

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİKNOGENOL VE KURKUMİNİN ÇEŞİTLİ
KANSER HÜCRE HATLARINDA SİSPLATİN
SİTOTOKSİSİTESİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Ecz.Merve BECİT

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİKNOGENOL VE KURKUMİNİN ÇEŞİTLİ KANSER
HÜCRE HATLARINDA SİSPLATİN SİTOTOKSİSİTESİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Merve BECİT

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr.Sevtap AYDIN**

ANKARA

2017

**Piknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Sisplatin
Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi**

Ecz. Merve BECİT

Bu çalışma 13 Ocak 2017 tarihinde, jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Tezli Yüksek Lisans Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN*
(Hacettepe Üniversitesi)



Danışman: *Doç. Dr. Sevtap AYDIN*
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: *Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL*
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: *Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT*
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: *Doç. Dr. Özge ÜLKER*
(Ankara Üniversitesi)



ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ✓ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenkle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

13 / 01 / 2017



Merve BECİT

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. Sevtap AYDIN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Merve BECİT

TEŞEKKÜR

Akademik çalışmalarımın her bir aşamasında bilgi ile yolumu aydınlatan, iyilik ve anlayış ile heyecanıma ortak olan, her konuda desteği ile beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Sevtap AYDIN'a çok değerli emekleri için en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimimdeki değerli katkılarından dolayı Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme, hayatımda yer almalarından güç aldığım canım dostlarım Seda ÖNDER ve Nihal ÖZGEY'e teşekkür ederim.

ÖZET

Becit, M. Pknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017.

Pinus pinaster'den elde edilen pknogenol ve *Curcuma longa* L.'dan elde edilen kurkumin polifenolik bileşikler olup, yüksek antioksidan özellikleri nedeniyle geleneksel olarak birçok hastalıkta yaygın kullanılmaktadır. Sisplatin, testis, over, mesane, prostat, serviks, akciğer kanseri gibi solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ajandır. Kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçlarla birlikte çeşitli bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması amaçlanmakta ve araştırılmaktadır. Pknogenol ve kurkuminin antikanser ilaçlarla etkileşmeleri üzerinde yapılan çalışmalar yetersiz olduğundan, bu tez çalışmasında bu fenolik bileşiklerin Çin hamster akciğer fibroblast (V79), insan karaciğer kanser (HepG2) ve insan serviks kanser (HeLa) hücrelerinde MTT yöntemi ile sitotoksitesi belirlenerek sisplatin ile kombinasyonlarında hücre canlılığının değerlendirilmesi ve antikanser etkilerine açıklık getirilmesi amaçlanmıştır. Pknogenol 24 saatlik inkübasyonda V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla, 500 µM, 15.6-500 µM ve 125-500 µM dozlarında, sisplatinin IC₅₀ değerini azaltmıştır 48 saat inkübasyonunda pknogenol HepG2 ve V79 hücresi için daha düşük dozunda, HeLa hücresi için daha yüksek dozunda sisplatinin IC₅₀ değerini azaltmıştır. Kurkuminin 24 saatlik inkübasyonda V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla, 500 µM, 500 µM ve 250-500 µM dozlarında, sisplatinin IC₅₀ değerini azaltmıştır. 48 saat inkübasyonunda kurkumin çalışılan tüm hücreler için daha düşük dozlarında, sisplatinin IC₅₀ değerini azaltmıştır. Sonuç olarak, bulgularımız hücre tiplerine göre farklı sitotoksik profile sahip olan pknogenol ve kurkuminin serviks ve karaciğer kanser hücre gelişimi ve ilerlemesine karşı bir rol alabileceğini gösterebilir, ancak bu etkilerin doğrulanması ve antikanser ilaçlar ile etkileşmelerini belirlemek üzere daha ileri in vitro ve in vivo çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: pknogenol, kurkumin, sitotoksiste, HepG2 cells, HeLa cells

ABSTRACT

Becit, M. Investigation of Effects of Pycnogenol And Curcumin on Cisplatin Cytotoxicity in Various Cancer Cell Lines. Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2017.

Pycnogenol from *Pinus pinaster* and curcumin from *Curcuma longa* L., are polyphenolic compounds and commonly used in many diseases traditionally due to their high antioxidant properties. Cisplatin, an antineoplastic agent, is commonly used in the treatment of solid tumors such as testis, ovary, bladder, prostate, cervix, and lung cancer. In the treatment of cancer, it is aimed to increase anticancer effect and decrease cytotoxicity using various plant-derived phenolic compounds with chemotherapeutic drugs. Since the studies on the interactions of pycnogenol and curcumin with anticancer drugs are insufficient, in this thesis, it was aimed to determine the cytotoxic effects of these phenolic compounds in Chinese hamster lung fibroblast (V79), human cervix adenocarcinoma (HeLa), and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells by MTT assay, to evaluate the cell viability in combination with cisplatin, and to clarify the anticancer effect of cisplatin. Pycnogenol decreased IC_{50} of cisplatin in V79, HeLa, and HepG2 cells, at the concentrations of 500 μ M, 15.6-500 μ M and 125-500 μ M, respectively for 24 h incubation. Pycnogenol decreased IC_{50} of cisplatin at lower concentrations in HepG2 and V79 cells and at higher concentrations in HeLa cells for 48 h incubation. Curcumin decreased IC_{50} of cisplatin in V79, HeLa, and HepG2 cells, at the concentrations of 500 μ M, 500 μ M, and 250-500 μ M, respectively for 24 h incubation. Curcumin decreased IC_{50} of cisplatin at lower concentrations in all studied cells for 48 h incubation. In conclusion, our findings may show that pycnogenol and curcumin having different cytotoxic profiles according to cell types and may play a role in cervical and hepatic cancer cell growth and progression, however, further in vitro and in vivo studies are required to confirm these effects and to determine their interactions with anticancer drugs.

Key Words: pycnogenol, curcumin, cytotoxicity, HepG2 cells, HeLa cells

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pknogenol	4
2.1.1. Pknogenolün Doğal Kaynakları ve Kullanımı	4
2.1.2. Pknogenolün Fizikokimyasal Özellikleri	4
2.1.3. Pknogenolün Farmakokinetik Özellikleri	5
2.1.4. Pknogenolün Farmakolojik Etkileri	7
2.1.5. Pknogenol Toksisitesi	21
2.2. Kurkumin	25
2.2.1. Kurkuminin Doğal Kaynakları ve Kullanımı	25
2.2.2. Kurkuminin Fizikokimyasal Özellikleri	26
2.2.3. Kurkuminin Farmakokinetik Özellikleri	27
2.2.4. Farmakolojik Özellikleri	32
2.2.5. Kurkumin Toksisitesi	41
2.3. Sisplatin	48
2.3.1. Sisplatin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı	48
2.3.2. Sisplatin Farmakokinetik Özellikleri	49
2.3.3. Sisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları	51
2.3.4. Sisplatin Toksisitesi	56
2.4. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite	60

2.4.1. Sitotoksisite Belirleme Yöntemleri	60
2.4.2. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM	67
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	67
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	68
3.3. Çalışma Çözeltileri	69
3.4. Hücrelerin çoğaltılması	70
3.5. Pknogenol ve Kurkuminin Farklı Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi	72
3.6. İstatistiksel Yöntemler	74
4. BULGULAR	75
4.1. Pknogenol Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	75
4.1.1. Pknogenolün V79 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	75
4.1.2. Pknogenolün HeLa Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	78
4.1.3. Pknogenolün HepG2 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	81
4.2. Kurkuminin Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	84
4.2.1. Kurkuminin V79 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	84
4.2.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	87
4.2.3. Kurkuminin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	91
4.3. Sisplatin Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	93
4.3.1. Sisplatinin V79 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	93
4.3.2. Sisplatinin HeLa Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	96
4.3.3. Sisplatinin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	99
4.4. Pknogenolün sisplatin sitotoksisitesine etkilerinin belirlenmesi	103
4.4.1. Pknogenolün V79 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksisitesine Etkilerinin Belirlenmesi	103
4.4.2. Pknogenolün HeLa Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksisitesine Etkilerinin Belirlenmesi	106
4.4.3. Pknogenolün HepG2 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksisitesine Etkilerinin Belirlenmesi	109
4.5. Kurkuminin sisplatin sitotoksisitesine etkilerinin belirlenmesi	112
4.5.1. Kurkuminin V79 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksisitesine	

Etkilerinin Belirlenmesi	112
4.5.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi	115
4.5.3. Kurkuminin HepG2 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi	118
5. TARTIŞMA	121
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	127
7. KAYNAKLAR	128
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-LOX	5-Lipoksijenaz
8-OHdG	8-Hidroksi-2'- deoksiguanozin
ALT	Alanin aminotransferaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AP-1	Aktivatör protein-1
AST	Aspartaz aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
Aβ	Beta-amiloid
BrdU	5-bromo-2'-deoksiüridin
BUN	Kan üre azotu
C_{max}	Maksimum plazma konsantrasyonu
Caco-2	kolon kanser hücreleri
CCBL	Sistein-S-konjugat beta liyaz
CDDP	Sisplatin
CHO	Çin hamster varyum hücresi
CIS	Sisplatin
COX	Siklooksijenaz
CTR	Bakır transport proteini
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit, disodyum tuzu
e-NOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinazlar
FBS	Yenidoğan Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GGT	gama-glutamil transpeptidaz
GRAS	"Genellikle Güvenli Kabul Edilir" Generally Recognized as Safe
GSH	Glutasyon
H250	İnsan skuamöz hücreli akciğer karsinomu
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma
HepG2	İnsan hepatosellüler karsinoma
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPV	İnsan papillomavirüs
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyon
ICAM	Hücrelerarası adezyon molekülü
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
INR	Protrombin zamanı
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LD₅₀	Popülasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
M1	δ -(3,4-dihidroksi-fenil)- γ -valerolakton)
M2	δ -(3-metoksi-4-hidroksi- fenil)- γ -valerolakton
MAPK	Mitojen aktive protein kinazlar
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriksmetallopeptidaz
MMP-1	Kollajenaz-1
MMP-2	Jelatinaz A
MMP-9	Jelatinaz B
MPO	Myeloperoksidaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-κB	Nükleer faktör kappa beta
NO	Nitrik oksit
NOAEL	Yan etki gözlenmeyen doz (<i>No observed adverse effect level</i>)
NTP	Ulusal Toksikoloji Programı
OCT	Organik katyon taşıyıcısı
PYC	Piknogenol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücresi
SOD	Superoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
t_{1/2}	Yarı ömür
t_{max}	maksimum plazma konsantrasyon gözleendiği zaman
THC	Tetrahidrokurkumin
TNF-α	Tümör nekroz edici faktör alfa
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
V79	Çin hamster akciğer fibroblast
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Fransız sahil çamı ekstraktına ait metabolitlerinin yapısal formülleri	6
2.2. Bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin, kurkuminin (enol ve keto formları) kimyasal yapıları.	26
2.3 Kurkuminin in vivo metabolitlerinin ve parçalanma ürünlerinin kimyasal yapıları.	29
2.4. Sisplatinin moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri.	49
2.5. Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar.	53
2.6. V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinin (A) düşük konsantrasyonlarda, (B) yüksek konsantrasyonlarda mikroskopik görünümleri.	66
3.1. Neubauer hücre sayım lamı.	72
4.1. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	76
4.2. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	77
4.3. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	78
4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	79
4.5. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	80
4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	81
4.7. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	82
4.8. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	83
4.9. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	84
4.10. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	85
4.11. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	86
4.12. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	87
4.13. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	88
4.14. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	89
4.15. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	90
4.16. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	91

4.17.	HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	92
4.18.	HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	93
4.19.	V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	94
4.20.	V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	95
4.21.	V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	96
4.22.	HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	97
4.23.	HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	98
4.24.	HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	99
4.25.	HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	100
4.26.	HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	101
4.27.	HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.	102
4.28.	V79 hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	105
4.29.	HeLa hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	108
4.30.	HepG2 hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	111
4.31.	V79 hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	114
4.32.	HeLa hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	117
4.33.	HepG2 hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.	120

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Pknogenolün 300 mg tek doz oral uygulamasını takriben metabolitlere ya da bileşenlere ait farmakokinetik parametreler	7
2.2. Sıçanlarda kurkumin uygulamasında farmakokinetik parametreler	28
2.3. İnsan, sıçan ve farelerde kurkuminin farklı doz ve uygulama yollarında plazma ve doku düzeyleri.	30
2.4. Kurkuminin antikanser etkisi ve altında yatan etki mekanizmaları	37
2.5. Sisplatin metabolizması ve toksisitesine neden olan durumlar.	55
2.6. Sisplatinin istenmeyen etkileri.	59
2.7. Çalışmada kullanılan hücrelerin özellikleri.	66
4.1. V79 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	76
4.2. V79 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	77
4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	79
4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine pknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	80
4.5. HepG2 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.	82
4.6. HepG2 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.	83
4.7. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	85
4.8. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	86
4.9. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	88
4.10. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	89
4.11. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.	91
4.12. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.	92
4.13. V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	94
4.14. V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	95
4.15. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	97
4.16. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	98
4.17. HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.	100
4.18. HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.	101
4.19. V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde sisplatin, pknogenol ve kurkuminin IC ₅₀ değerleri.	102
4.20. V79 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette	103

	sisplatin sitotoksitesine etkisi.	
4.21.	V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	104
4.22.	HeLa hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	106
4.23.	HeLa hücreleri üzerinde piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	107
4.24.	HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	109
4.25.	HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	110
4.26.	V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	112
4.27.	V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	113
4.28.	HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	115
4.29.	HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	116
4.30.	HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	118
4.31.	HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.	119

1. GİRİŞ

Tüm canlı hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin devamlı olarak üretildiği ve pek çok hayati fizyolojik süreçte rol oynadıkları bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin artması oksidatif stres durumunu ortaya çıkarmakta olup hücrel bileşenlerin oksidasyonuna yol açarak yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumların başlamasına ve ilerlemesine neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların gelişiminin koruyucu bileşiklerin kullanımı ile engellenebileceği ya da geciktirilebileceği belirtilmektedir (1).

Sebze, meyve, çay ve şarap gibi bitkisel kökenli içeceklerin, bitkisel kaynaklı ilaçların ve gıda takviyelerinin içerisinde bol miktarda bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümör gibi birçok etki gösterdikleri ve böylece birçok dejeneratif hastalığa karşı terapötik ve koruyucu etkilere sahip oldukları ortaya konmuştur (2-5).

Piknogenol Fransa'nın güneybatı sahillerinde yetişen Fransız sahil çamı *Pinus pinaster*'den elde edilen bir bitki ekstresi olup yapısında %65-75 oranında kateşin ve epikateşin alt ünitelerini taşıyan prosiyanidinleri içeren kompleks bir karışım içerir (6).

Piknogenolün ilgi çeken biyolojik etkileri in vitro ve in vivo çalışmalarda dikkat çekmektedir. Kanser, diyabet, inflamatuvar hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları ve immün sistem hastalıkları üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Piknogenolün biyolojik etkilerinin altında yatan mekanizmaların moleküler temeli çok çeşitli olmakla birlikte reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpürücü özelliği temel mekanizma olarak görülmektedir (7).

Kurkumin, Zingiberaceae ailesine ait *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden elde edilen polifenolik bir bileşiktir. Başta Pakistan, Hindistan, Çin olmak üzere Asya'nın tropik bölgelerinde yetişmekte olan *Curcuma longa*'nın aktif bileşenleri kurkuminoit (%0.3-5.4) olarak adlandırılır ve üç önemli kurkuminoit bulunmaktadır. Bunlar; kurkumin (%75), demetoksikurkumin (%20) ve bisdemetoksikurkumin (%5)'dir (8).

Kurkumin, antioksidan, antikanserojenik, antimitojenik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antinosisiptif etkileri ile geniş bir biyolojik ve farmakolojik etkiye sahip olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Son yıllarda kurkuminin yararlı etkileri üzerine literatürde çok fazla bilgi yer almaktadır. Kurkuminin kanser dahil birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisi için etkin ve güvenilir olduğu ileri sürülmektedir. Gıda olarak önerilen dozlarda tüketildiğinde kümülatif etkiye sahip olmadığı bildirilse de, yüksek dozlarında kurkuminin dokularda birikerek toksik olabileceği göz ardı edilmemelidir. Kurkuminin bu etkilerinin altında yatan mekanizmaların daha iyi aydınlatılması için yeni ve ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir (9, 10).

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardan biri olan sisplatin, baş, boyun, akciğer, testis, over ve meme gibi birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan güçlü bir antineoplastik ilaçtır (11).

Kanser tedavisinde farklı tedavi rejimleri kullanılmaktadır. Güncel çalışmalara bakıldığında kemoterapötik ilacın yanında çeşitli bitkisel kaynaklı özellikle fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması amaçlanmakta ve araştırılmaktadır (12-16).

Sisplatinin kanser kemoterapisinde etkinliğini artırmak, direnç gelişimini azaltmak ve toksisitesini azaltmak için diğer antikemoterapötikler ile ve antioksidan maddeler ile kombine kullanımının olumlu sonuçlar doğurduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Ancak sisplatinin antikanser tedavisini iyileştirmek ve neden olduğu toksik etkilerin azaltılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (17).

Fenolik maddelerin kanser üzerine etkilerinin aydınlatılması ve daha ileri düzey araştırmaların yapılması gerekmektedir. Pknogenolün ve kurkuminin bilinen farmakolojik ve biyolojik etkilerinin –özellikle kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin- antikanser ilaçlarla farklı doz kombinasyonlarının birlikte kullanımını içeren ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Pknogenol ve kurkuminin antikanser etkisi üzerinde yapılan çalışmalar yetersizdir. Bu tez çalışmasında önemli biyolojik etkileri olduğu bilinen ve son

yapılan çalışmalarda önemi gittikçe artan bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerden piknogenol ve kurkuminin antikanser ilaç sisplatinle birlikte kullanımında Çin hamster akciğer fibroblast (V79), insan karaciğer kanser (HepG2) ve insan serviks kanser (HeLa) hücreleri üzerindeki etkileri araştırılacaktır. Konu ile ilgili olarak tez çalışmamızda, sisplatin, piknogenol ve kurkuminin çeşitli zamanlarda ve kombinasyonlarda sitotoksisite profili metil tiyazol tetrazolyum (MTT) yöntemi ile tayin edilecektir. Yapılacak alışma sonunda, sisplatinin antikanser tedavisinde piknogenol ve kurkuminin kullanımının bu tedavideki olumlu yada olumsuz yönlerini ortaya çıkaracağı ve antikanser tedaviye yeni bir bakış açısı katacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pknogenol

2.1.1. Pknogenolün Doğal Kaynakları ve Kullanımı

Pknogenol, Fransa'nın güneybatı sahillerinde yetişen Fransız sahil çamı *Pinus pinaster* (*Pinus maritima*)'den elde edilen flavonoid/polifenol yapısında bir bitki ekstresidir (7).

Pknogenol terimi, antik Yunanca'da kondanse anlamına gelen "puknos" ile aile, sınıf anlamına gelen "genos" sözcüklerinden oluşturulmuştur. Flavan-3-ol türevlerinden oluşan flavonoidlerin bir alt sınıfını belirtmek için ortaya çıkan bu terim günümüzde çam kabuğundan elde edilen prosiyanidinlerin özel bir karışımını ifade etmektedir ve "Pknogenol (PYC) (Horphag Research Ltd, UK, Geneva, İsviçre)" adı altında patentlidir (7, 18).

Çam ağacı kabuklarının eski dönemlerde kullanımlarına bakıldığında inflamatuvar hastalıklarda, yara iyileşmesinde, kanamaları önlemede, öksürük şurubu olarak, diş ağrılarını geçirmek amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (7, 18). Ayrıca pknogenolün antimikrobiyal etkilerinden dolayı ağız ve cilt sağlığını koruyucu olarak geleneksel kullanımına rastlanmaktadır (19).

Pknogenolün, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi yapılan in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar sonucunda aydınlatılmıştır. Kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu ve düzenleyici, diyabetli hastalarda glisemik kontrolü sağlayıcı ve diyabet komplikasyonlarını iyileştirici olarak ve dismonere, kas ve kramp ağrıları, dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu, alerji ve solunum yolu gibi birçok fizyolojik hastalıklarda destekleyici tedavide yeri olan pknogenolün fitokimyasal bir madde ve gıda takviyesi olarak dünya çapında oral tüketimi bulunmaktadır (7, 20).

2.1.2. Pknogenolün Fizikokimyasal Özellikleri

Çam kabuğu ekstresi kırmızımsı-kahverengi renkli, aromatik kokulu kuru toz halindedir. Kuru ve karanlık bir ortamda stabilitesini korur. Isıya karşı dayanıklıdır. Yapısında zengin olarak bulunan proantosiyanın suda yüksek oranda çözünmesini sağlar (21).

USP 28'de "*Maritime pine bark ekstraktı*" adı altında piknogenolün kalitesi belirlenmiştir (22). Bu monografa uygun olarak hazırlanan standardize edilmiş piknogenol ekstraktı (Pycnogenol®) yapısında %65-75 oranında kateşin ve epikateşin alt ünitelerini taşıyan prosiyanidin içermektedir. Yapısındaki diğer bileşenler ise polifenolik monomerler, benzoik veya sinnamik asit ve bunların glikozitleridir (7, 23).

Piknogenolün tanımında kullanılan ve analizi için asıl kabul edilen bileşenler; prosiyanidinler, taksifolin, ferulik asit, kateşin ve kafeik asittir (22). Ayrıca glukoz ve inorganik bileşikler de düşük miktarda bulunmaktadır (23).

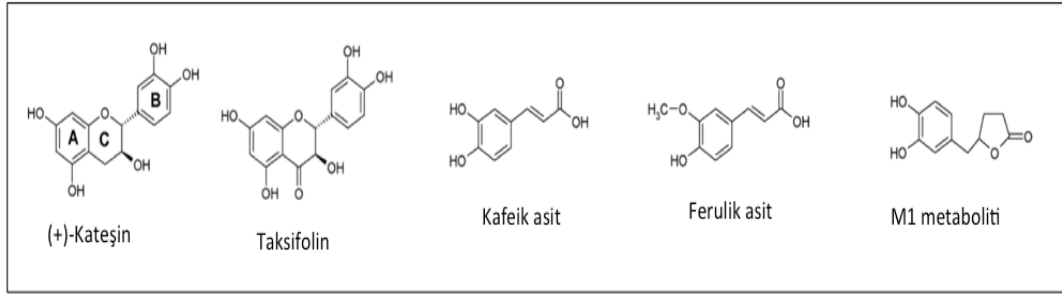
2.1.3. Piknogenolün Farmakokinetik Özellikleri

Ağız yoluyla kullanımında kolaylıkla absorbe olduğu ve vücut dokularına hızlı dağıldığı gösterilmiştir (20, 21, 24).

Piknogenolün sağlıklı gönüllüler üzerinde tek ve çok doz oral alınımından sonra farmakokinetik özelliklerini belirlemek üzere kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, piknogenol bileşenlerinin birçoğunun oral alınımında iyi absorbe edildiği, biyoyararlanımının yüksek olduğu ve önemli oranda metabolize edildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bilinen bileşiklerin plazma konsantrasyonlarının nanomolar düzeyinde olduğu belirtilmiştir (24).

Piknogenol deriden kolaylıkla absorpsiyona uğrayabilmektedir. Polietilen glikol ile hazırlanan %5'lik piknogenol solüsyonunun 10 kadavraya topikal uygulandıktan sonra transdermal biyoyararlanımı incelendiğinde; gallik asit, protokateşik asit, kateşin, p-hidroksibenzoik asit, vanilin, taksifolin tespit edilmiştir (25, 26).

Gönüllü insanlarda yapılan çalışmada piknogenolün oral alınımından 2-3 saat sonra, sülfatasyon ve glukronidasyona uğradığı ve idrarda ferulik asit, taksifolin olarak ve M1 δ -(3,4-dihidroksi-fenil)- γ -valerolakton) ve M2 (δ -(3-metoksi-4-hidroksi-fenil)- γ -valerolakton) metabolitleri halinde atıldığı tespit edilmiştir (Şekil 2.1.). (25, 27).



Şekil 2.1. Fransız sahil çamı ekstraktına ait metabolitlerinin yapısal formülleri

Bir başka çalışmada benzer şekilde piknogenolün oral alımından sonra sağlıklı gönüllü bireylerin idrarında serbest ve konjuge ferulik asit belirlenmiştir. İdrarda ferulik asitin çam kabuğu ekstresi tüketiminin bir biyobelirteci olarak görülebileceği belirtilmiştir (28).

24 saat boyunca flavonoid içermeyen diyetle (sebze, meyve, çay, kahve, kakao vb olmayan) beslenen yaşları 18- 30 arasında değişen 11 gönüllüye (5 kadın, 6 erkek) oral yoldan 300 mg tek doz piknogenol uygulanmış ve 14 saat sonra kan örnekleri alınarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. Plazmada kateşin, kafeik asit, ferulik asit, taksifolin, M1 metabolitinin yanı sıra bilinmeyen 10 bileşik daha tanımlanmıştır. Bilinmeyen 10 bileşiğin, önceki literatür bilgilerinde yer alan deniz çamı kabuğu ekstraktın (-)-epikateşin, gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit ya da M2 gibi diğer bileşenlerine yapıca benzemediği belirtilmiştir. Kateşin, kafeik asit, ferulik asit ve bilinmeyen bir bileşik için t_{max} (maksimum plazma konsantrasyon gözleendiği zaman) 5 saat, taksifolin ve bilinmeyen iki bileşik için t_{max} 10 saat, M1 ve bilinmeyen iki bileşik için ise t_{max} yaklaşık olarak 10 saat olarak belirtilmiştir. Maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) düzeyleri ise kateşin için 107 ng/mL, taksifolin için 33 ng/mL, kafeik asit için 17 ng/mL, ferulik asit için 15 ng/mL ve M1 için 4 ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 2.1.) (24).

Tablo 2.1. Pknogenolün 300 mg tek doz oral uygulamasını takiben metabolitlere ya da bileşenlere ait farmakokinetik parametreler.

Bileşen	n	AUC[0-t] [ng/mL × h]	AUC[t-8] [ng/mL × h]	C _{max} [ng/mL]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
Kafeik asit	9	75.66 ± 33.53	82.78 ± 36.47	16.67 ± 13.29	3.7 ± 2.4	4.42 ± 2.47
Kateşin	9			107.22 ± 55.49	3.2 ± 1.7	
Taksifolin	6	231.11 ± 85.98	399.14 ± 98.95	33.34 ± 12.54	8.2 ± 2.5	8.89 ± 2.81
Ferulik asit	7	99.05 ± 28.09	141.19 ± 73.90	14.78 ± 5.89	1.2 ± 1.1	6.87 ± 3.83
M1	8			4.11 ± 2.08	10.0 ± 1.9	

Aynı araştırmacılar tarafından deney tekrarlanmış ve 5 gönüllüye (4 kadın, 1 erkek) 200 mg pknogenol verilmesinin ardından 4 saat sonra plazma örnekleri alınmıştır. Tek doz pknogenol alımından sonraki metabolitler ve bileşenler benzerlik göstermiştir. Kateşin, ferulik asit, kafeik asit, M1 ve bilinmeyen bileşiklerden dördü plazmada kararlı duruma ulaşmış olarak belirlenirken, taksifolin ve bilinmeyen iki bileşiğin plazma düzeyi belirlenen limitin altında bulunmuştur. Ayrıca birçok bileşiğin faz II metabolizma aracılığıyla sülfat ve glukoronik asit konjugatları belirlenmiştir. Konjügasyonların derecesinin bireysel değişiklik gösterdiği gözlenmiştir ve ortalama kateşin için konjügasyon derecesi %56.5, kafeik asit için %69.4 olarak belirtilmiştir (24, 25).

Pknogenolün karışım olarak gösterdiği biyolojik etkinin içeriğindeki saflaştırılmış bileşenlerinin tek başlarına gösterdikleri etkilerin toplamından daha yüksek olduğu, karışım halinde iken sinerjistik etki ile daha güçlü etki gösterdiği ve biyoyararlanımlarının yüksek olduğu belirtilmiştir (7).

2.1.4. Pknogenolün Farmakolojik Etkileri

Pknogenolün dikkat çeken biyolojik etkileri nedeni ile birçok hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları yapılmıştır. Kanseri, diyabet, inflamatuvar hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, immün sistem hastalıkları, erektil disfonksiyon, erkek infertilitesi, menopozal belirtiler, diş eti kanamaları ve ödem gibi birçok patolojik durumda pknogenolün etkili olduğu bildirilmiştir (7).

Antioksidan etkisi

Piknogenolün biyolojik etkilerinin altında yatan mekanizmaların moleküler temeli olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpürücü özelliği ileri sürülmektedir (7). Yapısında bulunan fenolik asitler, polifenoller ve özellikle flavonoidler aracılığıyla, piknogenolün güçlü serbest radikal süpürücü etkiye ve güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* deneylerde ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (18, 21).

Piknogenolün yapısındaki hidroksil gruplarının sayısı, fenolik eşleşme reaksiyonları ve nükleofilik eklenmelerin yüksek radikal tutucu özelliği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (7).

Piknogenolün radikal süpürücü etkisinde serbest nitrojen türlerini, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve iNOS-mRNA ekspresyonunu inhibe ederek belirgin şekilde nitrojen monooksit üretimini azaltarak etki gösterdiği ileri sürülmüştür (18).

Piknogenolün bileşenleri tek tek değerlendirildiğinde, kateşinin askorbik asite benzer nitelikte süperoksit aktivitesini inhibe ettiği ve M1 metabolitinin hem kateşinden hem askorbik asitten daha güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir (29).

Prosiyanidince zengin çam kabuğu ekstresi olan piknogenolün bilinen güçlü antioksidan etkisinin sentetik antioksidanlar (askorbik asit, trolox) ile birlikte kullanıldığında nihai etki araştırıldığında sinerjistik etki tespit edilmiştir (30).

Matriks parçalayıcı enzimler, matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) çinko bağımlı proteolitik enzim ailesinden olup çeşitli kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin MMP'leri çeşitli hücre içi sinyal yolları ile aktive edildiği bilinmektedir. Piknogenolün güçlü radikal süpürücü özelliği, antiinflamatuvar etkisi ve antioksidan enzimlerin sentezini arttırıcı etkisi ile MMP'lerin patofizyolojik rolü araştırılmıştır ve MMP 1, 2 ve 9 salıverilmelerini ve etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgulara göre piknogenolün MMP'nin aşırı artması ile ilişkili pek çok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde yararlı olabileceği öngörülmektedir. Örneğin; artritte düzeyleri

yükseldiği tespit edilen MMP-1 (kollajenaz 1) ve MMP-9 (jelatinaz B), kıkırdak hasarına yol açmaktadır. Pulmoner fibroziste MMP-2 (Jelatinaz A) artışı, astımda MMP-9 artışı görülmektedir. Pknogenolün bahsedilen durumlarda MMP düzeylerini azaltmasına bağlı olarak hastalıkların seyrini olumlu etkilediği belirtilmiştir (29, 31, 32).

Pknogenolün oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalığa karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Pknogenolün intraselüler antioksidan koruma sistemlerini stabilize ederek başta oksidatif hasarda temel hedef olan lipit, protein ve DNA olmak üzere tüm biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruduğu belirtilmektedir (20, 33).

İnsan karaciğer kanser hücrelerinde (U1285), pknogenolün hücrel redoks sistemleri üzerine antioksidan etkisinin incelendiği çalışmada pknogenol uygulamasının oksidatif strese karşı endojen savunmanın aktif enzimlerinden tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde ve mRNA ekspresyonlarında azalmaya yol açtığı ve glutatyon redüktaz aktivitesini ise etkilemediği gösterilmiştir (34).

İnsan nöroblastoma hücresi (SH-SY5Y) üzerinde pknogenolün akrolein tarafından indüklenen sitotoksositeye ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliği gösterilmiştir. Pknogenolün kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemi dokularını koruyabileceği ve oksidatif stres ile ilişkili alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavi yaklaşımında umut verici olabileceği düşünülmektedir (23, 35).

Kanser tedavi rejimlerinden biri olan radyoterapinin reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile artan oksidatif hasarın pknogenolün güçlü antioksidan aktivitesi ile önlenebileceği ve radyasyona karşı güvenli bir koruyucu olabileceği sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ileri sürülmüştür (36).

Siklofosfamid ile indüklenen üreme/gelişimsel toksisite modeli oluşturulan sıçanlarda pknogenolün lipit peroksidasyonu engellediği ve antioksidan aktivitesi ile embriyo-fetüs toksisitesinden koruduğu gösterilmiştir (37).

Pknogenol ile zenginleştirilmiş meyve sularının (0.5 g/L pknogenol) kolon kanser hücreleri (Caco-2) üzerinde antioksidan ve antiproliferatif etkisinin değerlendirildiği in vitro çalışmada pknogenolce zengin örneklerde antioksidan

kapasitenin arttığı bildirilmiştir (38).

İskemi reperfüzyon ile indüklenen oksidatif renal hasarda biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgular değerlendirilerek piknogenolün belirgin düzelme gösterdiği *in vivo* olarak gösterilmiştir. Piknogenolün serbest radikalleri azalttığı, doku nötrofil infiltrasyonunu azalttığı ve böbrek üzerine koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür (39).

Piknogenolün plazma antioksidan kapasitesi 25 gönüllüye (10 erkek, 15 kadın, yaş ortalaması 30±8) 150 mg/gün doz 6 hafta süre ile uygulanarak araştırılmıştır. Plazma antioksidan potansiyelinin, oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi tayini ile ölçüldüğünde %40 arttığı bulunmuştur (40).

Antiinflamatuvar etkisi

Piknogenolün doz-bağımlı olarak antioksidan ve antiinflamatuvar etkili olduğu ve kronik inflamatuvar hastalıklardaki olası terapötik rolü birçok çalışma ile desteklenmektedir (20, 33, 40).

Reaktif oksijen türleri, hücre hasarına yol açmakla ve dejeneratif süreci başlatmakla kalmaz aynı zamanda nükleer faktör-kappa B (NF- κB) aktivasyonu gibi diğer proinflamatuvar süreçleri de etkilemektedir. Piknogenolün proinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonu üzerine etkisi ve etki mekanizmasının araştırıldığı bir *in vitro* çalışmada, piknogenolün, nükleer faktör-kappa B ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi temel faktörleri inhibe ederek IL-1betayı ve mRNA düzeylerini doz-bağımlı olarak azalttığı ayrıca; forbol,12-miristat,13-asetat ve iyonominin tarafından indüklenen interlökin (IL)-2 gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (41).

Deneysel inflamatuvar barsak modeli oluşturulan hayvanlarda piknogenolün antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada makroskopik hasarı azalttığı, mieloperoksidaz (MPO) aktivitesini doz-bağımlı azaltarak antioksidan etkisi gösterdiği bildirilmiştir (42).

Gönüllü bireyden alınan serum örneklerinde inflamatuvar yanıtı aracılık eden prostoglandin gibi kimyasal mediyatör kaskat üretiminden sorumlu enzimlerin (siklooksijenazlar, COX-1 ve COX-2) aktivitelerinin piknogenol ile inhibe edildiği gösterilmiştir. 300 mg tek doz piknogenol uygulanan 10 sağlıklı bireylerin serum

örneklerinde görülen siklooksijenaz enzim inhibisyonu trombosit agregasyonunun inhibisyonuna neden olacağı için antiinflamatuvar etkinin kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisini de açıklamaktadır (43).

Bir diğer çalışmada ise yaş aralığı 35-50 olan sağlıklı gönüllülere 5 gün süre ile 150 mg oral yoldan verilen piknogenolün COX-1 gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile ilişkili olan ve lökotrien biyosentezinin azalmasına yol açan COX-2 ve 5-lipoksijenaz (5-LOX) gen ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Aynı zamanda fosfolipaz A2 aktivitesi de inhibe olmuştur. Bu bulgular, piknogenolün insan polimorfonükleer lökositlerindeki antiinflamatuvar yanıtın COX-2 ve 5-LOX gen ekspresyonundan kaynaklandığını göstermektedir (44).

Osteoartrit tedavisi ile ilgili yapılan klinik bir çalışmada piknogenolün semptomları iyileştirdiği gösterilmiştir ve uygulanan osteoartrit tedavisinde bir tedavi seçeneği olarak ileri sürülmektedir (45).

Biyoflavonoidlerce ve organik asitlerce zengin çam kabuğu çayını tüketenlerde C vitamini eksikliğinden kaynaklanan skorbüte karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (20).

Piknogenolün antiinflamatuvar etkisine bağlı olarak ağrıyı azaltabileceği düşünülmektedir. Dismonore, migren, kas ve kramp ağrılarında piknogenol takviyesinin ağrıda belirgin azalma sağladığı klinik olarak tespit edilmiştir (46-48).

Antiinflamatuvar etkili piknogenolün kronik inflamatuvar, kardiyovasküler, otoimmün hastalıkların tedavisinde yeri olabileceği görülmektedir.

Piknogenolün alerjik hastalıkların tedavisinde de yardımcı etmen olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Bunun üzerine yapılan çalışmada piknogenolün mast hücrelerinden histamin ve proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini inhibe ederek immünoglobülin (Ig)-E aracılı alerjik yanıtı önemli derecede azalttığı ortaya konulmuştur. Hem *in vivo* hem *in vitro* modellerin kullanıldığı çalışmada, antialerji etki mekanizması mast hücrelerinde NF-κB aktivitesinin ve kalsiyum geri-alımını baskılanması esasına dayanmaktadır (49).

Piknogenolün alerji mevsimi başlamasından en az 5 hafta önce alınmasının alerjik rinit semptomlarını iyileştirdiği, insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada

ortaya konmuştur (50).

Antigenotoksik etkisi

Piknogenolün genom üzerindeki olumlu etkilerinin in vitro olarak araştırıldığı çalışmada, mutajen olduğu bilenen maddelerin mutajenitelerini önemli ölçüde azalttığı yani antimutajenik bir madde olduğu belirtilmektedir (51).

Sisplatin sitotoksitesi oluşturulan sıçanlarda 5 gün süre ile 200 mg/kg oral verilen piknogenolün antioksidan ve antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda sisplatin tarafından indüklenen prooksidan enzimlerin (MPO, ksantin oksidaz), malondialdehit ve nitrik oksit düzeyinin piknogenol ile normalize edildiği, kromozom hatalarını azalttığı ve mitotik indekslerinin arttırıldığı gösterilmiştir. Bu bulgular, piknogenolün sisplatin tedavisi ile ilişkilendirilen oksidatif, inflamatuvar ve genotoksik hasara karşı koruyucu bir madde olabileceğini düşündürmektedir (52).

Antimikrobiyal etkisi

Prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalara karşı piknogenolün antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı bakteriyostatik etkisi ve *Candida* gibi ökaryotik mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Mantar gelişimini engellemesinin kliniğe yansması piknogenolün ağız ve cilt sağlığını koruyucu bir madde olarak kabul edilebileceğini düşündürmektedir (19).

Peptik ülserle neden olan *Helicobacter pylori*'nin eradikasyonunda antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, araştırmacıları alternatif bir tedavi bulmaya yönlendirmiştir. Antimikrobiyal etkileri olduğu düşünülen piknogenolün gastrik hücrelerde *H.pylori* üzerine etkisini araştıran bir çalışmada, gastrik hücreler piknogenol ve *H.pylori* ile inkübasyona bırakılmıştır. Piknogenolün doz-bağımlı ve anlamlı olarak bakterinin üreme ve gelişimini ve gastrik hücreye adhezyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (53).

Piknogenolün antimikrobiyal etkisinin gıda endüstrisinde doğal koruyucu madde olarak kullanılabilmesini öne süren bir çalışma da bulunmaktadır. Pişmiş kırmızı etteki *Staphylococcus aureus*'a karşı piknogenolün bakteri sayısını azalttığı ve antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (54).

Antiviral etkisi

Piknogenolün viral miyokardit üzerinde hem antiinflamatuvar hem de antiviral etkilerinden dolayı önemli bir etmen olabileceği düşünülmüştür. Viral miyokarditteki olumlu etkilerinin; proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu baskılayarak antiinflamatuvar etki göstermesinden ve viral replikasyonu inhibisyonu ile miyokardiyal nekrozu artırarak antiviral etki göstermesinden kaynaklandığı *in vivo* çalışmada belirtilmiştir (55).

In vitro bir çalışmada, piknogenolün hücre-içi antioksidan bir protein olan mangan süperoksit dismutaz ekspresyonunu artırarak AIDS'e neden olan HIV-1 (*human immunodeficiency virus-1*, insan immün yetmezlik virüsü-1) replikasyonunu inhibe ettiği ve HIV enfeksiyonunda virüsün çoğalmasını kontrol edebilen yeni bir anti-HIV-1 ajanı olarak kullanılabilirliği, aynı zamanda diğer virüs ile ilişkili hastalıklarda da koruyucu ve tedavi edici değeri olabileceği ileri sürülmüştür (56).

Karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma riskini artıran hepatit C virüsünün replikasyonunun piknogenol tarafından inhibe edilebileceği hipotezine dayanan araştırmada, mevcut tedavide kullanılan ilaçlar (interferon-alfa, ribavirin, telaprevirin) ile kombine kullanımının sitotoksisiteyi artırmadan sinerjistik etki gösterdiği, ayrıca ilaca dirençli hücrelerde bile antiviral etki gösterdiği *in vitro* olarak belirlenmiştir (57).

Antikanser etkisi

Piknogenolün malign ovaryum germ hücreleri için seçici toksik olduğu belirtilmektedir. Ovaryum hücrelerinde yapılan bir hücre kültürü çalışmasında, talk ile indüklenen proliferasyon ve neoplastik dönüşüm sırasında piknogenolün reaktif oksijen türlerinin üretimini azalttığı, hücre proliferasyon artışını azalttığı, neoplazm görülen kolonilerin sayısını azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre piknogenolün ovaryum kanser oluşumunu önleyebileceği ileri sürülmüştür (58).

Piknogenolün aynı zamanda seçici bir şekilde göğüs kanseri hücrelerinde (59) ve insan promiyeloid lösemi hücrelerinde (60) apoptozu arttırdığı gösterilmiştir.

Klinik bir araştırmada ise piknogenolün onkolojik tedavide uygulanan kemoterapinin ve radyoterapinin neden olduğu yan etkileri azalttığı, kemoterapötik

ilacın tolere edilebilirliğini arttırdığı ve hastanede kalım süresini kısalttığı ileri sürülmüştür (20, 61).

Antidiyabetik etkisi

Deneysel ve klinik çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda piknogenolün diyabet üzerinde olumlu etkileri gösterilmektedir. Piknogenolün tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrol ve diyabet komplikasyonlarında iyileşme sağlayabileceği bildirilmektedir. Piknogenolün 100 mg/gün konvansiyonel diyabet tedavisinin üç ay boyunca izlendiği klinik araştırmaya göre, düşük glukoz düzeyleri ve endotel işlevlerinde iyileşme olduğu ve bir aylık piknogenol takviyesinin glikozillenmiş hemoglobinin düzeylerini belirgin oranda düşürdüğü belirtilmiştir (62).

Tip 2 diyabetiklerde artan alfa glukozidaz enziminin piknogenol etkisi ile azaldığı ve kan glukoz düzeyinin düştüğü *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir. Piknogenolün aktivitesi alfa-glukozidaz inhibitörü olarak bilinen akarboz ile karşılaştırılmıştır. Piknogenolün akarbozdan daha güçlü bir alfa-glukozidaz enzim inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Piknogenolün insülin sekresyonu üzerinde bir etkisi bulunmadığı belirtilmiştir (63).

Sağlıklı ve streptozosin ile diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlara 10 mg/kg ip olarak 14 gün boyunca piknogenol uygulandığında, piknogenolün diyabetik sıçanlarda kan glukoz düzeyini %28 oranında azalttığı gösterilmiştir (64).

Diyabet modeli oluşturulan sıçanların karaciğerlerindeki hiperglisemik hasara karşı piknogenolün koruyuculuğu gösterilmiştir; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında piknogenolün (10 mg/kg va, 4 hafta, ip) sıçanlarda antioksidan savunma mekanizmaları ve histopatolojik bulguları düzenlediği saptanmıştır (65). Piknogenolün diyabet komplikasyonlarında etkili olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Diyabet komplikasyonları arasında ciddi sağlık riski oluşturan diyabetik retinopatili hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda piknogenol ile olumlu sonuçların alındığı belirtilmiştir. Piknogenolün, damar permeabilitesini azalttığı, nitrik oksit üretimini artırarak kılcal damar direncini artırarak retina içine sızıntıları azalttığı, hasta tarafından toleransının iyi olduğu ve yan etkilerinin çoğunlukla gastrointestinal sistem üzerine olduğu belirtilmiştir. Piknogenolün retinopatinin preproliferatif aşamalarının ilerlemesini durdurucu etki gösterdiği belirtilmiştir (66).

Gözdeki diyabetik mikroanjiyopatiler retinopatiye, görme kaybına yol açabilmektedir. Piknogenolün retinopatinin erken evrelerindeki koruyucu etkileri insanlar üzerinde araştırılmış ve mikrosirkülasyonu arttırarak ve retinal ödemi azaltarak diyabetik retinopatiyi azalttığı ve görme üzerinde yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (67).

Diyabetik retinopati, kontrol edilemeyen *Diyabetes Mellitus*'tan kaynaklanan yetersiz enzimatik antioksidan korumanın bir sonucudur. Streptozosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, 14 gün boyunca 10 mg/kg ip piknogenolün diyabetik hayvanlarda katarakt oluşumunu azalttığı, retina glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzim işlevlerini artırdığı gösterilmiştir. Piknogenolün diyabetik retinopati ve katarakt oluşumuna karşı antihiperglisemik tedavide önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (68).

Böbrek tübül hücrelerinde yüksek doz glukoz ile oluşturulan oksidatif stresin ve inflamasyonun piknogenolün antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri ile baskılandığı ve apoptozu düzenlediği belirtilmiştir. Diyabetik nefropatiye karşı piknogenolün umut verici bir madde olabileceği ve daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerektiği ortaya konmuştur (69).

Piknogenolün mikrosirkülasyonu arttırdığı için diyabetik ülserde yararlı olabileceği düşünülmektedir. Diyabetik ülserde piknogenolün lokal ve sistemik uygulama yolları ile toplam 30 hasta üzerinde etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda ülserli bölgenin iyileşmesi ve semptomların giderilmesi açısından en iyi yolun lokal ve sistemik uygulama yollarının birlikte kullanılması olduğu kontrollü klinik çalışmada gösterilmiştir (70).

Cesarone ve ark. tarafından 4 hafta süreyle oral olarak 150 mg/gün piknogenol verilen diyabetik mikroanjiyopati hastalarında özellikle diyabetik mikroanjiyopatideki ödem üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (71, 72).

Kan glukoz düzeyinin yüksek seyretmesi kardiyovasküler hastalıklar açısından risk oluşturmaktadır. Piknogenolün diyabetik kardiyomiopati üzerinde etkili olup olmadığı üzerinde odaklanılan bir çalışmada, diyabetik sıçanların kalplerinde piknogenolün biyometrik ve hemodinamik parametrelerde farmakolojik

olarak etkili olduğu, elektriksel parametrelerde anlamlı bir değişiklik tespit edilemediği bildirilmiştir (73). Pknogenol takviyesinin diyabetiklerde kardiyovasküler risk faktörlerini azaltabileceği ve kardiyovasküler rahatsızlığı olan diyabetik hastalarda antihipertansif ilaç kullanımını azaltabileceği aynı zamanda da diyabeti kontrol altına alabileceği hipotezine dayanarak yapılan klinik çalışma sonuçlarında bu hipotezlerin doğrulandığı belirtilmiştir (74).

Kardiyovasküler sistem üzerine etkisi

Pknogenolün hücre içi glutasyon peroksidaz, disülfid redüktaz, süperoksit dizmutaz (SOD) ve katalaz aktivitesini arttırarak serbest oksijen radikallerini süpürücü etkisi ile kardiyovasküler hastalıklarda damar endotelinde hasar oluşmasını önlediği ileri sürülmektedir (75).

Pknogenol, inflamatuvar bölgede lökosit alımında rol oynayan ve vasküler hastalıkların gelişimine de katkıda bulunan vasküler hücre adezyon molekülünü (VCAM)-I ve hücrelerarası adezyon molekülü (ICAM)-I inhibe ettiği gösterilmiştir (76).

Pknogenolün, insanlarda endotelial nitrik oksit sentazı aktive ederek endotelial nitrik oksit salıverilmesine bağlı vazodilatatif etki gösterdiği belirtilmektedir. Endotel bağımlı vazodilatasyon ile ilişkili nitrik oksit, vasküler işlevlerde önemli rol oynar. Pknogenolün endotel bağımlı vazodilatasyon üzerine etkileri randomize, çift kör, plasebo kontrollü 16 sağlıklı gönüllü birey ile değerlendirilmiştir. 180 mg/gün pknogenolün 2 hafta süre ile kullanımının plasebo ile kıyaslandığında vazodilatasyonu arttırdığı gösterilmiştir (77).

Pknogenolün 4 mg/kg intravenöz olarak uygulandığı sıçanlarda anjiyotensin dönüştürücü enzimi inhibe ederek kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (78).

Pknogenolün, asetilsalisilik asit ile platelet agregasyonunun inhibe edilmesinde sinerjistik etki gösterdiği in vitro olarak gösterilmiştir (79).

Kardiyovasküler rahatsızlığı olan bireylere pknogenol takviyesinin platelet agregasyonunu belirgin olarak azalttığı ve mikrosirkülasyon geliştirdiği tespit edilmiştir (7, 80).

Sigara kullanımının kan basıncını ve kanın pıhtılaşma eğilimini artırarak

koroner kalp hastalığı için bir risk teşkil ettiği bilinmektedir. Pknogenolün sigaranın platelet reaktivitesi üzerindeki etkiyi azalttığı iki çalışmada gösterilmiştir. Çalışmalardan birinde 23 sigara içicisine (günde 15 adetten fazla) verilen 100 mg pknogenolün sigara ile indüklenen platelet agregasyonunda 500 mg aspirin ile eşdeğer etki görülmüştür. Diğer çalışmada ise 16 sigara içicisine verilen 125 mg pknogenolün platelet agregasyonunu kısmen azalttığı, kan basıncı ve kalp atım hızına etki etmediği belirtilmiştir (81).

Pknogenolün platelet agregasyonu üzerindeki kronik etkilerinin değerlendirildiği bir diğer klinik araştırmada, 5 yıldan uzun süredir günde 15 adetten fazla sigara içen 4 kişi ile 16 sigara içmeyen birey karşılaştırılmıştır. Her iki grup da 8 hafta boyunca 200 mg/gün pknogenol kullanmıştır. Çalışma sonunda ilk sigaradan 3 saat önce alınan pknogenolün platelet reaktivite indeksini sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. (82).

Arteriosklerotik plaklar ve trombozlar ile karakterize aterosklerozda, pknogenolün güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra nitrik oksit (NO) sentaz ile endotel bağımlı vazodilatör etkisi ile endotel işlevlerinde iyileşme sağlanmaktadır (20, 77). Pknogenol ile aterosklerozun önlenmesi vasküler olayların kontrolünde önemlidir. Pknogenolün ateroskleroza karşı koruyucu etkisinin daha ileri ve kontrollü insan çalışmaları ile desteklemek gerekmektedir.

Antihipertansif ilaçların neden olduğu ödemin önlenmesi üzerinde pknogenolün etkisi klinik olarak değerlendirilmiştir. Pknogenolün kalsiyum kanal antagonisti nifedipinin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim blokörü ilaçların neden olduğu ödem üzerinde yararlı etkisi gösterilmiştir. Hipertansif hastalarda mikrosirkülasyonda uzun dönem hasarı önlediği, pknogenolün antihipertansif etkisinden dolayı antihipertansif ilaçların daha düşük doz kullanılmasını sağladığı bildirilmiştir. Dolayısı ile antihipertansif ilacın yan etkisini bu yönü ile de azaltmaktadır. Örneğin anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin yaptığı kuru öksürüğün pknogenol ile belirgin azaldığı gözlenmiştir (83).

Yapılan bir klinik çalışmada pknogenolün kronik venöz yetmezlik komplikasyonlarını azalttığı ve pknogenolün iyi tolere edildiği gösterilmiştir. (71).

Piknogenolün plazma lipit seviyeleri üzerine etkilerini inceleyen klinik bir çalışmada 6 hafta boyunca 150 mg/gün piknogenol verilen 25 gönüllüde düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL)'yi önemli oranda (%7) azalttığı ve yüksek yoğunluklu lipoproteini (HDL)'yi önemli oranda (%10.4) arttırdığı, kolesterol ve trigliserit düzeyine belirgin etkisinin olmadığı görülmüştür (40).

Piknogenolün dislipidemi üzerinde anlamlı bir etki göstermediği, ancak lipit profilini olumsuz etkilemediği bildirilmiştir (84).

Nitrik oksit sentez aktivitesi engellenerek kalp yetmezliği oluşturulan farelerde 300 mg/kg piknogenol oral olarak 4 hafta uygulandığında hipertansiyon ve kardiyak hipertrofiyi belirgin oranda azalttığı gösterilmiştir. Bu etkinin MMP-9'un gen ekspresyonu ve aktivitesinin azaltılması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar, piknogenolün kalp yetmezliği olan hastalarda MMP aktivitesini ve ekspresyonunu düzenleyerek ve kardiyak kollajen degradasyonunu azaltarak kardiyak doku hasarının sınırlandırılmasında yararlı olabileceğini göstermektedir (85).

Piknogenolün yapısındaki zengin prosiyanidin içeriği sayesinde güçlü antioksidan özelliği ile kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu ve düzenleyici olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (40, 74).

Kardiyovasküler hastalıklar üzerinde piknogenolün koruyucu etkisinin ve altında yatan mekanizmalarının aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmaların gerekli olduğu görülmektedir.

Karaciğer üzerine etkisi

Hepatotoksik olduğu bilinen karbon tetraklorüre maruz kalan sıçanlarda piknogenolün akut hepatotoksiteyi azalttığı ve antioksidan etkisi ile lipit peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada i.p. yoldan 14 gün süre ile piknogenolün farklı dozlarının (10mg/kg ve 20 mg/kg) ardından tek doz karbon tetraklorür (1.25 mg/kg) uygulanmıştır. Hepatotoksik etkili karbon tetraklorür ile önemli derecede indüklenen aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) konsantrasyonları, hepatik lezyonlar ve oksidatif hasarın piknogenol ile doz-bağımlı olarak belirgin şekilde azaltıldığı belirlenmiştir (86).

Yağ oranı yüksek diyet uygulanan sıçanların diyetlerine eklenen piknogenolün serum alanin amino transferaz, ALT düzeylerinde belirgin azalmaya neden olduğu kaydedilmiştir (87).

Sıçanlarda sisplatin ile indüklenen hepatotoksisite ve oksidatif strese karşı piknogenolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Piknogenolün sisplatinin neden olduğu histopatolojik lezyonlarının ve aminotransferaz düzeylerinin artmasını engellediği bildirilmiştir (88).

Sinir sistemi üzerine etkisi

Alzheimer'a neden olduğu düşünülen nöron apoptozunun piknogenol tarafından azaltıldığı ve nöronları koruduğu in vitro bir çalışmada gösterilmiştir (89). Alzheimer hastalığındaki bilişsel kayıpların oksidatif stres durumunda artması nedeniyle, piknogenol gibi güçlü antioksidan bir maddenin oksidatif stres ile ilişkili nörodejeneratif durumları düzeltebileceği düşünülmektedir (20).

Dikkat eksikliği sendromu ve hiperaktivite olan çocuklarda adrenal ve noradrenalin düzeylerinin normal çocuklara göre yüksek olduğu bilinmektedir. Piknogenol ile dikkat eksikliği ve hiperaktivite tedavisi alan çocuklarda katekolamin düzeylerinin normal düzeye geldiği ve hiperaktivitenin azaldığı görülmüştür. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite olan 57 çocuğa (47 erkek, 10 kız, 6-14 yaşlarında) 1 ay süre ile 1 mg/kg piknogenol uygulanmasında dopamin seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş belirlenmiştir (90).

Solunum yolu hastalıkları üzerine etkisi

Piknogenolün 5-LOX ekspresyonunu inhibe etmesi ve bunun sonucu olarak lökotrien düzeylerini düşürmesi ve ayrıca antiinflamatuvar etkiye sahip olması nedeniyle astımlı bireylerde tedaviyi destekleyebileceği düşünülmektedir. Astım hastalarında yapılan çift-kör plasebo kontrollü klinik çalışma sonucunda günlük 100 mg (2x50 mg) piknogenol takviyesi alan hastalarda astım semptomlarında ve solunum işlevlerinde iyileşme görülürken plazma lökotrien konsantrasyonunda azalma gösterilmiştir. Yapılan çalışmada piknogenolün ilaca olan ihtiyacı azalttığı ve astım semptomlarını düzeltebildiği belirtmiştir (91, 92).

Üreme sistemi üzerine Etkileri

Piknogenolün reaktif oksijen türleri aracılığıyla bozulan sperm morfolojisi ve işlevlerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (93).

Klinik bir araştırmada subfertil 19 bireyde 90 gün boyunca 200 mg/gün piknogenol uygulamasının sperm yapısına etkisi incelenmiştir. Piknogenolün sperm morfolojisinde, istatistiksel olarak anlamlı, %38 bir gelişme ve mannoz bağlanma testinde %19'luk bir artış belirlenmiştir. Sperm sayısında değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuçlar piknogenolün erkeklerin doğurganlık durumunu olumlu etkileyebileceğini düşündürmektedir (93).

L-arjinin ve piknogenol kombininin sperm kalitesini artırıcı etkiye sahip olduğu, aynı zamanda hafif ve orta derece erektil disfonksiyonun tedavisinde bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Piknogenol endotelial nitrik oksit sentaz (e-NOS) aktivasyonuna bağlı nitrik oksit üretimini artırarak vazodilatasyon ile erektil disfonksiyonunda etkili bulunmuştur. Piknogenol ile L-arjinin birlikte kullanımının nitrik oksit üretiminde sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Artan nitrik oksit, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretmek üzere guanilat siklazı aktive eder, G sinyal yolu cGMP protein kinaz ise sperm motilitesinde artışa yol açmaktadır. Piknogenol ile L-arjinin birlikte kullanımının testesteron seviyesini ve seksüel aktiviteyi artırabildiği bildirilmiştir. L-arjinin (690 mg) ve piknogenol (60 mg) kullanılarak sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan klinik çalışmada sperm ve erektil işlevleri üzerinde olumlu etkiler gözlenmiştir. Piknogenolün diğer bir olumlu etkisi ise iNOS inhibisyonudur. Bu enzimin aşırı ekspresyonu spermilerin oksidatif hasara uğramasına dolayısıyla sperm morfolojisinin bozukluğuna, *oligo-asteno-teratozoospermi* sendromuna, yol açmaktadır. Bu kombinasyonun oligo-asteno-teratozoospermi kaynaklı infertilitede, bir yan etkiye neden olmadan, etkili olduğu gösterilmiştir (94).

Kohama ve ark (95), endometriozis tedavisinde kullanılan gonadotropin salıveren hormon agonistine bir alternatif olarak piknogenolü etkili bulmuşlardır. Perimenapozal dönemde olan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, yan etkiye sebebiyet vermeden klimakterik semptomları giderdiği belirtilmiştir (96).

Cilt üzerindeki etkisi

Piknogenolün güçlü antioksidan özelliği ile cildi UV radyasyondan koruduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. Ayrıca piknogenolün hiperpigmentasyonu azalttığı ve cildin bariyer işlevini, hücre dışı matriks homeostazını koruduğu da belirtilmektedir (97).

Piknogenolün, tirozinaz aktivitesine ve melanin biyosentezine etkisinin araştırıldığı B16 melanoma hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, serbest radikalleri (peroksinitrit, süperoksit, nitrik oksit, hidroksil radikali) baskıladığı ve indirgenmiş glutatyon/oksidlenmiş glutatyon oranını upregüle ettiği ve ayrıca antitirozinaz etki gösterdiği ve mekanin biyosentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Piknogenolün antimelanojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (98).

Piknogenolün sıçanlar üzerinde doz-bağımlı yara iyileşme zamanını ve skar çapını azalttığı gösterilmiştir (99).

Klinik çalışmalarda oksidatif stres ile indüklenen dermatozların topikal tedavisinde de etkili olabileceği bildirilmektedir (7).

2.1.5. Piknogenol Toksisitesi

Akut-subakut toksisitesi

Piknogenol az toksik olarak kabul edilmektedir. Fare, sıçan ve domuzlarda oral uygulama sonrasında LD₅₀ değerleri 14 farklı akut toksisite testinin sonucunda popülasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz (LD₅₀) değerlerinin 1000-4000 mg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir (21). Oral uygulamada yan etki gözlenmeyen doz (*No observed adverse effect level*, NOAEL) değeri 100 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir (21).

Kronik toksisitesi

Kronik toksisite testlerinde sıçanlara 2000 mg/kg/gün doza kadar oral uygulamanın klinik olarak anlamlı herhangi bir değişikliğe (görsel, biyokimyasal veya davranışsal) yol açmadığı bildirilmiştir (25, 100).

Genotoksisitesi

Toksisite testlerine ve klinik çalışmalara göre piknogenolün güvenli doğal bir

ürün olduğu ortaya konmaktadır (101).

Piknogenolün in vivo fare kemik iliği hücrelerinde Ames ve mikronükleus testleri ile ayrıca in vitro insan lenfositlerinde kromozom aberasyon testi ile mutajenitesi araştırılmıştır. Piknogenolün mutajenik olmadığı belirtilmiştir (25, 100).

Çin hamster over hücrelerinde nötral kırmızı boya geri alım testi ile 24 saatlik maruziyette piknogenolün sitotoksitesi araştırıldığında piknogenolün 150 µg/ml'e kadar sitotoksik etki göstermediği, ancak bu konsantrasyon üzerinde sitotoksite başladığı ve 300 µg/ml konsantrasyonunda %50'nin altında canlılık tespit edildiği bildirilmiştir (102).

Piknogenolün 150 µg/ml'ye kadar genotoksik etki göstermediği bildirilirken, 600 µg/ml'ye kadar insan lenfositlerinde kromozomal aberasyonlara neden olmadığı belirtilmiştir (101, 102). Fare kemik iliği kullanılarak yapılan mikroçekirdek testi sonuçlarına göre 1500 mg/kg piknogenolün kromozom anormalliği göstermediği bildirilmiştir (101).

Bu çalışmalar, piknogenolün mutajenik ve genotoksik olmadığını göstermektedir. Ayrıca birçok çalışmada piknogenolün genotoksik hasara karşı koruyucu rolü olduğu belirtilmektedir. Chovanova ve ark. yaptıkları bir çalışmada dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda kontrol grubu ile kıyasla 8-okso-7,8-dihidroguanin (8-oksoG) konsantrasyonlarının arttığı belirtilmiştir (103). Piknogenol takviyesi kullanan çocuklarda 8-oksoG düzeylerinin önemli ölçüde azalmasının piknogenolün DNA'yı hasardan koruduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Üreme toksisitesi

Fare, sıçan ve domuzlarda yapılan 6 üreme toksisite çalışmasına göre herhangi bir teratojenik etki, perinatal toksisite ya da infertilite üzerine olumsuz bir etki göstermediği bildirilmiştir (21).

Siklofosfamid ile indüklenen embriyo-fetal gelişim toksisitesine karşı piknogenolün koruyucu rolü sıçanlar üzerinde gösterilmiştir. Siklofosfamid uygulaması ile sıçanlarda fetal ve plasental ağırlıkta azalma ve fetal malformasyonda artma gözlenmiştir. Ayrıca sıçanlara gebelik süresince uygulanan piknogenolün

siklofosfamid tarafından indüklenen embriyo-fetal gelişimsel toksisitede olumlu etkilere yol açtığı gözlenmiştir (37). Piknogenolün oksidatif stres ile uyarılan çeşitli teratojenik etkenlere karşı koruyucu bir madde olabileceğini düşünülmektedir.

Duyarlılık reaksiyonları

Tavşanlarda deri ve göz tahriş testleri ve domuzlarda temas aşırı duyarlılık testinde piknogenolün iritan olmadığı gösterilmiştir. Gönüllü insanlarda patch-oklüzyon testinde deri irritasyonu gözlenmediği bildirilmiştir (21).

Riskli dönemlerde kullanımları

Gebelikte piknogenol için bildirilen herhangi bir kontrendikasyon belirtilmemiştir. Toksikolojik çalışmalarda mutajenik, teratojenik ve perinatal toksisite bulguları görülmemiştir. Fakat genel bir yaklaşım prensibi olarak gebeliğin ilk trimestrinde kullanılmaması önerilmektedir (21, 23, 25).

Hamilelik ve emzirme döneminde piknogenol kullanımına dair yeterli bilgi mevcut değildir. Ayrıca 6 yaş altındaki çocuklarda piknogenol kullanımının güvenilirliği hakkında yeterli bilgi bulunmadığından dolayı kullanımı önerilmemektedir (33).

Piknogenolün güvenliliğinin değerlendirilmesi

Piknogenolün gıdalarda kullanımına ilişkin klinik güvenilirlik ve prelinik toksikolojik değerlendirilmesine dayanarak, bağımsız toksikoloji uzmanları tarafından “Genellikle Güvenli Kabul Edilir, GRAS, *Generally recognized as safe*” kabul edilmektedir (20, 25, 33).

Piknogenolün istenmeyen etkilerine dair yapılan çalışmalarda uzun sürede güvenli ve etkin olduğu, oldukça yüksek dozlarda bile ciddi bir akut veya kronik toksisiteye neden olmadığı belirtilmiştir (21, 37).

2010 yılında yayınlanan bilimsel ve klinik bir monografya; piknogenolün uzun dönemde 20-100 mg’lık dozlarda ve kısa dönemde 100-300 mg dozlarda kullanımının toksik olmadığı kabul edilmektedir (20, 25).

Piknogenolün insanlarda 100-200 mg/günlük dozunun güvenli olabileceği öngörülmektedir (104).

Sağlıklı ve hasta bireylerden oluşan toplamda 5723 kişinin bulunduğu yaklaşık 70 klinik çalışmadan elde edilen verilere dayanarak piknogenolün güvenilir olduğu ileri sürülmektedir. Klinik çalışmalarda piknogenolün günlük dozunun (80 mg/gün ortalama dozda, 30-450 mg/gün doz aralığında, 4665 kişi) advers etki oranı % 2.4 olarak, sağlıklı kişilerde (2116 kişi) bu oran %0.19 olarak belirlenmiştir. Bu klinik çalışmaların ortak sonucunda kullanım süresi ya da dozunun yan etki ile ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır (20, 25, 100).

Klinik araştırmaların sonucunda piknogenolün en sık rastlanan yan etkisinin gastrointestinal rahatsızlıklar olduğu ve yemekle birlikte ya da yemekten sonra alımında bu yan etkinin görülmediği belirlenmiştir (25, 100). Bunun yanı sıra baş dönmesi, baş ağrısı ve bulantı da sık bildirilen yan etkilerdendir (25). Bu yan etkiler hafif şiddetli bulunmuştur. Piknogenolün daha yüksek dozlarında bile ciddi yan etki göstermediği belirtilmiştir (20, 25, 100).

Piknogenolün normotansif bireylerde kan basıncı ve kalp atım hızına etkisi, 4 klinik araştırma (kişi sayısı: 185) ile değerlendirildiğinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir (25).

2002-2005 yılları arasında Avrupa ve Asya’da piknogenol kullanan binlerce bireyde 3 ürtiker, 1 baş ağrısı, 1 mide bulantısı, 1 egzama ve diyare vakası belirlenmiştir. Sonuç olarak, 1970 yılında Avrupa’da piyasaya sürülen piknogenolün kullanımını ile ilgili ciddi bir advers etki bildirilmemiştir (25).

Genellikle yetişkin veya geriyatrik popülasyon tarafından kullanılan piknogenolün diğer ilaçlar ile, alkol ve besinler ile birlikte alınmasına bağlı olarak bildirilen bir etkileşme bildirilmemiştir. Aspirin kullanan hastalarda piknogenolün alınması protrombin zamanını (INR)’yi etkilememiştir (25, 33).

Kardiyovasküler bozukluğu olan 40 hastada 2 ay süre ile günde 300 mg kullanılan piknogenolün herhangi bir yan etkiye neden olmadığı ve güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir (105).

Diz osteoartriti olan 156 kişi ile yapılan klinik çalışmada piknogenolün üç ay boyunca kullanımının plasebo ile kıyasla bir yan etkiye yol açmadığı, aksine tedavide kullanılan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların neden olduğu

gastrointestinal rahatsızlıklara yol açmadan semptomatik tedavide güvenle kullanılabilirliği belirtilmiştir (106).

Klinik çalışmalarda piknogenolün 40-100 mg/gün ya da 1 mg/kg va doz aralığında kahvaltıda birlikte alınması önerilmektedir (21).

2.2. Kurkumin

2.2.1. Kurkuminin Doğal Kaynakları ve Kullanımı

Anavatanı Güney Asya olan kurkumin; halk arasında “zerdeçal, zerdeçöp, hint safranı, safran kökü” olarak bilinen *Curcuma longa* L.’nin rizomlarından elde edilen sarı-turuncu renkli polifenolik bir bileşiktir (107-109).

Amerikan Gıda ve İlaç Daresi (FDA), kurkumini GRAS listesinde yayınlamıştır ve şu anda birçok ülkede gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (109, 110).

Curcuma longa (%3-8), *Curcuma phaeocaulis* (%3), *Curcuma xanthorrhiza* (%1-2), *Curcuma zedoaria* (%0.1), *Curcuma aromatica*, *Costus speciosus*, *Curcuma mangga*, *Etingera elatior* ve *Zingiber cassumunar* türleri kurkumin kaynakları olarak bilinmektedir (107).

Kurkumin en yaygın bilinen kullanımı köri tozu üretimi olup testil boyası olarak, gıda endüstrisinde renklendirici, koruyucu ve aromatan olarak kullanımının yanı sıra tıbbi kullanımı 6000 yıllık bir geçmişe sahiptir. Kurkuminin grip, soğuk algınlığı, gastrointestinal sistem rahatsızlıkları, hematolojik bozukluklar, karaciğer ve akciğer hastalıkları ve cilt hastalıkları gibi çeşitli hastalıklar ve durumlar üzerinde geleneksel kullanımına rastlanmaktadır (107, 111-113).

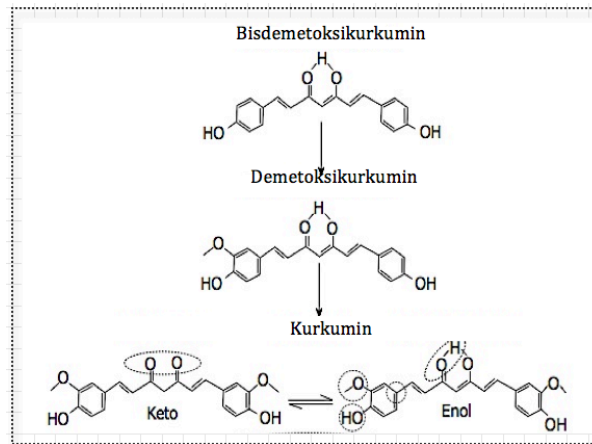
Yaklaşık son 50 yılda yapılan detaylı araştırmaları özetleyen bir derlemede, kurkuminin kolesterol ve LDL düzeyini düşürdüğü, platelet agregasyonunu ve miyokard infarktüsünü engellediği, Tip 2 diyabet, romatoid artrit, multipl skleroz ve Alzheimer ile ilişkili semptomları azalttığı, HIV replikasyonunu inhibe ettiği, karaciğer ve akciğer toksisitesini önlediği, safra salgılamasını arttırdığı, katarakt oluşumuna karşı koruyucu rolü olduğu ayrıca kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkin rolü olduğu belirtilmiştir (111, 114).

Kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyal, antifungal, antiseptik, analjezik ve antikanser etkilerine bağlı olarak çeşitli malign hastalıklar, diyabet, alerji, ağrı, artrit, alzheimer ve diğer kronik hastalıklara karşı etki potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir. Bu etkilerinde transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler, protein kinazlar ve diğer enzimlerin regülasyonunun aracılık ettiği belirtilmektedir (107).

Kurkuminin güvenliliği ve etkinliği üzerine yapılan birçok in vitro ve in vivo çalışmalar ile çeşitli hastalıklar üzerinde koruyucu ve tedavi edici rolü desteklenmektedir. Kurkuminin terapötik etkinliğinin klinik çalışmalarda araştırılması sonucunda oral, sistemik veya topikal kullanımı ile çeşitli kanser türlerinde, inflamatuvar hastalıklarda, ülseratif oluşumlarda, romatoid artrit, osteoartrit, kardiyovasküler ve nörodejeneratif bozukluklarda, metabolik hastalıklarda, cilt hastalıklarında, mikrobiyal durumlarda etkinliği bildirilmiştir (107, 110, 113, 114).

2.2.2. Kurkuminin Fizikokimyasal Özellikleri

Curcuma longa (*C.longa*) bitkisinin aktif bileşenleri kurkuminoit olarak isimlendirilir ve bitki yaklaşık olarak %2-6 oranında kurkuminoit içermektedir. Kurkumin (%80), demetoksi kurkumin (%18) ve bis-demetoksi kurkumin (%2) doğal fenoller olarak bilinen kurkuminoit ailesinin en bilinen üç ana fenolik bileşimidir. (Şekil 2.2.) (109, 110, 114, 115, 116).



Şekil 2.2. Bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin, kurkuminin (enol ve keto formları) kimyasal yapıları.

Kurkumin (diferuloilmetan, $C_{21}H_{20}O_6$; MA: 368,38 g/mol)'in kimyasal adı IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) tarafından 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion olarak belirlenmiştir. Kurkumin portakal kabuğu renginde, suda ve eterde çözünmeyen, lipofilik bir bileşik olup çeşitli organik çözücülerde (aseton, dimetilsülfoksit, etanol, kloroform gibi) çözünen fenolik yapıya sahip bir bileşiktir (109, 111, 115).

Kurkuminin kimyasal yapısı incelendiğinde keto ve enol formu olmak üzere iki tautomerik form bulunur. Enol formu katı fazda ve solüsyon içindeyken daha karardır. Beta pozisyonunda bağlanmış olan 2 keton grubu kurkuminin antioksidan etkisinde sorumlu tutulmaktadır (116, 117).

2.2.3. Kurkuminin Farmakokinetik Özellikleri

Kurkuminin farmakokinetik özelliklerine dair çalışmalarda oral absorpsiyonun düşük olduğu, önemli miktarının feçesle ve az bir kısmının ise idrarla atıldığı bildirilmektedir. Özellikle yüksek dozlarının alınmasını takiben karaciğer başta olmak üzere kan, mide, bağırsak, kalp, böbrek gibi farklı organlarda farklı düzeylerde bulunabildiği ve vücuttaki yarılanma ömrünün alınan kurkumin miktarına bağlı olarak doz artışı ile orantılı değişebildiği gösterilmiştir.

Kurkuminin oral uygulamasında Sprague-Dawley sıçanlarında diyet ile 1 g/kg verilen kurkuminin oral absorpsiyonunun çok düşük olduğu, büyük bir kısmının (%75) feçesle atıldığı ve çok az bir kısmının ise idrarla atıldığı gösterilmiştir (118).

Tritiyum ile işaretli kurkumin kullanılarak sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada da kurkuminin oral uygulamasında çoğunun feçesle atıldığı, intravenöz (i.v.) ve intraperitoneal (i.p.) uygulamada ise safra yolu ile atıldığı gösterilmiştir (119).

Bir diğer çalışmada, tritiyum ile işaretli kurkuminin 10, 80, 400 mg/kg dozlarda uygulanan sıçanlarda kurkuminin belirgin oranda feçesle atıldığı, absorbe edilen yüzdesinin (verilen dozun %60-66) dozdan bağımsız olarak sabit olduğu ve doz arttırılmasının yüksek absorpsiyon ile sonuçlanmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, 80

ve 10 mg/kg dozlarında işaretli kurkuminin çoğunun 72 saat içinde atıldığı, ancak 400 mg/kg işaretli kurkuminin uygulamadan 12 gün sonra bile karaciğer, kan ve böbrekte bulunabildiği belirtilmiştir (120).

Farelere oral yoldan 1 g/kg kurkumin verildikten 15 dakika sonra plazma düzeyi 0.13 mikrog/mL ve 60 dakika sonra ise maksimum konsantrasyon $C_{max}=0.22$ mikrog/mL'a ulaştığı, 6 saat içerisinde ise 5 ng/mL değerinin altına düştüğü bildirilmiştir (121). Farelere 0.1 g/kg i.p kurkumin verilmesi ile 15 dakika içinde maksimum konsantrasyona (yaklaşık 2.25 mikrog/mL) ulaştığı ve ilk 60 dakika içerisinde konsantrasyonun hızla düştüğü gözlenmiştir (121). Sıçanlarda 10 mg/kg (i.v) ve 500 mg/kg (oral) dozlarda kurkuminin farmakokinetik özelliklerini belirlemek üzere yapılan çalışmada, maksimum plazma konsantrasyonu 10 mg/kg (i.v) doz için 0.36 ± 0.05 mikrog/mL ve 500 mg/kg (oral) doz için 0.06 ± 0.01 mikrog/mL olarak belirlenmiştir. Plazma yarılanma ömrü ise 10 mg/kg (i.v) doz için 28.1 ± 5.6 dk ve 500 mg/kg (oral) doz için 44.5 ± 7.5 dk olarak belirlenmiştir (Tablo 2.2.) (122).

Fare ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kurkuminin dokularda farklı düzeylerde birikebildiği ve zamana bağlı kısa sürede atıldığı gösterilmiştir. 0.1 g/kg i.p. kurkumin verildikten 1 saat sonra kurkumin en yüksek oranda bağırsakta ($117 \mu\text{g/g}$) olmak üzere dalakta ($26.1 \mu\text{g/g}$), karaciğerde ($26.9 \mu\text{g/g}$), böbreklerde ($7.5 \mu\text{g/g}$) ve en düşük oranda beyinde ($0.41 \mu\text{g/g}$) belirlenmiştir (121).

Tablo 2.2. Sıçanlarda kurkumin uygulamasında farmakokinetik parametreler.

Parametre	10 mg/kg (i.v.)	500 mg/kg (oral)
AUC (dk $\mu\text{g/ml}$)	7.2 ± 1.2	3.6 ± 0.6
T_{max} (dk)	-	41.7 ± 5.4
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0.36 ± 0.05	0.06 ± 0.01
$t_{1/2}$ (dk)	28.1 ± 5.6	44.5 ± 7.5

İnsanlarda yapılan farmakokinetik çalışmaların çoğunda hayvan çalışmalarına benzer sonuçlara ulaşılmıştır (109). İnsan, sıçan ve farelerde kurkuminin farklı doz ve uygulama yollarında plazma ve doku düzeyleri Tablo'da verilmiştir (Tablo 2.3.). İnsanlarda 4-8 gram ($57-114$ mg/kg) kurkuminin oral yoldan

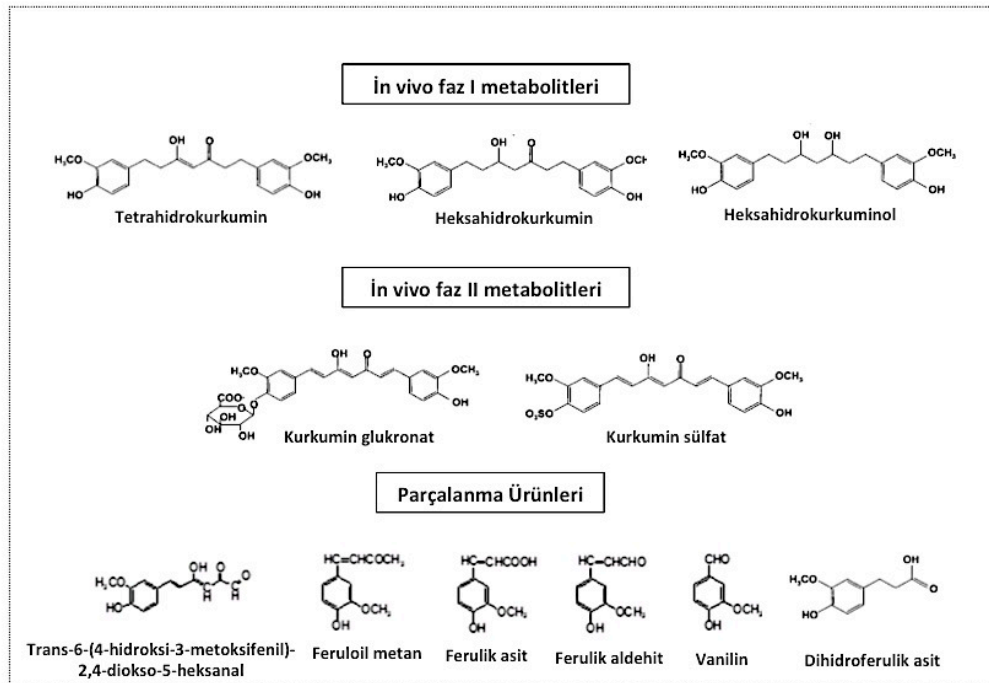
verilmesinde maksimum plazma düzeyi 0.41-1.75 μM olarak belirlenmiştir (123).

Birçok çalışmada kemiricilerde ve insanlarda kurkumin metabolizması değerlendirilmiştir. Kurkuminin ana olarak karaciğerde ve ayrıca diğer dokularda sülfatasyon ve glukronidasyon konjugasyonuna uğradığı bildirilmektedir (131, 132).

Kurkuminin gönüllü bireylere, oral yoldan tek doz (yaklaşık 10-12 g) verilmesinden 15 dakika ve 72 saat sonra alınan serum örneklerinde kurkuminin, sülfat ve glukronat konjugatları tespit edilmiştir (133).

Sıçanlarda kurkuminin ana safra metabolitlerinin tetrahidrokurkumin ve heksahidrokurkumin olduğu, bunların glukronat konjugatları olarak atıldığı ve diğer safra metabolitlerinin ise dihidroferulik asit ve ferulik asit olduğu 1978 yılında Holder ve ark. tarafından bildirilmiştir (119). Ayrıca sıçanların idrarında kurkuminin sülfat konjugatlarının varlığı da tespit edilmiştir (120).

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, kurkuminin ana metabolitlerinin glukronat ve sülfat metabolitleri ve tetrahidrokurkumin olduğu ileri sürülmüştür (Şekil 2.3.) (121, 131, 134).



Şekil 2.3. Kurkuminin in vivo metabolitlerinin ve parçalanma ürünleri.

Tablo 2.3. İnsan, sıçan ve farelerde kurkuminin farklı doz ve uygulama yollarında plazma ve doku düzeyleri.

Tür	Uygulama Yolu / Doz		Serum/Doku	Konsantrasyon	Kaynak
İnsan	Oral	2 g*	Serum	0.006 ± 0.005 µg/mL	(124)
	Oral	3.6 g	Plazma	11.1 ± 0.6 nmol/mL	(125)
	Oral	4-8 g	Plazma	0.41-1.75 µM	(123)
	Oral	12 g*	Serum	51.2 ng/mL	(126)
Sıçan	Oral	340 mg/kg	Plazma	16.1±11.4 ng/mL	(127)
			İdrar	2 ng/mL	
			Bağırsak	1.4±0.2 mg/g	
			Karaciğer	3671.8 ng/g	
			Böbrek	206.8±51.5 ng/g	
	Kalp	807.6±170.4 ng/g			
Oral	500 mg/kg	Plazma	0.06±0.01 µg/mL	(122)	
Oral	1 g/kg	Serum	0.5 µg/mL	(128)	
Oral	2 g/kg	Mide	53.5±5.1 (µg/g)	(124, 129)	
		İnce bağırsak	58.6±11.0 (µg/g)		
		Kalın bağırsak	5.1±2.5 (µg/g)		
		Serum	1.35±0.23 µg/mL		
i.v.	10 mg/kg	Plazma	0.36±0.05 µg/mL	(122)	
Fare	Oral	100 mg/kg	Plazma	0.22 µg/mL	(121)
	i.p.	100 mg/kg	Plazma	0.60±0.03 µg/mL	(121, 130)
			Bağırsak	117±6.9 µg/g	
			Dalak	26.1±1.1 µg/g	
			Karaciğer	26.9 ±2.6 µg/g	
			Böbrek	7.5 ±0.08 µg/g	
			Beyin	0.41 ±0.01 µg/g	
			Kalp	9.1±1.1 nmol/g	
			Akciğer	16 ±3 nmol/g	
Kas	8.4±6 nmol/g				

Kurkumin metabolitlerinin kurkumin kadar aktif olup olmadığı henüz tam

olarak kesinlik kazanmamıştır. Bazı çalışmalarda tetrahidrokurkumin (THC)'in kurkuminin fizyolojik aktiviteleri üzerinde rol alabileceği ileri sürülürken, bazı çalışmalarda ise metabolitlerinin daha düşük aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (131, 135, 136).

Ağızdan alınan kurkuminin büyük bir kısmı feçes yolu ile atılır, bir kısmı ise idrar yolu ile konjugatları halinde atılır. i.v. ve i.p. uygulanan kurkumin ise uygulamadan hemen sonra hızlı bir şekilde safra kanallarına geçip metabolize edilerek feçes ile atılmaktadır (131).

Oral olarak kurkumin verilen (36-180 mg/kg) 15 hasta ile yapılan bir çalışmada, 4 aya kadar kurkumin metabolitlerinin kan veya idrarda tespit edilemezken feçeste bulunabildiği gösterilmiştir (137).

Kurkuminin oral biyoyararlanımı üzerine yapılan bir çalışmada, 500 mg/kg kurkuminin oral biyoyararlanımı sıçanlarda %1 olarak bildirilmiştir (122). Kurkuminin bağırsaklardan absorpsiyonun az olması, karaciğerden yüksek derecede metabolize olması ve safradan hızlı atılması, plazma ve dokularda düşük seviyelerde bulunmasını açıklamaktadır. Bu nedenle kurkuminin biyoyararlanımının düşük ve yarı ömrünün oldukça kısa olduğu sonucuna varılmaktadır (109, 121, 131). Kurkuminin düşük biyoyararlanıma sahip olduğu insanlar üzerinde de gösterilmiştir. Bu durumunun, kurkuminin suda çözünürlüğünün zayıf olmasından ve pre-sistemik metabolizmaya uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir (128).

Shoba ve ark (1998) yaptıkları bir çalışmada, kurkuminin yalnız başına ve ayrıca hepatik ve intestinal glukuronidasyon inhibitörü olarak bilinen piperin ile birlikte verilmesi durumunda biyoyararlanımını değerlendirmiştir. Kurkuminin piperin ile kombinasyonunun sağlıklı gönüllü bireylerde ve sıçanlarda belirgin şekilde biyoyararlanımı arttırdığı gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, 2 g/kg kurkumin ile 20 mg/kg piperinin birlikte uygulanmasının kurkuminin maksimum serum konsantrasyonunu kısa zamanda arttırdığı, eliminasyon yarılanma ömrünü ve klerensi belirgin şekilde azalttığı, ayrıca piperin ile kurkuminin birlikte kullanımının sıçanlarda kurkumin biyoyararlanımını yaklaşık %154 oranında, insanlarda ise %200 oranında arttırdığı bildirilmiştir (124).

Kurkuminin biyoyararlanımının artırılması için kurkumin ile kompleks oluşturma, lipozomal kurkumin, kurkumin nanopartikülleri, kurkuminin sentetik analogları gibi çeşitli yöntemler denenmektedir (109).

2.2.4. Farmakolojik Özellikleri

Çeşitli prelinik hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antimikrobiyal etkilere sahip olduğu, yara iyileşmesini hızlandırdığı, ayrıca kardiyovasküler, nörodejeneratif, gastrointestinal, otoimmün rahatsızlıklarda yararlı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Kurkumin üzerine yapılan klinik araştırmalar kurkuminin geleneksel tıbbi kullanımını ve terapötik rolünü desteklemektedir (109, 111, 112, 138).

Antioksidan etki

Oksidatif stresin inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, miyokardiyal iskemi, kanser gibi pek çok hastalığın oluşumuna zemin hazırladığı bilinmektedir. Kurkuminin bilinen güçlü antioksidan bileşikler ile kıyaslanabilecek düzeyde güçlü antioksidan etkiye sahip olması, kurkumini birçok hastalığın tedavisinde potansiyel bir etmen yapmaktadır (114, 115, 138, 139).

Kurkumin, başta hidrojen peroksit olmak üzere süperoksit anyonlarının, nitrojen dioksit radikallerinin ve hidroksil radikalleri gibi birçok serbest radikali süpürücü etkiye sahiptir ve süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin düzeylerini artırarak oksidatif stresi azaltmaktadır. Lipid peroksidasyonunu, lipit degradasyonunu, oksidatif DNA hasarını engellediği in vitro ve in vivo olarak birçok çalışmada gösterilmiştir (109, 114, 115, 138).

Kurkuminoitlerin sıçanlarda beyin dokusunda ve karaciğer mikrozomlarında lipit peroksidasyonuna etkisi incelenmiş ve tüm kurkuminoitlerin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği, fenolik halkaya bağlı metoksi grubu ve diketon yapılı kurkuminin ise antioksidan etkisinin oldukça belirgin olduğu gösterilmiştir (140).

Serebral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan hayvan modelinde kurkuminin lipit peroksidasyonunu inhibe ederek, antioksidan savunma enzimlerini artırarak ve serbest radikal oluşumunu azaltarak dolayısıyla güçlü antioksidan etkisi ile hasarı azalttığı gösterilmiştir (141).

Sonuç olarak, birçok hastalığın temelinde yatan oksidatif hasarın kurkuminin güçlü antioksidan etkisi aracılığı ile azaltıldığı ve birçok hastalığın tedavisinde olumlu etkileri nedeniyle yeni ilaç sistemlerinde kullanılabileceği görülmektedir.

Antiinflamatuvar etki

Kurkuminin antiinflamatuvar etkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları, klinik araştırmalarda kurkuminin inflamatuvar barsak hastalıkları, pankreatit gibi inflamatuvar yanıtın arttığı hastalıklarda akut ve kronik inflamasyonu baskılayarak etki gösterdiği belirtilmektedir (112, 142).

Birçok hayvan çalışmasında kurkuminin antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Hayvan çalışmalarından birinde, karragen ile indüklenen ödemde kurkuminin fareler üzerindeki antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Farelerde 48 mg/kg va dozda kurkuminin ödemi yarı yarıya azaltarak benzer dozdaki kortikosteroite yakın etki gösterdiği belirtilmiştir (142).

Antiinflamatuvar etkisi yönünden nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar ile karşılaştırıldığında uzun süreli kullanımda yan etki profili açısından daha uygun ve ekonomik olduğu bildirilmiştir (143).

Kurkuminin antiinflamatuvar etkisine yönelik öne sürülen etki mekanizmaları şu şekildedir:

- Proinflamatuvar gen ürünlerinin salıverilmesini düzenleyen transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunun engellenmesi (144)
- İnflamasyonların çoğunda rol oynayan proinflamatuvar enzimlerden COX-2 ve 5-LOX enziminin ekspresyonunu engellenmesi (145)
- İnflamasyon ile ilişkili hücre yüzeyinde bulunan adhezyon moleküllerinin oluşumunun baskılanması (112)
- İnflamatuvar etkinin oluşmasında görev alan sitokinlerin (Tümör nekroz faktör (TNF) ve interlökinler (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12)) ekspresyonunun ve etkisinin aril hidrokarbon reseptörleri üzerinden inhibisyonu (146, 147)
- Periferel mononükleer hücreler tarafından oluşturulan MMP'lerin üretimini ve aktivitesinin doza bağımlı inhibisyonu (112)
- İnflamasyon sürecinde rol oynayan oksijen radikallerini süpürücü etkisi (107)

Antikanser etki

Kanser, proapoptotik sinyallerin kaybı ve antiapoptotik mekanizmaların etkisinin artmasına bağlı olarak gelişen kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize bir durumdur. Kurkuminin tek başına ya da kombine kullanımının araştırıldığı kapsamlı çalışmalarda apoptozu indüklediği, hücre siklusunu durdurduğu ve ileri sürülen çeşitli mekanizmalar ile antikanser etki gösterdiği belirtilmektedir. Kurkuminin farklı dokulardan elde edilen hücre hatlarında yapılan in vitro çalışmalara göre sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermemesine rağmen, tümör hücreleri için sitotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir. Kurkuminin tümör hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu temel mekanizma, apoptozun indüklenmesi olarak ileri sürülmektedir (107, 129, 148).

Kurkuminin hücre canlılığı ve proliferasyon, kaspaz aktivasyon, tümör süpresör, mitokondriyal ve protein kinaz yollarını etkileyerek antiproliferatif ve antiapoptotik etki aracılığıyla normal hücreleri etkilemeden geniş çeşitlilikte tümör hücrelerini öldürebilme yeteneğine sahip olduğu, bildirilmiştir (129).

Kurkuminin normal hücrelerde oksidatif stresi azaltarak ve inflamatuvar yanıt ile ilgili genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek radyoprotektif etki gösterdiği ve kanserli hücrelerde ise apoptozdan sorumlu genlerin artışına bağlı olarak bu hücreleri radyasyona duyarlı hale getirdiği bildirilmektedir (112).

Kurkuminin farklı hayvan modellerinde tümör büyümesini engellediği ve kanserli hayvan modellerinde yaşam süresini uzattığı belirtilmiştir. Kurkuminin MMP inhibisyonu ile tümör metastazını inhibe ettiği in vivo ve in vitro modellerde gösterilmiştir. Kurkuminin ağız, özefagus, mide, karaciğer, meme, duodenum, kolon, prostat gibi birçok kanser türünde antitümör etki gösterdiği bildirilmiştir (107).

İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalar kurkuminin karsinogenezini üç aşamada inhibe ettiğini göstermektedir. Kanserojenik bileşiklerin metabolik aktivasyonunu bloke ederek veya detoksifikasyonunu stimüle ederek tümörün başlamasını engellemektedir. Aynı zamanda apoptozu arttırarak, hücre siklusunun ilerlemesini inhibe ederek, transkripsiyon faktörlerinin kontrolünü sağlayarak, inflamatuvar yanıtı baskılayarak, tümörün beslenmesi için önemli olan anjiogenezini ve metastazını inhibe ederek tümörün gelişmesini ve ilerlemesini engellediği belirtilmektedir (107).

NF- κ B, tümör nekroz faktör ilişkili apoptozu indükleyen ligand, fosfoinositid 3-kinaz, c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'in dahil olduğu önemli çoklu hücrel iletişim yollarının düzenlenmesi aracılığıyla kurkuminin normal hücreleri etkilemeden tümör sürecini inhibe ettiği bulunmuştur (148).

Kurkuminin çeşitli kanser türlerinin hem önlenmesinde hem de tedavisinde etkili olduğu birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bu etkilerinde ileri sürülen olası mekanizmalar aşağıda listede ve tabloda belirtilmiştir (Tablo 2.4.) (107, 113, 114, 148-150):

- Antiinflamatuvar ve immünomodulatör etkinin antitümör etkiyi desteklemesi (142, 147)
- Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin ekspresyonunu azalttığı, kaspaz aktivasyonu ve p53 gibi tümör supresör geninin uyarılması ile tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılanması (151)
- Anjiyogenik sitokinlerin baskılanması ile damar endoteli gelişim faktörü (VEGF), fibroblast gelişim faktörü ve COX-2 ekspresyonunu inhibe ederek invaziv tümörlerin beslenme ağının engellenmesi (107)
- MMP ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunun inhibisyonu ile metastazının engellenmesi (148)
- Transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu (c-myc, siklin D1, Bcl-xL gibi hedef genlerin kontrolü sağlanamaması nedeniyle hücre döngüsünün engellenmesi ve apoptozun artması) (116)
- AP-1 sinyal iletim yollarında inhibisyonu
- Sitokin ve çeşitli büyüme faktörlerinin değişmesi epidermal büyüme faktörünün ve reseptörünün etkisinin ve ekspresyonunun inhibe edilmesi ile (107)
- Hücre siklusunu baskılanarak (cyclin D1, sdk-1 ve cdc-25 ekspresyonunu önleyerek) hücrenin apoptoza teşvik edilmesi (116)
- Karsinojen aktivasyonunun inhibisyonu (in vitro çalışmalarda prokarsinojenler tarafından indüklenen sitokrom P450 aktivite artışını inhibe ettiği gösterilmiştir) (116, 146)
- Karsinojenin detoksifikasyonu için faz-II enzim ekspresyon mekanizmasının uyarılması (112)

Tüm bu biyolojik etkiler kurkuminin kanser tedavisinde ve önlenmesinde güçlü etkisini açıklamaktadır.

İnsan skuamöz hücreli akciğer karsinomu H250 hücrelerinde vinorelbin ve kurkuminin tek başlarına sırası ile %38 ve %23.7 oranında apoptoza neden olduğu, birlikte verildiklerinde kurkuminin vinorelbinin neden olduğu apoptozu yaklaşık %60 arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak kurkuminin *in vitro* olarak vinorelbinin kemoterapötik etkisini artıran adjuvan bir madde olabileceği bildirilmiştir (152).

Faz I klinik araştırmada ilerleyici dirençli kolorektal kanserli hastalara kurkuminin günlük 450-3600 mg arasında değişen dozlarda 4 ay süre ile uygulanmasının ardından diyare dışında belirgin toksisite gözlenmediği belirtilmiştir. Kurkumin 3600 mg/gün dozda tüketilmesinin kan lökositlerinde prostaglandin-E2 (PGE2) üretimini inhibe ettiği *ex-vivo* olarak gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, kurkuminin oral 3.6 g/gün dozu gastrointestinal sistem ve diğer malignitelerin önlenmesi veya tedavisinde önerilmiştir (125).

Kurkuminin kolorektal, pankreas, prostat, karaciğer kanserleri ve multipl myeloma gibi çeşitli kanser türlerinde kanser lezyonlarında etkili olduğu tamamlanan klinik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (110). Faz-I ve faz-II klinik çalışmalar kurkuminin oldukça güvenilir ve etkili olabileceğini ortaya koymaktadır (148).

Antimikrobiyal etki

Kurkuminin tekstil ve gıda ürünlerinde toksik etki göstermeden antibakteriyel özelliğe sahip olmasından dolayı kullanıldığı bilinmektedir (153). Antibakteriyel etkisinin yanı sıra kurkuminin antiviral, antimalaryal, antifungal, antiprotozoal etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (108).

Birçok *in vitro* çalışmada kurkuminin HIV tip 1 ve tip 2 virüsünün replikasyonunu önleyerek AIDS hastalarında umut vaat edici sonuçlar alınabileceği ileri sürülmektedir (143). Kurkumin ile antibiyotik kombinasyonları denenmiş ve kurkumin varlığının antibiyotik ile sinerjistik etki ortaya çıkardığı gösterilmiştir (154).

Tablo 2.4. Kurkuminin antikanser etkisi ve altında yatan etki mekanizmaları.

Antikanser etki	Mekanizma	Hücre / Hayvan çalışmaları
Karsinojen aktivasyonunun inhibisyonu	P450 aktivitesinin ve ekspresyonunun inhibisyonu	MCF-7 hücresi, sıçan, fare
Karsinojen detoksifikasyonunun uyarılması	GST aktivasyonunun indüksiyonu	Fare, sıçan
Antiinflamasyon	COX-2 ekspresyon veya aktivasyonunun uyarılması	Fare derisi, insan gastrointestinal hücreleri, BV2 mikroglial hücreleri
	iNOS ekspresyon veya aktivasyonunun uyarılması	RAW 264.7 hücresi, BALB/c fare peritoneal makrofaj
Apoptoz indüksiyonu	Kaspaz aktivitesinin uyarılması	İnsan kronik miyelojenik lösemi K-562 hücresi, insan melanoma hücresi, nöro2a hücresi
	Hücre sağkalım sinyalinin baskılanması	U937 monosit lenfoma hücresi, insan böbrek karsinoma hücresi, DU145 hücresi
Hücre siklusunun inhibisyonu	G2/M baskılanması	HL-60 hücresi, MCF-insan akciğer tümör hücresi, insan kolon kanser hücresi, gastrik KATO-III hücresi
	G0/G1 baskılanması	İnsan umbilikal ven endotel hücresi, insan böbrek karsinoma hücresi
Anjiyogenez inhibisyonu	VEGF ekspresyonunun inhibisyonu	Ehrlich ascites tümör (EAT) hücresi, NIH 3T3 hücresi, HUVEC hücresi, U937 ve Raji hücresi, MDA-MB-231 hücresi
Metastaz ve yayılımının inhibisyonu	MMP ekspresyon veya aktivasyonunun inhibisyonu	Mürin melanoma hücresi B16F10, insan hepatoselüler karsinoma SK-Hep-1 hücresi, hepatoselüler karsinoma CBO140C12 hücresi, MCF10A insan akciğer epitel hücreleri, insan astroglioma hücresi
Onkogen ekspresyonunun veya aktivasyonunun inhibisyonu	<i>c-ras</i> , <i>c-jun</i> , <i>c-fos</i> ve <i>c-myc</i> ekspresyonunun azalması	CD-1 fare derisi, tümörlü fare derisi, SKH-1 fare derisi, fare epidermal JB6 hücresi, B lenfoma hücresi, HCT-116 hücresi
Tümör baskılama fonksiyonu	P53 geninin akümüasyonu veya fosforilasyonunun artması	MCF-7 ve TR9-7, insan akciğer kanser hücreleri, insan nöroblastoma hücresi, insan ovaryum kanser hücresi, HT-29 kolon adenokarsinoma hücresi.

Antidiyabetik etki

Kurkuminin diyabet hastalığında geleneksel tıbbi kullanımının olduğu bilinmektedir. Kurkuminin glisemi, karaciğer bozuklukları, adipoz doku disfonksiyonu, nefropati, nöropati, vasküler hastalıklar, pankreatik beta hücre disfonksiyonu, testiküler hasar gibi diyabet ve diyabet komplikasyonlarında etkili olduğu bildirilmektedir (155).

Kurkuminin, bazı otoimmün hastalıklarda proinflamasyon sinyalleri düzenleyerek etki gösterdiği, ayrıca NF-kB ve tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa ekspresyonunu engelleyerek insülin direncini azaltarak insüline dirençli tip-II diyabet hastalarında ve birçok diyabetik hayvan modellerinde antidiyabetik etkisi gösterdiği bildirilmektedir (107).

Kurkuminin hipoglisemik etkisinin altında yatan mekanizma çeşitli araştırmalarda farklı şekillerde açıklanmaktadır. Bir araştırmada kurkuminin doğrudan pankreasın beta hücrelerini uyararak hipoglisemik etkiye neden olduğunu belirtilirken (156) bir başka çalışmada ise peroksizom proliferatör aktive reseptör gama (PPAR-gama) bağlama aktivitesi ile kan glukoz seviyelerinin yükselmesini engellendiği belirtilmektedir (157). Fareler üzerinde oluşturulan diyabetik ağrı modelinde kurkuminin, TNF-alfa ve NO salıverilmesini inhibe edici etkisi gösterilmiştir (158).

Nörodejeneratif hastalıklarda etki

Kurkuminin nörodejeneratif hastalıklar üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Kurkuminin reaktif oksijen türlerini azaltarak ve glutatyon sentezini artırarak mitokondriyal hasarı inhibe ettiği, amiloid beta plakların birleşmesini önlediği bildirilmiştir (159).

İn vitro, in vivo ve klinik çalışmalar ile kurkuminin Alzheimer, parkinson, multipl skleroz, epilepsi, serebral hasar gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif etki gösterdiği ve kurkuminin moleküler hedeflerinin transkripsiyon faktörleri, sitokinler ve NF- κ B aktivitesinin regülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (143, 159). Ayrıca, kurkuminin nöroprotektif etkisi, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi ve serbest radikal süpürücü etkisi aracılığıyla antioksidan etki göstermesi ile ilişkilendirilmiştir (114).

Sıçanlara 30-300 mg/kg uygulanan kurkuminin güçlü antioksidan etkisi ile orta serebral arter tıkanıklığına karşı lipit peroksidasyonunu inhibe ederek, antioksidan savunma enzimlerini arttırarak ve peroksit oluşumunu azaltarak belirgin nöroprotektif etki gösterdiği belirlenmiştir (141).

Kurkuminin diyeteye eklenmesinin fare ve sıçanlarda Alzheimerda ve fokal serebral iskemi modellerinde lipit peroksidasyonunu inhibe ederek oksidatif stres oluşumunu azaltarak koruyucu olduğu gösterilmiştir (160, 161).

Alzheimer hastalığına sahip hayvan modellerinde kurkuminin kan beyin bariyerini geçerek amiloid beta plaklar ile indüklenen toksisiteyi önlediği ve okside protein seviyelerini düşürerek bilişsel bozukluklardan koruduğu ve ayrıca metaller ile (Cu⁺², Fe⁺²) ile şelasyona girerek NF-κB'nin oluşturacağı inflamasyon hasarını önleyebildiği gösterilmiştir (160, 162).

Kurkuminin hem in vitro hem in vivo olarak Parkinson hastalığına bağlı glutatyon redüktaz (GSH) seviye azalmasını düzeltebildiği, oksidasyona karşı korunma sağladığı ve mitokondriyal kompleks-1 aktivitesini koruyabildiği gösterilmiştir ve Parkinson hastalarında beyindeki dopaminerjik nöronlarındaki oksidatif strese bağlı hasarın kurkuminin güçlü antioksidan etkisi ile düzeltebileceği ileri sürülmüştür (163).

Alzheimer hastalarında kurkuminin 24 hafta boyunca oral tüketildiği randomize, çift kör plasebolu kontrollü çalışmasında tolerebilitesi ve etkinliği değerlendirilmiştir. Günlük 2-4 gram kurkumin içeren preparatın gastrointestinal yan etkiler dışında bir yan etki göstermediği, Alzheimerda da klinik ve biyokimyasal parametreler açısından etkili olduğu bildirilmiştir (162).

Kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri

Kurkuminin güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi kardiyovasküler sistem üzerinde de olumlu etkiler göstereceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda serbest radikallerin neden olduğu kardiyak hasara ve kardiyak inflamasyona karşı kurkuminin kardiyoprotektif etki gösterdiği bildirilmektedir (164, 165).

Kurkuminin antineoplastik bir ilaç olan adriamisin ile indüklenen

kardiyotoksitesisi üzerindeki etkisi sıçanlar üzerinde çalışılmıştır. Adriamisin kullanımından 7 gün önce ve ilacı takiben 2 gün boyunca 200 mg/kg va/gün kurkuminin kardiyotoksitesiyi anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (166).

Kurkuminin hücre içi membranlarda lipit peroksidasyonunu inhibe ederek dislipidemide olumlu etkiler gösterdiği ve ateroskleroz gelişimini önleyerek kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etki gösterdiği belirtilmektedir (139).

Kurkuminin trombositlerin agreagasyonunu ve adhezyonunu inhibe ederek trombus oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Siklooksijenaz aktivesini inhibe etmesi nedeniyle muhtemel antitrombotik ajan olarak değerlendirilmektedir (167).

Kurkuminin patolojik kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliğinde önemli işleve sahip histon asetiltransferazı inhibe ederek kalp hipertrofisini engellediği gösterilmiştir (168).

Gastrointestinal sistem üzerindeki etkileri

Kurkuminin orta derecedeki sindirim sistemi rahatsızlıklarında ve safra salgısı yetersizliklerine bağlı hastalıkların semptomatik tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığı bilinmektedir. Kurkuminin hem oral hem ip uygulamasının gastrik ülseri engelleyerek antiülser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (169). Kurkuminin ayrıca serbest oksijen radikallerinin neden olduğu gastrik ülserde antioksidan etkisi ile gastroprotektif etkisi ortaya konmuştur (169).

Hafif seyreden ülseratif kolitli hastalarda hastalık nüksünün kurkumin ile engellenmesi amaçlanmış 89 hasta ile yapılan randomize çift kör klinik çalışmada ise plasebo ve kurkumin kullananlar arasında belirgin bir fark görülmediği de bildirilmiştir (170).

Helicobacter pylori ile ülser modeli oluşturulan farede oral olarak uygulanan *C.longa* ekstraktının gastrik asit sekresyonunu azalttığı ve gastrik mukozal lezyon oluşumuna karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Gastrik asit sekresyonunu H2 histamin reseptörlerini bloke ederek gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (171).

Karaciğer üzerine etkisi

Kurkuminin hepatotoksitede antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ile potansiyel koruyucu role sahip olduğu çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur (172,

173). Akut ve kronik alkol intoksikasyonu durumunda kurkuminin NF- κ B ile fosfolipaz A2 inhibisyonu yaparak, yüksek yağlı diyetle LDL peroksidasyonu ile karaciğer intoksikasyonunu önlediği bildirilmiştir (116).

Deri üzerine etkisi

Kurkuminin su çiçeği, böcek ısırıkları gibi durumlarda yara iyileşmesinde lokal olarak geleneksel kullanımının olduğu bildirilmiştir (174).

Kurkuminin NF- κ B inhibisyonu aracılığıyla skleroderma, psöriazis ve deri kanseri gibi çeşitli deri hastalıklarında önleyici ve tedavi edici etkisinden söz edilmektedir (114, 115). Kurkuminin psöriyasizli hastalarda lokal uygulamasının klinik, histolojik ve immünolojik olarak yararlı olduğu bildirilmiştir (139).

Kurkumin uygulamasının fibronektin ve kollajen ekspresyonunu artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığı, neovaskülarizasyonu ve ayrıca keratinosit ve fibroblastlarda hidrojen peroksitin neden olduğu hasarı inhibe ettiği bildirilmiştir (175).

2.2.5. Kurkumin Toksisitesi

Akut toksisitesi

Akut toksisite çalışmalarına göre kurkumin toksisitesinin düşük olduğu görülmektedir.

Farelerde 1380-3500 mg/kg va dozlarının akut oral olarak verilmesinde dışkıda renk değişikliği dışında herhangi bir yan etkiye neden olmadığı ve kurkuminin oral LD₅₀ değerinin 3500 mg/kg va'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (176).

Yapılan bir başka çalışmada oral olarak verilen kurkuminin farelerde 2000 mg/kg'a kadar, sıçanlarda ise 5 g/kg'a kadar akut toksik etki oluşturmadığı ve kurkuminin oral LD₅₀ değerinin sıçanlarda 5000 mg/kg'dan ve farelerde ise 2000 mg/kg'dan fazla olduğu bildirilmiştir (118, 124).

Lilja ve diğ. (1983) yaklaşık %79 kurkumin içeren türmerik ekstraktının hem sıçanlarda hem farelerde LD₅₀ değerinin 10 g/kg 'dan fazla olduğunu ileri sürmüşlerdir (177).

Subakut-subkronik toksisitesi

Yaklaşık 90 gün boyunca diyetlerine kurkumin eklenen sıçan (1.8 g/kg va) ve maymunlarda (0.8 g/kg va) büyüme, davranışsal, biyokimyasal ve histolojik parametrelerde herhangi bir yan etki oluşturmadığı gösterilmiştir (178).

Başka bir çalışmada sıçanlara 8 hafta kurkuminin insanların tüketebileceği normal dozun 1.25-125 katı doz aralığında oral olarak verilmesinde büyüme, beslenme ve hematolojik parametrelerde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı, ancak çalışılan en yüksek dozunda (5000 mg/kg va) gıda tüketimini azalttığı bildirilmektedir (179).

Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) tarafından 1988 yılından beri kanser önleyici madde olarak araştırılan kurkuminin güvenirliliği iki ayrı subkronik çalışmada sıçan ve köpeklerde değerlendirilmiştir. 90 gün boyunca 1140, 1515, 1995, 2630, 3500 mg/kg va/gün dozlarda uygulanan kurkuminin bazı sıçanlarda dışkı renginde değişme, retikülosit sayısında azalma ve hemoglobininde artma belirlenmiştir. Ayrıca yüksek dozlarda sıçanlarda vücut ağırlığında hafif azalma gözlenmiştir. Ancak bu değişikliklerin biyolojik olarak önemli olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya istinaden NOAEL değeri, 3500 mg/kg va /gün olarak kabul edilmiştir. Erkek ve dişi köpeklere 90 gün boyunca jelatin kapsül formülasyonunda 250, 500, 1000 mg/kg va /gün verilen kurkuminin orta ve yüksek dozlarında hemoglobin konsantrasyonunda yükselmeye neden olduğu, ancak belirgin bir anemiye neden olmadığı gösterilmiştir. Dolayısı ile köpeklerde NOAEL değeri 1000 mg/kg va/ gün olarak kabul edilmiştir (176).

Kurkumin içeriği %79-85 olan türmerik oleoresin kullanarak farelerde yapılan subkronik toksisite çalışmasına göre; 13 hafta boyunca erkek farelere 150, 750, 1700, 3850, 7700 mg/kg va/gün; dişi farelere ise 200, 1000, 1800, 4700, 9300 mg/kg va/gün dozda oral olarak verilmiştir. Her iki cinsiyette de kilo, hematolojik ve histopatolojik bulgular veya mortalite oranında önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Ancak karaciğer ağırlığında doza bağımlı artış gözlenmiştir. Ayrıca, en yüksek doz verilen farelerde istatistiksel olarak anlamlı akciğer ve böbrek ağırlığında azalma meydana gelmiştir. Biyokimyasal analizlerde kolinesterazlar ve fosforda doz-bağımlı artış gösterilmiştir (177, 180).

Kronik toksisitesi

Sıçanlarda subkronik uygulamayı takiben katı lipid kurkumin partiküllerinin (yaklaşık %30 kurkumin içeren) etkisi araştırılmıştır. 90 gün süre ile oral olarak 180 mg (=54 mg kurkumin)/kg va, 360 mg (=108 mg kurkumin)/ kg va, 720 mg (=216 mg kurkumin)/kg va uygulanan formülasyonunun oftalmik, davranışsal, kilo değişimi, organ ağırlık değişimi gibi klinik bulgularda toksikolojik açıdan önemli bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir. Ayrıca hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak da herhangi bir yan etki görülmemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak katı lipid kurkumin partiküllerinin NOAEL değeri çalışılan en yüksek doz olan 720 mg/kg olarak bildirilmiştir (181).

Ulusal Toksikoloji Programı (NTP, 1993) kemiricilerde yaklaşık olarak %80 kurkumin içeren türmerik oleoresin ile 2 yıllık bir kronik toksisite ve kanserojenite çalışması yürütmüştür. Bu çalışma kapsamında, dişi ve erkek sıçanlara kurkumin 2000, 10000, 50000 ppm dozda diyetleri ile birlikte uygulanmıştır. Bu değerlerin erkek sıçanlar için 80, 460, 2000 mg/kg va/ gün ve dişi sıçanlar için 90, 440, 2400 mg/kg va/ gün dozuna eşdeğer olarak öngörülmüştür. 15 aylık ara değerlendirmelerde; yüksek dozlarda (10000 ve 50000 ppm) karaciğer ağırlıklarında artışlar görülmekle birlikte toksisite ile ilgili belirgin bir klinik bulgu kaydedilmemiştir. Hematolojik değerlendirmede; yüksek dozda hematokrit değerlerini, hemoglobin konsantrasyonlarını ve eritrosit sayısını önemli ölçüde azalttığı ve biyokimyasal paratetrelerde klinik yönden anlamlı değişiklik göstermediği sonucuna varılmıştır. Yüksek dozlarda (10000 ppm ve üzeri) sıçanlarda neoplastik olmayan lezyonlar, ülser, kronik aktif inflamasyon, çekum hiperplazisi gözlenmiştir. Çalışılan doz aralığında kurkuminin doz-bağımlı kanser ilişkisi gösterilememiştir (180).

Benzer bir başka çalışmada ise kurkuminin kronik toksisitesi ve karsinojenik etkisi fareler üzerinde incelenmiştir. Bu çalışmada kurkuminin 2 yıl süre ile 220 mg/kg (2000 ppm)- 8400 mg/kg (50000 ppm) va/gün) doz aralığında oral olarak farelere verilmiştir. Kurkuminin 10000 ppm dozda hepatoselüler adenoma insidansında önemli artışa neden olduğu, ancak gastrointestinal hasara (ülser, neoplastik olmayan gastrointestinal lezyonlar gibi) yol açmadığı bildirilmiştir. En yüksek doz uygulanan farelerde tiroit bezi foliküler hiperplazisinde, düşük ve orta

doz uygulanan erkek farelerde ince barsak karsinomlarında artışa yol açtığı gösterilmiştir (180).

Yapılan kronik toksisite çalışmalarına göre kurkuminin karsinojenik aktivitesinin olduğuna dair yeterli kanıt bulunmadığı sonucuna varılmıştır (180). Dünya Sağlık Örgütü kurkumini kanserojen olarak değerlendirmemektedir (176, 182).

Genotoksisite

Yapılan birçok çalışma da kurkuminin mutajenik olmadığı gösterilmiştir. İn vivo ve in vitro mutajenite deneylerinde kurkuminin potansiyel genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Ames testinde (metabolik aktivasyon (-/+)) kurkuminin genotoksik etkiye sahip olmadığı bildirilmektedir (183-185).

Kurkuminin CHO hücrelerinde yapılan çalışmaya göre mikroçekirdek, kromozomal aberasyon ve dominant lethal mutasyon testinde negatif sonuç alınmıştır ve mutajenik ve genotoksik olmadığı ileri sürülmüştür (186).

Bazı in vitro ve in vivo klastojenisite çalışmalarında kurkuminin çelişkili sonuçları bildirilmektedir. Kurkuminin kromozomal sapma testinde ve in vitro comet testinde, 15, 25, 50 µM konsantrasyonlarının gastrik mukoza hücrelerinde ve insan periferik kan lenfositlerinde DNA hasarına yol açtığı, ancak bu hasarın 2 saat içinde onarılabildiği bildirilmiştir (187). Farelere oral yol ile 5 g/kg tek doz C. longa ekstresi uygulamasının kemik iliğinde mikroçekirdek oluşumunda önemli bir değişikliğe ve genotoksisiteye neden olmadığı belirtilmiştir (188).

Güçlü antioksidan etkisi ve gıda ve kozmetiklerde renklendirme ajanı olarak yaygın kullanılan kurkuminin yüksek dozlarda oksidatif stresi tetikleyebileceği ve DNA hasarına neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bunun üzerine HepG2 hücreleri ile yapılan in vitro çalışmada, kurkuminin antigenotoksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Mikroçekirdek testinde, 8 ve 16 µg/ml konsantrasyonlarında mikroçekirdek oluşumunu önemli düzeyde arttırdığı, 2 µg/ml konsantrasyonlarında siklofosfamid ile indüklenen mikroçekirdek oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Kurkuminin doz-bağımlı olarak hem genotoksik etki hem de antigenotoksik etki gösterebileceği ileri sürülmüştür (189).

Fare ve sıçanlarda kurkuminin kronik diyet maruziyetinin kardeş kromatit değişimi ve kromozomal aberasyona etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucuna göre kurkumin farelerde zayıf klastojenik olarak değerlendirilmiştir. Kromozomal aberasyonda önemli bir artış gözlenmezken, intraperitoneal uygulamada 25 mg/kg va üzerindeki dozlarında kardeş kromatit değişimini düşük sıklıkta indüklediği bildirilmiştir (190).

Bir başka çalışmada ise farelere 25-200 mg/kg va intraperitoneal yoldan uygulanan kurkuminin, dozdan bağımsız kemik iliği hücrelerindeki kardeş kromatit değişimini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (182).

Yukarıda belirtilen araştırmalarının aksine kurkuminin antimutajenik ve antigenotoksik etkiye sahip olduğu da birçok çalışmada gösterilmektedir (176).

Üreme ve gelişim toksisitesi

Fareler üzerinde yapılan çalışmada 12 hafta süre ile hayvan diyetlerine eklenen kurkuminin (%0.015) hamilelik oranı, embriyo sağ kalımı, implantasyon sayısı ve mutajenik indeks parameterelerine göre herhangi bir teratojenik etki oluşturmadığı gösterilmiştir (186).

OECD klavuzlarına uygun olarak yürütülen bir çalışmada, sıçanlara çiftleşme periyodundan 10 hafta önce 1500, 3000, 10000 ppm kurkumin içeren diyet verilmiştir ve 21-24 hafta boyunca kurkuminli diyete devam edilmiştir. Bu çalışmada ebeveyn ve yenidoğanda çalışma boyunca gözle görülür önemli toksisite, histopatolojik değişiklik, oftalmolojik değişiklik ya da mortalite görülmediği ve tedavi ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmadığı bildirilmiştir. Orta ve yüksek dozlarda doğum endeksinde artış gözlemlendiği, ancak bu etkinin anlamlı olmadığı kaydedilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doğurganlık indeksi, doğum oranı, implant kaybı, canlı doğum yüzdesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Araştırmacılar, bu çalışma sonucuna göre kurkuminin üreme parametreleri üzerinde toksikolojik etkisinin olmadığını bildirmiş ve üreme toksisitesi için NOAEL değerini 10000 ppm (=erkek sıçanlarda 847-959 mg/kg va dişi sıçanlarda 1043-1076 mg/kg va eşdeğerdir) olarak belirlemişlerdir (191).

Alerji ve duyarlılık

Kurkumin ya da zerdeçal alımının allerjik reaksiyonu artırdığına dair kanıt bulunmamaktadır. Ancak kurkuminin deri üzerinde çeşitli yararlı etkilerinin olduğu bilinmesine rağmen nadir de olsa allerjik temas dermatiti ve ürtikere ve eritem, papül ve veziküllerin oluşumuna yol açabileceği bildirilmektedir. Baharat işçilerinde ve gıda fabrikasında çalışan işçilerde mesleki allerjik temas dermatit vakaları bildirilmektedir. Kurkuminin neden olduğu immünolojik (Ig-E aracılıklı) ve immünolojik olmayan iki allerjik temas ürtiker vakası rapor edilmiştir (176, 192, 193).

Riskli Dönemlerde Kullanımları

Annelerin süt üretimini artırmak için *C.longa*'nın geleneksel olarak kullandığı bilinmektedir. İnsanlarda gebelik döneminde kurkumin kullanımının olumsuz etkilerinin gözlemlendiğine dair herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak geleneksel kullanımına rağmen, kurkuminin hamilelerde ve laktasyon döneminde kullanımının güvenliliğine dair daha fazla çalışmanın gerekli olduğu görülmektedir. Kurkuminin hekim önerisi dışında bu risk gruplarında kullanımı önerilmemektedir (194).

Çocuklarda olumsuz bir etki beklenmemekle birlikte çocuklarda kullanımının güvenilirliği ve etkinliği konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (194).

Kurkuminin özellikle duyarlı bireylerde demir dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan peptit yapılı hepsidin proteinini baskıladığı ve demir metabolizmasının değişimine neden olduğu gösterilmiştir. Kanser veya kronik hastalıklara bağlı anemili hastaların kurkumin kullanımından etkilenebileceği ileri sürülmektedir (195).

Perkins ve ark. (130) tarafından insanlarda kemoprotektif etkinlik için kurkuminin 1.6 g/gün dozunun yeterli olduğu bildirilmiştir.

Kurkuminin güvenliliğinin değerlendirilmesi

C.longa USA/FDA Amerika Gıda ve İlaç Dairesi GRAS kapsamında gıda katkısı olarak değerlendirilmektedir. Literatürde yayınlanmış 5000'den fazla kurkumin ve türmerik ile ilgili prelinik, in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır.

Kurkuminin güvenilirliği birçok klinik çalışma ile in vivo ve in vitro çalışma ile desteklense de uzun dönem toksisitesinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır (176).

Anand ve ark. (2007) kurkumin üzerine yapılan çeşitli hayvan modellerinden ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen verileri kapsamlı olarak incelemişlerdir ve kurkuminin yüksek dozlarda bile güvenli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu durum, kurkuminin zayıf absorpsiyon, hızlı metabolizasyon ve hızlı sistemik eliminasyona sahip olması ve dolayısıyla plazma ve dokulardaki düşük seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (131).

Birçok faz I klinik çalışmalara göre 8-12 g/gün gibi yüksek dozlarında kurkuminin toksik etkisinin olmadığı, güvenli olduğu ve iyi tolere edilebildiği bildirilmiştir (123, 126).

Kurkuminin tek seferde alınan oral dozunun güvenilirliği ve maksimum tolere edilebilir dozunun belirlenmesi için 24 sağlıklı gönüllü bireyde yapılan çalışmada, 500-12000 mg arasında değişen miktarlarda kurkumin verilmesini takiben 72 saat sonra güvenilirlik değerlendirilmesi yapılmıştır. Tüm bireylerde herhangi bir toksik etki görülmediği ve 7 bireyde dozdan bağımsız minimal toksisite (Kaşıntı, başağrısı, diyare) görüldüğü kaydedilmiştir. İnsanlardaki maksimum tolere edilebilir dozun belirlenemediği, ilaç formülasyonlarındaki farklılıklardan etkilenebileceği belirtilmiştir (126).

Bir diğer çalışmada kanser açısından yüksek riskli hastalarda ya da premalign lezyonlarda kurkuminin kemoprevatif bir ajan olarak etkinliği değerlendirilmiştir. Kurkuminin, 25 hastada 3 ay boyunca 500-8000 mg/gün dozda kullanılmasıyla premalign lezyonların histolojik olarak düzeldiği belirlenmiştir. 8000 mg/gün dozuna kadar toksisite gözlenmediği bildirilmiştir (123).

Kolorektal kanser hastalarında yapılan faz II çalışmasında, kurkuminin 4 ay boyunca günlük 450, 900, 1800 ve 3600 mg alınan dozlarının iyi tolere edildiği ve doz-bağımlı belirgin toksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Kurkumin tüketimi ile ilişkilendirilen gastrointestinal yan etki (bulantı ve diyare) ve biyokimyasal analizlerde serum alkalin fosfataz ve laktat dehidrogenaz artışına yol açtığı

bildirilmiştir (125).

Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir diğer çalışmada 10 ve 12 gram dozda oral yolla kurkumin uygulanmasının ardından ciddi toksisite görülmemiştir ve klinik ve prelinik çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada sadece bir gönüllüde başağrısı, iki gönüllü de ise sarı-yumuşak bir dışkılama görülmüştür (133).

Benzer şekilde insanlarda yapılan klinik çalışmada 4 ay boyunca günlük 3600-8000 mg kurkumin kullanımının mide bulantısı ve baş dönmesi gibi yan etkiler haricinde bir toksisite oluşturmadığı belirtilmiştir (196).

İleri düzeyde pankreas kanseri olan hastalarda yapılan çalışmada gemitabin ile birlikte kullanıldığında, 8000 mg/kg va/gün kurkumin 2 hafta süre ile alındıktan sonra 17 hastadan 5'inde hafif karın ağrısı görülmüştür. Kurkumin dozunun 4000 mg/kg va/gün düşürülmesi ile de bu şikayetin azalmadığı belirtilmiştir (197).

Dhillon ve diğ. tarafından yapılan günlük oral yoldan 8 gram kurkumin verilen ileri pankreas kanseri hastalarında yapılan Faz II araştırmasında kurkuminin iyi tolere edildiği, absorpsiyonunun zayıf olmasına rağmen pankreas kanseri olan hastalarda biyolojik etkilerinin güçlü olduğu ve toksisite gözlenmediği bildirilmiştir (198).

Hafif ve orta derece alzheimer hastalığı olan 36 birey üzerinde yapılan çalışmada 24-48 hafta boyunca 2 ve 4 g/gün uygulanan kurkuminin ciddi advers/zıt etkilere neden olmadığı 3 kişide doz-bağımsız gastrointestinal rahatsızlık görüldüğü bildirilmiştir (162).

2.3. Sisplatin

2.3.1. Sisplatinin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı

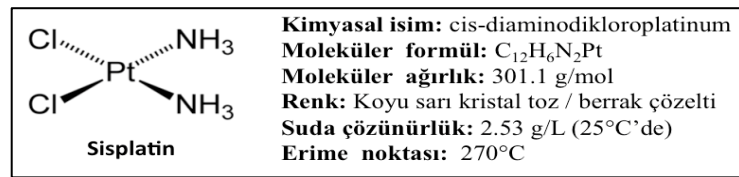
Sisplatin, ağır bir metal olan platin (Pt) içeren geniş spektrumlu güçlü kemoterapötik bir ilaçtır (17, 199-201). Sisplatinin biyolojik etkileri, 1965'de biyofizik uzmanı Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Sıvı ortamda platin elektrotlar ile oluşturulan elektriksel alanın E.coli'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler sırasında, platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki yaptığı fark

edilmiştir (202). Sisplatine ait bu bulgular yayınlandıktan sonra, yapılan ileri araştırmalar ile ilk keşfedilen platin türevi olan sisplatinin ve platin komplekslerinin antitümör ve karsinojenik etki gücü kanıtlanmıştır (199, 203).

Sisplatin ile tedavi 1971 yılında başlamış, 1978 yılında FDA tarafından platin grubu taşıyan kemoterapötiklerin kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (199, 200).

Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaç olan sisplatin, tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla veya radyoterapi ile birlikte testis, over, mesane, prostat, serviks, özefagus, akciğer kanseri, ağız, baş-boyun kanserleri gibi solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (200, 204).

Sisplatin, (cis-diaminodikloroplatinum, (PtII(NH₃)₂Cl₂), CDDP) yatay düzlemde *cis* pozisyonunda platin atomuna bağlı klor ve amonyum içeren inorganik, suda çözünür bir moleküldür ve sadece *cis* izomeri sitotoksik özelliğe sahiptir (Şekil 2.4.) (201, 203).



Şekil 2.4. Sisplatinin moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri (201).

Sisplatinin antikanser etkisi DNA sarmalına çapraz bağlanıp DNA sentezini engelleyen kompleks oluşturmasından ileri gelmektedir. Sisplatin, tümör hücresinde DNA onarım mekanizmasında interferasyona ve DNA hasarına neden olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Sisplatinin antikanser etki mekanizmasının dayandığı apoptozun indüksiyonu toksisite mekanizmasının da temelini oluşturmaktadır (17, 199-201).

2.3.2. Sisplatinin Farmakokinetik Özellikleri

Sisplatin, gastrointestinal kanaldan absorbe olmadığı için sadece paranteral olarak (i.v. veya i.p.) uygulanmaktadır (205). Sisplatin plazma proteinine yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir ve intravenöz infüzyon sonrasında yaklaşık %90

oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. İlacın toksisitesinden serbest platin bileşikleri sorumlu tutulmaktadır (206-208).

50 ve 100 mg/m² sisplatinin intravenöz bolus uygulamasından sonra 24 hastada hızla plazma pik seviyesine (yaklaşık olarak 6 µg/mL) ulaştığı ve 2 saat içinde de oldukça düşük konsantrasyonlara (2 µg/mL konsantrasyonun altına) düştüğü gösterilmiştir (209).

Sisplatin vücut sıvılarına ve dokulara hızlı dağılım göstermektedir (208). Özellikle böbrek, karaciğer ve prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bunun yanısıra böbrek, mesane, karaciğer, femur, böbrek üstü bezi, over ve ince barsaklarda plazmadan daha yüksek oranda sisplatin belirlenmiştir (206).

Sisplatinin kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçemediği düşünülmektedir. Beyin omurilik sıvısında çok düşük konsantrasyonlarda bulunması santral sinir sistemine zayıf penetrasyonu gösterir (208). Ancak sisplatinin intraserebral tümörlere seçici olarak dağıldığı ve santral sinir sistemi neoplazmlarında antitümör etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (205).

Sisplatinin metabolizasyonu karmaşıktır ve tam olarak anlaşılamamıştır. Enzimatik olmayan yollarla plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanan inaktif metabolitlerine dönüştürülür (205).

Sisplatinin ana eliminasyon organı böbreklerdir. İnsan ve hayvan çalışmalarında, böbreklerde glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyona uğrayarak ilacın yaklaşık %90'undan fazlasının (ilk 24 saatte yaklaşık %25'inin) idrarla atıldığı tespit edilmiştir. Yaklaşık %10'u ise safra yolu ile elimine edilmektedir. Sisplatin maruziyetinden sonra platin katım ürünlerinin dokularda biriktiği ve on yıla kadar bulunabildiği düşünülmektedir (208, 210).

Serbest platinlerin ortalama yarılanma ömrünün 20-45 dakika, toplam platinin ortalama yarılanma ömrünün 5 günden daha fazla olduğu belirtilmektedir (210).

Yetişkinler için yapılan farmakokinetik çalışmalar ile kıyaslandığında pediatrik farmakokinetiğinde önemli bir fark olmadığı ileri sürülmektedir. Ancak tüm hasta popülasyonları düşünüldüğünde farmakokinetik parametreler ve bazı toksisitelerin sıklığı ve şiddetinin yaşa bağlı değişkenlik gösterebileceği

bilinmektedir (205).

2.3.3. Sisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları

Sisplatinin, başta nefrotoksisite olmak üzere, hepatotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, miyelosupresif etki, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doz-bağımlı belirgin yan etkileri bulunmaktadır. Ancak bu yan etkilerine rağmen sisplatin güçlü kemoterapötik bir ajan olması sebebiyle günümüzde kullanımı devam etmektedir (200, 207).

Sisplatinin neden olduğu toksik etkilerin altında yatan mekanizmalar karmaşıktır ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bununla birlikte deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; (i) membran taşıyıcılarının rolü, (ii) sisplatinin toksik metabolitlerine dönüşümü, (iii) nükleer ve mitokondriyal DNA hasarı, (iv) oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, (v) apoptoz aktivasyonu, (vi) inflamatuvar yanıtın artması üzerinde durulan mekanizmalar olarak değerlendirilmektedir (17, 199, 211-213).

Membran taşıyıcılarının rolü

Son zamanlarda sisplatinin nefrotoksisitesi ile ilişkili olduğu düşünülen iki farklı membran taşıyıcı sistem belirlenmiştir. Sisplatin, kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınarak hedef organlarda orantısız biriktiği gösterilmiştir ve dolayısıyla nefrotoksisiteye yol açabileceği düşünülmüştür. Çalışmalarda sisplatinin proksimal tübüler epitel hücrelerinden alınması ile ilişkilendirilmiş bir bazolateral organik kation taşıyıcısı (OCT) tanımlanmıştır. İnsanlarda tanımlanan 3 izoformu (OCT1, OCT2, OCT3) bulunmaktadır. OCT2, insanlarda ve hayvanlarda sisplatinin hücre içine alınmasından ve sitotoksisitesinden sorumlu ana organik taşıyıcıdır. Günümüzde belirlenen diğer bir taşıyıcı ise bakır transport proteini “copper transporter 1” (CTR1)’dir. *In vitro* çalışmalarda CTR1’in sisplatinin sitotoksisitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (211, 212, 214).

Toksik metabolit oluşumu

Hayvan çalışmalarında sisplatinin renal tübüler epitel hücrelerinde daha güçlü nefrotoksik etkili bir metabolite dönüştüğü ve bir protoksin olduğu bildirilmektedir. Sisplatinin redükte glutatyon ile konjugasyonu sonucunda oluşan

reaktif tiyollerin toksisiteye yol açabileceği belirtilmektedir (211).

Bu mekanizmaya göre; sisplatin renal tübüler hücrelerde glutatyon-S-transferaz Pi (GSTP) enziminin katalizlemesiyle glutatyon konjugatlarına (Pt-GSH) dönüşür. Bu konjugat oldukça kararsız bir yapıdadır. Ardından glutatyon konjugatları tübüler hücrelerden geçer ve gama-glutamil transpeptidaz (GGT) ve aminotransferaz N (APN) enzimleri tarafından sisteinil-glisin konjugatları ve sistein konjugatlarına ayrılır. Sistein konjugatları proksimal tübüler hücre içine geçer ve orada sistein-S-konjugat beta liyaz (CCBL) aracılığı ile yüksek reaktif sistein tiyollere dönüştürülür. Reaktif sistein tiyollerinin proksimal tübüler hücrelerdeki esansiyel proteinlere bağlanması toksisiteye yol açar (215).

Hücre dışı glutatyon katabolizmasında ve tiyollerin hücresel taşınmasında önemli rol oynayan plazma membran enzim olan GGT aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerin platin bileşiklerine karşı daha duyarlı olduğu in vitro bir çalışmada belirtilmiştir (216).

DNA katım ürünü oluşturma

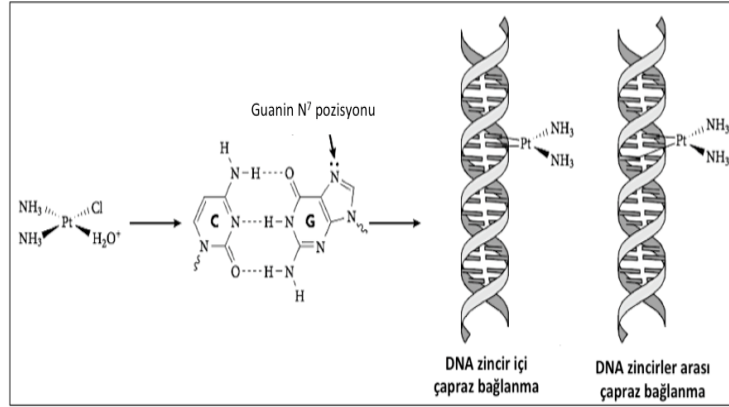
Sisplatinin antikanser etkisi hücre çekirdeğinde DNA çift zincirine çapraz bağlanması ve transkripsiyon ve/veya DNA replikasyon mekanizmasını baskılaması ile açıklanmaktadır. Hücre içine giren sisplatin, su ile reaksiyon sonucunda klor iyonlarını kaybederek hücre içindeki DNA, RNA ve protein gibi nükleofil moleküllere saldırır. Sisplatin DNA'daki guanin bazının oldukça reaktif olan N7 pozisyonundaki pürin bazlarıyla reaksiyona girerek interstrand (iki DNA zinciri arasında) ve en sık olarak da intrastrand (tek DNA zincirde bazlar arasında) kovalan çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın yapısını bozar; replikasyon ve transkripsiyon inhibisyonu aracılığıyla kanser hücresinin çoğalması ve tümör büyümesi durdurulmuş olur (Şekil 2.5.) (199, 210, 212, 213).

Sıçanlarda sisplatin ile indüklenen kardiyak toksisite modelinde hem nükleer hem mitokondriyal DNA'nın önemli derecede hasara uğradığı gösterilmiştir (217).

Ayrıca sisplatin kaynaklı genotoksik stresin apoptotik birçok sinyal iletim yolağını aktive ederek hücreyi apoptoza götürdüğü bildirilmiştir (201).

Kanser hücreleri de dahil olmak üzere hızlı çoğalan hücreler DNA hasarına

karşı daha duyarlı olmaktadır. Sisplatinin antikanser etkisinin altında yatan temel mekanizmanın da DNA katım ürünü oluşturması olduğu düşünülmektedir (211).



Şekil 2.5. Sisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar (199).

Oksidatif stres

Oksidatif stres, sisplatin toksisitesinde yer alan diğer önemli mekanizmalardan biridir. Sisplatinin serbest oksijen radikal oluşumuna bağlı olarak özellikle karaciğer ve böbrekteki lipid peroksidasyonunu arttırması ve oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarı, sisplatinin toksisitesinden sorumlu tutulmuştur (211, 218).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun sisplatin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olduğu ve reaktif oksijen türlerinin hem ekstrinsik hem intrinsik yollar ile apoptozu indüklediği belirtilmiştir (17, 219).

Mitokondri, sisplatin ile indüklenen oksidatif stresin birincil hedefi olup mitokondriyal disfonksiyonuna, sinyal moleküllerinin aktivasyonuna, pro-apoptotik genlerin transkripsiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açan bir dizi olaya yol açmaktadır (201, 211).

Lipid peroksidasyonu ile membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olan malondialdehit (MDA) üretiminde artış olduğu bilinmektedir. Çeşitli antioksidanların kullanımı ile sisplatinle bağlı böbrek dokusunda indüklenen MDA düzeylerindeki artışın önlenmesinde ve dolayısıyla nefrotoksitenin azaltılmasında etkin oldukları gösterilmiştir (220).

Apoptoz-nekroz

Sisplatin ile indüklenen tümör hasarının başlıca mekanizması apoptozun indüklenmesi yoluyla olmaktadır. Apoptozun indüksiyonunda, DNA onarım mekanizmalarının işleyişi ve apoptotik sinyal iletiminin aktivasyonu önemli rol oynayan faktörlerdir (200).

Sitotoksik etkili sisplatinin düşük dozlarda kaspaz bağımlı yolak ile apoptozu indükleyebildiği, daha yüksek dozlarda nekrotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (201).

Sisplatinin oluşturduğu reaktif oksijen bileşiklerinin neden olduğu oksidatif stres, apoptozu arttırmaktadır. Sisplatinin mitokondriyel işlev bozukluğuna neden olarak hücrenin elektron transport zincirini etkilediği, dolayısıyla hücreyi ATP kaybına uğrattığı bilinmektedir. Sisplatinin dozunun artması, hücrede ATP kaybının şiddetlenmesine bağlı metabolik işlevlerin bozulmasına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (204, 213, 218).

Yapılan bir in vivo çalışmada sisplatin ile tedavi edilen hayvanlarda görülen antioksidan enzim düzeyi gibi biyokimyasal değişimlerin üzüm çekirdeği ekstresi ile antagonize edilerek koruyucu bir etki yaptığı ortaya konmuştur. Ayrıca üzüm çekirdeği ekstresinin antimör etkiye sahip olduğu ve yalnızca sisplatin toksisitesini azaltmakla kalmayıp antikanser etkisini de artırdığı bildirilmiştir (221).

Mitojen aktive protein kinazlar (MAPK), hücrel sinyalleri düzenleyerek hücre büyümesi ve canlılığını düzenleyen serin/teronin protein kinazlardan oluşan bir enzim ailesidir. Sisplatinin özellikle küçük hücreli akciğer kanser hücreleri olmak üzere çeşitli hücrelerde, MAPK ailesinden c-Jun N-terminal kinaz (stres ile aktive protein kinaz, JNK) stres sinyal iletim yollarının aktivatörü olduğu belirtilmektedir. Diğer bir yandan, MAPK enzim ailesinden hücrelerarası sinyal düzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonunun ise p53 aracılığı ile sisplatin tarafından indüklenen DNA hasarının onarılması için hücre siklusunu duraklattığı belirtilmiştir (181).

Servikal kanserdeki anahtar olay, insan papillomavirüs (HPV) E6 onkogeni tarafından p53 tümör baskılayıcı gen yolağının parçalanması olarak bilinmektedir.

Platin türevi kemoterapötik ilaçların p53 genini aktive ettiği ve HPV E6 onkogeninin mRNA sentezini de azalttığı bildirilmiştir (200, 222).

İnflamatuvar yanıt

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sisplatin toksisitesinde inflamatuvar yanıtın da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Sisplatinin, proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa üretiminden sorumlu NF-κB translokasyonu dahil olmak üzere birçok inflamatuvar sitokin ve kemokini arttırdığı birçok çalışmada bildirilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin yanı sıra sitokinlerin ve kemokinlerin sisplatin sitotoksitesini arttırdığı ve toksik etkilerinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (211, 223).

Sisplatin uygulaması ile böbrekte ekspresyonları artan TNF-alfa, transkribe edici büyüme faktörü beta “*transforming growth factor-β*” (TGF-β), ICAM gibi sitokinlerin renal hasarda rol oynadığı düşünülmektedir. Proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa serbest oksijen üretimini, birçok sitokin aktivasyonunu ve apoptozu indükleyerek toksisiteye katkıda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, TNF-alfa inhibitörlerinin sisplatinine bağlı böbrek disfonksiyonunu belirgin düzeyde düzelttiği ve yapısal hasarı azalttığı gösterilmiştir (224, 225) Ayrıca, TNF-alfa taşımayan farelerin sisplatin nefrotoksitesinden belirgin oranda korunduğu gözlenmiştir (223).

Sisplatin metabolizması ve toksisitesine neden olan durumlar belirtilmiştir (Tablo 2.5.) (224).

Tablo 2.5. Sisplatin metabolizması ve toksisitesine neden olan durumlar.

	Süreç	İlişkilendirilen toksik durum
Farmakokinetik özellikler	-Renal atılım	-Tübüllerde ilaç birikimi (mitokondri yoğunluğu olan proksimal tübül duyarlılığı)
Hücre içine alım ve metabolizma	-Transport aracılıklı -İntraselüler hidrasyon	-Hücre içine alımının engellenmesi -Artmış toksisite
Genomik etkiler	-Gen aktivasyonu -Genin inaktivasyonu	-Kaspaz 3 → Apoptoz -Süperoksid dismutaz → serbest oksijen radikallerinin artması

Tablo 2.5. (devam) Sisplatin metabolizması ve toksisitesine neden olan durumlar.

Doğrudan toksik etkiler	-Serbest oksijen radikalleri -Mitokondriyal hasar	-Lipid peroksidasyonu -Serbest oksijen radikallerinin artması ve ATP üretiminin azalması
Dolaylı toksik etkiler	-MAPK yolakları	-Artan TNF-alfa üretiminin apoptozu artırması
Organ etkileri	-Tübüler hasar -Tübüler fonksiyonun bozukluğu ve glomerüler filtrasyon hızının azalması	-Apoptoz, nekroz -Sodyum, potasyum ve magnezyum kaybı

2.3.4. Sisplatin Toksisitesi

Nefrotoksisitesi

Sisplatin ana eliminasyon organı böbreklerdir. Böbreklerden glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyona uğrayarak atılmaktadır. Sisplatinin doz kısıtlayıcı en ciddi yan tesiri de böbrekler üzerinedir, belirgin nefrotoksik etkiye sahiptir (214, 224). Sisplatin toksisitesi proksimal tüpte, distal tüpte ve toplayıcı kanallarda histopatolojik olarak dejeneratif ve nekrotik lezyon oluşumu ile karakterizedir. Sisplatin, yüksek dozda maruz kalan bir insanın böbrek fonksiyonlarını tamamen bozabilecek bir nefrotoksin olarak değerlendirilmektedir. Sisplatin özellikle proksimal tübül hücrelerinde, diğer organlara göre daha fazla tutularak (proksimal tübül epitel hücrelerinde serum konsantrasyonunun yaklaşık 5 katı konsantrasyonunda) ciddi böbrek hasarına yol açar. Hem hayvan hem insan çalışmaları sisplatinin kan üre azotu (BUN) düzeyinde artışa, elektrolit kaybını arttırdığı, renal kan akımında, glomerüler filtrasyon hızında ve renal klerenste doz ve zamana bağlı olarak azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (201, 204, 226-228).

5 ile 10 mg/kg arasında dozlarda sisplatin uygulanan sıçanlarda doz-bağımlı BUN ve serum kreatinin düzeylerinde artış ve histopatolojik olarak incelenen böbrek dokusunda nekrotik oluşum gözlenmiştir (229).

Sisplatin nefrotoksisitesinin etiyolojisinde birden çok faktörün rolü söz

konusudur. İleri sürülen mekanizmalardan biri, sisplatinin sitotoksik Pt-DNA katım ürünü oluşturmalarıdır (199, 204, 218, 227). Bir diğer mekanizma ise, sisplatinin GSH ile konjugasyonu sonucu oluşan reaktif tiyoller aracılığıyla nefrotoksisite oluşturmalarıdır. Sisplatinin GSH ile konjugasyonunun oluşumunu ve oluşan konjugasyonun reaktif tiyol molekülüne dönüşmesini inhibe ederek sisplatin nefrotoksisitesinin azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (204, 213, 218). Oksidatif stres, inflamasyon, fibrojeniz, hipoksi, mitokondriyal hasar, nekroz ve apoptoz, sisplatin nefrotoksisitesini açıklayan diğer mekanizmalar olarak ileri sürülmektedir (224, 225, 227).

Sisplatinin tekrarlanan dozlarında, nefrotoksisiteye bağlı hipomagnezemi, hipokalsemi, hiponatremi hipokalemi gibi elektrolit bozuklukları görülmekte, kemik metabolizması ve bütünlüğünü etkilenmekte ve tetani görülmektedir (200, 211). Nitekim, yapılan bir çalışmada üç ay süre ile sisplatin kullanan hastalarda belirlenen hipomagnezemi tedaviden üç yıl sonra bile hastaların %50'sinde gözlenmiştir (230).

Sisplatin tarafından indüklenen hem akut hem kronik renal toksisitede, BUN ve serum kreatin düzeyinde artmanın yanı sıra proteinüri, glukozüri, enzimüri gibi komplikasyonlar rapor edilmektedir (211, 227).

Araştırmacılar, sisplatin ile indüklenen nefrotoksisitenin insan ve sıçan böbrek kesitlerinde morfolojik olarak gen ekspresyonu ve fonksiyonel değişiklikler ile karakterize olduğunu bildirmiştir. Böbrek geni ekspresyonundaki değişiklikler, sisplatinin DNA hasarına, hücre büyümesinin engellenmesine ve apoptozun tetiklenmesine işaret etmektedir. Protein hasarına uğrayan genler, sisplatin taşıyıcıların hasarına, kalsiyum homeostazının ve hücresel metabolizmanın bozulmasına ve oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir (226).

Nörotoksisitesi

Sisplatinle bağlı ototoksisite ise kulak çınlaması ve yüksek frekanslarda tek ya da çift taraflı işitme kaybı olarak kendini göstermektedir. Ayrıca doz-bağımlı olarak sisplatinin uzun dönem kullanımında periferik nöropati gelişebileceği bildirilmiştir (231, 232).

Hidrofilik bir madde olan sisplatin normal koşullarda kan-beyin bariyerine az

geçmesine rağmen mental hasara yol açarak serebral kortekste platin içeriğinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (218, 232).

Hepatotoksitesisi

Sisplatine yüksek doz maruziyetinin hepatotoksisiteye yol açtığı ve akut hepatik nekroz gelişebildiği, buna bağlı olarak karaciğerde apoptotik lezyonlar görülebilebildiği belirtilmektedir (218, 233).

Sisplatin tarafından indüklenen hepatotoksisite mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak oksidatif stresin antioksidan enzimleri tüketmesine bağlı olarak toksisite görüldüğü düşünülmektedir. Sisplatin ile tedavi edilen sıçanlarda hepatik MDA ve antioksidan enzim düzeylerinde azalma bildirilmiştir (234).

Yapılan çalışmalarda selenyum, E vitamini gibi güçlü antioksidan ajanlar ile sisplatinin hepatotoksitesinin önlendiği gösterilmiştir (220, 235).

Neoplastik etkisi

Sisplatin mutajenik, teratojenik ve muhtemel karsinojenik bir ilaçtır. Sisplatin tedavisi gören over kanserli kadınlarda lösemi gelişme riskinin dört kat arttığı bildirilmiştir (231, 232).

Hematolojik sistem üzerindeki toksik etkisi

Sisplatine bağlı geçici lökopeni, trombositopeni ve anemiyle birlikte orta derecede miyelosüpresyon görülebilmektedir (200, 232). Anemi, sisplatinin myelosüpresif etkisinin bir sonucudur. İnsan ve hayvan çalışmaları ile böbrek hasarının eritropoetin eksikliğine yol açarak da anemiyi kötüleştirdiği bildirilmiştir (236).

Gastrointestinal sistem üzerindeki toksik etkisi

Sisplatinin doz-bağımlı bulantı ve kusma yaptığı bilinmektedir (232).

Kardiyotoksitesisi

Kemoterapi uygulamalarına bağlı kardiyovasküler komplikasyonlar sık görülmektedir. Sisplatin tedavisi gören hastalarda yaklaşık yirmi yıl sonra sisplatine bağlı kardiyotoksisite tanımlanmıştır. Sisplatinin neden olduğu kardiyotoksisite, elektrokardiyografik değişim, ventriküler artimi, supraventriküler taşikardi, atrial fibrilasyon, sinüs bradikardisi ve atriyoventriküler blok gibi bulgularla gösterilmiştir

(211). Ayrıca miyokardit, perikardit ve anjina da sisplatin tedavisi ile ilişkilendirilmiştir (237). Bunun yanı sıra vasküler endotelial hasar, akut miyokard infarktüsü, otonomik kardiyovasküler disfonksiyon, hipertansiyon ve hipotansiyonun da görüldüğü bildirilmiştir (211).

Dermatolojik sistem üzerindeki toksik etkisi

Sisplatinin uygulaması sırasında kazara ekstrevasiyon (damar dışına sızması) durumunda deri ülserasyonunun oluştuğu bildirilmiştir (207).

Üreme sistemi üzerindeki toksik etkisi

Birçok antikanser ilacın sperm kromozomlarında anormalliklere yol açtığı deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca düşük doz sisplatinin Leyding hücre işlevlerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı, ancak kümülatif yüksek doz kemoterapinin kalıcı hasara yol açtığı bildirilmektedir (207).

Sisplatin, plasentayı geçerek fetal hasara neden olmaktadır. Sisplatinin deney hayvanlarında teratojenik ve embriyotoksik olduğu gösterilmiştir (207). İnsanlarda fetal risk yarattığından dolayı FDA gebelik risk kategorisinde D sınıfı olarak belirlemiştir.

Alerji ve İmmünolojik etkileri

Ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlara ve anaflaktik reaksiyonlara (fasiyal ödem, bronkokonstrüksiyon, taşikardi ve hipotansiyon ile karakterize) neden olabileceği bildirilmiştir (207, 232).

Sisplatinin genel olarak görülen istenmeyen etkileri tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.6.) (17, 232, 238).

Tablo 2.6. Sisplatinin istenmeyen etkileri.

Sistem	İstenmeyen Etkileri
Kardiyovasküler sistem	- Bradikardi, sol ventrikül bloğu (nadir) - Hipertansiyon, serebral arterit (nadir) - Vasküler toksisite* (miyokard infarktüsü, serebrovasküler durumlar, mikroanjiopati)
Nörolojik sistem	- İşitme kaybı* (%24), tinnitus*(%9), vertigo - Ototoksisite*(%31), periferik nöropati, nöbet

Tablo 2.6. (devam) Sisplatinin istenmeyen etkileri.

Gastrointestinal sistem	- Bulantı/kusma* (>%90), diyare*, anoreksi* - Tat alma duyusunda bozukluk - Pankreatit, stomatit
Hematolojik sistem	- Miyelosupresyon* (%25-30) - Anemi* (%25-30), hemolitik anemi, trombositik mikroanjiyopati
Neoplastik sistem	- Akut lösemi
Dermatolojik sistem	- Alopesi, döküntü,
Hepatik sistem	- Karaciğer fonksiyon testinde bozulma - Bilirubin yüksekliği (nadir)
Bağışıklık sistemi	- Aşırı duyarlılık (nadir)
Renal/metabolik sistem	- Toksik nefropati* (%28-36) - Fanconi sendromu - Elektrolit kaybı* (Hipomagnezemi, hipokalsemi, tetani, hipokalemi, hiponatremi, hipofosfatemi)
Üreme sistemi	- İnfertilite
Diğer	- Ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlar - Kas krampları - Serum demir düzeyinde yükselme - Raynaud fenomeni

*Klinik olarak önemli olan yan etkilerdir.

2.4. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite

2.4.1. Sitotoksisite Belirleme Yöntemleri

Sitotoksisite, hücre işlevlerinde ve yapısında önemli hasar meydana gelmesidir (239). Sitotoksisitenin belirlenmesinde in vitro olarak farklı testler/yöntemler geliştirilmiştir. Sitotoksisite testleri ile hücrenin yaşamsal olaylarında meydana gelen değişiklikler ve hücrelerdeki hasar derecesi belirlenir. Bu testler, bir kimyasal maddenin olası toksik etkilerinin değerlendirilmesini sağlar ve hücre canlılığı, hücre bölünmesi, hücre zarı ve organel hasarı, protein ve DNA sentezi gibi hücresel olaylar hakkında bilgi verir (240, 241).

Sitotoksisite testlerinde farklı hücre kültürleri kullanılmaktadır ve özellikle toksisitenin değerlendirilmesinde çok önemlidir. Hücre kültürleri, primer hücre

kültürleri, sonlu hücre kültürleri ve sürekli hücre kültürleri olarak sınıflanabilirler. Özellikle ilaç etkinliğinin ve kimyasal maddelerin toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, farklı hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* testlerin kullanılabilirliğinin ve geçerliliğinin arttığı görülmektedir. *In vitro* test sistemlerinin avantajları yanında dezavantajları da vardır.

Moleküler düzeyde çalışmaların yapılmasını sağlar. Hücrelerde oluşan değişimler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilir; hücrenin bulunduğu ortamın koşulları değiştirilerek, hücrelerde ortaya çıkabilecek değişiklikler izlenebilir; insan hücre kültürleri kullanılarak, hücre tipine göre, hücrenin büyüme ve çoğalması için gereksinim duyduğu koşullar daha çabuk ve kolay belirlenir; farklı hücre tiplerinde farklı kimyasal maddeler ile ortaya çıkabilecek toksik etkiler daha az maliyet ve zaman harcanarak incelenebilir; hücresel olaylarda özelleşmiş bir işlevin değerlendirilmesine ve uygun hücre tipi seçilerek istenen organdaki etkinin incelenmesine olanak sağlar.

Türler arası farklılıklar nedeniyle, bazı hayvan hücre kültürleri insan hücreleriyle benzer yanıt vermeyebilir. İnsan hepatositleri gibi bazı kültürlerin de bulunması zor ve pahalıdır. Bazı hücre tipleri klonal büyüme göstermediklerinden kültür ortamlarında kısa sürede canlılıklarını kaybedebilir. Bu hücre kültürlerinin kronik toksisite testlerinde kullanılmaları olanaksızdır. Bazı hücreler yavaş çoğalır ve bu hücreler kısa sürede fenotipik değişikliklere uğrayabilir. Tek bir test sistemi için tek bir hücre kullanılması ve bu durumda *in vitro* testlerin *in vivo* test sonuçlarını tam olarak yansıtması beklenemez. *In vitro* toksisite testleri için düzenleyici kuruluşlar ve bilim çevrelerince yayınlanmış kesin ve kabul edilmiş az sayıda kılavuz bulunmaktadır.

Hücre kültüründe hücrelerin canlılığının belirlenmesinde kullanılan sitotoksisite testlerinde, membran bütünlüğü bozulan hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin veya naftalin siyahı gibi boya ile ya da membran bütünlüğü bozulmamış sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan, nötral kırmızı gibi boyaları kullanılır. Sitotoksisitenin değerlendirilmesi dört ana başlık altında incelenebilir: (240, 242)

- a. Hücre canlılığının değerlendirilmesi
- b. Yaşamsal devamlılığının değerlendirilmesi
- c. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi
- d. Metabolik sitotoksitenin değerlendirilmesi

a. Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Bu yöntemlerde membran bütünlüğü bozulan hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile ya da membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan ya da nötral kırmızı gibi boyalar kullanılmaktadır. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan testler ile akut toksik etkiler belirlenir (243).

- Nötral kırmızı alım testi

Nötral kırmızı boyasının canlı hücrede hücre içine alınması ve lizozomda birikmesi esasına dayanır. Boyanan hücreler hemositometre üzerine yerleştirilir, optik mikroskop altında canlılık yüzdesi tespit edilir. Ayrıca boyanan hücreler spektrofotometrik olarak da ölçülebilir (244).

- Tripan mavisi testi

Tripan mavisinin membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerde birikmesi esasına dayanır. Nötral kırmızı testinde olduğu gibi hemositometre ile boyanan hücrelerin oranı tespit edilir (244).

- Floresan metodu

Canlı hücre içerisine girebilen diasetil floresan boya veya membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine girebilen propidyum iyodür floresan boya kullanılır. Floresan boyalar ile boyanmış hücreler flow sitometri veya floresan mikroskobu ile değerlendirilir (244).

b. Yaşamsal devamlılığının değerlendirilmesi

Yaşamsal devamlılığın değerlendirilmesinde kronik toksik etkiler incelenir. Toksik etkilere maruz kalan hücrelerde etkiler birkaç saat, gün veya daha geç görülebildiğinden ve kısa dönemde ortaya çıkan toksik etkiler geri dönüşümlü olabileceğinden canlılık oranının belirlenmesinde, uzun dönem testleri kullanılmaktadır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi

belirlenmektedir (243).

c. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

Sitotoksik etki profili araştırılan maddenin hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla uygulanan testler arasında ^3H -timidin testi ve 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) immünohistokimyasal yöntem yer alır.

- ^3H -timidin testi

Hücre proliferasyonu esnasında uygulanan bir radyoizotop olan ^3H -timidin hücre içine alınması ve radyoaktivite ölçümü ile yeni DNA sentezi tespiti esasına dayanır (243).

- BrdU immünohistokimyasal teknik

Bu teknik, BrdU aracılığı ile immünohistokimyasal olarak antikorların işaretlenerek hücre ve doku antijenlerinin gösterilmesi esasına dayanır. BrdU uygulanan proliferasyon dönemindeki canlı hücreler anti-BrdU monoklonal antikorlar ile boyanarak sayım yapılabilir ya da ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) kiti kullanılabilir (245).

d. Metabolik sitotoksitenin değerlendirilmesi

Metabolik sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan testler ile hücre sayısındaki net artış, total protein miktarı, DNA artışı, metabolik aktivite belirlenebilir. Bu test yöntemleri yüksek yoğunluğa sahip hücrelerin değerlendirilmesinde tercih edilir (240). Bu testler, uzun dönemde oluşabilecek toksik etkiyi belirleyebilen, hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitesini ölçen, ucuz ve hızlı yöntemlerdir.

- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi

Mosmann tarafından (1983) geliştirilen MTT yöntemi, makrofaj aracılı sitotoksitenin nicel olarak belirlemede yaygın olarak kullanılan ve hızlı, kolay uygulanabilir kolorimetrik bir test yöntemidir (246).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olup, fenol kırmızısı içermeyen ortamlarda hazırlanan çözeltisi sarı renklidir. Yöntemin esası, sarı renkli MTT çözeltisinin, çözünmeyen menekşemor renkli formazan kristallerine dönüştüren canlı hücrelerdeki mitokondriyal

redüktaz enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanır (246).

Canlı hücrelerde süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin metabolik aktiviteleri ile tetrazolyum halkası açılarak suda çözünmeyen mor formazan MTT kristalleri oluşturulur. Bu kristaller yalnızca aktif mitokondrinin aktivitesinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür (246-248).

Organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyon-bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülen bir absorbans verir. Bu ölçülen absorbans değerleri dolaylı olarak hücrelerin canlılığını yansıtır. MTT yönteminde, hücre içi mitokondrinin metabolik aktivitesi değerlendirilirken, hücreler arası aktivitelerin değerlendirilmesine olanak vermez (249).

XTT ve WST testleri, MTT testinde olduğu gibi, bu maddelerin solüsyonlarında bulunan tetrazolyum tuzunun, hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanarak renkli formazon kristaline indirgenmesiyle gerçekleşen metabolik aktivitenin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (240).

- *Laktat dehidrogenaz (LDH) testi*

Kolorimetrik sitotoksosite değerlendirme yöntemi olan LDH test yöntemi, hücrede membran hasarı veya sitolizis durumunda hasarlı hücreden hücre besiyeri ortamına salınan sitozolik bir enzim olan LDH ölçümü esasına dayanır (240, 245).

- *Alamar mavisi testi*

Alamar mavisi boyası ile hücre canlılığı ve proliferasyonunun değerlendirildiği hem florometrik hem de kolorimetrik renk değişimlerinin tespit edildiği, metabolik aktivitenin belirlendiği bir yöntemdir. Alamar mavisinin indirgenmesi ile medyumdaki rengin maviden (okside) pembeye (indirgenmiş) dönüşmesi esasına dayanır. Alamar mavisi testi, MTT testine göre pahalı bir yöntemdir (240, 242).

- *Sülforodamin B testi*

Hücre proteinlerinin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanır. Belirlenen protein miktarı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (240, 242).

2.4.2. Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

Çin Hamster fibroblast hücresi (V79)

V79 hücreleri, *Cricetucus griseus* (2n=22) türü erkek Çin hamster akciğerlerinden elde edilen fibroblast hücreleridir. Toksikite, mutajenite ve DNA onarım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.7. ve Şekil 2.6.) (250-252).

İnsan serviks (rahim ağzı) kanseri hücreleri (HeLa)

İnsan kaynaklı kanser hücreleri, ilk kez 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Afrika kökenli "Henrietta Lacks" isimli 31 yaşında servikal adenokarsinomlu bir kadın hastadan alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. Hasta, bu kanserin metastazından aynı yıl ölmüştür, ancak hastaya ait bu hücrelerin ölümsüz olduğu tespit edilmiştir. Bu hücre hatları, hücreleri alınan hastaya ithafen, HeLa hücre serisi olarak adlandırılmıştır. Bu hücre hatları, bu özelliğinin keşfinden sonra standart hücre soyu olarak kullanılmıştır. 1951'den beri birçok araştırma alanında hücre modeli olarak kullanılmıştır ve birçok önemli bilimsel gelişmeler kaydedilmiştir. Günümüzde kanser araştırmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Tablo 2.7. ve Şekil 2.6.) (253, 254).

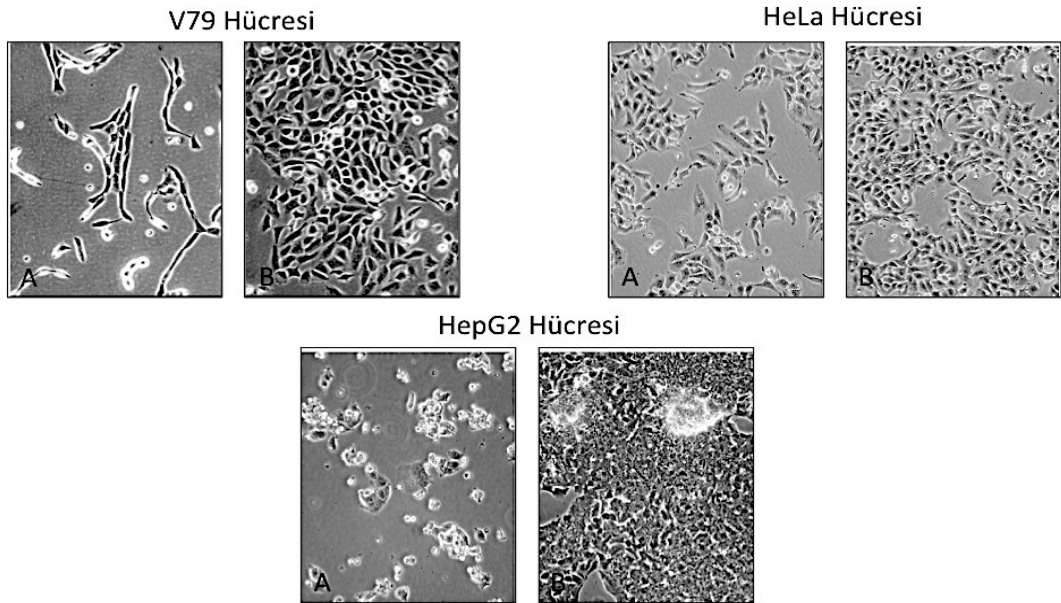
HeLa hücreleri adheran özelliğe sahiptir. Epitel karakterli morfoloji göstermekte olup oldukça hızlı proliferasyon olabilen (yaklaşık 24 saatte yeni bir jenerasyon üretebilen) hücrelerdir. HeLa hücrelerindeki P53 ifadeleri düşük ancak retinoblastoma baskılayıcı gen ifadelerinin normal olduğu belirtilmiştir. Hücre genlerinin human papilloma virus 18 dizileri içerdiği bildirilmiştir (252, 254-256).

İnsan hepatoselüler karsinoma hücreleri (HepG2)

İnsan hepatoselüler karsinoma hücreleri HepG2, 1979 yılında 15 yaşında Amerikalı beyaz ırka sahip bir erkek hastanın hepatoselüler karsinoma hücrelerinden alınarak kültüre edilmiştir. Karaciğer metabolizması, hepatotoksikite, kanser gibi araştırmalarda adheran özelliği ile *in vitro* toksisite çalışmalarında yaygın kullanılmaktadır (Tablo 2.7. ve Şekil 2.6.) (252, 257, 258).

Tablo 2.7. Çalışmada kullanılan hücrelerin özellikleri (252).

	V79	HeLa	HepG2
Elde edildiği organizma	Hamster	İnsan	İnsan
Doku	Akciğer	Serviks	Karaciğer
Yaş/cinsiyet/ırk	Cricetulus griseus (Çin hamster)	31 / Kadın / Siyahi	15 / Erkek / Beyaz
Tümör tipi	-	Adenokarsinom	Hepatoselüler karsinoma
Hücre tipi ve morfolojisi	Fibroblast hücresi	Epitel karakterli	Epitel karakterli
Özelliği	Adheran	Adheran	Adheran
Saklama koşulları	Sıvı nitrojen buharı	Sıvı nitrojen buharı	Sıvı nitrojen buharı

**Şekil 2.6.** V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinin (A) düşük konsantrasyonlarda, (B) yüksek konsantrasyonlarda mikroskopik görünüşleri (252).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinoma) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinoma) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
Kurkumin (\geq % 80)	Sigma
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
Penisilin-Streptomisin	PAA
Piknogenol®	Horphag Research (İsviçre)
RPMI-1640	Sigma
Sisplatin	Koçak Farma®
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
V79 (Çin Hamster Akciğer Fibroblast) Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection
Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Derin Dondurucu (-20 ⁰ C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80 ⁰ C)	Revco
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre kültürü uyumlu flask (25/75 cm ²), 6-/96-kuyucuklu plaka, pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15, 50 mL)	Corning
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar akımlı kabin	Heraeus
Mikrofiltre	Millipore® Merck
Mikropipet, 8 kanallı (5-300 µl)	Eppendorf
Mikropipetler (0.5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml)	Finnpipette, Gilson, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü (1.5ml)	Eppendorf
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
Pipet ucu, 0.5-10, 10-200, 100-1000µl'lik	Eppendorf

Santrifüj	Heraeus, Hettich
Spektrofotometre	SpektraMax M2
Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Vakum Pompası	Welch Vacuum
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler

3.3. Çalışma Çözeltileri

V79 ve HeLa besiyeri

V79 ve HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besiyeri (vasat) için; 500 ml RPMI1640 (L-Glutamin içeren RPMI1640 vasatı) üzerine 50 ml FBS (~%10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (~%1) eklenir. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklanır.

HepG2 besiyeri

HepG2 hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besiyeri için; 500 ml Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (L-Glutamin ve 5mM (1g/l) glukoz içeren DMEM vasatı) üzerine 50 ml FBS (~% 10) ve 5 ml penisilin/streptomisin (~% 1) eklenir. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklanır.

MTT stok çözeltisi (5 mg/ml)

5 mg MTT, 1 ml PBS içinde çözülür. Elde edilen MTT stok çözeltisi Millipore (0.2 µm) filtresi kullanılarak sterilize edilir ve ışıktan uzak tutulur. 4° C’de en fazla 4 gün saklanabilir. Uzun süre saklanacaksa -20°C’de saklanılır.

Sisplatin çözeltisi

10 mg sisplatin (MA: 300.01 g/mol) 20 ml enjektabl preparat içinde (Koçak Farma®) çözünmüş halde ve steril olarak bulunmaktadır. Bu çözelti 1.665 mM sisplatin içerir. 1.665 mM sisplatin çözeltisinden 1201 µl litre alınır ve 2 ml’ye vasat

ile tamamlanarak 1 mM sisplatin çözeltisi hazırlanır.

2 mM Piknogenol® çözeltisi

2.9 mg PYG (MA: 290 g/mol) tartılır, 5 ml vasatta çözülür. 2 mM piknogenol çözeltisi elde edilir. Bu çözelti filtreden (0.22 µM) geçirilerek sterilize edilir. Karanlık ortamda hazırlanır, taze olarak kullanılır.

2 mM Kurkumin çözeltisi

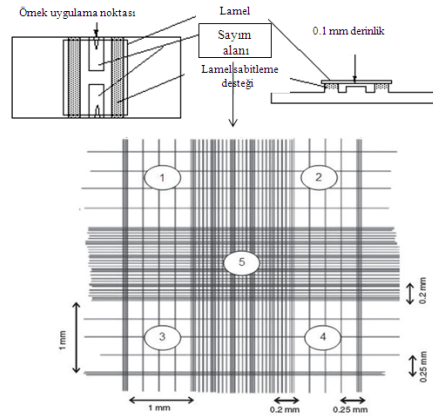
3.7 mg CUR (MA: 368.39 g/mol) tartılır, 25 µl DMSO'da çözülür, 4975 µl vasat ilave edilir. Bu çözelti filtreden (0.22 µM) geçirilerek sterilize edilir. Karanlık ortamda hazırlanır, taze olarak kullanılır.

3.4. Hücrelerin çoğaltılması

1. -80°C'de, %10 DMSO içeren besiyerinde saklanan V79, HeLa ve HepG2 hücreleri, çalışma öncesinde 37°C'ye getirilen su banyosunda 1 dk bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra yapılan her işlem steril şartlarda ve hava akışlı steril kabin ortamında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılacak gereçler %70'lik etanol ile sterilize edildi.
2. Su banyosunda 37°C'ye getirilen besiyeri (9 ml) ile hücreler (1 ml) steril bir tüp içinde süspande edildikten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulandı ve üstteki berrak kısım (süpernatant) atıldı. Bu şekilde hücre ortamı yıkanarak saklama ortamındaki DMSO uzaklaştırıldı.
3. Kalan hücre pelleti, uygun besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²'lik yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
4. Kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde (37°C ± 1°C, % 90 ± % 5 nem, % 5.0 ± 1 CO₂/hava) büyümeleri sağlandı.
5. Çoğalmaya bırakılan hücrelerin besiyeri her 3 günde bir değiştirildi ve besiyerinin, kontaminasyon ve doyumluk durumu mikroskopta kontrol edildi.
 - Hücre sayımı
6. Mikroskopik olarak değerlendirilen hücreler tüm kültür ortamını

kapladıklarında, ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.

7. Hücreler 2 kez 5 ml 37°C'ye getirilmiş PBS ile yıkandı.
8. Hücrelerin üzerine 2-5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5-10 dakikalık tripsin inkübasyonundan sonra hücrelerin yapıştıkları yerden kalkmaları sağlandı. Kalkmayan hücreler için toksik olan tripsin ile uzun süre bekletilemeyeceği için kültür kabının tabanına hafifçe vuruldu. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop altında kontrol edildi.
9. Eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin iki katı kadar besiyeri ortama ilave edilerek hücreler nazikçe süspande edildi. Hücre süspandesi steril bir tüpe aktarılarak 1200 devir/dk hızda 25°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 2 ml besiyeri ile nazikçe süspande edilerek 10 µl'si steril bir ependorf tüpte 90 µl tripan mavisi çözeltisi (% 0.4) ile iyice süspande edildi.
11. Neubauer tipi hücre sayım lamı (hemasitometre) ve bir lamel yardımı ile hücre süspansiyonu kapiler etki ile dolduruldu (Şekil 3.1.).
12. Hücre sayımı; ışık mikroskobu altında hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin iki kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz görüntülü canlı hücreler sayılarak gerçekleştirildi.
13. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:
 A: Yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldıktan sonra toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı elde edilir)
 B: Seyreltme faktörü = 10/1 (Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi karışımı)
 Yaşayan hücre konsantrasyonu (hücre/ml) = A x B x 10⁴
14. Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan (sayılan hücre sayısı x 10⁵ hücre/ml) sonra hücre süspansiyonu besiyeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.



Şekil 3.1. Neubauer hücre sayım lamı.

3.5. Pknogenol ve Kurkuminin Farklı Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksisine Etkilerinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

1. Laminer kabinin ultraviyole ışığı çalışmadan önce ve sonra 20 dakika açık bırakıldı. Çalışma ortamı ve gereçler kullanım öncesi ve sonrası %70'lik etanol ile sterilize edildi. Tüm işlemler steril şartlarda ve hava akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirildi.
2. Madde 3.4'de anlatıldığı üzere uygun besi ortamında çoğaltılan ve sayılan hücreler, çoklu pipet yardımı ile 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 200 µl besiyeri içerisinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin kuyucuklar içinde tutunup çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Tüm hücre hatlarında geniş konsantrasyon aralığında sisplatin, pknogenol ve kurkuminin tek başlarına 24 ve 48 saat maruziyetin sitotoksitesisi incelendi. Sisplatin için 0.49-500 µM; Pknogenol için 1.95-2000 µM; Kurkumin için 1.95-2000 µM konsantrasyon aralıklarında dozları uygulandı.
4. Maddelerin IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra pknogenol ve kurkuminin sisplatin ile kombinasyonlarının sitotoksitesisi araştırıldı.
 - Pknogenolün sisplatin sitotoksitesisine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile uygulanan konsantrasyon aralıkları;
 - V79 hücresinde, 24 saat inkübasyon için; 15 µM sisplatin + 15.6-500 µM pknogenol ve 48 saat için 5 µM sisplatin + 15.6-500 µM

- piknogenol kombinasyonları incelendi.
- HeLa hücrelerinde, 24 saat inkübasyon için; 20 μM sislpatin + 15.6-500 μM piknogenol ve 48 saat için 10 μM sislpatin + 15.6-500 μM piknogenol kombinasyonları incelendi.
 - HepG2 hücrelerinde, 24 saat inkübasyon için; 25 μM sislpatin + 15.6-500 μM piknogenol ve 48 saat için 10 μM sislpatin + 15.6-500 μM piknogenol kombinasyonları incelendi.
- Kurkuminin sislpatin sitotoksitesine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile uygulanan konsantrasyon aralıkları;
- V79 hücrelerinde, 24 saat inkübasyon için; 15 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin ve 48 saat için 5 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin kombinasyonları incelendi.
 - HeLa hücrelerinde, 24 saat inkübasyon için; 20 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin ve 48 saat için 10 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin kombinasyonları incelendi.
 - HepG2 hücrelerinde, 24 saat inkübasyon için; 25 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin ve 48 saat için 10 μM sislpatin + 15.6-500 μM kurkumin kombinasyonları incelendi.
5. Negatif kontrol olarak, sislpatin ve piknogenol için hücre besiyeri uygulandı. Kurkumin için %0.5 DMSO içeren besiyeri uygulandı.
 6. İnkübasyon sonunda hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı.
 7. İnkübasyon sonunda (24 ve 48. saatlerde) madde çözeltileri atıldı. Her bir kuyucuğa 90 μl besi ortamı ve hazırlanan 5 mg/ ml MTT çözeltisinden 10'ar μl ilave edilerek (0.5 mg/ml MTT ortamında) 4 saat inkübe edildi.
 8. İnkübasyon sonrasında kristal oluşumu mikroskopik olarak gözlemlendi.
 9. MTT çözeltisi dikkatli bir şekilde atıldı.
 10. Kuyucuklara 200 μl PBS çözeltisi ile ilave edilerek yıkama yapıldı.
 11. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 100 μl çözme solüsyonu (DMSO) eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 5 dakika süreyle çalkalandı.
 12. Multiplak okuyucu spektrofotometrede örneklerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

13. Çalışma farklı zamanlarda dört kez tekrarlandı ve sonuçlar dört çalışmanın ortalaması olarak hesaplandı.
14. Işığa duyarlı bir yöntem olduğundan dolayı deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta gerçekleştirildi.
15. Her bir madde konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin, kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı elde edildi.
% Hücre canlılığı = $(A_{\text{ö}}/A_{\text{k}}) \times 100$ ($A_{\text{ö}}$: Örneğin absorbansı; A_{k} : Kontrol grubunun absorbansı)
16. Konsantrasyona karşı gelen hücre canlılığı her madde için grafiğe geçirildi. Grafikten elde edilen denkleme göre hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalaması \pm SS (standart sapma) olarak verilmiştir. Kontroller ve madde grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar “SPSS 10.5 for Windows” paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle yapıldı. Grup farklılıkları tek yönlü varyans alanizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi. $p < 0.05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Pknogenol Sitotoksisitesinin Belirlenmesi

4.1.1.Pknogenolün V79 Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Belirlenmesi

Pknogenolün V79 hücrelerinde 1.95-2000 µM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.1., 4.2. ve Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3' de verilmiştir.

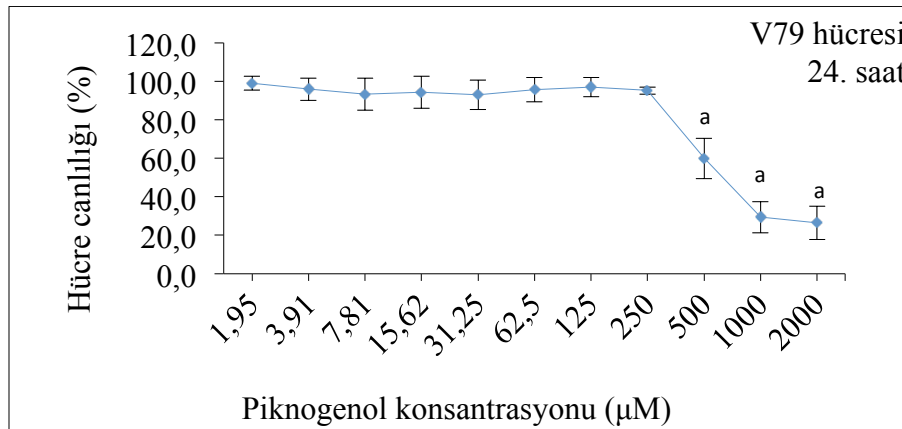
24 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında pknogenolün 1.95-250 µM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 500µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). V79 hücrelerinde pknogenole ait IC₅₀ değeri 24 saatlik maruziyette 670 µM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında pknogenolün 1.95-62.5 µM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 125 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). V79 hücrelerinde pknogenole ait IC₅₀ değeri 48 saatlik maruziyette 119 µM bulunmuştur.

Tablo 4.1. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	95.5	101.5	102.8	96.4	99.1±3.6
3	3.91 µM PYC	88.3	99.3	94.6	101.3	95.9±5.8
4	7.81 µM PYC	83.6	102.9	89.9	96.7	93.3±8.4
5	15.63 µM PYC	82.6	97.8	94.4	102.4	94.3±8.4
6	31.25 µM PYC	82.9	93.2	93.6	101.6	92.8±7.7
7	62.5 µM PYC	88.9	102.2	91.5	99.6	95.5±6.4
8	125 µM PYC	91.5	97.0	95.4	103.7	96.9±5.1
9	250 µM PYC	93.8	97.9	94.0	95.0	95.2±1.9
10	500 µM PYC	59.7	46.5	61.3	72.3	60.0±10.5 ^a
11	1000 µM PYC	29.3	18.6	31.4	38.2	29.4±8.1 ^a
12	2000 µM PYC	27.1	14.4	29.6	34.6	26.4±8.6 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

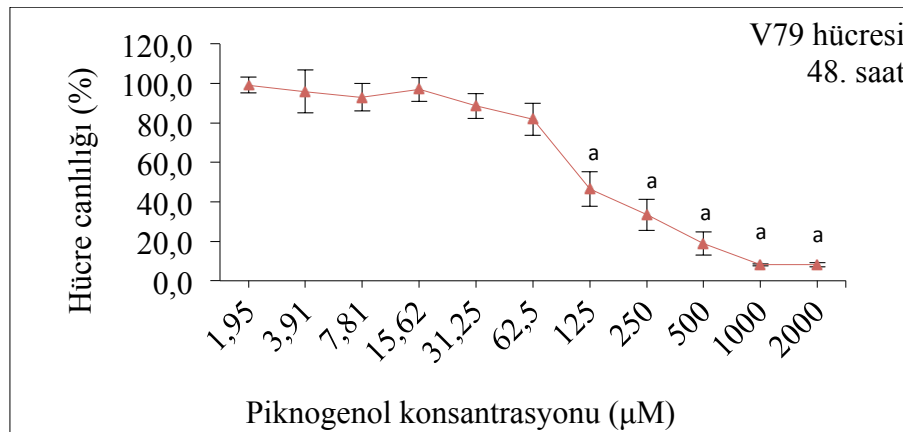
**Şekil 4.1.** V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi*

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

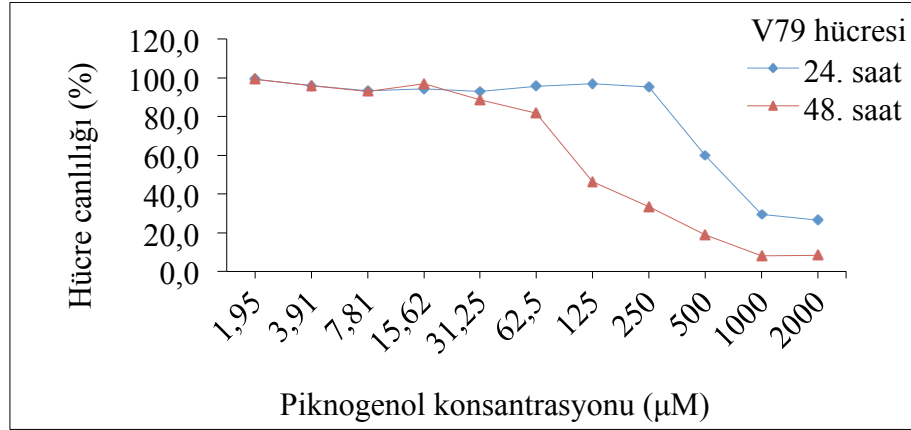
Tablo 4.2. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	104.9	97.8	95.7	98.2	99.2±4
3	3.91 µM PYC	87.7	106.4	85.4	103.9	95.8±10.8
4	7.81 µM PYC	93.4	102.9	87.6	88.1	93.0±7.1
5	15.63 µM PYC	101.6	102.3	89.5	94.5	97.0±6.1
6	31.25 µM PYC	91.4	92.4	79.1	91.5	88.6±6.3
7	62.5 µM PYC	82.9	83.1	70.8	90.4	81.8±8.1
8	125 µM PYC	49.4	45.2	35.2	55.8	46.4±8.7 ^a
9	250 µM PYC	38.6	31.7	23.0	40.5	33.5±7.9 ^a
10	500 µM PYC	21.1	15.6	12.7	25.8	18.8±5.8 ^a
11	1000 µM PYC	8.8	8.0	7.6	7.9	8.1±0.5 ^a
12	2000 µM PYC	9.8	7.4	7.6	8.0	8.2±1.1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.2.** V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.3. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.1.2. Piknogenolün HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Piknogenolün, HeLa hücrelerinde 1.95-2000 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.3., 4.4. ve Şekil 4.4., 4.5. ve 4.6' da verilmiştir.

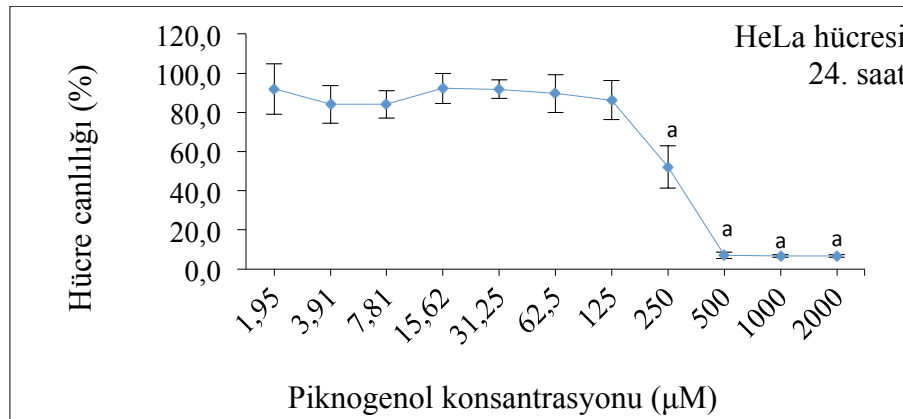
24 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında piknogenolün 1.95-125 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 250 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). HeLa hücrelerinde piknogenole ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 261 μ M bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında piknogenolün 1.95-125 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 250 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). HeLa hücrelerinde piknogenole ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 213 μ M bulunmuştur.

Tablo 4.3. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	109.9	81.7	83.5	92.5	91.9±12.9
3	3.91 µM PYC	95.8	83.5	72.3	84.8	84.1±9.6
4	7.81 µM PYC	78.8	94.2	81.1	82.0	84.0±6.9
5	15.63 µM PYC	86.3	102.6	86.7	93.1	92.2±7.6
6	31.25 µM PYC	93.5	97.6	88.2	87.9	91.8±4.7
7	62.5 µM PYC	100.7	92.4	77.6	87.7	89.6±9.7
8	125 µM PYC	97.6	86.9	87.3	73.2	86.2±10
9	250 µM PYC	66.2	54.9	42.8	44.7	52.2±10.8 ^a
10	500 µM PYC	9.3	6.5	5.8	6.5	7.0±1.6 ^a
11	1000 µM PYC	7.6	6.2	6.3	6.3	6.6±0.7 ^a
12	2000 µM PYC	6.5	4.9	5.0	6.2	5.7±0.8 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

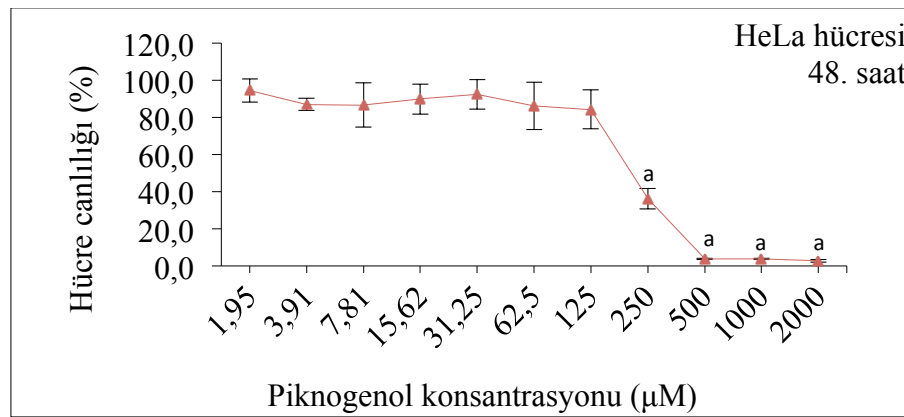
**Şekil 4.4.** HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

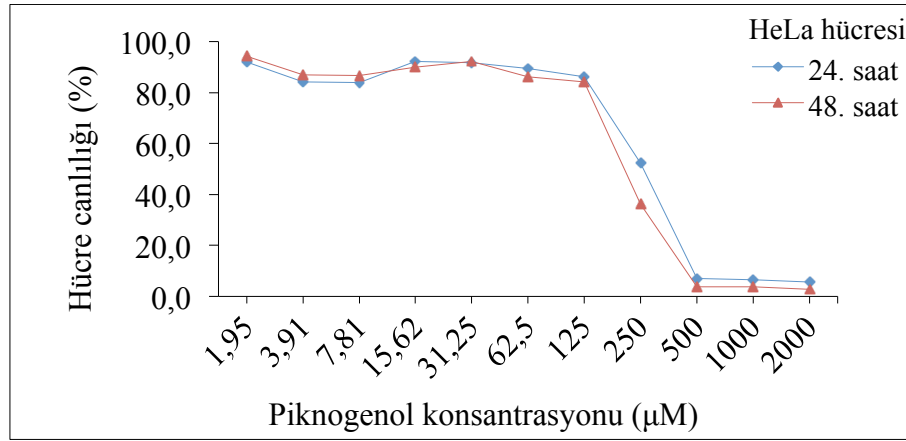
Tablo 4.4. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	94.4	94.1	102.1	86.9	94.4±6.2
3	3.91 µM PYC	89.6	82.2	88.2	88.1	87.0±3.3
4	7.81 µM PYC	102.0	88.3	82.8	73.6	86.6±11.9
5	15.63 µM PYC	100.9	89.7	87.7	81.3	89.9±8.2
6	31.25 µM PYC	103.0	92.2	84.2	89.8	92.3±7.9
7	62.5 µM PYC	103.1	88.6	79.9	73.1	86.2±12.9
8	125 µM PYC	85.2	79.4	98.3	74.1	84.3±10.4
9	250 µM PYC	39.1	42.1	33.1	30.1	36.1±5.5 ^a
10	500 µM PYC	3.9	3.5	4.1	3.5	3.8±0.3 ^a
11	1000 µM PYC	4.2	3.5	3.6	3.3	3.7±0.4 ^a
12	2000 µM PYC	3.8	2.4	2.5	2.4	2.8±0.7 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.5.** HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.6. HeLa hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.1.3. Piknogenolün HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Piknogenolün HepG2 hücrelerinde 1.95-2000 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.5. ve 4.6. ve Şekil 4.7., 4.8., 4.9’da verilmiştir.

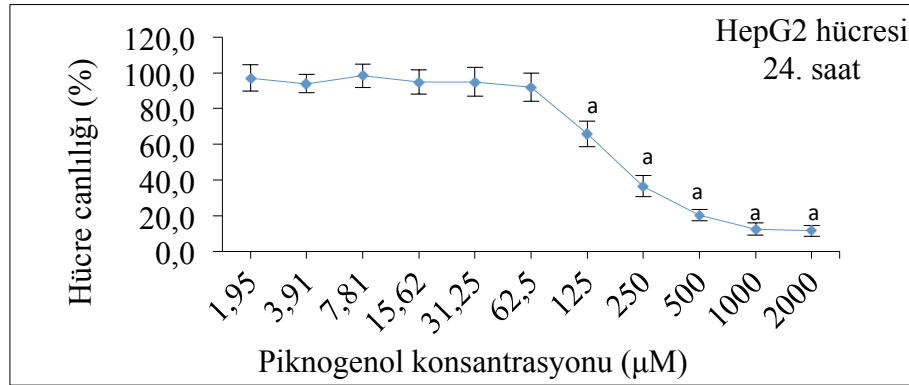
24 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında piknogenolün 1.95-62.5 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 125 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde piknogenole ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 192 μM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında piknogenolün 1.95-15.6 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 31.25 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde piknogenole ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 51.5 μM bulunmuştur.

Tablo 4.5. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	107.6	93.6	90.6	96.7	97.1±7.4
3	3.91 µM PYC	91.5	95.4	100.3	88.6	94.0±5.1
4	7.81 µM PYC	95.5	105.5	101.9	90.7	98.4±6.6
5	15.63 µM PYC	101.7	100.0	89.5	88.7	95.0±6.8
6	31.25 µM PYC	107.0	93.4	90.5	89.2	95.0±8.2
7	62.5 µM PYC	98.7	91.1	81.2	96.9	92.0±7.9
8	125 µM PYC	68.2	59.0	61.2	75.0	65.8±7.2 ^a
9	250 µM PYC	32.6	45.4	34.1	34.2	36.6±5.9 ^a
10	500 µM PYC	23.2	18.5	16.9	22.7	20.3±3.1 ^a
11	1000 µM PYC	15.1	11.9	8.0	15.3	12.6±3.4 ^a
12	2000 µM PYC	13.5	10.3	7.9	14.7	11.6±3.1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

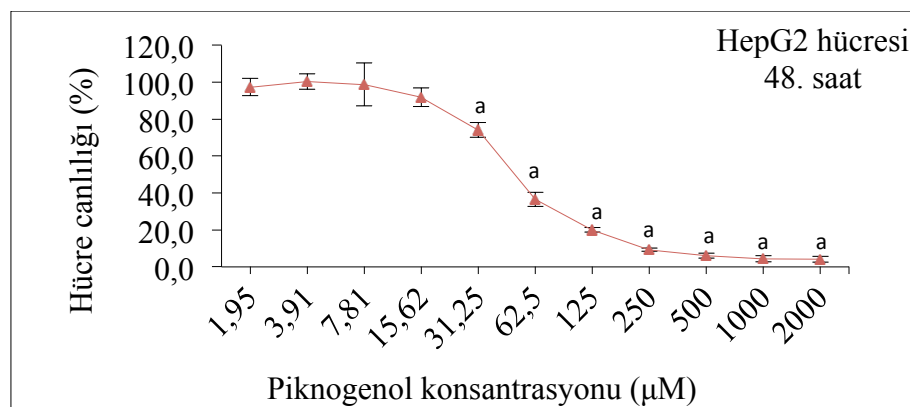
**Şekil 4.7.** HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

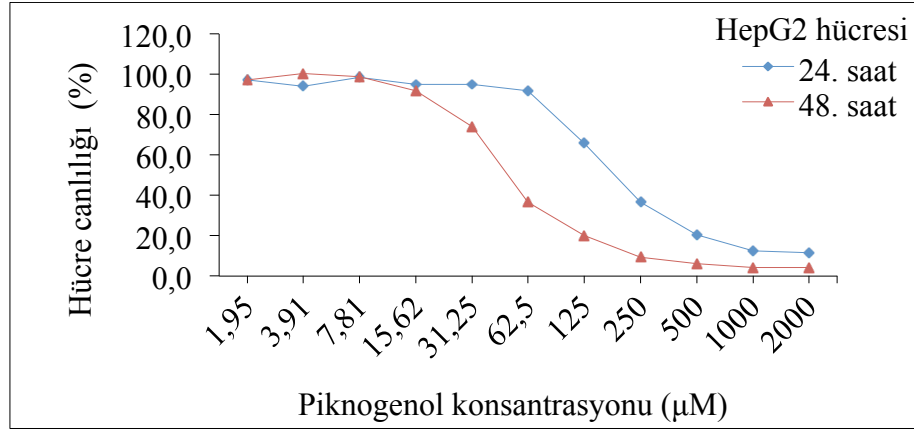
Tablo 4.6. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM PYC	103.0	98.3	91.6	96.6	97.4±4.7
3	3.91 µM PYC	99.6	98.0	106.6	97.5	100.4±4.2
4	7.81 µM PYC	101.2	89.6	114.2	90.1	98.8±11.6
5	15.63 µM PYC	92.5	84.7	96.9	93.4	91.9±5.1
6	31.25 µM PYC	76.3	73.1	68.9	78.3	74.2±4.1 ^a
7	62.5 µM PYC	30.8	38.4	38.7	38.3	36.5±3.8 ^a
8	125 µM PYC	18.8	19.4	20.3	21.6	20.0±1.2 ^a
9	250 µM PYC	8.0	9.9	9.7	9.6	9.3±0.9 ^a
10	500 µM PYC	4.4	7.2	5.8	6.8	6.0±1.3 ^a
11	1000 µM PYC	4.9	2.8	6.3	3.3	4.3±1.6 ^a
12	2000 µM PYC	3.9	3.0	6.5	3.2	4.2±1.6 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.8.** HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.9. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2. Kurkuminin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

4.2.1. Kurkuminin V79 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Kurkuminin V79 hücrelerinde 1.95-2000 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.7. ve 4.8 ve Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12' de verilmiştir.

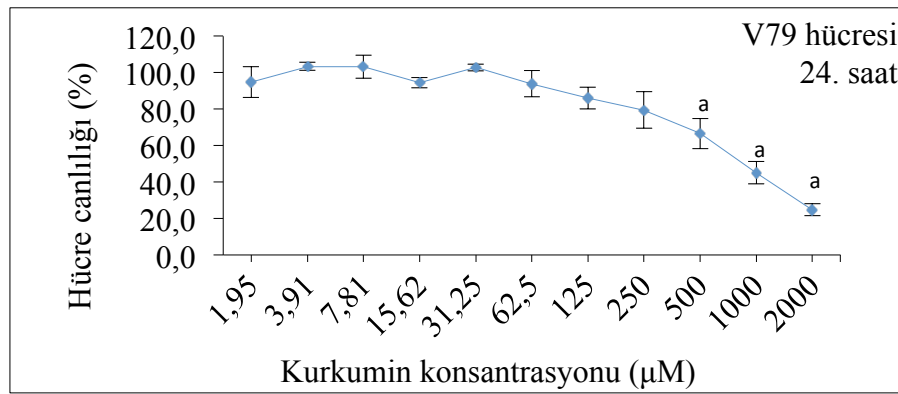
24 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-250 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 500 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). V79 hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 877 μ M bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-62.5 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 125 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$). V79 hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 119 μ M bulunmuştur.

Tablo 4.7. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	95.8	97.3	82.9	102.8	94.7±8.4
3	3.91 µM CUR	103.1	102.8	101.4	106.4	103.5±2.1
4	7.81 µM CUR	100.3	96.7	104.8	111.6	103.4±6.4
5	15.63 µM CUR	97.7	95.2	90.7	94.7	94.6±2.9
6	31.25 µM CUR	101.7	102.0	101.9	105.4	102.8±1.8
7	62.5 µM CUR	92.0	89.3	89.7	104.7	94.0±7.3
8	125 µM CUR	91.1	90.8	83.2	79.0	86.0±6
9	250 µM CUR	74.2	74.9	74.5	94.6	79.5±10
10	500 µM CUR	65.4	55.3	71.9	73.8	66.6±8.4 ^a
11	1000 µM CUR	43.4	41.7	41.0	54.1	45.0±6.1 ^a
12	2000 µM CUR	28.4	23.6	26.1	20.9	24.8±3.2 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

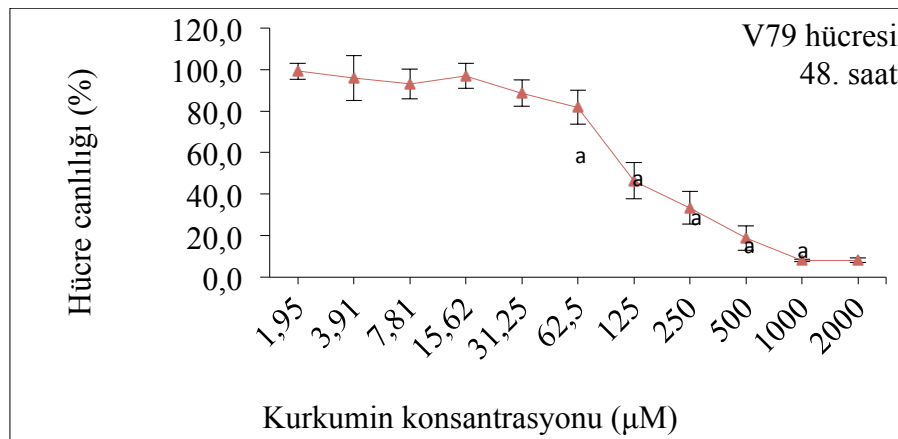
**Şekil 4.10.** V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

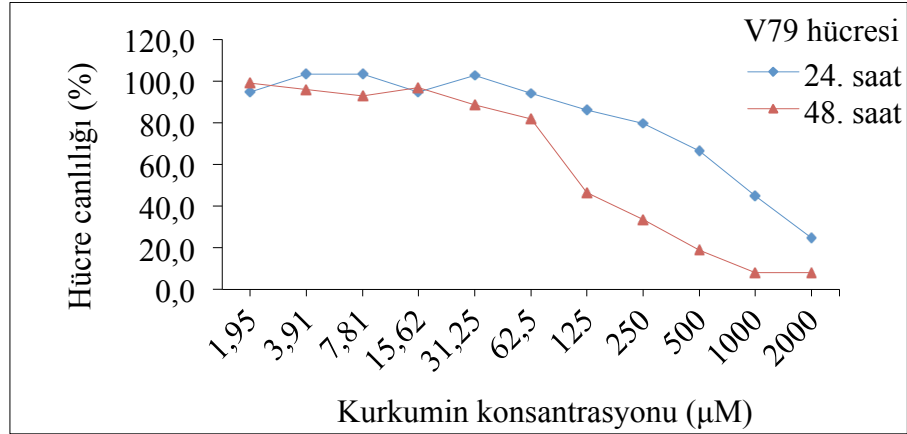
Tablo 4.8. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	104.9	97.8	95.7	98.2	99.2±4
3	3.91 µM CUR	87.7	106.4	85.4	103.9	95.8±10.8
4	7.81 µM CUR	93.4	102.9	87.6	88.1	93.0±7.1
5	15.63 µM CUR	101.6	102.3	89.5	94.5	97.0±6.1
6	31.25 µM CUR	91.4	92.4	79.1	91.5	88.6±6.3
7	62.5 µM CUR	82.9	83.1	70.8	90.4	81.8±8.1
8	125 µM CUR	49.4	45.2	35.2	55.8	46.4±8.7 ^a
9	250 µM CUR	38.6	31.7	23.0	40.5	33.5±7.9 ^a
10	500 µM CUR	21.1	15.6	12.7	25.8	18.8±5.8 ^a
11	1000 µM CUR	8.8	8.0	7.6	7.9	8.1±0.5 ^a
12	2000 µM CUR	9.8	7.4	7.6	8.0	8.2±1.1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.11.** V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.12. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Kurkuminin HeLa hücrelerinde 1.95-2000 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.9, 4.10 ve Şekil 4.13., 4.14. ve 4.15.'de verilmiştir.

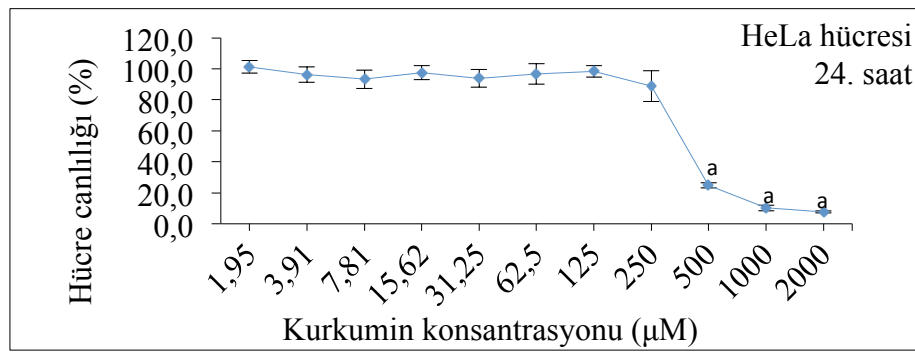
24 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-250 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 500 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HeLa hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 404 μ M bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-125 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 250 μ M konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HeLa hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 320 μ M bulunmuştur.

Tablo. 4.9. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	99.1	107.2	99.5	99.3	101.3±4
3	3.91 µM CUR	92.8	100.9	100.1	91.3	96.3±4.9
4	7.81 µM CUR	98.1	96.8	93.5	84.9	93.3±6
5	15.63 µM CUR	93.4	95.3	103.6	97.7	97.5±4.4
6	31.25 µM CUR	91.4	101.0	95.0	87.9	93.8±5.6
7	62.5 µM CUR	100.0	103.5	88.6	94.5	96.7±6.5
8	125 µM CUR	95.1	100.9	95.4	102.4	98.5±3.7
9	250 µM CUR	83.4	94.3	99.5	77.9	88.8±9.9
10	500 µM CUR	25.6	26.5	23.6	23.2	24.7±1.6 ^a
11	1000 µM CUR	12.5	10.4	8.1	9.7	10.2±1.8 ^a
12	2000 µM CUR	7.5	7.1	7.3	8.7	7.6±0.7 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

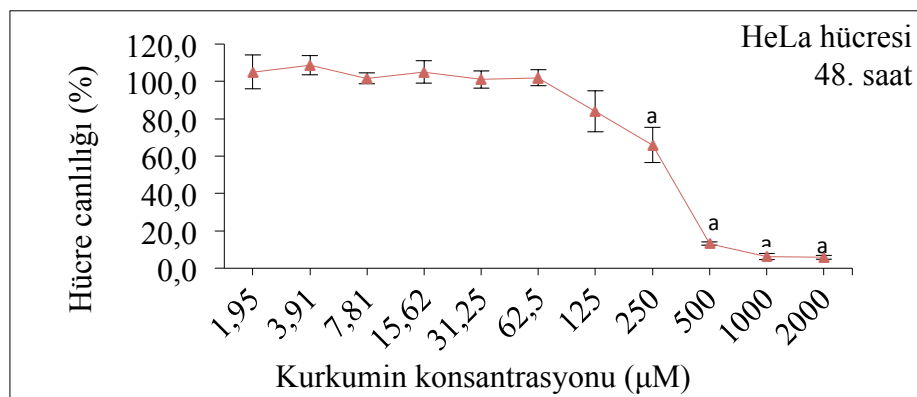
**Şekil 4.13.** HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

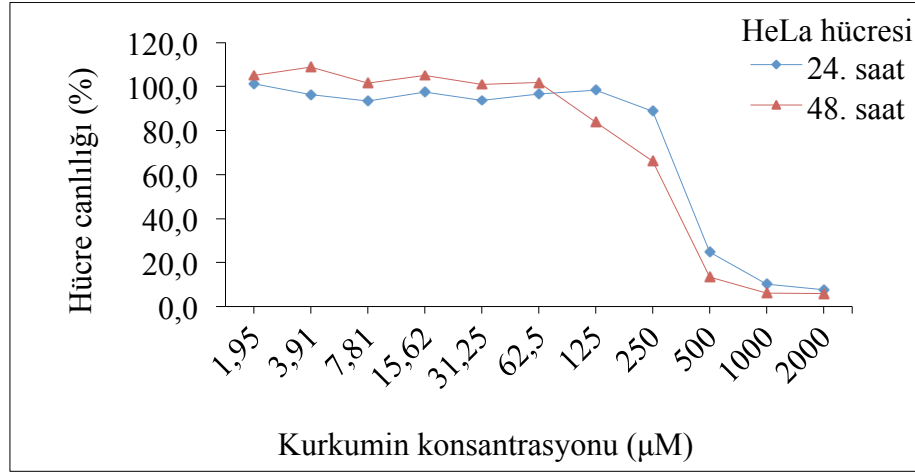
Tablo 4.10. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	97.8	112.7	113.0	96.8	105.1±9
3	3.91 µM CUR	112.3	106.2	113.9	102.7	108.8±5.2
4	7.81 µM CUR	102.3	105.4	98.8	99.9	101.6±2.9
5	15.63 µM CUR	105.3	113.3	101.0	100.5	105.0±5.9
6	31.25 µM CUR	98.8	101.5	107.2	96.6	101.0±4.6
7	62.5 µM CUR	107.5	103.0	98.9	98.3	101.9±4.3
8	125 µM CUR	99.5	74.0	79.5	82.8	83.9±11
9	250 µM CUR	79.1	61.3	66.5	57.1	66.0±9.5 ^a
10	500 µM CUR	13.4	14.4	13.2	12.0	13.2±1 ^a
11	1000 µM CUR	8.2	4.5	6.7	5.5	6.2±1.6 ^a
12	2000 µM CUR	5.3	6.8	6.8	4.7	5.9±1.1 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.14.** HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.15. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.2.3. Kurkuminin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Kurkuminin HepG2 hücrelerinde 1.95-2000 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.11., 4.12. ve Şekil 4.16., 4.17. ve 4.18’de verilmiştir.

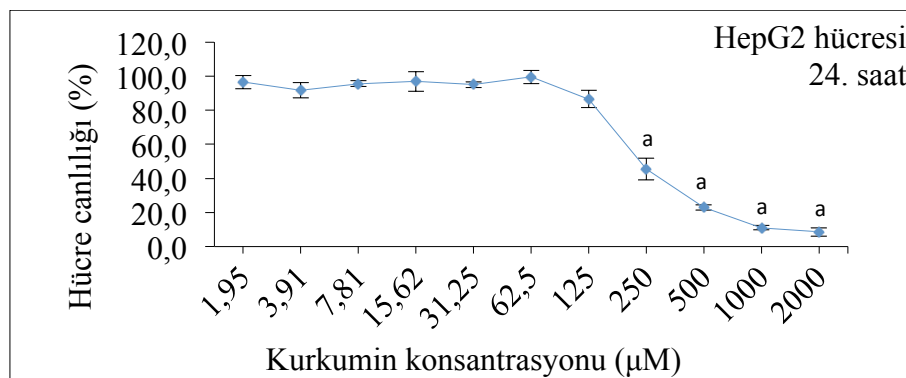
24 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-125 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 250 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 236 μM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında kurkuminin 1.95-31.25 μM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 62.5 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde kurkumine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 98.3 μM bulunmuştur.

Tablo 4.11. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	96.7	92.8	101.8	94.6	96.5±3.9
3	3.91 µM CUR	94.4	88.7	87.3	96.8	91.8±4.5
4	7.81 µM CUR	94.0	98.0	94.8	95.6	95.6±1.8
5	15.63 µM CUR	92.0	91.8	102.5	100.8	96.8±5.7
6	31.25 µM CUR	93.9	96.2	93.2	96.4	94.9±1.6
7	62.5 µM CUR	94.3	98.9	103.0	101.7	99.5±3.8
8	125 µM CUR	86.1	88.0	92.4	79.9	86.6±5.2
9	250 µM CUR	51.6	50.7	39.2	40.7	45.6±6.5 ^a
10	500 µM CUR	22.9	24.7	22.9	20.9	22.8±1.6 ^a
11	1000 µM CUR	10.8	12.8	10.2	10.4	11.1±1.2 ^a
12	2000 µM CUR	10.8	7.7	5.5	10.4	8.6±2.5 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

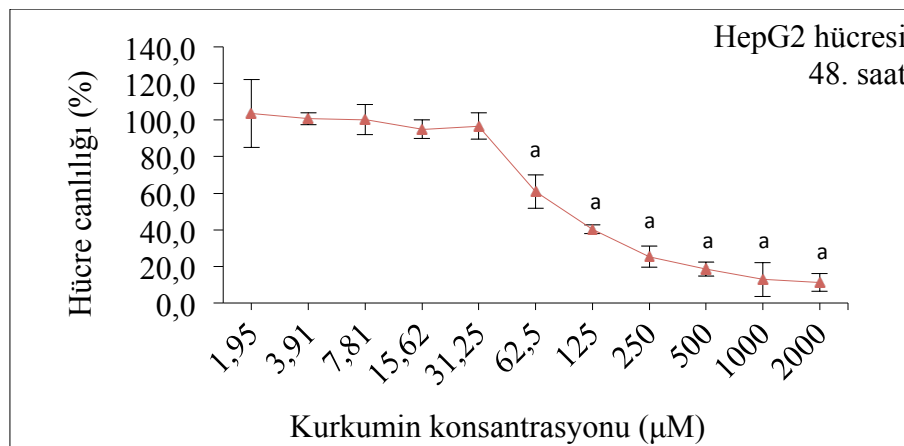
**Şekil 4.16.** HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

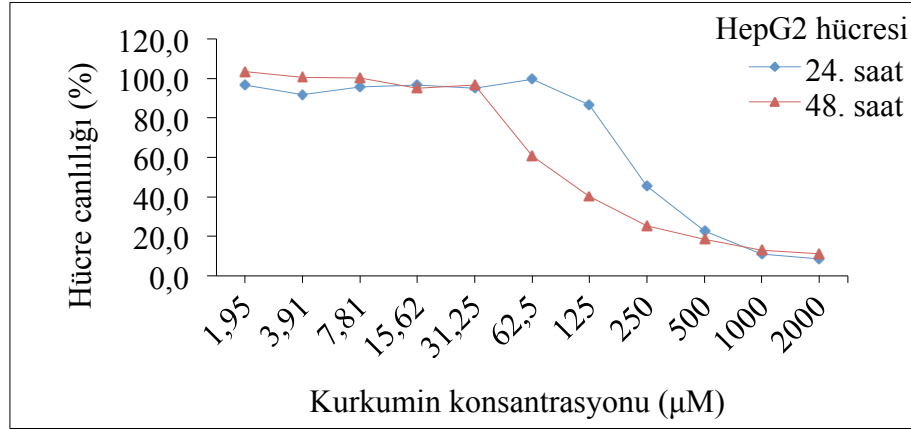
Tablo 4.12. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deneş	II. Deneş	III. Deneş	IV. Deneş	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	1.95 µM CUR	88.3	101.6	94.0	130.2	103.5±18.6
3	3.91 µM CUR	96.3	102.6	103.5	100.2	100.7±3.2
4	7.81 µM CUR	92.0	106.7	94.1	108.1	100.2±8.4
5	15.63 µM CUR	88.5	100.1	93.4	97.9	94.9±5.1
6	31.25 µM CUR	92.0	106.8	91.3	96.3	96.6±7.2
7	62.5 µM CUR	70.4	66.1	50.2	56.5	60.8±9.2 ^a
8	125 µM CUR	40.1	40.7	37.2	42.8	40.2±2.3 ^a
9	250 µM CUR	19.2	22.6	32.7	26.7	25.3±5.8 ^a
10	500 µM CUR	14.9	17.3	23.7	18.2	18.5±3.7 ^a
11	1000 µM CUR	7.5	7.2	10.2	26.7	12.9±9.3 ^a
12	2000 µM CUR	7.8	8.5	10.3	18.2	11.2±4.8 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^ap<0.05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**şekil 4.17.** HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^ap<0.05. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.18. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.3. Sisplatin Sitotoksitesitesinin Belirlenmesi

4.3.1. Sisplatinin V79 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

V79 hücrelerinde sisplatinin, 0.49-500 µM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.13. 4.14. ve Şekil 4.19., 4.20. ve 4.21.'de verilmiştir.

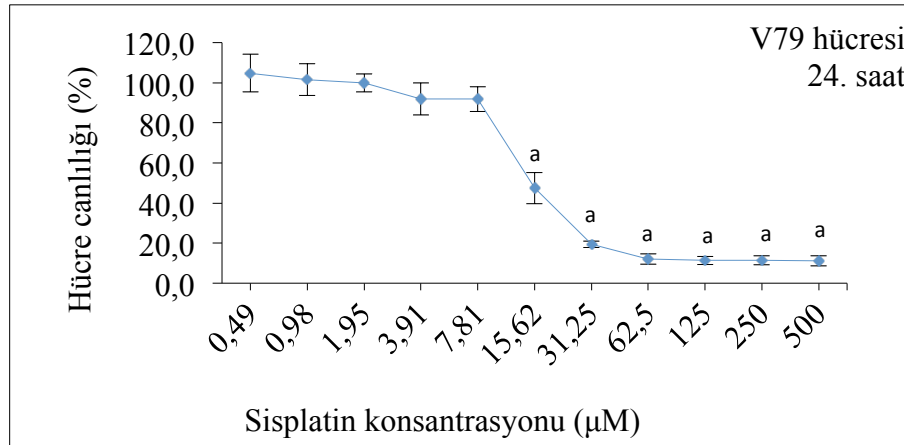
24 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 0.49-7.81 µM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 15.2-500 µM konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). V79 hücrelerinde sisplatinine ait IC_{50} (hücre canlılığını %50 azaltan düzey) değeri 24 saatlik maruziyette 15.4 µM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, V79 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 3.91-500 µM konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). V79 hücrelerinde sisplatinine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 4.9 µM bulunmuştur.

Tablo 4.13. V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	101.6	98.9	99.8	118.7	104.8±9.4
3	0.98 µM CIS	100.4	99.2	94.0	112.7	101.6±7.9
4	1.95 µM CIS	98.7	98.9	95.4	106.1	99.8±4.5
5	3.91 µM CIS	80.2	94.6	98.7	94.0	91.9±8.1
6	7.81 µM CIS	84.6	91.9	91.2	99.8	91.9±6.2
7	15.62 µM CIS	45.2	45.6	40.4	58.7	47.5±7.8 ^a
8	31.25 µM CIS	17.3	21.1	19.3	19.9	19.4±1.6 ^a
9	62.5 µM CIS	11.1	11.5	15.9	10.0	12.1±2.6 ^a
10	125 µM CIS	11.1	11.5	13.9	8.9	11.3±2.0 ^a
11	250 µM CIS	10.8	11.4	14.6	9.0	11.4±2.3 ^a
12	500 µM CIS	10.4	11.4	14.4	8.4	11.2±2.5 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

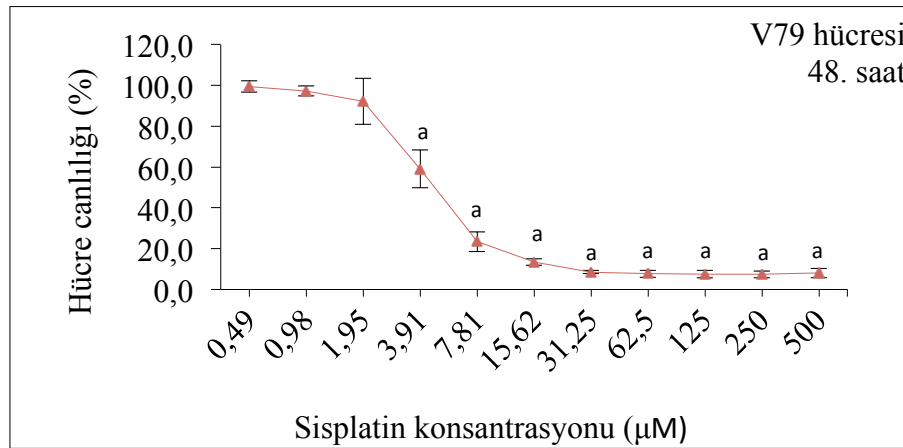
**Şekil 4.19.** V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

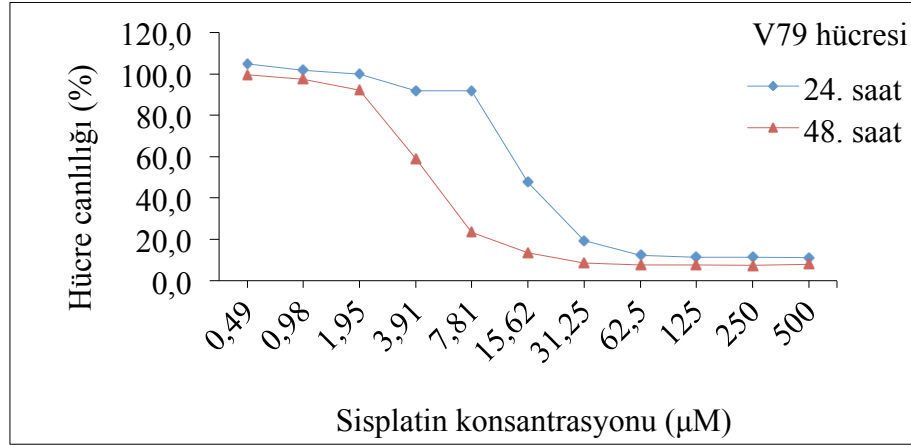
Tablo 4.14. V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	98.3	97.9	98.0	103.5	99.4±2.7
3	0.98 µM CIS	94.9	97.2	96.5	100.8	97.3±2.5
4	1.95 µM CIS	83.1	82.1	104.2	99.1	92.1±11.2
5	3.91 µM CIS	50.2	52.8	62.7	70.2	59.0±9.2 ^a
6	7.81 µM CIS	17.7	29.3	23.8	22.7	23.4±4.8 ^a
7	15.62 µM CIS	13.7	14.4	14.4	11.2	13.4±1.5 ^a
8	31.25 µM CIS	8.3	8.7	9.4	7.8	8.6±0.7 ^a
9	62.5 µM CIS	8.9	5.4	9.2	7.3	7.7±1.7 ^a
10	125 µM CIS	8.1	5.1	9.4	7.5	7.5±1.8 ^a
11	250 µM CIS	8.3	5.2	9.1	7.1	7.4±1.7 ^a
12	500 µM CIS	9.4	4.9	10.0	7.8	8.0±2.3 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.20.** V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.21. V79 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.3.2. Sisplatinin HeLa Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Sisplatinin, HeLa hücrelerinde 0.49-500 µM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.15., 4.16 ve Şekil'de 4.22., 4.23., 4.24.'de verilmiştir.

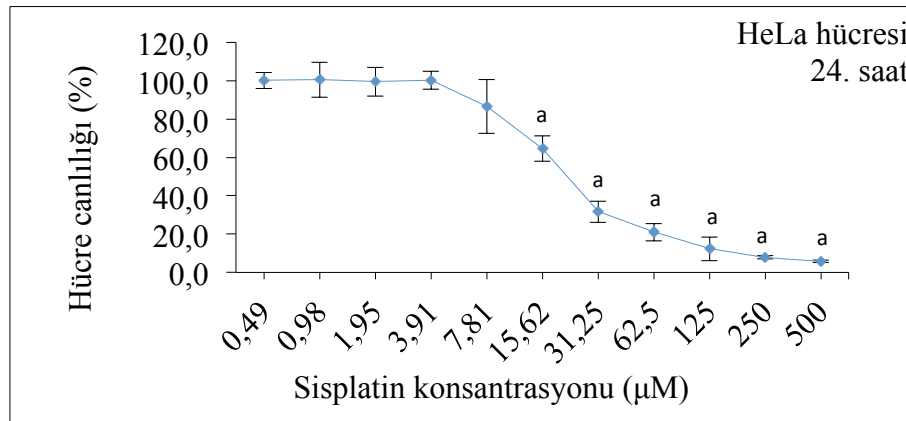
24 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 0.49-7.81 µM konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 15.2-500 µM konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HeLa hücrelerinde sisplatinine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 22.4 µM bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HeLa hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 7.81-500 µM konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HeLa hücrelerinde sisplatinine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 12.3 µM bulunmuştur.

Tablo 4.15. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	99.0	106.2	98.8	96.5	100.1±4.2
3	0.98 µM CIS	95.5	113.0	92.5	100.7	100.4±9.1
4	1.95 µM CIS	100.0	106.9	89.1	102.0	99.5±7.5
5	3.91 µM CIS	93.9	103.8	103.7	99.3	100.1±4.6
6	7.81 µM CIS	75.6	95.8	73.4	101.0	86.5±14
7	15.62 µM CIS	59.4	62.0	62.8	74.4	64.7±6.6 ^a
8	31.25 µM CIS	26.9	36.0	26.7	37.1	31.6±5.6 ^a
9	62.5 µM CIS	15.8	21.2	20.0	26.8	21.0±4.5 ^a
10	125 µM CIS	7.7	9.7	10.4	21.3	12.3±6.1 ^a
11	250 µM CIS	6.7	8.6	8.1	7.8	7.8±0.8 ^a
12	500 µM CIS	5.5	6.6	5.2	5.8	5.8±0.6 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

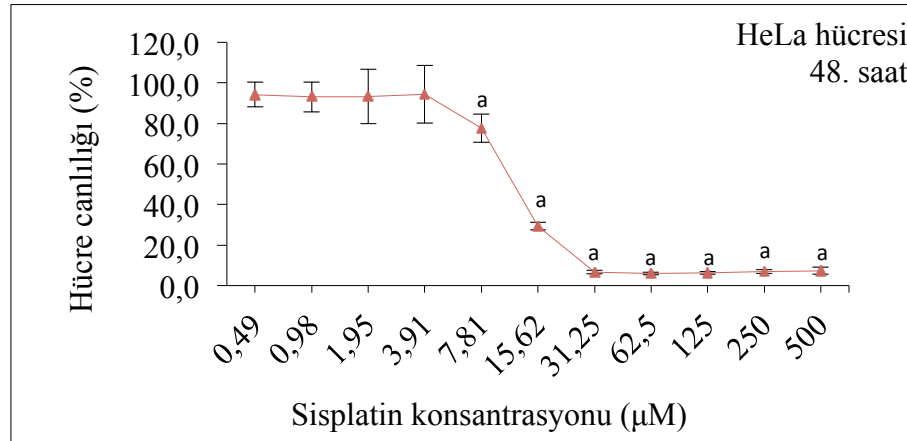
**Şekil 4.22.** HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

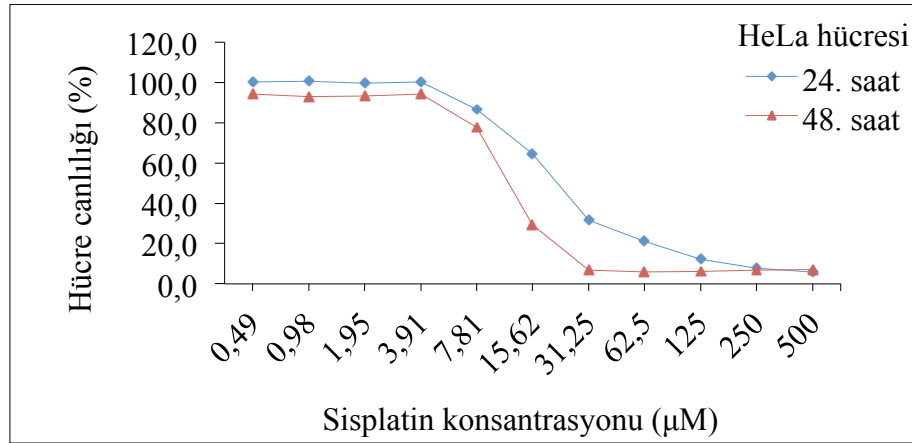
Tablo 4.16. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	102.0	95.0	92.1	87.6	94.2±6
3	0.98 µM CIS	96.6	95.4	82.1	97.9	93.0±7.4
4	1.95 µM CIS	104.2	87.3	76.9	104.5	93.2±13.5
5	3.91 µM CIS	107.8	83.3	81.0	105.2	94.3±14.2
6	7.81 µM CIS	83.7	70.1	73.2	83.5	77.6±7 ^a
7	15.62 µM CIS	30.2	28.6	31.7	27.1	29.4±2 ^a
8	31.25 µM CIS	7.6	6.8	5.5	7.0	6.7±0.9 ^a
9	62.5 µM CIS	6.3	5.5	5.2	6.7	5.9±0.7 ^a
10	125 µM CIS	6.5	6.0	5.5	7.1	6.3±0.7 ^a
11	250 µM CIS	7.3	6.6	5.8	7.9	6.9±0.9 ^a
12	500 µM CIS	6.5	9.7	5.7	7.2	7.3±1.7 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.23.** HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.24. HeLa hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ³ $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

4.3.3. Sisplatinin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Sisplatinin, HepG2 hücrelerinde 0.49-500 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Tablo 4.17., 4.18. ve Şekil 4.25, 4.26., 4.27'de verilmiştir.

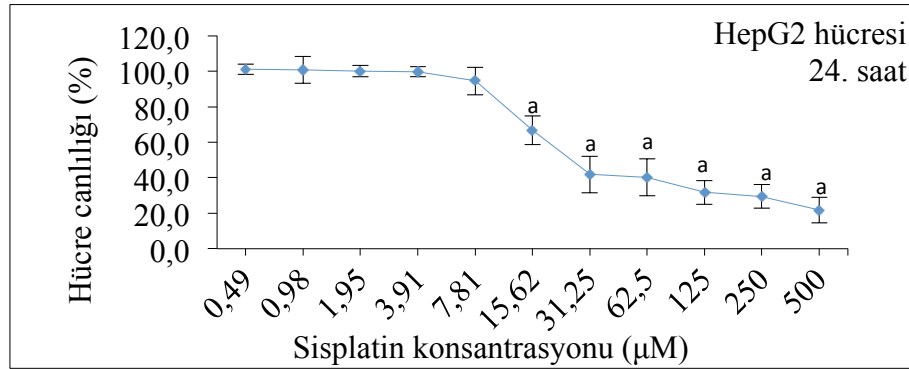
24 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 0.49-7.81 μ M konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı, ancak 15.62-500 μ M konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde sisplatine ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 25.5 μ M bulunmuştur.

48 saatlik inkübasyon için, HepG2 hücrelerinde negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin 7.81-500 μ M konsantrasyon aralığında doz bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p < 0.05$). HepG2 hücrelerinde sisplatine ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 7.7 μ M bulunmuştur.

Tablo 4.17. HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	103.5	99.7	103.3	97.5	101.0±2.9
3	0.98 µM CIS	95.0	107.8	106.9	93.5	100.8±7.6
4	1.95 µM CIS	100.4	102.2	102.4	95.5	100.1±3.2
5	3.91 µM CIS	96.6	99.2	103.4	99.7	99.7±2.8
6	7.81 µM CIS	99.4	102.2	90.7	85.4	94.4±7.8
7	15.62 µM CIS	67.1	70.3	74.0	55.4	66.7±8 ^a
8	31.25 µM CIS	42.5	39.7	55.1	30.0	41.8±10.3 ^a
9	62.5 µM CIS	41.6	34.6	54.3	30.5	40.2±10.4 ^a
10	125 µM CIS	31.5	27.1	41.2	27.0	31.7±6.7 ^a
11	250 µM CIS	32.4	24.8	37.3	23.3	29.5±6.6 ^a
12	500 µM CIS	26.5	16.3	29.5	15.0	21.8±7.3 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

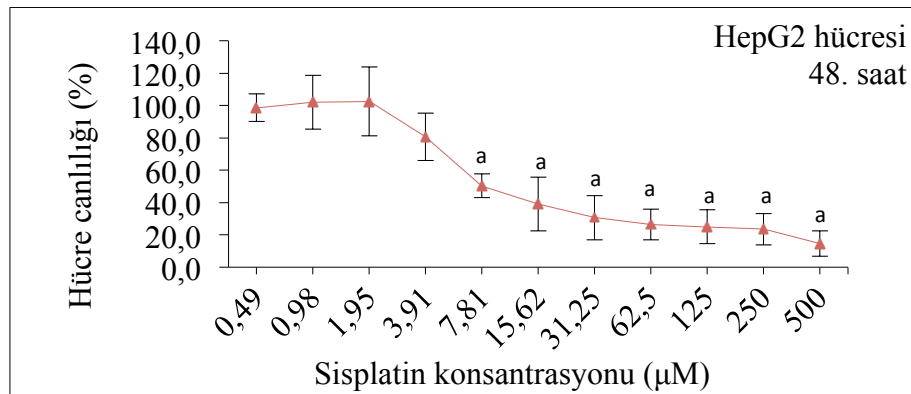
**Şekil 4.25.** HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 24 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

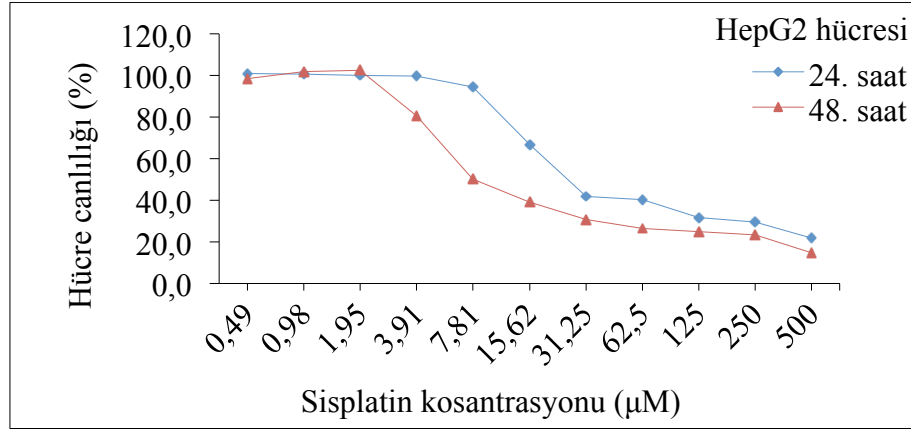
Tablo 4.18. HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	0.49 µM CIS	99.0	109.0	97.9	88.3	98.5±8.5
3	0.98 µM CIS	125.3	102.7	88.7	91.0	102.0±16.8
4	1.95 µM CIS	118.7	121.4	76.5	93.7	102.6±21.4
5	3.91 µM CIS	88.4	97.4	66.4	70.2	80.6±14.7
6	7.81 µM CIS	58.1	48.5	40.9	53.8	50.3±7.4 ^a
7	15.62 µM CIS	60.5	41.3	20.8	33.5	39.0±16.6 ^a
8	31.25 µM CIS	49.3	29.0	16.2	28.0	30.6±13.7 ^a
9	62.5 µM CIS	39.2	27.4	16.5	22.4	26.4±9.6 ^a
10	125 µM CIS	38.6	27.0	14.5	19.8	25.0±10.4 ^a
11	250 µM CIS	35.7	25.7	12.6	20.0	23.5±9.7 ^a
12	500 µM CIS	24.1	17.9	9.7	6.9	14.6±7.8 ^a

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

**Şekil 4.26.** HepG2 hücre canlılığı üzerine sisplatinin 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.27. HepG2 hücre canlılığı üzerine sisleptinin 24 ve 48 saat maruziyette etkisi.*

* Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı.

V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde piknogenol, kurkuminin ve sisleptinin 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.19. V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde piknogenolün, kurkuminin ve sisleptinin IC_{50} değerleri

Piknogenol	IC_{50} değeri (µM)	
	24. Saat	48. Saat
V79 hücresi	670	119
HeLa hücresi	261	213
HepG2 hücresi	192	51.5
Kirkumin	IC_{50} değeri (µM)	
	24. Saat	48. Saat
V79 hücresi	877	119
HeLa hücresi	404	320
HepG2 hücresi	236	98.3
Sisleptin	IC_{50} değeri (µM)	
	24. Saat	48. Saat
V79 hücresi	15.4	4.9
HeLa hücresi	22.4	12.3
HepG2 hücresi	25.5	7.7

4.4. Pknogenolün sisplatin sitotoksitesine etkilerinin belirlenmesi

4.4.1. Pknogenolün V79 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Pknogenolün V79 hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesisi üzerine etkileri Tablo 4.20, 4.21. ve Şekil 4.28'de verilmiştir.

V79 hücrelerinde pknogenolün 15.6-250 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (15 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, ancak 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

V79 hücrelerinde pknogenolün 15.6-125 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (5 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, 250 μM ve 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.20. V79 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

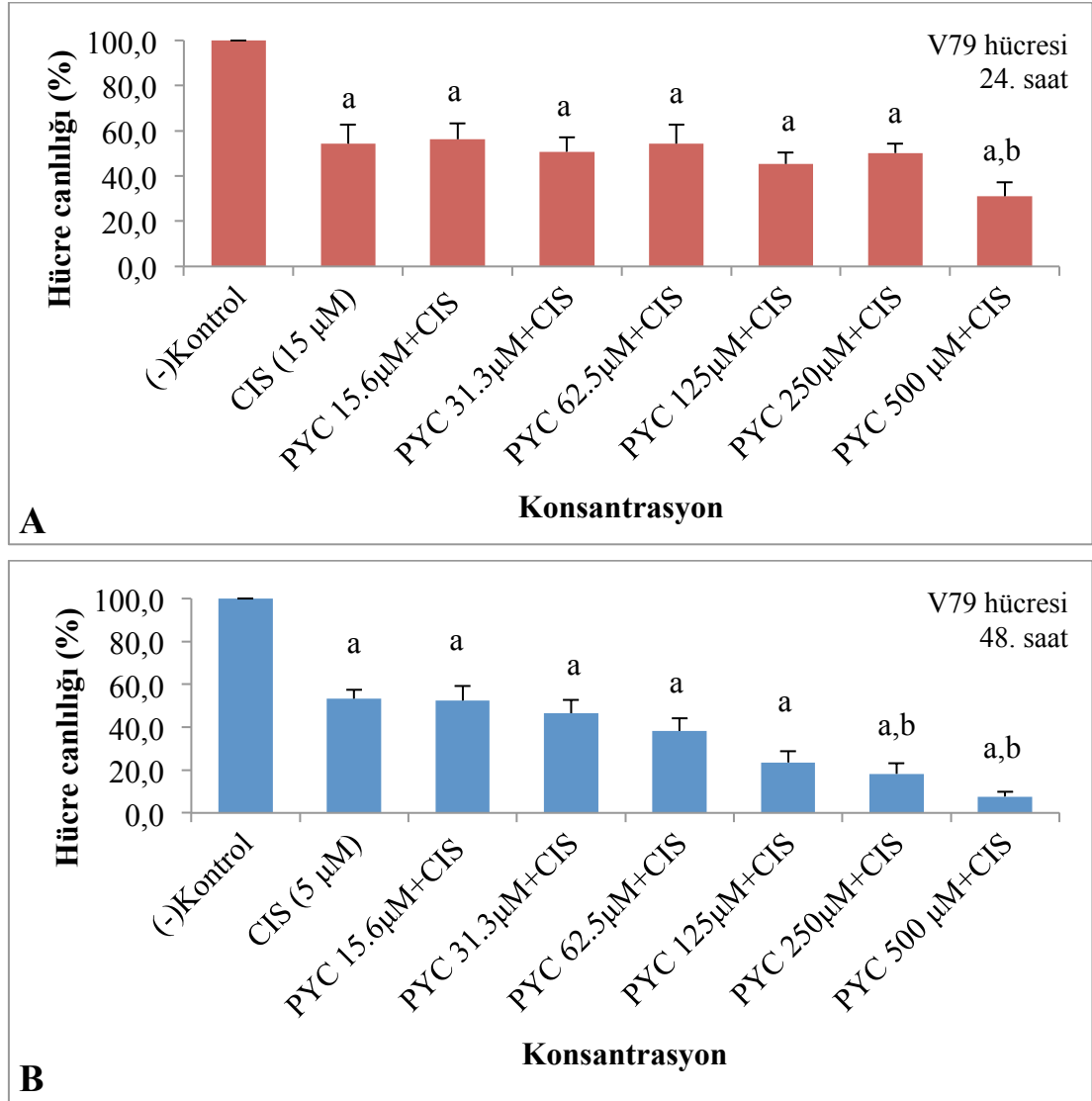
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (15 μM)	46.2	58.1	64.2	48.3	54.2 \pm 8.5 ^a
3	15.63 μM PYC + CIS	53.5	50.0	66.2	55.0	56.1 \pm 7.0 ^a
4	31.25 μM PYC + CIS	45.4	53.5	58.4	45.6	50.7 \pm 6.3 ^a
5	62.5 μM PYC + CIS	46.2	58.1	64.2	48.3	54.2 \pm 8.5 ^a
6	125 μM PYC + CIS	38.9	49.9	48.8	43.9	45.3 \pm 5.0 ^a
7	250 μM PYC + CIS	45.5	53.2	54.3	47.6	50.2 \pm 4.3 ^a
8	500 μM PYC + CIS	22.6	31.7	37.4	32.3	31.0 \pm 6.1 ^{a,b}

*Sonicular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (15 μM) ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.21. V79 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	CIS (5µM)	47.6	54.4	58.0	52.8	53.2±4.3 ^a
3	15.63 µM PYC + CIS	42.5	55.8	58.1	53.2	52.4±6.9 ^a
4	31.25 µM PYC + CIS	39.4	42.7	50.9	52.6	46.4±6.4 ^a
5	62.5 µM PYC + CIS	31.8	34.4	42.8	43.8	38.2±6.0 ^a
6	125 µM PYC + CIS	22.1	25.5	17.1	29.4	23.5±5.2 ^a
7	250 µM PYC + CIS	16.6	21.2	12.0	23.1	18.2±4.9 ^{a,b}
8	500 µM PYC + CIS	5.7	6.8	7.4	10.7	7.6±2.2 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (5 µM) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.28. V79 hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (15 μ M ve 5 μ M) ile karşılaştırıldı.

4.4.2. Pknogenolün HeLa Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Pknogenolün HeLa hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesini üzerine etkileri Tablo 4.22., 4.23. ve Şekil 4.29'da verilmiştir.

HeLa hücrelerinde pknogenolün 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (20 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

HeLa hücrelerinde pknogenolün 15.6-125 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (10 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedığı, 250 μM ve 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.22. HeLa hücreleri üzerinde pknogenolün 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

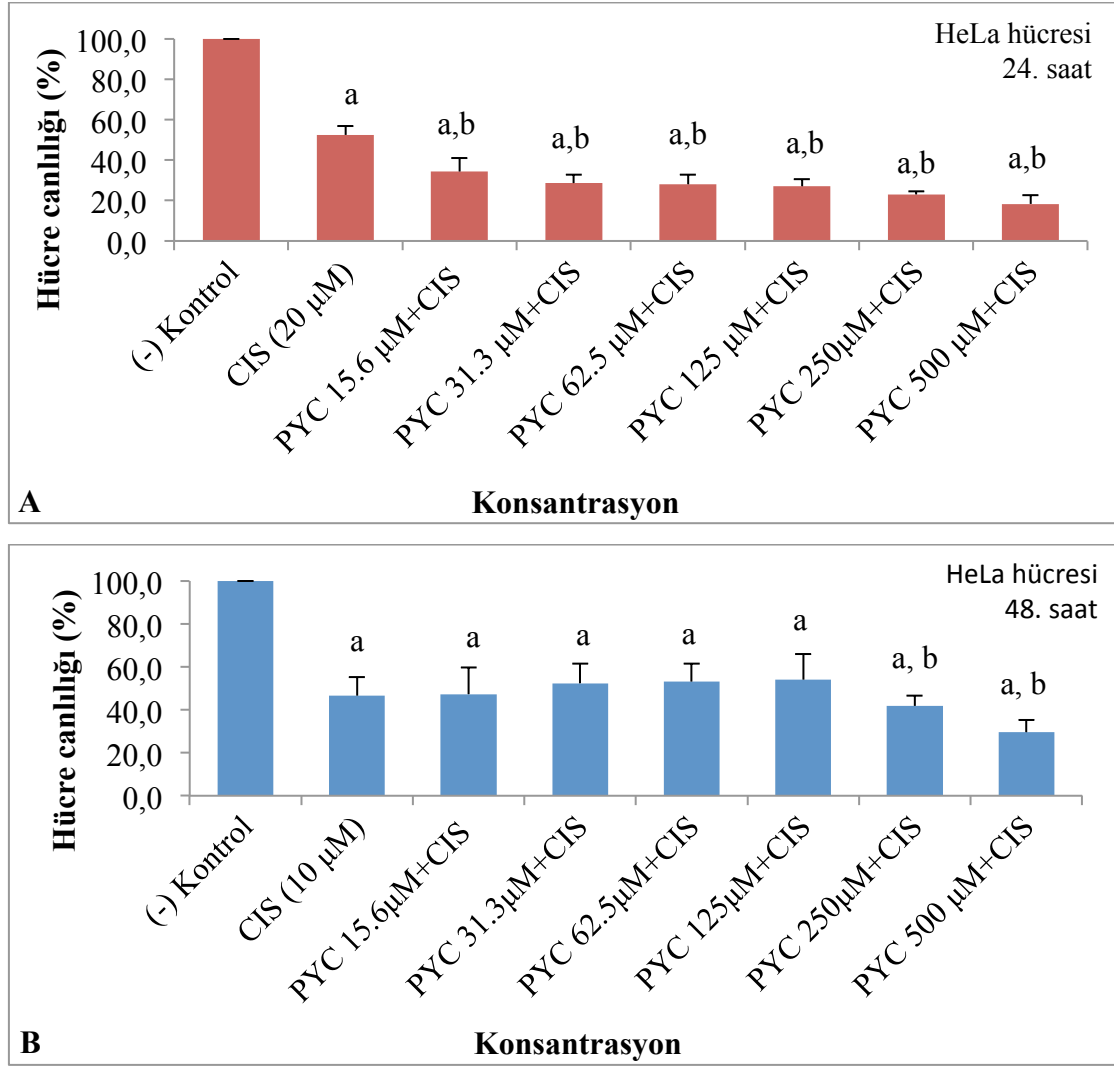
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (20 μM)	50.7	47.3	54.4	57.6	52.5 \pm 4.5 ^a
3	15.63 μM PYC+ CIS	40.4	30.2	26.9	39.7	34.3 \pm 6.8 ^{a,b}
4	31.25 μM PYC + CIS	32.9	25.9	31.2	24.3	28.6 \pm 4.1 ^{a,b}
5	62.5 μM PYC + CIS	34.8	26.9	24.3	26.3	28.1 \pm 4.6 ^{a,b}
6	125 μM PYC + CIS	27.3	27.7	22.2	31.1	27.1 \pm 3.6 ^{a,b}
7	250 μM PYC + CIS	24.8	22.7	21.5	23.1	23.0 \pm 1.4 ^{a,b}
8	500 μM PYC + CIS	24.2	17.7	13.9	17.5	18.3 \pm 4.3 ^{a,b}

*Soniclar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (20 μM) ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.23. HeLa hücreleri üzerinde piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	CIS (10 µM)	56.2	50.8	36.4	42.6	46.5±8.8 ^a
3	15.63 µM PYC + CIS	61.8	47.7	31.5	48.3	47.3±12.4 ^a
4	31.25 µM PYC + CIS	44.2	52.1	65.3	48.0	52.4±9.2 ^a
5	62.5 µM PYC + CIS	43.2	51.3	63.6	54.1	53.0±8.4 ^a
6	125 µM PYC + CIS	40.7	47.7	67.3	60.2	54.0±12.0 ^a
7	250 µM PYC + CIS	35.8	46.7	40.7	44.0	41.8±4.7 ^{a,b}
8	500 µM PYC + CIS	28.9	22.9	30.0	36.7	29.6±5.7 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (10 µM) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.29. HeLa hücreleri üzerinde pknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

*Sonnçular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (20 µM ve 10 µM) ile karşılaştırıldı.

4.4.3. Pknogenolün HepG2 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Pknogenolün HepG2 hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesisi üzerine etkileri Tablo 4.24., 4.25. ve Şekil 4.30'da verilmiştir.

HepG2 hücrelerinde pknogenolün 15.6-62.5 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (25 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, ancak 125, 250, 500 μM konsantrasyonlarında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

HepG2 hücrelerinde pknogenolün 15.6-31.25 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (10 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, 62.5, 125, 250, 500 μM konsantrasyonlarında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.24. HepG2 hücre canlılığı üzerine pknogenolün 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesisine etkisi.*

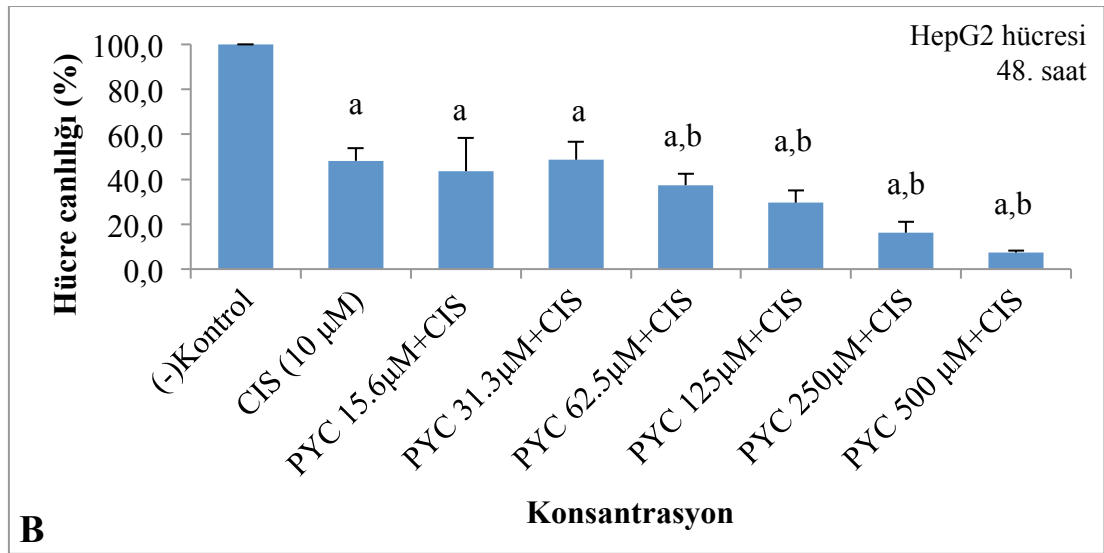
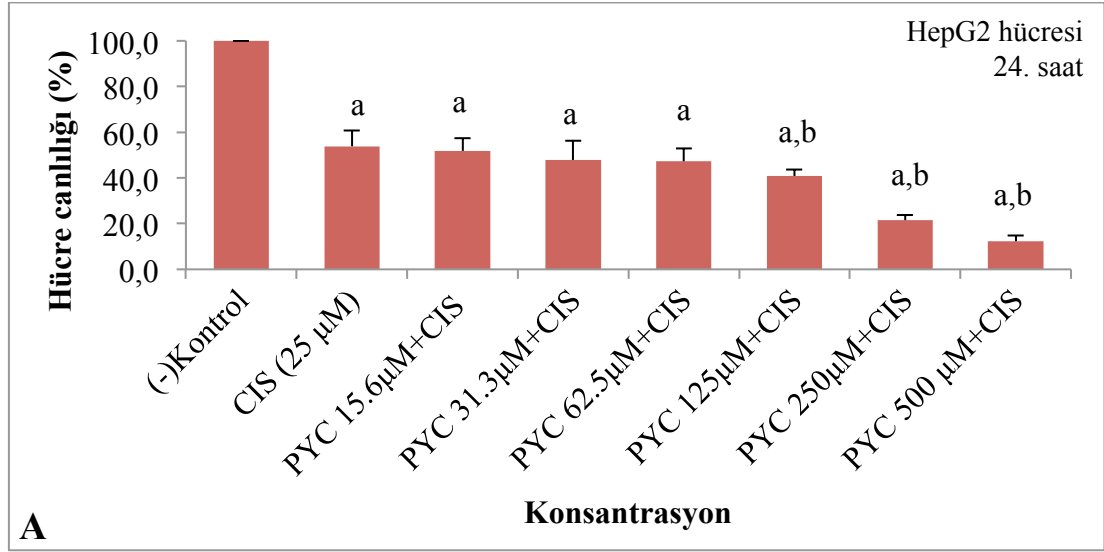
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (25 μM)	46.7	49.3	59.2	60.2	53.9 \pm 6.9 ^a
3	15.63 μM PYC + CIS	49.0	45.2	56.3	56.8	51.8 \pm 5.7 ^a
4	31.25 μM PYC + CIS	42.0	53.3	56.8	39.3	47.8 \pm 8.5 ^a
5	62.5 μM PYC + CIS	44.6	50.5	53.1	40.9	47.3 \pm 5.6 ^a
6	125 μM PYC + CIS	40.3	43.0	42.8	36.9	40.8 \pm 2.9 ^{a,b}
7	250 μM PYC + CIS	23.2	20.6	18.9	23.5	21.6 \pm 2.1 ^{a,b}
8	500 μM PYC + CIS	12.2	15.9	9.5	11.6	12.3 \pm 2.6 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (20 μM) ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.25. HepG2 hücre canlılığı üzerine piknogenolün 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	CIS (10 µM)	56.4	47.8	44.3	44.2	48.2±5.7 ^a
3	15.63 µM PYC + CIS	62.2	46.7	26.7	38.5	43.5±14.9 ^a
4	31.25 µM PYC + CIS	52.4	49.8	55.2	37.2	48.6±8.0 ^a
5	62.5 µM PYC + CIS	36.0	43.7	38.4	31.3	37.4±5.2 ^{a,b}
6	125 µM PYC + CIS	29.0	35.2	31.3	22.4	29.5±5.4 ^{a,b}
7	250 µM PYC + CIS	17.2	19.2	19.0	9.0	16.1±4.8 ^{a,b}
8	500 µM PYC + CIS	7.5	6.1	7.7	8.1	7.3±0.8 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (10 µM) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.30. HepG2 hücreleri üzerinde piknogenolün 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

*Sonnular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak PBS uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (25 μ M ve 10 μ M) ile karşılaştırıldı.

4.5. Kurkuminin sisplatin sitotoksitesine etkilerinin belirlenmesi

4.5.1. Kurkuminin V79 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Kurkuminin V79 hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesine üzerine etkileri Tablo 4.26., 4.27. ve Şekil 4.31'de verilmiştir.

V79 hücrelerinde kurkuminin 15.6-250 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (15 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, ancak 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

V79 hücrelerinde kurkuminin 15.6-62.5 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (5 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, 125, 250, 500 μM konsantrasyonlarında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.26. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

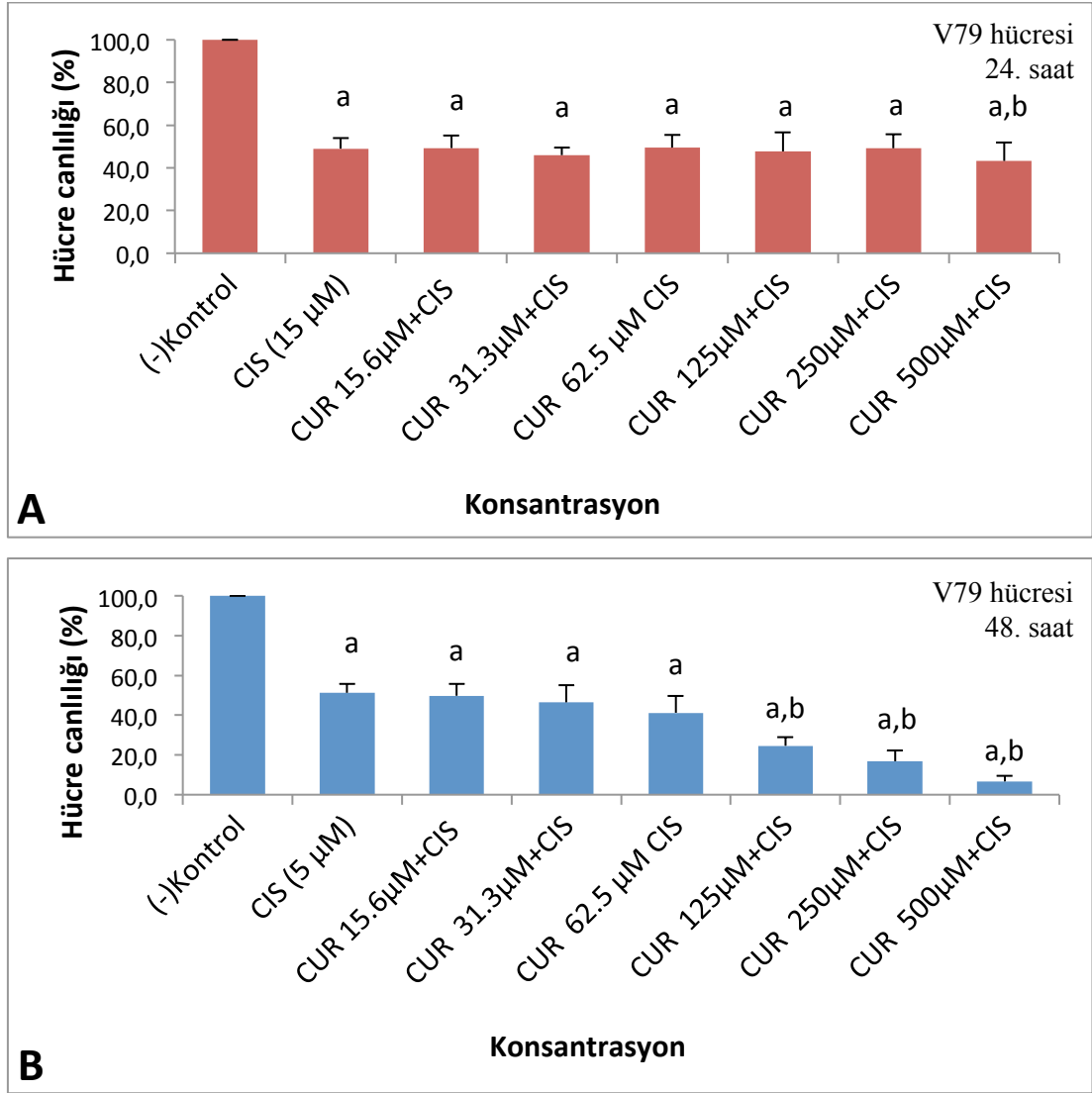
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (15 μM)	42.9	53.0	52.8	47.4	49.1 \pm 4.8 ^a
3	15.63 μM CUR + CIS	43.6	45.1	55.9	52.6	49.3 \pm 5.9 ^a
4	31.25 μM CUR + CIS	42.1	49.0	49.2	43.7	46.0 \pm 3.6 ^a
5	62.5 μM CUR + CIS	43.9	51.8	56.9	45.6	49.5 \pm 5.9 ^a
6	125 μM CUR + CIS	36.7	53.3	56.7	43.8	47.6 \pm 9.1 ^a
7	250 μM CUR + CIS	43.0	52.1	57.2	44.5	49.2 \pm 6.7 ^a
8	500 μM CUR + CIS	42.0	52.1	46.9	31.8	43.2 \pm 8.6 ^{a,b}

*Sonn lar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiŒtir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$, negatif kontrol ile karŒılaŒtırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (15 μ M) ile karŒılaŒtırıldı.

Tablo 4.27. V79 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi.*

No	alıŒma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (5 μ M)	46.1	48.8	56.1	54.0	51.3 \pm 4.6 ^a
3	15.63 μ M CUR + CIS	43.5	46.0	56.2	53.4	49.8 \pm 6.0 ^a
4	31.25 μ M CUR + CIS	35.8	43.1	54.5	52.5	46.5 \pm 8.6 ^a
5	62.5 μ M CUR + CIS	30.9	38.7	50.8	44.5	41.2 \pm 8.5 ^a
6	125 μ M CUR + CIS	21.4	22.7	23.5	30.9	24.6 \pm 4.2 ^{a,b}
7	250 μ M CUR + CIS	10.8	14.7	17.4	23.9	16.7 \pm 5.5 ^{a,b}
8	500 μ M CUR + CIS	5.3	3.9	7.1	10.4	6.7 \pm 2.8 ^{a,b}

*Sonn lar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiŒtir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$, negatif kontrol ile karŒılaŒtırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (5 μ M) ile karŒılaŒtırıldı.



Şekil 4.31. V79 hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi*

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (15 ve 5 μ M) ile karşılaştırıldı.

4.5.2. Kurkuminin HeLa Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Kurkuminin HeLa hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesi üzerine etkileri Tablo 4.28., 4.29. ve Şekil 4.32.'de verilmiştir.

HeLa hücrelerinde kurkuminin 15.6-250 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (20 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, ancak 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

HeLa hücrelerinde kurkuminin 15.6-125 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (10 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, 250 μM ve 500 μM konsantrasyonda sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.28. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi*

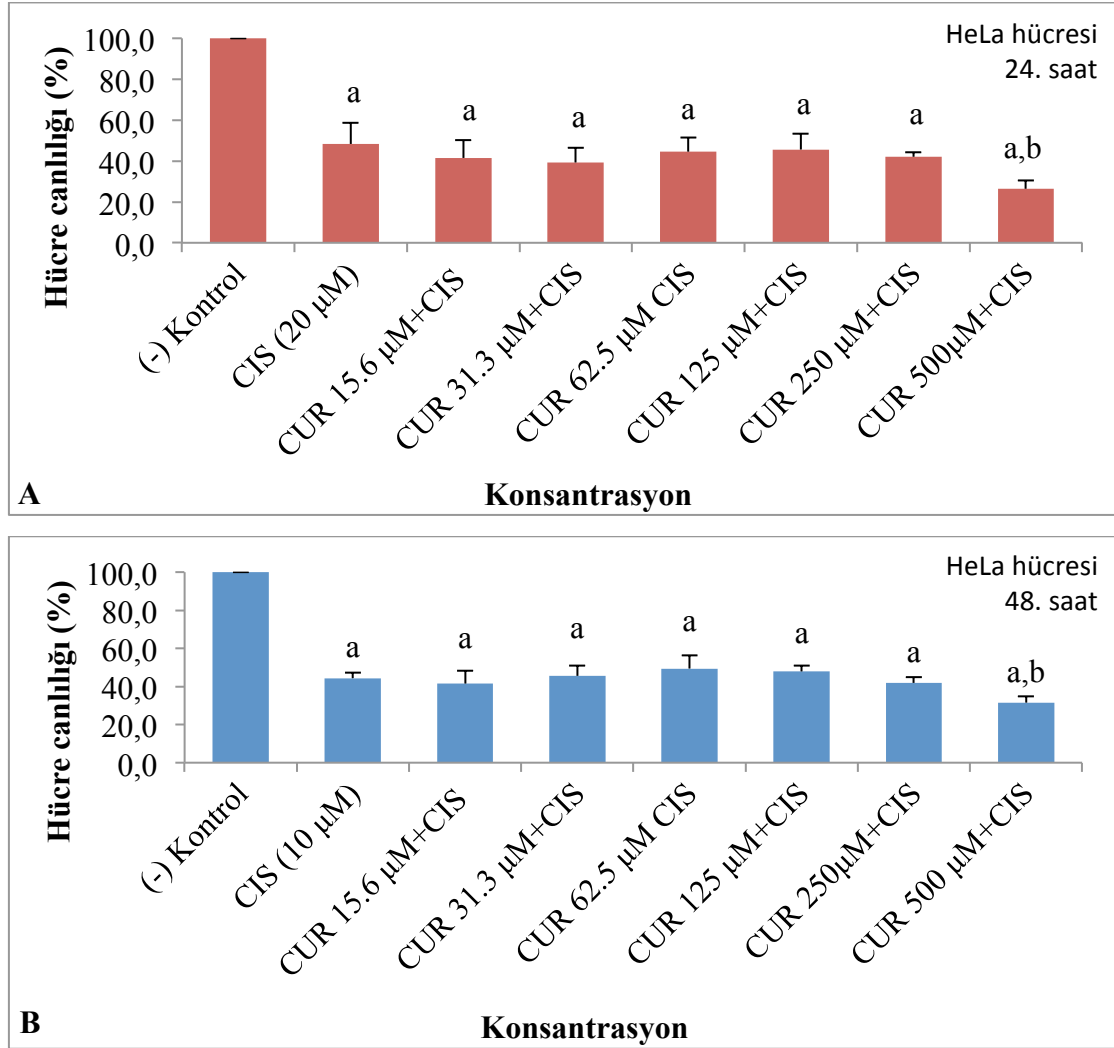
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (20 μM)	43.2	43.6	63.8	42.5	48.3 \pm 10.3 ^a
3	15.63 μM CUR + CIS	33.8	39.2	39.1	53.9	41.5 \pm 8.7 ^a
4	31.25 μM CUR + CIS	39.1	41.2	30.0	46.9	39.3 \pm 7.0 ^a
5	62.5 μM CUR + CIS	36.2	44.4	43.9	53.4	44.5 \pm 7.0 ^a
6	125 μM CUR + CIS	34.9	46.6	47.7	53.4	45.6 \pm 7.7 ^a
7	250 μM CUR + CIS	40.0	40.4	43.8	44.1	42.1 \pm 2.2 ^a
8	500 μM CUR + CIS	23.4	24.8	24.8	32.5	26.4 \pm 4.1 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (20 μM) ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.29. HeLa hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sislpatin sitotoksitesine etkisi*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	CIS (10 µM)	40.5	46.4	43.8	46.9	44.4±2.9 ^a
3	15.63 µM CUR + CIS	33.1	41.6	40.8	50.0	41.4±6.9 ^a
4	31.25 µM CUR + CIS	41.5	41.8	44.9	53.5	45.4±5.6 ^a
5	62.5 µM CUR + CIS	54.7	45.7	41.6	55.6	49.4±6.9 ^a
6	125 µM CUR + CIS	43.9	49.9	47.4	50.2	47.9±2.9 ^a
7	250 µM CUR + CIS	38.2	42.0	40.7	46.0	41.7±3.3 ^a
8	500 µM CUR + CIS	34.6	33.6	27.7	30.3	31.5±3.2 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sislpatin (10 µM) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.32. HeLa hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi*

*Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (20 ve 10 μ M) ile karşılaştırıldı.

4.5.3. Kurkuminin HepG2 Hücrelerinde Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Kurkuminin HepG2 hücrelerinde 15.6-500 μM konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyonda sisplatin sitotoksitesi üzerine etkileri Tablo 4.30. 4.31. ve Şekil 4.33.'de verilmiştir.

HepG2 hücrelerinde kurkuminin 15.6-125 μM konsantrasyon aralığında 24 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (25 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, ancak 250 μM ve 500 μM konsantrasyonlarında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

HepG2 hücrelerinde kurkuminin 15.6-62.5 μM konsantrasyon aralığında 48 saatlik inkübasyonda, sisplatinin IC_{50} değerini (10 μM) negatif kontrol ile karşılaştırıldığında değiştirmedeği, 125, 250, 500 μM konsantrasyonlarında sisplatinin IC_{50} değerini doz bağımlı anlamlı olarak azalttığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tablo 4.30. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 24 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi*

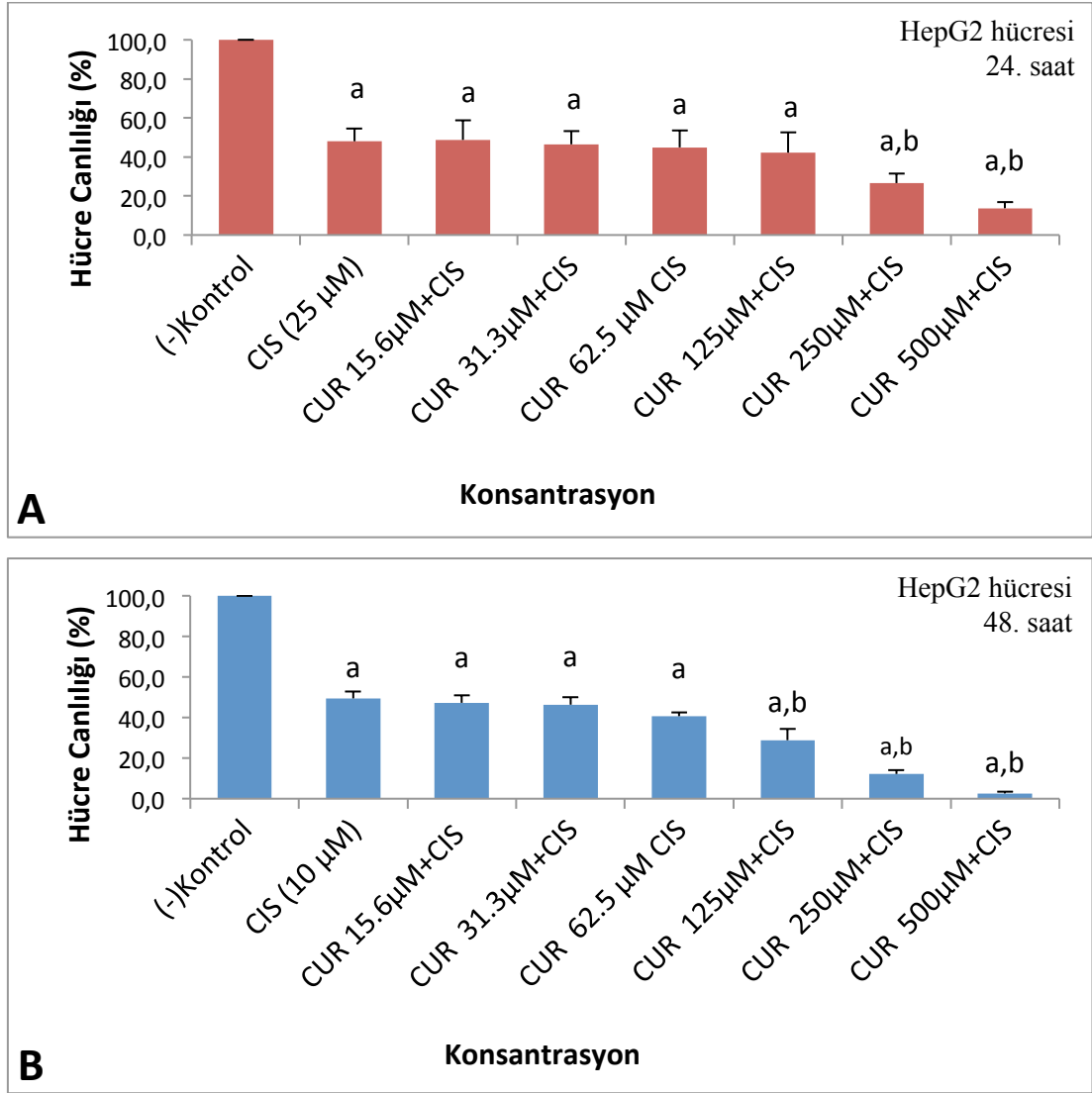
No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Dene y	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0 \pm 0
2	CIS (25 μM)	43.5	50.1	56.2	42.5	48.0 \pm 6.4 ^a
3	15.63 μM CUR + CIS	33.9	53.2	54.0	53.9	48.8 \pm 9.9 ^a
4	31.25 μM CUR + CIS	38.9	55.3	44.9	46.9	46.5 \pm 6.8 ^a
5	62.5 μM CUR + CIS	35.8	51.5	39.1	53.4	44.9 \pm 8.8 ^a
6	125 μM CUR + CIS	34.4	48.5	32.7	53.4	42.2 \pm 10.2 ^a
7	250 μM CUR + CIS	26.0	33.3	21.4	25.3	26.5 \pm 5.0 ^{a,b}
8	500 μM CUR + CIS	13.7	17.8	9.8	13.7	13.8 \pm 3.2 ^{a,b}

*Sonicular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (25 μM) ile karşılaştırıldı.

Tablo 4.31. HepG2 hücre canlılığı üzerine kurkuminin 48 saat maruziyette sisplatin sitotoksitesine etkisi*

No	Çalışma grupları	I. Deney	II. Deney	III. Deney	IV. Deney	Hücre canlılığı
1	(-) Kontrol	100	100	100	100	100.0±0
2	CIS (10 µM)	49.9	54.1	47.9	45.9	49.5±3.5 ^a
3	15.63 µM CUR + CIS	42.7	51.0	45.9	49.5	47.3±3.7 ^a
4	31.25 µM CUR + CIS	40.9	49.0	47.0	48.4	46.4±3.7 ^a
5	62.5 µM CUR + CIS	39.6	40.8	39.1	43.4	40.7±1.9 ^a
6	125 µM CUR + CIS	30.8	20.6	30.5	33.6	28.9±5.7 ^{a,b}
7	250 µM CUR + CIS	12.7	9.7	11.2	14.8	12.1±2.2 ^{a,b}
8	500 µM CUR + CIS	3.4	1.7	2.9	2.5	2.6±0.7 ^{a,b}

*Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p<0.05$. negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p<0.05$, sisplatin (10 µM) ile karşılaştırıldı.



Şekil 4.33. HepG2 hücreleri üzerinde kurkuminin 24 saat maruziyette (A) ve 48 saat maruziyette (B) sisplatin sitotoksitesine etkisi*

*Sonnular ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. Negatif kontrol olarak %0.5 DMSO uygulandı. ^a $p < 0.05$, negatif kontrol ile karşılaştırıldı. ^b $p < 0.05$, sisplatin (25 μ M ve 10 μ M) ile karşılaştırıldı.

5. TARTIŞMA

Hastalıkların önlenmesi ve tedavisi amacıyla ağaç kabuklarından ekstre edilmiş pek çok bileşik vardır. Ağaç kabuklarından elde edilen maddelere örnek olarak *Salix alba* kabuğundan asetilsalisilik asit (aspirin), *Cinnamomum zeylanicum*'dan tarçın, *Cinchona salisaya* ve *C. pubescens*'dan kinin benzeri alkaloidler, *Corynanthe yohimbe*'den yohimbin verilebilir (20). Ağaç kabuklarındaki, özellikle de çam ağaçlarının kabuklarındaki zengin fitokimyasal içerikler araştırmalarda dikkat çekmiştir. Tedavi edici özelliği ile uzun zamandır kullanılan *Pinus pinaster* isimli çam ağacı kabuğu ekstresi olan piknogenol bu fitokimyasallardan biridir (20). Piknogenol, Fransa'nın güneybatı sahillerinde yetişen Fransız sahil çamı *Pinus pinaster* (*Pinus maritima*)'den elde edilen flavonoid/polifenol yapısında bir bitki ekstresidir (7). Piknogenol güçlü antioksidan özelliği ile ve hücrel redoks sistemi üzerindeki düzenleyici etkisi ile oldukça etkili bir bileşik olarak dikkat çekmektedir (34). Piknogenolün dikkat çeken biyolojik etkileri nedeni ile birçok hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları yapılmıştır. Kanseri, diyabet, inflamatuvar hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, immün sistem hastalıkları, erektil disfonksiyon, erkek infertilitesi, menopoz belirtileri, diş eti kanamaları ve ödem gibi birçok patolojik durumda piknogenolün etkili olduğu bildirilmiştir (7). *Curcuma longa* L.'nin (*C.longa*) rizomlarından elde edilen sarı-turuncu renkli polifenolik bir bileşik olan kurkuminin yararlı etkileri üzerine literatürde çok fazla bilgi yer almaktadır. Kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antiseptik, analjezik ve antikanser etkilerine bağlı olarak çeşitli malign hastalıklar, diyabet, alerji, ağrı, artrit, alzheimer ve diğer kronik hastalıklara karşı etki potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir. Kurkumin kanser dahil birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde güvenli, etkili ve düşük maliyetli olması açısından iyi bir alternatif olarak düşünülmektedir (111, 259).

Baş, boyun, akciğer, testis, over ve meme gibi birçok solid tümörün tedavisinde sisplatin sıklıkla kullanılmaktadır (11). Sisplatinin toksik etkilerinden sorumlu tutulan mekanizmalardan biri oksidatif stresin uyarılmasıdır (211). Son yıllarda, artan nüfusla birlikte, ülkemiz de dahil dünyada görülme sıklığı artmaktadır.

Kanser tedavisinde farklı tedavi rejimleri kullanılmaktadır. Güncel çalışmalara bakıldığında kemoterapötik ilacın yanında çeşitli bitkisel kaynaklı özellikle fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması amaçlanmakta ve araştırılmaktadır (12-16). Sisplatinin kanser kemoterapisinde etkinliğini artırmak, direnç gelişimini azaltmak ve toksisitesini azaltmak için diğer antikemoterapötikler ile ve antioksidan maddeler ile kombine kullanımının olumlu sonuçlar doğurduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Ancak sisplatinin antikanser tedavisini iyileştirmek ve neden olduğu toksik etkilerin azaltılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (17).

Piknogenolün ve kurkuminin bilinen farmakolojik ve biyolojik etkilerinin antikanser ilaçlarla farklı doz kombinasyonlarının birlikte kullanımını içeren ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir. Piknogenol ve kurkuminin antikanser ilaçlarla kombine etkisi üzerinde yapılan çalışmalar yeterli değildir. Bu tez çalışmasında önemli biyolojik etkileri olduğu bilinen ve son yapılan çalışmalarda önemi gittikçe artan bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerden piknogenol ve kurkuminin antikanser ilaç sisplatinle birlikte kullanımında Çin hamster akciğer fibroblast (V79), insan karaciğer kanser (HepG2) ve insan serviks kanser (HeLa) hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında, piknogenolün 1.95-2000 μM konsantrasyon aralığında V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. 24 saatlik maruziyette IC_{50} değerleri V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla 670 μM , 261 μM , 192 μM olarak belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyonda piknogenol sitotoksitesinin HepG2 hücresinde HeLa hücresine göre karşılaştırıldığında ~1.4 kat ve V79 hücresine göre karşılaştırıldığında ~3.5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik maruziyette IC_{50} değerleri V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla 119 μM , 213 μM , 51.5 μM olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonda piknogenol sitotoksitesinin HepG2 hücresinde, HeLa hücresine göre karşılaştırıldığında ~4.1 kat ve V79 hücresine göre karşılaştırıldığında ~2.3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Piknogenolün 48 saatlik inkübasyon zamanı 24 saatlik inkübasyon zamanı ile karşılaştırıldığında, sitotoksitenin V79 hücresi için ~5.6 kat, HeLa hücresi için ~1.2 kat, HepG2 hücresi için ~3.7 kat arttığı belirlenmiştir.

Piknogenolün insan lösemi hücreleri (HL-60, U937 ve K562) üzerinde antitümör etkisinin propidyum iyodür eksklüzyon yöntemi ile incelendiği bir *in vitro* çalışmada 24 saat piknogenol inkübasyonu sonrası IC₅₀ değerleri; HL-60 hücrelerinde 150 µg/ml (~516.8 µM), U937 hücrelerinde 40 µg/ml (~137.8 µM) ve K562 hücrelerinde 100 µg/ml (344.5 µM) olarak belirlenmiştir (60).

İnsan oral skuamoz karsinoma (HSC-3) hücresinde piknogenolün apoptotik etkisinin MTS (bir tetrazolyum tuzu) formozan testi ile araştırıldığı bir diğer çalışmada, 24 saat piknogenol inkübasyonunda IC₅₀ değeri 20 µg/ml (~68.9 µM) olarak rapor edilmiştir (260).

Piknogenolün sitotoksik, genotoksik ve antijenotoksik özelliklerini *in vitro* memeli hücrelerinde NRU testi ile araştırılan bir diğer çalışmada, piknogenolün 24 saat maruziyetinde CHO hücrelerinde IC₅₀ değeri 285 µg/ml (~982 µM) olarak belirlenmiştir (102).

Kurkuminin 1.95-2000 µM konsantrasyon aralığında V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. 24 saatlik maruziyette IC₅₀ değerleri V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla 877 µM, 404 µM, 236 µM olarak belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyonda kurkumin sitotoksitesinin HepG2 hücresinde HeLa hücresine göre karşılaştırıldığında ~1.7 kat ve V79 hücresine göre karşılaştırıldığında ~3.7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik maruziyette IC₅₀ değerleri V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla 119 µM, 320 µM, 98.3 µM olarak belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonda kurkumin sitotoksitesinin HepG2 hücresinde, HeLa hücresine göre karşılaştırıldığında ~3.2 kat ve V79 hücresine göre karşılaştırıldığında ~1.2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Kurkuminin 48 saatlik inkübasyon zamanı 24 saatlik inkübasyon zamanı ile karşılaştırıldığında, sitotoksitesinin V79 hücresi için ~7.4 kat, HeLa hücresi için ~1.3 kat, HepG2 hücresi için ~2.4 kat arttığı belirlenmiştir.

İnsan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7), MTT yöntemi ile kurkuminin IC₅₀ değerleri 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarında sırası ile 79.58 µg/ml (~216 µM) ; 53.18 µg/ml (~144 µM); 30.78 µg/ml (~83.5 µM) olarak belirlenmiştir (261). Kurkuminin antikanser etkisinin insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde

NRU yöntemi ile araştırıldığı çalışmada, 72 saat kurkumin inkübasyonunda IC₅₀ değeri 41.5 µg/ml (~113 µM) olarak belirlenmiştir (262).

Bir başka in vitro çalışmada ise kurkuminin 3 farklı hücre üzerinde 72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri MCF-7 hücrelerinde 9.40 µg/ml (~25.5 µM), HeLa hücrelerinde 17.67 µg/ml (~47.9 µM), HepG2 hücrelerinde 22.88 µg/ml (~62.1 µM) olarak belirlenmiştir (263).

Sisplatin 0.49-500 µM konsantrasyon aralığında V79, HeLa ve HepG2 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. IC₅₀ değerleri V79, HeLa ve HepG2 hücreleri için sırasıyla 24 saatlik maruziyette 15.4 µM, 22.4 µM, 25.5 µM ve 48 saatlik maruziyette 4.9 µM, 12.3 µM, 7.7 µM olarak belirlenmiştir. Sisplatinin 48 saatlik inkübasyon zamanı 24 saatlik inkübasyon zamanı ile karşılaştırıldığında, sitotoksitenin V79 hücresi için ~3.1 kat, HeLa hücresi için ~1.8 kat, HepG2 hücresi için ~3.3 kat arttığı belirlenmiştir.

Sisplatinin seçilen insan kanser hücreleri üzerinde 24 saat inkübasyonunda MTT yöntemi ile IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Servikal kanser hücrelerinde (HeLa ve Caco-2) sırası ile 54.07 µM ve 96.38 µM; pankreatik kanser hücrelerinde (MIA PaCa-2 ve BxPC-3) sırası ile 97.20 µM ve 85.66 µM; hepatoselüler karsinoma hücrelerinde (Hep-G2 ve SK-HEP-1) sırası ile 14.87 µM ve 77.89 µM olarak belirlenmiştir (264).

V79 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, piknogenolün 500 µM konsantrasyonda ve 48 saatlik inkübasyonda ise 250 µM ve 500 µM konsantrasyonda doz bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. HeLa hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, piknogenolün 15.6-500 µM konsantrasyonlarında ve 48 saatlik inkübasyonda ise 250 µM ve 500 µM konsantrasyonda doz bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. HepG2 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, piknogenolün 125-500 µM konsantrasyonlarında ve 48 saatlik inkübasyonda ise 62.5-500 µM konsantrasyonda doz bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur.

V79 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, kurkuminin 500 µM konsantrasyonda ve 48 saatlik inkübasyonda ise 125-500 µM konsantrasyonda doz

bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. HeLa hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, kurkuminin 500 µM konsantrasyonda ve 48 saatlik inkübasyonda ise 250 µM ve 500 µM konsantrasyonda doz bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. HepG2 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyonda, kurkuminin 250 µM ve 500 µM konsantrasyonlarında ve 48 saatlik inkübasyonda ise 125-500 µM konsantrasyonda doz bağımlı olarak sisplatinin IC₅₀ değerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur.

Küçük olmayan akciğer kanser hücrelerinde (A549 ve H2170), kurkuminin sisplatinin etkisine etkisi incelenmiş ve her iki hücrede de sisplatin ile indüklenen apoptozu ve metastaz inhibisyonunu artırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada sisplatin, kurkumin ve kombinasyonun 48 saat inkübasyonunda MTS yöntemi ile IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. A459 ve H2170 hücrelerinde kurkuminin IC₅₀ değeri 48 saat inkübasyonunda sırası ile 40 µM ve 30 µM; benzer şekilde sisplatinin IC₅₀ değeri 30 µM ve 7.0 µM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada her iki hücre belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarında sisplatin ve kurkumin kombinasyonu ile 48 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerde, düşük doz (3 µM) sisplatin ile kurkumin (10-40 µM) kombinasyonunun; düşük doz sisplatinin etkisini arttırarak IC₅₀ değerindeki sisplatine yakın etki gösterdiği rapor edilmiştir (265).

Kurkuminin çeşitli kanser türleri üzerindeki etkisinde hücre sel sinyal yollarını düzenleyerek ve transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, sitokinler, enzimler, hücre çoğalma genleri gibi birçok moleküler hedefle etkileşimi ile çeşitli kanser tedavisinde kurkumin kullanımının etkililiğinin doğrulandığı belirtilmektedir. Kurkuminin sitotoksitesiteyi önleyici etkisinde, başlıca; antioksidan özelliği, reaktif oksijen bileşiklerinin ekspresyonunu azaltması, lipid peroksidasyonunu baskılaması, intraselüler glutatyon ekspresyonunu artırmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (107).

Piknogenolün oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalığa karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Piknogenolün biyolojik etkilerinin altında yatan mekanizmaların moleküler temeli olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerini süpürücü özelliği ileri sürülmektedir. Piknogenolün radikal süpürücü etkisinde serbest nitrojen türlerini, nitrik oksit sentaz (iNOS) ve iNOS-mRNA ekspresyonunu inhibe ederek belirgin şekilde nitrojen monooksit üretimini azaltarak etki gösterdiği ileri

sürülmüştür (6). Sisplatin sitotoksitesinde, sisplatin tarafından indüklenen prooksidan enzimlerin (miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz), malondialdehit ve nitrik oksitin düzeyinin piknogenol ile düzeltildiği, kromozom hatalarını azaltıldığı bildirilmiştir. Bu bulgular, piknogenolün sisplatin tedavisi ile ilişkilendirilen oksidatif, inflamatuvar ve genotoksik hasara karşı koruyucu bir madde olabileceğini düşündürmektedir (52). Kanser tedavi rejimlerinden radyoterapide oluşan artmış oksidatif hasarın piknogenolün güçlü antioksidan aktivitesi ile önlenebileceği ileri sürülmüştür (36).

Çalışmamızda piknogenol ve kurkuminin tek başına sitotoksik olmadığı dozlarında bile sisplatin sitotoksitesini arttırabildiği bulunmuştur, ancak piknogenol ve kurkuminin sitotoksitesi üzerine yapılan önceki çalışmalardan elde edilen sonuçların tutarlı olmadığı da görülmektedir. Bunun nedenleri arasında; kullanılan sitotoksite yönteminin, uygulama zamanının ve seçilen hücre ve özelliklerinin farklı olması düşünülmektedir. Kurkumin ve piknogenolün çeşitli insan kanserlerinin önlenmesinde ve tedavisinde önemi rol oynayabileceği, mevcut verilerin daha fazla klinik çalışma ile desteklenmesi gerektiği görülmektedir. Kanser hücreleri üzerine piknogenol ve kurkuminin moleküler etki mekanizmaları üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile gıda yoluyla sıklıkla alınan bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerden olan piknogenol ve kurkuminin HepG2, HeLa ve V79 gibi kanser hücrelerinde, sitotoksitesi ve sisplatin ile birlikte kullanımında hücre canlılığını azaltıcı veya arttırıcı etkilerini ve güvenli kullanımını ortaya çıkararak konuya açıklık getirilmeye çalışılmıştır. Bu bulgular ile, sisplatinin antikanser tedavisinde piknogenol ve kurkuminin kullanımının kanser tedavisindeki olumlu yada olumsuz yönlerini ortaya çıkarabileceği ve antikanser tedaviye yeni bir bakış açısı katacağı düşünülmektedir.

Kurkuminin ve piknogenolün güvenilirliği birçok klinik çalışma ile in vivo ve in vitro çalışma ile desteklene de uzun dönem toksisitesinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Kurkumin ve piknogenolün çeşitli insan kanserlerinin önlenmesinde ve tedavisinde önemi rol oynayabileceği, mevcut verilerin daha fazla klinik çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda piknogenol ve kurkuminin sisplatin sitotoksitesini arttırabildiği gösterilse de, piknogenol ve kurkuminin sitotoksitesi üzerine yapılan çalışma sonuçlarının tutarlı olmadığı görülmektedir.

Kanser tedavisinde sisplatinle birlikte piknogenol ve kurkuminin kombine verilmesi tedavi etkinliğini arttırabileceği öngörülse de, kurkumin ve piknogenolün kanser tedavisinde etkinliği ve terapötik öneminin ortaya çıkarılması için daha kapsamlı in vitro, in vivo ve klinik çalışmaları gereklidir. Ayrıca bu maddelerinin hücre canlılığı üzerine toksisitelerinin ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasına daha fazla önem verilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Kitsati N, Fokas D, Ouzouni MD, Mantzaris MD, Barbouti A, Galaris D. Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-Induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *J Agric Food Chem.* 2012;60(32):7873-9.
2. Russo GL. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(4):533-44.
3. Ramos AA, Lima CF, Wilson CP. DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention: What do we know? *Select Topics in DNA Repair.* 2011;237-270.
4. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:230-42.
5. Kyselova Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip Toxicol.* 2011;4(4):173-83.
6. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(5-6):704-24.
7. D'Andrea G. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 2010;81(7):724-36.
8. Çıkırıkcı S, Mozioglu E, Yılmaz H. Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod.* 2008;2(1)19-24.
9. Nagpal M, Sood D. Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine.* 2013;4(1):3-7.
10. Bansal SS, Goel M, Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC. Advanced drug-delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res.* 2011;4(8):1158-71.
11. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer.* 1985;55:2303-16.
12. Chen J, Xu T, Chen C. The critical roles of miR-21 in anti-cancer effects of curcumin. *Annals of Translational Medicine.* 2015;3(21):330.
13. Adahoun MA, Al-Akhras MH, Jaafar MS, Bououdina M. Enhanced anti-cancer and antimicrobial activities of curcumin nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology.* 2016. DOI:10.3109/21691401.2015.1129628.
14. Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Russo LL ve ark. . Biological and therapeutic activities and anticancer properties of curcumin. 2015;10(5):1615-23.

15. Taner G, Aydin S, Bacanli M, Sarigol Z, Sahin T, Basaran AA ve ark. Modulating effects of pycnogenol(R) on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats. *Phytother Res.* 2014;28(11):1692-700.
16. Yang IH, Shin JA, Cho SD. Pycnogenol Induces Nuclear Translocation of Apoptosis-inducing Factor and Caspase-independent Apoptosis in MC-3 Human Mucoepidermoid Carcinoma Cell Line. *J Cancer Prev.* 2014;19(4):265-72.
17. Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-71.
18. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine.* 1999;27(5-6):704-724.
19. Torras MAC, Faura CA, Schonlau F, Rohdewald P. Antimicrobial activity of pycnogenol. *Phytother Res.* 2005;19:647-648.
20. Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):261-77.
21. Rohdewald PJ. Pycnogenol, French maritime pine bark extract. *Encyclopedia of Dietary Supplements.* 2005. DOI:10.1081/E-EDS-120022123.
22. United States Pharmacopeia. Maritime Pine Extract. Rockville, United States Pharmacopeial Convention. 2005;28:2115-2116.
23. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40(4):158-68.
24. Grimm T, Skrabala R, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clin Pharmacol.* 2006;6:4.
25. Oliff, H. Scientific and Clinical Monograph for Pycnogenol. [Internet]. American Botanical Council. 2010. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi:http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Pycnog_FullMono120809_L OW.pdf
26. Sarikaki V, Rallis M, Tanojo H. In vitro percutaneous absorption of pine bark (Pycnogenol) in human skin. *J Tox Cutaneous Ocular Tox.* 2004;23(3):149-58.
27. Duweler KG, Rohdewald P. Urinary metabolites of French maritime pine bark extract in humans. *Pharmazie.* 2000;55(5):364-368.
28. Virgili F, Pagana G, Bourne L, Rimbach G, Natella F, Rice-Evans C, et al. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(8):1249-56.

29. Grimm T, Schafer A, Hogger P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic Biol Med.* 2004;36(6):811-22.
30. Sivonova M, Zitnanova I, Horakova L, Strosova M, Muchova J, Balgavy P. The Combined Effect of Pycnogenol with Ascorbic Acid and Trolox on the Oxidation of Lipids and Proteins. *Gen Physiol Biophys.* 2006;25:379-396.
31. Grimm T, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z, et al. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm (Lond).* 2006;3:1.
32. Peng YJ, Lee CH, Wang CC, Salter DM, Lee HS. Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(4):765-74.
33. Gulati OP. Pycnogenol in metabolic syndrome and related disorders. *Phytother Res.* 2015;29(7):949-68.
34. Gandin V, Nystrom C, Rundlof AK, Jonsson-Videsater K, Schonlau F, Horkko J, et al. Effects of the antioxidant Pycnogenol on cellular redox systems in U1285 human lung carcinoma cells. *FEBS J.* 2009;276(2):532-40.
35. Ansari MA, Keller JN, Scheff SW. Protective effect of Pycnogenol in human neuroblastoma SH-SY5Y cells following acrolein-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(11):1510-9.
36. de Moraes Ramos FM, Schonlau F, Novaes PD, Manzi FR, Boscolo FN, de Almeida SM. Pycnogenol protects against Ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytother Res.* 2006;20(8):676-9.
37. Kim SH, Lee IC, Lim JH, Moon C, Bae CS, Kim SH, et al. Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(2):109-15.
38. Frontela-Saseta C, Lopez-Nicolas R, Gonzalez-Bermudez CA, Peso-Echarri P, Ros-Berruezo G, Martinez-Gracia C, et al. Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol(R) in colon carcinoma cells. The effect of in vitro gastrointestinal digestion. *Phytother Res.* 2011;25(12):1870-5.
39. Sehirli OA, Sener G, Ercan F. Protective effects of pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Ren Fail.* 2009;31(8):690-697.
40. Deveraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids.* 2002;37(10):931-934.

41. Cho KJ, Yun CH, Chung AS. Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:141-56.
42. Mochizuki M, Hasegawa N. Therapeutic efficacy of pycnogenol in experimental inflammatory bowel diseases. *Phytother Res.* 2004;18(12):1027-8.
43. Schafer A, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z, et al. Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomed Pharmacother.* 2006;60(1):5-9.
44. Canali R, Comitato R, Schonlau F, Virgili F. The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(10):1145-9.
45. Farid R, Mirfeizi Z, Mirheidari M, Rezaieyazdi Z, Mansouri H, Esmaili H, et al. Pycnogenol supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis. *Nutrition Research.* 2007;27(11):692-7.
46. Suzuki N, Uebaba K, Kohama T, Moniwa N, Kanayama N, Koike K. French maritime pine bark extract significantly lowers the requirement for analgesic medication in dysmenorrhea: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Reprod Med.* 2008;53(5):338-46.
47. Chayasirisobhon S. Use of a pine bark extract and antioxidant vitamin combination product as therapy for migraine in patients refractory to pharmacologic medication. *Headache.* 2006;46(5):788-93.
48. Vinciguerra G1, Belcaro G, Cesarone MR, Rohdewald P, Stuard S, Ricci A ve ark. Cramps and muscular pain: prevention with pycnogenol in normal subjects, venous patients, athletes, claudicants and in diabetic microangiopathy. *Angiology.* 2006;57(3):331-9.
49. Choi YH, Yan GH. Pycnogenol inhibits immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells. *Phytother Res.* 2009;23(12):1691-5.
50. Wilson D, Evans M, Guthrie N, Sharma P, Baisley J, Schonlau F ve ark. A randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study to evaluate the potential of pycnogenol for improving allergic rhinitis symptoms. *Phytother Res.* 2010;24(8):1115-9.
51. Krizkova L, Chovanova Z, Durackova Z, Krajcovic J. Antimutagenic in vitro activity of plant polyphenols: Pycnogenol and Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Phytother Res.* 2008;22(3):384-8.
52. Aydin B, Unsal M, Sekeroglu ZA, Gulbahar Y. The antioxidant and antigenotoxic effects of pycnogenol® on rats treated with cisplatin. *Biol Trace Elem Res.* 2011;142(3):638-50.

53. Rohdewald P, Beil W. In Vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by pycnogenol®. *Phytotherapy Research*. 2008;22:685-688.
54. Kocabaş EEH, Yeşil Ö, İşleten M, Sukan FV. Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked red meat. *Gıda*. 2008;33(3):123-127.
55. Matsumori A, Higuchi H, Shimada M. French maritime pine bark extract inhibits viral replication and prevents development of viral myocarditis. *J Card Fail*. 2007;13(9):785-91.
56. Feng WY, Tanaka R, Inagaki Y, Saitoh Y, Chang MO, Amet T ve ark. Pycnogenol, a procyanidin-rich extract from French maritime pine, inhibits intracellular replication of HIV-1 as well as its binding to host cells. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:279-285.
57. Ezzikouri S, Nishimura T, Kohara M, Benjelloun S, Kino Y, Inoue K, et al. Inhibitory effects of Pycnogenol® on hepatitis C virus replication. *Antiviral Res*. 2015;113:93-102.
58. Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol reduces talc-induced neoplastic transformation in human ovarian cell cultures. *Phytother Res*. 2007;21(6):579-86.
59. Huynh HT, Teel RW. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cells (MCF-7) by pycnogenol. *Anticancer Res*. 2000;20(4):2417-20.
60. Huang WW, Yang JS, Lin CF, Ho WJ, Lee MR. Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk Res*. 2005;29(6):685-92.
61. Belcaro G, Cesarone MR, Genovesi D, Ledda A, Vinciguerra G, Ricci A, et al. Pycnogenol may alleviate adverse effects in oncologic treatment. *Panminerva Med*. 2008;50(3):227-34.
62. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci*. 2004;75(21):2505-13.
63. Schafer A, Hogger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):41-46.
64. Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(3):193-9.
65. Parveen K, Khan MR, Mujeeb M, Siddiqui WA. Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. *Chem Biol Interact*. 2010;186(2):219-27.
66. Schönlau F, Rohdewald P. Pycnogenol® for diabetic retinopathy. *International Ophthalmology*. 2002;24:161-171.

67. Steigerwalt R, Belcaro G, Cesarone MR, Di Renzo A, Grossi MG, Ricci A, et al. Pycnogenol improves microcirculation, retinal edema, and visual acuity in early diabetic retinopathy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009;25(6):537-40.
68. Kamuren ZT, McPeck CG, Sanders RA, Watkins JB. Effects of low-carbohydrate diet and pycnogenol® treatment on retinal antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 2006;22:10-18.
69. Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. Pycnogenol modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in high glucose-treated renal tubular cells. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2196-201.
70. Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, Ledda A, Di Renzo A, Stuard S ve ark. Diabetic ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with pycnogenol. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(3):318-23.
71. Cesarone MR, Belcaro G, Rohdewald P, Pellegrini L, Ledda A, Vinciguerra G, et al. Improvement of signs and symptoms of chronic venous insufficiency and microangiopathy with Pycnogenol: a prospective, controlled study. *Phytomedicine.* 2010;17(11):835-9.
72. Cesarone MR, Belcaro G, Rohdewald P, Pellegrini L, Ledda A, Vinciguerra G, et al. Improvement of Diabetic Microangiopathy With Pycnogenol(R): A Prospective, Controlled Study. *Angiology.* 2006;57(4):431-6.
73. Kralova E, Jankyova S, Mucaji P, Gresakova E, Stankovicova T. Pycnogenol(R) and its fractions influence the function of isolated heart in rats with experimental diabetes mellitus. *Pathol Res Pract.* 2015;211(2):156-61.
74. Zibadi S, Rohdewald PJ, Park D, Watson RR. Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation. *Nutr Res.* 2008;28(5):315-20.
75. Wei ZH, Peng QL, Lau BH. Pycnogenol enhances endothelial cell antioxidant defenses. *Redox Rep.* 1997;3(4):219-24.
76. Peng Q, Wei Z, Lau BH. Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(5):834-41.
77. Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S, Umemura T, Jitsuiki D, Soga J ve ark. Pycnogenol®, french maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertens Res.* 2007;30(9):775-780.
78. Blazsó G GR, Gábor M, Rűve HJ, Rohdewald P. ACE inhibition and hypotensive effect of procyanidins containing extract from the bark of *Pinus pinaster*. *Sol Pharm Pharmacol Lett.* 1996;6(1):8-11.
79. Golanski J, Muchova J, Golanski R, Durackova Z, Markuszewski L, Watala C. Does pycnogenol intensify the efficacy of acetylsalicylic acid in the inhibition of platelet function? In vitro experience. 2006;60:316-321.

80. Wang S, Duanjun T, Yusheng Z. The effects of Pycnogenol on the microcirculation, platelet function and ischemic myocardium in patients with coronary artery diseases. *Eur Bull Drug Res.* 1999;7:19-25.
81. Putter M, Grotemeyer KH, Wurthwein G, Araghi NM, Watson RR, Hosseini S ve ark. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. *Thromb Res.* 1999;95(4):155-161.
82. Araghi NM, Hosseini S, Larson DF, Rodhewald P, Watson RR. Pine bark extract reduces platelet aggregation. *Int Med.* 1999;2(2):73-77.
83. Belcaro G, Cesarone MR, Ricci A, Cornelli U, Rodhewald P, Ledda A, et al. Control of edema in hypertensive subjects treated with calcium antagonist (nifedipine) or angiotensin-converting enzyme inhibitors with Pycnogenol. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(4):440-4.
84. Sahebkar A. A systematic review and meta-analysis of the effects of pycnogenol on plasma lipids. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014;19(3):244-55.
85. Zibadi S, Yu Q, Rohdewald PJ, Larson DF, Watson RR. Impact of Pycnogenol® on cardiac extracellular matrix remodeling induced by l-NAME administration to old mice. *Cardiovascular Toxicology.* 2007;7(1):10-8.
86. Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, et al. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(1):380-7.
87. Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N. Hepatoprotective effects of pycnogenol in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Phytother Res.* 2012;26(10):1572-4.
88. Ko JW, Lee IC, Park SH, Moon C, Kang SS, Kim SH, et al. Protective effects of pine bark extract against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Lab Anim Res.* 2014;30(4):174-80.
89. Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BHS. Pycnogenol protects neurons from amyloid-b peptide-induced apoptosis. *Molecular Brain Research.* 2002;104:55-65.
90. Dvorakova M, Jezova D, Blazicek P, Trebaticka J, Skodacek I, Suba J, et al. Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (pycnogenol). *Nutr Neurosci.* 2007;10(3-4):151-7.
91. Belcaro G, Luzzi R, Cesinaro DRP, Cesarone MR, Dugall M, Feragalli B ve ark. Pycnogenol improvements in asthma management. *Panminerva Med.* 2011;53(3 Suppl 1):57-64.
92. Hosseini S, Pishnamazi S, Sadrzadeh SMH, Farid F, Farid D, Watson RR. Pycnogenol in the management of asthma. *Journal of Medicinal Food.* 2001;4(4):201-209.

93. Roseff SJ. Improvement in sperm quality and function with French maritime pine tree bark extract. *J Reprod Med.* 2002;47(10):821-824.
94. Kobori Y, Suzuki K, Iwahata T, Shin T, Sadaoka Y, Sato R, et al. Improvement of seminal quality and sexual function of men with oligoasthenoteratozoospermia syndrome following supplementation with L-arginine and Pycnogenol(R). *Arch Ital Urol Androl.* 2015;87(3):190-3.
95. Kohama T, Herai K, Inoue M. Effect of French maritime pine bark extract on endometriosis as compared with leuprorelin acetate. *J Reprod Med.* 2007;52(8):703-8.
96. Yang HM, Liao MF, Zhu SY, Liao MN, Rohdewald P. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial on the effect of Pycnogenol on the climacteric syndrome in peri-menopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(8):978-985.
97. Grether-Beck S, Marini A, Jaenicke T, Krutmann J. French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol(R)) Effects on Human Skin: Clinical and Molecular Evidence. *Skin Pharmacol Physiol.* 2016;29(1):13-7.
98. Kim YJ, Kang KS, Yokozawa T. The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(7):2466-71.
99. Blazso G, Gabor M, Schonlau F, Rohdewald P. Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res.* 2004;18:579-581.
100. Rohdewald P. Pycnogenol scientific file-section 19 Geneva, Switzerland: Horphag Research. 2005.
101. Rohdewald P. Pycnogenol protects DNA against oxidative damage in vivo. *Phytother Res.* 2005;19:262.
102. Taner G, Aydin S, Aytac Z, Basaran AA, Basaran N. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic potential of Pycnogenol(R) in in vitro mammalian cells. *Food Chem Toxicol.* 2013;61:203-8.
103. Chovanova Z, Muchova J, Sivonova M, Dvorakova M, Zitnanova I, Waczulikova I, et al. Effect of polyphenolic extract, Pycnogenol, on the level of 8-oxoguanine in children suffering from attention deficit/hyperactivity disorder. *Free Radic Res.* 2006;40(9):1003-10.
104. Li YY, Feng J, Zhang XL, Cui YY. Pine bark extracts: nutraceutical, pharmacological, and toxicological evaluation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;353(1):9-16.
105. Arcangeli P. Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Fitoterapia.* 2000;71:236-244.
106. Belcaro G, Cesarone MR, Errichi S, Zulli C, Errichi BM, Vinciguerra G, et al. Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol. The SVOS (San Valentino Osteo-arthritis Study). Evaluation of signs, symptoms, physical performance and vascular aspects. *Phytother Res.* 2008;22(4):518-23.

107. Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia S. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Back N, Cohen IR, Kritchevsky D, Lajtha A, Paoletti R. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 595. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2007.
108. Ammon PTH, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*. 1991; 57:1-7.
109. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.
110. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J*. 2013;15(1):195-218.
111. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. 2003;23:363-398.
112. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(11):1631-52.
113. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1056:206-17.
114. Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114(2):127-49.
115. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955-68.
116. Dulbecco P, Savarino V. Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World J Gastroenterol*. 2013;19(48):9256-70.
117. Kolev TM, Velcheva EA, Stamboliyska BA, Spitteller M. DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2005;102(6):1069-79.
118. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol. Et Toxicol*. 1978;43:88-92.
119. Holder, GM, Plummer JL, Ryan AJ. The Metabolism and Excretion of Curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,s-dione) in the Rat. *Xenobiotica*. 1978;8(12):761-768.
120. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin -- studies with [³H]curcumin. *Toxicology*. 1982;22:337-344.
121. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition*. 1999;27(1):486-494.
122. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;853(1-2):183-9.

123. Cheng AL, HSU CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS ve ark. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*. 2001; 21:2895-2900.
124. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R ve Srinivas PSSR. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Medica*. 1998;64:353-356.
125. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR ve ark. Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin: Biomarkers of Systemic Activity and Compliance. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(15):6847-6854.
126. Lao CD, Ruffin MTt, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:10.
127. Marczylo TH, Steward WP, Gescher AJ. Rapid analysis of curcumin and curcumin metabolites in rat biomatrices using a novel ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method. *J. Agric. Food Chem*. 2009;57:797-803.
128. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*. 2007;330(1-2):155-63.
129. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J*. 2009;11(3):495-510.
130. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA ve ark. Chemopreventive Efficacy and Pharmacokinetics of Curcumin in the Min/+ Mouse, a Model of Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 2002;11;535-540.
131. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(6):807-818.
132. Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*. 2004;90(5):1011-5.
133. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(6):1411-7.
134. Shen L, Liu CC, An CY, Ji HF. How does curcumin work with poor bioavailability? Clues from experimental and theoretical studies. *Sci Rep*. 2016;6:20872.
135. Ireson C, Orr S, Jones DJL, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL ve ark. Characterization of Metabolites of the Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Hepatocytes and in the Rat in Vivo, and Evaluation of Their Ability to Inhibit Phorbol Ester-induced Prostaglandin E2 Production. *Cancer research*. 2001;61:1058-64.

136. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1765-73.
137. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1894–900.
138. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*. 2006;78(18):2081-7.
139. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Alperi JD, Ramirez A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2002;34:37-46.
140. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol*. 1994;46(12):1013-6.
141. Thiagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*. 2004;74(8):969-85.
142. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review*. 2009;14(2):141-153.
143. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):40-59.
144. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kB is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). *The Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(42):24995-25000.
145. Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1671-9.
146. Ciolino HP, Daschner PJ, Wang TTY, Yeh GC. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome p450 1a1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 1998;56:197-206.
147. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*. 2007;27(1):19-35.
148. Chen J, Wang FL, Chen WD. Modulation of apoptosis-related cell signalling pathways by curcumin as a strategy to inhibit tumor progression. *Mol Biol Rep*. 2014;41(7):4583-94.

149. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 2005;223(2):181-90.
150. Senft C, Polacin M, Priester M, Seifert V, Kogel D, Weissenberger J. The nontoxic natural compound Curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas. *BMC Cancer.* 2010;10:491.
151. Moos PJ, Edes K, Mullally JE, Fitzpatrick FA. Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(9):1611-7.
152. Sen S, Sharma H, Singh N. Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(4):1245-52.
153. Han S, Yang Y. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. *Dyes and Pigments.* 2005;64(2):157-61.
154. Moghaddam KM, Iranshahi M, Yazdi M, Shahverdi AR. The combination effect of curcumin with different antibiotics against *Staphylococcus aureus*. 2009;3(2):141-143.
155. Zhang DW, Fu M, Gao SH, Liu JL. Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:636053.
156. Best L, Elliott AC, Brown PD. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(11):1768-75.
157. Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Tsukagawa M, Mimaki Y, Kuroda M. Curcuminoids and Sesquiterpenoids in Turmeric (*Curcuma longa* L.) Suppress an Increase in Blood Glucose Level in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005;53:959-963.
158. Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF-alpha. *Phytother Res.* 2007;21(3):278-83.
159. Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology.* 2013;11:338-378.
160. Baum L, Ng A. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. *Journal of Alzheimer's Disease.* 2004;6:367-377.
161. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an alzheimer transgenic mouse. *The Journal of Neuroscience.* 2001;21(21):8370-8377.

162. Ringman JM, Frautschy SA, Teng E, Begum AN, Bardens J, Beigi M ve ark. Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. 2012;4(43):1-8.
163. Jagatha B, Mythri RB, Vali S, Bharath MM. Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion in vitro and in vivo: therapeutic implications for Parkinson's disease explained via in silico studies. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(5):907-17.
164. Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(7):974-979.
165. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(10):1967-80.
166. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *British Journal of Pharmacology.* 1998;124:425-427.
167. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, Roomi A, Mahmood H, Saeed SA ve ark. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling. 1999;58(7):1167-72.
168. Li HL, Liu C, de Couto G, Ouzounian M, Sun M, Wang AB, et al. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2008;118(3):879-93.
169. Rajasekaran SA. Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011;2(1):1-14.
170. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4(12):1502-6.
171. Kim DC, Kim SH, Choi BH, Baek NI, Kim D, Kim MJ. Curcuma longa Extract Protects against Gastric Ulcers by Blocking H2 Histamine Receptors. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(12):2220-2224.
172. Naik SR, Thakare VN, Patil SR. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol.* 2011;63(5):419-31.
173. Wang Y, Hu PC, Gao FF, Lv JW, Xu S, Kuang CC, et al. The protective effect of curcumin on hepatotoxicity and ultrastructural damage induced by cisplatin. *Ultrastruct Pathol.* 2014;38(5):358-62.
174. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC ve ark. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen.* 1998;6(2):167-177.

175. Phan TT, See P, Lee ST, Chan SY. Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *Protective Effects of Curcumin against Oxidative Damage on Skin Cells In Vitro: Its Implication for Wound Healing*. The Journal of Trauma Injury Infection and Critical Care. 2001;51(5):927-931.
176. GRAS Notice (GRN) No.460. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi: <http://www.curcuminoids.com/gras/CurcuminC3ComplexGRASStatus.pdf>.
177. Lilja HS, Hagopian M, Esber HJ, Fleischman RW, Russfield AB, Tiedemann KM. Report on the subchronic toxicity by dosed feed of turmeric oleoresin (C60015) in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. EGG Mason Research Institute, Report No. MRI-NTP 11-83-22., Submitted to WHO by the National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC, USA. 1983.
178. Majeed M, Badmaev V, Shivakumar U, Rajendran R. *Curcuminoids. Antioxidant Phytonutrients*, Piscataway, NJ: Nutriscience Publishers, Inc. 1995.
179. Sambaiah, K., Ratnkumar, S., Kamanna, V.S., Satyanarayana, M., Rao, M.V., 1982. Influence of turmeric and curcumin on growth, blood constituents, and serum enzymes in rats. *J Food Sci Technol*. 1982;19:187-190.
180. NTP, National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of turmeric oleoresin (CAS No. 8024-37-1) (Major Component 79%-85% curcumin, CAS No. 458-37-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed studies). Technical Report Series No. 427, NIH, Publication No. 93-3158. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC. 1993.
181. Dadhaniya P, Patel C, Muchhara J, Bhadja N, Mathuria N, Vachhani K, et al. Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(8):1834-42.
182. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive. 1994; 35. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je09.htm>.
183. Ishidate M, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayahshi M, Nohmi T, Sawada M ve ark. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol*. 1984;22:623-636.
184. Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, Speck W, TaMer B, Zeiger E. Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ Mutagen*. 1986;8(Suppl 7):1-119.
185. Giri AK, Food dyes of India: mutagenic and clastogenic potentials-a review. *Indian Natl Sci Acad*. 1991;B57(3 and 4):183-198.
186. Vijayalaxmi. Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rats. *Mutation Research*. 1980;79:125-132.

187. Blasiak J, Trzeciak A, Kowalik J. Curcumin damages DNA in human gastric mucosa cells and lymphocytes. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1999;18:271-276.
188. Abraham SK, Kesavan PC. Genotoxicity of garlic, turmeric and asafoetida in mice. *Mutation Research.* 1984;136:85-88.
189. Cao J, Jiang LP, Liu Y, Yang G, Yao XF, Zhong LF. Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol.* 2007;49(8):1219-22.
190. Giri AK, Das SK, Talukder G, Sharma A. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations induced by curcumin and tartazine on mammalian cells in vivo. *Cytobios.* 1990;62:111-117.
191. Ganiger S, Malleshappa HN, Krishnappa H, Rajashekhar G, Ramakrishna Rao V, Sullivan F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(1):64-9.
192. Liddle M, Hull C, Liu C, Powell D. Contact Urticaria from Curcumin. *Dermatitis.* 2006;17(4):196-7.
193. Lucas CD, Hallagan JB, Taylor SL. The role of natural color additives in food allergy. *Adv Food Nutr Res.* 2001;43:195-216.
194. WHO, Dünya Sağlık Örgütü. Monographs on Selected Medicinal Plants. 1999;(1). Geneva.
195. Jiao Y, Wilkinson Jt, Di X, Wang W, Hatcher H, Kock ND, et al. Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator. *Blood.* 2009;113(2):462-9.
196. Hsu CH, Cheng AL. Clinical studies with curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:471-80.
197. Epelbaum R, Schaffer M, Vigel B, Badmaev V, Bar-Sela G. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutr Cancer.* 2010;62(8):1137-41.
198. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(14):4491-9.
199. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
200. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep.* 2003;10(6):1663-82.
201. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.

202. Rosenberg B, Camp LV, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;205:698-699.
203. Frezza M, Hinds S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2010;16(16):1813-1825.
204. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003;1:47-61.
205. Crom WR, Barnhart AMG, Rodman JH, Teresi ME, Kavanagh RE, Christensen ML et al. Pharmacokinetics of anticancer drugs in children. *Clinical Pharmacokinetics*. 1987;12:168-213.
206. O'dwyer, PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs*. 2000;29(4):19-27.
207. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother*. 2003;4(6):889-901.
208. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M, et al. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*. 2013;24(10):1007-19.
209. Himmelstein KJ, Patton TF, Belt RJ, Taylor S, Repta AJ, Sternson LA. Clinical kinetics of intact cisplatin and some related species. *Clin Pharmacol Ther*. 1981;29(5):658-64.
210. Go RS1, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*. 1999;17(1):409-22.
211. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology*. 2016;371:58-66.
212. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.
213. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.
214. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14298-302.
215. Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(2):79-85.
216. Paolicchi A, Lorenzini E, Perego P, Supino R, Zunino F, Comporti M, et al. Extra-cellular thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression: Implications for cell

- response to platinum-based drugs. *International Journal of Cancer*. 2002;97(6):740-5.
217. El-Awady el SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):335-41.
 218. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degridasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2008;28(1): 63-92.
 219. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-59.
 220. Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*. 2004;195(2-3):221-30.
 221. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(6):1176-83.
 222. Koivusalo R, Krausz E, Ruotsalainen P, Helenius H, Hietanen S. Chemoradiation of Cervical Cancer Cells: Targeting Human Papillomavirus E6 and p53 Leads to Either Augmented or Attenuated Apoptosis Depending on the Platinum Carrier Ligand. *Cancer Research*. 2002;62:7364-7371.
 223. Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF-alpha production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(2):F812-9.
 224. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007;334(2):115-24.
 225. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008;73(9):994-1007.
 226. Vickers A, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney Slices of Human and Rat to Characterize Cisplatin-Induced Injury on Cellular Pathways and Morphology. *Toxicologic Pathology*. 2004;32(5):577-90.
 227. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2010;2(11):2490-518.
 228. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*. 2001;59:657-663.
 229. Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H ve ark. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2002;451:203-208.

230. Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(3):186-9.
231. Klaassen CD, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. Baskı, McGraw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division, USA, 2001.
232. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 8. Baskı, Cilt 1-2, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şirketi, Ankara, 1998.
233. Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, Vannozzi MO, Otone M, Bocchini V ve ark. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2002;442:265-272.
234. Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B, et al. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health*. 2005;21(3):67-73.
235. Liao Y, Lu X, Lu C, Li G, Jin Y, Tang H. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res*. 2008;57(2):125-31.
236. Wood PA, Hrushesky WJ. Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1650-9.
237. Bano, 2013.pdf
238. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncol Rep*. 2013;29(4):1285-1292.
239. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*. Third edition, Humana Press, Totowa, 2005.
240. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg*. 2011;21(2):141-149.
241. Nicholson JW. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. The Royal Society of Chemistry, RSC Publishig, Cambridge, 2002.
242. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomics*. 2009;3:33-41.
243. R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition, John Wiley & Sons. 2005.
244. Jenkins N. *Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology* Totawa NJ, Humana Press. 2007.
245. Moharamzadeh K, Franklin KL, Brook IM, van Noort R. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. *J Periodontol*. 2009;80(5):769-75.

246. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
247. Hansen CH, Br nner N. MTT-cell proliferation assay. *Cell Biology: a Laboratory Handbook*. 2nd Ed. Academic Press. San Diego. 1998.
248. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 1997;69(2):581-593.
249. Li Y, Huang W, Huang S, Du J, Huang C. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422(1):85-90.
250. Chaung W, Mi L, Boorstein RJ. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(5):992-994.
251. Doehmer J. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology*. 1993;82:105-118.
252. ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center. [Erişim tarihi 3 Ocak 2017]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.
253. Akçalı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının  nemi. *T rk Onkoloji Dergisi*. 2010;25(3):119-123.
254. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:315-9.
255. Scheeffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:5523-5527.
256. Adey A, Burton JN, Kitzman JO, Hiatt JB, Lewis AP, Martin BK, et al. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*. 2013;500(7461):207-11.
257. Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In vitro Cell Dev Biol*. 2004;40:172-182.
258. Terrada DL, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1512-5.
259. Moron BE, Montano JMC, Salvador J, Robles A, Lazaro ML. The dark side of curcumin. *Int J Cancer*. 2010;126:1771-1775.
260. Yang IH, Shin JA, Kim LH, Kwon KH, Cho SD. The caspase 3!dependent apoptotic effect of pycnogenol in human oral squamous cell carcinoma HSC!3 cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2016;58(1):40-47.

261. Koozpar ZK, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. *Iran J Cancer Preven.* 2015;8(3):e2331.
262. Abdel-Lateef E, Mahmoud F, Hammam O, El-Ahwany E, El-Wakil E, Kandil S ve ark. Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). *Acta Pharm.* 2016;66:387-398.
263. Ding L, Ma S, Lou H, Sun L, Ji M. Synthesis and Biological Evaluation of Curcumin Derivatives with Water-Soluble Groups as Potential Antitumor Agents: An in Vitro Investigation Using Tumor Cell Lines. *Molecules.* 2015;20:21501-12.
264. Nurcahyanti ADR, Wink M. L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. *PeerJ.* 2016; DOI: 10.7717/peerj.1542.
265. Baharuddin P, Satar N, Fakiruddin KS, Zakaria N, Lim MN, Yusoff NM ve ark. Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through p21 and cyclin D1-mediated tumour cell inhibition in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Reports.* 2016;35:13-25.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Bildiriler

S98

Abstracts / Toxicology Letters 258S (2016) S62–S324

P03-020
Effects of pycnogenol on cisplatin cytotoxicity in HeLa cellsM. Becit^{1,*}, S. Aydın¹, A.A. Basaran², N. Basaran¹¹ Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

Phenolic compounds are protective agents against oxidative stress-related diseases. They can play an important role in the preventing DNA damage, regulating DNA repair mechanisms, inhibiting carcinogenesis. Pycnogenol (PYC), natural dried extract obtained from the bark of *Pinus pinaster*, is commonly consumed as a dietary food supplement due to its strong antioxidant activity. The anticancer effect of PYC has been the subject of many researches. It is believed that some natural compounds might reduce the development of cancer. However, there are not sufficient studies on the interactions between antineoplastic drugs and natural phenolic compounds. Cisplatin is an anti-cancer chemotherapy drug to treat many types of cancer including esophageal, lung, breast, ovarian, bladder, cervical, and prostate cancers. This study was focused on the effects of pycnogenol on the cytotoxicity of cisplatin in HeLa cells using Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) assay. The IC50 doses of cisplatin in HeLa cells for 24 h and 48 h were found to be 22.4 μ M and 12.3 μ M, respectively. The IC50 doses of PYC in HeLa cells for 24 h and 48 h were found to be 502 μ M and 409 μ M, respectively. PYC significantly increased the cytotoxicity of cisplatin in HeLa cells at all studied concentrations of 15.6–500 μ M for 24 h and 250–500 μ M for 48 h. Our results suggest that PYC might contribute to the anticancer effect of cisplatin in cervical carcinoma, but further in vitro studies with other cancer cell lines as well as in vivo studies are needed.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1421>**P03-021**
Wine Lees: A possible agent in the epigenetic therapy against hepatocarcinogenesisZ. Fernández-Bedmar¹, J. Anter¹, S. Guil-Luna², J. de las Mulas², Y. Millán², M. Luque de Castro³, P. Delgado de la Torre³, M. Mateo-Fernández¹, T. Merinas-Amo^{1,*}, Á. Alonso-Moraga¹¹ Department of Genetics, Gregor Mendel Building, Faculty of Science, University of Córdoba, Córdoba, Spain² Department of Comparative Pathology, Veterinary Medicine Faculty, University of Córdoba, Córdoba, Spain³ Department of Analytical Chemistry, University of Córdoba, Córdoba, Spain

Nowadays there is an urgent need to find new strategies to reduce the incidence of hepatocellular carcinoma. Selective-focused diets are considered a preventive strategy for this cancer. Grapes polyphenols exert beneficial effects on degenerative diseases. Wine lees are sediments consisting of residues of yeast cells, skin and grape seeds. These sediments provide certain organoleptic properties and improve the physicochemical stability of the wine. However, their role in the wine anticarcinogenic effects is yet unknown. In order to study the anticarcinogenic effects of wine lees, a diethylnitrosamine (DEN) induced rat hepatocarcinogenesis bioassay was followed. The global methylation patterns using the Alu-M2 repetitive element as a global methylation marker and the concurrent macroscopic and histological effects induced by these

sediments and diethylnitrosamine have been evaluated. The results showed a hypermethylation of the Alu-M2 repetitive sequence in the rat genome by DEN. The rats co-treated with DEN and wine lees reduced the methylation level (hipomethylation) of the repetitive sequence at all concentrations of white lees (1000, 2000 and 4000 ppm) and at the lowest concentration of red lees (1000 ppm). An improvement of the hepatocellular architecture and a reduction of the mitotic index by white (1000 and 4000 ppm) and red (1000 ppm) lees respect to the DEN-control group was observed at histopathological level. In conclusion, these findings suggest that the wine lees could be considered as a possible epigenetic therapy option in the treatment of the hepatocellular carcinoma.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1422>**P03-022**
n-3 Polyunsaturated fatty acids alter benzo[a]pyrene toxicity in a model of human colon cancer cellsZ. Tylichova^{1,*}, J. Neča², M. Machala², J. Topinka³, A. Milcová³, J. Hofmanová¹, A. Kozubík¹, J. Vondráček¹¹ Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic² Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic³ Institute of Experimental Medicine ASCR, Prague, Czech Republic

Diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) has been proposed to provide anti-tumor protection and several epidemiologic studies have suggested a decrease in colorectal cancer risk among individuals consuming diets high in PUFAs. The primary aim of this study was to investigate the effect of two major PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), on genotoxic effects of benzo[a]pyrene (BaP), a carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon that can be found at significant levels in processed food. We hypothesized that addition of physiological dose of EPA and DHA might interfere with BaP metabolism/bioactivation and/or alter its toxic effects. Using a model of human colon cells – colon carcinoma HCT-116 cell line – we analyzed the impact of PUFAs on BaP metabolism and induction of DNA damage. HCT-116 cells are able to metabolize and bioactivate BaP, via the cytochrome P450 family 1 (CYP1) enzymes, which in turn leads to formation of covalent DNA adducts. We observed that cells treated with either EPA or DHA exhibited significantly lower CYP1 activity that was determined as ethoxyresorufin-O-deethylase activity. Application of both PUFAs also significantly reduced formation of covalent DNA adducts in HCT-116 cells, as determined by 32P-postlabeling, or further genotoxic events. However, only EPA decreased the formation of major BaP metabolites, while DHA had no apparent effect on their levels. Thus both PUFAs may limit bioactivation and genotoxic effects of BaP in colon epithelial cells; however, they may act through different mechanisms.

Supported by the Czech Science Foundation, project no. 13-09766S.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1423>

P16-073
Expression of H3K9ac, H3K9me2 mediated by signal pathway of NMDAR-ERK in the hippocampus of rats chronically exposed to aluminum



Q. Niu*, Z. Li, P. Kang, Q. Zhang, X. Lu, J. Nie, J. Song, L. Wang

School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, China

To explore the impact of chronic aluminum exposure on learning and memory ability through histone modification by studying the changes of N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAR), extracellular regulated protein kinases (Phospho-ERK) H3K9ac, H3K9me2, HP1, and BDNF in rat hippocampus.

Methods: 24 healthy SPF grade SD male rats were randomly divided into four groups by weight, including control group and low, medium, high dose aluminum exposed group, 6 rats in each group. The Al-exposed rats drank water containing different doses of aluminum chloride ($AlCl_3$) (2, 12, and 72 mg/kg Al^{3+}) for 120 days, expression of NMDAR, P-ERK, H3K9ac, H3K9me2, HP1, and BDNF was detected with Western blot.

Results: The results of Western-blot test demonstrated that the expression of NMDAR in the Al-exposed groups were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$), and P-ERK, H3K9ac, and BDNF in the Al-exposed groups were significantly lower than those of the control group too ($P < 0.01$), while the expressions of H3K9me2 and HP1 in the Al-exposed groups were both significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Chronic aluminum exposure may change the histone modification via inhibiting the signal pathway of NMDAR-ERK, and therefore impair the ability of learning and memory in rats.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1912>

P16-074
Fumonisin B1 affects "in vitro" intestinal epithelial cell barrier integrity and reduces claudin expression



M.R. Martínez Larrañaga*, M.A. Martínez, I. Ares, E. Ramos, V. Castellano, M. Martínez, A. Anadón, A. Romero

Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Although the literature about mycotoxins is rich in reports investigating cellular mechanisms, cellular toxicity, associated pathology and animal performance, studies on the effect of these compounds on the gastrointestinal tract is limited. The intestinal tract represents the first barrier to ingested chemicals or food contaminants. The gut barrier is formed to a large extent by tight junctions, the most important components of the intercellular junctional complexes regulating cell adhesion and selective permeability in the gut. Because of transmembrane proteins claudins and occludin determine adhesion and permeability characteristics of the epithelium in terms of specificity and tightness, the aim of the present study was to evaluate the expression of claudin-3, claudin-4 and occludin in Caco-2 cells exposed to Fumonisin 1 (FB1). Our results showed that FB1 treatment strongly reduced the expression of claudin-3, claudin-4 and occludin. The decrease of mRNA expression of claudin-3 reached values of 29%, 36%, 38% and 60% for cells treated with 1, 3, 10 and 30 μ M FB1, respectively. The decrease of mRNA expression of claudin-4 reached values of 40%, 58%, 60% and 80% for cells treated with 1, 3, 10 and 30 μ M FB1, respectively. The decrease of mRNA expression of occludin reached values of 70%,

80%, 80% and 92% for cells treated with 1, 3, 10 and 30 μ M FB1, respectively. These observations may help to explain, at a molecular level, some of the "in vivo" effects of these mycotoxins on the intestine.

Acknowledgements: Work supported by Project S2013/ABI-2728 (Programa ALIBIRD-Comunidad de Madrid).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1913>

P16-075
Cytotoxicity of deoxynivalenol and cytoprotection of antioxidants in Caco-2 cells



M. Iula, C. Fernández Blanco, A. Juan García, G. Font, M. Ruiz*

Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain

Deoxynivalenol (DON) is a secondary metabolite of Fusarium fungi producing cell injury. When antioxidant agents (polyphenols and vitamins), commonly present in vegetables, are simultaneously ingested with DON, cytotoxic effects can be interfered. Aims of this work were to determine mechanisms of DON-inducing cell damage and cytoprotection effect of antioxidants in Caco-2 cells. Cytotoxic effect of DON was determined by MTT assay. Reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation (LPO) were determined using the fluorescein and TBARS assays, respectively. To determine cytoprotection of antioxidant, Caco-2 cells previously exposed to different concentrations of quercetin, pterostilbene, vitamin C and vitamin E (5, 25 and 50 μ M) were treated with DON. IC50 values obtained were 9.5 (48 h) and 7 (72 h) μ M, while no IC50 value was obtained after 24 h. Oxidative stress and cellular antioxidant protection were assayed at 0.5 and 1 μ M DON. LPO increased by 33% after 1 μ M DON. ROS generation increased in time dependent manner. The highest increases obtained were 30% (0.5 μ M DON) and 40% (1 μ M DON) at 15 min exposure. Cell viability increased at 25 and 50 μ M vitamin C and quercetin, respectively compared to cells exposed to DON; increases were from 20% to 25% and from 12% to 28% for vitamin C and quercetin, respectively. Cytotoxicity of DON was prevented by vitamin C and quercetin.

Acknowledgments: This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2013-43194-P).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1914>

P16-076
Effects of curcumin on cisplatin cytotoxicity in HeLa cells



S. Aydin^{1,*}, M. Becit¹, A. Basaran², N. Basaran¹

¹ Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

Phenolic compounds, because of their antioxidant properties, have an important role in the prevention of aging, cancer, and several degenerative and genetic diseases. Curcumin, a phenolic compound, obtained from *Curcuma longa*, has some beneficial health effects such as antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic, and antimutagenic effects. The combination of some plant derived compounds, especially phenolic compounds, with antineoplastic drugs such as cisplatin has been suggested to increase the anticancer effects and also decrease their adverse effects in the chemotherapy. However, there are limited studies

on the anticancer effects of curcumin. The aim of this study was to evaluate whether curcumin affected the cytotoxicity of cisplatin in HeLa cells using Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) assay. The IC50 doses of curcumin in HeLa cells were found to be 403 μM and 320 μM for 24 h and 48 h, respectively. The IC50 doses of cisplatin in HeLa cells were found to be 22.4 μM and 12.3 μM for 24 h and 48 h, respectively. It was found that at the studied doses (15.2–250 μM), curcumin did not change the cytotoxicity of cisplatin in HeLa cells for 24 h and 48 h. However, at the highest concentration of curcumin (500 μM), the cell viability was found to be reduced (26.4% and 31.5%, for 24 h and 48 h, respectively, versus cisplatin treatment). In conclusion, our results suggest that curcumin seems not to show anticancer effect with cisplatin in cervical carcinoma.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1915>

P16-077
Cytotoxic and genotoxic effects of thymoquinone in different cell lines



S. Aydin^{*}, P. Guzelsoy, N. Basaran

Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

Thymoquinone (TQ), the main active phenolic compound from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds is commonly used in traditional medicine for several diseases due its high antioxidant properties. It has been reported to have many beneficial effects such as antiinflammatory, antimicrobial, antidiabetic, and anticancer in vitro and in vivo experiments. This study was focused on the cytotoxicity of TQ in different cell lines using Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue (MTT) assay for 24 h and the genotoxicity of TQ in human lymphocytes for 2 h using alkaline comet assay. DNA damage was expressed as DNA tail moment. The IC50 doses of TQ were found to be 102 μM , 461 μM , and 364 μM in Chinese hamster fibroblast (V79), human cervix adenocarcinoma (HeLa) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells, respectively. In human lymphocytes, TQ alone did not induce DNA damage at the concentrations of 1–10 μM . However, at the higher concentrations (25 μM and 50 μM), it significantly induced DNA strand breakages ($p < 0.05$). TQ at the concentrations of 1–50 μM significantly reduced 50 μM H₂O₂-induced DNA damage ($p < 0.05$). In conclusion, our results suggest that TQ, having different cytotoxicity profiles according to cell types, might have a role on the prevention of oxidative stress-related disorders and also some types of cancer but in order to have a more pronounced results, the further in vitro and in vivo studies are required.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1916>

P16-078
Association between MDR1 C1236T polymorphism and blood, hair and urinary mercury levels in Turkish women



Z. Kayaaltı^{1,*}, D. Kaya Akyüzlü¹, F. Özdemir¹, B. Yüksel², T. Söylemezoğlu¹

¹ Ankara University, Institute of Forensic Sciences, Ankara, Turkey

² Turkish National Police, Ankara Police Forensic Laboratory, Ankara, Turkey

Phospho-glycoprotein (P-gp) protects the human body against potentially toxic compounds by extruding a wide range of chemically and structurally different substrates out of the cells. This

protein is encoded by human multidrug resistance 1 (MDR1) gene. To assess the effect of MDR1 C1236T polymorphism on mercury levels, blood, hair and urine samples were collected from 110 Turkish women. Mercury levels of blood, hair and urine were quantified by cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS). MDR1 C1236T polymorphism was detected standard PCR-RFLP technique. The MDR1 C1236T genotype frequencies of mothers were 30% homozygote typical (CC), 50.91% heterozygote (CT) and 19.09% homozygote atypical (TT). The mean mercury levels of blood, hair and urine were 3.28 \pm 1.38 $\mu\text{g/L}$, 122.64 \pm 282.94 $\mu\text{g/kg}$ and 2.78 \pm 2.47 $\mu\text{g/L}$, respectively. When the mercury levels were evaluated according to the MDR1 C1236T genotypes, it was found that women with TT genotypes had lower blood, hair and urinary mercury levels than those with CC and CT genotypes, but these results were not statistically significant ($p > 0.05$). Our study results indicated that MDR1 C1236T polymorphism was not associated with blood, hair and urinary mercury levels in Turkish women. However, we thought that these associations may be observed in larger population studies.

This study is supported by the Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP; Project Number: 15B0217001).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1917>

P16-079
Quercetin upregulate PON2 gene expression and ameliorate chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat brain



S. Ghahramani¹, M. Soodi^{1,*}, A. Atashi²

¹ Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Chlorpyrifos as an organophosphates compound inhibits acetylcholinesterase (AChE) enzyme and induces oxidative stress in the brain. Quercetin is a flavonoid with anti-oxidant and neuroprotective activities. It is reported that quercetin increases expression of paraoxanase2 enzyme (PON2) in cultured neural cells resulted in neuroprotection against oxidant insults. PON2 is a lactonase expressed in brain and has anti-oxidant and anti-inflammatory activities. The aim of this study is to evaluate protective effect of quercetin against chlorpyrifos-induced oxidative stress and PON2 expression in the brain tissue. The rats were divided into four groups: control (corn oil), CPF (10 mg/kg), quercetin (20 mg/kg) and CPF+quercetin. All animals orally treated once per day for one month. The PON2 gene expression was quantified by real time PCR method. Oxidative stress markers were measured in brain tissue and AChE activity was measured in brain and serum. Chlorpyrifos inhibited 67% and 57% AChE activity in brain and serum respectively. Co-administration of quercetin was not affect on AChE activity inhibition by CPF. Chlorpyrifos increased lipid peroxidation and decreased antioxidant enzyme activities and total thiol content which indicates oxidative stress. Co-administration of quercetin ameliorated oxidative stress markers. The expression of PON2 gene was significantly increased in all treated groups compared with control group and also expression of PON2 gene was significantly increased in quercetin and quercetin-chlorpyrifos treated groups compared with chlorpyrifos treated group. Results of the present study indicate that quercetin improves chlorpyrifos-induced oxidative stress and this effect may be done through increased upregulation of PON2 gene as an antioxidant enzyme.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1918>

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Merve BECİT

Doğum yeri ve tarihi: Erzurum, 1992.

Uyruğu: T.C.

İletişim adresi: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD

Yazışma adresi: mervebecit@hotmail.com

Telefon: +904422315200 Dahili: 5241

II. Eğitimi

Yılı	Derecesi	Üniversite	Öğrenim Alanı
2014-	Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Farmasötik Toksikoloji
2014-	Doktora	Atatürk Üniversitesi	Tıbbi Farmakoloji
2014	Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Eczacılık (82.03/100)

III. Mesleki Deneyimi

Görev Dönemi	Ünvan	Bölüm	Üniversite
2014-	Arş. Gör. Ecz.	Farmakoloji AD	Atatürk Üniversitesi

IV. Bilimsel Faaliyetleri

Çalışma Alanı	Anahtar Sözcükler
- Kimyasal ajanların ve bitkisel kaynaklı maddelerin genotoksisite ve sitotoksisitesi. - Deneysel hayvan modelleri.	Sitotoksisite, fenolik maddeler, kanser, deney hayvanları.

