassia* kabuğu ile birlikte kullanıldığında %20 oranında çözünmüştür (22).

II.1.6 Biyolojik Aktiviteleri

II.1.6.1 Anti-inflamatuvar Aktivitesi

C. cassia'nın siklooksijenaz-2 (COX-2) ve nitrik oksit oluşumunu inhibe ederek güçlü anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. Hong ve ark. *C. cassia* metanol ekstresinin (10 µg/ml) COX-2 aktivitesini % 81,7 oranında, iNOS'ları ise % 62,4 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır (23). Tarçının sulu ekstresinin *in vitro* çalışmalarda TNF- α (tümör nekroz faktörü α) ve IL-6 (interlökin 6) düzeylerinde azalmaya neden olarak anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir (24). Çalışmalarda tarçın kabuk bileşenlerinden *trans*-sinnamaldehit, karyofilen oksit, öjenol, L-borneol bileşiklerinin anti-inflamatuvar etkileri gösterilmiştir (25). Lee ve ark. sinnamaldehit türevleri içerisinde en etkili olanın 2'-hidroksisinnamaldehit olduğunu ve antiinflamatuvar bir ajan olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (26).

II.1.6.2 Antimikrobiyel Aktivitesi

Tarçın kabuk yağı, sinnamaldehit ve öjenolün *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* gibi çok sayıda Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmaya karşı güçlü antimikrobiyel etki gösterdikleri bildirilmiştir (27–29).

II.1.6.3 Antiviral Aktivitesi

C. cassia'nın HIV'e karşı güçlü etkinlik gösterdiği saptanmıştır. *C. cassia* kabuk ekstraktları HIV ile enfekte olmuş MT-4 hücrelerinde virüslerin indüklediği sitopatojenitenin inhibisyonu açısından HIV-1 ve HIV-2 replikasyonuna karşı yüksek oranda etkili bulunmuştur (30). Tarçın kabuğundan elde edilen trans-sinnamealdehitin influenza A/PR/8 virüsünün büyümesine karşı inhibitör etki gösterdiği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (31).

In vitro veriler *C. cassia* kabuk yağının, sulu ve etanolik ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, HIV- ve influenza virüslerine karşı sırasıyla güçlü antibakteriyel ve antiviral özellikleri olduğunu ortaya koymaktadır (32).

II.1.6.4 Antifungal Aktivitesi

Mastura ve ark. çok sayıda *Cinnamomum* türü esansiyel yağlarının orta düzeyde antikandidal (*Candida albicans*, *C. glabrata*) ve antidermatofitik (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*) aktivite gösterdiklerini *in vitro* olarak göstermişlerdir (33).

Simic ve ark. *C. zeylanicum* esansiyel yağının 17 mantar türüne karşı (*Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium ochrochloron*, *P. funiculosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. Fulvium*, *Trichoderma viride*, *Fusarium tricinctum*, *F. sporotrichoides*, *Phoma macdonaldii*, *Phomopsis helianthi*, *Mucor mucedo*) güçlü antifungal aktivite gösterdiğini saptamışlardır (34). Singh ve ark. sinnamik aldehit tarçın kabuk yağının aktif fungitoksik bileşeni olarak tanımlamışlardır (35).

Tarçın yağının, 500 ppm konsantrasyonda *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Fusarium moniliforme*'nin büyük çoğunluğunun büyümesini inhibe ettiği, 1000 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda ise hepsinin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (36–38).

II.1.6.5 Antioksidan Aktivitesi

Tarçında antioksidan aktivite gösteren öjenol, gamma-terpinen, salisilik asit, tanenler, kamfen gibi fitokimyasallar, A- ve B-tipi prosiyanidinler ve kateşinler bulunmaktadır (39,40). Yapılan çeşitli çalışmalarda *C. cassia* kabuk ekstralarının yüksek düzeyde antioksidan içerdikleri, *in vitro* koşullarda lipid peroksidasyonunu α -tokoferolden daha fazla inhibe ettikleri bildirilmiştir (41,42). Murcia ve ark. tarçının süperoksit radikal süpürücü etkisinin hemen hemen propil gallatla eşit olduğunu göstermişlerdir (43).

C. cassia etanol ekstresinde bulunan esansiyel yağ bileşenleri (sinnamaldehit, sinnamik asit, sinnamil alkol), flavonoidler ve tanenin güçlü antioksidan aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (44). Öjenol bileşeninin *in vitro* modellerde peroksinitrit tarafından indüklenen nitrasyonu ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Etanol ekstresinin karbon tetraklorürle indüklenen lipid peroksidasyonunu azalttığı ve MDA (malondialdehit) gibi oksidatif stres göstergelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (41).

II.1.6.6 Antitümör Aktivitesi

Tarçın ve bileşenlerinin antineoplastik aktivitelerine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Lenfoma ve lösemi hücre hatlarında yapılan çalışmalarda tarçın ekstralarının kanser hücrelerinde hücre döngüsünü G2/M fazında bloke ederek proliferasyonu önemli oranda azalttıkları gösterilmiştir (45). Kwon ve ark. *C. cassia* su ekstresinin antitümör aktivite gösterdiğini ve bu etkisinin NF κ B ve AP1 aktiviteleri ile onların hedef genlerini inhibe etmesi ve pro-apoptotik aktiviteyi artırmasıyla ilişkili olabileceğini *in vivo* ve *in vitro* olarak göstermişlerdir (46). *C. cassia*'nın farelerde benzo[α]piren ve siklofosfamide karşı antimutajenik etkisi Ames testi, kemik iliği kromozomal aberasyon testi ve mikronükleus testi ile ortaya konmuştur (47). *C. zeylanicum* ve *C. cassia* sulu ekstralarının serviks kanserinde apoptozu indükledikleri saptanmıştır (48).

Tarçın ekstralarının çeşitli kanser tiplerinin gelişimine karşı koruyucu etkilerinin içeriklerindeki polifenollerin antioksidan aktivitesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (49).

Lee ve ark. *C. cassia* kabuk ekstralarının altı insan tümör hücre hattındaki sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir (50). Çalışılan hücre hatlarında *trans*-sinnamaldehit güçlü sitotoksikite göstermiştir. Sinamaldehitin antimutajenik etkiler gösterdiği ve karsinogenez oluşumunu inhibe edebileceği belirtilmiştir. Sinamaldehitin FDA/WHO tarafından kabul edilen günlük alım düzeyi (ADI) 1.25 mg/kg'dır (51).

Trans-sinnamaldehit ve analogları olan 2-hidroksi sinnalaldehit ve 2-benzoiloksi sinnalaldehitin antitümör aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Bir grup orto-süstitüe sinnalaldehit analogunun antiproliferatif ve tiyoredoksin redüktaz (TrxR)-inhibitör aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, sinnalaldehitin zayıf sitotoksik ve TrxR inhibitörü aktivite gösterdiği, hidroksi ve benzoiloksi türevlerinin sitotoksiteleri ve buna paralel olarak TrxR inaktivasyon aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak TrxR inaktivasyonu sinnalaldehit sitotoksitesiyle ilişkilendirilmiş ve sinnalaldehitin kemoterapötik ve kemopreventif ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (52).

II.1.6.7 Antidiyabetik Aktivitesi

Tarçının vücuttaki glukoz düzeylerini düzenlemesindeki rolü çok sayıda randomize kontrol deneylerinde belirtilmiştir. Ancak, sonuçlar çelişkili veya yeterince anlamlı değildir. Bazı çalışmalar yararlı etkiler olmadığını gösterirken bazıları ise tarçın ile kolesterol düzeylerinde, sistolik kan basıncında, insüline duyarlılıkta ve postprandial glukoz düzeylerinde iyileşmeler olduğunu ortaya koymuştur (53). Tarçının diyabetteki etki mekanizmasına ilişkin yayımlanan çeşitli araştırmalar, tarçının insüline benzer etki gösterdiğini ve insüline duyarlılığı artırdığını ileri sürmektedir (54).

Allen ve ark. tarafından 543 hastada gerçekleştirilen bir meta-analiz çalışmasında, tarçının 120 mg/gün-6 g/gün dozlarında 4 ay kullanılmasının tokluk plazma glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya ve lipid profilinde iyileşmeye yol açtığı gösterilmiştir (13). Özellikle 1-6 g/gün doz aralığında tarçın kullanımının glisemik parametrelerde, 1g/gün dozunda kullanımının total kolesterol, LDL ve trigliserit düzeylerinde iyileşmeye neden olduğu rapor edilmiştir.

C. cassia sinyal proteinlerinin fosforilasyonunda ve insüline duyarlı glukoz taşıyıcıların ekspresyonunun artırılmasında ve bunun sonucunda insülin direncinin azaltılmasında önemli rol oynar (55). Tarçın su ekstreğine sürekli maruziyetin PPAR (peroksizom proliferatör aktive edici reseptör)- α ve - γ ekspresyonunda artışa neden olduğu, bu etkinin tarçının insülin direncindeki rolüne katıldığı bildirilmiştir (56).

Tarçının hipoglisemik aktiviteden sorumlu aktif bileşiği tartışmalıdır (57). Bugüne kadar hipoglisemik özellikte çeşitli bileşikler izole edilip hayvan çalışmalarında ve klinik denemelerde kullanılmıştır. Babu ve ark. tarçın kabuğundan izole edilen sinnalaldehitin streptozotosinle indüklenen diyabetik sıçanlarda plazma glukoz ve HbA1c düzeylerinde belirgin azalışa sebep olduğunu göstererek sinnalaldehitin pankreas β hücrelerinden insülin

sekresyonunun artması ve sonuç olarak glukoz düzeylerinin normalleşmesinden sorumlu olduğu sonucuna varmışlardır (58). Diyabet tedavisinde yüksek sinnamaldehit içeriğinden (%85) dolayı genelde *C. cassia* kullanılır (8). Anderson ve ark. tarçının antidiyabetik etkilerinden sorumlu aktif bileşenlerinin suda çözünür bileşikler olabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, *C. cassia*, *C. verum*, *C. burmanni* ve *C. Loureirii* den örnekler test edilmiştir. Tarçından izole edilen suda çözünür polifenolik bileşiklerin antioksidan aktivite gösterdikleri ve insülin etkisini potansiyalize ettikleri gösterilmiştir. Flavonoid trimerleri ve tetramerleri olan kateşin ve epikateşin tarçın polifenolleridir. Bu tarçın polifenolleriyle çifte bağlı prosiyanidin tip-A polimerleri insülin benzeri aktivitelerinden dolayı eşsizdir (59).

Tarçının antidiyabetik aktivitesinin olasılıkla insülin sinyal yolağının farklı aşamalarındaki etkisine bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (60). Tarçının insülin reseptörlerinin otofosforilasyonlarında artışa, defosforilasyonlarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (61). Tarçın GLUT4 reseptörlerinin ekspresyonunu, insülin reseptörlerinin ve insülin reseptör substratlarının miktarlarını artırarak glukozun hücrelere girişini kolaylaştırır (47). Bunun yanında PPAR (α) ve PPAR (γ) ekspresyonunu artırarak plazma trigiliserit düzeyini düşürürken plazma HDL kolesterol düzeyini ve aynı zamanda insüline duyarlılığı artırır (62).

II.1.6.8 Diğer Etkileri

Yapılan çalışmalarda tarçının hepatoprotektif, insektisit, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkileri olabileceği bildirilmiştir.

Tarçın alkol ekstresinin, farelerde karaciğer yağlanmasını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Tarçının koruyucu etkisinin, ekstreinin Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile etkileşimine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (63). *C. cassia* bileşenleri olan *trans*-sinamaldehit, öjenol, salisilaldehit ve *trans*-sinamik asitin *Mechoris ursulus*'a karşı güçlü insektisit aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (64). DJ-1 genindeki değişiklikler Parkinson hastalığında önemli role sahiptir. Bir tarçın metaboliti olan sodyum benzoatın fare santral sinir sisteminde DJ-1 genini, nörotropik faktörleri ve nörotropin-3 (NT-3)'ü upregule ettiği gösterilmiştir (65,66). Başka bir çalışma *C. zeylanicum* su ekstresinin Alzheimer hastalığının temel iki özelliği olan tau agregasyonunu ve filament oluşumunu düşürebileceğini rapor ederek tarçının Alzheimer hastalığının tedavisindeki potansiyelini belirtmiştir (67). Son yıllarda yapılmış bir çalışma *C. cassia*'dan izole edilen sinamaldehit ve sinamik asitin miyokardiyal iskemiye karşı potansiyel etkilerini rapor ederek tarçının kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki potansiyelini ortaya koymuştur (68).

II.1.7 Toksisitesi

Mevcut olan bilimsel verilere göre tarçında bulunan toksisite oluşturabilecek temel bileşenler; kumarin, sinnamaldehit, safrol ve stirendir.

Kumarin (benzo- α -piron), başta tarçın olmak üzere, hintbaklası, vanilya, turunçgiller ve yeşil çayda geniş çeşitlilikte bulunan, hoş bir tada ve antikoagülan aktiviteye sahip bir bileşiktir. *C. cassia* %1 kumarin içeriğine sahipken *C. zeylanicum* iz miktarda (%0.004) kumarin içerir (9). Kumarin sıçanlarda hepatotoksik etki gösterirken farelerde akciğer hasarına neden olur. Uzun süreli çalışmalar kumarinin sıçan ve farelerde yüksek dozlarda karaciğer ve akciğer tümörlerini indüklediğini ortaya koymuştur (69). Kumarinin 200 mg/kg dozda B6C3F1 farelerine kronik olarak gavajla uygulanması Clara hücrelerinin ölümüne, alveolar/bronşiyoler adenoma ve karsinoma insidensinde istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olmuştur (70).

Sıçanlarda ve farelerde uzun süreli çalışmalarda gözlenen kumarin hepatotoksitesi ve karsinojenik etkileri, 3,4-kumarin epoksit yolağı üzerinden oluşan reaktif kumarin metabolitlerinin sebep olduğu sitotoksiteyle ilişkilidir. İnsan popülasyonunun çoğunluğu, sıçanlardakinden (3,4-kumarin epoksidasyon yolağı) farklı bir kumarin metabolizması yolağına (7-hidroksikumarin) sahiptir. Bozulan CYP2A6 aktivitesine sahip insanlarda 3,4-kumarin epoksit yolağı tercih edildiğinde bu insanlar daha yüksek kumarin karsinojenitesi riski altında olabilirler. Ancak, kumarin karsinojenitesinin genotoksisiteyle ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) 2008'de kumarinin insanlar üzerindeki metabolik etkilerini göz önünde bulundurarak "Tolere Edilebilen Günlük Alım Düzeyini (TDI)" 0.1 mg/kg vücut ağırlığı olarak saptamıştır (69). Düşük metabolizmaya sahip alt popülasyonlar için bile bu eşik değerli yaklaşım düşünüldüğünde kumarinin güvenli olduğu ortaya konmuştur (52). Günlük vücut ağırlığı başına 0.1 mg'dan fazla kumarin alımı hastanın eş zamanlı olarak varfarin gibi bir ilaç kullanması durumunda kan koagülasyon profilinde de dikkat çekici etkilere yol açmaktadır (2).

Gebeliğin ilk trimesterinde kumarin maruziyeti malformasyonlara sebep olabilir (71). Tarçındaki sinnamaldehitin de teratojenik aktivite potansiyeli nedeniyle gebelerde risk oluşturabileceği tartışılmaktadır. Tarçının belirlenmemiş yüksek miktarlarının gebelerde methemoglobinemi, hematüri, albüminüri ve silindirüriye neden olduğu rapor edilmiştir. Düşük bu etkiler arasında bulunmamaktadır (72).

C. cassia kabuğunun içeriğindeki uçucu yağlar nedeniyle alerjik reaksiyonlara yol açtığı bilinmektedir. *C. cassia* su ekstrelerinin tip II ve tip III alerjik reaksiyonları inhibe ederken tip IV

reaksiyonlarını önlemediği gösterilmiştir (73). Tarçın kabuk yağı ve sinnamaldehit 0.2 g/gün'ü aşan dozlarda iritan özelliklere sahiptir (74).

Tarçında toksisite oluşturabilecek diğer bileşikler safrol ve stirendir. Safrol tarçında normalde iz miktarlarda bulunur. Ancak yüksek miktarları tarçının yapraklarından elde edilen yağlarda bulunmaktadır. Safrolun yüksek dozlarda sıçanlarda hepatokarsinogenik ve genotoksik etkileri mevcuttur. Stiren doğal koşullarda sinnamaldehit ve sinnamik asitin degradasyonu sonucunda tarçın ağacında bulunur. Kabukta 0.1 mg/kg konsantrasyonlara ulaşır. Toplanan tarçın kabuğunun kurutulması, taşınması ve depolanması sırasında yüksek sıcaklıklarda ve yüksek nemli ortamlarda stiren yüksek konsantrasyonlara çıkabilir. Kronik stiren maruziyeti santral sinir sistemi üzerinde baş ağrısı, yorgunluk, depresyon, santral sinir sisteminde fonksiyon bozuklukları, periferik nöropati gibi etkilere neden olmaktadır (75). Toksikolojik açıdan safrol ve stirenin güvenli konsantrasyonu, Braunschweig Gıda Enstitüsü tarafından 22 mg/kg'a kadar olan konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir (76).

Tarçının yüksek dozlarına uzun süreli günlük maruziyet ile ilgili toksikolojik veriler ve karsinogenik ve mutajenik potansiyeli hakkında yeterli veri mevcut değildir. Tavsiye edilen günlük doz (2–4 g) klinik ya da epidemiyolojik veriler ile desteklenmemiştir.

II.2 DİYABET HASTALIĞI (DIABETES MELLITUS)

Diabetes mellitus; pankreas insülin sekresyonunun mutlak veya görece yetersizliği veya insülin etkisizliği ya da insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucu gelişen, hiperglisemi ve glukagon yüksekliği ile karakterize; karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, akut metabolik ve kronik dejeneratif komplikasyonlara neden olan bir sendromdur (77).

Diyabetin gelişiminde, insülin yetersizliği ile sonuçlanan pankreas β hücrelerinin otoimmün harabiyetinden insülin etkisine direnç gelişimine kadar değişen çeşitli patojenik süreçler yer almaktadır. Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anomalilerin temeli insülinin hedef dokulardaki eksikliğidir. İnsülinin etkisindeki yetersizlikler, yetersiz insülin sekresyonu ve/veya dokuların insüline yanıtının azalmasından kaynaklanmaktadır.

İyi kontrol edilemeyen hiperglisemi uzun dönemde, vücudun çeşitli organ ve sistemlerinde hasarlar, fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikler ile seyreder. Hastalık genellikle ağız kuruluğu, polidipsi, poliüri, bulanık görme ve kilo kaybı gibi semptomlar ile ortaya çıkar.

Daha ağır durumlarda ise ketoasidoz veya non-ketotik hiperozmolar hiperglisemi gelişerek stupor, koma, hatta ölüm ile sonlanabilir (78).

Diyabetin kronik komplikasyonları vasküler ve vasküler olmayan komplikasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Vasküler komplikasyonlar da, mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler (koroner arter hastalığı, serebral arter hastalığı, periferik arter hastalığı, renal arter hastalığı) komplikasyonlar olarak gruplandırılmaktadır. Diğer kronik komplikasyonlar diyabetik ayak, erektil disfonksiyon, seksüel fonksiyon bozuklukları, kemik ve mineral metabolizma bozuklukları, psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklardır. Kronik komplikasyon riski hiperglisemi süresi ile doğrudan ilişkilidir (79).

Diyabet, hiperglisemi fenotipini paylaşan bir grup metabolik bozukluğu ifade eder. Glisemik bozuklukların sınıflamasına göre diyabet; tip 1, tip 2, spesifik nedenlere bağlı diyabet ve gebelik diyabeti olmak üzere başlıca dört gruba ayrılır. İki geniş etyopatogenetik kategorideki ilk kategori, tip 1 diyabet ve daha yaygın olan ikinci kategori tip 2 diyabettir (78).

II.2.1 Tip 1 Diyabet

Diyabetli hastaların % 5-10'unu oluşturan bu formu önceleri insüline bağımlı diyabet, juvenil başlangıçlı diyabet terimleriyle de anılırdı. Tip 1 diyabette mutlak insülin eksikliği vardır. T1DM, pankreasın β -hücrelerinin hücresel temelli yıkımı ve sonrasında gelişen inflamatuvar olaylar sonucu insülitis gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır. Hastaların % 90'ında otoimmün (Tip 1A), %10'unda nonotoimmün (Tip 1B) β -hücre yıkımı söz konusudur. Tip 1A diyabette, genetik yatkınlığı bulunan kişilerde çevresel tetikleyici faktörlerin (virüsler, toksinler, duygusal stres) etkisiyle otoimmünite tetiklenir ve ilerleyici β -hücre hasarı başlar. β -hücre rezervi % 80-90 oranında azaldığı zaman klinik diyabet semptomları ortaya çıkar. Hastalık ortaya çıkıncaya kadar uzun bir preklinik evre mevcuttur. Tip 1A diyabette başlangıçta kanda adacık otoantikörleri pozitif bulunur. Tip 1B diyabet, otoimmünite dışındaki bazı nedenlere bağlı mutlak insülin eksikliği sonucu gelişir. Kanda adacık otoantikörleri bulunmaz (77,80).

II.2.2 Tip 2 diyabet

Tüm diyabetlilerin % 90-95'ini oluşturur. İnsülin sekresyonunda bozukluk ve insülin direnci ile karakterizedir. İnsülin direnci, endojen salgılanan veya ekzojen verilen insülinin normalden daha az biyolojik yanıt oluşturma durumudur. İnsülin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glikoz üretimini baskılar. Ayrıca glikozu kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşıyarak burada ya glikojen olarak

depolanmasını ya da enerji üretmek üzere okside olmasını sağlar. Tip 2 diyabetin uzun bir asemptomatik dönemi vardır ve genellikle diyabetin ikinci 10 yılında komplikasyonlar ortaya çıkar.

II.2.3 Diyabetin Diğer Tipleri

Gestasyonel diyabet (GDM) ilk kez gebelikte ortaya çıkan ya da gebelik sırasında tanı konulan glukoz tolerans bozukluğudur.

β -hücrelerinin genetik bozuklukları, insülin etkisindeki genetik bozukluklar, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç veya kimyasalca indüklenen diyabet, immün temelli diyabetin nadir formları, diyabetle ilişkilendirilen diğer genetik sendromlar gibi klinik olarak hiperglisemi ile sonuçlanan hastalıklar diyabetin diğer özel tipleridir (78).

II.2.4 Oksidatif Stres ve Diyabet

Serbest radikaller, endojen olarak fizyolojik metabolizma reaksiyonları sırasında oksidasyon ve indirgenme reaksiyonları ile ayrıca stres, virüsler, enfeksiyonlar, çeşitli ilaçlar ve radyasyon gibi çevresel faktörler ile oluşurlar (81).

Oksijen radikalleri hücrelerde aerobik solunum sırasında oksijen kullanımı sonucu sürekli olarak oluşmaktadırlar. Mitokondride az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), ardışık olarak hidrojen peroksit ve hidroksil radikali ($OH^\bullet$) indirgenir. Bu radikaller de serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatarak hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R^\bullet$), peroksil ($ROO^\bullet$), alkoksil ($RO^\bullet$), tiyol ($RS^\bullet$), sülfonil ($RSO^\bullet$), tiyol peroksil ($RSO_2^\bullet$) radikalleri gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Organizma bu radikallere karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferazlar (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzimleridir. Glutatyon, tioredoksinler gibi proteinler, askorbik asit, α -tokoferol, ve karotenoidler organizmada bulunan enzimatik olmayan antioksidanlardır (82).

Serbest radikallerin oluşum oranı ile ortadan kaldırılmaları arasında bir denge mevcuttur ve bu durum "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum oranında artma ya da ortadan kaldırılmalarında bir azalma olması bu dengenin bozulmasına neden olur. Bu durum "oksidatif stres" olarak tanımlanır (83). Oksidatif stres arttığında serbest radikaller makromoleküller (lipidler, proteinler, nükleik asitler) ile etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ve mutasyonlara

neden olabilmekte, sonuç olarak katarakt, romatoid artrid, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kanser gibi çeşitli hastalıkların gelişimine ve immün sistemin zayıflamasına neden olmaktadır. Oksidatif stresin yaşlanmada da rol oynadığı kabul edilmektedir (81,84).

Deneyssel ve klinik çalışmalarda, artmış oksidatif stresin diyabet ve diyabetin komplikasyonlarının gelişiminde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (85). Diyabette serbest radikallerin üretimi artarken antioksidan savunmanın bozulduğu bilinmektedir (86–89). Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (90). Diyabette uzamış hipergliseminin, antioksidan SOD enziminin progresif glikasyonuna ve aktivitesinde azalmaya yol açtığı, bunun yanında dokularda bazı DNA hasar onarım genlerinin downregülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (66). Ayrıca, artan reaktif oksijen radikallerinin nükleer faktör kappa B (NFκB) üzerinden, antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu azalttığı da ileri sürülmüştür (66).

Diyabette serbest radikaller, glukoz oksidasyonu, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu ve glikolize proteinlerin oksidatif degradasyonu ile orantısız olarak oluşur. Serbest radikallerin normal olmayan yüksek düzeyleri ve eşzamanlı olarak antioksidan savunma mekanizmaların azalması hücre organellerinin ve enzimlerin hasarına, lipid peroksidasyonunun artmasına ve insülin direnci gelişimine sebep olabilir. Oksidatif stresin bu sonuçları diyabet komplikasyonlarının gelişimine katkıda bulunabilir (91). Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (92);

a) Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Glukoz oksidasyonunun serbest radikallerin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bir geçiş elementinin varlığında enediol formundaki glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyon radikallerine çevrilir (91). Süperoksit anyon radikalleri katalaz ya da glutatyon peroksidaz ile degrade olmazlarsa geçiş metallerinin varlığında hidrojen peroksitin dismutasyonu ile son derece reaktif olan hidroksil radikallerine dönüştürülürler. Süperoksit anyon radikalleri nitrik oksitle reaksiyon verip reaktif peroksinitrit radikallerini de oluşturabilirler (93).

Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'nin açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan

süperoksit radikali, mitokondriyel elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'nin okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'a okside olması ile üretilir (94). Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyel ROS üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (95,96).

b) Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (İleri Glikasyon Son Ürünleri) Oluşumu

Yüksek konsantrasyonlarda glukoz, bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan ortamda bulunan proteinlere bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış proteinler, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olurlar (97). Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Hipergliseminin şiddetine ve süresine, proteinlerin yarı ömrüne, dokuların glukozla olan geçirgenliğine ve proteinlerdeki serbest amino gruplarının sayısına bağlı olan protein glikasyonu yarı ömrü kısa (albumin, hemoglobin) ve uzun (kollajen, elastin, myelin, tubulin) olan tüm proteinlerde gerçekleşmektedir. Bu glikasyon ürünlerinin en tipik örneği HbA1C ve fruktozamindir. Bu şekilde oluşan erken glikasyon ürünleri tedavi sonucu glukozun normale dönmesiyle azalmaktadır. Yarı ömrü uzun olan proteinlerde ise geri dönüşümsüz olarak ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşmaktadır. AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler (94). AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve NFκB gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin-1, adhezyon molekülü, VCAM-1 gibi) ekspresyonlarının artışı da bulunmaktadır (98). Giardino ve ark. hücre içi AGE oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (99). Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (100,101).

c) Poliol Yolağı

Glukoz girişi için insüline ihtiyaç duymayan ve aldoz redüktaz enzimi içeren lens, periferik sinirler, böbrek glomerülleri gibi dokularda hiperglisemi sonucu hücre içi glukoz ve dolayısıyla sorbitol konsantrasyonu artar (102). Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (91). Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar (103). Poliol yolun aktivasyonu enzimatik olmayan glikasyonu ve diaçilgliserol sentezini artırmaktadır. Diaçilgliserolün artışı da PKC aktivasyonuna yol açarak diyabetteki damar patolojilerine neden olmaktadır. Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi veya iskemiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücrelerde, schwann hücrelerinde hasar meydana gelmektedir (104). Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşıyan Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir (105). Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Hiperglisemi dışında hiperinsülinemi de oksidatif strese neden olmaktadır. ROS'un insülin bağımlı hücresel sinyal yollarında önemli araçlar olduğu bilinmektedir. İnsülin tarafından indüklenen ROS stimülasyonu için önerilen sinyal mekanizmalarından biri NADPH bağımlı H_2O_2 üretiminin aktivasyonudur. İnsülin bağımlı ROS oluşumunun diğer bir kaynağı mitokondridir. Aggeli ve ark. C2 iskelete ait miyoblast hücre hattında insülinin indüklediği oksidatif stresin çeşitli sinyal kaskatları üzerinden hem oksijenaz-1 (HOX-1)'i upregüle ettiğini rapor etmişlerdir (106). ROS'un düşük düzeyleri hücresel büyüme faktörü ve sitokin stimülasyonuna hızlı geçici yanıt olarak üretilirler ve çeşitli intraselüler sinyal yollarının düzenlenmesinde bütünleyicidirler. Bu durum insülin için de geçerlidir. İnsülinin fazlası ROS üretimini stimüle etmektedir (107). H_2O_2 'in OH. radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Çalışmalar glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını göstermektedir.

II.3 ROS TAYİN YÖNTEMLERİ

Serbest oksijen radikallerinin saptanması ve nicel tayini için *in vivo* ya da *in vitro* yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar;

- Ortaklanmamış elektron varlığını saptayan L-band elektron spin rezonans (ESR) tekniği (108);
- Serbest radikallerin hücresel ölçümüne olanak veren, floresans temelli problemlerin kullanıldığı yöntemler (DHR; DHE; DCF-DA)

Dihidrorodamin (DHR), $\text{OH}^\cdot$, $\text{ONOO}^\cdot$, $\text{NO}_2^\cdot$ gibi çeşitli serbest radikallerin saptanmasında kullanılan bir boyadır; ancak $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{NO}^\cdot$ radikallerine karşı duyarlı değildir. DHR rodamin 123'e oksitlenir. Rodamin 123; 536 nm de yüksek floresans verir (109).

Dihidroetidyum (dihidroetidin; DHE), süperoksit radikalının saptanmasında sıklıkla indikatör prob olarak kullanılır. DHE esas olarak hücre sitoplazmasında mavi floresans verir. Oksitlendiğinde oluşan etidyum türevi 2-hidroksietidyum, DNA ile interkalasyon sonucu kırmızı floresans verir. DHE'nin indirgenmiş şekli DNA boyası olan etidyum bromürdür (109).

Diklorofluorescein diasetat (DCF-DA), ROS tayininde sıklıkla kullanılan en popüler yöntemdir.

II.3.1 DCF-DA Testi

DCF-DA testi hücre kültür çalışmalarında ROS oluşumunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Floresan özellik göstermeyen lipofilik bir ester olan dihidroklorofluorescein diasetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) plazma membranını kolaylıkla geçerek sitoplazmaya girer ve hücre esterazlarıyla deasetilasyon sonucunda hidrofilik alkol dihidroklorofluorescein (H_2DCF) molekülünü oluşturur. Bu molekül de ROS varlığında oksitlenerek floresans veren 2',7'- diklorofluorescein (DCF)'e dönüşür. Floresans şiddeti ROS miktarıyla ilişkilidir. Ölü ya da ölmekte olan hücreler de ROS oluştururlar. Propidyum iyodür ilave edilmesi, propidyum iyodür negatif olan canlı hücrelerdeki ROS oluşumunun belirlenmesini sağlar. Propidyum iyodür, 488 nm'de uyarılır ve maksimum 617 nm dalga boyunda emisyon gösterir. Bu nedenle $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ floresan probu ile kombine kullanılabilmektedir (110).

II.4 DNA HASARI

DNA (deoksiribonükleik asit), endojen ve ekzojen faktörlere bağlı olarak sürekli hasara uğramaktadır. DNA hasarı, DNA yapısında meydana gelen değişikliklerdir. DNA hasarına

neden olan reaksiyonlar endojen metabolik reaksiyonlar ya da ekzojen faktörlerle tetiklenmektedir (111,112). Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hasar hücre ölümüne neden olabilir.

DNA da oluşan hasarların başlıcaları; tek ve çift zincir kırıkları, oksidatif DNA baz hasarı, inversiyon-delesyonlar, DNA-protein ve DNA-ilaç çaprazlaşmaları ve abazik alanlardır. Serbest radikaller DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, pürin ve pirimidin bazlarının spesifik DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur. Farklı radikal metabolitlerin DNA hasar oluşturma mekanizmaları farklılık gösterir. Örneğin süperoksit anyonu ve onun dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit direkt olarak DNA ile etkileşerek baz oksidasyonuna ve zincir kırıklarına neden olmaz; DNA hasarı geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu ile oluşan hidroksil radikali ile oluşur (113).

DNA'nın yaşam boyunca sürekli olarak maruz kaldığı bu değişimler, tek hücreli organizmalarda hücre ölümüne veya çok hücreli organizmalarda dejenerasyon ve yaşlanmaya sebep olabilir (114). Ayrıca DNA hasarı kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (81).

II.4.1 DNA Hasarı Tayin Yöntemleri

Son 20 yılda çeşitli organizmalarda DNA hasarını saptamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. DNA hasarının saptanmasında sıklıkla kullanılan başlıca yöntemler aşağıda kısaca anlatılmıştır.

8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) ölçümü: 8-OHdG, en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarıdır ve 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmaktadır (115). Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi - Elektrokimyasal Detektör (HPLC-ECD) kullanılarak DNA'daki enzim hidrolizini takiben oluşan 8-OHGua (8-hidroksiguanin) ve 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) nükleozidleri ölçülebilir (116). Ancak oldukça pahalı ve ileri teknoloji gerektiren bir yöntemdir.

Gaz kromatografisi-Kütle spektrometrisi (GS-MS): GS-MS serbest radikallerin neden olduğu DNA baz hasarları ölçümünde yaygın olarak kullanılan diğer bir kromatografik tekniktir. GC-MS, *in vitro* ya da hasara uğramış DNA'da ve doğrudan kromatinin kendisinde, dört bazda da oluşan hasar ürünlerinin belirlenmesine olanak sağlayan tek tekniktir. Ayrıca

GC-MS, DNA onarım enzimlerinin eksizyon kinetiğini ve hücresel DNA onarım düzeyini ölçmede kullanılabilir. Ancak hava varlığında yüksek sıcaklıkta hidrolize DNA'nın derivasyonu ile 8-OH-guanin, 8-OH-adenin ve 5-OH-sitozin düzeyleri arttığı için oksidatif hasarın olduğundan daha yüksek saptanmasına neden olabilir (117).

Floresans *In Situ* Hibridizasyon (FISH): Nükleik asit problemleri aracılığı ile preparat üzerinde bulunan hücresel ya da kromozomal DNA veya RNA'nın incelenmesi temeline dayanan sitogenetik bir tekniktir. Hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine prob denir. Kromozomlar, probun kromozomun üzerinde aranan DNA dizisine bağlanmasına izin verilecek şekilde hazırlanırlar. Kromozoma bağlı olan işaretli DNA problemlerinin floresan vermesi genin mevcut olduğunu, vermemesi ise delesyona uğradığını gösterir (118).

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): Yöntemde antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenerek immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir (119).

Halo Testi (Kromatin ayrılma testi): Hücre DNA fragmentasyonu ile direkt ilişkili olan uyarılmış yoğunlaştırma prensibine dayanmaktadır. Yöntem hücrede DNA organizasyonundaki değişimleri ölçmek için kullanılır. Bu testte floresan veren bir boya olan PI, DNA ile interkalasyon oluşturur ve DNA'nın süperkoil yapısında değişiklik oluşturur. DNA halo şeklinde görülür ve PI konsantrasyonuna bağlı olarak çapı değişir. Yöntemde hücrelerin lizisi sonrası nükleoidler halo şeklinde görülür ve halo alanı DNA fragilitesini saptayan bir görüntü analiz sistemi ile ölçülür. Duyarlılığı yüksek değildir (120).

Mikronükleus Testi: Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır. Bu oluşumlar genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. Mikronükleus sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir.

μ -FADU (Florometrik DNA Unwinding Analizi) ve KOMET Testi: DNA hasarı ve tamirinin hızlı tayini için geliştirilen yöntemlerdir. İki yöntem de alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması temeline dayanmaktadır. FADU floresans miktarındaki değişimin değerlendirildiği spektrofotometrik bir yöntemdir. Komet ise florometrik bir yöntemdir.

II.5 HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücre ölümü genel olarak iki şekilde gerçekleşir;

a) Apoptoz

b) Nekroz

Apoptoz hem endojen hem de ekzojen uyarılar tarafından aktive edilebilen programlı hücre ölümüdür ve çok hücreli organizmalarda gelişim ve homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynar. Hücre büzülmesi, plazma membran boğumlanması (blebbing), hücrelerin ayrılması, fosfatidilserinin translokasyonu, nükleer kondensasyon ve sonunda DNA fragmentasyonu apoptozun tanımlanmış özellikleridir (121). Apoptoz sırasında spesifik endojen endonükleazların aktivasyonu ile genomik DNA'nın fragmentasyonu gerçekleşir ve çok sayıda DNA zincir kırıklarının oluşumuyla sonuçlanır.

Nekroz, hücre hasarına neden olan koşullarda oluşan hücre ölümüdür. Nekrotik hücre ölümünde hücre şişmesi, organel parçalanması, lizis ve hücre içeriğinin dışarı salınması görülür. Nekroza inflamasyon eşlik eder ve çevre dokulara zarar verir (122).

II.5.1 Apoptoz Tayin Yöntemleri

Apoptoz tayin yöntemleri temel olarak dört prensibe dayanmaktadır;

-Kaspaz Aktivasyonu

-Membran Değişimleri

-DNA Fragmentasyonu

-Mitokondriyel değişimler

A- Kaspaz Aktivasyonu: Kaspazlar apoptoz sırasında aktive olduklarında spesifik substratları aktive ya da inaktif ederek bölerler. Bu bölünmeler apoptozla ilişkili morfolojik değişimler yaratırlar (123,124). Belirli kaspazların apoptoz sürecinde yer almalarının belirlenmesi için bir kanıt da kaspaz aktivasyonunun belirleyicisi olarak o kaspazların proteolitik bölünmesinin izlenmesidir (125). M30 ve Kaspaz 3 yöntemleri bu prensiple uygulanan testlerdir. M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler (126). Kaspaz-3 yöntemiyle sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir.

Bunun için, dokunun kaspaz-3'ü eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir (127).

B- Membran Değişimleri: Apoptozun karakteristik bir özelliği de sağlıklı hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzünde bulunan membran fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin proapoptotik uyarıcılara cevap olarak hücre membranının dış yüzüne yer değiştirmesidir. Bu mekanizma kaspaz bağımlıdır ancak kaspazların PS yer değiştirmesini nasıl sağladığı bilinmemektedir. PS yer değiştirmesi apoptotik hücrelerin eliminasyonu için önemlidir, çünkü bu, PS reseptörüne bağlanan fagositler için "beni-ye" sinyalidir. Bu nedenle bu süreç hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı ve inflamatuvar yanıtın olmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir (128).

PS yer değiştirmesi en yaygın olarak PS'e bağlanan bir protein olan Annexin-V kullanılarak deneysel olarak tespit edilir.

C- DNA Fragmentasyonu: Apoptozun en belirgin özelliği hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer (ladder formasyonu) bir yapı biçiminde görülür. Bu, apoptoz için tipik bir görünüm sağlar. Fragmentasyon apoptotik hücrelerde CAD (caspase activated DNase kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve bu enzim DNaz (endonükleaz) olduğu için çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (129). Agaroz jel elektroforezi bu prensibe dayanan bir yöntemdir.

D- Mitokondriyel değişimler: Mitokondriyel yollar pro-apoptotik düzenleyici olan Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından mitokondriyel dış membran permeabilizasyonu ile başlar. Sitokrom c ve diğer toksik proteinlerin membranlar arasından sitozole salınımı ile devam eder. Bu proteinlerin salınımı genellikle immunositokimyasal tekniklerle veya sitozolik, mitokondriyel ve nükleer fraksiyonların Western blot analiziyle tespit edilir. Mitokondriyel dış membran permeabilizasyonu dışında apoptoz sırasında gözlenen diğer olay iç mitokondriyel transmembran potansiyelinin kaybıdır. Solunum zinciri tarafından elektrokimyasal proton gradientinin olduğu bu süreç mitokondriyel permeabilite değişimi olarak adlandırılır ve mitokondriyel iç membranda çok sayıda selektif olmayan por açılmasıyla sonuçlanır (130).

Mitokondriyel transmembran potansiyeli çok sayıda potansiyometrik boya, akım sitometrisi veya floresan mikroskobu kullanılmasıyla ölçülür.

Western blotlama, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteinin varlığını ve büyüklüğünü saptamak için kullanılır. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot yöntemiyle hücrede ne kadar protein biriktiğinin, apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) ve Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının tespiti yapılabilir (131). Diğer bir teknik olan floresan mikroskopi ise floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidyum iyodür, akridin turuncusu, etidyum bromür, FITC) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidyum iyodür) beraber kullanılır.

II.6 ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

II.6.1 Alkali Komet Yöntemi

Komet yöntemi, "Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE)" tekniği ya da "Mikrojel Elektroforetik Tekniği" olarak da adlandırılmaktadır. Hücrelerde DNA hasarı sonucu oluşan DNA kırıklarını ve apoptozun erken evresini belirlemek amacıyla kullanılan hızlı ve duyarlı mikroeletroforetik bir yöntemdir. 1984 yılında Ostling ve Johanson mikrojel elektroforez tekniği ile hücrelerde DNA hasarını görüntülemişlerdir (132). Nötral şartlarda yapılan çalışmanın sadece çifte bağ hasarının tanınmasına yol açtığı ve denatürasyonu hızlandırmadığı anlaşılmıştır. Daha duyarlı sonuçlar elde edebilmek amacıyla yapılan çalışmalar sonunda Singh ve ark. tarafından 1988 yılında alkali komet yöntemi geliştirilmiştir (133). Collins ve ark. kuyruk oluşumunun alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (134). Alkali ortamda, bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Alkali ortam (pH>13) kullanılarak DNA tek ve çift zincir kırıklarının, alkali-kararsız bölgelerin diğer bir deyişle apürinik/apirimidinik bölgelerin (AP-bölgelerinin) tayini, DNA-DNA/DNA-protein çapraz bağlanma bölgelerinin tespiti sağlanabilmektedir (135). Bu nedenle tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarının çalışılması olmuştur.

Alkali komet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektriksel yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Düşük

erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonu lam üzerine, agar jel ile sandviç modeli oluşturacak şekilde aktarılır. Agaroz jel donduktan sonra alkali ortamda zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları kullanılarak parçalama (lisis) işlemi gerçekleştirilir. Parçalama işlemi ile nükleer materyal dışındaki hücre bileşenleri uzaklaştırılmış olur. Daha sonra ise alkali koşullar altında kısa bir süre elektroforez uygulanmaktadır. Çok küçük miktardaki non-histon protein varlığında bile DNA süpersarmal halinde iken, alkali koşullarda kırıkların bulunduğu bölgelerden açılmaya başlar. Hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden elektroforezde yürürken hasarlı DNA'ların fragmanları farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket ederler ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Elektroforezde kırılmış DNA zincirlerinin anoda doğru göçerek oluşturdukları kuyruklu yıldız görüntüsü nedeniyle hasarlı hücreler "comet" olarak adlandırılmıştır (136).

Yöntem, genel olarak genotoksisite araştırmaları, DNA onarım araştırmaları, antioksidan araştırmaları, klinik araştırmalar gibi alanlarda ve çevresel mutajenlere maruz kalan populasyonların izlenmesinde kullanılmaktadır. Çeşitli uluslararası yayınlar bu testin genotoksik/antigenotoksik etkilere yönelik çalışmalarındaki yararını ortaya konmuş, güvenilir bir test olduğu kanıtlanmıştır. Düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek duyarlılığı, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti komet yönteminin avantajlarındandır (137).

II.6.2 Akım Sitometrisi (Flow Sitometri)

Akım sitometrisi bir akışkan yataktan geçen partiküllerin, çoğunlukla hücrelerin, çoklu fiziksel karakteristiklerinin aynı anda ölçüldüğü ve ardından analiz edildiği bir teknolojidir (138). Akım sitometrisi hücrelerin veya çekirdekler, mikroorganizmalar, kromozom preparasyonları gibi partiküllerin optik ve floresans karakteristiklerini ölçer. Hücrenin büyüklük (ileri açılı ışık saçılımı tarafından temsil edilen) ve iç kompleksite (dik açılı saçılım tarafından temsil edilen) gibi fiziksel özellikleri belirlenir. Floresan boyalar DNA veya RNA gibi hücresel bileşenlere bağlanabilir veya araya girebilir. Ek olarak, floresan boyalara konjuge olan antikorlar, spesifik proteinlerin hücre membranlarına veya hücrelerin içine bağlanabilirler (139).

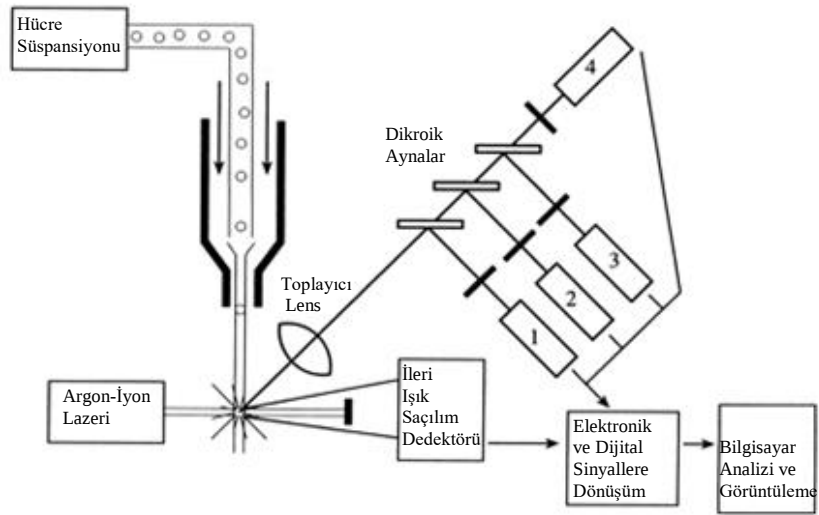
İşaretlenen hücreler ışık kaynağından geçirilirken floresan moleküller yüksek enerji seviyelerine uyarılırlar. Florokromlar temel enerji düzeylerine dönerken yüksek dalga boylarında ışık enerjisini salarlar. Her biri benzer uyarılma dalga boylarında ve farklı emisyon

dalgaboylarında (veya renklerde) çoklu florokromların kullanımı çok sayıda hücre özelliğinin aynı anda ölçülmesine imkan tanır (139). Ölçülen karakteristikler hücre veya partikülün lazer ışığını nasıl saçtığını ve nasıl floresans verdiğini kaydeden optik ve elektronik sistemlerce belirlenir (138). Akım sitometrisi için yaygın olarak kullanılan boyalar propidyum iyodür, fikoeritrin ve floresindir.

Akım sitometrisinin içinde süspansiyon halindeki hücreler, laminar akış yaratan izotonik akışkanın çevrelediği kılıfça yaratılan bir akışın içine çekilirler. Bu da hücrelerin lazer ışınlarıyla buluşma noktasından tek tek geçişine olanak tanır. Bu noktada, lazerden gelen monokromatik ışık ışınları, hücrelerle kesişir. Yayılan ışık tüm yönlere salınır ve ışığı bir dizi filtreye ve özel dalgaboyu bantlarını ayıran çift renkli aynalara yönlendiren optikler aracılığıyla toplanır. Işık sinyalleri fotoçoğaltıcı tüpler tarafından tespit edilir ve bilgisayar analizleri için sayısallaştırılır. Şekil 6 akım sitometresinin akışkan ve optik bileşenlerinin şematik diyagramıdır. Sonuçta elde edilen bilgi histogramlar veya iki boyutlu noktasal grafikler halinde görüntülenir (139).

Akım sitometri ile yüksek duyarlılıkla, hücre yada partikülün immünojenotipi, DNA içeriği miktarı, enzim aktiviteleri, spesifik antikorlar tarafından tanınan hücrenin; yüzeyi, sitoplazması ve/veya çekirdeğinde bulunan antijen/belirteçlerin tespiti ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilmektedir (140).

Çalışmalarımızda mavi (488 nm) ve kırmızı (640 nm) lazer eksitasyon kaynağı ile donatılmış, dört renk standart optik filtre (FL1: 533/30 nm, FL2: 585/40 nm, FL3: >670 nm, FL4: 675/25 nm) içeren BD Bioscience marka Accuri C6 model akım sitometrisi cihazı kullanılmıştır.



Şekil 6. Akım sitometri şematığı (138).

▪ TUNEL (TdT-aracılı dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi

DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Yöntemi, nükleer DNA fragmentasyonunu ölçerek hücre süspansiyonlarında apoptotik hücrelerin hızlı, doğru ve basit tespitine olanak sağlayan bir testtir. Çalışmamızda *C. cassia*'nın apoptozu indüklemeyen ve DNA hasarının en az olduğu ekstraların belirlenmesi ve alkali komet test sonuçlarının desteklenmesi amacıyla uygulanmıştır.

Nükleer DNA fragmentasyonu, çok sayıda hücre tipinde apoptoz için çok önemli bir biyokimyasal göstergedir. Apoptotik hücreler karakteristik olarak DNA zincir kırıklarını (nick) sergilerler ve bu kırıklar serbest 3'-OH uçlarının modifiye edilmiş nükleotidlerle enzimatik bir reaksiyonda işaretlenmesi ile tanımlanabilir (141). DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Sistemi, apoptotik hücrelerin fragmente olmuş DNA'sını, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimini kullanarak 3'-OH DNA uçlarının fluorescein-12-dUTP ile katalitik olarak birleşmesini sağlayarak ölçmektedir. TdT, TUNEL yönteminin prensiplerini kullanarak, polimerik bir kuyruk oluşturan bir enzimdir. Floresan etiketli deoksiüridin trifosfat nükleotidler (F-dUTP) ile işaretli DNA bu işlemler sonrasında floresan mikroskop ile ya da akım sitometrisinde değerlendirilmektedir (142).

Hücrelerin fiksasyonu ve permeabilizasyonu DNA zincir kırıklarının başarılı bir şekilde işaretlenmesinde önemli adımlardır. Hücreler formaldehit gibi bir çapraz bağlama fiksatif ile

fikse edilirler ve ardından etanol ve/veya deterjanlar kullanılarak permeabilize edilirler. Formaldehit fragmente DNA'nın diğer hücre bileşenlerine ekstraksiyonunu önler (143).

TUNEL reaksiyonu tercihen apoptoz sırasında oluşan DNA zincir kırıklarını işaretler. Bu tercih apoptozun, nekrozdan ve sitostatik ilaçların veya radyasyonun indüklediği primer DNA zincir kırıklarından ayırt edilmesine olanak tanır (141).

▪ **Anneksin V/Propidyum iyodür (Annexin V/PI) Testi**

Hücrelerde apoptoz ve nekrozun ayırt edilebilmesinde kullanılan bir yöntemdir (144). Propidyum iyodür ve fluoressein izotiyosiyanatla konjuge Anneksin (Anneksin V-FITC) kullanışı, apoptoz ilerleyişinin izlenmesinde uygulanan standart yöntemlerdir.

Normal hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzünde bulunan membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) molekülleri, hücrenin apoptoza gitmesi halinde, hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, fosfatidil serine yüksek afinite ile bağlanabilen, Ca^{+2} a bağımlı bir proteindir. Anneksin V bir florokrom ile işaretlenerek apoptotik hücreler floresans mikroskopunda ya da akım sitometresinde belirlenmektedir. "Florokrom-Anneksin V" kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı o hücre topluluğundaki apoptoza uğramış hücrelerin oranını verir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde plazma ve nükleer membran bütünlüğünü azalır, bu da propidyum iyodürün membranlar içinden geçmesine, nükleik asitler içine girmesine ve kırmızı floresan görüntü vermesine olanak tanır. Bu durumda canlı hücreler için Anneksin V-negatif ve PI-negatif (Anneksin V⁻/PI⁻); erken apoptotik hücreler için Anneksin V-pozitif ve PI-negatif (Anneksin V⁺/PI⁻); geç apoptotik hücreler için Anneksin V- ve PI-pozitif (Anneksin V⁺/PI⁺) ve nekrotik hücreler için Anneksin V-negatif ve PI-pozitif (Anneksin V⁻/PI⁺)'tir (145).

II.7 HÜCRE CANLILIK VE PROLİFERASYON TESTLERİ

Hücre proliferasyonu ve canlılığı testleri sağlıklı hücrelerin karakteristikleri olan vital fonksiyonları ölçmede kullanılır.

II.7.1 Sitotoksikite Testleri

Canlı hücre sayısını saptamada en basit yöntem hücrelerin hemositometrede direkt olarak sayılmasıdır. Bazen canlı hücreler yalnızca morfolojilerine göre belirlenir; ancak

hücrelerin tripan mavisi gibi bir boya ile boyanması daha uygundur. Bu durumda, canlılık hücrelerin bozulmuş veya bozulmamış membran bütünlüğü yeteneğine göre ölçülür. Bu testlerde membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin, naftalen siyahı ve propidyum iyodür gibi boyalar ile membran bütünlüğü bozulmamış hücre içerisine alınan diasetil floressein ve nötral kırmızısı gibi vital boyalar kullanılmaktadır (146).

Alternatif olarak, metabolik aktivite ölçümleri de hücre canlılığının saptanmasında kullanılabilir. Genellikle metabolik aktivite, popülasyonlardaki hücrelerin bir tetrazolyum tuzu (MTT, XTT, WST-1) ile inkübe edilmesi ve metabolik aktiviteleri sonucunda renkli formazan ürünleri oluşumu ile ölçülür.

II.7.1.1 Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi hücre membran bütünlüğü bozulmamış olan canlı hücrelere giremediği için; muamele edilen hücre süspansiyonlarında canlı hücreler boyanmazken membran bütünlüğü bozulan ölü hücrelere girebilen Tripan mavisi onların ışık mikroskopunda mavi renkte görülmelerine neden olur (147).

II.7.2 Hücre Proliferasyonu Testleri

Hücre proliferasyonu ölçümü bir kültürde bölünen hücrelerin sayısının ölçümüdür. Hücre proliferasyonu testleri genel olarak dört prensibe dayanmaktadır;

- **Klonojenik Yöntemlere Dayalı Proliferasyon Testleri**

Klonojenik yöntemlerde, belirli sayıdaki hücreler uygun bir matriks üzerine yerleştirilir ve belli bir periyod sonrası oluşan koloni sayısı belirlenir.

- **DNA Sentez Hızının Ölçülmesine Dayalı Proliferasyon Testleri**

Bu testlerde proliferasyon belirtici olarak DNA sentezi ölçülür. Bölünmeye giden hücrelerde DNA ikilenmesi işlemi S fazında gerçekleşir. S fazındaki hücrelere dışarıdan radyoaktif olarak işaretli nükleotid analogları (3 H-timidin veya bromodeoksiüridin) verilerek, hücrelerin yeni DNA sentezinde bu nükleotidleri kullanması sağlanır ve böylece hangi hücrelerin bölünme döngüsü içerisinde olduğu belirlenebilir (148).

- **Metabolik Aktivitenin Ölçümüne Dayalı Testler**

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak MTT, XTT, MTS, WST-1 gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu

kullanarak formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Alamar mavisi testi metabolik aktivitenin dolayısıyla hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği florometrik/kolorimetrik bir test yöntemidir. Sülforodamin B testi hücre proteinlerinin ölçümüne dayanır. Kolorimetrik değerlendirme sonucunda hücre sayısı ile ilişkili total protein kütlesi belirlenir. Laktat dehidrojenaz (LDH) testi hücrede membran hasarı veya sitoliz durumunda açığa çıkan sitozolik bir enzim olan laktat dehidrojenazın ölçümü yapılarak sitotoksitenin belirlendiği testtir (149).

▪ Proliferasyon İşaretçilerinin Hücrelerde Belirlenmesine Dayalı Testler

Hücre proliferasyon sürecinde hücrelerde bazı özel antijenler görülür, bu antijenler proliferasyon olmayan hücrelerde görülmemektedir. Histon H3'ün 10. konumdaki serin aminoasidi üzerinden fosforillenmesi, bölünme esnasındaki kromozom yoğunlaşması ile kuvvetli korelasyon göstermektedir (150). Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerinden hücrelerin bölünme döngüsündeki konumları belirlenebilir, PCNA ekspresyonu G fazında artıp, DNA'nın ikilendiği S fazında maksimuma ulaşır iken, bölünmenin M evresine geçiş sırasında PCNA ekspresyonunda düşüş görülür (151). Benzer şekilde, Ki67 ekspresyonu hücre bölünmesi ile sınırlı olan bir nükleer proteindir (152). Aynı şekilde Aurora A, B ve C serin treonin kinaz gibi işaretçilerin hücredeki miktarı G2/M fazında belirgin şekilde artmaktadır, böylece bu işaretçilere bakılarak hücrenin bulunduğu bölünme fazı ya da aşaması belirlenebilir. Buna göre, Ki-67, PCNA, fosfohiston H3, topoizomera II B ya da Aurora kinaz gibi proliferasyon spesifik işaretçilere özgün antikorlar kullanılarak hücre döngüsü incelenebilir.

▪ Hücrelerdeki ATP Miktarının Ölçümüne Dayalı Testler

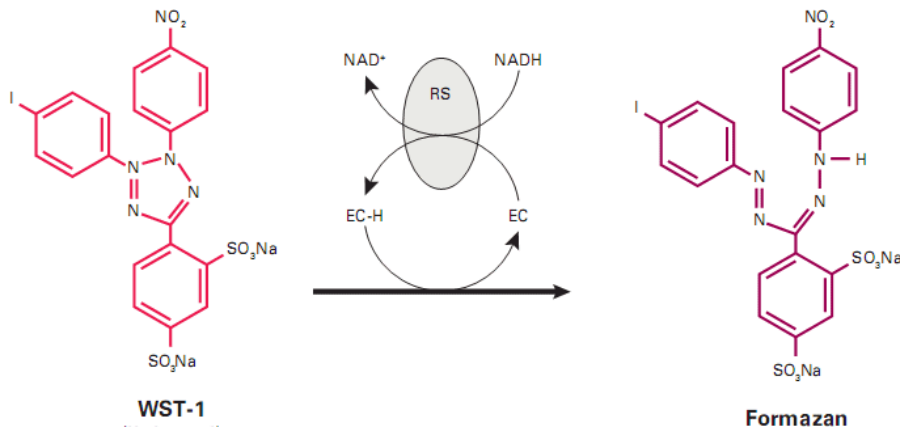
Hücre içerisindeki ATP miktarının ölçülmesi ile hücre proliferasyonu tayin edilebilir, proliferasyon hücrelerde ATP biyosentezindeki artış, yeni DNA zinciri sentezleyen proliferasyon hücreleri tarafından kullanılan ³H timidin miktarı ile korelasyon göstermektedir (153). ATP'nin ölçüldüğü hücre canlılığı testi, iki aşamalıdır. İlk aşamada adenilat siklaz substratı olarak ADP ilave edilir ve bu enzim varlığında ADP, ATP'ye dönüşür. İkinci aşamada lusiferaz enzimi ATP ve lusiferinden ışın oluşumunu katalize eder. Yayılan ışığın şiddeti luminometre ya da b-sayacı ile ölçülür.

Hücre proliferasyonu ayrıca daha indirekt parametrelerin kullanılması yoluyla da ölçülebilir. Bu tekniklerde, hücre döngüsünü düzenleyen moleküllerin aktivitelerine (CDK

kinaz yöntemi) veya miktarlarına (Western blot, ELISA, immunohistokimya) göre ölçümü yapılmaktadır.

II.7.2.1 WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil) 2-(4-nitrofenil) 2H-5-tetrazolyo] 1,3-benzen disülfonat) Testi

Bu test hücre canlılığı, sitotoksite, hücre aktivasyonu ve hücre proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılan bir testtir. Deneyin temeli, WST-1 yapısındaki tetrazolyum halkasının bir ara elektron alıcısı varlığında, canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzimleriyle parçalanarak sudaki çözünürlüğü yüksek olan portakal rengi formazan kristallerinin oluşmasına dayanır. Bu oluşumun canlı hücreler tarafından NAD/NADP (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) ve NADPH (indirgenmiş NADP) üretimine bağlı olması nedeniyle, bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. Absorbanslar mikropilaya okuyucusunda 450 nm test dalga boyu ve 630 nm referans dalga boyunda ölçülür. Bazal absorbans, 450 nm deki ölçümden çıkarılır. Formazan boya miktarı hücre kültüründeki metabolik olarak aktif canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (154).



Şekil 7. WST-1'in formazana dönüşümü (EC: Elektron eşleme reaktifi RS: Mitokondriyel süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid).

III. GEREÇ ve YÖNTEM

III.1 GEREÇLER

III.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Madde	Marka, Ülke
<i>n</i> -Hekzan	Merck, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
Kloroform	Merck, Almanya
Etil asetat	Merck, Almanya
1-Butanol	Merck, Almanya
<i>Tert</i> -butanol	Merck, Almanya
Propidyum iyodür	Sigma-Aldrich, ABD
H ₂ DCFDA (2'7'diklorodihidrofluoressein-diasetat)	Sigma-Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich, ABD
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich, ABD
Trizma base	Sigma-Aldrich, ABD
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich, ABD
Triton X- 100	Sigma-Aldrich, ABD
Tripsin-EDTA	Biological Industries, İsrail
Bovine Serum Albumin (BSA)	Amresco, ABD
Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA)	Sigma-Aldrich, ABD
Normal Erime Noktalı Agaroz (NMA)	Sigma-Aldrich, ABD
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich, ABD
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS)	Amresco, ABD
Hidrojen Peroksit (%35)	Merck, Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies, ABD
RPMI 1640	Biological Industries, İsrail
L-glutamin	Biological Industries, İsrail
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries, İsrail
Fetal Bovine Serum	Biological Industries, İsrail
KİTLER	
Cell proliferation Reagent WST-1	Roche, İsviçre
Annexin V-EGFP Apoptosis Kit	Biovision, ABD
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche, İsviçre

III.1.2 Kullanılan Gereçler

Cihaz	Marka, Ülke
Laminar akımlı kabin	Clean Bench SCBN 1013, Kore
CO ₂ inkübatörü	Nuaire, 5510, ABD
Yatay elektroforez	Cleaver Scientific, Model CSL-COM20, İngiltere
Elektroforez güç kaynağı	Thermo Scientific™ Owl™ EC300XL2, ABD
Derin dondurucu (-20 °C)	Siemens, Almanya
Derin dondurucu (-80 °C)	New Brunswick Scientific U410, İngiltere
Invert mikroskop	Olympus CKX41, Japonya
Floresan mikroskop/Işık mikroskopu	BAB Mikroskop ve Görüntü Analiz Sistemleri, Türkiye
Akım sitometrisi	BD Accuri™ C6, BD Biosciences, ABD
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Thermo Scientific Varioskan™ Flash Multimode Reader, ABD
Liyofilizatör	Labconco/Freezone6, Missouri, ABD
Mikrodalga fırın	Vestel MW17, Türkiye
Isıtıcı tabla/manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific Co, Wisestir MSH-20A, Kore
pH metre	Hanna Instruments HI221, Kanada
Su banyosu/Sonikatör	Elma Transsonic T460/H, Almanya
Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra X-15R, ABD

Gereçler	Marka, Ülke
Çok kuyucuklu plakalar	Costar 3599 Corning, ABD
Lam	Isotherm (76x26 mm/3x1 inch), Almanya
Lamel	Isolab (24x24 mm), Almanya
Otomotik mikropipetler	Gilson, Fransa
Otomatik pipetör	Eppendorf, Almanya
Steril Filtre	Corning, ABD
Steril Küvet	Corning, ABD

III.1.3 Kullanılan Çözeltiler

III.1.3.1 Alkali Komet Testinde Kullanılan Çözeltiler

Liziz Stok çözeltisi: 2,5 M NaCl (146,1 g), 100 mM EDTA (37,2 g), 10 mM Trizma base (1,2 g), 10 g N-laurilsarkosinat sodyum tartılarak distile su ile 1L'ye tamamlanır. NaOH çözeltisi ile pH 10 olarak ayarlanır.

Liziz çözeltisi: Her deney öncesi taze hazırlanarak kullanılır. Stok çözelti %1 Triton X-100 ve %10 DMSO ile karıştırılarak soğutulur.

EDTA çözeltisi (0,2 M): 37,2 g tartılarak distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

NaOH çözeltisi (10M): 400 g tartılarak distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

Elektroforez Çözeltisi (300mM NaOH, 1 mM EDTA): 30 ml 10 M NaOH ve 5 ml 0,2 M EDTA çözeltisi distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

Nötralizasyon Çözeltisi (0,4 M Tris): 48,5 g Tris distile su ile 1 L'ye tamamlanır. HCl ile pH 7,5 olacak şekilde hazırlanır.

NMA çözeltisi (%1,5): 1,5 g agar 100 mL distile suya eklenir ve mikrodalga fırında çözülür.

LMA çözeltisi (%0,55): 0,0275 g LMA 5 mL PBS'e eklenir ve mikrodalga fırında çözülür.

Stok Etidyum bromür çözeltisi (10X): 10 mg boya 50 ml distile suda çözülür. Boyama sırasında stok 1:10 oranında seyreltilerek kullanılır.

III.1.3.2 Diklorofluoressein (DCF-DA) Testinde Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): 80 g NaCl, 2 g KCl, 5,75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1L distile suda çözülür ve pH 7,4'e ayarlanır. 1:10 oranında seyreltilip otoklavlanır.

BSA/Propidyum iyodür çözeltisi: 10mg BSA 1mL PBS içerisinde çözülür ve 1µL propidyum iyodür (1 mg/ml) eklenir.

III.1.3.3 TUNEL Testinde Kullanılan Çözeltiler

Fiksatif solüsyonu: Her deney öncesi taze olarak hazırlanır. PBS içinde 4% paraformaldehit çözülerek pH 7.4'e ayarlanır.

Permeabilizasyon solüsyonu: 0.1% sodyum sitrat; % 0,1 Triton X, distile su içinde çözülerek hazırlanır.

III.1.4 Materyal

Çalışmada *C. cassia* kabuklarının ticari preparatı kullanılmıştır. Preparatın *C. cassia* olduğunun doğrulanması Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Erdal Bedir tarafından yapılmıştır.

III.2 YÖNTEMLER

III.2.1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları Coriell Enstitüsü (NewJersey, ABD) diyabetik hücre koleksiyonundan sağlandı (<http://ccr.coriell.org>). Hücreler; Tip 1 diyabetli gönüllülerin periferik kan lenfositlerinin Epstein Barr virüsü ile transfeke edilmesi ile hazırlanan immortalize hücrelerdir. Hücre hatları ile ilgili bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. T1DM hücre hatlarının özellikleri

Katalog ID	GM02765	GM01838
Koleksiyon	NIGMS İnsan Genetik Hücre Deposu	NIGMS İnsan Genetik Hücre Deposu
Subkoleksiyon	Kalıtsal Hastalıklar	Kalıtsal Hastalıklar
Örnek tanımı	Tip 1 Diyabetli	Tip 1 Diyabetli
Hücre tipi	B-Lenfosit	B-Lenfosit
Doku tipi	Kan	Kan
Transformasyon	Epstein-Barr Virus	Epstein-Barr Virus
Hücre kültürü	Süspansiyon	Süspansiyon
Tür	Homo sapiens	Homo sapiens
Cinsiyet	Erkek	Kadın
İrk	Beyaz	Beyaz
Klinik etkilenme	Evet	Evet
Doğrulama	Klinik bulgu / Olgu geçmişi	Klinik bulgu / Olgu geçmişi
Açıklama	Tanı yaşı 4; HLA tipi A10, Bw16/A1,B8;hipertansiyon, boy kısalığı	Tanı yaşı 18; HLA tipi A28 (A2),Aw30,B12(B13),Bw35

GM01838 ve GM02765 hücre hatları süspansiyon formunda hücrelerdir. Bu hücre hatları, Coriell Enstitüsü'nün önerdiği protokole uygun olarak ısı ile inaktive edilmemiş %15 fetal bovin serumu (FBS); %1 penisilin-streptomisin ve 2 mM glutamin eklenen RPMI 1640

besi ortamına alındılar ve hücre canlılığı Tripan mavisini ile kontrol edildi. Hücreler 25 cm²'lik flasklarda, %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde kültüre edildiler. Besi ortamları 2-3 günde bir değiştirildi, gerekli ise (1x10⁶/ml olan plato düzeyine ulaşmadan) bölündü ve hücre sayıları ve canlılıkları belli aralıklarla kontrol edildi.

İlk aşamada her hücre hattından (0. pasaj) yedekleme yapıldı. Bu amaçla: Hücreler 15 ml'lik falkonlara alındı ve 700 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Sıvı tabaka atıldıktan sonra falkon içerisine buz üzerinde %10 DMSO; %90 FBS içeren dondurma sıvısı eklenip pellet homojen hale getirildi ve 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde kriyo tüplere alındı. Tüpler -86°C'de muhafaza edildiler.

III.2.2 Ekstre Hazırlanışı

Başlangıç materyali olarak toz haline getirilmiş tarçın kabuklarından 400 gram tartıldı; verimin yüksek olması amacıyla materyal porsiyonlara ayrılarak paralel çalışıldı ve çözücülerle ekstraksiyon işlemleri üçer kez tekrarlandı.

Ekstraksiyon protokolü: Toz halindeki *C. cassia* kabuk preparatı ilk olarak *n*-hekzan ile 40 °C'de sonikatör yardımıyla 90 dakikalık ekstraksiyona tabi tutuldu ve takiben Whatman No. 4 filtre kağıdından süzöldü. Kalan posadaki *n*-hekzan kalıntısı etüvde 40 °C'de bekletilerek tamamen uzaklaştırıldı; temizlenen kalıntılar aynı şartlarda metanol ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Böylece *n*-hekzan ile tarçın kabuklarından apolar sekonder metabolitler tüketilirken, metanol ile daha polar maddeler kazanıldı. Her iki ekstre vakumlu evaporatörde 40 °C'yi geçmeyen sıcaklıkta kuruluğa kadar uçuruldu. *n*-hekzan kalıntısı tersiyer butanolde çözüldü, -80 °C'de donduruldu ve liyofilize edildi. Metanol kalıntısı suda süspanse edilerek sırasıyla kloroform, etil asetat ve butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak partisyona tabi tutuldu. Her çözücü ile yapılan ekstraksiyon işlemleri üçer kez tekrarlanarak ayrılan fraksiyonlar bir araya getirildi. Butanol fazının ayrılmasıyla kalan sulu kısım donduruldu ve liyofilize edildi. Kloroform, etil asetat ve butanol fraksiyonları vakumlu evaporatörde kuruluğa kadar uçurulduktan sonra kalıntılar tersiyer butanol ile çözüldü ve -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi. Liyofilize edilen tüm ekstraktlar deneysel çalışmalara kadar buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneysel çalışmalar için ekstraktların hazırlanması: *C. cassia* hekzan, kloroform, etil asetat ve butanolün istenen konsantrasyondaki çözeltileri çözünürlüklerinin düşük olması nedeniyle % 1'lik DMSO'daki stok çözeltilerinden (100 mg/ml) RPMI ile dilüsyon yapılarak hazırlandı. Su ekstresinin hidrofilik olması nedeniyle istenen konsantrasyonda su ekstre çözeltileri hazırlanırken RPMI kullanıldı.

Çalışmalarda tarçın içeriğindeki sinnamaldehitin 60 °C'den sonra sıcaklığa bağlı olarak benzaldehite dönüştüğü saptandığı için çalışmaların tüm aşamalarında ekstreler ışıktan korundu (155).

III.2.3 Tripan Mavisi Testi

Her deney öncesi kullanılacak hücrelerin canlılığı "Tripan Mavisi Testi" ile değerlendirildi.

Deney prosedürü: Tripan mavisi (% 0,4) ile 1:1 oranında (20 µl:20 µl) karıştırılan hücreler 5 dakika bekletildi ve Thoma lamına uygulanarak ışık mikroskobunda sayıldı. Canlı hücre oranı (%); canlı hücre sayısının total hücre sayısına oranı 100 ile çarpılarak hesaplandı.

III.2.4 Hücre Aktivasyon Çalışması

Hücrelerin kolorimetrik ölçümde optimum absorbans vermeleri için yeterli hücre sayısı WST-1 testi kullanılarak saptandı. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakalarda, uygun besi ortamında yüksek konsantrasyonda (2×10^6) hücre içeren süspansiyondan hareketle 1:1 dilüsyon yapılarak gittikçe azalan konsantrasyonlarda hücre süspansiyonları hazırlandı. Hücrelere 24 saat sonra WST-1 (10 µl/kuyucuk) ilave edildi. Absorbanslar bir mikropilaka okuyucuda spektrofotometrik olarak (Thermo Scientific Varioskan, ABD) 450 nm test dalga boyunda ve 630 nm referans dalga boyunda ölçüldü. 630 nm deki bazal absorbans, 450 nm deki ölçümden çıkarıldı.

III.2.5 WST-1 Testi

WST-1 testi hücre canlılığı, sitotoksite ve hücre proliferasyonu tayininde kullanılan bir testtir. Çalışmamızda tarçın ekstrelerinin IC_{50} düzeyleri WST-1 testi ile hesaplandı.

Deney prosedürü: Deneyde WST-1 hücre proliferasyon kiti (Cell proliferation Reagent WST-1; Roche, İsviçre) kullanıldı. Test için hücreler, 96 kuyucuklu plakalara 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücreler tarçın ekstrelerinin farklı konsantrasyonları (10^{-3} - 10^{-5} g/ml) ile 37°C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucuklara, kullanılan kit üretici firmasının önerdiği şekilde 10 µL/100 µL WST-1 ilave edildi. İnkübatörde 3,5 saatlik inkübasyonun ardından absorbans değerleri 450 nm test dalga boyunda mikropilaka okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. Yukarıda belirtildiği gibi 630 nm referans dalga boyunda ölçülen bazal absorbans, 450 nm deki ölçümden çıkarıldı.

Hücre canlılığı, "kontrole göre % hücre canlılığı" olarak ifade edildi. Deney öncesi tarçın kabuk ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının absorbansları ölçülmüş ve deneyleri

etkilemeyecek kadar düşük düzeylerde oldukları saptanmıştı. Ekstrelerin IC₅₀ değerleri “GraphPad™ Prism® 5.0” yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

III.2.6 Deney Protokolü

Ekstrelerin hücre canlılığı üzerine etkileri ve apoptotik aktiviteleri Anneksin V/PI ve TUNEL testleri ile değerlendirildi. Bu testler için hücreler *C. cassia* ekstreleri (her ekstrenin IC₂₀ değeri kullanıldı) ve ekstresiz uygun besi ortamı (kontrol grubu) ile muamele edildiler. 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübasyonun ardından hücreler santrifüj edilip PBS ile yıkandı. Anneksin V/PI ve TUNEL testleri bu hücreler kullanılarak yapıldı.

Apoptozu artırmadığı belirlenen su ve butanol ekstreleri ile yapılan çalışmalarda her hücre tipi için; a) Kontrol grubu (yalnızca hücre besi ortamı); b) Pozitif Kontrol (H₂O₂); c) Butanol ve su ekstreleri (IC₂₀); d) Butanol ve su ekstreleri (IC₂₀) + H₂O₂ olmak üzere gruplandırma yapıldı. Ekstrelerle 24 saat inkübasyon sonrası PBS ile yıkanan hücreler soğuk H₂O₂ ya da PBS ile buz üzerinde 5 dakika bekletildiler. Süre sonunda hücreler PBS ile yıkandılar. Alkali komet, TUNEL, Anneksin V/PI ve DCF-DA testleri bu hücreler kullanılarak uygulandı. T1DM hücreleri ile yapılan ön çalışmalarda 150 µM H₂O₂ ile daha homojen ve stabil sonuç aldığımız için oksidatif DNA hasarını indüklemek amacıyla çalışmalarda 150 µM H₂O₂ kullanıldı.

III.2.7 Anneksin V / Propidyum İyodür Testi

Deney prosedürü: Çalışmada Annexin V-EGFP Apoptoz Kiti (Biovision) kullanıldı. Kit içeriğinde Annexin V-EGFP, 1X Binding Buffer ve Propidyum İyodür (PI) bulunmaktadır. EGFP (enhanced green fluorescence protein) diğer floresan bileşiklerden daha parlaktır ve fotostabildir. Üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak muamele görmüş hücreler PBS ile yıkandı ve 100 µl “binding buffer” ile süspande edildi. Ardından hücrelere 1 µl Annexin V-EGFP, 1µl PI eklenmesinin ardından hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika bekletildi. Ölçümler akım sitometresinde 488 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında yapıldı, veri analizi “BD Accuri C6” yazılım programı ile gerçekleştirildi. Her örnek için 20.000 hücre değerlendirildi.

III.2.8 TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Nick-End Labeling) Yöntemi

Deney prosedürü: Çalışmada “In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, İsviçre)” kullanılmıştır. Kit içeriğinde Enzim Solüsyonu (TdT) ve İşaretleme (Label) Solüsyonu (fluorescein-dUTP) bulunmaktadır. Üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak hücrelere belirlenen inkübasyon süresi sonunda 1 ml fiksatif solüsyonu (% 4 paraformaldehit

içeren PBS, pH:7,4) eklenmiş ve 15-25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bir saatlik inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanmış; sonrasında 100 µl permeabilize edici solüsyon (% 0,1 Triton X-100 ve % 0,1 sodyum sitrat içeren çözelti) eklenmiş ve 2 dk. buz üzerinde bekletilerek permeabilize edilmiştir. Süre sonunda çözelti santrifüjle uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Pozitif kontrol hücrelerine 1 µl DNase I eklenerek ile 10 dk 15-25°C de inkübe edilmiştir. Pozitif kontroller iki kez PBS ile yıkanmıştır. Tüm hücrelere 50 µl Tunel karışımı (1:9; TdT enzim solüsyonu:fluorescein-dUTP işaretleme solüsyonu) eklenerek 37 °C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkama ardından, hücreler 250 µl PBS'de süspanse edilmiştir. Çalışmamızda BD Biosciences, BD Accuri™ C6 akım sitometrisinde 488 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında ölçüm yapıldı; veri analizi BD Accuri C6 yazılım programı ile gerçekleştirildi. Her örnek için 20.000 hücre değerlendirildi.

III.2.9 Alkali Komet Yöntemi

Çalışmada ekstrelerin endojen ve H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkileri alkali komet yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla Singh ve ark. ile Collins ve ark.'nın yöntemleri modifiye edilerek uygulandı (133,134).

Deney prosedürü: Muamele görmüş hücrelerden 20 µL (2X10⁶ hücre/ml) alınarak 37°C'de eritilmiş 180 µL düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile karıştırıldı. Önceden normal erime noktalı agaroz (NMA) ile kaplanmış lamlara bu karışımdan 45 µL uygulandı. Bir lamel ile kapatılan lamlar 15 dakika buzdolabında bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Lamalar pH'sı 10 olan soğuk lizis çözeltisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra yeni hazırlanmış soğuk alkali elektroforez çözeltisi (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. 30 dakika akım uygulamadan bekletildikten sonra, 1 V/cm, 300 mA akım uygulayarak 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işlemleri +4°C'de gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası lamalar nötralizasyon çözeltisi (0,4 M Trizma-base, pH 7.5) ile yıkandı ve soğuk metanolde fikse edildi. Tüm bu işlemler dış kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık bir ortamda gerçekleştirildi (tarçın ekstreleri de ışıқта bozundukları için tez çalışmamızın tüm aşamalarında örneklerin ışıkla temasına karşı önlem alınmıştır). Nötralizasyon aşamasından sonra slaytlar etidyum bromür (20 µg/ml) ile boyandı ve yukarıda belirtildiği gibi, floresan ataçmanlı mikroskopta, 20x0,40 büyütmede görüntülenerek fotoğraflandı. DNA hasarı "Comet Score 15 Image Analysis" programı kullanılarak nicel olarak değerlendirildi ve hasar "kuyruk DNA yüzdesi" olarak ifade edildi (136). Hücre hatlarında her iki lamda 50'şer hücre olmak üzere 100 hücre değerlendirildi ve

her örnek için deney üç kez tekrarlandı. Deney sonunda etidyum bromür ile boyanan hücreler BAB floresan ataçmanlı mikroskop ve görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı. DNA hasarı "Comet Score 15 Image Analysis" programı (Tritek Corp, ABD) kullanılarak nicel olarak değerlendirildi.

III.2.10 DCF-DA Testi

Deney için muamele edilmiş PBS içindeki hücrelere 1 µL H₂-DCFHDA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diasetat, 20 mM) ilave edildi. 37 °C'de 20 dk. inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkandı ve 150 µL BSA-propidyum iyodür ilave edilerek 10 dk. buz üzerinde bekletildi. Değerlendirme için akım sitometrisinde (DCF filtre, 488 nm/25nm bant genişliği; PI filtre, 575 nm/26nm bant genişliği) hücrelerin floresans şiddeti ölçüldü. Canlı hücreler PI boyama ile belirlendi. PI floresansı akım sitometrisinde FL-3'te toplanır (620 nm). PI negatif olan canlı hücreler seçilerek (FACS gating) DCF floresansı FL-1'de kaydedildi (525 nm). Her örnek için 20.000 hücre değerlendirildi. Verilerin analizi BD Accuri C6 yazılım programı ile gerçekleştirildi.

III.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Ekstrelerin IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri, "GraphPad™ Prism® 5.0 yazılım programı" ile hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri "Windows için SPSS versiyon 22" paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği "Shapiro Wilk" testi ile araştırılmıştır. Verilerin analizi nonparametrik Mann-Whitney-U testi ile yapılmıştır. p≤0.05 anlamlı farklılık kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

IV.1 EKSTRAKSİYON VERİMLERİ

Çalışmamızda ekstrakter 400 g toz haline getirilmiş *C. cassia* kabuğundan hazırlanmıştır. Ekstraksiyon verimleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 2’de görülmektedir.

$$\% \text{ Verim} = m_2/m_1 \times 100$$

m_1 = Ekstrakte edilen tarçın miktarı

m_2 = Ekstraksiyon sonucunda elde edilen madde miktarı

Tablo 2. *C. cassia* ekstraksiyon verimleri

Ekstreler	Verim (%)
<i>n</i> -Hekzan	0,47
Kloroform	0,37
Etil Asetat	0,99
Butanol	4,44
Su	1,79
TOTAL VERİM	8,06

IV.2 HÜCRE AKTİVASYON ÇALIŞMA SONUÇLARI

Çalışmalar için hücre aktivasyonunu belirlemek amacıyla her hücre hattından belirtilen konsantrasyonlarda hücre solüsyonları 96 kuyucuklu plakalara kondu ve WST–1 (10 µL/kuyucuk) eklendi. Absorbanslar mikrolaka okuyucusunda 450 nm test ve 630 nm referans dalga boylarında ölçüldü. 630 nm referans dalga boyunda ölçülen bazal absorbans, 450 nm deki ölçümden çıkarıldı.

T1DM hücre hatlarıyla yapılan aktivasyon çalışmalarının sonuçları Tablo 3’te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, hücrelerin 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonlarda kullanılmasının uygun olduğu saptanmıştır.

Tablo 3. T1DM hücrelerinin aktivasyon çalışma sonuçları*

Hücre Sayısı (x10 ⁶ /ml)	GM01838 (absorbans)	GM02765 (absorbans)
2	1,8105 ± 0,21	1,5250 ± 0,15
1	0,6124 ± 0,08	0,6055 ± 0,11
0,5	0,4865 ± 0,04	0,4681 ± 0,01
0,25	0,3957 ± 0,04	0,3581 ± 0,01
0,125	0,2657 ± 0,02	0,2460 ± 0,01
0,0625	0,1924 ± 0,02	0,1811 ± 0,01
0,03125	0,1516 ± 0,01	0,1545 ± 0,02
0,015625	0,1246 ± 0,00	0,1269 ± 0,01

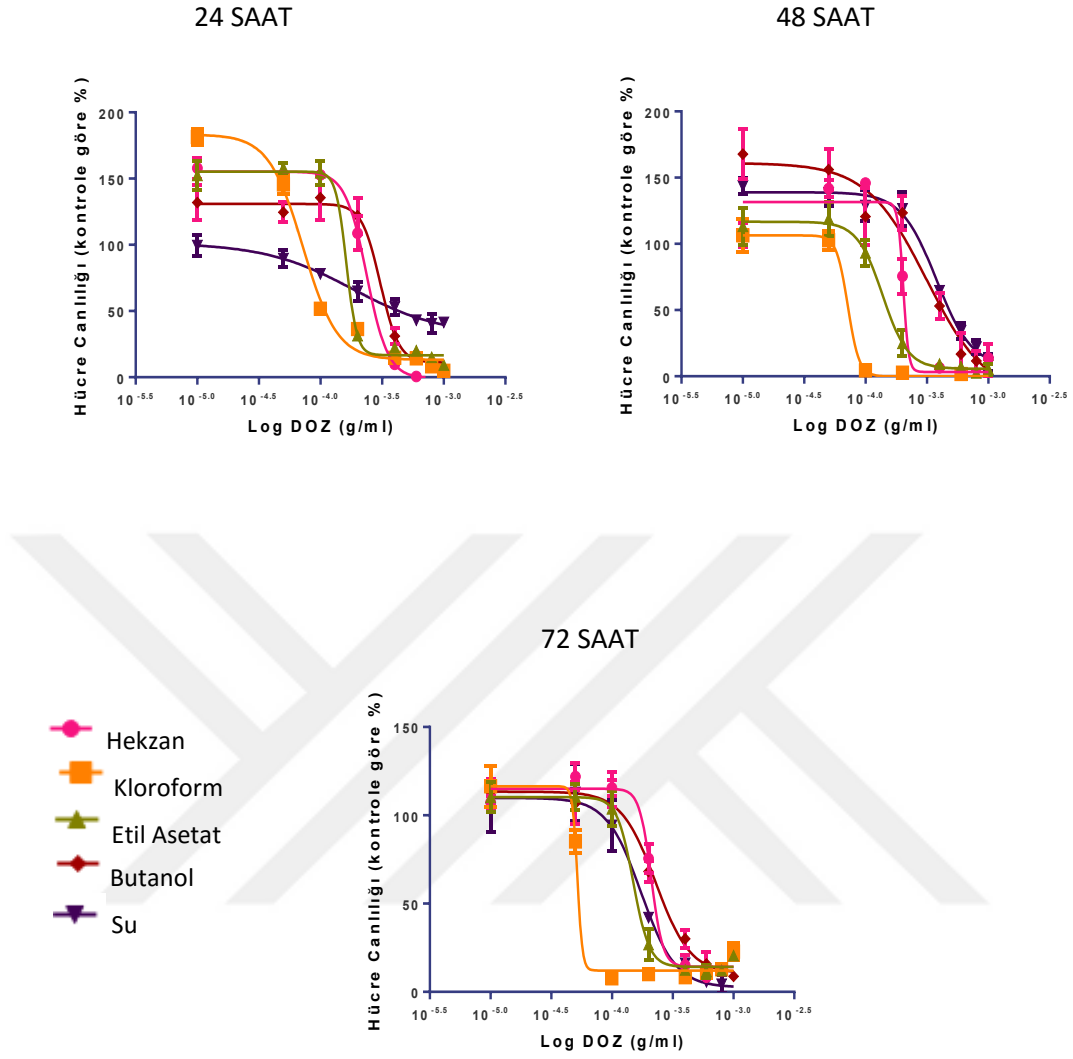
*Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir.

IV.2.1 WST-1 Testi Sonuçları

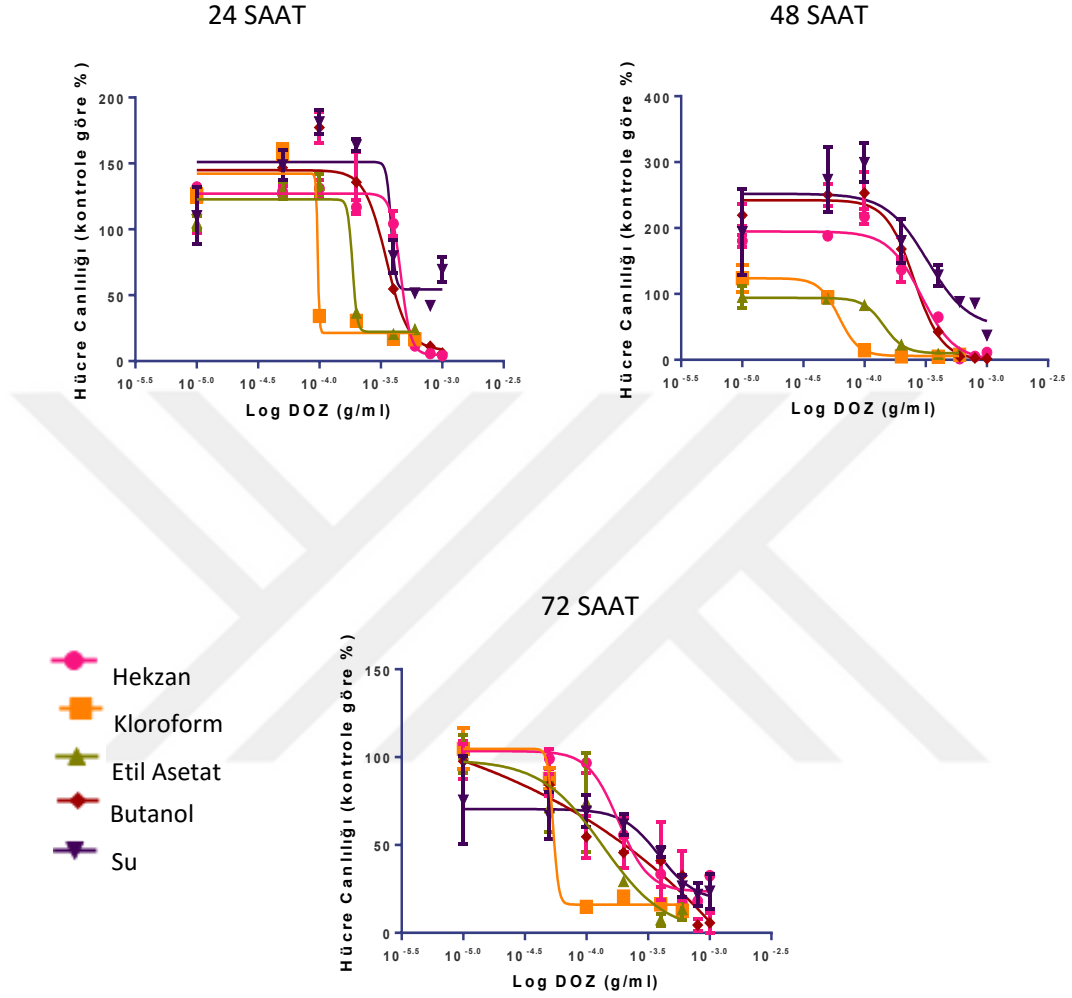
Çalışmamızın başlangıcında WST-1 testi için ekstrelerin 100-0,78 µg/ml ile arasında değişen konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen IC₅₀ değerlerinin genel olarak kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/ml' nin üstünde olması, bazen saptanamamış olması gibi nedenlerle ekstrelerin konsantrasyon aralığı 10⁻³-10⁻⁸ g/ml olarak genişletildi. Sonuçlar gözden geçirildiğinde hücre ve ekstrelerin farklılığı nedeniyle konsantrasyonlar 10⁻³-10⁻⁵ g/ml arasında tutularak WST-1 testi tekrarlandı. Ekstrelerin her konsantrasyonu için üç ayrı deney yapıldı. Ekstrelerin bazal absorbansları çıkarıldıktan sonraki absorbanslar değerlendirildi. Sonuçlar kontrol değeri ile karşılaştırılarak kontrole göre % canlılık şeklinde ifade edildi ve Şekil 8-9'da hücre hatları için grafiksel olarak sunuldu. IC₅₀ değerleri "GraphPad™ Prism® 5.0" yazılım programında:

"Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10[^]((LogIC₅₀-X)*HillSlope))" formülüne göre hesaplandı.

Ekstrelerin IC₂₀ değerleri de aynı yazılım programında hesaplandı. WST-1 çalışma sonuçları değerlendirildiğinde GM01838 ve GM02765 hücrelerinde ekstrelerle 24 saat inkübasyon sürelerinin optimum olduğu belirlendi. Tablo 4'te ekstrelerin 24 saat inkübasyondaki IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri verilmiştir.



Şekil 8. Ekstrelerin GM01838 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi



Şekil 9. Ekstrelerin GM02765 hücre hattı ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi

Tablo 4. T1DM hücre hatlarında ekstrelerin 24 saat inkübasyon sonrası IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri

EKSTRELER	GM01838		GM02765	
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₂₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₂₀ (µg/ml)
Hekzan	406,8	135,5	459,3	100,2
Kloroform	72,1	5,5	75,0	5,1
Etil Asetat	152,9	38,2	185,6	45,0
Butanol	306,1	78,7	351,6	80,2
Su	407,6	30,4	400,0	30,2

IV.3 ANNEKSİN V/PI ve TUNEL TEST SONUÇLARI

Ekstrelerin IC₂₀ değerlerinin saptanmasından sonraki aşamada hücre hatlarında apoptoz oluşturmeyan ekstre/ekstrelerin belirlenmesi amacıyla Anneksin V/PI ve TUNEL testleri çalışıldı. Bu çalışmalarda ekstrelerinin hücre canlılığını % 20 azaltan konsantrasyonları kullanıldı. Apoptotik ve nekrotik indeksler; ekstrelerin apoptotik ya da nekrotik hücre oranlarının karşı gelen kontrollerin sırasıyla apoptotik ya da nekrotik hücre oranlarına bölünmesiyle hesaplanır. Bulunan değer >1 olması apoptoz ya da nekrozun indüklendiğini göstermektedir. Sonuçlar Anneksin V/PI testi için Tablo 5-6'da ve TUNEL testi için Tablo 7'de sunulmuştur. Ekstrelerin apoptotik indekslerine ilişkin sonuçlar Anneksin V/PI ve TUNEL testleri için sırasıyla Tablo 8-9'da ve grafiksel olarak Şekil 10-11'de sunulmuştur. Bir örneğe ait Anneksin V/PI analiz sonuçlarının histogramı Şekil 12'de ve bir örneğe ait TUNEL analiz sonuçlarının histogramı Şekil 13'te görülmektedir.

Tablo 5. GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI analiz sonuçları*

GM01838	ANNEKSİN V/PI				
EKSTRELER	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Total Apoptoz (%)	Nekroz (%)
KONTROL	91,74 ± 3,7	2,39 ± 2,1	3,40 ± 3,4	5,79	2,44 ± 2,3
HEKZAN	87,29 ± 5,5	5,14 ± 3,8	2,96 ± 1,8	8,10	4,62 ± 3,7
KLOROFORM	84,19 ± 7,8	11,43 ± 9,2	2,72 ± 0,5	14,15	1,69 ± 1,0
ETİL ASETAT	91,06 ± 4,5	3,41 ± 0,5	2,71 ± 2,3	6,11	2,89 ± 1,9
BUTANOL	93,14 ± 4,6	3,72 ± 1,9	1,64 ± 2,7	5,36	1,53 ± 2,6
SU	94,73 ± 2,5	3,49 ± 2,6	0,61 ± 0,3	4,10	1,17 ± 1,0

*Sonuçlar birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir.

Tablo 6. GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI analiz sonuçları*

GM02765	ANNEKSİN V/PI				
EKSTRELER	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Total Apoptoz (%)	Nekroz (%)
KONTROL	90,94 ± 4,5	4,64 ± 2,0	2,52 ± 2,3	7,16	1,87 ± 1,0
HEKZAN	85,56 ± 5,2	7,46 ± 4,2	4,67 ± 3,3	12,13	2,31 ± 1,8
KLOROFORM	85,49 ± 4,9	7,51 ± 3,1	4,38 ± 3,4	11,89	2,59 ± 1,3
ETİL ASETAT	85,23 ± 6,9	8,25 ± 5,3	3,94 ± 3,2	12,19	2,56 ± 1,9
BUTANOL	92,43 ± 2,9	5,86 ± 3,4	0,76 ± 0,7	6,62	0,94 ± 1,3
SU	96,38 ± 2,0	2,82 ± 1,5	0,43 ± 0,7	3,25	0,33 ± 0,4

*Sonuçlar birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir.

Tablo 7. T1DM hücre hatlarında TUNEL analiz sonuçları*

HÜCRELER	EKSTRELERİN APOPTOTİK HÜCRE ORANLARI (%)					
	KONTROL	HEKZAN	KLOROFORM	ETİL ASETAT	BUTANOL	SU
GM01838	4,79 ± 1,2	9,08 ± 3,3*	11,00 ± 4,4*	10,15 ± 6,9	3,28 ± 1,1	3,23 ± 1,8
GM02765	6,76 ± 0,8	14,08 ± 9,5	12,37 ± 7,8	8,23 ± 5,1	5,35 ± 1,6	4,73 ± 2,1

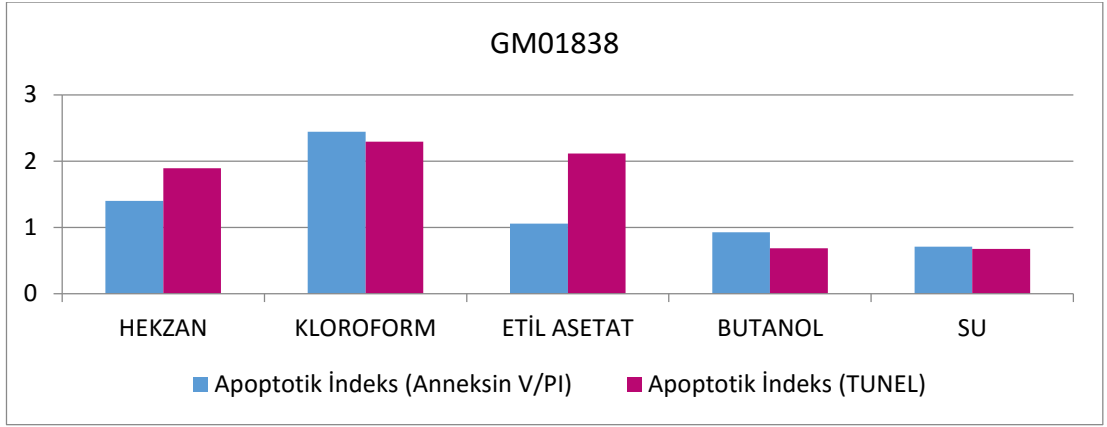
*Sonuçlar birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık *p<0,05.

Tablo 8. Ekstrelerin T1DM hücre hatlarında Anneksin V/PI yöntemine göre apoptotik ve nekrotik indeksleri

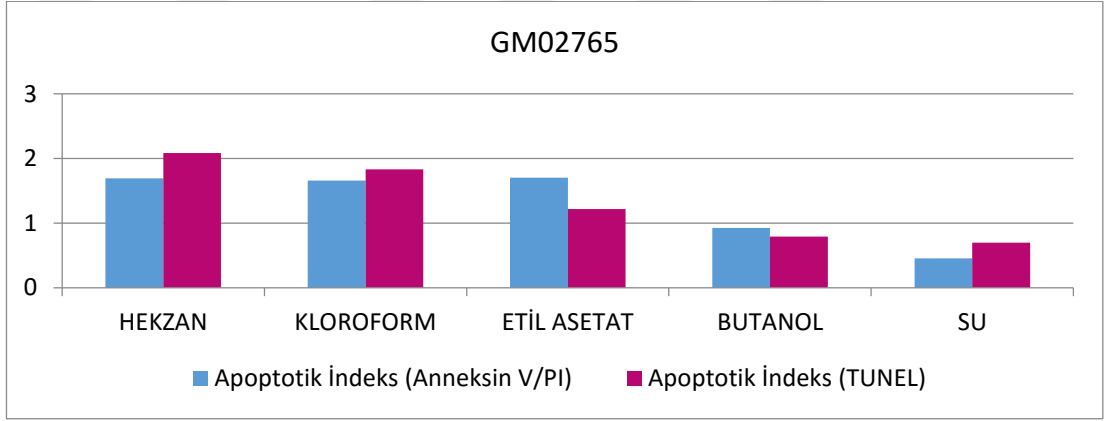
EKSTRELER	GM01838		GM02765	
	Apoptotik İndeks	Nekrotik İndeks	Apoptotik İndeks	Nekrotik İndeks
HEKZAN	1,40	1,89	1,69	1,24
KLOROFORM	2,45	0,69	1,66	1,39
ETİL ASETAT	1,06	1,19	1,70	1,37
BUTANOL	0,93	0,63	0,92	0,50
SU	0,71	0,48	0,45	0,18

Tablo 9. Ekstrelerin T1DM hücre hatlarında TUNEL yöntemine göre apoptotik indeksleri

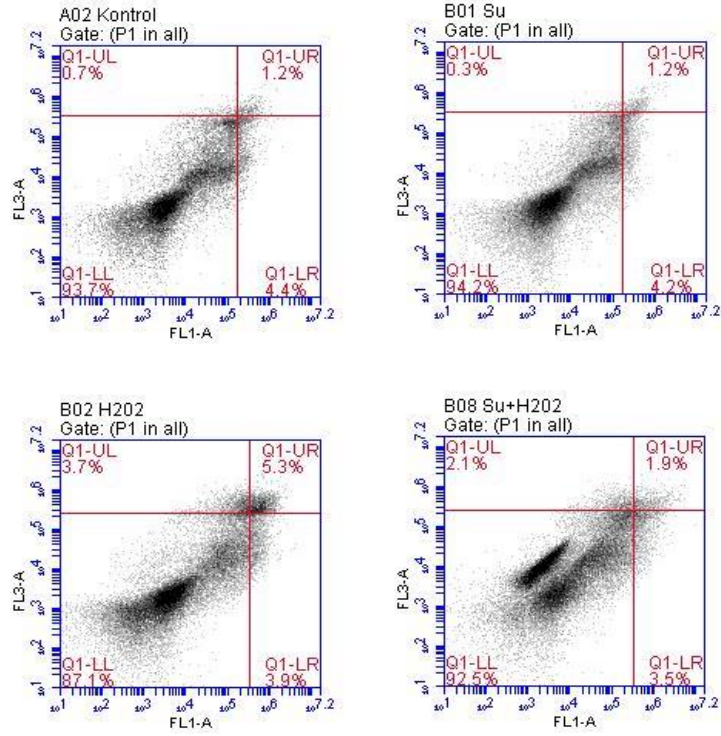
HÜCRELER	APOPTOTİK İNDEKS				
	HEKZAN	KLOROFORM	ETİL ASETAT	BUTANOL	SU
GM01838	1,89	2,29	2,12	0,68	0,67
GM02765	2,08	1,83	1,22	0,79	0,70



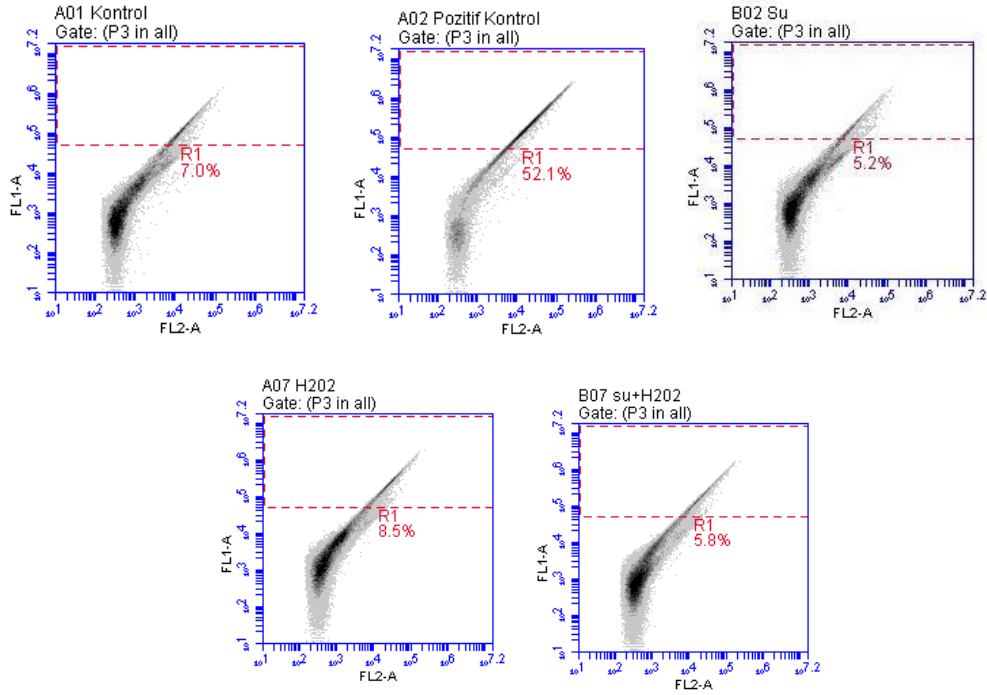
Şekil 10. GM01838 hücre hattında ekstrelerin apoptotik indeksleri.



Şekil 11. GM02765 hücre hattında ekstrelerin apoptotik indeksleri.



Şekil 12. *C. cassia* su ekstrelerinin GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI analiz histogramı (LL-canlı; LR-erken apoptotik; UR-geç apoptotik; UL-nekrotik hücre oranlarını göstermektedir.)



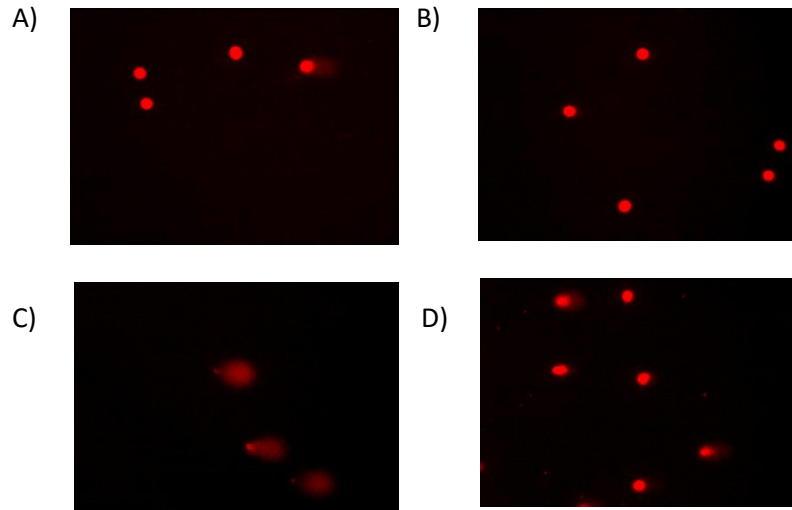
Şekil 13. *C. cassia* su ekstrelerinin GM01838 hücre hattında TUNEL analiz histogramı (Kesikli kırmızı çizginin üst bölümleri apoptoz oranlarını göstermektedir).

Deney sonuçları incelendiğinde *C. cassia* butanol ve su ekstraktları dışındaki ekstraktların her iki hücre hattında da Annexin V/PI yöntemine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte apoptozda artışa yol açtıkları görülmektedir. Annexin V/PI yöntemine göre ekstrakt muamelesiyle hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma olmamıştır. TUNEL testi apoptoz sonuçlarını destekler niteliktedir. TUNEL testine göre GM01838 hücrelerinde hekzan ve kloroform ekstraktları apoptozu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmışlardır ($p<0,05$) (Tablo 7).

Bu sonuçlara dayanılarak çalışmamızın bundan sonraki aşamasında apoptozu indüklemeyen ve hücre canlılığını azaltmayan su ve butanol ekstraktlarının oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

IV.4 ALKALİ KOMET DENEY SONUÇLARI

C. cassia butanol ve su ekstraktlarının T1DM hücre hatlarında endojen ve H_2O_2 ile indüklenen oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkileri alkali komet yöntemi ile araştırıldı. Oksidatif stres oluşumunu indüklemek amacıyla $150 \mu M$ H_2O_2 kullanıldı. Komets oluşumuna ilişkin örnek olarak; GM01838 hücre hattında yapılan alkali komet analizinde gözlenen DNA hasarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 14'te sunuldu. T1DM hücre hatlarında alkali komet deney sonuçları Tablo 10'da ve grafiksel olarak Şekil 15-16'da gösterildi.



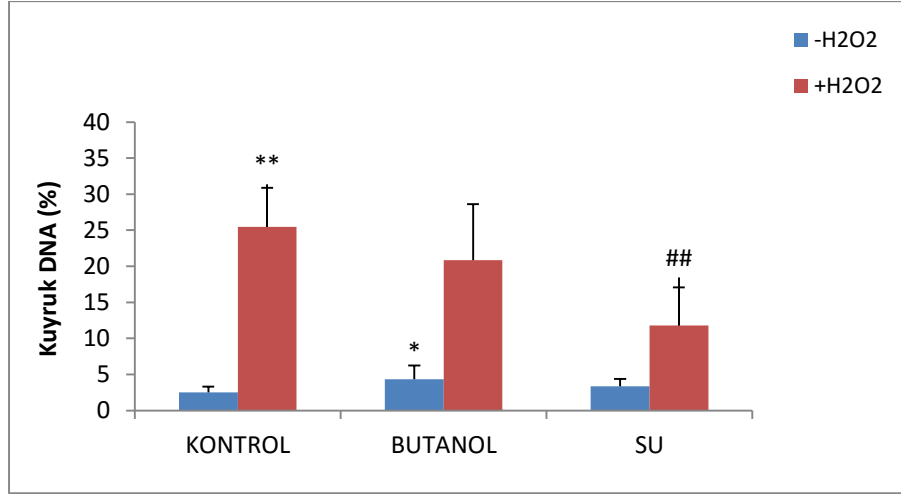
Şekil 14. GM01838 hücre hattında komet analizinin floresan mikroskopundaki görüntüleri*

A. Kontrol hücreleri; B. Ekstre ile muamele görmüş hücreler; C. H₂O₂ ile muamele edilmiş hücreler; D.H₂O₂ + *C. cassia* su ekstresi ile muamele görmüş hücreler

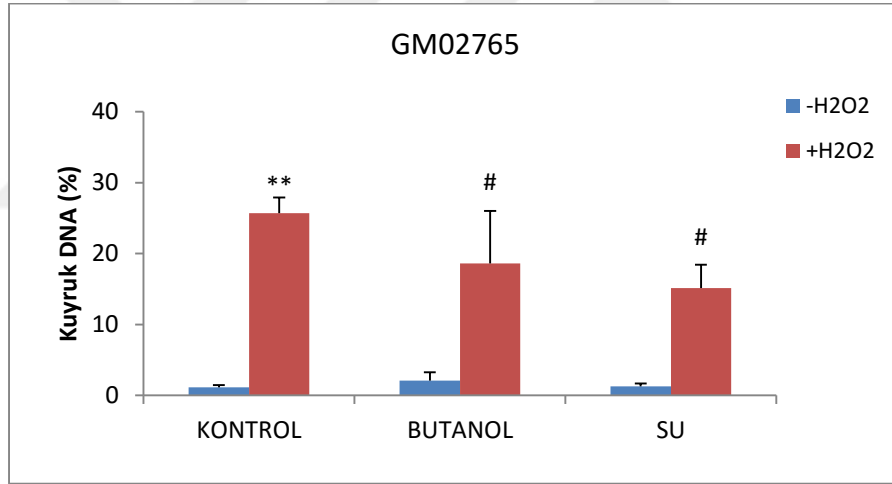
Tablo 10. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin DNA hasarı üzerindeki etkileri*

	DNA HASARI (KUYRUK DNA %)		
	EKSTRELER	GM01838	GM02765
ENDOJEN (-H ₂ O ₂)	KONTROL	2,49 ± 0,8	1,14 ± 0,3
	BUTANOL	4,33 ± 1,8 *	2,08 ± 1,2
	SU	3,35 ± 1,0	1,26 ± 0,4
H ₂ O ₂ İLE İNDÜKLENEN (+H ₂ O ₂)	KONTROL	25,46 ± 5,4 **	25,69 ± 2,2 **
	BUTANOL	20,87 ± 7,7	18,59 ± 7,4 #
	SU	11,77 ± 5,3 ##	15,14 ± 3,3 #

*Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık *p<0,05 **p<0,01; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık #p<0,05 ## p<0,01.



Şekil 15. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM01838 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama $\pm$ standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık * $p<0,05$ ** $p<0,01$; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık ## $p<0,01$.



Şekil 16. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM02765 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkilerinin grafiksel gösterimi. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama $\pm$ standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık # $p<0,05$.

T1DM hücre hatlarında su ekstresi ile muamele endojen DNA hasar düzeylerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadi. Butanol ekstresi ile muamele edilen GM01838 hücrelerinde endojen DNA hasarında düşük düzeyde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu belirlendi. Su ekstresi iki hücre hattında da H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu (p<0,05). Butanol ekstresinin etkisi hücre hatlarına göre değişkenlik gösterdi; GM02765 hücre hattında H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltırken (p<0,05), GM01838 hücrelerinde azalma olmakla birlikte anlamlı farklılık yoktu.

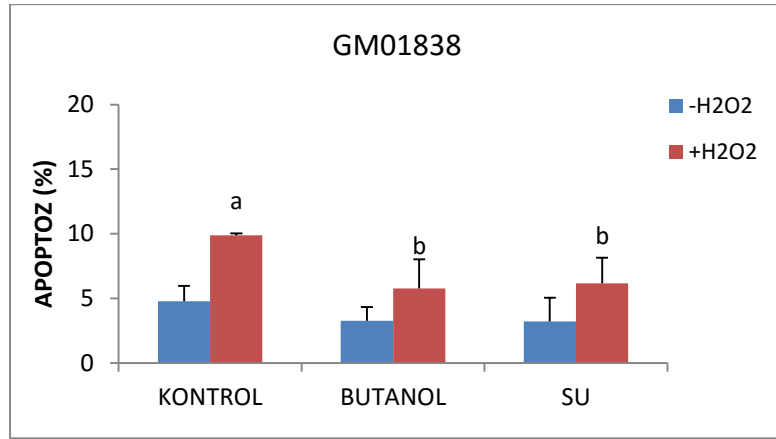
IV.5 TUNEL, Anneksin V/PI ve DCF-DA Test Sonuçları

Çalışmanın başlangıç aşamasında *C. cassia* ekstrelerinden apoptozu indüklemeyen ve en az DNA hasarı yapan ekstrenin belirlenmesi amacıyla Anneksin V/PI ve TUNEL testleri yapılmıştı. Bu aşamada; su ve butanol ekstrelerinin endojen ve H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı alkali komet test sonuçlarını desteklemek amacıyla TUNEL ve Anneksin testleri uygulandı. Sonuçlar Tablo 11-13'te ve grafikler halinde Şekil 17-20'de verildi. Ekstrelerin oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkilerinin ROS oluşumuyla ilişkisini değerlendirmek amacıyla yapılan DCF-DA testi sonuçları Tablo 14'te ve grafiksel olarak Şekil 21-22'de gösterildi.

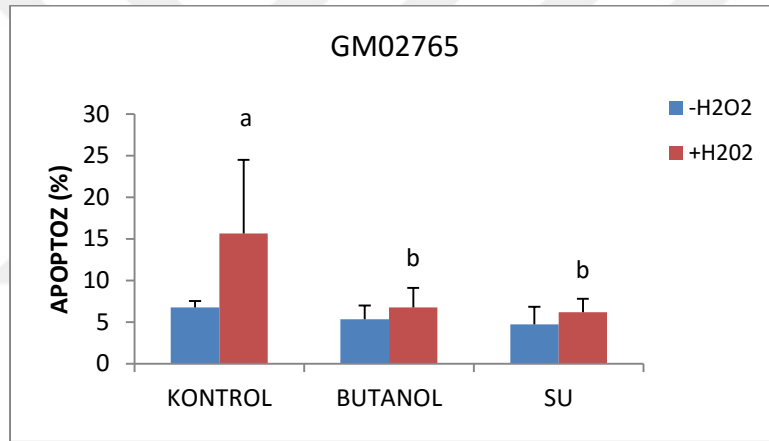
Tablo 11. *C. cassia* butanol ve su ekstrelerinin T1DM hücre hatlarında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri*

	EKSTRELER	GM01838	GM02765
		Apoptoz (%)	Apoptoz (%)
ENDOJEN (-H ₂ O ₂)	KONTROL	4,79 ± 1,2	6,76 ± 0,8
	BUTANOL	3,28 ± 1,1	5,35 ± 1,6
	SU	3,23 ± 1,8	4,73 ± 2,1
H ₂ O ₂ İLE İNDÜKLENEN (+H ₂ O ₂)	KONTROL	9,87 ± 0,2 ^a	15,64 ± 8,8 ^a
	BUTANOL	5,77 ± 2,3 ^b	6,77 ± 2,3 ^b
	SU	6,17 ± 2,0 ^b	6,18 ± 1,6 ^b

*Sonuçlar birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık ^ap=0,05; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık ^bp=0,05.



Şekil 17. *C. cassia* butanol ve su ekstraktlarının GM01838 hücre hattında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama $\pm$ standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık ^ap=0,05; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık ^bp=0,05.

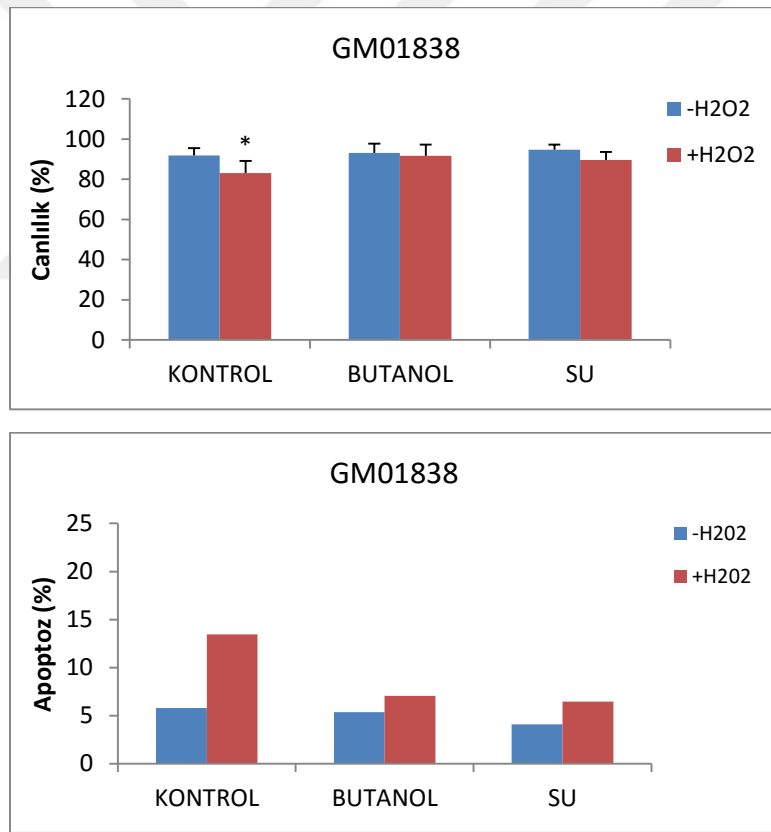


Şekil 18. *C. cassia* butanol ve su ekstraktlarının GM02765 hücre hattında TUNEL yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen apoptoz üzerindeki etkileri. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama $\pm$ standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık ^ap=0,05; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık ^bp=0,05.

Tablo 12. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen canlılık ve apoptoz üzerindeki etkileri*

GM01838	EKSTRELER	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Total Apoptoz (%)
ENDOJEN (-H ₂ O ₂)	KONTROL	91,74 ± 3,7	2,39 ± 2,1	3,40 ± 3,4	5,79
	BUTANOL	93,14 ± 4,6	3,72 ± 1,9	1,64 ± 2,7	5,36
	SU	94,73 ± 2,5	3,49 ± 2,6	0,61 ± 0,3	4,10
H ₂ O ₂ İLE İNDÜKLENEN (+H ₂ O ₂)	KONTROL	83,13 ± 6,0 *	8,47 ± 6,9	4,98 ± 2,5	13,44
	BUTANOL	91,69 ± 5,5	5,06 ± 2,8	2,00 ± 2,7	7,05
	SU	89,64 ± 3,9	3,31 ± 1,1	3,13 ± 1,4	6,44

*Sonnular birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık *p<0,05.

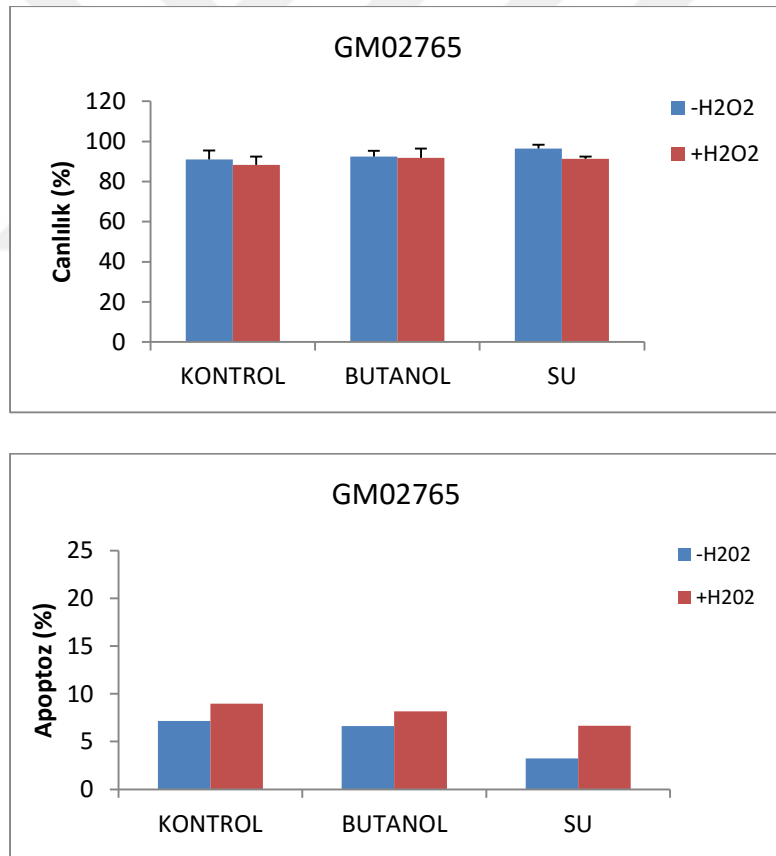


Şekil 19. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM01838 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve total apoptoz oranları (%)’nın grafiksel gösterimi. Kontrole göre anlamlı farklılık *p<0,05.

Tablo 13. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen canlılık ve apoptoz üzerindeki etkileri*

GM02765	EKSTRELER	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Total Apoptoz (%)
ENDOJEN (-H ₂ O ₂)	KONTROL	90,94 ± 4,5	4,64 ± 2,0	2,52 ± 2,3	7,16
	BUTANOL	92,43 ± 2,9	5,86 ± 3,4	0,76 ± 0,7	6,62
	SU	96,38 ± 2,0	2,82 ± 1,5	0,43 ± 0,7	3,25
H ₂ O ₂ İLE İNDÜKLENEN (+H ₂ O ₂)	KONTROL	88,26 ± 4,2	4,64 ± 1,7	4,34 ± 2,9	8,97
	BUTANOL	91,77 ± 4,7	7,85 ± 4,7	0,33 ± 0,2	8,18
	SU	91,40 ± 1,1	4,99 ± 2,8	1,67 ± 0,4	6,66

*Değerler birbirinden bağımsız dört ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir.

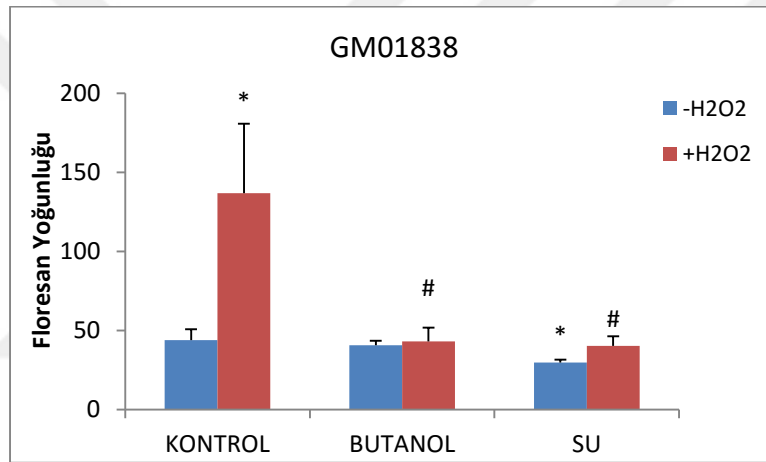


Şekil 20. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM02765 hücre hattında Anneksin V/PI yöntemine göre endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve total apoptoz oranları (%)’nın grafiksel gösterimi.

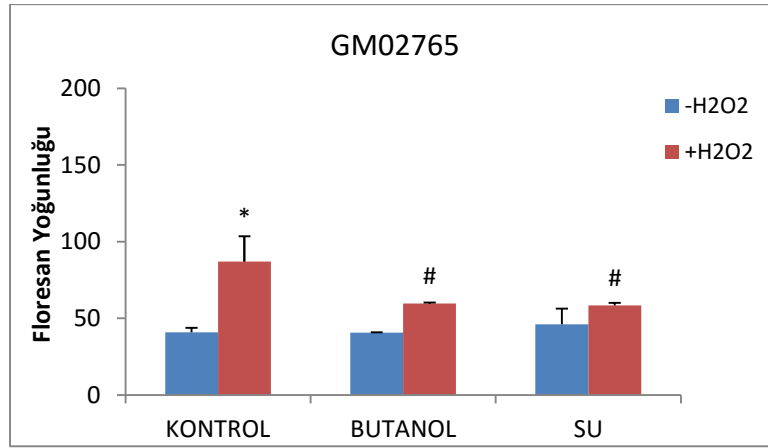
Tablo 14. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının T1DM hücre hatlarında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerindeki etkileri*

	EKSTRELER	GM01838	GM02765
		Floresans Yoğunluğu	Floresans Yoğunluğu
ENDOJEN (-H ₂ O ₂)	KONTROL	43,94 ± 7,0	40,91 ± 2,8
	BUTANOL	40,73 ± 2,9	40,62 ± 0,2
	SU	29,76 ± 2,0 *	46,13 ± 10,3
H ₂ O ₂ İLE İNDÜKLENEN (+H ₂ O ₂)	KONTROL	136,93 ± 43,9 *	87,03 ± 16,5 *
	BUTANOL	43,16 ± 8,7 #	59,57 ± 0,8 #
	SU	40,33 ± 6,1 #	58,43 ± 1,7 #

*Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık *p=0,05; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık # p=0,05.



Şekil 21. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM01838 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerine etkileri. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama ± standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık *p=0,05; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık #p=0,05.



Şekil 22. *C. cassia* butanol ve su ekstralarının GM02765 hücre hattında endojen ve hidrojen peroksitle indüklenen ROS oluşumu üzerine etkileri. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç ölçümün "ortalama $\pm$ standart sapma" değerleridir. Kontrole göre anlamlı farklılık * $p=0,05$; H₂O₂'e göre anlamlı farklılık # $p=0,05$.

TUNEL testinde H₂O₂ ile DNA fragmentasyonundaki artış her iki hücre hattında da su ve butanol ekstraları ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı.

Anneksin/PI analiz sonuçlarına göre hidrojen peroksit, hücre canlılığında azalmaya neden oldu. Ancak bu azalma % 80'in altına düşmedi. Butanol ve su ekstralarının her iki hücre hattında da hücre canlılığındaki azalmayı önlediği saptandı.

DCF-DA testinde ROS oluşumu GM01838 hücrelerinde su ekstralarıyla muamelede kontrole göre anlamlı düzeyde azaldı ($p=0,05$). H₂O₂ ile muamelede ROS oluşumu GM01838 ve GM02765 hücrelerinde kontrole göre anlamlı düzeyde arttı ($p=0,05$). Butanol ve su ekstralarıyla muamelenin H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumunu her iki hücre hattında da azalttığı saptandı (Tablo 14).

V. TARTIŞMA

Tip 1 diyabet hastalarında oksidatif stres nedeniyle oksidatif DNA hasarının arttığı, onarım kapasitesinin azaldığı ve bu durumun diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışına ve kanser gelişimi sürecine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (91). Bu nedenle araştırmalar özellikle antihiperglisemik ve antioksidan özelliklere sahip bileşikler, bitkisel kaynaklı ürünler ve bileşenlerinin diyabet ve komplikasyonlarının oluşum/gelişimi üzerindeki etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bitkisel kaynaklı ürünlerde bulunan polifenoller gibi çeşitli bileşiklerin serbest radikal süpürücü ve/veya antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri nedeniyle oksidatif stres kaynaklı hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdikleri, hatta tedavilerinde yararlı olabileceklerine ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır (156–160).

C. cassia ucuz olması nedeniyle ülkemizde ve diğer ülkelerde çay ve baharat olarak sıklıkla kullanılan tarçın türüdür. Çeşitli tarçın türlerinin özellikle kabukları antioksidan, antidiyabetik ve antitümör aktiviteyi de içeren geniş spektrumlu biyolojik etkilere sahip oldukları ortaya konmuştur (7,12,32,46,161). Tarçın ekstrelerinin antidiyabetik ve çeşitli kanser tiplerinin gelişimine karşı koruyucu etkilerinin içeriklerindeki polifenollerin antioksidan aktivitesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar *C. cassia* su ekstresinin anti-tümör aktivitesinin pro-apoptotik aktiviteyi artırmasıyla ilişkili olduğu gen ekspresyon düzeyinde gösterilmiştir (46).

Ekibimizin *C. cassia* kabuğundan hazırlanan farklı ekstre ve fraksiyonlarının insan primer periferik kan lenfositleri, V79 Çin Hamster akciğer fibroblastları ve HL-60 insan promiyelositik lösemi hücreleri gibi farklı hücrelerde endojen ve oksidatif DNA hasarı, sitotoksik ve apoptotik aktivitelerine yönelik yaptığı çalışmalar bulunmaktadır (162–165). Bu çalışmamızda ilerlemesi ve komplikasyonlarının gelişiminde oksidatif stresin önemli rol oynadığı gösterilmiş olan T1DM hastalığını hedef alarak “T1DM *in vitro* modelinde” *C. cassia* ekstrelerinin etkilerini araştırmayı amaçladık. Ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan yöntem önceki çalışmalarda kullanılan yöntemin modifiye şeklidir (Bakınız III.2.2 Ekstre Hazırlanışı). Bu modifikasyonun amacı, yalnızca metanol-su ile ekstraksiyon yapıldığında ekstrakta geçmeyen ve atılan apolar bileşiklerin de etkinliğini araştırmaktır.

In vitro T1DM modeli olarak Coriell Enstitüsü (NewJersey, ABD) diyabetik hücre koleksiyonundan temin ettiğimiz Epstein Barr virüsü (EBV) ile transforme (immortalize) T1DM insan lenfosit hücrelerini (GM01838, GM02765) kullandık. İnsan periferik kan lenfositleri, endojen DNA hasar düzeyi, ekzojen ajanlar ya da hastalıkların genotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılan hücrelerdir; DNA hasar ve onarımının değerlendirilmesine ve gen

ekspresyonu ile ilgili bilgilerin sağlanmasına yönelik çalışmalarda önemli bir yere sahiptirler (166).

EBV ile transforme hücreler, büyük miktarlarda DNA sağlanmasına olanak verdiği için önemli hastalık koleksiyonlarının uzun vadeli yönetiminde ve genetik epidemiyoloji çalışmalarının ilerlemesinde referans materyal olarak önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız EBV ile immortalize B lenfosit hücre hatları sınırsız DNA kaynağıdır ve fonksiyonel ve moleküler çalışmalar için biyolojik malzeme kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tip hücre hatlarının hücrelerin alındığı bireye özgü metabolik yolları temsil ettiği gösterilmiştir (167,168).

Çalışmamızda ekstrelerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde; kloroform ve etil asetat ekstrelerinin daha düşük konsantrasyonlarda inhibitör etkinlik gösterdikleri (IC_{50} değerleri sırasıyla <100 ve <200 $\mu\text{g/ml}$), hekzan, su ve butanolün IC_{50} değerlerinin >300 $\mu\text{g/ml}$ olduğu belirlendi. Daha önce laboratuvarımızda *C. cassia* su ekstresi ile insan primer periferik kan lenfositlerinde yaptığımız bir çalışmada su ekstresi ile 24 saat muamele edilen lenfositlerde canlılığın konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiş, IC_{50} değeri 253.2 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştı (162). Kwon ve ark.; *C. cassia* su ekstresinin normal hücre büyümesi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında fare primer lenfositlerini kullanmışlar ve su ekstresinin 0.5 mg/ml konsantrasyonlara kadar hücrelerde büyüme inhibisyonu oluşturmadığını saptamışlardır (46). Bu tez çalışmamızda T1DM hücrelerinin her ikisinde de su ekstresinin IC_{50} değerleri yaklaşık 400 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar dışında *C. cassia* ekstrelerinin sağlıklı hücrelerde sitotoksik ve apoptotik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmalar daha çok ekstrelerin ya da bileşenlerinin antidiyabetik ve antikanser aktiviteleri ile ilgilidir. Lee ve ark. farklı kanser hücrelerinde *C. cassia* kabuğunun metanol ekstresi ve fraksiyonlarının sitotoksik etkilerini çeşitli kanser hücrelerinde sulforodamin B testi ile araştırmışlar, metanol ekstresi ile hekzan ve etil asetat fraksiyonlarının güçlü sitotoksisite gösterdiğini, kloroform, butanol ve su fraksiyonlarının bu hücrelerde sitotoksik olmadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada en etkin fraksiyonun hekzan ve etken bileşenin içeriğindeki sinnamaldehit olduğunu göstermişlerdir (50). Daha önce laboratuvarımızda insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde *C. cassia* kabuk ekstreleriyle yapılan çalışmada metanol ekstresinin hekzan, kloroform, etil asetat fraksiyonlarının anlamlı düzeyde sitotoksisiteye neden olduğu, hekzan fraksiyonunun en güçlü etki gösterdiği saptanmıştı (169). Anılan çalışmada hekzan ekstresinin apoptozu ve apoptozla ilişkili bazı genlerin ekspresyonlarını artırdığı da gösterilmişti. T1DM hücrelerinde yaptığımız bu çalışmada ise en güçlü sitotoksisite gösteren fraksiyon kloroform

olarak belirlendi. İki çalışma sonuçlarındaki farklılıkların; hücrelerin farklı özellikte hücreler (promiyelositik lösemi hücreleri/T1DM periferik kan lenfositleri) olmasından kaynaklanabileceği, ve/veya ekstre bileşenlerinin farklılığı ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Evdokimova ve ark.ı *C. cassia*'dan hekzan ile hazırlanan ekstrenin temel bileşeninin *trans*-sinnamaldehit olduğunu göstermişlerdir (170). Rad ve ark. *C. cassia* hekzan ekstresinin iki temel bileşeninin semi-preparatif HPLC ile izole edilen ve GC-MS ile saptanan *trans*-sinnamaldehit ve kumarin olduğunu bildirmişlerdir (171). Ka ve ark.ı *C. cassia* kabuğunun aktif bileşeni sinnamaldehitin HL-60 hücrelerinde serbest oksijen radikal oluşumunu artırdığını göstermişler, bileşiğin sitotoksik etkisini ROS oluşumunun aracılık ettiği apoptozla ilişkilendirmişlerdir (172). *C. cassia* kabuğu metanol ekstresinin GC-MS analizinin yapıldığı bir çalışmada 35 fitokimyasal saptanmış ve majör bileşenlerin sinnamaldehit (% 24.58), *p*-metoksi sinnamaldehit (% 9.87), *cis*-2-metoksi sinnamik asit (% 9.22), sinnamik asit (% 7.39), kumarin (% 5.31) ve 8,11-oktadekadienoik asit metil esteri (% 4.27) olduğu bildirilmiştir (173). Bu nedenlerle anılan iki çalışmada ekstre bileşenlerinin ve düzeylerinin farklı olduğu öngörülebilir. Ekstrelerin bileşenlerinin nicel ve nitel analizinin yapılması bu sonuçların daha iyi anlaşılabilmesi için tamamlayıcı olacaktır.

Çalışmamızda ekstrelerin apoptotik aktiviteleri Anneksin V/PI ve TUNEL testleri ile araştırılmıştır. Hekzan, kloroform ve etil asetat ekstrelerinin apoptotik hücre oranını kontrollere göre değişen derecelerde artırdığı, su ve butanol ekstrelerinin ise kontrollerden farklı olmadığı ya da azalttığı gözlenmiştir (Tablo 8-9, Şekil 10-11). T1DM hücrelerinde su ve butanol ekstrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve apoptotik aktivite açısından diğer ekstrelerle göre daha güvenli bulunmaları nedeniyle bu ekstrelerin bazal ve oksidatif DNA hasarı ile ROS oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda oksidatif DNA hasarı oluşturmak için H₂O₂ kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarımızda sağlıklı insan primer lenfosit hücrelerinde 100 µM H₂O₂ yeterli DNA hasarı oluşturmuştu. T1DM hücreleri ile yaptığımız ön çalışmalarda 150 µM H₂O₂ ile daha homojen ve stabil sonuçlar alındığı için bu hücrelerle çalışmalarımızda 150 µM H₂O₂ kullanılmıştır. Hidrojen peroksit ile canlı hücre oranı azalmış, ancak inhibisyon %80'in altına düşmemiştir. Bu da çalışmamızda 150 µM H₂O₂'nin bu konsantrasyonda sitotoksiste oluşturmadığını ortaya koymuştur.

Çalışmada su ekstresinin oksidatif DNA hasarını her iki hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı hem alkali komet testi, hem de TUNEL testi ile gösterilmiştir (Tablo 10-11, Şekil 15-18). Butanol ekstresinin etkileri ise iki hücre tipinde farklılık

göstermiştir. *C. cassia* kabuğu sulu ve alkollü ekstrelerinin *in vitro* olarak yağ asit oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu güçlü şekilde inhibe ettiği, bu etkinin bu ekstrelerden izole edilen serbest radikal süpürücü aktivite ve antioksidan özelliklere sahip flavonoidlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (7,174). Su ekstresinin hem H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumundaki artışa hem de oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermesi polifenollerin antioksidan aktivitelerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinden sorumlu olabilecekleri görüşünü desteklemektedir. *C. cassia* su fraksiyonunda kateşin, epikateşin, prosiyanidin B2 ve fenol polimerleri gibi fenolik bileşiklerin varlığı gösterilmiştir (175). Butanol ekstresinin etkileri de benzerlik göstermektedir. Ancak endojen DNA hasarında artışa neden olması ve hücrelerin yanıtlarındaki farklılıklar bu ekstrenin farklılığını işaret etmektedir. Laboratuvarımızda daha önce V79 hücrelerinde yapılan çalışmada *C. cassia* metanol ekstresinin su ve butanol fraksiyonlarının H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarını azalttıkları, ayrıca endojen ve H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumunu da azalttıkları gösterilmişti (164).

Sonuç olarak çalışmamızda *C. cassia* su ekstresinin T1DM *in vitro* modelinde sitotoksik ve apoptotik aktivite göstermeyen konsantrasyonlarda oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- T1DM *in vitro* hücre modeli olarak kullanılan insan immortalize periferik kan lenfositlerinde *C. cassia* hekzan ekstresi ve metanol ekstresi alt fraksiyonları hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve apoptotik aktiviteleri açısından farklılık göstermiştir.
- 2- Hekzan, kloroform ve etil asetat ekstraktlarının apoptozu artırmaları, *C. cassia*'nın apolar çözücülere geçen bileşenlerinin su ve butanol fraksiyonlarındaki bileşenlere göre T1DM lenfositlerinde daha toksik olabileceklerini ortaya koymaktadır.
- 3- Çalışmamızda *C. cassia* su ekstresinin T1DM *in vitro* hücre modelinde H₂O₂ ile indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiş, bu etkinin oluşumunda ROS oluşumunu azaltmasının rol oynayabileceği düşünülmüştür.
- 4- Su ekstresinin endojen ve H₂O₂ ile indüklenen ROS oluşumundaki artışta azalmaya neden olması ve oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermesi, içeriğinde yüksek oranda bulunan polifenollerin antioksidan aktivitelerinin bu etkiden sorumlu olabilecekleri görüşünü desteklemektedir.
- 5- Sonuç olarak bu proje çalışmasının hipotezi olan "*C. cassia* kabuk ekstraktlarının T1DM hastalarında endojen ve oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterebileceği" hipotezimiz; *C. cassia* su ekstresi için *in vitro* koşullarda doğrulanmıştır.
- 6- Butanol ekstresinin benzer etki göstermesi, etkisinin hücreler arasında farklılık göstermesi ve endojen DNA hasarını artırabileceği bulgusu, bu fraksiyonun su fraksiyonu ile farklılığının araştırılmasını gerektirmektedir.
- 7- Bundan sonraki aşamada; *C. cassia* ekstraktlarının içeriklerinin nitel ve nicel olarak belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması ekstraktlara bağlı farklı etkilerin açıklanabilmesi açısından tamamlayıcı olacaktır.
- 8- Çalışma sonuçlarının güvenilirliği, *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Manosi D, Suvra M, Budhimanta M, Jayram H. Ethnobotany, phytochemical and pharmacological aspects of *Cinnamomum Zeylanicum* Blume. *Int Res J Pharm.* 2013;4(4):58-63.
2. Kawatra P, Rajagopalan R. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. *Pharmacognosy Res.* 2015;7(1):S1–6.
3. Toussaint-Samat M. *A History of Food.* Blackwell Publishing Ltd; 2009. 437-440.
4. Tennent JE. *Ceylon : an account of the island, physical, historical, and topographical with notices of its natural history, antiquities and productions.* Fourth Edi. London; 1860. 413-460 p.
5. Gürson O, Özçelikay G. Tarçın'ın Tarih Boyunca ve Günümüzdeki Kullanımı. *Ankara Üniversitesi Dergiler Verit.* 2005;18:171–83.
6. Dugoua J-J, Seely D, Perri D, Cooley K, Forelli T, Mills E, et al. From type 2 diabetes to antioxidant activity: A systematic review of the safety and efficacy of common and *Cassia Cinnamon* bark. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85:837–47.
7. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014:1–12.
8. Chen P, Sun J, Ford P. Differentiation of the four major species of cinnamons (*C. burmannii*, *C. verum*, *C. cassia*, and *C. loureiroi*) using a flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprinting method. *J Agric Food Chem.* 2014;62(12):2516–21.
9. Abraham K, Wöhrlin F, Lindtner O, Heinemeyer G, Lampen A. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. *Mol Nutr Food Res.* 2010 ;54(2):228–39.
10. Gruenwald, J., Brendlar, T., Jaenicke C. *PDR for Herbal Medicines.* 1st Editio. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, editors. Medicinal Economics Company; 2000. 182-183.
11. Barceloux DG. Cinnamon (*Cinnamomum* species). *Dis Mon.* 2009 2015;55(6):327–35.
12. Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol.* 2006;104(1-2):119–23.

13. Allen RW, Schwartzman E, Baker WL, Coleman CI, Phung OJ. Cinnamon use in type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis. *Ann Fam Med*. 2013;11(5):452–9.
14. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*. 2015;7(9):7729–48.
15. Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Młynarczyk A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian J Microbiol*. 2013;53(2):232–7.
16. Jayaprakasha GK, Rao LJM. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(6):547–62.
17. Senanayake UM, Lee TH, Wills RBH. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *J Agric Food Chem* [Internet]. American Chemical Society; 1978;26(4):822–4.
18. He Z-D, Qiao C-F, Han Q-B, Cheng C-L, Xu H-X, Jiang R-W, et al. Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (*cortex cinnamomi*) by high-pressure liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2005;53(7):2424–8.
19. European Medicines Agency. Assessment report on *Cinnamomum verum* J. S. Presl (*Cinnamomum zeylanicum* Nees), cortex and corticis aetheroleum. London, United Kingdom; 2010.
20. Yuan JH, Dieter MP, Bucher JR, Jameson CW. Toxicokinetics of cinnamaldehyde in F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 1992;30(12):997-1004.
21. Chen Y, Ma Y, Ma W. Pharmacokinetics and bioavailability of cinnamic acid after oral administration of *Ramulus Cinnamomi* in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;34(1):51–6.
22. Miyazaki S, Inoue H, Nadai T. Effect of antacids on the dissolution behavior of tetracycline and methacycline. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1979;27(10):2523–7.
23. Hong CH, Hur SK, Oh O-J, Kim SS, Nam KA, Lee SK. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol*. 2002;83(1-2):153–9.

24. Hong J-W, Yang G-E, Kim YB, Eom SH, Lew J-H, Kang H. Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:237.
25. Tung Y-T, Chua M-T, Wang S-Y, Chang S-T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresour Technol*. 2008;99(9):3908–13.
26. Lee SH, Lee SY, Son DJ, Lee H, Yoo HS, Song S, et al. Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF-kappa B activation in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(5):791–9.
27. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot*. 2002 ;65(10):1545–60.
28. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47(5):565–73. I
29. López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agric Food Chem*. 2005;53(17):6939–46.
30. Premanathan M, Rajendran S, Ramanathan T, Kathiresan K, Nakashima H, Yamamoto N. A survey of some Indian medicinal plants for anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity. *Indian J Med Res*. 2000;112:73–7.
31. Hayashi K, Imanishi N, Kashiwayama Y, Kawano A, Terasawa K, Shimada Y, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from *Cinnamomi* cortex, on the growth of influenza A/PR/8 virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2007;74(1):1–8.
32. Gruenwald J, Freder J, Armbruester N. Cinnamon and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010;50(9):822–34.
33. Mastura M, Nor Azah MA, Khozirah S, Mawardi R, Manaf AA. Anticandidal and antidermatophytic activity of *Cinnamomum* species essential oils. *Cytobios*. 1999;98(387):17–23.
34. Simić A, Soković MD, Ristić M, Grujić-Jovanović S, Vukojević J, Marin PD. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytother*

Res. 2004;18(9):713–7.

35. Singh HB, Srivastava M, Singh AB, Srivastava AK. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. *Allergy*. 1995;50(12):995–9.
36. Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Turon C, Marín S. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *J Appl Microbiol*. 2004;96(4):716–24.
37. Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Egidio J, Marín S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int J Food Microbiol*. 2003;89(2-3):145–54.
38. Soliman K., Badeaa R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2002;40(11):1669–75.
39. Nonaka G, Morimoto S, Nishioka I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. The Royal Society of Chemistry; 1983. p. 2139.
40. Tanaka T, Matsuo Y, Yamada Y, Kouno I. Structure of polymeric polyphenols of cinnamon bark deduced from condensation products of cinnamaldehyde with catechin and procyanidins. *J Agric Food Chem*. 2008;56(14):5864–70.
41. Lin C-C, Wu S-J, Chang C-H, Ng L-T. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res*. 2003;17(7):726–30.
42. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr*. 2003;133(5):1286–90.
43. Murcia MA, Egea I, Romojaro F, Parras P, Jiménez AM, Martínez-Tomé M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J Agric Food Chem*. 2004 Apr 7;52(7):1872–81.
44. Graf E. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Von W. Tang und G. Eisenbrand. Springer-Verlag Berlin etc. 1992, X, 1056, S., 41 Abb. gebd. DM 248,00. *Pharm Unserer Zeit*. 1992;21(6):281–281.

45. Schoene NW, Kelly MA, Polansky MM, Anderson RA. A polyphenol mixture from cinnamon targets p38 MAP kinase-regulated signaling pathways to produce G2/M arrest. *J Nutr Biochem*. 2009;20(8):614–20.
46. Kwon H-K, Hwang J-S, So J-S, Lee C-G, Sahoo A, Ryu J-H, et al. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFkappaB and AP1. *BMC Cancer*. 2010;10:392.
47. Sharma N, Trikha P, Athar M, Raisuddin S. Inhibition of benzo[a]pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat Res*. 2001;480-481:179–88.
48. Koppikar SJ, Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kumari S, Chattopadhyay S, Kaul-Ghanekar R. Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC Cancer*. 2010;10:210.
49. Schoene NW, Kelly MA, Polansky MM, Anderson RA. Water-soluble polymeric polyphenols from cinnamon inhibit proliferation and alter cell cycle distribution patterns of hematologic tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2005;230(1):134–40.
50. Lee HS, Kim SY, Lee CH, Ahn YJ. Cytotoxic and mutagenic effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials. *J Microbiol Biotechnol*. 2004;14(6):1176–81.
51. FAO/WHO. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: Some flavoring substances and non-nutritive sweetening agents. Eleventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 383, 1968.
52. Chew E-H, Nagle AA, Zhang Y, Scarmagnani S, Palaniappan P, Bradshaw TD, et al. Cinnamaldehydes inhibit thioredoxin reductase and induce Nrf2: potential candidates for cancer therapy and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(1):98–111.
53. Rafehi H, Ververis K, Karagiannis TC. Controversies surrounding the clinical potential of cinnamon for the management of diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(6):493–9.
54. Howard ME, White ND. Potential Benefits of Cinnamon in Type 2 Diabetes. *Am J Lifestyle Med*. 2012;7(1):23–6.
55. Jitomir J, Willoughby DS. Cassia cinnamon for the attenuation of glucose intolerance

- and insulin resistance resulting from sleep loss. *J Med Food*. 2009;12(3):467–72.
56. Sheng X, Zhang Y, Gong Z, Huang C, Zang YQ. Improved insulin resistance and lipid metabolism by cinnamon extract through activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *PPAR Res*. 2008;8:1–9.
 57. Anderson RA, Zhan Z, Luo R, Guo X, Guo Q, Zhou J, et al. Cinnamon extract lowers glucose, insulin and cholesterol in people with elevated serum glucose. *J Tradit Complement Med*. 2015;1(5).
 58. Subash Babu P, Prabuseenivasan S, Ignacimuthu S. Cinnamaldehyde--a potential antidiabetic agent. *Phytomedicine*. 2007;14(1):15–22.
 59. Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem*. 2004;52(1):65–70.
 60. Medagama AB. The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials. *Nutr J*. 2015;14:108.
 61. Imparl-Radosevich J, Deas S, Polansky MM, Baedke DA, Ingebritsen TS, Anderson RA, et al. Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon: implications for cinnamon regulation of insulin signalling. *Horm Res*. 1998;50(3):177–82.
 62. Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. *Lancet (London, England)*. 2001;357(9260):905–10.
 63. Kanuri G, Weber S, Volynets V, Spruss A, Bischoff SC, Bergheim I. Cinnamon extract protects against acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *J Nutr*. 2009;139(3):482–7.
 64. Park IK, Lee HS, Lee SG, Park JD, Ahn YJ. Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: attelabidae). *J Agric Food Chem*. 2000;48(6):2528–31.
 65. Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(2):424–35.

66. Jana A, Modi KK, Roy A, Anderson JA, van Breemen RB, Pahan K. Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(3):739–55.
67. Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, LaPointe NE, Anderson RA, Graves DJ, et al. Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease in vitro. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(3):585–97. 8
68. Song F, Li H, Sun J, Wang S. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *J Ethnopharmacol.* 2013;150(1):125–30.
69. European Food Safety Association. Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. *Efsa J.* 2008;793:1–15.
70. Born SL, Api AM, Ford RA, Lefever FR, Hawkins DR. Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. *Food Chem Toxicol.* 2003;41(2):247–58.
71. Zipprich K, Canzler E, Hundsdörfer S. [Teratogenic effect of coumarins]. *Zentralblatt für Gynäkologie.* 1987;109(6):364–8.
72. Keller Ki. Adverse effect of herbal drugs-Cinnamomum species. 1st ed. De Smet P, Keller K, Hansel R, editors. Berlin: Springer-Verlag; 1992. 105-114 p.
73. Nagai H, Shimazawa T, Matsuura N, Koda A. Immunopharmacological studies of the aqueous extract of Cinnamomum Cassia (CCAq). I. Anti-allergic action. *Jpn J Pharmacol.* 1982;32(5):813–22.
74. Smith CK, Moore CA, Elahi EN, Smart AT, Hotchkiss SA. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;168(3):189–99.
75. Rosemond Z, Chou S, Wilson J, Schwartz M, Tomei-Torres F, Ingerman L, et al. Toxicological Profile for Styrene. US Public Heal Serv Agency Toxic Subst Dis Regist. 2010.
76. High daily intakes of cinnamon: Health risk cannot be ruled out. *Diabetes.* 2006;(044):1–15.
77. Gümüş E, Satman I, Yetkin İ, Hatun Ş, Çakır B. Türkiye Diyabet Programı 1. 2015.

78. Inzucchi S, Bergenstal R, Fonseca V, Gregg E. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(1):62–9.
79. Abacı A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabetin Uzun Dönem İzlemi - Derleme. *Güncel Pediatr*. 2008;6(4):111–8.
80. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev. American Physiological Society*; 2011;91(1):79–118.
81. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 th Edition. Oxford University Press. Oxford; 200.p. 639-695.
82. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287–99.
83. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49(1):3–8.
84. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89–96.
85. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000;49(1):27–9.
86. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999;48(1):1–9.
87. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405–12.
88. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(3):539–42.
89. McLennan S V, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(3):344–8.
90. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. *Diabetes*. 1997;46(11):1733–42.
91. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2003;17(1):24–38.

92. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(5):561–8.
93. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett*. 1993;334(2):170–4.
94. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokim Derg*. 2006;31:51–6.
95. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813–20.
96. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004;53 (1):110–8.
97. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabète & métabolisme*. 1988;14(1):25–30.
98. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997;46(9):1481–90.
99. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*. 1998;47(7):1114–20.
100. Chappey O, Dosquet C, Wautier M-P, Wautier J-L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest*. 2003;27(2):97–108.
101. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med*. 2001;18(12):945–59.
102. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Derg*. 2005;3:30–9.
103. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21525–50.
104. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*.

2001;44(11):1973–88.

105. Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1987;316(10):599–606.
106. Aggeli I-K, Theofilatos D, Beis I, Gaitanaki C. Insulin-induced oxidative stress up-regulates heme oxygenase-1 via diverse signaling cascades in the C2 skeletal myoblast cell line. *Endocrinology.* 2011;152(4):1274–83.
107. Sholkamy E. In Vitro and In Vivo Analysis of Insulin - Induced Oxidative Stress and DNA Damage. 2013.
108. Berliner LJ, Khramtsov V, Fujii H, Clanton TL. Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(5):489–99.
109. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–55.
110. Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J.* 2010;428(2):183–90.
111. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169–85.
112. Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokim Derg.* 2007;32(3):104–11.
113. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997;2(4):152–9.
114. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39–85.
115. De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacol Res.* 2002;46(2):129–31.
116. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1102–15.

117. Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Singh SP, Sinha RP, Sinha RP. DNA Damage: Detection Strategies. *EXCLI J.* 2006;7:44–62.
118. Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.* 2003;116(14):2833–8.
119. Yolken RH. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. *Yale J Biol Med.* 1980;53(1):85–92.
120. Woudstra EC, Driessen C, Konings AW, Kampinga HH. DNA damage induction and tumour cell radiosensitivity: PFGE and halo measurements. *Int J Radiat Biol.* 1998;73(5):495–502.
121. Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol.* 2012;942:287–308.
122. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3–15.
123. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231–41.
124. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):76–100.
125. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004;384(2):201–32.
126. Leers MP, Kölgén W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 1999;187(5):567–72.
127. Glamoclija V, Vilović K, Saraga-Babić M, Baranović A, Sapunar D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2005;83(2):426–31.
128. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of Apoptotic Cells. *Mol Cell.* 2004;14(3):277–87.
129. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2006;35(4):495–516.
130. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell

- death. *Physiol Rev.* 2007;87(1):99–163.
131. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429–34.
 132. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123(1):291–8.
 133. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184–91.
 134. Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997;375(2):183–93.
 135. Collins AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res.* 2009;681(1):24–32.
 136. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249–61.
 137. Bowman L, Castranova V, Ding M. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) for evaluating nanoparticles-induced DNA damage in cells. *Methods Mol Biol.* 2012;906:415–22.
 138. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8):1221–9.
 139. Weaver JL. Introduction to flow cytometry. Vol. 21, *Methods* (San Diego, Calif.). 2000. 7-10 p.
 140. Zu Y, Shahjahan M, Chang C. Basic Principles of Flow Cytometry. In: Cagle P, Allen T, editors. *Basic Concepts of Molecular Pathology*. Houston, Texas: Springer Science & Business Media; 2009. p. 139.
 141. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;682:3–13.
 142. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 2012;887:41–7.
 143. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL

- assay. *Methods*. 2008;44(3):250–4.
144. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*. 1997;23(3):525–31.
 145. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39–51.
 146. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem*. 1989;179(1):1–7.
 147. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001;3:21-5.
 148. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya ACB. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*. 2011;16(9):7980–93.
 149. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr Chem Genomics*. 2009;3:33–41.
 150. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*. 2004;20(4):214–20.
 151. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(12):1681–8.
 152. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993;123(3):513–22.
 153. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1993;160(1):81–8.
 154. Yin L-M, Wei Y, Wang Y, Xu Y-D, Yang Y-Q. Long term and standard incubations of

- WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):68–72.
155. Friedman M, Kozukue N, Harden LA. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2000;48(11):5702–9.
 156. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
 157. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol Res.* 2000;33(2):55–64.
 158. Farris P, Krutmann J, Li Y-H, McDaniel D, Krol Y. Resveratrol: a unique antioxidant offering a multi-mechanistic approach for treating aging skin. *J Drugs Dermatol.* 2013;12(12):1389–94.
 159. Giovannini C, Filesi C, D’Archivio M, Scazzocchio B, Santangelo C, Masella R. [Polyphenols and endogenous antioxidant defences: effects on glutathione and glutathione related enzymes]. *Ann dell’Istituto Super di sanità.* 2006;42(3):336–47.
 160. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2010;2(11):1106–31.
 161. Verspohl EJ, Bauer K, Neddermann E. Antidiabetic effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* in vivo and in vitro. *Phyther Res.* 2005;19(3):203–6.
 162. Karadagli S, Agrap B, Erciyas F. Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Potential of *Cinnamomum cassia* Bark Water Extract. *J Marmara Univ Inst Heal Sci.* 2014;4(1):17–23.
 163. Lermioğlu Erciyas F, Ağrap B, Çanaklı G, Çeliksöz M, Sözer Karadağlı S, Gündüz C. An investigation of the effects of *Cinnamomum cassia* bark extracts on oxidative DNA damage and possible cytotoxic and apoptotic activities in transformed/untransformed cell lines from Type 1 diabetic patients, in vitro. *Frontiers in Genetics. ICAW 2015 - 11th International Comet Assay Workshop.* 2015. doi: 10.3389/conf.fgene.2015.01.00006
 164. Ağrap B. *Cinnamomum Cassia* Bark Ekstrelerinin Oksidatif Stres, Sitotoksisite ve DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Akım Sitometrisi Ve Comet Yöntemi İle Araştırılması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2013.

165. Karadağlı SS, Agrap B, Erciyas FL. Investigation of the protective effect of cinnamomum cassia bark extract against H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood lymphocytes and antioxidant activity. *Marmara Pharm J*. 2014;18(1):43–8.
166. Miao F, Smith DD, Zhang L, Min A, Feng W, Natarajan R. Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(12):3189–98.
167. Bass H, Walters R, Darke C. Provision of Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines in a routine tissue typing laboratory: practicalities and applications. *Eur J Immunogenet*. 2004;31(2):87–92.
168. Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WER. EBV immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int J Epidemiol*. 2008;37 (1):41–5.
169. Gündüz C, Süslüer S, Ağrap B, Erciyas Lermioğlu F. Effects of Cinnamomum cassia extracts on cytotoxicity, apoptosis and gene expression in HL-60 cells. *ASHG 2012 Annual Meeting, San Francisco; 6-10 November 2012*.
170. Evdokimova OV, Neneleva EV, First IMS, State M. Comparison of Lipophilic Substances of the Bark of Chinese (Cinnamomum cassia (L .) C . Presl .) and Ceylon Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume). *World Appl Sci J*. 2013;27(1):70–3.
171. Kianpour Rad S, Kanthimathi MS, Abd Malek SN, Lee GS, Looi CY, Wong WF. Cinnamomum cassia Suppresses Caspase-9 through Stimulation of AKT1 in MCF-7 Cells but Not in MDA-MB-231 Cells. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145216.
172. Ka H, Park H-J, Jung H-J, Choi J-W, Cho K-S, Ha J, et al. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett*. 2003;196(2):143–52.
173. Ahmad SI, Capoor M, Khatoon F. Phytochemical analysis and growth inhibiting effects of Cinnamomum cassia bark on some pathogenic fungal isolates. *J Chem Pharm Res*. 2013;5(3):25–32.
174. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull*. 2001;24(10):1202–5.

175. Peng X, Cheng K-W, Ma J, Chen B, Ho C-T, Lo C, et al. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem*. 2008;56(6):1907–11.



ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmir’de doğdum. 2007 yılında İngilizce hazırlık eğitiminden sonra 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde lisans eğitime başladım. 2011 yılında Erasmus LLP programı kapsamında Belçika’da Ghent Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi’nde üç ay staj yaptım. Lisans eğitimimi 2013 yılında tamamlayarak aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladım.

e-mail: gizemcanakli@gmail.com

