

**BENZİL BENZOATIN SİTOKSİSİTESİNİN *İN VİTRO*
KOŞULLAR ALTINDA ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF BENZYL BENZOATE CYTOTOXICITY
UNDER *İN VİTRO* CONDITIONS**

ASLI KARTAL

Prof. Dr. GÜLDENİZ SELMANOĞLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2015

ASLI KARTAL'ın hazırladığı “**BENZİL BENZOATIN SİTOTOKSİSİTESİNİN İN VİTRO KOŞULLAR ALTINDA ARAŞTIRILMASI**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr., Terken BAYDAR)

Danışman

(Prof. Dr., Güldeniz SELMANOĞLU)

Üye

(Prof. Dr., Nurhayat BARLAS)

Üye

(Prof. Dr., Arzu Evrim KOÇKAYA)

Üye

(Doç. Dr., Ö. Aylin GÜRPINAR)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Yoluma ışık olan
Kök Kadınları'na
ve
Babaannem'e**

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/01/2015

ASLI KARTAL

ÖZET

BENZİL BENZOATIN SİTOTOKSİSİTESİNİN *İN VİTRO* KOŞULLAR ALTINDA ARAŞTIRILMASI

ASLI KARTAL

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. GÜLDENİZ SELMANOĞLU

Ocak 2015, 77 sayfa

Benzil benzoat kozmetik, ilaç, gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan bir bileşiktir. Başlıca kullanım şekli akarisit/skabisit olmakla beraber; sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinden de birisidir. Bu çalışmada L929 fare fibroblast hücrelerinde benzil benzoatın sitotoksitesi MTT [3-(4,5- dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi, laktat dehidrogenaz (LDH) testi, tripan mavisi boyama ve nötral kırmızı alım testleriyle incelenmiştir. Ayrıca hücresel reaktif oksijen türleri (ROS) tespiti için dikloroflorosein diasetat (DCFDA) testi ve hücre ölüm şeklini belirlemek amacıyla da akridin oranj - propidyum iyodit ikili boyaması yapılmıştır.

Yapılan MTT analizleri sonucu benzil benzoatın L929 hücrelerinde LC₅₀ değeri 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri için sırasıyla 21 mM ve 18 mM olarak bulunmuştur. Benzil benzoatın uygulanan konsantrasyonlarında L929 hücrelerinde ROS üretiminde artışa, yapılan sitotoksite test sonuçlarına göre mitokondriyal işlev bozukluğuna, hücresel membran bütünlüğünde bozulmalara ve lizozomlar üzerinde etkilere neden olduğu saptanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlarda özellikle akridin oranj –

propidyum iyodit boyamalarına göre apoptotik hücre ölümünün yanısıra özellikle yüksek dozlarda nekrotik hücre ölümünün daha baskın olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Benzil Benzoat, sitotoksisite, MTT, LDH, akridin oranj – propidyum iyodit, nötral kırmızı, DCFDA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BENZYL BENZOATE CYTOTOXICITY UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

ASLI KARTAL

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. GÜLDENİZ SELMANOĞLU

January 2015, 77 pages

Benzyl benzoate is a compound which has been used in several areas such as cosmetic, pharmaceutical and food industries. It is one of the frequently used food additives, although it is mainly used as acaricide/scabicide. In this study, cytotoxicity of benzyl benzoate on L929 mouse fibroblast cells was examined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] test, lactate dehydrogenase (LDH) test, Trypan Blue dye exclusion assay, Neutral Red uptake assay. Also in order to determine cell death type, acridine orange-propidium iodide double staining was carried out and DCFDA cellular reactive oxygen species (ROS) detection assay was performed.

As a result of MTT test, LC₅₀ values of benzyl benzoate on L929 cells were found 21 mM and 18 mM for 24 and 48 h incubation periods, respectively. Increased ROS activity, mitochondrial dysfunction, disruption in cellular membrane integrity and effects on lysosomes were determined on L929 cells at the treatment doses of benzyl benzoate. Considering acridine orange propidium iodide staining, apoptotic cell death

was observed as well as necrotic cell death was more dominant particularly at its highest doses.

Keywords: Benzyl benzoate, cytotoxicity, MTT, LDH, acridine orange – propidium iodide, neutral red, DCFDA

TEŞEKKÜRLER

Öncelikle bu yüksek lisans tezinin ortaya çıkmasını sağlayıp desteğini esirgemeyen sayın danışmanım Prof. Dr. Güldeniz Selmanoğlu'na, çalışmalarım ile ilgili bitmek bilmeyen sorularıma yorulmaksızın cevap veren sayın Araş. Gör. Elif Karacaoğlu'na ve Araş. Gör. Dr. Aysun Kılıç Süloğlu'na, deneysel problemlerimin çözümü için sunduğu öneriler nedeniyle T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre ve Virüs Bölüm Başkanı sayın Bilim Uzmanı Şükran Yılmaz'a, florometrik çalışmam için güleryüz ve sıcakkanlılıkla laboratuvarlarını kullanımına açan Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı personeli sayın Dr. Cansın Güngörmüş ve Doç. Dr. Aslı Korkmaz'a, verilerin istatistiksel açıdan yorumlanmasına yardımcı olan sayın Araş Gör. Anıl Dolgun'a şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmama, 013D07601009 No'lu proje kapsamında destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Şairin dediği gibi 'yedi yıllık yoldan kuş kanadı ile gelen', hayatımdaki varlığı ile benim daha iyi bir insan olmamı sağlayan, hep yanı başımda olan kadim dostum ve manevi kız kardeşim Araş. Gör. Canan Has'a; beni her zaman dinleyen, 'an'larımı güzelleştiren, uzaklığı sadece bir telefon kordonuna indiren can dostlarım Cem Düzenli ve Araş. Gör. Dr. Onur Bulut'a; Ankara'ya geldiğim ilk andan itibaren evleri benim de evim aileleri benim de ailem olan maddi ve manevi her şekilde yanımda olan güzel insanlar Berna Ergün ve Bahar Aktepe'ye; dilimden gözümünden anlayan sevgili dostum Okt. Uzm. Gamze Beştaş'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Zooloji Anabilim Dalı lisansüstü öğrencilerine, özellikle de bu süreçte her başım sıkıştığı an yanımda oldukları için Araş. Gör. Mehmet Kürşat Şahin ve doktora öğrencisi Nazlı Deniz Eyice'ye teşekkür ederim.

Ve son olarak, ki en önemlisi hayatta koşulsuz şartsız hep yanımda olan canım annem Zeâllâ Fatma Kök'e, ondan çok ama çok şey öğrendiğim önüme hep yeniliklerle çıkan ve aynı zamanda her şeye dayanma gücü veren sevgili teyze-annem Yrd.Doç.Dr. Nilgün Hatice Kök'e, canımın parçası kardeşim Gözde'ye, hayata inatçılıkla tutunmasına hayran olduğum dirayetini çalışkanlığını örnek aldığım anneannem Nazmiye Kök'e, verdiği moral destekle beni hep ayakta tutan sevgili halam Fatma Kartal'a ve yukarıdan beni izlediğini bildiğim, bugünleri görmesini ve benimle gururlanmasını en çok istediğim canım babaannem Zekiye Kartal'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gıda Toksikolojisi	3
2.2. Gıda Katkı Maddeleri	5
2.3. Benzil Benzoat Hakkında Genel Bilgiler	11
2.3.1. Benzil Benzoat Toksikokinetiği	13
2.3.2. Benzil Benzoat Toksisitesi	13
2.3.3. Benzil Benzoat ile İlgili Klinik Bulgular	15
2.3.4. Benzil Benzoat ile yapılmış <i>in vitro</i> çalışmalar	17
2.4. Toksikolojide Hücre Kültürü Uygulamaları	18
2.4.1. MTT testi	23
2.4.2. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Analizi	24
2.4.3. Laktat Dehidrogenaz Sitotoksisite Testi	25
2.4.4. Nötral Kırmızı Alım Testi	25
2.5. Oksidatif Stres	26
2.6. Hücre Ölümü	28
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1. Hücre Kültürü	30
3.2. L929 Hücrelerinin Üretilmesi ve Pasajlanması	30
3.3. L929 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözülmesi	31
3.4. Benzil Benzoat için Uygun Çözücü Seçimi	31
3.5. Benzil Benzoatın Stok Çözeltisinin Hazırlanması	32
3.6. MTT Testi	32

3.7. Tripan Mavisi ile Canlı Hücre Sayımı	33
3.8. Laktat Dehidrogenaz Sitotoksisite Testi	34
3.9. Nötral Red Alımı Hücre Canlılığı Testi	35
3.10. DCFDA ile Hücresel Reaktif Oksijen Türlerinin Tespiti	35
3.11. Akridin Oranj – Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi	36
3.12. İstatiksel Analizler	37
4.SONUÇLAR	38
4.1. MTT Sonuçları	38
4.2.Tripan Mavisi ile Canlı Hücre Sayımı Sonuçları	40
4.3. LDH Sitotoksisite Testi Sonuçları	42
4.4. Nötral Red Alım Testi Sonuçları	44
4.5. DCFDA ile Hücresel Reaktif Oksijen Türlerinin Tespiti Sonuçları	52
4.6. Akridin Oranj – Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Yolunun Belirlenmesi	53
5.TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Benzil Benzoat Kimyasal Yapısı	11
Şekil 2.2. Benzaldehitten Tischenko Reaksiyonu Benzil Benzoat Oluşumu	12
Şekil 2.3. Hücre Canlılık Tespiti için Kullanılan Bazı Testler	22
Şekil 2.4. MTT'nin indirgenmesi	23
Şekil 2.5. DCFDA'nın floresan bir ürün olan diklorofloreseine dönüşümü	27
Şekil 2.6. Tipik apoptotik ve primer nekrotik olaylar sırasında canlılık ve sitotoksosite belirteçlerinin kronolojik karşılaştırılması	29
Şekil 3.1. Hemositometre Şekli	34
Şekil 4.1. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması MTT yüzde canlılık sonuçları	38
Şekil 4.2. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması MTT yüzde canlılık sonuçları	38
Şekil 4.3. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen MTT bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	39
Şekil 4.4. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen MTT bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	39
Şekil 4.5. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu yüzde (%) canlılık sonuçları	40
Şekil 4.6. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu yüzde (%) canlılık sonuçları	40
Şekil 4.7. L929 hücrelerinin 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen tripan mavisi bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	41
Şekil 4.8. L929 hücrelerinin 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen tripan mavisi bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	41
Şekil 4.9. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu LDH sitotoksosite sonuçları	42
Şekil 4.10. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu LDH sitotoksosite sonuçları	42
Şekil 4.11. L929 hücrelerinde 24 saat benzil benzoat inkübasyon sonucu elde edilen LDH sitotoksosite bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	43
Şekil 4.12. L929 hücrelerinde 48 saat benzil benzoat inkübasyon sonucu elde edilen LDH sitotoksosite bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	43

Şekil 4.13. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu nötral red alım testine göre hücre canlılık sonuçları	44
Şekil 4.14. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu nötral red alım testine göre hücre canlılık sonuçları	44
Şekil 4.15. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen nötral red alım testi bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	45
Şekil 4.16. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen nötral red alım testi bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	46
Şekil 4.17. Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon sonucu nötral red alımı	47
Şekil 4.18. Etanol Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon sonucu nötral red alımı	47
Şekil 4.19. 10 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	48
Şekil 4.20. 15 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	48
Şekil 4.21. 20 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	49
Şekil 4.22. Kontrol grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	49
Şekil 4.23. Etanol Kontrol grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	50
Şekil 4.24. 10 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	50
Şekil 4.25. 15 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	51
Şekil 4.26. 20 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral red alımı	51
Şekil 4.27. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu gözlenen hücrel reaktif oksijen türlerinin üretimi	52
Şekil 4.28. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucunda reaktif oksijen türleri artışı bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	52
Şekil 4.29. Kontrol Grubu 24 saat inkübasyon AOPI boyaması	54
Şekil 4.30. 10 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOPI boyaması	54
Şekil 4.31. 15 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOPI boyaması	55
Şekil 4.32. 20 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOPI boyaması	55
Şekil 4.33. Kontrol grubu 48 saat inkübasyon AOPI boyaması	56
Şekil 4.34. 10 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması	56
Şekil 4.35. 15 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması	57
Şekil 4.36. 20 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Besinlerde bulunabilen insan sağlığını ilgilendiren olası toksik kimyasalların kaynakları	4
Çizelge 2.2. Yasaklanan Bazı Gıda Katkı Maddeleri	8
Çizelge 2.3. Kültürdeki hücre hatları için en yaygın kullanılan bazı genel toksisite kriterleri	20
Çizelge 2.4. MTT Test Sonuçlarını Etkileyen Faktörler	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
FBS	Fötal Sığır Serumumu (Foetal Bovine Serum)
DMSO	Dimetil sülfoksit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
EPA	Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation)
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Üzerine Birleşmiş Uzmanlar Komitesi (The Joint Expert Committee on Food Additives)
GRAS	Genel olarak güvenli-zararsız kabul edilen (Generally Recognised as Safe)
MTT	[3-(4,5- dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
LDH	Laktat dehidrogenaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
DCFDA	Dikloroflorosein diasetat
TBHP	Tert butil hidrojen peroksit
AO	Akridin Oranj
PI	Propidyum İyodit

1. GİRİŞ

19. yüzyılda yapılan Sanayi Devrimi ile küresel olarak kimyasal üretimi ve kullanımı gittikçe artmaya başlamıştır. Bu durumun ekonomik yararları olmakla birlikte, ksenobiyotiklere zamanla maruziyet oranı artan organizmaların uyum sorununu beraberinde getirmektedir. Günümüzde ise sadece insan değil birçok organizma, kimyasal bir tehdit ile karşı karşıyadır.

Son iki yüzyıldaki sanayi ve teknolojidaki gelişmeler ile her geçen gün yeni sentezlenen kimyasal maddeler kullanıma girmektedir. Aynı zamanda hem yeni bir kimyasalın piyasaya sürümü hem de toplamda kullanılan kimyasal ürün miktarı açısından sürekli bir artış söz konusudur. Örneğin Türkiye ölçeğinde değerlendirme yapılacak olursa; 1979 yılında toplam 8.396 ton pestisit kullanılırken 2007 yılına gelindiğinde ise bu oran 22.681 tona yükseldiği bildirilmektedir [1].

Bu her geçen gün artan kimyasal tehdidin boyutu bize toksikolojik çalışmaların önemini göstermektedir. Su, deri, hava ya da gıda yoluyla vücuda alınabilen bu kimyasallar toksikolojik araştırmalar ile olası etkileri risk değerlendirmesi çerçevesinde incelenmesi ve kontrol amaçlı stratejiler geliştirilebilmesi sağlanmaktadır.

Toksikolojik araştırmalarda önceleri havyan modelleri kullanılmış olup günümüzde ise bilim ve teknolojinin gelişmesi ile ayrıca etik kaygılar gibi nedenlerle araştırmacılar toksikolojide alternatif metotlar ile çalışmaya yönelmektedirler. *In vitro* toksikolojik yaklaşım sayesinde kimyasalların etkileri temel ve moleküler düzeyde incelenebilmektedir.

Dünya nüfusunun artışı gıda yeterliliği ve güvenliği konusunu gündeme getirmiştir. Bu nedenle Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency, EPA), Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) gibi kuruluşlar gıda güvenliği sağlamaya yönelik araştırmalar yapmakta, gıdalardaki toksik maddeleri belirlemeye ve önlemler almaya çalışmaktadırlar.

Besin maddeleri sürekli bir transport halindedir. Dünyanın farklı bir bölgesinde üretilip işlenip, paketlenip başka bir bölgesine taşınıp tüketicilere sunulmaktadır. Bu gıda işlenmesi süreci içerisinde raf ömrünü uzatmak ve ya daha farklı amaçlarla birçok farklı kimyasal, gıdaların içerisine girmekte ve yâhutta gıdaların işlenmesi

sirasında kendiliğinden oluşabilmektedir. Bahsedilen bu kimyasalların, organizmaların tüketimi yoluyla toksik etki göstermesi olasılıklar dâhilindedir.

Gıda maddelerinde bulunan olası toksik maddelere nutrientler, doğal yolla oluşan gıda toksikantları, kontaminantlar, gıdalara eklenen kimyasallar ya da maddeler (gıda katkı maddeleri) girmektedir [2]. Gıda katkı maddeleri ise yüzyıllardan beri besinlerin kalitesini arttırmak için kullanılmaktadır. Renklendiriciler gibi katkı maddeleri üretim sürecinde etkilenen orijinal görünümünü tekrar yerine koymak, besin maddelerini görsel olarak daha çekici kılmak için kullanılmaktadır [3].

Benzil benzoat kozmetik, gıda ve ilaç sektöründe birçok kullanım alanı olan bir kimyasal maddedir. Böcek ilaçlarında özellikle akarlar karşı kullanılmasının yanı sıra gıda sektöründe besin katkı maddesi olarak sakızlarda, göğüs üzerine ve göz çevresine kullanılan kozmetiklerde solvent olarak, parfüm sektöründe, selüloz ve diğer polimerleri plastikleştirici olarak, farmasötik ürünlerde (örneğin; testosteron undekanoat ve öksürük şurupları) yardımcı madde olarak kullanılmaktadır.

Bu yüksek lisans tezinde sıklıkla kullanılan gıda katkı maddelerinden biri olan benzil benzoatın *in vitro* koşullarda toksikolojik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, L929 fare fibroblast hücre hattında benzil benzoatın LC₅₀ değeri belirlenerek sitotoksitesinin araştırılması hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra benzil benzoatın hücresel reaktif oksijen türevleri oluşturma etkisine bakılmış ve ayrıca benzil benzoat etkisiyle gözlenen hücre ölüm yolları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Toksikolojisi

Birçok toplum, kültürel olarak besin hazırlama ve tüketimini yaşam merkezine almıştır. Yirminci yüzyılda, dünyanın birçok yerinde besin üretimi ve hazırlanması küçük çiftlikler, evler, restoran mutfakları ve küçük besin hazırlama faaliyetlerinden (örneğin yerel fırınlar vb.) büyümekte olan dev besin imalatlarına geçiş olmuştur. Bu değişikliklerle beraber, çeşitli kimyasallar besinlerin içine girmeye başlamıştır [4].

Güvenli ve besleyici gıdaların bulunabilirliği ve tüketimi insan sağlığı için temel bir gereksinimdir. Besleyici olan ve olmayan kimyasallar, besinlerin tamamlayıcı unsurlarıdır ve bunlar hem beslenme hem de sağlık açısından önemli etkilere sahiptir. Bu kimyasallar; proteinler, karbohidratlar, yağlar, vitaminler, iz elementler, lifler ve antioksidanları kapsamaktadır. Çizelge 2.1.'de görüldüğü üzere bazı belirli koşullar altında, besinler zararlı olabilmektedir ve sağlık açısından riskler yaratabilmektedir [5].

Farmasötik ürünlerdeki yardımcı maddeler, vitaminler, mineral destekleri gibi ticari olarak üretilen besinlere eklenen birçok kimyasal madde bulunmaktadır. Ksenobiyotiklerin besinlerdeki varlığı kaçınılmaz bir durumdur. Su, hava, topraktaki varlıkları bilinmektedir. Diğerleri ise estetik, koruma ve ekonomik nedenlerle bilerek gıdalara eklenir. Besinlerde bulunan ksenobiyotikler:

1. Büyüme sırasında toprak ve bitki yüzeylerinden sebze ve meyveler yoluyla alınımı
2. Balık, büyükbaş ve kümes hayvanları yoluyla su ve işlenmiş besinin alınımı
3. Gıda işlenmesi
4. Ticari gıda hazırlama sırasında eklenen katkıları
5. Ambalajlama

yukarıda sıralanan beş nedenden herhangi birinden kaynaklanabilir [4].

Gıdaların yeterliliği kadar gerekli miktarda tüketilmesi de son derece önemlidir. Bunlarla birlikte son yıllarda gıdalardan kaynaklanan hastalıkların ve risklerin artması gıda tüketimini kamunun ve uluslararası kurumların temel sorunları arasında yer almasına neden olmuştur. Bu nedenle ülkesel ve uluslararası güncel önlemler alınmaya başlanmıştır [6]. Toksikoloji biliminin alt dallarından biri olan gıda toksikolojisi de daha güvenilir gıdaların tüketiciye sunulması amacına hizmet etmektedir.

Gıda toksikolojisi gıdalarda bulunan toksik maddelerin ve toksinlerin sistematik incelenmesi olarak tanımlanabilir. Gıda toksikolojisi; gıdaların olası toksisitesi, gıdalarda bulunan bu toksik maddelerden etkilenen faktörler ve durumlar, temel nutrientler ile etkileşimleri, bunlara bireylerin cevabı, gıda güvenliği ve toplumun beslenmesiyle alakalı oldukları için toksik etkilerden korunma ve bunları en az hale getirme yolları ile ilgilenmektedir [7].

Çizelge 2.1. Besinlerde bulunabilen insan sağlığını ilgilendiren olası toksik kimyasalların kaynakları [5].

-
- A. Besinlerdeki yabancı kimyasallar
- I. İstemli olarak eklenen maddeler (katkı maddeleri)
 - a. Görünümü iyileştirmek için: renklendiriciler, parlaklık sağlayıcı ajanlar (Balmumu vb.)
 - b. Depolama stabilitesini uzatmak için: koruyucular, antioksidanlar vb.
 - c. Kıvamını arttırmak ve düzeltmek için: emülgatörler, stabilizatörler, kıvamlaştırıcılar vb.
 - d. Besini iyileştirmek ve değiştirmek için: tatlandırıcılar, aromalar, esanslar
 - e. Besleyici / biyolojik değerini arttırmak için: vitaminler
 - f. Adjuvant olarak: enzimler
 - II. İstemsiz olarak bulunanlar
 - a. Antropojenik aktivitelerden kaynaklanan kontaminantlar
 1. Tarım kimyasalları kalıntıları: fungusit, herbisit, insektisit vb.
 2. Hayvan üretiminin kalıntıları: östrojenler, antibiyotikler, sakinleştiriciler vb.
 3. Adjuvant kalıntıları
 4. Çevresel kirleticiler(örneğin; kalıcı organik kirleticiler, POPs)
 5. Dezenfektan, kimyasal ara ürün ve metabolit kalıntıları
 6. Mikrobiyolojik proses sonrası kontaminantlar: çözücüler, parlaklaştırıcı ajanlar, koagülatörler, nötralize edici ajanlar, asit ve alkaliler, enzimler, katalizler, bakteriler vb.
 - b. Gıdaların işlenmesi sonucu olarak besinlere giren kontaminantlar (Örneğin; akrilamid)
 - c. Doğal kaynaklardan gelen kontaminantlar
 1. Algal toksinler (fikotoksinler)
 2. Fungal toksinler (mikotoksinler)
 3. Bitkisel toksinler (fitotoksinler)
- B. Doğal olarak besinlerde bulunan bileşikler
- I. Belirli besinlerdeki doğal olarak bulunan toksik özellikli bileşikler (Örneğin; manyok bitkisindeki siyanojenik glikozitler)
 - II. Genellikle besinsel değeri olan fakat spesifik genetik bir geçmişi olan ya da spesifik bir durumu olan duyarlı popülasyonlara zarar veren besinlerdeki intrinsik bileşikler (Örneğin; gluten hassasiyeti ve ya çölyak hastalığı)
-

2.2. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, yüzyıllardan beri besinlerin kalitesini arttırmak için kullanılmaktadır. Tütsüleme, alkol, sirke, yağ ve baharatlar sıklıkla besini korumak için kullanılır. Bugün ise besinin kalite ve stabilitesini sağlamak; gıdanın organoleptik özelliklerini arttırmak; üretim süreci, depolama ve gıda taşınımında kolaylık sağlamak için kullanılmaktadır [3].

Gıda ve Tarım Bakanlığı'nın gıda katkı maddeleri yönetmeliğindeki tanımı şöyledir; "Normal koşullarda tek başına tüketilmeyen veya gıda ham maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeleri tanımlar" [8].

Gıda katkı maddelerinin temel kullanım nedenleri:

1. Emülsifikasyon: Emülgatörler, örneğin lesitin, yağ ve sulu faz için salata soslarında kullanılır.
2. Kıvam koyulaştırma: Koyulaştırıcılar örneğin karagenan ve karboksil selülöz dondurma ve jölenin kıvamını koyulaştırmak için ayrıca kek ve ekmeğin dokusunu vermek için kullanılır
3. Zenginleştirme: Vitamin ve mineraller, örneğin vitamin D, tiamin, niasin, sütü ve unu kuvvetlendirmek için kullanılır
4. Topaklanma önleyici: Topaklama önleyici ajanlar örneğin; tuzdaki sodyum aluminosilikat, süt tozu ve süt içermeyen kremalardaki silikon dioksit, koagülasyondan korunmak için kullanılır.
5. Şelatlama: Şelatlayıcı ajanlar örneğin; EDTA çözünmeyen metal tuzlarının çökmesinden korunmak için eklenir. Sitrik asit ve tartarik asit gıda işlenmesi sürecinde renk değişimini engellemek için kullanılır.
6. Beyazlaştırma: Beyazlaştırıcı ajanlar, örneğin peroksitler, unu ve peyniri beyazlaştırmak için kullanılırlar.
7. Koruma: Antimikrobiyal ajanlar örneğin; metil paraben, propil paraben, sodyum benzoat, kalsiyum propionat gibi maddeler küf ve mantarların neden olduğu

besin bozulmalarını engellemek için kullanılır. Koruyucu kimyasalların kullanımı raf ömrünü uzatır ve dondurulma ihtiyacını elimine eder.

8. Antioksidan aktivite: Antioksidanlar, örneğin butillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve BHT, yağların oksijenlerle tepkimeye girmesini ve kokmasını engeller.
9. Renklendirme: Yapay renklendiriciler – örneğin blue#1, yellow#6, red#40 – hazır gıdaların büyük çoğunluğuna göz alıcı bir renk vermek için eklenir.
10. Tatlandırma: Yapay tatlandırıcılar – örneğin şeker için sakkarin, kiraz tadı için benzaldehit–doğal tadı vermek amacıyla kullanılmaktadır. Tat arttırıcılar, örneğin monosodyum glutamat (MSG), aslında kendilerinin çok az tadı vardır ya da hiç yoktur fakat diğer gıda bileşenlerinin tadını arttırmak için kullanılırlar [4].

Gıda işlenmesi sürecinde birçok çeşitli kimyasal besin maddelerinin içerisine girebilmektedir veya gıda değişik maddeler ile kontamine olabilmektedir. Gıda katkı maddelerine butil hidroksi toluen (BHT), nitrit gibi koruyucular ile kalsiyum propanat gibi mikrobiyal geciktiriciler girmektedir. Ayrıca gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı olarak bazı kimyasallar da eklenmektedir. Gıda işlenmesi sürecinin farklı aşamalarında gübre kalıntıları, pestisitler, veteriner farmasötikleri, poliklorlubifeniller (PCB) gibi çevresel kimyasallar ve sayısız bileşik besin zincirine dâhil olmaktadır. Bazı katkı maddeleri ise genel olarak güvenli – zararsız kabul edilmektedir (generally recognized as safe, GRAS) ve herhangi bir test gerektirmemektedir. Diğerleri ise tüketicilerin güvenliğinden emin olması için bir takım testlerin yapılmasını gerektirmektedir [2].

GRAS listesi MSG, kalsiyum proprionat, BHA, BHT de dâhil olmak üzere yüzlerce kimyasal katkıyı içermektedir. Gıdalardaki kimyasal katkı maddelerinin listesi sadece GRAS listesindekiler ile sınırlandırılmamalıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde günümüzde 3000'den fazla kimyasalın gıdalarda kullanımına izin verilmektedir. Gıda ve İlaç Dairesi (Food & Drug Administration, FDA) veri bankasında 'Everything Added to Food in United States' (EAFUS) olarak bahsedilmektedir. Bu liste gıda işlenmesi sırasında kullanılan kimyasalları, gıda işlenmesi sırasında ortaya çıkan kimyasalları, çözücü rezidülerinin ekstraktlarını, pestisit kalıntılarını, antibiyotikleri, büyüme hormonlarını, kaçınılmaz şekilde gıdalara eklenen kimyasalları içermektedir. Bu liste uzun olmasına rağmen, bütün gıda katkı maddelerini içermemektedir. Bunların bazıları FDA tarafından bağımsız biçimde GRAS listesi altına eklenir [4].

GRAS listesindeki maddelerin, gıda katkı maddesi olarak kullanımları için FDA iznine gerek yoktur. Diğer yandan, 1958 sonrası insanlara ve hayvanlara olası hasar kanıtları ile ticari kullanıma sunulan maddeler FDA kısıtlamasına ve incelemesine alınmışlardır. Gıdalara eklenmesi yasaklanan maddeler Çizelge 2.2.'de verilmiştir [9].

Çizelge 2.2. Yasaklanan Bazı Gıda Katkı Maddeleri [9]

Katkı Maddesi (Yasaklama Yılı)	Amaç	Kaynak /Tanım	Toksosite
Kalamus (1968)	Tat arttırıcı	Acorus calamus'un B-asaron içeren yağlı ekstraktı	Karsinojenik
Kloroflorokarbon püskürtücü (1978)	Koruyucu	Alifatik halojenli karbon	Hepatoksik, Kardiyotoksik
Sinnamil antranilat (1985)	Tat arttırıcı	Antranilik asit ve sinnamil alkolün esteri (C ₁₆ H ₁₅ NO ₂)	Karsinojenik
Kobalt Tuzları (1966)	Stabilize edici	İnorganik Tuzlar (CoCl ₂ ,CoSO ₄)	Kardiyotoksik
Kumarin (1954)	Tonka ağacı içeriği	1,2-benzopiren (C ₉ H ₆ O ₂)	Hepatoksik
Siklamat (1969)	Tat arttırıcı	Sikloheksan sulfamik asit tuzları (C ₆ H ₁₀ NO ₃ S)	Karsinojenik
Dietilpirokarbonat (1972)	Stabilize edici	Pirokarbonik asit dietil ester (C ₆ H ₁₀ O ₅)	Karsinojenik
Dulsin (1950)	Tat arttırıcı	4-etoksi fenil üre (C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₂)	Karsinojenik
Monokloroasetik asit (1941)	Koruyucu	Kloroasetik asit (C ₂ H ₃ ClO ₂)	Karsinojenik, Nörotoksik, Kardiyotoksik
Nordihidroguayaretik asit (1968)	Antioksidan	4,4'-(2,3-dimetiltetrametilen) dipirokatekol (C ₁₈ H ₂₂ O ₄)	Hepatoksik
P-4000 (1950)	Tat arttırıcı	5-nitro-2-propoksianilin (C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₃)	Karsinojenik
Safrol (1960)	Tat arttırıcı	4-allyl-1,2-metilendioksibenzen (C ₁₀ H ₁₀ O ₂)	Karsinojenik
Tiyöüre (1977)	Koruyucu	Tiyokarbamid (CH ₄ N ₂ S)	Karsinojenik

Kanada'da Őu an 400'den fazla gıda katkı maddesi kullanım için kabul görmektedir, bu sayılar Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliğinde sırasıyla yaklaşık olarak 3000 ve 300 dür [3]. Spesifik gıda katkı maddelerinin kullanım izni Kodeks Alimentarius Komisyonu (Codex Alimentarius Commission) tarafından önerilir ve ulusal yönetmelikler ile kabul edilir. Gıda katkı maddeleri kullanımının insan sağlığı açısından güvenli olduğunu göstermek için bilimsel çalışmalarla desteklenen sıkı denetimlere tabidir [10].

Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda Katkı Maddesi Düzenlemesi 1958'e göre 10.000'den fazla kimyasalın doğrudan ya da dolaylı olarak insanların tükettiği gıdalara eklenmesine izin verildiği FDA tarafından kabul edilmiştir [11]. 2010 yılında bu maddelerden %90'dan fazlası gıdalarda "gıda katkı maddesi" ya da "genel olarak güvenli-zararsız kabul edilen (GRAS)" maddeler olarak bilinen yasal kategoriler altında kullanımına izin verilmiştir. GRAS maddeleri sık kullanılan gıda malzemelerinden (örneğin buğday) biyoteknoloji kullanarak yeni tasarlanmış maddelere kadar çeşitlenmektedir. Geri kalan %10 ise renklendiriciler, pestisitler gibi daha küçük kategorilerdir. Yasalarla gıda katkı ve GRAS maddeleri FDA ya da bazı durumlarda üretici firma tarafından kullanımının güvenli olduğunu onaylanan bir tanım yapılmadan kullanılamazlar. Kimyasal katkıların üçte ikisinde herhangi bir beslenme toksisite çalışması eksik, doğrudan gıdalara eklenen katkıların %78,4'ü maruziyetin güvenlik seviyesini değerlendirmek için veriler eksik, %93'ünde ise herhangi bir üreme ve gelişim toksisite testi yapılmamıştır. FDA, bu problemin farkında olmasına rağmen; bilgi açıklarını doldurmak için otorite ve kaynak bulunmamaktadır [12].

Ülkemizde de kullanılan E-kodları Avrupa Birliği'nin ilgili sağlık/gıda otoritelerinin gerekli güvenlik testlerinden geçmiş ve tüm spesifikasyonu belirlenmiş gıda katkılarına verilen kodları gösterir. E-kodu güvenliğin ifadesidir [13]. Bu kodlarda her yüzölçüm grup, gıda katkı maddelerinin spesifik bir grubunu ayırır. Örneğin; renklendiriciler E100 serisinde (E150 karamel, E162 pancar kırmızısı vb.), koruyucular E200 serisinde (E202 potasyum sorbat ve E211 sodyum benzoat vb.) ve antioksidanlar E300 serisinde. Avrupa Birliği tarafından toplam 322 katkı maddesine E-kodu verilmiştir [14].

Kimyasal maruziyetten kaynaklanan yan etkiler, (1) kimyasalın etkisi ve toksisite mekanizması, (2) doz, süre, maruziyet sıklığı, (3) konağın genel sağlığı, genetik

yatkınlığı, yaş ve yaşam biçimini de kapsayan birçok parametreye dayanmaktadır. 2004 yılında yayınlanan raporda Dünya Sağlık Örgütü'nün 'Kimyasal Güvenlik Üzerine Uluslararası Programı' yaşlılık, gençlik, hamile kadınlar ve düşük sosyoekonomik statüye sahip populasyonları da kapsayan duyarlı popülasyonların hassasiyetini vurgulamaktadır. Çocuklar yetişkinlerden kimyasal toksisiteye karşı daha fazla hassastırlar, çünkü kendi beden ağırlıkları ile ilişkili olarak vücutlarına daha fazla hava, su ve besin alırlar. Yaşa bağlı fizyolojik değişiklikler ve premorbid patolojiler de yaşlıların toksik kimyasallara daha fazla duyarlı olmasına neden olur [5].

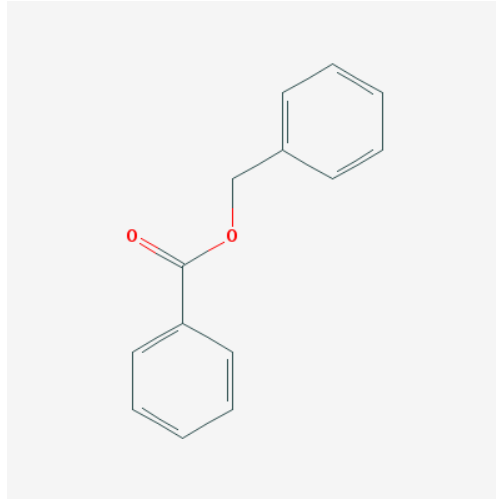
Amerika Birleşik Devletleri'ndeki populasyonun %2'sinin gıda katkı maddelerine karşı duyarlılıkları vardır ve yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Astımlı çocuklarda, gıda katkı maddelerine tepkinin görülme sıklığı %10'a kadar çıkmaktadır. İmmün-aracılı hipersensivite tepkileri ve idiyosenkratik tepkiler, gıda katkı maddelerine yan etkilerin çoğunluğundan oluşmaktadır. Genel olarak, tatlandırıcı ajan olarak tuberoz lakton, mint lakton, dihidromint lakton, sklareolid, oktahidro kumarin, 3-propilideneftalid, 3-butildeneftalid, dihidro kumarin ve 6-metilkumarin de dahil olmak üzere alisiklik, alisiklik türevi, aromatik halkalı laktonlar için herhangi bir güvenlik endişesi bulunmamaktadır [9].

2007 yılında McCann ve ark. [15]; gıda katkı maddelerinin 3 yaş ve 8/9 yaş çocuklarında hiperaktif davranışlara etkisiyle ilgili olarak rastgele ve plasebo kontrollü bir çalışma yürütmüşlerdir. 3 yaşında 153 çocuk ve 8/9 yaşlarında 144 çocuk bu çalışma için değerlendirilmiştir. Çocuklar plasebo veya yapay gıda renklendiricileri ve katkı maddeleri (AFCA: artificial food color and additives) içeren A ve B meyve suyu karışımını kullanmıştır. Bahsedilen bu A ve B karışımlarının her ikisi de eşit miktarda sodyum benzoat içermekte, fakat farklı miktarda AFCA vardır. 3 yaş çocukları için kullanılan A ve B karışımlarının 1,25 katı 8/9 yaş çocukları için hazırlanmıştır. A karışımında sodyum benzoat haricinde sunset yellow, karmoisin, tartrazin, ponceau 4R bulunmaktayken, B karışımında ise yine sodyum benzoat haricinde sunset yellow, karmoisin, kinolin sarısı, allura red bulunmaktadır. Bu belirtilen A ve B karışımları için 3 yaşındaki çocuklara uygulanan dozlar iki paket 56 gramlık şekerin içinde bulunan gıda renklendiricisi miktarı ile neredeyse aynıdır. 8/9 yaş için ise A karışımı günde 2 paket şeker ve B karışımı ise 4 paket şekerdenektir. Sonuç olarak; 3 yaş grubundan 16 çocuk, 8/9 yaş grubundan 14 çocuk çalışmayı

tamamlamamış, 3 yaş çocukları için A karışımı plasebo ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yan etkisi gözlenmiş, fakat B karışımı için bu söz konusu olmamıştır. Analizler sadece %85'ten fazla meyve suyu tüketen ve herhangi bir kayıp veri olmaksızın 3 yaş çocukları ile sınırlandırıldığında bu sonuçlar devam etmiştir. Yine en az %85'i meyve suyu tüketen ve yine herhangi bir kayıp veri olmaksızın 8/9 yaş çocukları ile bu analizler sınırlandırıldığında hem A hem de B karışımının önemli ölçüde yan etkilere neden olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu diyetdeki ACFA ya da sodyum benzoat koruyucusunun (ya da her ikisi birden) 3 ve 8/9 yaş çocuklarında genel popülasyonda artmış bir hiperaktivite bulgusu ile ilişkisi olabileceği şeklinde yorumlamaktadırlar.

Ceyhan ve ark. 2013'te yaptığı çalışmada ise eritrosin, ponceau 4R, allura red AC, sunset yellow FCF, tartrazin, amaranth, brilliant blue, azorubin ve indigotinden oluşan karışım dişi ve erkek sıçanlara uygulanmış ve reseptör protein etkileşimi incelenmiştir. Sonuç olarak; maternal ACFA maruziyetinin NR2B, nAChR β 2 ve nAChR α 4 ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiştir. Fakat bu değişikliklerin davranışsal ve nöronal canlılık üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır [16].

2.3. Benzil Benzoat Hakkında Genel Bilgiler

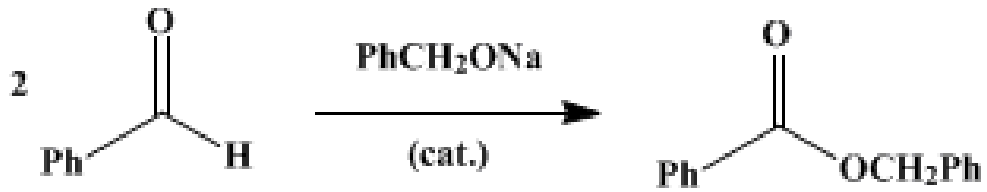


Şekil 2.1. Benzil Benzoat Kimyasal Yapısı [17]

Benzil benzoat (CAS 120-51-4), $C_6H_5COOCH_2C_6H_5$ ($C_{14}H_{12}O_2$) genel formülüne sahiptir (Şekil 2.1.) ve askabiol, benzilat, vanzoat (venzoat), benzoik asit fenil metil ester ve benzoik asit benzil ester gibi sinonimleri bulunmaktadır [18]. Benzil benzoat

212,25 g moleküler ağırlığında olup, renksiz hoş kokulu visköz bir sıvıdır. Peru ve Tolu balsamınının aynı zamanda belirli çiçek yağlarının temel bileşenidir [19].

Benzil benzoat, benzil alkol ve benzoik asidin kondensasyonu sonucu oluşabileceği gibi Tishchenko reaksiyonu (Şekil 2.2.) ile benzaldehitten de oluşabilmektedir [20]. Benzil benzoat, benzil alkol ve sodyum benzoat'tan trietilamin varlığında ve ya alkali benzil oksit varlığında benzil alkol ile metil benzoatın transesterifikasyonu ile de oluşabilmektedir. Diğer bir üretim prosesinde ise, sodyum varlığında benzil benzoat oluşturmak için benzaldehit kondanse olur (Claisen-Tishchenko reaksiyonu). Küçük miktarlarda alifatik eter varlığı, bu reaksiyonu ilerletmektedir. Benzil benzoat, benzoik asidin tolüen ile oksidasyonu ile üretiminde bir yan üründür, benzoik asidin distilasyon kalıntısında bulunur [19].



Şekil 2.2. Benzaldehitten Tishchenko Reaksiyonu ile Benzil Benzoat oluşumu [21]

Benzil benzoat, parfüm üretiminde temel olarak uçucu kokulu maddelerin stabilize edilmesinde kullanılır. Vazodilatör ve spazmolitik etkileri vardır ve birçok astım ve öksürük ilaçlarının içinde bulunur. Böcek uzaklaştırıcı olarak ve uyuz tedavisinde de kullanılır. Benzil benzoatın plastikleştirici olarak yüzey kaplamalarında ve plastik endüstrisinde de kullanımı söz konusudur [19].

Peru balsamında olmasının yanısıra yumrulu çiçeklerde, sümbül, *Narcissus jonquilla* L. ve *Dianthus caryophyllus* L., ylang-ylang yağında ve yukarıda da belirtildiği gibi Tolu balsamında doğal olarak oluşmaktadır. [22]. Ayrıca *Malus domestica* bitkisinin yapraklarından elde edilen yağda % 1,7 oranında bulunduğu [23], *Cinnamomum rhyncophyllum* Miq. bitkisinden elde edilen esansiyel yağın doğal bir benzil benzoat kaynağı (%77 oranında) olduğu [24] ve *Piper bisasperatum* Trel. (Piperaceae) bitkisinin yaprakları ve dikenlerinden hidrodistilasyon yoluyla elde edilen yağda %0,3 oranında bulunduğu [25] bildirilmiştir.

Ayrıca benzil benzoat, sık kullanılan gıda katkı maddelerinden biridir. FDA'nın yayınladığı EAFUS listesinde benzil benzoatın güncel toksikolojisi hakkında bilgiye gerek duyulduğunu bildirmiştir[26]. Benzil benzoat, yiyecek ve farmasotiklerde sentetik tatlandırıcı ve gıda paketlenme adhezifi olarak da kullanılmaktadır [27].

2.3.1 Benzil Benzoat Toksikokinetiği

Benzil benzoat mide tarafından hızlıca absorbe edilir. Ardından sırasıyla benzoik asite hidrolize edilecek olan benzil alkole hidrolize edilir. Benzoik asit glisin ile benzoglisin ya da hippürük asit ve glukoronik asit ile benzoglukoronik asite konjuge olur. Konjugatlar, türe ya da doza bağlı değişen oranlarda hızlıca idrarla atılırlar [28].

2.3.2. Benzil Benzoat Toksisitesi

Benzil benzoat toksisitesi Environmental Protection Agency (EPA)'nın 2010'da yayınladığı rapora göre; Grup II alt kategorisinde sınıflandırılmıştır. Sıçanlarda akut dermal toksisitesi için LD₅₀ değeri yaklaşık 1100 mg/kg-vücut ağırlığı ve akut oral toksisitesi için LD₅₀ değeri 4000 mg/kg-vücut ağırlığı olarak belirtilmiştir. Erkek sıçanlar için oral maruziyet sonucu elde edilen NOAEL değeri 900 mg/kg-vücut ağırlığı ve LOAEL değeri 460 mg/kg-vücut ağırlığı olarak bulunmuştur. EPA tarafından aynı rapora göre; *Salmonella typhimurium*'un TA 98, 100, 1535, 1537 suşları ile yapılan Ames testine göre mutajenik bulunmamıştır [29].

JECFA'nın yayınladığı raporda ise benzoik asit, benzaldehit, benzil asetat ve diğer benzil ve benzoate esterleri de dâhil olmak üzere benzil türevleri değerlendirilmiş olup ADI değeri 5 mg/kg (bir kişinin günde 300 mg/kişi gün olan günlük alımına eşittir) olarak hesaplanmıştır [30].

Benzil benzoat laboratuvar hayvanlarında düşük bir akut toksisiteye sahiptir. Sıçanlar için oral LD₅₀ değeri 1 g/kg 'den büyüktür. Çok sık ve çok geniş bir alana uygulandığında sistemik toksik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu klinik bulgular salivasyon, piloereksiyon, kas koordinasyon bozukluğu, tremor, arka ekstremitelerin progresif paralizisi, yorgunluk, şiddetli havaleler, solunum güçlüğü olmaktadır. Kediler özellikle bu tür bir toksisiteye daha hassastırlar. Aksine köpekler ise akut benzil benzoat toksisitesine daha dirençlidirler. Laboratuvar hayvanlarına büyük dozlarda verildiğinde hipereksitasyon, koordinasyon bozukluğu, ataksi,

konvulsiyon ve solunum paralizisine neden olmaktadır. İnsanlarda ise topikal kullanımında oldukça hafif toksik bir bileşiktir. Maruziyet periyodu sonrasında kaybolan hafif bir alerjik tepkiye neden olur. Akarisit olarak uygulanırsa; bağırsak peristaltisi, diyare, intestinal kolik, enterospazm, pilorospazm, seminal vezikül kontraksiyonu, hipertansiyon ve bronkospazma neden olabilmektedir [28].

Koçkaya ve Kılıç'ın (2011) yaptığı çalışmada dişi sıçanlarda gebelikte oral yolla uygulama sonucunda benzil benzoat ve metabolitlerinin plasenta ve fötüse geçebilecekleri gösterilmiştir. Bu çalışmada 25 mg/kg ve 100 mg/kg benzil benzoat dozları gebe sıçanlara uygulanmış biyokimyasal, histopatolojik ve morfolojik incelemeler yapılmıştır. Uygulama doz grubunda biyokimyasal parametrelerde, plasental ve iskelet ölçümlerinde istatistiksel önemli değişiklikler bulunmuştur. Histopatolojik değişimlere ek olarak uygulama gruplarında VEGF'nin immunolokalizasyonunda önemli değişiklikler gözlenmiştir [31].

Başka bir çalışmada ise benzil benzoatın yeni bir kompetitif kalmodulin antagonisti olduğu ve moleküler hedef olarak kalmodulin düzenleyici protein katılımının düz kaslarda gevşetici bir etkisinin muhtemel olduğunu belirtilmiştir [32].

EFSA, 2012 yılında benzil türevlerinin bütün hayvan türleri için tatlandırıcı olarak kullanılırken, güvenliği ve etkisi üzerine bir rapor yayınlamıştır. Bu raporda benzil benzoatın yemlerdeki maksimum ölçülebilir kullanım seviyesi alabalık, sığırlar için 1,5 mg/kg; domuz ve kümes hayvanları için 1,0 mg/kg olarak bildirilmiştir. Benzil benzoatın aynı raporda yem konsantrasyonlarında önerilen kullanım dozu normal seviye için 1 mg/kg, yüksek seviye için ise 5 mg/kg'dır. İnsan ve hayvanların maruziyetleri karşılaştırılmış ve insanlar için 74,2 µg/metabolik vücut ağırlığı-gün olarak; alabalıklar için 118 µg/metabolik vücut ağırlığı gün; domuz yavruları için 526 µg/metabolik vücut ağırlığı-gün; inekler için 777 µg/metabolik vücut ağırlığı-gün bulunmuştur. Yine bu raporda yemlerdeki benzil benzoatın maksimum güvenlik konsantrasyonları belirlenmiş, buzağı, alabalık, inek sığır, köpek ve kedi için 1,5 mg/kg; domuz, hindi ve tavuk için 1,0 mg/kg olarak saptanmıştır [33].

Sharma ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada uyuz hastalığı taşıyan koyunların üzerinde *Cedrus deodara* yağı ve benzil benzoatın etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada üç ve altı aylık arası 24 kuzu kullanılmış, kontrol grubu, *Cedrus deodara* yağı grubu (OCD), benzil benzoat grubu (BB) olarak üç gruba ayrılmıştır. Uygulama sonunda kontrol grubuna göre eritrosit ve lökosit sayıları OCD ve BB grubunda daha fazla

bulunmuştur. OCD uygulanan grupların uyuz hastalığının kontrolünde daha etkili olduğu gösterilmiştir [34].

Başka bir çalışmada ise Hindistan'da akarisit olarak kullanılan ilaçların terapötik etkileri değerlendirilmiş ve ek tedavi olarak askorbik asit uygulamasının etkilerine bakılmıştır. Benzil benzoat, *Jatropha curcas*, *Pongamia glabra*, *Cedrus deodara* yağları hem askorbik asitli hem de askorbik asitsiz olarak koyunlara uygulanmıştır. Uygulama ve kontrol gruplarının ağırlık artışları, karaciğer fonksiyonu, nutrient sindirimi, yün üretimi ve et kalitesi incelenmiştir. Sonuç olarak en iyi tedavi yönteminin *Cedrus deodara* yağı ile olduğu ve askorbik asit ile uygulanmasının tavsiye edildiği belirtilmiştir [35].

2.3.3. Benzil Benzoat ile İlgili Klinik Bulgular

Primer hipogonadizm hastalarına verilen testosteron undekanoat adlı ilacın bileşiminde bulunan benzil benzoatın anafilaktik şoka yol açtığı ve aynı olguda dermal yolla test edildiğinde ise deride kabartı ve küçük lezyonlara neden olduğu görülmüştür [36].

Sette ve ark.'nın 1994'de yaptığı bir çalışmada ise astım hastası 24 çocuğun evi benzil benzoat spreyi ya da plasebo ile ilaçlanmış ve *Dermatophagoides pteronyssinus* için geliştirilen serum ya da nasal salgıya spesifik IgE gibi bronşial hiperaktivite evden ayrılmadan önce ve döndükten sonraki 48 saat içinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar hastaların nasal salınımları ya da serumundaki IgE konsantrasyonları ve bronşial hiperaktivite azalışında benzil benzoat spreyinin plasebo'dan daha etkili olmadığını göstermiştir [37].

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile ilişkili uyuz hastalığının tedavisi için ivermektin ve benzil benzoat ayrı ayrı ve de birlikte kombinasyonunun etkisi incelenmiştir. 39 hasta farklı dozajlarda tedavi edilmiştir. Bu dozajlar benzil benzoat solüsyonunun topikal tedavisi, yalnızca ivermektinin tek doz tedavisi, oral ivermektin ve benzil benzoat solüsyonu kombinasyonu (tek doz tedavisinde olduğu gibi) olarak hastalara uygulanmıştır. Hastalar, hastalık derecesine ve sonuca (hastalığın yok olması, kötüye gitme, başarısızlık) göre gruplara ayrılmıştır. Sonuç olarak; benzil benzoat ve ivermektini tek başına hafif dereceli uyuzun tedavisinde oldukça etkili bulunmuştur. Bu iki dozaj şekli de ciddi ve kabuk bağlamış uyuzun tedavisindeki kabul edilemez biçimde kötüye gidişat ve başarısızlık oranı ile ilişkilidir. Buna karşın, doz ile ilişkili önemli bir yan etki göstermeksizin kombine tedavi şekli maksimum

başarı oranı sağlamaktadır. Bu nedenle, HIV sendromu hastalarında oluşan ciddi seviyedeki uyuzun tedavisinde benzil benzoat solüsyonu ve oral ivermektinin tek doz tedavi kombinasyonunun tercih edilebilir olacağı düşünülmektedir [38].

Başka bir plasebo kontrollü çalışmada ise ev tozu akarına karşı duyarlılıkları olan ve astım hastası çocukların evinde halılarda tannik asit ve benzil benzoatın allerjen azaltıcı etkisi incelenmiştir. %1 benzil benzoat ve %1 tannik asit ('Lowal'; bir protein denatüre edici) *Dermatophagoides pteronyssinus* ve *D. farinae* akar türlerine karşı majör allerjen konsantrasyonlarında etkisine bakılmıştır (çözücü olarak izopropanol kullanılmıştır). Araştırmacılar, plasebo ve aktif uygulamanın yapıldığı grupları karşılaştırdıklarında; benzil benzoatın uzun bir akar öldürme periyodu sonunda allerjen azaltıcı etkisinin açıkça gözlemlendiğini, plasebo uygulamasında görülen allerjen azalışının da izopropanolün proteinleri denatüre edici etkisinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlamışlardır [39].

Uyuz tedavisinde yeni sinerjik termofobik piretrin köpüğü ile benzil benzoat karşılaştırılarak etkinliği ve tolere edilmesi incelenmiştir. Bu çalışma hapis cezasını çeken 240 suçlu üzerinden yürütülmüştür. Uyuz için bu kişilerin yarısı benzil benzoat losyonu ile diğer yarısı ise piretrin ile 4 hafta boyunca tedavi edilmiştir. Yanma ve irritasyon bulguları piretrin uygulanan gruba göre benzil benzoat uygulanan grupta daha fazla olduğu gözlenmiştir. 3 gün devamlı piretrin uygulamasının en az 5 gün devamlı benzil benzoat uygulaması kadar etkili olduğu ve benzil benzoat losyonuna göre piretrin köpüğü formülasyonunun daha iyi tolere edilebilir olduğu saptanmıştır [40].

Diğer bir çalışmada ise gebelik süresinde uyuzun topikal tedavisinde benzil benzoat ve permetrinin güvenliği değerlendirilmiştir. Bu çalışma Ağustos 1993 ve Nisan 2006 arasında doğum öncesi kliniklerine devam eden mülteci ve göçmen kadınlar ile yürütülmüştür. Gebe kadınlar %25 benzil benzoat losyonu ve/veya %4 permetrin losyonu ile tedavi edilmişlerdir. Sonuç olarak benzil benzoat losyonu ile tedavi edilenlerde permetrine göre tekrar tedavi oranı daha yüksektir. Topikal benzil benzoat veya permetrin uygulamasının gebelik sonucunda (düşük oranı, konjenital anormallik, neonatal ölüm, ölü doğum ve prematüre bebek) herhangi bir yan etkisi bulunmamıştır. Fakat gebeliğin ilk üç aylık döneminde topikal tedavi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır [41].

2.3.4 Benzil Benzoat ile Yapılmış *In Vitro* Çalışmalar

Benzil benzoat, doku hazırlama ve astarlama çalışmalarında da kullanılmaktadır. 2003 yılında Hashimoto ve ark.'nın yaptığı çalışmada benzil benzoat, benzil salisilat, dibutil fitalat, n-butil benzil fitalat, n-butil fitalil n-butil glikolat, di-2-etilhekzil fitalat, di-2 etilhekzil adipat, monobutil fitalat, mono-2 etil hekzil fitalatın MCF-7 meme kanseri hücre hattında östrojenik aktiviteye etkileri incelenmiştir. Benzil benzoat ve di-2-etilhekzil adipat haricindeki diğer plastikleştiriciler uygulanan konsantrasyonlarda östrojenik etki göstermişlerdir [42].

Malezya'da geleneksel tıpta premenstrual ağrıyı hafifletmek ve meme kanseri tedavisi için kullanılan aynı zamanda bir antispazmodik ajan olan *Cyathostemma argenteum* bitkisinin köklerinden ayrımsal damıtma ile dört farklı flavon çeşidi, iki farklı alkaloid ve benzil benzoat elde edilmiştir. Elde edilen bileşikler *Artemia salina* üzerinde ve dört farklı meme kanseri hücre hattı (MCF-7, MCF-7/ADR, MDA-MB435, MT-1) üzerinde sitotoksik incelemeler yapılmıştır. Benzil benzoat *Artemia salina* üzerinde toksik bulunurken, meme kanseri hücre hatları üzerinde toksisite göstermemiştir [43].

Liquidambar styraciflua'dan elde edilen etanol ekstraktından benzil benzoat izole edilmiş ve fare ile yapılan *in vivo* deneyler sonucu doza bağlı Angiotensin II fonksiyonunu engellediği, hipertansiyonu düşürmek için yararlı olabileceği bulunmuştur. Yine aynı çalışmada insan embriyo böbrek epiteliyal mAT1a(HA)293T hücre hattında tripan mavisi boya testi sonucu sitotoksisite göstermediği gözlenmiştir [44].

Kozmetik olarak kullanımını değerlendiren bir çalışmada ise benzil benzoat MCF7 insan meme kanseri hücre hattına uygulanmıştır. Östrojene bağımlı MCF7 hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını, yani östrojenik etkiye neden olduğu görülmüştür [45].

Meme kanseri, ovaryum kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserinde etkili olan Paklitakselin tedavide kullanımına yönelik iyonik olmayan sürfaktanlar ile yağlı ve sulu formülasyonları geliştirilmiştir. Yağ fazı için benzil alkol, 2-fenil etanol, benzil benzoat, tributirin kullanılmıştır. Hazırlanan karışımların NIH/3T3 fibroblast hücreleri üzerinde MTT testiyle sitotoksisiteyi incelenmiştir. İlaç taşınım etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmanın sonucunda bu emülsiyonların önemli oranda sitotoksisite göstermedikleri ve iyi bir biyoyumluluğa sahip olduğu gözlenmiştir [46].

Benzil benzoat, *Desmoschinensis* köklerinden elde edilmiş olup MOLT3 T lenfoblast (akut lenfoblastik lösemi) hücre hattı, A549 insan akciğer karsinoma hücre hattı, HuCCA-1 insan kolanjiyokarsinoma hücre hattı ve HepG2 insan hepatosellüler karaciğer karsinoma hücre hatlarında antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir [47]. Başka bir çalışmada ise benzil benzoat ile beraber 56 farklı kozmetik madde için nötral kırmızı alım testinin üç farklı protokolünde normal insan keratinosit (NHK) ve rodent fibroblast (BALB/3T3) hücre hattı üzerine uygulanmış olup toksik olmayan kimyasalları belirlemek için bir test stratejisi geliştirilmesi amaçlanmıştır [48].

2.4. Toksikolojide Hücre Kültürü Uygulamaları

Hayvan ve insan hücrelerini veya dokuları bir plastik yüzeyde veya süspansiyonda büyütmek için teknikler biyomedikal bilimlerin gelişimine önemli bir katkı sağlamıştır. Bu sayede *in vitro* terimi öncelikle hayvan ve insan hücrelerinin ve dokuların vücut dışında büyümelerini, gelişmelerini, stabilitelerini destekleyen koşullar altında kullanılmasını kasteder [49].

Hayvan içermeyen test metotlarının kullanımı - bilgisayar temelli yaklaşımlar ve *in vitro* çalışmalar da dâhil edilerek - kimyasalların zararlı etkilerinin anlaşılmasını ve insanlar üzerindeki etkilerini tahmin etmek için önemli alternatif yollar sağlar [50]. *In vitro* sistemler temel olarak amaçların araştırılması ve daha anlaşılır toksikolojik profiller oluşturabilmesi için kullanılır. Aynı zamanda lokal ya da doku ve spesifik hedefli etkilerin araştırılması için de kullanılır. Potansiyel kullanımlarının temel alanı mekanizma temelli bilgi elde etmek içindir. *In vitro* yaklaşımlar risk tanımının ötesinde ek bir değer olarak düşünülür. Çünkü risk değerlendirilmesi paradigmasında diğer unsurların da uygulanmasını değerlendirmek önemlidir. Hayvan kullanılmayan test metotları, bilgisayar temelli yaklaşımlar ve *in vitro* deneyler de dâhil edilerek, insanlarda *in vitro*'dan *in vivo*'ya ekstrapolasyonu güçlendirmek için önemli araçlar sağlar [51].

Yeni ilaçlar, kozmetikler, gıda katkı maddeleri ve benzerleri kullanıma sunulmadan önce kapsamlı sitotoksisite testleriyle ayrıntılı bir şekilde araştırılır. Hem insani açıdan hem de ekonomik olarak en azından sitotoksisite kısmının *in vitro* yürütülmesi için oldukça büyük bir kamuoyu ve bilimsel baskı bulunmaktadır [52].

In vitro toksikoloji testleri kullanarak araştırılabilecek gıda ilişkili maddeler: besin hazırlama sırasında ortaya çıkan doğal bileşikler; bir maruziyet sonucu olarak

endojen olarak oluşan bileşikler; katkı maddeleri de dâhil olmak üzere izin verilmiş/onaylanmış bileşikler; kalıntılar; ek maddeler; gıda prosesi, paketlenmesi ve kontaminantlardan kaynaklı kimyasallardır [51].

Sitotoksosite tanımı çalışmanın yapılmasına ve hücrelerin ölüp ölmemesine veya daha basit bir şekilde metabolizmalarını değiştirip değiştirmediğine bağlı olarak farklılaşmaktadır. Bir anti-kanser ajanının hücreleri öldürmesi gerekirken; diğer farmasötiklerin toksik olmadığını göstermek, hücre sinyalindeki değişim ya da inflamatuvar veya allerjik cevaba neden olan hücre etkileşimleri gibi spesifik hedeflerin daha ayrıntılı bir biçimde analizini gerektirir [52].

Sitotoksosite terimi sıklıkla ilaç keşfi ve geliştirme endüstrisinde geniş ve iyi tanımlanmamış bir anlama sahiptir. *In vitro* kültür sistemleri için bir bileşik ya da bir uygulama eğer hücreler arası yüzey temasına engel oluyorsa, önemli ölçüde morfolojiyi değiştirirse, hücre üreme oranını olumsuz biçimde etkiler veya hücreyi öldürürse sitotoksik olarak nitelendirilir [53].

Sitotoksinlerin geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz etkileri vardır ve bu etkiler hemen ya da birkaç haftaya kadar gecikmiş olabilir. Bu maddeler için aşağıda sıralanmış temel bir farklılıklar bulunmaktadır:

- 1) Ani bir canlılık kaybına neden olan fizikokimyasal hasar
- 2) Saatler ya da daha da fazla süren bir periyottan sonra metabolizmadaki hafif, fakat progresif bir etkiye sahip çevresel ya da farmasötik bir sitotoksin
- 3) Üreme potansiyelinin kaybı, örneğin ışın tedavisi sonucu olarak hücre canlılığındaki azalışta hemen görülebilir olmayan etkiler [54].

Genel toksisite denemeleri için kullanılan yaklaşık 20 metodun geçerliliği genellikle bir laboratuvarında birçok kez tekrarlanmasıyla belirlenmiştir, bunu diğer araştırmacılar tarafından tekrarlar ve doğrulamalar izlemiştir. Bu metotların değerlendirilmesi, özellikle deneme olanakları rutine kolaylıkla uyum sağlıyorsa, laboratuvarlarda kullanım için uygunluğu tartışma konusudur. Bunun yanısıra söz konusu metotlar zorunlu olarak benzerdir: hücreler daha önceden belirlenmiş bir süre için maddenin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır, sonra canlılığın inhibisyon derecesi ya da fonksiyonel durumu ölçülür. Standart ölçüm olarak bu indikatör, daha sonra toksik sonuç olarak değerlendirilir. Hücre hatları için en yaygın kullanılan genel toksisite kriterleri Çizelge 2.3.'de listelenmiştir [49].

Çizelge 2.3. Kültürdeki hücre hatları için en yaygın kullanılan bazı genel toksisite kriterleri [49]

Kriter	İnhibisyon ya da hasarın derecesini belirlemek için metotlar
Hücre Morfolojisi	Işık mikroskobu kullanarak histolojik analizler; Transmisyon elektron mikroskobu kullanarak ultra ince yapı analizleri
Hücre Üremesi	Hücre sayımı; Karyotipik analiz kullanarak mitotik frekans; DNA sentezi
Hücre Bölünmesi	Klon formasyonu; Ekim verimliliği (Plating efficiency)
Hücre Metabolizması	Anaerobik glikoliz; Yeni sentezlenmiş makromoleküller için indikatör olarak izotop işaretli prekürsörlerin alımı; spesifik protein, hormon ve enzim (kollajen, steroidler, nörotransmitterler) deneyleri
Hücre Boyaması	Proteinler, enzimler ve karbonhidratlar için immünohistokimyasal ya da sitokimyasal boyamalar
Hücre Membranı	İzotop işaretli belirteçlerin sızıntısı, enzimlerin sızıntısı (laktat, dehidrogenaz-glukuronidaz), membranda tomurcuklanma, tripan mavi boyası alımı
Mitokondri	Mitokondriyal bütünlük (MTT testi)
Lizozomlar	Vital boyama metotları (Nötral Kırmızı Alım testi)
Ribozomlar	Makromoleküllerin (glikozaminoglikanlar) sentezi, Enzim indüksiyonu veya inhibisyonu (Asit ve alkalin fosfataz)

Hücreler fizikokimyasal hasara maruz kaldıklarında genellikle hücrenin sitoplazmik içeriğinin dışarı sızdığı, hücre içi organellerin yıkıldığı, çoğunlukla lizozomlar tarafından otolitik enzimlerin salgılandığı nekroz ile ölürlür. Ancak hücreler spesifik fizyolojik sinyallere cevapta programlı hücre ölümü (apoptoz) sonucu olarak da ölebilirler [55]. Bu sinyaller hücre içi, örneğin DNA hasarına cevapta, ya da hücre popülasyonunda değişimler gerektiren parakrin faktörlere cevap olarak hücre dışı da olabilir. Toksik etkiler her zaman hücre ölümü ile sonuçlanmaz; en azından

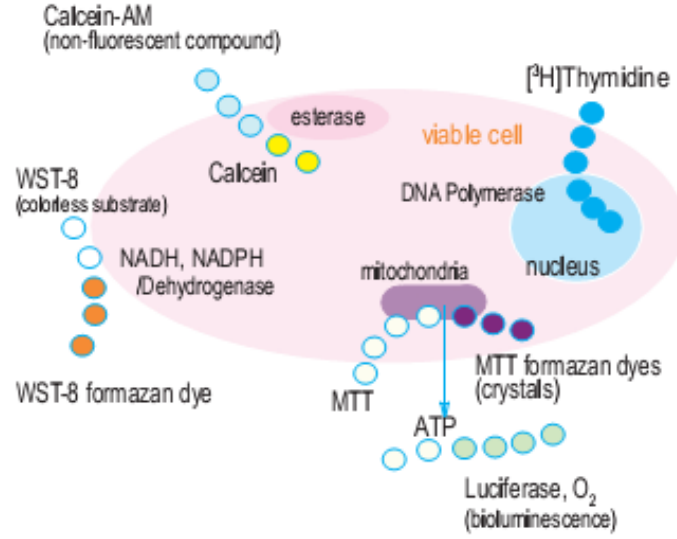
hemen olmayabilir, hücreler metabolik değişimlere girerler veya herhangi bir görülen canlılık kaybı olmaksızın hücre döngüsünden çekilirler. Bu bir sitostatik cevaptır ve genellikle geri döndürülebilir, negatif bir büyüme regülatörü varlığı ile veya nutrient ya da büyüme faktörü eksikliği ile sonuçlanabilir. Ancak, örneğin hücreler apoptoza, yaşlılık sürecine girdiklerinde ya da farklılaşma için indüklendiklerinde geri dönüştürülebilir olmayabilir [54].

Canlılık testleri, hücresel devamlılığı ve hayatta kalımın nitelenebilir etkinliklerini ölçmek için tasarlanmıştır. Bu etkinlikler, ATP ve potansiyel mitokondriyal redüktaz gibi tipik metabolik biyobelirteçlerdir, fakat homeostatik "housekeeping" enzim aktivitelerini de kapsayabilir. Öncül testlerin temeli, bu aktivitelerin bir uygulama süresi sonrası direkt olarak canlı hücre sayısı ile orantılı olmasıdır. Göreceli kısa inkübasyon süresi (8 saat ya da daha az) sırasında bir redüksiyon ya da bu biyobelirteç etkinliklerinin tamamıyla durması, katastrofik membran hasarı (örneğin; primer nekroz) ile açıkça bir sitotoksosite göstergesidir [56]. Uzun inkübasyon sürelerinde kontrole göre biyobelirteç etkinliklerinde azalış, normal hücre bölünme oranında bir azalışa ya da apoptozis gibi programlı eliminasyon mekanizmaları ile hücre ölümünü gösterir [57]. Çünkü canlılık testleri uygulama sonrasında kalan hücrelerin göreceli olarak miktarını ölçer, uzun süre (72 saat) uygulamalarda bile önemli yarar sağlar [58].

Yukarıda da bahsedilmiş olduğu gibi toksisiteyi belirlemeye yönelik hücre temelli birçok test (Şekil 2.3.) bulunmaktadır. Canlılık için en çok kullanılan biyobelirteçlerden biri olan ATP, canlı hücrelerin ATP üretiminin değerlendirilmesine dayanan bir testtir ve ATP hücresel yaşam için vazgeçilmezdir. Lusiferaz temelli testler hücre içi ATP'nin duyarlı bir biçimde kantitatif ölçümüne izin verir. Fakat azalmış ATP konsantrasyonları, proliferasyonun durması (örneğin; hücre yaşlanması nedeniyle, açlık ya da kontakt inhibisyon) ve inhibe edilmiş mitokondriyal solunumu da dahil ederek ölümcül olmayan düzensizliklerle sonuçlanabilir. Bu nedenle, ATP ölçümü direkt olarak hücre canlılığı ile ilişkilendirilmez [59].

Resazurin, kültüre edilmiş hücrelerde indirgendiğinde resofurin oluşturan bir redoks boyasıdır. Resazurin koyu mavi ve pembe resofurin ürününe dönüştürülünceye kadar hafif intrinsik floresana sahiptir. Spesifik hücresel mekanizması bilinmemektedir, ancak muhtemel olarak NADH gibi eşdeğerliklerini indirgeme

reaksiyonlarına katılmaktadır. Canlı hücreler metabolik kapasitelerini hızlıca kaybederler ve bu nedenle bir floresan sinyal oluşturmak için resazurini indirgeyemezler [60].

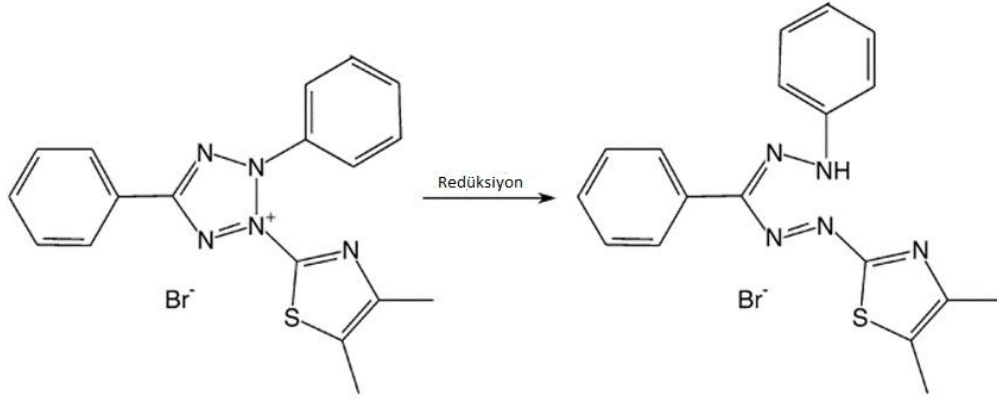


Şekil 2.3. Hücre Canlılık Tespiti için Kullanılan Bazı Testler [61]

Tritiyum işaretli timidin alım metodunda ise timidin hücre büyümesi sebebiyle nukleusa katılır ve nukleustaki tritiyum miktarı bir sintilasyon ölçüm cihazı kullanılarak ölçülür. Bu metot, DNA polimerizasyon aktivitesindeki etkiyi belirlemek için duyarlı bir yöntemdir [61]. Kalsein (Calcein-AM), sitoplazmik esterler tarafından serbest ve güçlü bir floresan olan kalseine hidroliz edilen ve hücrelere hızlıca girebilen bir floresan olmayan-floresan analogudur. Serbest kalcein, bozulmamış plazma membranına sahip canlı hücrelerde iyi tutunur ve bariz bir sitoplazmik dağılıma sahiptir. Çoğunlukla çoklu ilaç direnç çalışmaları için kullanılmaktadır [62]. Sulforodamin (SRB) B testi, sitotoksisite tespiti için en yaygın kullanılan in vitro metotlardan birisidir. Test, hücre kültürü flasklarına trikloroasetik asit ile fikse edilmiş olan hücrelerin protein bileşenlerine SRB'nin bağlanması kapasitesine dayanır. SRB'nin bağlanması stokiyometrik olduğundan, boyanmış hücrelerden ekstrakte olan boya miktarı direkt olarak hücre ağırlığı oranıdır [63].

2.4.1. MTT Testi

Tetrazolyum tuzları 1940'lardan beri doku homojenatlarının indirgeme kapasitelerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Deneyin kimyasal olarak temeli, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]'nin indirgenmesine dayanmaktadır (Şekil 2.4.). MTT'nin belirgin sarı rengi, kimyasal indirgenme sonucunda mavi formazan rengi oluşturmaktadır [64].



Şekil 2.4. MTT'nin indirgenmesi [64]

Bu süreç temel olarak mitokondri ve hücre membranında gerçekleşir. Endoplazmik retikulumdaki redüktaz aktivitesi, hücre içi NADH ve NADPH konsantrasyonuna dayalıdır. Bu nükleotid kofaktörlerinin miktarı, hücre dışı glukozun varlığı ile ilişkilendirilir. Çünkü eskimiş hücre kültürü besiyeri, düşük glukoz konsantrasyonu nedeniyle daha da düşük MTT absorpsiyon okumalarına neden olabilir. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz ve Sitokrom C'de MTT'nin indirgenmesinde rol oynar. Bu nedenle enzimler ya da glikoliz ile etkileşime geçen herhangi bir bileşik ya da uygulama MTT'nin indirgenmesini değiştirebilir, MTT absorpsiyon okumasını etkileyebilir (Çizelge 2.4.) ve özetle hücre sayımının sonucunda farklılıklar olmasına neden olabilir [64].

MTT testi, taze insan tümör hücreleri ve farklı orijinlere ait hücre hatları ile örneğin; hormon, büyüme faktörü, stimüle edici faktörlerin değerlendirilmesi için, insan tümör hücrelerinin kemosenzitivite testleri için, radyosenzitivite ölçümleri için, klonojenizite ölçümleri için, sıvı maddelerde büyüme faktörlerinin ölçümü için, mikrobiyal aktivite tespitinde ve üç boyutlu kültürlerde kullanılmaktadır [65].

Çizelge 2.4. MTT Test Sonuçlarını Etkileyen Faktörler [64]

FAKTÖR	ETKİLEME ŞEKLİ	ÇÖZÜM
Glukoz	Glikoliz azalışı yoluyla glukoz eksikliği MTT oluşumunu azaltır	Eski besi yeri kullanmamak
Protein çökmesi	Organik çözücüler serum proteinleri çökmesine neden olabilir, absorbans okumasını etkileyebilir	Farklı bir çözücü kullanımı
Fenol Kırmızısı	Fenol kırmızısı okumayı etkileyebilir, absorbansı pH'a bağlıdır	Asitli çözücü kullanmak veya fenol kırmızı içermeyen besiyeri
Tamamlanmamış çözünme	Formazan kristallerinin çözünmemesi deneyin duyarlılığını azaltır	Ekstraksiyon süresinin ve/veya karıştırma sıklığının arttırılması
Konfluent olması	Hücre yoğunluğunun yüksek olması metabolik oranı düşürür, hücre sayım oranının daha az miktarda tahmin edilmesiyle sonuçlanır	Mümkünse başlangıçta az hücre yoğunluğu ile teste başlamak
Metabolik oran	Uygulama sonrası hücrelerin metabolik oranı değiştirilebilir	Her bir uygulama için standart grafiği kullanmak ya da daha farklı alternatif hücre sayım metodu bulmak

2.4.2. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Analizi

Canlılık, bir kültürde metabolik olarak aktif hücrelerde canlı oranının ölçümüdür; çünkü normal metabolizmalarını gerçekleştirmek için veya bölünmek için hücrelerin kapasitesini gösterir. Canlılık hücrelerin metabolik durum indikatörleri (örneğin enerji değişimi) ya da spesifik metabolik görevlerini sürdürmek için hücrelerin kapasitesine dayanan fonksiyonel testlerle ölçülür.

Canlılık indeksi boya dışlama metodu gibi basit yöntemlerde de ölçülebilir. Tripan mavisi sayımdan önce hücre süspansiyonuna eklenir. Tripan mavisi boyası ile cansız hücre membranlarından boya geçer ve mavi renk alırlar; cansız hücreler ise, boya alınmadığı için, renksiz kalırlar [66].

2.4.3. Laktat Dehidrogenaz Sitotoksisite Testi

Hücre ölümünü değerlendirmek için en tanımlayıcı metotlardan biri besiyerinde hasar görmüş hücrelerden içeriğin dışarı sızmasıdır. Bu tipik olarak ölü hücrelerden salınan enzim ölçümü ile elde edilir [53].

Laktat dehidrogenaz bütün hücrelerde bulunan stabil sitoplazmik bir enzimdir. Bir hücrenin plazma membranı hasar gördüğünde, hücre kültür süpernatantına veya kana hemen salgılanır. Bu nedenle LDH testi, çeşitli molekül ve ilaçların toksisitesi için kullanılan en yaygın kantitatif testlerden biridir. Bu test, iki aşamalı bir süreç içerir. İlk aşamada, LDH, NAD⁺(nikotinamid adenin dinükleotid) indirgenmesini NADH ve H⁺'a laktatın pirüvata oksidasyonu ile katalizler. İkinci aşamada, diyaferez enzimi yeni oluşmuş NADH ve H⁺'ı renkli bir ürün oluşturmak için kullanır. Tutunmuş hücrelerin üzerindeki besiyeri süpernatantını kullanarak; ölçülen LDH hücre lizisi ve halen kültür flaskına tutunmakta olan hücrelerin membran hasarları nedeniyle hücre dışına salınan LDH'ı ifade eder. Deney sonucunda oluşan rengin miktarı, deneydeki lizise uğramış ya da membranı hasar görüp LDH sızdıran hücre sayısı ile bağlantılıdır [67].

2.4.4. Nötral Kırmızı Alım Testi

Nötral kırmızı alım testi hücre kültüründe canlı hücre sayısının kantitatif değerlendirilmesini sağlamaktadır. Hem biyomedikal hem de çevresel uygulamalar için en çok kullanılan sitotoksisite testlerinden biridir. Canlı hücrelerin lizozomlarında supravital nötral kırmızı boyasının bağlanması temeline dayanmaktadır. Bu zayıf katyonik nötral kırmızı boyası hücre membranına iyonik olmayan pasif difüzyon ile girer ve anyonlara ve/veya lizozomal matriksin fosfat gruplarına elektrostatik hidrofobik bağlarla bağlanır ve lizozomlarda birikir. Daha sonra boya canlı hücrelerden asidik bir etanol çözeltisi ile çıkartılır ve çözünmüş boyanın absorbansı spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Nötral kırmızı alımı hücrenin ATP üretimi yoluyla pH dengesini sürdürebilme yeteneğine bağlıdır. Fizyolojik pH'da, boyanın net yükü sıfıra yakındır; bu durum hücre membranından boyanın girişine olanak sağlar. Lizozomların içinde, sitoplazmadan daha düşük bir proton gradienti vardır. Yani boya yüklü hale gelir ve lizozomların içinde kalır. Hücre öldüğünde ise ya da pH gradienti düştüğünde boya hücre içinde kalmaz. Sonuç olarak hücre içerisinde kalan boya miktarı canlı hücre sayısının oranıdır. Ek olarak, canlı hücreler tarafından

nötral kırmızı alımı hücre yüzeyinde ya da lizozomal membranda değişimler ile modifiye edilebilir. Yani nötral kırmızı boyası alımıyla spesifik lizozomal kapasitelerine göre; canlı, hasar görmüş ya da ölü hücreler arasındaki fark anlaşılabilir. Nötral kırmızı boyası bağlanması ile beraber gelen lizozomal bütünlük, hücre canlılığının oldukça duyarlı bir indikatörü olarak değerlendirilebilir. Nötral kırmızı alım testi, hücre canlılığı miktarını belirler ve hücre replikasyonu, sitostatik etkileri ya da hücre ölümünün miktarını belirleyebilir [68].

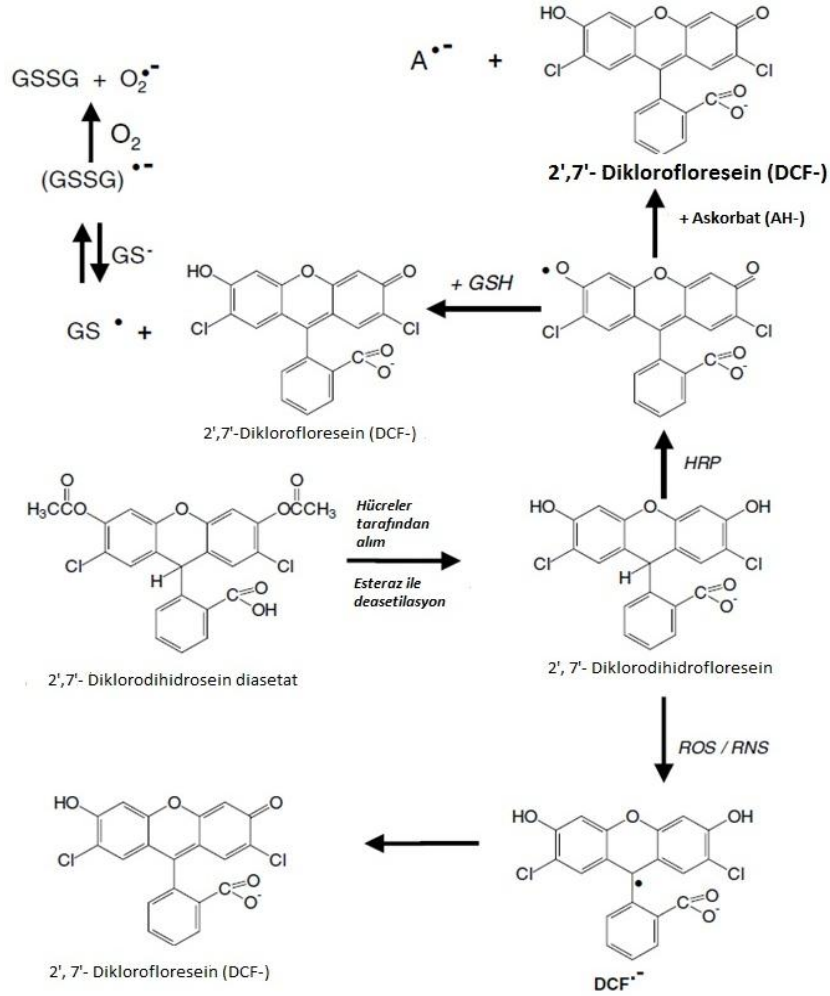
2.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki dengesizlik nedeniyle aşırı oksidan varlığı ile karakterize edilir [69]. Oksidatif stres; lipitler, proteinler ve biyolojik makromoleküllere büyük zarar ve şiddetli hücre hasara neden olarak stabil olmayan olası bir hücre çevre yaratan zincir reaksiyonu yan ürünlerinin oluşması ile sonuçlanır. Oksidatif stres doku hasarı, ileri yaş ilişkili disfonksiyonlar ve ateroskleroz, artrit, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, metabolik sendrom ve çeşitli kanserleri de kapsayan geniş spektrumlu ve özellikle dejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilir [70,71].

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu eşleşmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır [72].

Reaktif oksijen türleri birçok toksik ve patolojik duruma cevap olarak programlı hücre ölümünde (apoptoz) ya da programlı olmayan hücre ölümünde yaygın bir aracı olarak görev yapar. Birçok deneysel kanıt pestisitler, ağır metaller ve mikotoksinleri de kapsayan yapısal olarak farklı ve benzer olmayan çevresel kirleticilerin vücutta çeşitli organlarda ve immün fonksiyonlar üzerinde yan etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu kaskat etkinliği, antioksidan savunma sisteminin down regülasyonu ve gen ekspresyonunun değişmesi ile sonuçlanır ve kimyasal toksisiteye sebep olur [73].

Hücrelerde reaktif türlerin tespitinde örneğin; diklorofloroseindiasetat (DCFDA), dihidrorodamin 123, dihidroetidyum, luminol ve lusijenin gibi birçok test kullanılmaktadır.



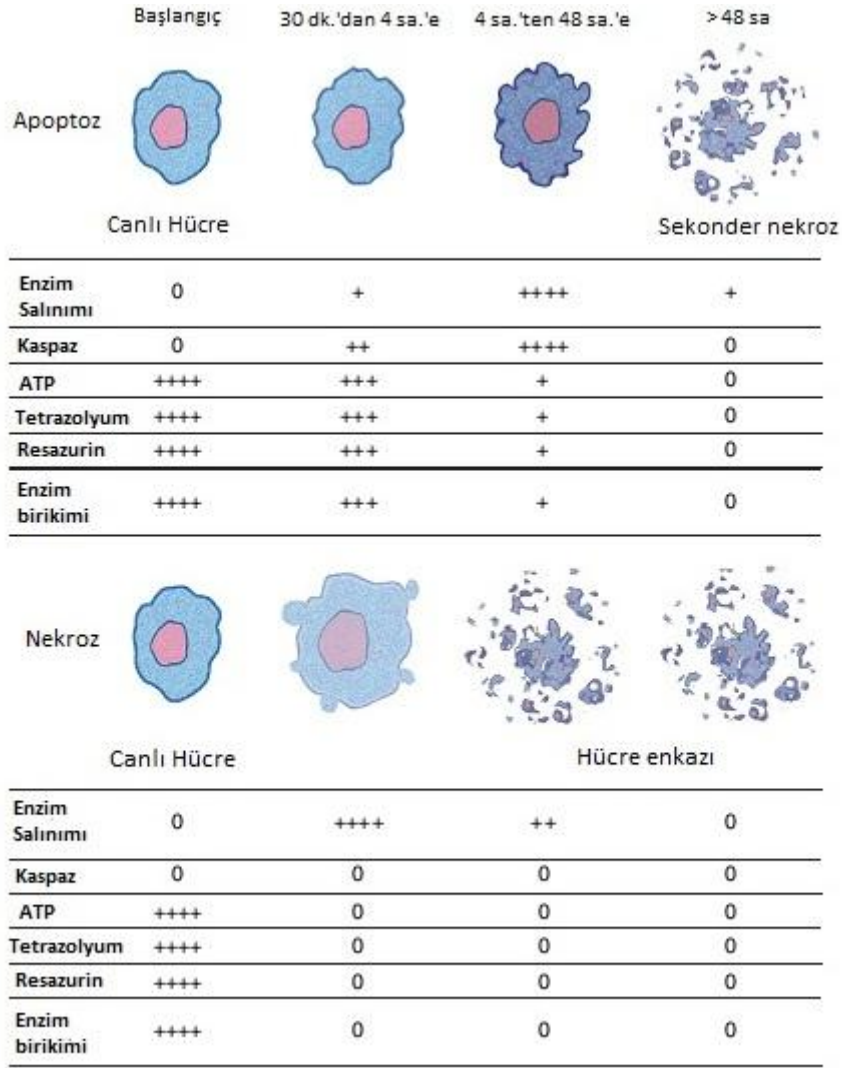
Şekil 2.5. DCFDA'nın floresan bir ürün olan diklorofloresine dönüşümü [74]

Bu testin esası, floresan olmayan bir floresin türevinin hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oksitlendikten sonra floresanı yayması esasına dayanır. Yayılan floresan oranı, hidrojen peroksit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. İşlem görmemiş hücrelere uygulandığında; iyonik ve polar olmayan DCFDA hücre membranından geçer ve hücresel esterazlar tarafından enzimatik olarak floresan olmayan bir bileşik olan DCFH'a hidrolize edilir. Reaktif oksijen türlerinin varlığında ise; oldukça floresan bir bileşik olan diklorofloresine (DCF) okside edilir(Şekil 2.5.). Böylece hücresel DCFDA testi, tüm oksidatif stres miktarını belirlemek için hücrelerde bir gösterge olarak kullanılabilir [75]. Fakat, DCFDA floresan bir ürün oluşturmak için H₂O₂ ile reaksiyona girmediği genel bir reaktif oksijen tür tespit edici olarak değerlendirilmesine dair yayınlar da mevcuttur [76].

2.6. Hücre Ölümü

Apoptoz ve nekroz kendilerine özgü ayırt edici morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bulunan iki farklı hücre ölümü mekanizmasıdır. Hücre travması sonrasında dakikalar içinde oluşan nekroz, hücre membranına eksternal hasar, homeostazın bozulması, su ve ekstraselüler iyon akışı, organel şişmesi, hücre parçalanması (lisis) ve sonuçta inflamatuvar hücre saldırısı ile sonuçlanan bir "hücre katili" olarak nitelendirilebilir. Apoptoz ise nekrozdaki daha yavaş olan bir ölüm şeklidir, birkaç saatten birkaç güne kadar süre gerektiren ve tek bir hücrenin içerisinde başlayan moleküler sinyaller ile ortaya çıkar. Apoptozun temel unsurları, ölüm reseptörü aktivasyonu, hücre morfolojide değişimler (büzülme), membran değişimi, DNA fragmentasyonu, mitokondri bozunması ve kaspaz aktivasyonlarıdır [77]. Apoptoz ve nekrozun sitotoksik ve canlılık açısından karşılaştırılması Şekil 2.6.'te verilmiştir.

Hücre ölüm şeklini belirlemede çeşitli boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan birisi akridin oranj - propidyum iyodit yöntemidir. Akridin oranj (AO) ve propidyum iyodit (PI) DNA'ya bağlandıklarında, sırasıyla yeşil ve turuncu floresans ışımaya yayan nükleik asit spesifik florokromlardır. İkisinden sadece akridin oranj canlı ve erken apoptotik hücrelerin plazma membranından geçebilir. Floresan mikroskopide görüntülendiğinde apoptotik hücrelerin yoğun yeşil bir alan olarak kromatin kondensasyonu gösteren parlak yeşil nükleusları varken; canlı hücreler bozulmamış bütün bir yapıya sahip yeşil nükleusları vardır. Geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler hem akridin oranj hem de propidyum iyodit ile boyanırlar. Göreceli olarak propidyum iyodit en yüksek yoğunluklu emisyonu oluşturur. Çünkü geç apoptotik hücreler kromatin kondensasyonu gösteren turuncu bir nükleus gösterirken; nekrotik hücreler bozulmamış bir yapıya sahip turuncu bir nükleus gösterir [78].



Şekil 2.6. Tipik apoptotik ve primer nekrotik olaylar sırasında canlılık ve sitotoksisite belirteçlerinin kronolojik karşılaştırılması [53]

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücre Kültürü

Tüm hücre kültürü çalışmaları laminar akım kabinin (Esco Laminar Kabin Plus II BSC) içinde ve aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında fare fibroblast L929 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı sağlıklı erkek fareden subkütanöz areolar dokudan (fibroblast bağ doku) elde edilmiş bir hattır. L929 hücre hattı Şap Enstitüsü bünyesindeki Hücre Bankası Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HUKUK, Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

Yapılan testlerde L929 hücrelerinin 7. pasaj ve 15. pasajlar arasındaki hücreleri kullanılmıştır.

3.2. L929 Hücrelerinin Üretilmesi ve Pasajlanması

L929 hücreleri %10 fetal sıgır serumu (FBS, Biochrom), %1 gentamisin ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 3.7 g/l NaHCO₃, 4.5 g/l glukoz, stabil glutamin, Biochrom AG, Berlin Almanya) içeren besiyerinde %5 CO₂ ve 37°C koşullara sahip etüvde (Sanyo MCO18AC) inkübe edilerek üretilmiştir.

Optimum koşullarda inkübe olan hücreler konfluent (buldukları yüzeyi %80-90 kapladıklarında) olduklarında, çoğaltmak için tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Bunun için Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin Almanya) kullanılmış olup hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Bu işlem için 75 cm² flasttaki hücreler öncelikle 2 ml Tripsin/EDTA ile yıkanmış ve böylece FBS'un besiyerindeki etkinliği inhibe edilmiştir. Daha sonra tekrar 1,5 ml Tripsin/EDTA alarak flask CO₂'li etüve kaldırılmıştır. Etüvde 37°C'de hücreler birkaç dakika bekletilmiş, bu süreçte hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Yeterli süre beklendikten sonra etüvden alınan hücrelerin üzerine hazırlanan besiyeri eklenmiş ve hücre kümeleri oluşmaması için pipetaj yapılmıştır. Tripsinizasyon işlemi sonunda yüzeyden kaldırılan hücreler, süspansiyon haline getirilmiş ve çoğaltması için yeni flastlara bölünüp CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

3.3. L929 Hücrelerinin Dondurulması ve Çözülmesi

Pasajlama işlemi sonrasında hücrelerin konfluent olmaları için yeteri kadar süre beklenilmiş, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere stoklar hazırlanmıştır. Yapılan bu işlem kriyoprezervasyon olarak adlandırılmaktadır. Dondurma işleminin hücre yapısını bozabilecek etkilerinden kaçınmak için kriyoprotektan olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır ve dondurma işlemi için gerekli besiyeri, %90 fetal sığır serumu ve %10 DMSO içerecek biçimde hazırlanmıştır.

Hücrelerin dondurulması için yine öncelikle tripsinizasyon yapılmış, daha sonra süspanse hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5810R) edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak üzerine dondurma besiyeri eklenmiş olup, hücreler kriyotüplere paylaştırılıp tüp üzerine gerekli etiket bilgileri yazıldıktan sonra dondurulmuştur.

Çalışmalarda kullanılacak olan fare L929 fibroblast hücreleri -80°C'de kriyotüplerin içerisinde muhafaza edilmektedir. Bu hücreler çalışma öncesi derin dondurucudan alınarak 37°C'de su banyosunda çözündürülmüş ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kriyoprezervasyonda kullanılan DMSO'in hücrelere zarar vermemesi için ivedilikle süpernatant atılmış, pellette kalan hücreler alınarak besiyerli 25 cm² flasklara aktarılmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir.

3.4. Benzil Benzoat için Uygun Çözücü Seçimi

Benzil benzoattan stok çözeltisi hazırlamada en uygun çözücüyü tespit etmek için çeşitli çözücüler denenmiştir. Bunun için metanol, aseton, etil asetat, dimetilformamid (DMF), butanol ve etanol ile denemeler yapılmış, her bir çözücü için önce benzil benzoat-çözücü şeklinde karışımlar hazırlanmış ve bu karışımlar daha sonra istenen konsantrasyonlarda olmak üzere besiyerinde dilüe edilmiştir. Bu çalışmaların sonunda; hem benzil benzoat-çözücü karışımı açısından hem de çözücü için literatürde belirtilen düşük toksik özellikleri de düşünülerek çözücü olarak etanol seçilmiştir.

3.5. Benzil Benzoatın Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Çözücü olarak etanol seçiminden sonraki aşama, benzil benzoat (Merck) için stok çözeltisinin hazırlanması olmuştur. Stok çözeltisi için 1,895 ml benzil benzoat (BB) toplam hacim 20 ml olacak şekilde etanolde çözülmüş ve 500 mM BB konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu ana stoktan alınan benzil benzoat, serum içermeyen besiyerinde seyreltilerek, uygulanması düşünülen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. LC₅₀ dozunun saptanması için deneme dozlarına karar verilmiştir. Bu deneme dozlarının seçimi literatür araştırması sonucunda belirlenmiştir. Seçilen deneme dozları: 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM; 20 mM şeklinde olup bu dozlar benzil benzoatın LC₅₀ dozunun belirlenmesi için yapılacak olan MTT testlerinde kullanılmıştır. MTT testiyle LC₅₀ değerinin belirlenmesiyle 10 mM, 15 mM ve 20 mM dozları daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Ayrıca çalışma sırasında hazırlanan benzil benzoat uygulama dozları hazırlanırken FBS ilave edilmemiştir. Benzil benzoat ile yapılan denemeler sonucu, uygulama dozu hazırlanışında çökelti oluşturmamasından dolayı, besiyeri içerisindeki serum proteinlerine bağlandığı düşünülmüştür. Fötal sığır serum ve benzil benzoat ile yapılacak bir çalışmanın sonucunda nitelikli veriler elde edilmesinin zorluğundan dolayı serumsuz besiyeri ile uygulama dozlarının hazırlanması tercih edilmiştir.

3.6. MTT Testi

MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi sitotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan ilk basamak testlerden biridir. Bu çalışmada MTT testiyle hücrelerin metabolik aktivitesi tetrazolyum tuzu ile spektrofotometrik olarak ölçülerek LC₅₀ dozları belirlenmiştir. MTT testini uygulamak için ilk olarak hücreler 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 1×10^5 hücre sayısı olacak şekilde yerleştirilmiş, hücreler 24 saat bekletilerek tutunmaları sağlanmıştır. Daha sonra yukarıda belirtilen dozlarda benzil benzoat-besiyeri konsantrasyonları hazırlanmış, daha önceki besiyeri uzaklaştırılarak hazırlanan karışım 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiştir. Ayrıca deney dizaynı yapılırken kör kuyu olarak sadece besiyeri içeren hücre kuyucukları da konulup, çalışmaya dâhil edilmiştir. Uygulama 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde yapılmıştır. Uygulama süresinin bitiminde 13

µl/kuyucuk olacak şekilde MTT çözeltisi kuyucuklara konulmuş ve prosedüre uygun olarak 3 saat inkübe edilmiştir. Bu sırada ışık almamasına özen gösterilmiş ve inkübasyon süresi bitiminde formazan kristallerini çözmek için 100 µl/kuyucuk olmak üzere izopropil alkol kullanılmıştır. Plakların optik dansite (OD) değeri 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak mikropalak okuyucuda (BIO-TEK µQUANT) ölçülmüştür.

Verilerin ölçümü sonucunda hesaplama;

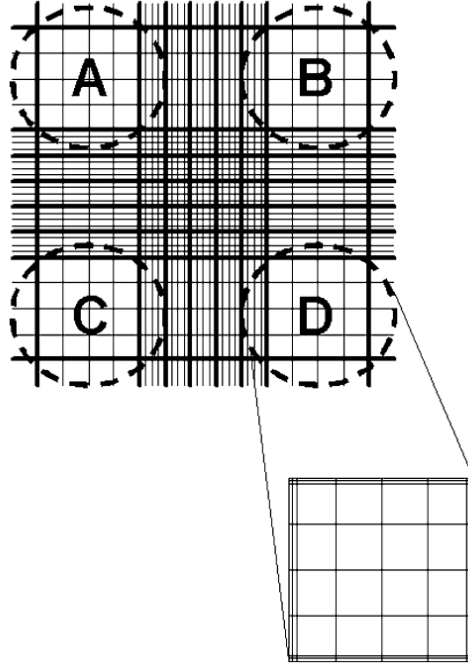
$$\frac{(Uygulama\ Dozu\ OD\ ortalaması - K\ddot{o}r\ kuyu)}{(Kontrol\ OD\ ortalaması - K\ddot{o}r\ kuyu)} \times 100$$

şeklinde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre LC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

3.7.Tripan Mavisi ile Canlı Hücre Sayımı

Hücre canlılığı analizlerinde en sık kullanılan yöntemlerden biri, tripan mavisi ile boya dışlama yöntemidir. Tripan mavisi, hücre membranı zarar görmüş cansız hücrelerin içine girerek belirgin mavi renk veren vital bir boyadır. Canlı hücreler ise boyanmamaktadır.

L929 hücrelerinde 3x10⁵ hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara süspansiyon haline getirilip konulmuştur. Hücreler 24 saat %5 CO₂ içeren 37°C'de etüvde inkübe edildikten sonra üzerlerine benzil benzoat uygulanmıştır. 24 ve 48 saat uygulama süresinden sonra yüzen hücrelerin sayılabilmesi amacıyla besiyerleri toplanmış, tutunan hücrelere yüzeyden ayrılımları için tripsinizasyon uygulaması yapılmıştır. Daha sonra hem yüzen hem de tutunan hücrelere %0,5 tripan mavisi solüsyonu eklenmiştir. Hücre sayımında Şekil 3.1.'de görülen hemositometre (Bürker Lamı) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Hemositometre şekli [79]

Tripan mavisi ile hücre sayımı yapılırken şekilde görülen hemositometre lamının A, B, C, D kareleri dikkate alınmıştır. Bu karelerdeki hem canlı hem de ölü hücreler tek tek sayılmış ardından toplam hücre sayısı belirlenmiştir. Bu işlem hem yüzen hem de tutunan hücreler için ayrı ayrı yapılmıştır. 4 karedeki canlı ve toplam hücre sayısının aritmetik ortalaması alınmıştır. Yüzde canlılık oranı;

$$\% \text{Canlı Hücre} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}}$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. Laktat Dehidrogenaz Sitotoksisite Testi

Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi üretici firmanın (Biovision) önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Hücreler 2×10^5 hücre/ml süspansiyonlarda hazırlanmış, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara dağıtılmıştır. Bu plaklar %5 CO₂'li etüvde 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde besiyerleri toplanarak 600 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanttan 10 µl alınıp sonra üzerine 100 µl LDH reaksiyon karışımı eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası referans dalga boyu 650 nm olacak şekilde 450 nm dalga boyunda mikroplak okuyuculu

spektrofometrede (BIO-TEK μ QUANT) ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile yüzde sitotoksosite hesaplanırken;

$$\%Sitotoksosite = \frac{(Test \text{ örneği} - Düşük Kontrol)}{(Kontrol Örnek - Düşük Kontrol)} \times 100$$

formülü kullanılmıştır. Sonuçların kantitatif değerlendirilmesi yapılırken bütün örneklerden background (geri plan) kontrol grubu ortalama OD değeri çıkarılması gözardı edilmemiştir.

3.9. Nötral Kırmızı Alımı Hücre Canlılığı Testi

Nötral kırmızı boya alım testinin uygulanması için öncelikle hücreler 5×10^4 hücre/ml yoğunlukta 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Ekim öncesinde hücre canlılığı tripan boyası ile tespit edilerek, %95 canlılık seviyesinde olmasına özen gösterilmiştir. Her bir kuyucuğa 200 ul hücre ekimi yapılmış, hücrelerin tutunması için bir gün inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücrelere 10, 15 ve 20 mM benzil benzoat uygulanarak 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Önceden hazırlanan nötral kırmızı solüsyonu 10 dk 600g (~1800 rpm)'de santrifüj edilmiş, benzil benzoat uygulama süresi sona erdiğinde 96 kuyucuklu plaklarda olan besiyerleri atılarak yerine her bir kuyucuğa 100 ul nötral kırmızı çalışma solüsyonu eklenmiştir. Hücreler 37°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra inkübasyon bitimine doğru morfolojik olarak Olympus CKX41 inverted mikroskopta incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. 2 saat sonunda nötral kırmızı solüsyonu uzaklaştırılmış, hücreler önce 150 ul PBS ile yıkanmış, ardından 150 ul nötral kırmızı destain solüsyonu kuyucuklara konulmuştur. Solüsyonun tamamıyla dağılıp, homojen bir karışım oluşturması için 10 dk mikroplak çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Son olarak OD değeri 540 nm'de spektrofotometrik (BIO-TEK μ QUANT) olarak ölçülmüştür.

3.10. DCFDA ile Hücresel Reaktif Oksijen Türlerinin Tespiti

Hücresel reaktif oksijen türlerinin tespiti için kullanılan DCFDA testi (ABCAM Cat No: 113851), üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Öncelikle hücreler 96 kuyucuklu plaklara $2,5 \times 10^4$ hücre / kuyucuk olacak şekilde her kuyucuk için 100 ul hücre süspansiyonu gelecek şekilde ekilmiştir. Hücrelerin tutunması için bir gün beklenmiş ve ertesi gün üzerine 10 mM, 15 mM, 20 mM benzil benzoat

dozları eklenmiştir. Ayrıca bu deney için kör kuyu (hücresiz), negatif (hücresiz ve test materyali içeren grup) ve pozitif (tert butil hidroksi peroksit, TBHP grubu) kontrol grupları da kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan plakların florometrik ölçümü yapılacağı için çevresi siyah ancak altı şeffaf olanlar (Grenier Bioone, Cat No: 655986) tercih edilmiştir.

Doz grupları eklendikten sonra plaklar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitimine 4 saat kala pozitif kontrol grubu için 500 µM TBHP hücrelere 11 µl eklenmiş ve etüve tekrar geri koyulmuştur. 24 saat inkübasyon süresinin bitimine 1 saat kala ise 40 µM konsantrasyonda DCFDA hazırlanmış ve 37°C'ye gelmesi için beklenmiştir. Ardından inkübasyonun bitimine 45 dakika kala 100 µl DCFDA solüsyonu hücrelere eklenmiştir. Bütün örnekler duplike çalışılmıştır. Son olarak plak, Biotek Synergy H1 Hibrit Reader'da florometrik olarak eksitasyon 485 nm ve emisyon 535 nm'de okunmuştur. Veriler değerlendirilirken bütün kör kuyu örneklerinin ortalaması, test örneklerinden çıkarılmış ve sonuçlar floresan yoğunluk olarak kontrol gruplarına göre kat değişikliği baz alınarak verilmiştir.

3.11. Akridin Oranj - Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

Sitotoksisite değerlendirilmesi kapsamında olası hücre ölüm tipinin belirlenmesi amacıyla L929 hücre kültüründe akridin oranj-propidyum iyodit (AOPI) boyaması yapılmıştır. Bu boyama için hücreler süspanse edilip, 4 kuyucuklu plaklara 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde yerleştirilmiştir. Benzil benzoat; 10, 15 ve 20 mM dozlarında olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda önce hücreler PBS ile yıkanmış, ardından akridin oranj (25 µl) ve propidyum iyodit (25 µl) karışımı 1:1 oranda 10 saniye uygulanıp bu solüsyon dökülmüş ve son olarak yapıştırma materyali olarak PBS-gliserol karışımı kullanılarak inverted mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında vital inceleme yapılmıştır.

Akridin oranj-propidyum iyodit boyaması sonucu temel olarak canlı hücreler zar bütünlüğü bozulmadığı için yeşil, ölü hücreler ise sarı kırmızı ve turuncu renklerde gözlenmiştir. Propidyum iyodit boyasını içine almamış hücreler yaygın kromatine sahipse canlı, kondanse kromatine sahip hücreler ise apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Propidyum iyoditi içine alan kırmızı hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilmiştir.

L929 hücre kültüründe oluşabilecek hücre ölümü sonucunda nükleer fragmentasyon, hücre membranı bütünlüğü bozulması gibi bulgular bu ikili boyama ile farklı renkte boyanma özelliği sayesinde tespit edilip mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir.

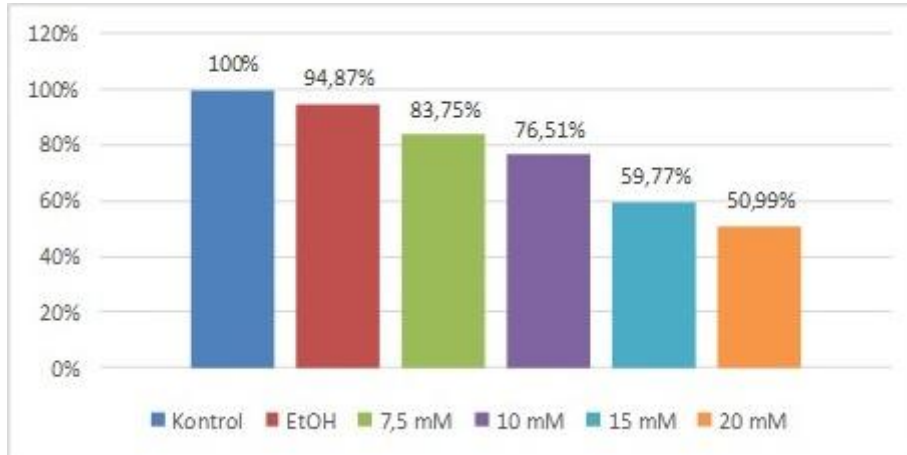
3.12. İstatiksel Analizler

Yapılan bütün testler en az üç tekrarlı olarak uygulanmış ve elde edilen bulguların ortalamaları alınmıştır. Deneysel verilerin istatistiksel analizi için SPSS programı (IBM SPSS Statistics, Sürüm 21) kullanılmıştır. Her grupta ayrı ayrı 24 ve 48 saat sonucu elde edilen bulguların karşılaştırılması Wilcoxon testi, grup içi karşılaştırmalar veriler normal dağılım göstermediği için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi, grup içerisindeki dozların ikili karşılaştırmaları ise Conover Dunn testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. $P \leq 0.05$ anlamlılık derecesi olarak kabul edilmiştir.

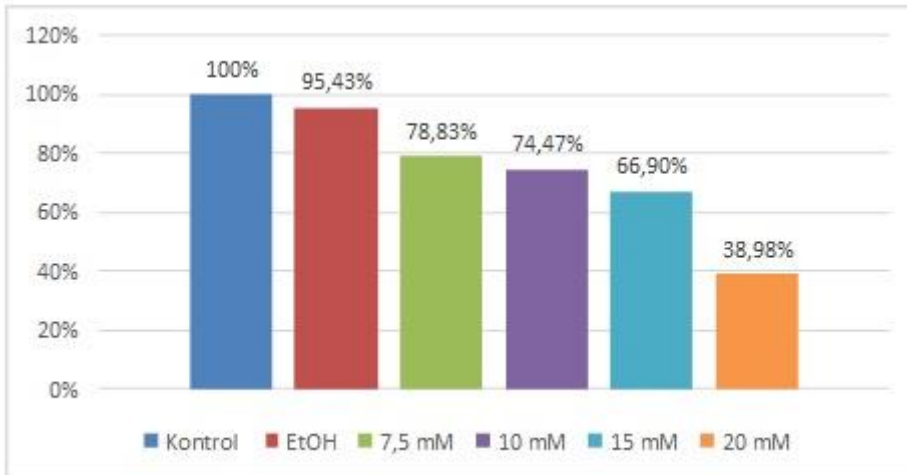
4. SONUÇLAR

4.1. MTT Sonuçları

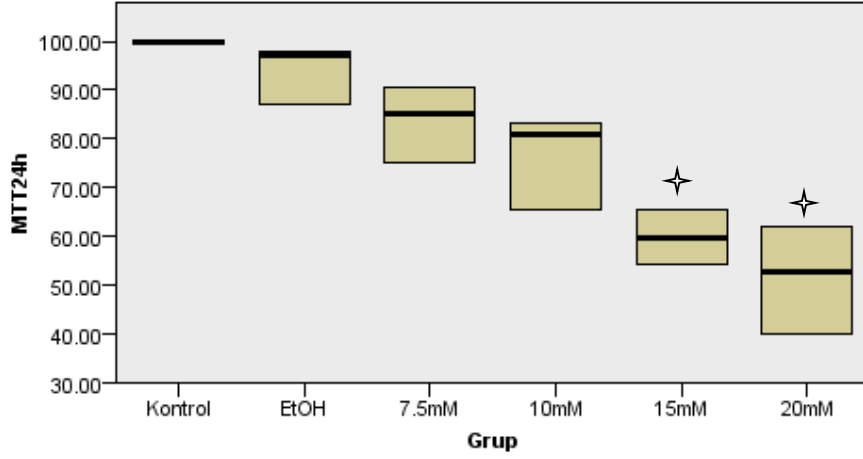
Benzil benzoatın hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT testine dayanan LC_{50} değerini belirlemek amacıyla benzil benzoat L929 hücrelerinde daha önce belirtilen dozlarda denenmiştir. Kontrol grubu ile etanol grubu arasında herhangi önemli bir fark bulunmamış olup LC_{50} değeri; yapılan SPSS probit analizi ile 24 saat için **21,082 mM**, 48 saat için ise **18,293 mM** olarak hesaplanmıştır. Benzil benzoatın artan konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda hücre canlılığındaki azalma inkübasyon süresine bağlı olarak da gözlenmiştir (Şekil 4.1. ve 4.2.).



Şekil 4.1. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması MTT yüzde (%) canlılık sonuçları

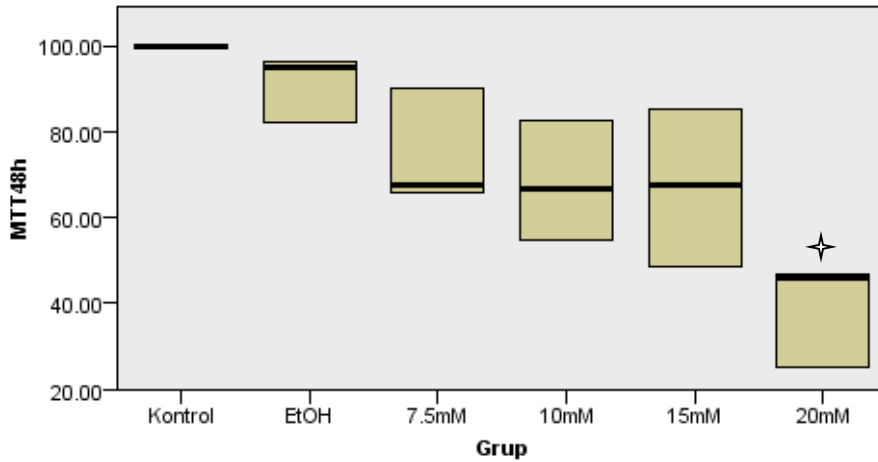


Şekil 4.2. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması MTT yüzde (%) canlılık sonuçları



Şekil 4.3. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen MTT bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p \leq 0.05$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✦ işareti ile gösterilmiştir.

Şekil 4.3.'de görüleceği gibi 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen MTT verileri, değerlendirildiğinde kontrole göre 15 ve 20 mM benzil benzoat dozları istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Diğer dozların birbirlerine göre ikili karşılaştırmalarında ise istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

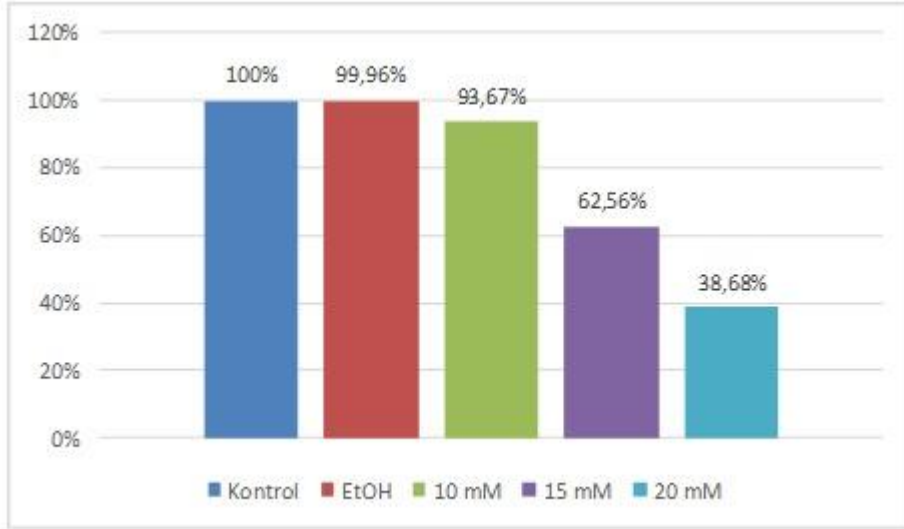


Şekil 4.4. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen MTT bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p \leq 0.05$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✦ işareti ile gösterilmiştir.

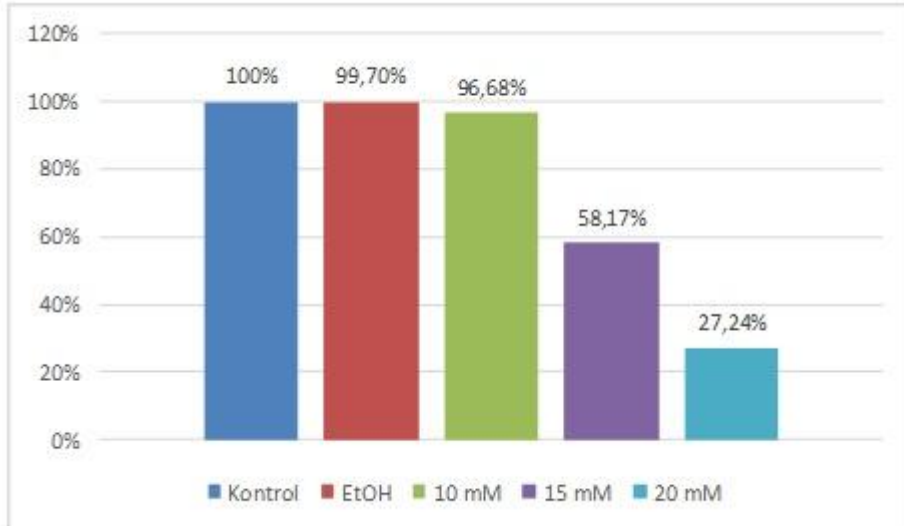
Şekil 4.4.'de de görülen 48 saatlik MTT inkübasyon bulguları istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde sadece kontrol ve 20 mM benzil benzoat dozu arasında ($p \leq 0.05$) farklılık bulunmuştur, diğerlerinde herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

4.2. Tripan Mavisi ile Canlı Hücre Sayımı Sonuçları

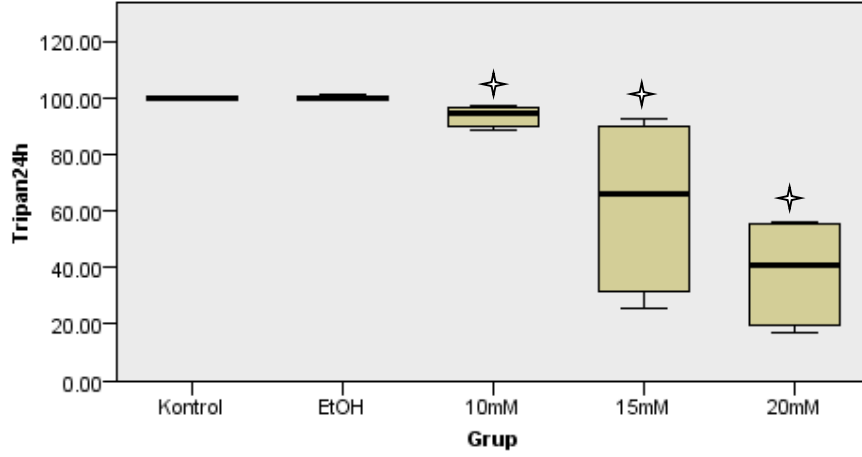
L929 fibroblast hücre hattında 24 ve 48 saat inkübasyon süresince benzil benzoat uygulanması sonrasında tripan mavisi boyası ile yapılan canlı hücre sayımı sonucunda hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. Hücre canlılığı doza bağlı olarak azalmıştır. Benzil benzoatın kontrole göre etanol ve 10 mM dozlarında çok ciddi farklar görülmezken, 15 mM ve 20 mM dozlarında inkübasyon süresine bağlı olarak canlılıkta önemli oranda azalma görülmüştür (Şekil 4.5. ve 4.6.).



Şekil 4.5. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu yüzde (%) canlılık sonuçları

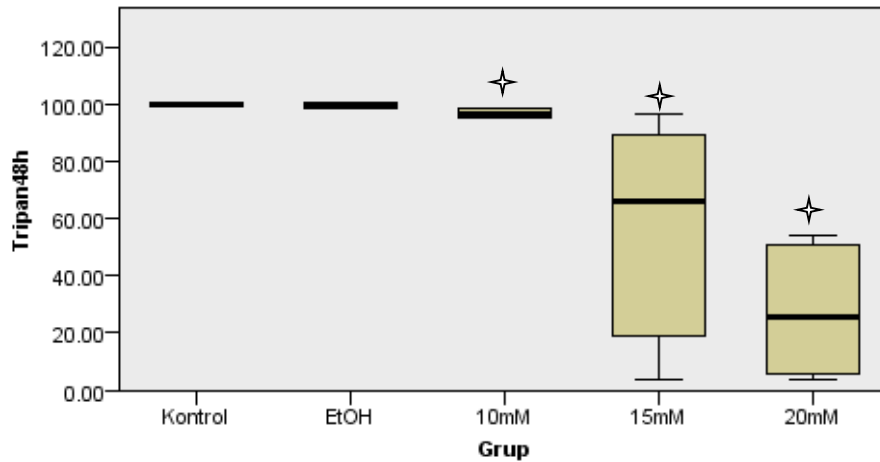


Şekil 4.6. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu yüzde (%) canlılık sonuçları



Şekil 4.7. L929 hücrelerinin 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen tripan mavisi bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ($p = 0.003$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✨ işareti ile gösterilmiştir.

24 saatlik benzil benzoat uygulamasının tripan mavisi canlılık testiyle değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel açıdan farklılık (Kruskal Wallis, $p=0.003$) gösterdiği için ikili karşılaştırmalar Conover Dunn testiyle yapıldı. Kontrol ve etanol (EtOH) kontrol grupları ile 15 mM ve 20 mM benzil benzoat uygulama dozları kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık gözlenmezken; diğer bütün ikili gruplar istatistiksel açıdan birbirinden farklı olarak bulundu (Şekil 4.7.).

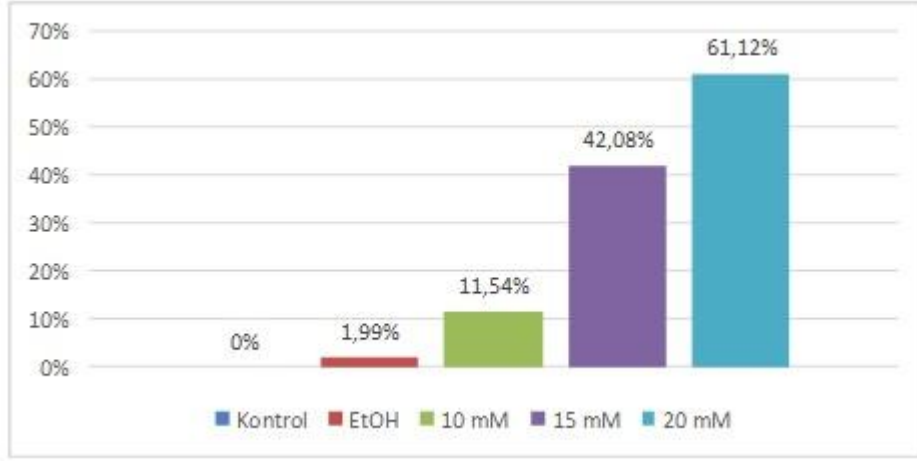


Şekil 4.8. L929 hücrelerinin 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen tripan mavisi bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ($p=0.003$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✨ işareti ile gösterilmiştir.

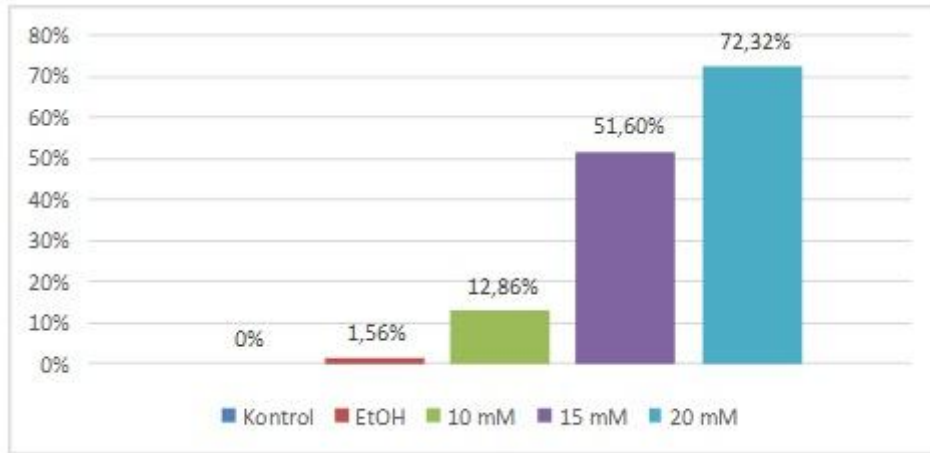
48 saat bulguları değerlendirildiğinde elde edilen veriler istatistiksel açıdan farklılık ($p=0.003$) gösterdiği için ikili karşılaştırmalar Conover Dunn testiyle yapıldı. Kontrol ile etanol kontrol grubu, 10 mM ve 15 mM benzil benzoat uygulama dozu, 15 ve 20 mM uygulama dozları kendi aralarında istatistiksel olarak birbirlerinden farklı bulunmamıştır; ancak diğer bütün ikili gruplar değerlendirildiklerinde istatistiksel açıdan farklı saptanmamıştır (Şekil 4.8.).

4.3. LDH Sitotoksosite Sonuçları

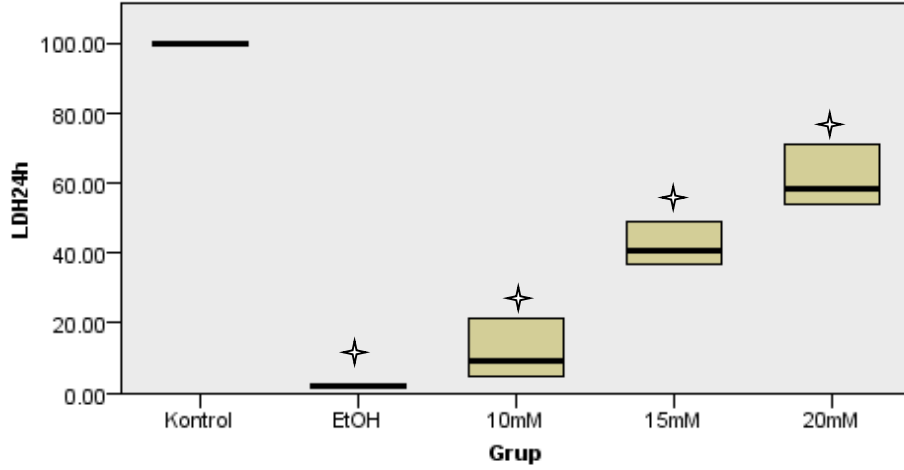
Benzil benzoatın membran hasarı, LDH sitotoksosite kiti kullanılarak tespit edilmiş ve sitotoksosite yüzdeleri hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalara göre, benzil benzoatın neden olduğu sitotoksitede doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak artış gözlenmiştir (Şekil 4.9. ve 4.10.).



Şekil 4.9. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu LDH sitotoksosite sonuçları

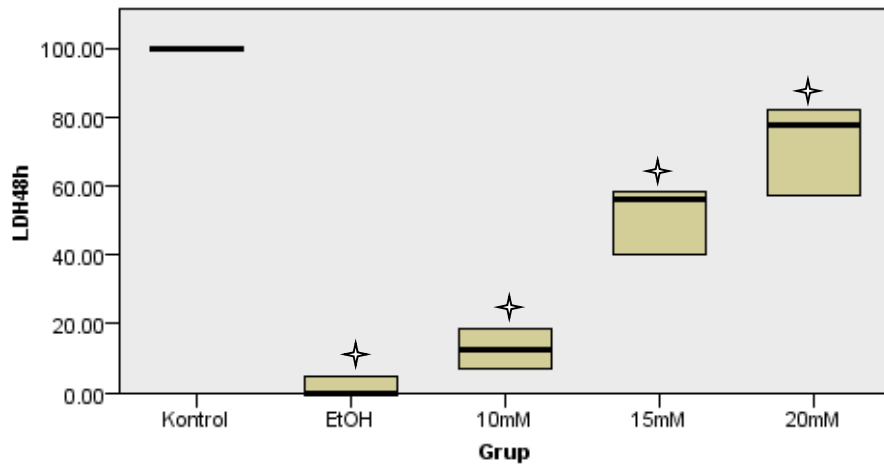


Şekil 4.10. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu LDH sitotoksosite sonuçları



Şekil 4.11. L929 hücrelerinde 24 saat benzil benzoat inkübasyon sonucu elde edilen LDH sitotoksosite bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ($p = 0.006$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✧ işareti ile gösterilmiştir.

Laktat dehidrogenaz sitotoksosite testi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde hem 24 saat hem de 48 saat gruplarında farklılık bulundu ($p=0.006$). İkili karşılaştırmalar Conover Dunn testiyle yapıldı ve bütün ikili gruplar kendi aralarında farklılık anlamlı bulundu. Her veri grubu için 24 ve 48 saat sonuçları ise Wilcoxon testiyle karşılaştırılmış olup, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.11. ve 4.12.).



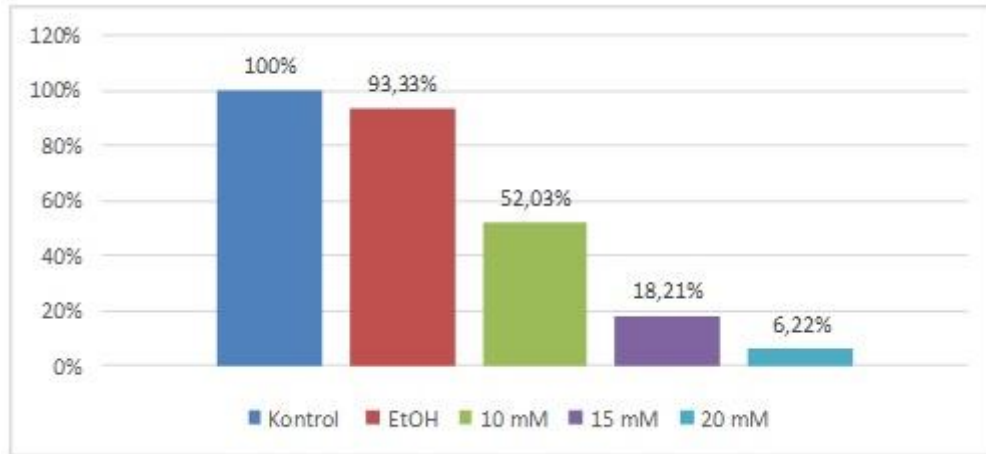
Şekil 4.12. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen LDH sitotoksosite bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ($p = 0.006$). Kontrole göre istatistiksel farklı olanlar ✧ işareti ile gösterilmiştir.

4.4. Nötral Kırmızı Alım Testi Sonuçları

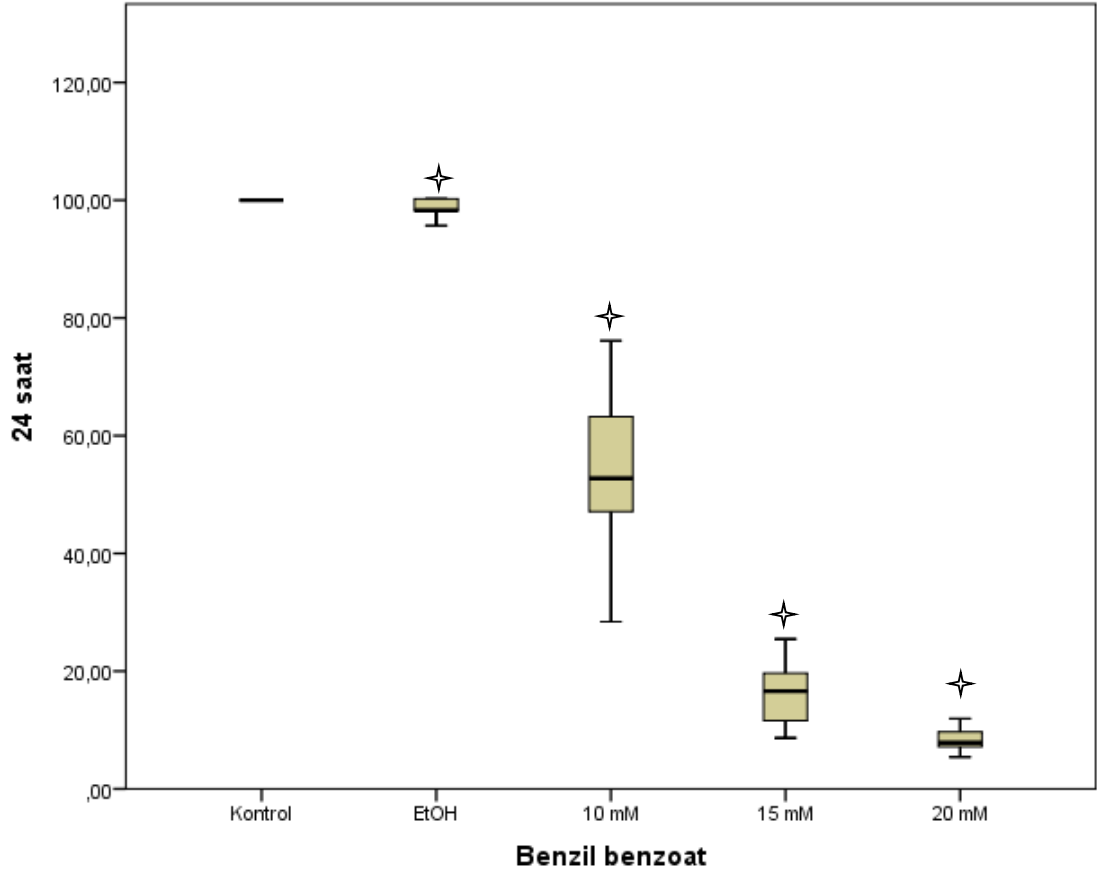
Benzil benzoat sitotoksitesi, MTT ve laktat dehidrogenaz sitotoksitesi gibi testlerin yanında nötral kırmızı alım testi ile de değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, doza bağlı olarak hücre canlılığında ciddi bir düşüş olduğunu göstermektedir. 24 ve 48 saat benzil benzoat uygulaması sonucu hücre canlılığındaki azalma sırasıyla Şekil 4.13. ve 4.14.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu nötral kırmızı alım testine göre hücre canlılık sonuçları

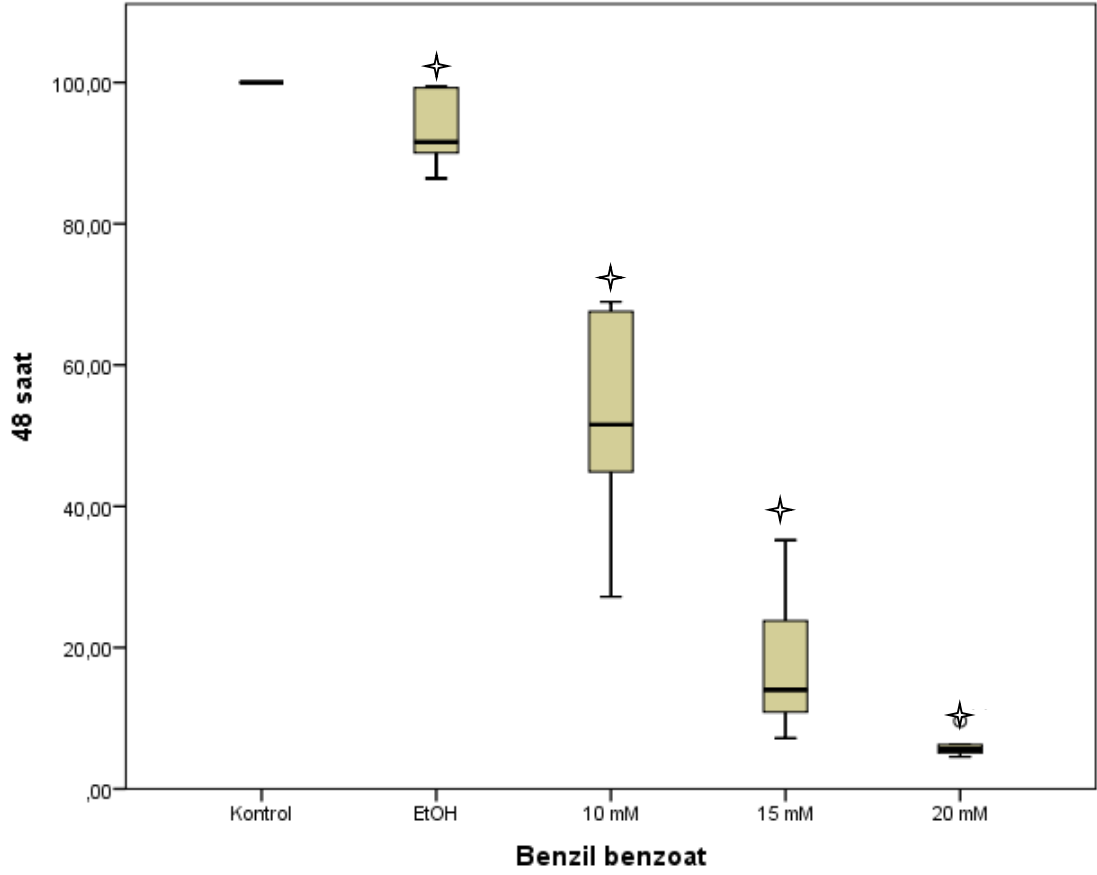


Şekil 4.14. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu nötral kırmızı alım testine göre yüzde canlılık sonuçları



Şekil 4.15. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen nötral kırmızı alım testi bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p \leq 0.05$). Kontrole göre farklı olanlar ✦ işareti ile gösterilmiştir.

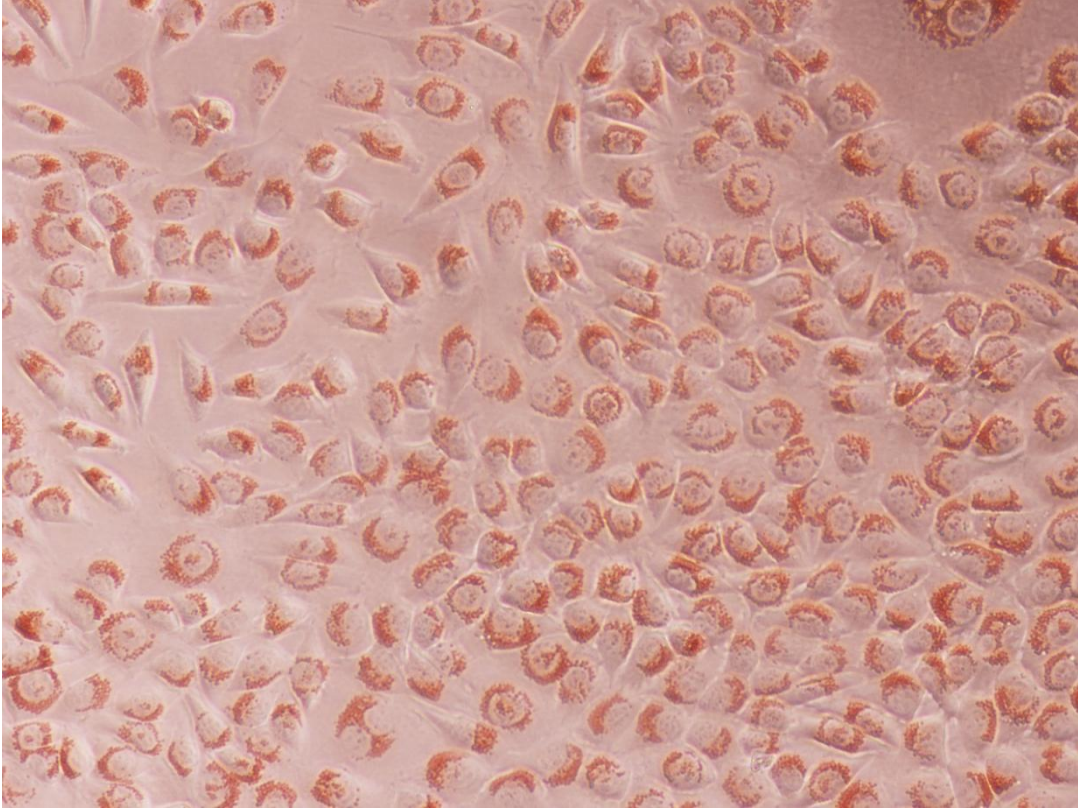
Şekil 4.15.'deki grafikte görülen 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonunda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkili karşılaştırmalar Conover Dunn testiyle yapılmış olup sadece kontrol ve etanol kontrol grubu ile 15 mM ve 20 mM benzil benzoat gruplarının kendi içlerindeki karşılaştırmaları istatistiksel açıdan incelendiğinde fark bulunmamıştır, fakat diğer bütün grupların ikili karşılaştırmaları sonucunda istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p \leq 0.05$).



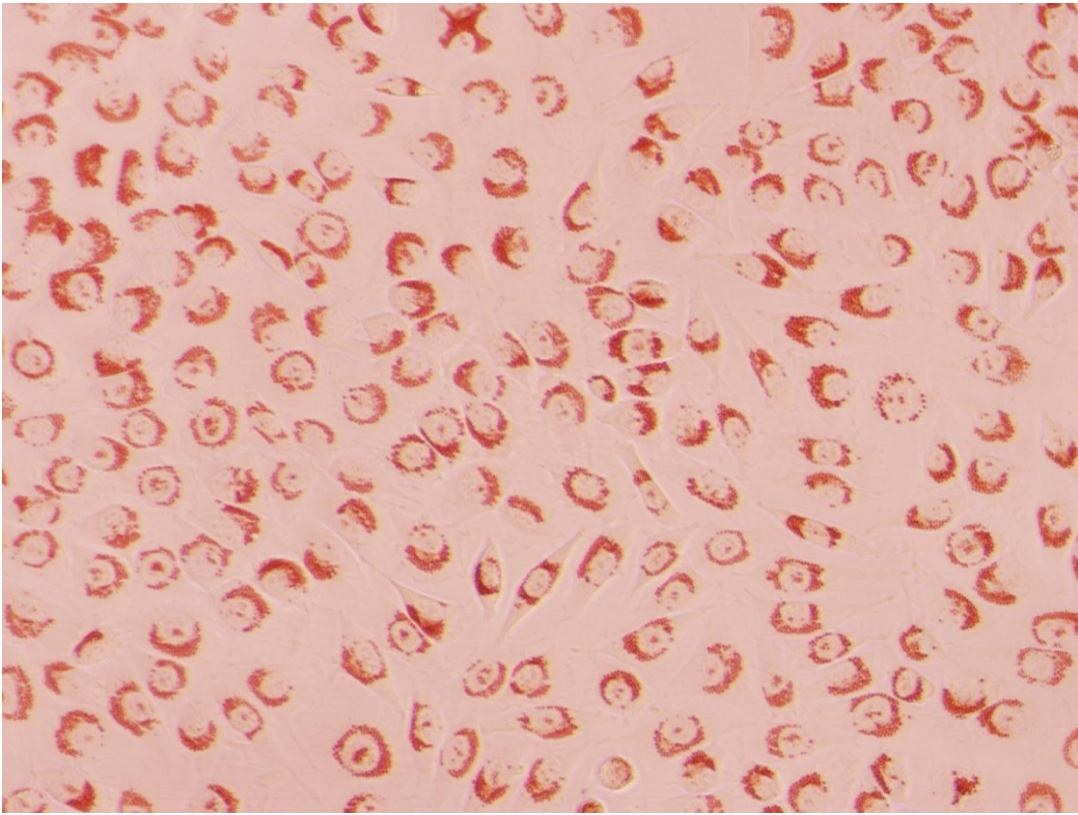
Şekil 4.16. L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucunda elde edilen nötral kırmızı alım testi bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p \leq 0.05$). Kontrolle göre farklı olanlar * işareti ile gösterilmiştir.

L929 hücrelerinde 48 saatlik benzil benzoat uygulamasından sonra elde edilen bulguların istatistiksel olarak incelenmesi Şekil 4.16.'da verilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen veriler anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuş olup dolayısıyla ikili karşılaştırmalar Conover Dunn testiyle yapılmıştır. Bulguların ikili karşılaştırmalarından 10 mM ve 15 mM; 15 mM ve 20 mM kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan farklı bulunmazken diğer tüm ikili gruplar istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

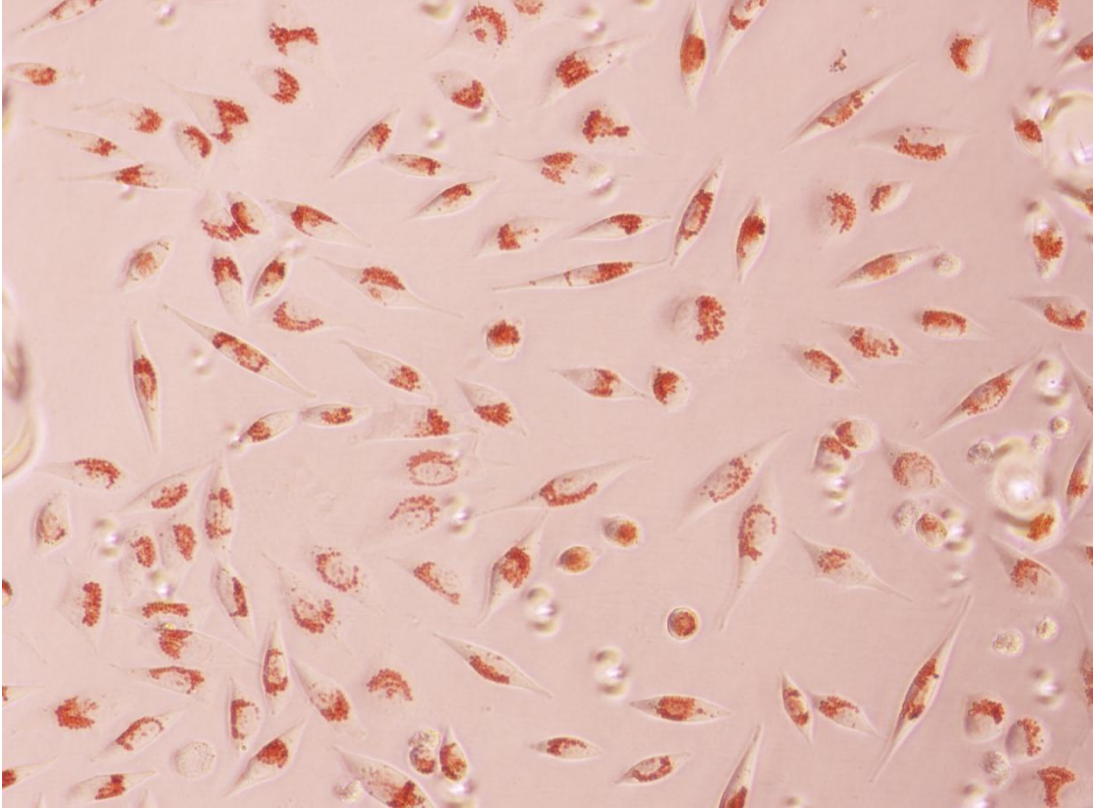
Benzil benzoat ile 24 saat ve 48 saat inkübasyondan sonra, kontrol ve uygulama gruplarındaki hücre canlılığı değişimi nötral kırmızı alım testi ile incelenip fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.17. - 4.26.). Canlı hücreler nötral kırmızı boyasını alırken; ölü hücreler almamaktadır. Şekillerde de görüldüğü gibi benzil benzoatın doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmektedir.



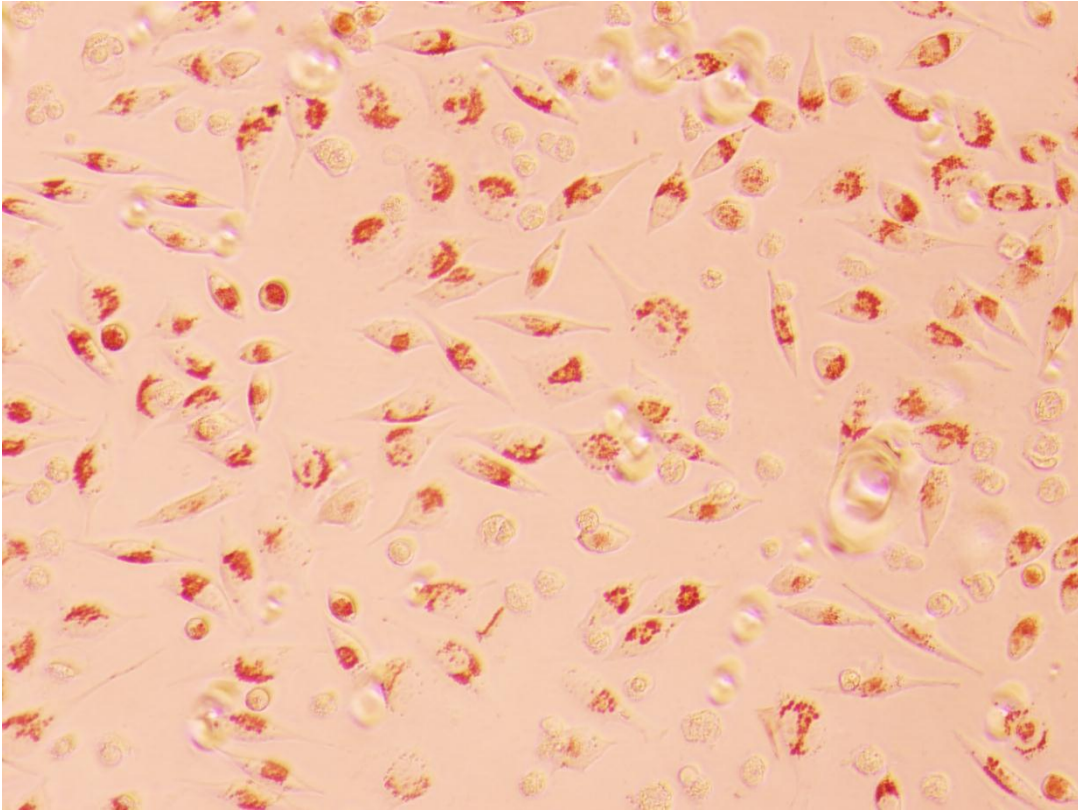
Şekil 4.17. Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



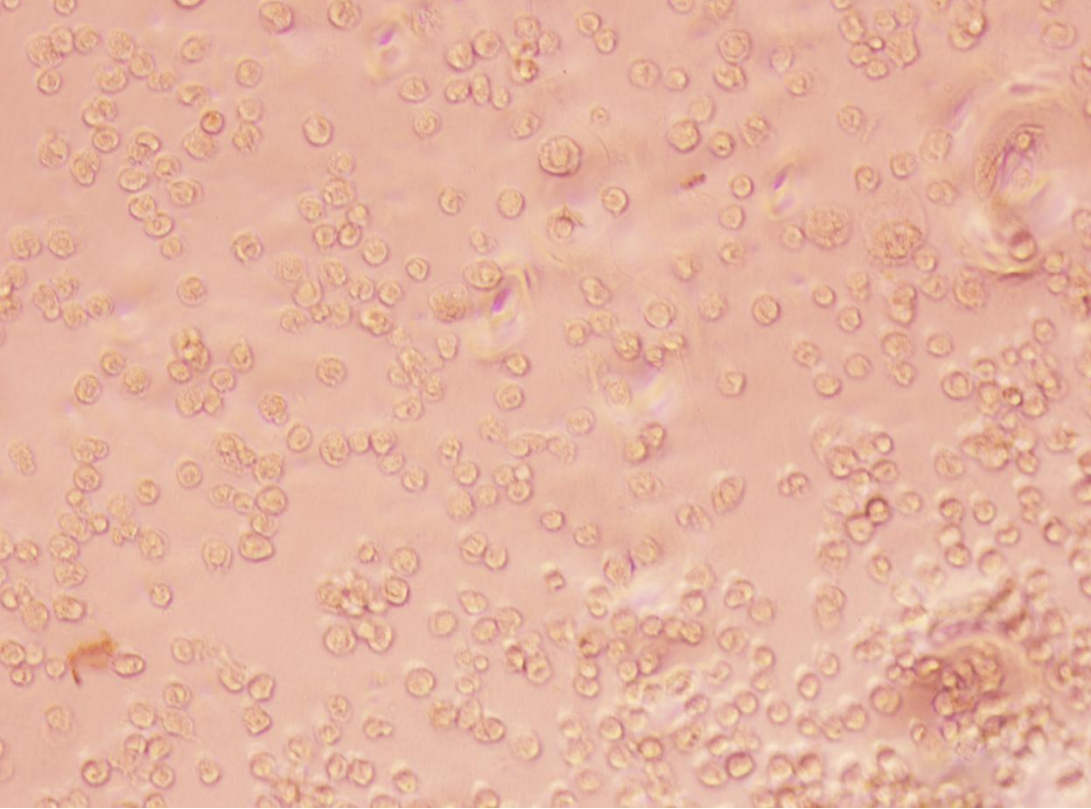
Şekil 4.18. Etanol Kontrol grubu 24 saatlik inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



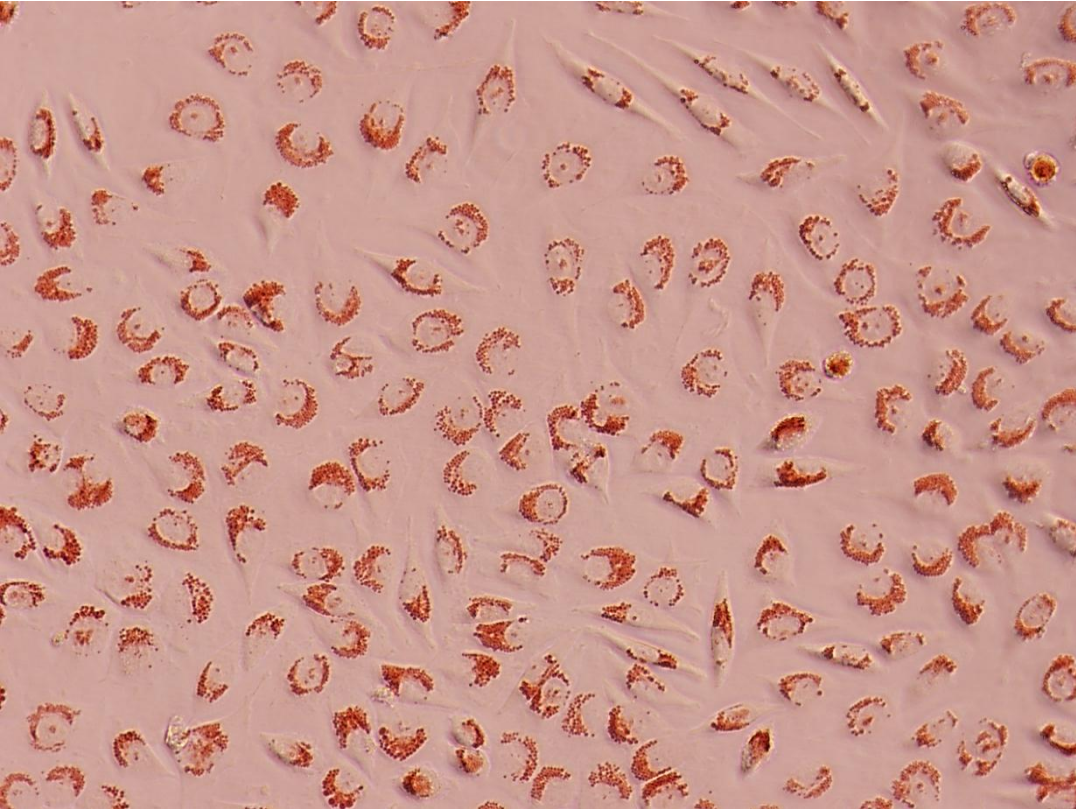
Şekil 4.19. 10 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



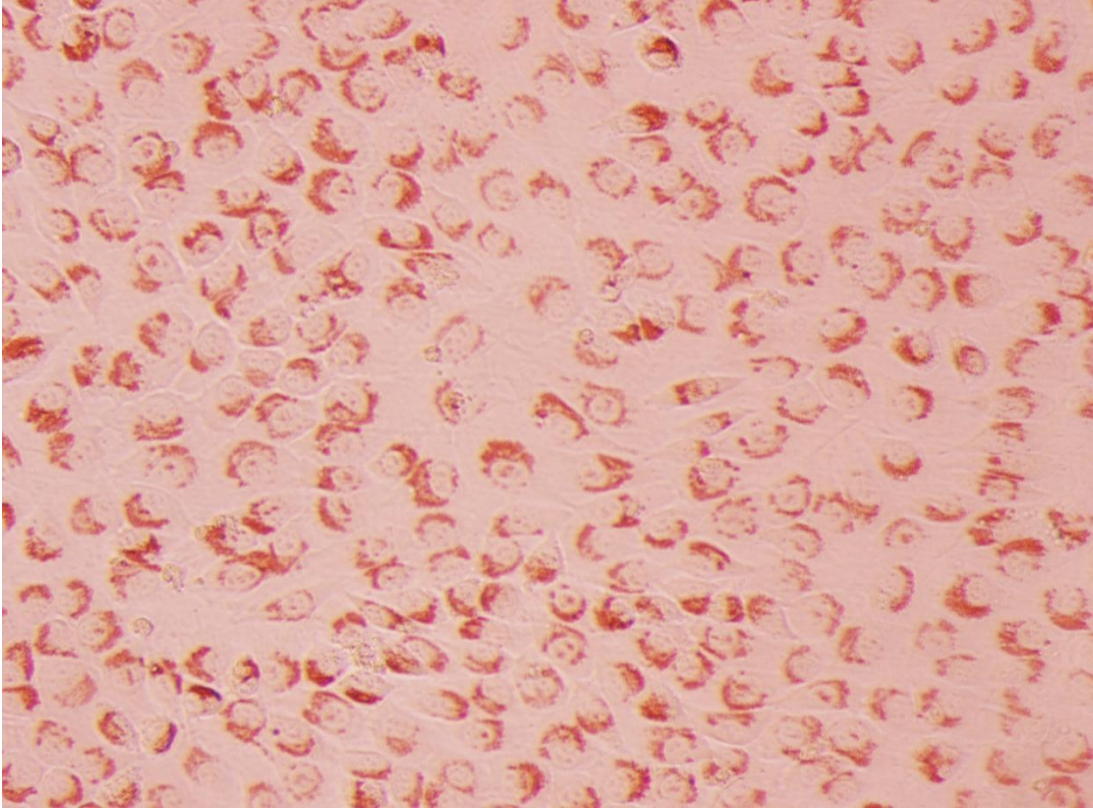
Şekil 4.20. 15 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



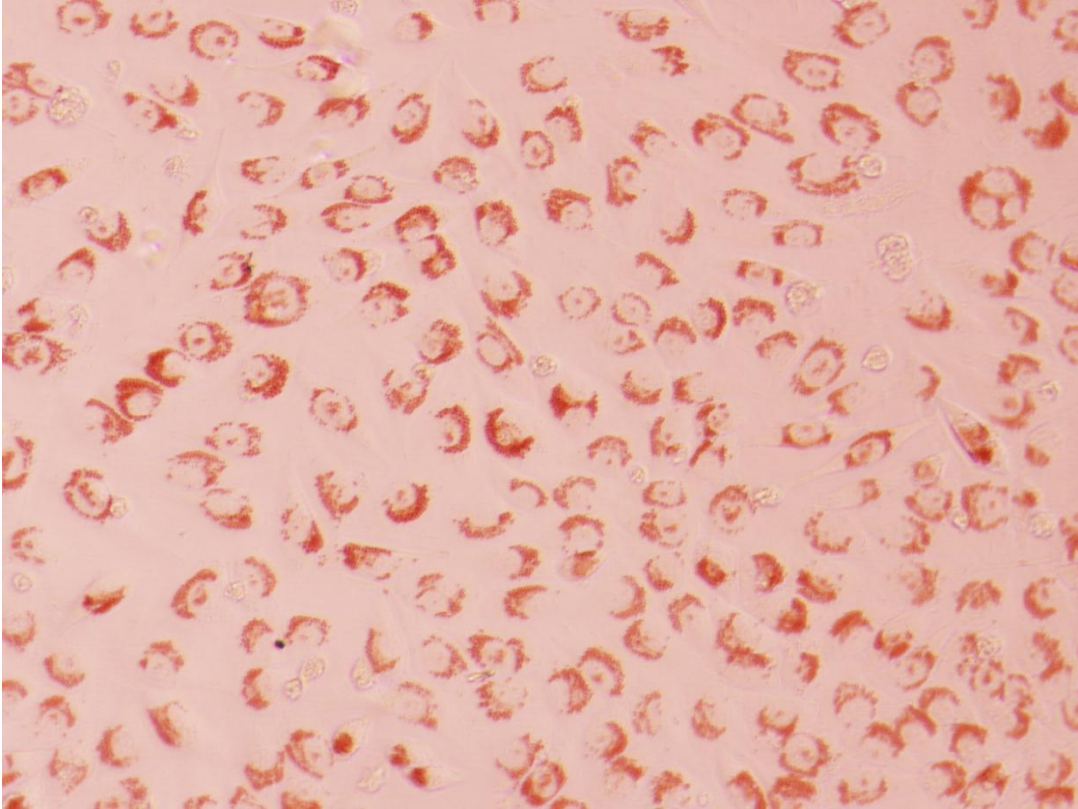
Şekil 4.21. 20 mM benzil benzoat uygulama grubu 24 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



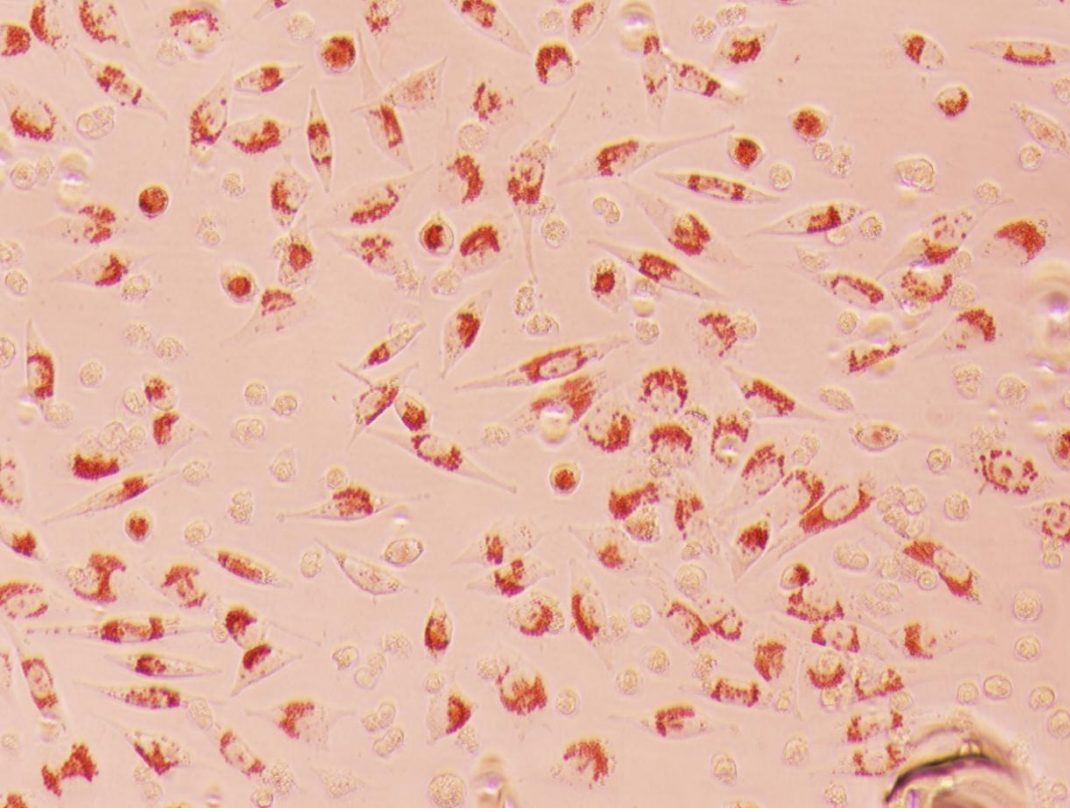
Şekil 4.22. Kontrol grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



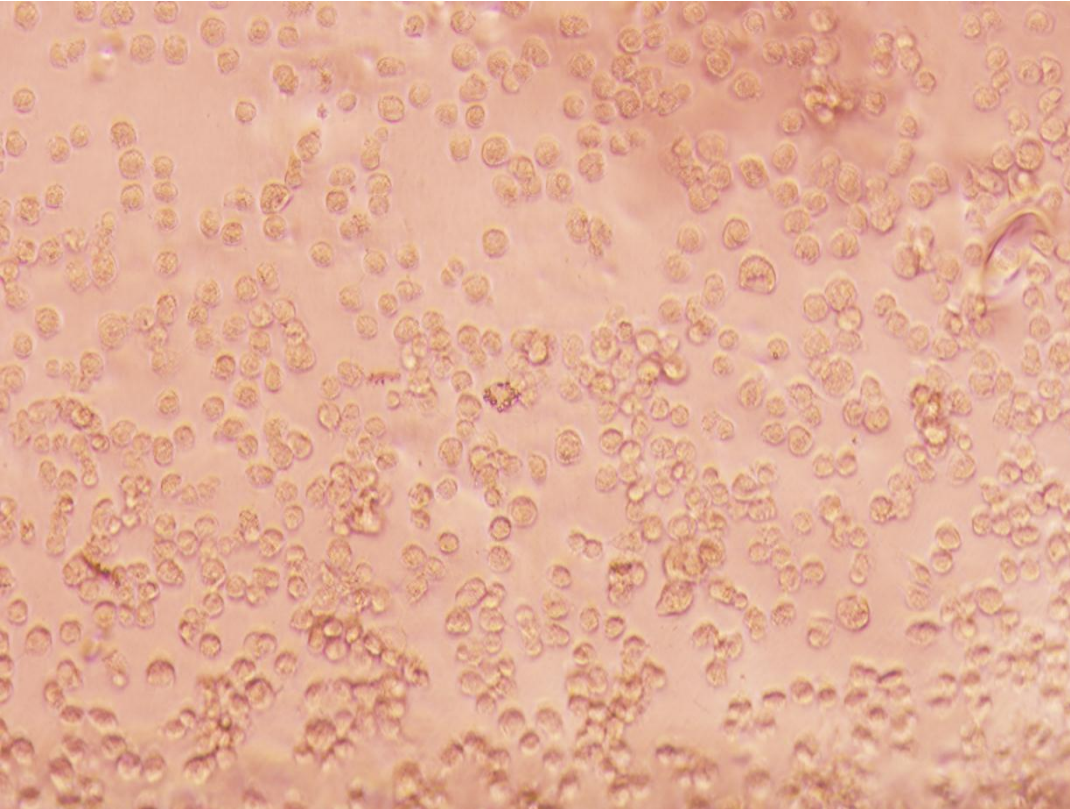
Şekil 4.23. Etanol Kontrol grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



Şekil 4.24. 10 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



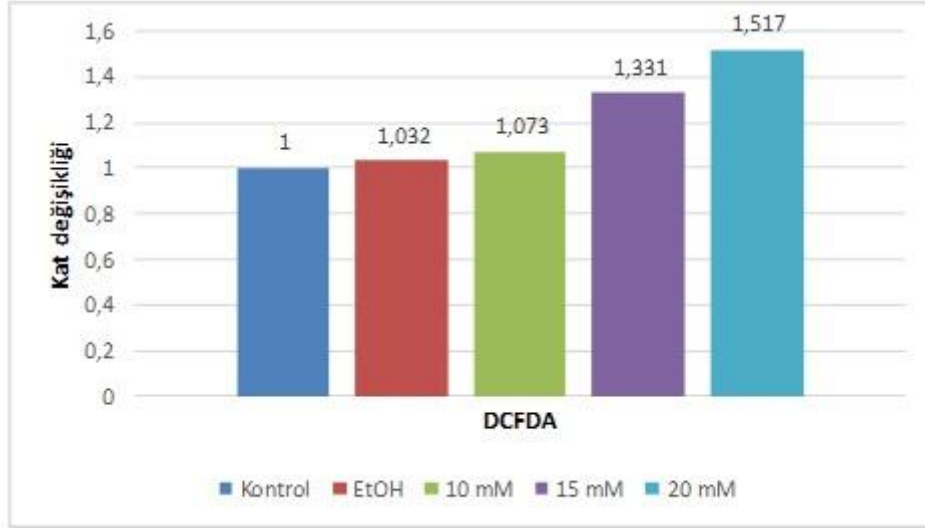
Şekil 4.25. 15 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)



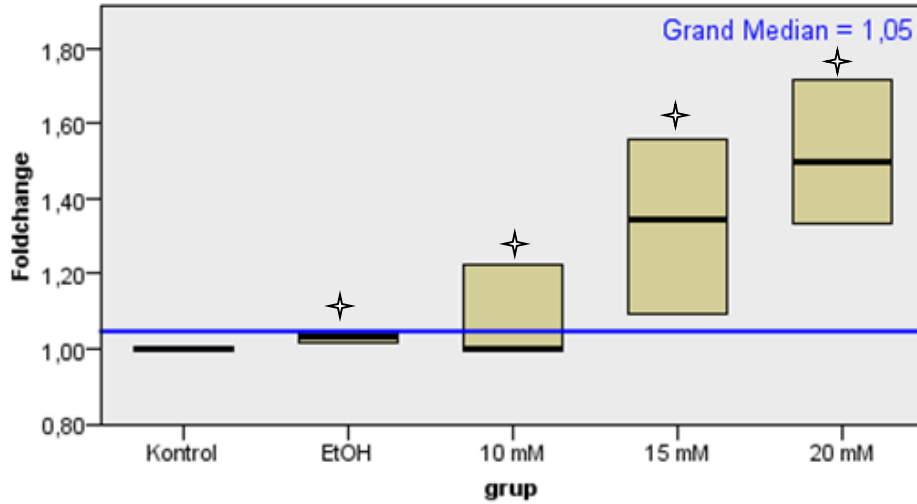
Şekil 4.26. 20 mM Benzil Benzoat uygulama grubu 48 saat inkübasyon sonucu nötral kırmızı alımı (X100)

4.5. DCFDA ile Hücresel Reaktif Oksijen Türlerinin Tespiti Sonuçları

Benzil benzoatın L929 hücrelerinde reaktif oksijen türleri üretimi üzerine etkisi DCFDA metoduyla tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucu gözlenen hücresel reaktif oksijen türlerinin üretimi



Şekil 4.28. L929 hücrelerinde 24 saatlik benzil benzoat uygulaması sonucunda reaktif oksijen türleri artışı bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ($p \leq 0.05$). Kontrole göre farklı olanlar * işareti ile gösterilmiştir.

Şekil 4.27.'de görüldüğü gibi DCFDA ile hücresel reaktif oksijen türlerin tespitinden elde edilen veriler değerlendirilirken kitle önerilen şekilde rölatif bir yaklaşım benimsenmiş olup kontrol grubunun floresan yoğunluk değeri 1 birim olarak kabul

edilmiştir. Diğer gruplardan elde edilen veriler ise kontrol grubuyla karşılaştırılıp kat değişikliği olarak hesaplanmıştır. DCFDA analizi sonuçlarına göre; 24 saatlik uygulama sonunda kontrole göre değerlendirildiğinde reaktif oksijen türlerinin 15 ve 20 mM gruplarında sırasıyla 1,331 ve 1,517 birim kat artmış olduğu görülmüştür.

Şekil 4.28.'de DCFDA analizi değerlendirildiğinde ise kat değişikliği açısından istatistiksel farklılık bulunmuştur ($p \leq 0.05$). İkili grupların değerlendirmesi Conover Dunn testiyle yapılmıştır. Bütün ikili gruplar birbirinden istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur, fakat sadece 15 ve 20 mM grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

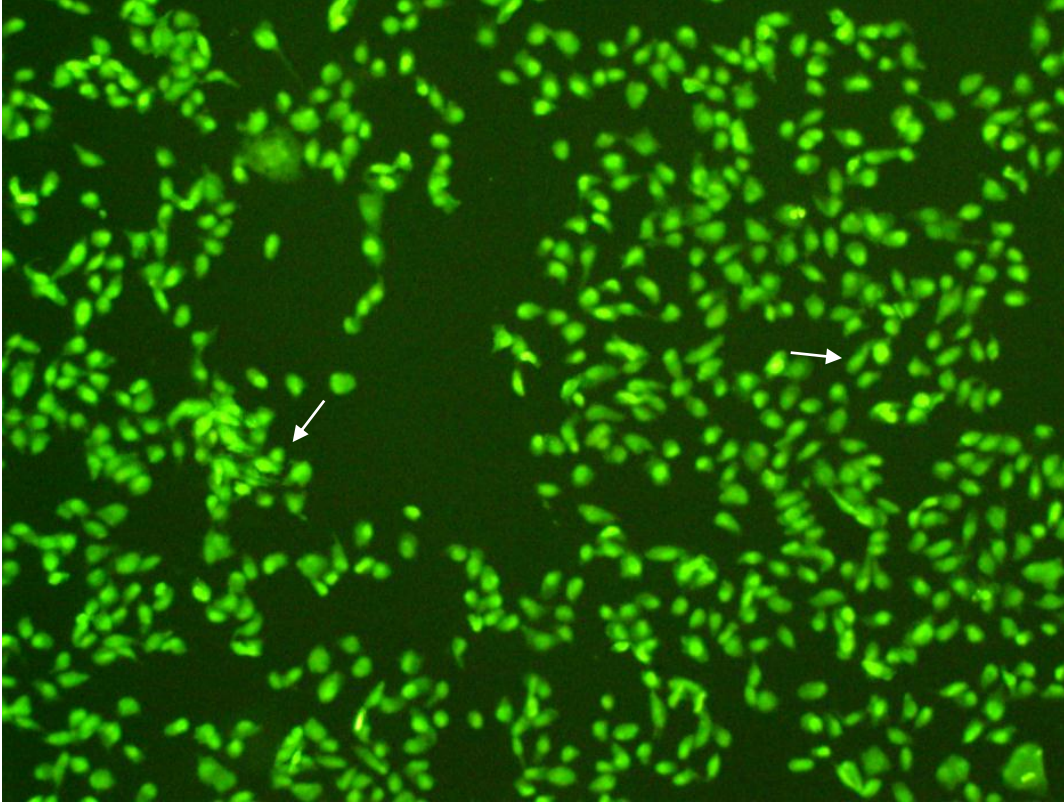
4.6. Akridin Oranj-Propidyum İyodit ile Hücre Ölüm Yolunun Belirlenmesi

Benzil benzoatın belirtilen dozlarda L929 fibroblast hücre hattına uygulanması sonunda hücrelerin ölüm tipini belirlemek amacıyla akridin oranj-propidyum iyodit (AOPI) boyası yardımıyla morfolojik inceleme yapılmıştır.

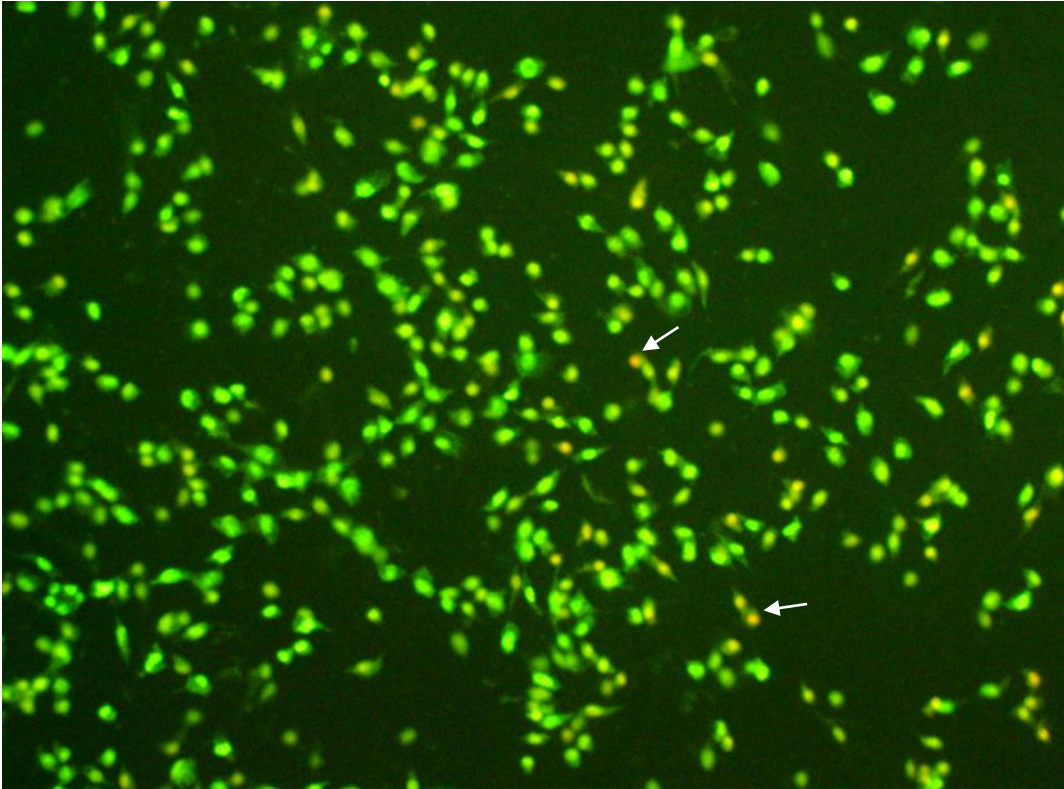
Şekil 4.29 ile Şekil 4.32 arasındaki fotoğraflarda görüldüğü üzere 24 saatlik inkübasyonda benzil benzoat konsantrasyonu doza bağlı olarak arttıkça nekrotik hücre ölüm tipinde bir artış saptanmıştır.

Şekil 4.33 ile Şekil 4.36 arasındaki fotoğraflarda görüldüğü üzere 48 saatlik benzil benzoat uygulanmasında 10 mM doz grubunda daha çok apoptotik hücreler görülürken, 20 mM grubunda ise nekrotik hücre ölümünde bir artış olduğu saptanmıştır.

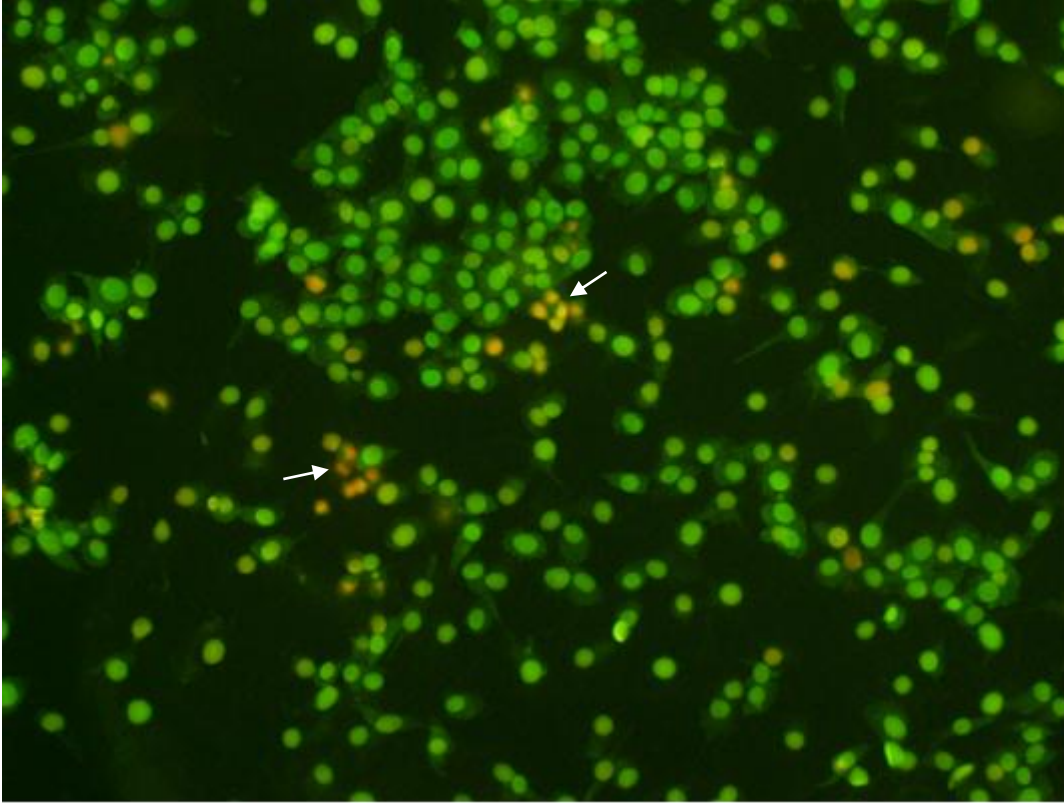
AOPI boyaması ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında ise hem inkübasyon süresi hem de uygulanan dozlara bağlı olarak nekrotik hücre ölümünde bir artış olduğu anlaşılmıştır.



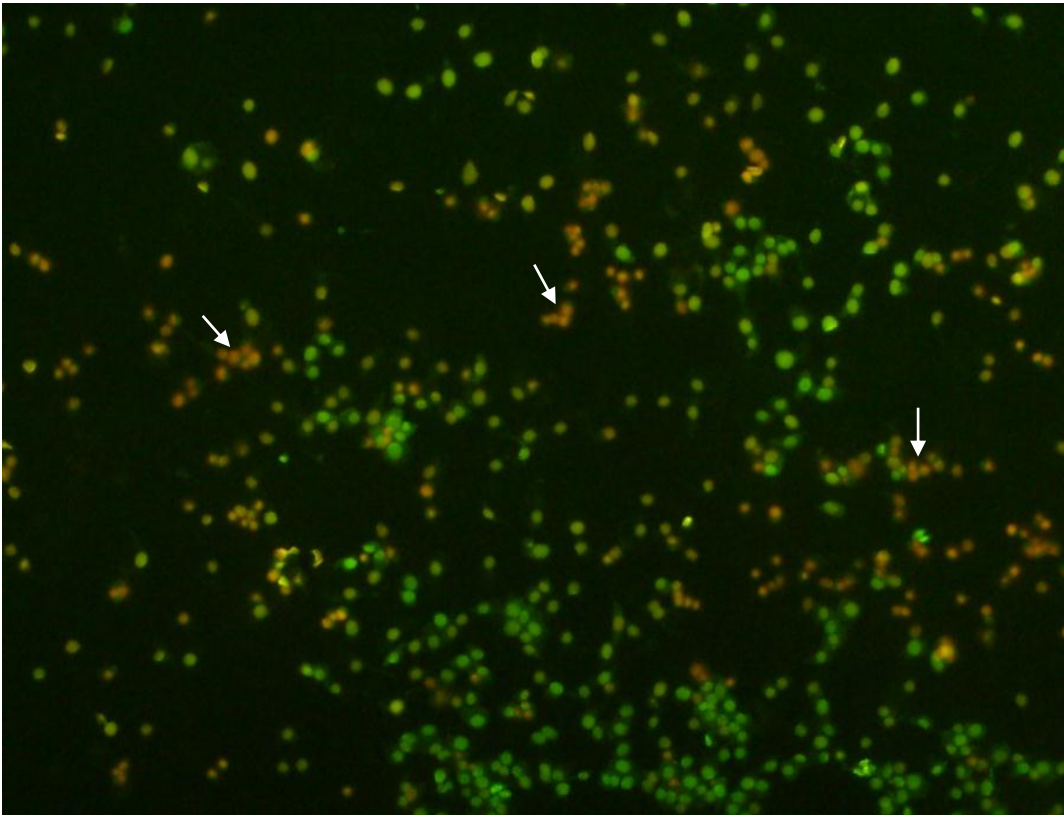
Şekil 4.29. Kontrol Grubu 24 saat inkübasyon AOPI boyaması. Canlı hücreler görülmektedir (ok) (X40).



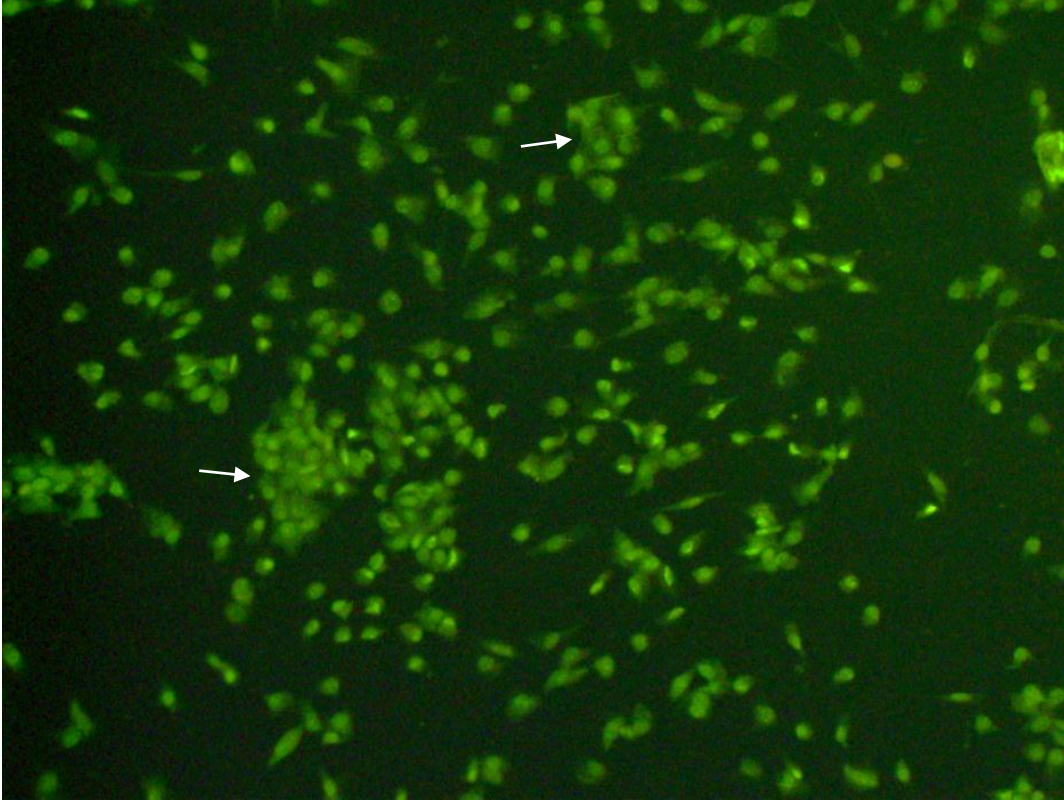
Şekil 4.30. 10 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOPI boyaması. Nekrotik hücreler görülmektedir (ok) (X40).



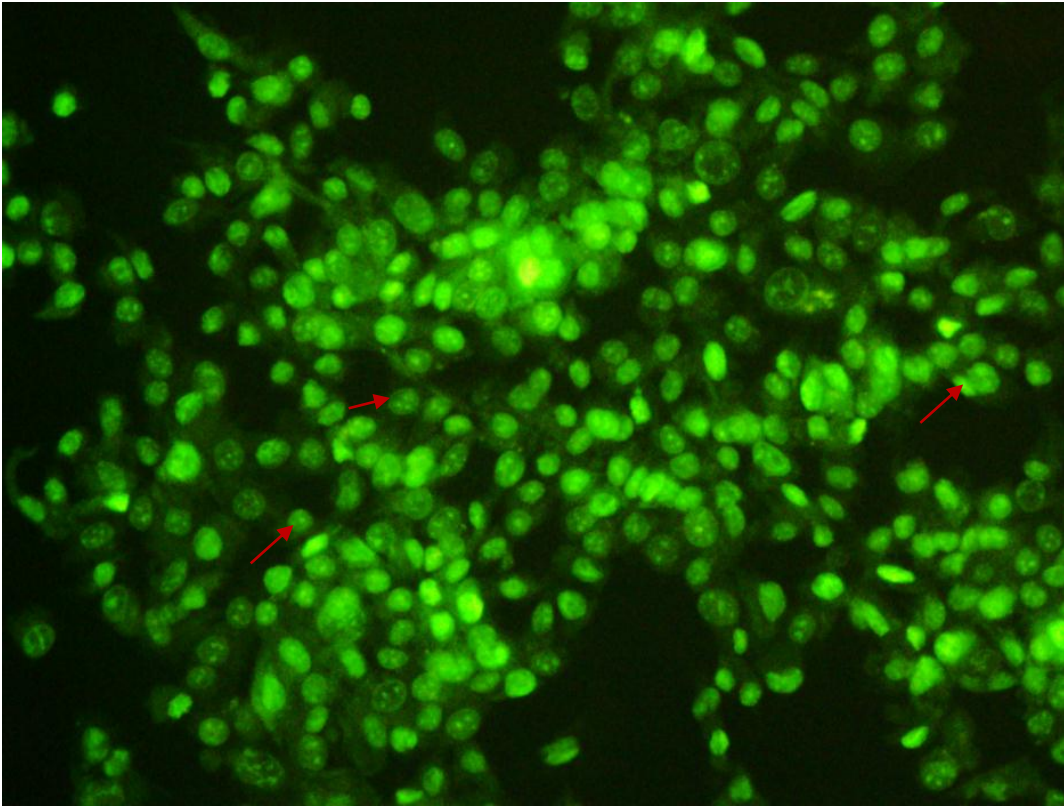
Şekil 4.31. 15 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOP1 boyaması. Nekrotik hücreler görülmektedir (ok) (X40).



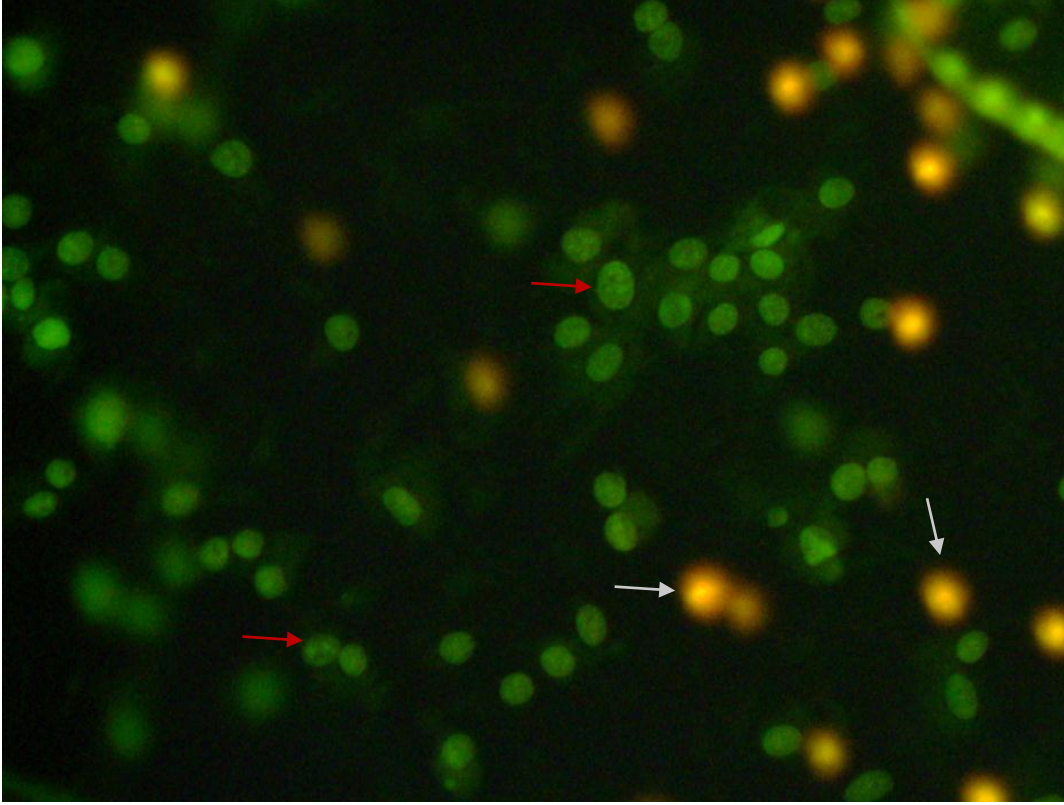
Şekil 4.32. 20 mM benzil benzoatın 24 saat inkübasyon AOP1 boyaması. Nekrotik hücreler görülmektedir (ok) (X40).



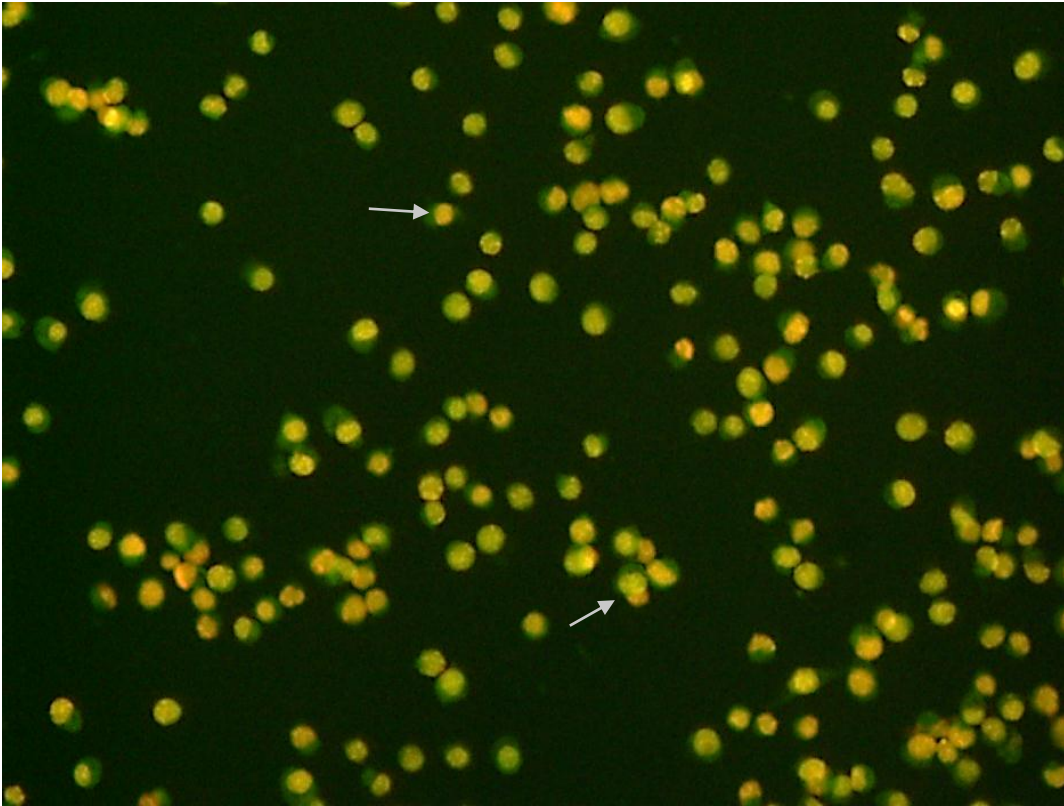
Şekil 4.33. Kontrol grubu 48 saat inkübasyon AOPI boyaması. Canlı hücreler görülmektedir (ok) (X40).



Şekil 4.34. 10 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması. Apoptotik hücreler görülmektedir (ok) (X100).



Şekil 4.35. 15 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması. Apoptotik (kırmızı ok) ve nekrotik (beyaz ok) hücreler görülmektedir (X100).



Şekil 4.36. 20 mM benzil benzoatın 48 saat inkübasyon AOPI boyaması. Nekrotik hücreler görülmektedir (ok) (X100).

5. TARTIŞMA

Benzil benzoat (benzoik asit benzil ester, benzoik asit fenil metil ester) kozmetik, ilaç gibi birçok farklı endüstride kullanım alanına sahiptir. Benzil benzoat akarisit/skabisit olarak kullanımı nedeniyle başlıca maruziyet yolu deri yolu ile olmakla beraber, besinler yoluyla veya solunum yoluyla da vücuda alınabilmektedir. Özellikle de gıdalara eklenen bir katkı maddesi olarak kullanımı da söz konusudur. Gıda katkı maddeleri günümüzde oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, gıda katkı maddelerinin mikrobiyal etkenlerden koruma, kullanım süresini uzatma, besin değerini zenginleştirme gibi oldukça büyük katkıları mevcuttur. Ancak bazı gıda katkı maddelerinin tüketici üzerinde olumsuz etkileri söz konusudur. Yoğun olarak kullanılan bazı gıda katkı maddelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* toksik etkiler gösterebileceği rapor edilmiştir.

Örneğin, gıda renklendirici ajanlardan amaranth, eritrosin ve tartrazin *in vitro* insan periferik kan hücreleri üzerinde genotoksik, sitotoksik, sitostatik etkileri araştırılmıştır. Kardeş kromatit değişim sıklığı analizi, proliferasyon oranı indeksi ve mitotik indeks analizleri, agaroz jel elektroforezi ile DNA hareketlilik kayma analizleri, PCR ve DNA bağlanma çalışmaları sonucunda elde edilen veriler bu gıda renklendiricilerinin insan periferik kan hücreleri üzerinde toksik olduğu ve doğrudan DNA'ya bağlandığını göstermektedir [80]. Gıda ürünlerinde, ilaçlarda ve kozmetiklerde çok kullanılan organik azo boyalarından olan tartrazin ve karmoisin ise erkek sıçanlar üzerinde biri yüksek biri düşük olarak iki farklı dozda 30 gün süresince uygulanmıştır. Bu gıda katkı maddeleri sadece yüksek dozlarda değil düşük dozlarda da karaciğer ve böbrek gibi yaşamsal organlarda biyokimyasal belirteçleri değiştirebilmektedir. Ayrıca hepatik ve renal parametreler üzerindeki etkiler yüksek dozlarda daha riskli olmaktadır, çünkü serbest radikallerin oluşumu ile oksidatif stresi indükleyebilmektedirler [81].

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, önemli gıda katkı maddelerinden biri olan benzil benzoatın L929 fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksitesinin farklı yöntemlerle araştırılması ve LC₅₀ dozunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Deney planı benzil benzoatın serum bileşenlerine bağlanmasından ötürü fetal sıgır serum kullanılmadan oluşturulmuştur. Besiyeri içeriği, fetal sıgır serumu miktarı, çözücü seçimi ve sitotoksite ilişkisi, deneysel olarak *in vitro* toksisite test yöntemlerinin

validasyonu açısından araştışıcıların da ilgisini çeken bir konudur. Literatürde yukarıda belirtilen unsurlarla ilgili bazı bulgular mevcuttur.

Hücre kültürü besiyerinde test ajanlarının süspansiyonları hazırlanırken çeşitli çözücüler kullanılmaktadır. Forman ve ark. [82]; etanol, aseton, izooktan, metanol, hekzan ve DMSO gibi organik çözücülerini HeLa hücre hattı üzerinde farklı dozlarda denemişler ve protein miktarı, ATP/ADP luminesans analizleri canlılık analizleri açısından incelemişlerdir. Diğer çözücülere göre DMSO'nun düşük konsantrasyonlarında HeLa hücrelerinin büyümesi üzerine süpresif bir etkisi olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda ise hücrelerde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Geniş spektrumlu bir antibiyotik olan lipofilik (hidrofobik) triklosanin göğüs kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde bir takım çözücüler [DMSO, absolü etanol, 1 N NaOH, %55 polietilen glikol + %45 etanol karışımı (PEM), aseton] kullanılarak anti-proliferatif etkisi değerlendirilmiştir. Triklosanin DMSO, etanol ve NaOH'ta besiyeri ile dilüsyonunda bulanıklık gözlenmiş, yapılan analizler sonucu en yüksek yoğunluk %95,23 ile asetonda görülmüştür [83]. Benzil benzoat ile yapılan bu çalışmada hem literatürde yer alan sitotoksik bulgular nedeniyle hem de çözünen çözücü ilişkisi açısından etanolün çözücü olarak kullanımı ile daha sağlıklı veriler elde edileceğine karar verilmiş olup, bu nedenle çözücü olarak etanol tercih edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, C6 Glioma hücrelerinin canlılığı üzerine seruma bağılı olarak tamoksifen ve kannabinoidlerin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada farklı inkübasyon sürelerinde ve farklı fetal sığır serumu konsantrasyonları ile kültüre edilen C6 glioma hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; hücrelerin tamoksifen duyarlılığı artmıştır, çünkü kültür besiyerinin FBS içeriği %10'dan %0,4'e ve %0'a düşmüştür [84]. Sıçan timosit hücrelerinde bir çevresel kirletici olan tri-*n*-butiltin (TBT) tarafından indüklenen sitotoksosite üzerinde fetal sığır serumu etkisi incelenmiştir. Besiyeri içeriğindeki FBS konsantrasyonu %0'dan %10'a arttığında TBT sitotoksitesinin doza bağılı olarak azaldığı, fetal sığır serumu varlığında sıçan timosit hücrelerinde görülen TBT'nin indüklediği sitotoksosite inhibisyonunun TBT'nin serum proteinlerine bağlanmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür [85]. Başka bir çalışmada ise bazı flavonoidler (kuersetin, rutin, luteolin ve apigenin) ile besiyeri tipi ve serum etkisi incelenmiş olup, hem serumsuz besiyeri hem de %5 konsantrasyon oranında serum içeren besiyeri ile yapılan çalışmada serum oranının doza bağılı olarak MTT formazan kristal oluşumunu etkilediği bildirilmiştir [86]. Fetal sığır ya da insan orijinli serum albüminin farklı hazırlanışlarının, tetrazolyum

tuzlarıyla yapılan (MTT, XTT) testlerin sinyalinde konsantrasyona bağılı bir yükselişe neden olduğu ve hücre sayısında daha yüksek bir değerlendirmeye ya da test bileşiğinin olası sitotoksik etkilerinde eksik değerlendirmelere yani serum albuminin yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği rapor edilmiştir [87]. Başka bir çalışma ise insan eritroid lösemi K-562 hücre hattı kullanılarak bir antimetabolit olan metotreksatin (methotrexate, MTX) serum faktörlerine bağılı sitotoksik etkilerini incelemiştir. Fötal sığır ve insan serumunun albümin dimeri/MTX kompleksi oluşumu nedeniyle *in vitro* sitotoksik etkilerini azalttığı, MTX'in antitümör etkinliğini baskıladığı gözlenmiştir [88]. *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (Conbr), *Cratylia floribunda* (CFL) lektinlerinin MCF-7 hücre hattında fötal sığır serumunun değişen konsantrasyonlarında (%1, 5, 10 ve 20) sitotoksik etkileri incelenmiştir. Hücreler yüksek serum konsantrasyonuna (% 10 ve 20) sahip besiyerinde büyütüldüklerinde bütün lektin grupları daha az toksik etki göstermişlerdir. Fakat diğer serum konsantrasyonları ile karşılaştırıldıklarında en yüksek sitotoksik etkinin %1 oranında serum kullanıldığında ortaya çıktığı görülmüştür [89]. Anandamid (AEA)'in C6 sıçan glioma hücre hattında serum ve albümin varlığında MTT testiyle sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada deney protokolü (i) AEA uygulama dozu besiyeri ve MTT besiyeri FBS içermeyen, (ii) AEA uygulama dozu besiyeri FBS içermeyen fakat MTT besiyeri FBS içeren, (iii) AEA uygulama dozu besiyeri FBS içeren fakat MTT besiyeri FBS içermeyen, (iv) hem AEA uygulama dozu besiyeri hem de MTT besiyeri FBS içeren ve (v) AEA uygulama besiyerinde albümin içeren olmak üzere beş farklı şekilde dizayn edilmiştir. Yapılan testler, besiyerinde serum yok iken AEA'nın doza bağılı olarak sitotoksosite gösterirken, diğer protokollerde ise sitotoksosite göstermediği, sığır serum albuminin FBS'nin etkisini taklit ettiğini ve bu durumun AEA'nın albümin gibi serum proteinlerine bağlanmasından kaynaklanabileceğini göstermiştir [90]. Serumun canlılık ve sitotoksosite testleriyle olası etkileşimi LDH testi için de geçerli olabileceği, LDH testinin serum bileşenlerinden kaynaklanan arka plan sinyaline duyarlılığı olabileceği belirtilmiştir [58].

Çalışmamızın nasıl bir protokolle izleneceğinin belirlenmesinde yukarıda yer alan literatür bilgileri dikkate alınmıştır. Bu bilgilere göre; L929 hücreleri fötal sığır serumu içeren besiyerinde büyütülmüşler ve daha sonra serum proteinlerine bağlanma sonucu herhangi bir etkileşimin olmaması için benzil benzoat ile hazırlanan uygulama dozlarında serum içermeyen besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca, yapılan

testlerde serum içermeyen besiyeri kullanılması nedeniyle yüksek hücre yoğunluğu ile başlanmıştır.

Sitotoksisite testleri *in vitro* toksikoloji çalışmaları için yaygın biçimde kullanılmaktadır. LDH testi, protein testi, nötral kırmızı ve MTT testleri sitotoksisitenin tespiti için veya toksik maddelerin maruziyetini takip eden hücre canlılığını belirleme çalışmaları için en çok kullanılan testlerdir [91].

Mitokondri, ATP formunda hücrenin enerjisinin %95'ini üretmektedir. Mitokondride bir bozulma oluştuğunda; hücreler ölür, doku hasarına ve hatta organ yetmezliğine neden olur. Birçok hastalığın mitokondriyal proteinlerin kalıtsal ya da kazanılmış mutasyonu ile sonuçlanan mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklandığı bilinmektedir [92]. Suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzu olan MTT mitokondri içinde süksinat dehidrogenaz tarafından formazan bir ürüne dönüştürülür. Bu formazan ürün hücre membranından geçemez ve sağlıklı hücrelerde birikir. Daha güncel veriler MTT'nin indirgenmesinin hücrelerin içerisinde ve mitokondrinin dışında NADH ve NADPH tarafından aracılık edildiğini önermektedir [91]. Çalışmadaki MTT testi sonuçlarına göre, L929 hücrelerinde benzil benzoatın artan dozlarına ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığı oranında azalma görülmüştür. Özellikle 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı daha çok azalmıştır. 24 ve 48 saat inkübasyon süre sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise zamana bağlı olarak özellikle 48. saat 20 mM doz grubunda hücre canlılığı değerlerinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. İstatiksel açıdan incelendiğinde ise; 24 saat inkübasyon grubu için 15 ve 20 mM, 48 saat inkübasyon grubu için ise 20 mM benzil benzoat uygulama grubunda farklılık ($p \leq 0.05$) bulunmuş, bu değerlendirme elde edilen veriler ile de tutarlılık göstermektedir. Fakat 15 mM benzil benzoat doz grubu için 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında hücre canlılığı açısından bir tutarsızlık olduğu da görülmektedir. MTT sonucu elde edilen veriler ile LC_{50} değeri belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla 24 ve 48 saat için; 21,082 mM ve 18,293 mM olarak bulunmuştur. Hesaplanan LC_{50} değeri dikkate alınarak; daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere üç benzil benzoat dozu belirlenmiştir. Bunlar 10, 15 ve 20 mM olarak uygulanmıştır.

Hücre canlılığının klasik tanımı, koloni formasyonunu ve membran bütünlüğünün indikatörü olarak tripan mavisi dışlama testini de kapsamaktadır [93]. Çalışmamızdan elde edilen tripan mavisi boyası ile hücre canlılığı sonuçlarına bakıldığında ise; kontrole göre hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon grubunda

10 mM benzil benzoat uygulama grubunda herhangi bir önemli canlılık azalışı görülmemiştir. Ancak kontrol grubundakinden farklı olarak 15 ve 20 mM doz gruplarında doza ve süreye bağlı olmak üzere önemli bir düşüş gözlenmiştir. İstatiksel değerlendirmede ise; benzil benzoat uygulanan grupları doz ve süre açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında 24 saat için sadece kontrol-etanol ve 48 saat için kontrol-etanol, 10 mM-15 mM, 15-20 mM ikili grupları arasında farklılık bulunmamıştır. Diğer bütün ikili gruplar istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir. Benzil benzoat uygulaması sonucu elde edilen MTT ve tripan mavisi hücre canlılığı testi sonuçları karşılaştırıldığında ise; tripan mavisi testi sonuçlarının MTT testinden daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Laktat dehidrogenaz salınımı sitotoksik çalışmalar için bir gösterge olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Laktat dehidrogenaz salınımı, nekrotik/onkotik hücre ölümü için yaygın olarak kullanılan önemli bir belirteçdir. Birçok hücre LDH içermektedir ve hücreler ölümcül olarak hasar gördüklerinde inkübasyon besiyerinde LDH aktivitesi izlenerek membran bütünlüğünün kaybı değerlendirilebilmektedir [94]. L929 fibroblast hücre hattı üzerinde benzil benzoat sitotoksitesi laktat dehidrogenaz testiyle de değerlendirilmiştir. LDH sitotoksite testi sonuçları kontrole göre; 10 mM benzil benzoat uygulama grubunda herhangi bir önemli sitotoksite belirtisi göstermemiştir. Fakat özellikle 15 ve 20 mM dozlarında hem inkübasyon süresi hem de doza bağlı olarak sitotoksitede artış gözlenmiştir. Özellikle 20 mM doz grubundaki sitotoksite artışı dikkat çekicidir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiklerinde bütün ikili gruplar kendi aralarında farklı bulunurken, 24 ve 48 saat grubu arasında farklılık anlamlı bulunmamıştır. LDH sitotoksite verileri, tripan mavisi hücre canlılığı analizi verileri ile benzerlikler göstermekteyken MTT testi sonuçları ile karşılaştırıldıklarında ise LDH sitotoksite sonuçlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum LDH sitotoksite testi hassasiyetinin daha yüksek olmasına bağlanabilmekle beraber bütün yapılan bu testlerin sitotoksiteyi farklı açılardan değerlendirdiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sıklıkla kullanılan testlerden biri olan nötral kırmızı alım testi, hücre canlılığının lizozomal açıdan kantitatif değerlendirilmesini sağlamaktadır. Hasar görmemiş canlı hücrelerin lizozomlarında nötral kırmızı boyası birikimi gözlenirken; hasar gören cansız hücrelerde nötral kırmızı alımı gözlenmemekte dolayısıyla birikim olmamaktadır. Nötral kırmızı alım testi sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde doza bağlı olarak hücre canlılığında ciddi bir düşüşün olduğu, fakat bu durum

inkübasyon süresi açısından değerlendirildiğinde ise çok önemli bir farklılık göstermediği bulunmuştur. Bu durum benzil benzoatın nötral kırmızı alım testi sonuçlarına göre doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu, fakat inkübasyon süresine bağlı olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. İstatiksel açıdan değerlendirildiğinde ise 24 saat inkübasyon süresinde kontrol-etanol, 15 mM-20 mM ikili grupları arasında; 48 saat inkübasyon süresinde 10 mM-15 mM, 15 mM-20 mM ikili grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmazken, diğer bütün ikili gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$).

Bu tez kapsamında yapılan bütün sitotoksisite testleri arasında hücre canlılığının en düşük olduğu bulgular nötral kırmızı alım testi sonuçlarına aittir. Bu hücre canlılığı değişimi net olarak nötral kırmızı alım testi ile belirlenmiştir ve bu değişim Şekil 3.17-3.26. arasında gösterilmektedir. 2006 yılında Fotakis ve Timbrell [91]'in HTC (sığan hepatoma hücre hattı) ve HepG2 (insan hepatoma hücre hattı) hücrelerinde kadmiyum klorit ($CdCl_2$) ile yaptığı sitotoksisite karşılaştırılmasında LDH, MTT, nötral kırmızı ve protein testi uygulanmıştır. HTC hücrelerinde yapılan bu dört sitotoksisite testi sonucu 3 saatlik inkübasyonda erken bir sitotoksisite bulgusu sadece nötral kırmızı testinde ortaya çıkarılmıştır, HepG2 hücrelerinde ise sitotoksisite bulgusu MTT testinde görülürken diğer testlerde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Sunulan bu tez çalışmasında elde edilen bulgular benzil benzoatın L929 hücrelerinin canlılığını öncelikle yoğun bir biçimde lizozomal yolla etkilediği şeklinde yorumlanmıştır.

Sitotoksisite kimyasalların hücreler ve dokular üzerinde etki mekanizmalarını anlamada önemli bir yöntemdir. Sitotoksisitenin karsinogenez ve inflamasyon gibi sayısız patolojik süreçte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sitotoksisite serbest radikaller, irite edici maddeler ve genotoksinleri de kapsayan diğer ajanların etkinliğini düzenleyebilmektedir. Sitotoksisite için bir bileşiği test ederken birçok biyolojik son nokta incelenebilmektedir. Bunlar tüm hücrelerin genel mekanizması olabilir veya özel bir hücre tipinin spesifik mekanizması da olabilmektedir [95].

Çeşitli hücresel olaylar temel alınarak Kim ve ark. [96], (i) tripan mavisi testinin membran hasarı var ya da yok iken hücre sayısını tetkik etmek için uygun olduğunu, fakat membran bütünlüğü kaybı olmaksızın hücrelerde inip çıkan seviyelerde sitotoksisite tespiti için uygun olmadığını; (ii) LDH aktivite testinin membran hasarı ile sitotoksisitenin tespitinde uygun olduğu ancak membran hasarı olmaksızın hücre döngüsü değişimleri nedeniyle azalmış veya artmış hücre sayılarını tanımlamada

uygun olmadığını; (iii) MTT testinin değişmeyen hücresel azalış aralığında, hücresel redoks değişimleri ve mitokondriyal disfonksiyon kapsamında göreceli hücre sayısı değerlendirilmeleri için uygun olduğu fakat bazal hücresel redüksiyon kapasitesi ve/veya oksidan savunmasının yüksek seviyeleri ile hücrelerde değişmeyen azalış dalgalarıyla değerlendirilmesinde uygun olmadığı; (iv) eğer kimyasal olarak indüklenmiş hücresel bozukluğun altında yatan mekanizma açık ve kesin değil ise sitotoksisite kapsamı en az iki test metodu yardımıyla (tripan mavisi veya LDH salınımı) hücresel membran hasarının belirlenmesi gerektiği ve MTT testinin hücre azalışını doğrulaması gerektiğini önermektedirler.

Bu çalışma kapsamında benzil benzoat sitotoksisitesi dört farklı teste göre değerlendirilmiştir. Elde edilen bulguların değişkenliği, kullanılan bu testlerin her birinin farklı bir temele dayanmasından ileri gelmektedir. Farklı sitotoksisite testleri, kullanılan teste ve ajana bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmektedir.

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ROS üretiminin temel hücresel kaynağıdır. Aşırı besin alımı olan hücrelerin artmış bir oksidatif fosforilasyona ve ROS üretimine sahip olabileceği tahmin edilebilir. Bu uyumsuz metabolik durum ROS artışının düzenlenmesinde apoptoz ve/veya hücrenin yaşlanmasının indüksiyonu için evrimsel bir seçilimin temelini oluşturabilmektedir [97]. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonu için biyolojik sistemin yeterliliği arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşmaktadır [98].

L929 hücrelerinde benzil benzoatın indüklediği sitotoksisite ve hücre ölümü bulgularını destelemek amacıyla DCFDA ile olası hücresel reaktif oksijen türlerini tespit etmeye yönelik analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda elde edilen bulgular; benzil benzoatın 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilmiş olup veriler kontrol grubuna göre kat değişikliği şeklinde ifade edilmiştir. Benzil benzoatın indüklediği hücresel ROS üretimi kontrole göre değerlendirildiğinde etanol ve 10 mM benzil benzoat grubunda önemli bir farklılık gözlenmezken; özellikle 15 mM ve 20 mM benzil benzoat uygulama grubunda önemli bir artış gözlenmektedir. İstatiksel olarak incelendiğinde ise; bütün ikili grupların karşılaştırılmasında sadece 15 mM-20 mM benzil benzoat grubu arasında farklılık anlamlı bulunmamıştır. Diğer bütün ikili gruplar arasında benzil benzoatın indüklediği ROS üretimi açısından istatistiksel farklılık anlamlıdır ($p \leq 0.05$).

Benzil benzoatın indüklediği hücresel ROS üretimindeki bu artış aynı zamanda MTT, tripan mavisi ile canlılık testi, LDH, nötral kırmızı alım testi ve sonuçlarıyla da

uyumluluk göstermektedir. Benzil benzoat uygulaması nedeniyle indüklenen sitotoksisite ile ilgili bulguların kaynaklarından biri olarak hücrel ROS üretimindeki artış gösterilebilir.

Apoptoza giren hücreler plazma membran tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu, karyoreksis (nükleer fragmentasyon) ve apoptotik tomurcukların oluşumu gibi tipik, iyi tanımlanmış morfolojik değişiklikler gösterirler. Apoptoz plazma membranının dış kısmında fosfatidilserin (PS) maruziyeti kinetiklerinde değişiklikler, mitokondriyal membran permeabilitesindeki değişiklikler, mitokondriyal membranlararası proteinlerinin salınımı, kaspaz bağımlı aktivasyon, kaspazın aktivite ettiği DNaz'ın nükleer translokasyonu gibi çeşitli biyokimyasal kriterler ile karakterize edilmiştir. Buna karşın nekroz; hızlı sitoplazmik şişkinlik ile karakterize edilir ve sıklıkla onkosis olarak bahsedilir. Plazma membranının parçalanması ve organel bozulması ile sonuçlanır. Nekroz örneğin ısı, osmotik şok, mekanik stres, dondurup-çözme, hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonları gibi ekstrem fizikokimyasal stres sonucu ortaya çıkmaktadır [99].

Benzil benzoat uygulanan hücrelerde ölüm şeklini belirlemek amacıyla akridin oranj-propidyum iyodit ikili boyaması metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doza ve inkübasyon süresine bağlı olmak üzere incelendiklerinde (Şekil 4.29. - 4.36.) L929 hücrelerinin 24 saatlik benzil benzoat düşük doz uygulama grubunda kontrole göre hücre canlılığında bir azalış, aynı inkübasyon süresinde doz arttıkça nekrotik hücre ölümü yoğun bir biçimde gözlenmektedir. Özellikle 20 mM uygulama grubunda nekrotik hücre ölümü lehine bulguların artışı dikkat çekicidir. Aynı şekilde 48 saatlik benzil benzoat uygulama gruplarında 10 mM konsantrasyonda apoptotik hücre ölümü görülürken; doz arttıkça nekroza doğru bir yönelim söz konusu olmaktadır. AOPI boyaması ile elde edilen sonuçlar doz ve süreye bağlı olarak nekrotik hücre ölümünde bir artış olduğunu göstermektedir.

Benzil benzoat toksisite değerlendirmesi için uygulanan dozlar nedeniyle oluşan bütün etkiler kapsamlı olarak ele alındığında; benzil benzoatın ROS artışına, mitokondriyal disfonksiyona, hücrel membran bütünlüğünü etkilediğine, lizozomal yolla sitotoksisiteye sebep olarak nekrotik bir hücre ölümü yoluna gittiği gözlenmektedir. Bulguları desteklemek için bu testlere sitotoksisite değerlendirmesine ek olarak ATP temelli canlılık testinin, nekroz bulgusunu desteklemek için de RIPK1/3 fosforilasyon analizinin yapılması önerilebilir.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında gıda, ilaç ve kozmetiklerde sıklıkla kullanılan kimyasallardan benzil benzoatın sağlıklı bir hücre hattı olan L929 fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler ile benzil benzoatın sitotoksitesini farklı temellere dayanan testlerle değerlendirilmiş ve LC₅₀ dozu belirlenmiştir. Gıda katkı maddesi olarak ya da kozmetik ve ilaç sektöründeki kullanımı açısından değerlendirildiğinde birçok farklı kaynaktan maruz kalınabilen bu kimyasalın kullanımında oldukça dikkatli olunması gerektiği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Delen N., Durmuşoğlu E., Güncan A., Güngör N., Turgut C., Burçak A., “Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları,” *Türkiye Ziraat Mühendisliđi 6. Teknik Kongre*, 1–21, **2002**.
- [2] Omaye S. T., *Food and Nutritional Toxicology*. CRC Press, 17-23, **2004**.
- [3] Gilsenan M. B., “Acceptable Daily Intake,” *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, 55–60, **2011**.
- [4] Zeligler, H.I. “*Human Toxicology of Chemical Mixtures*,” Chapter 10: Food, Elsevier, 105-128, **2011**.
- [5] Pulido O. M. and Gill S., *Haschek and Rousseaux’s Handbook of Toxicologic Pathology*, Chapter 35: Food and Toxicologic Pathology: An Overview, Third Edit., Elsevier, 1051–1076, **2013**.
- [6] Özçiçek Dölekođlu C., *Tüketicilerin işlenmiş gıda ürünlerinde kalite tercihleri, sağlık riskine karşı tutumları ve besin bileşimi konusunda bilgi düzeyleri (Adana Örneği)*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, **2003**.
- [7] Deshpande S.S., *Handbook of Food Toxicology*, Chapter 8: Food Additives, CRC Press, 219-285, **2002**.
- [8] Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliđi, Resmi Gazete, **30 Haziran 2013**.
- [9] Rangan C., Barceloux D.G., Food additives and sensitivities, *Disease-a Month*, vol. 55, no. 5, 292–311, **2009**.
- [10] Tomaska L.D., Brooke- Taylor S. Food Additives: Food Additives – General, *Encyclopedia of Toxicology*, Volume 2: Hazard and Diseases, 449-454, **2014**.
- [11] Neltner T.G., Kulkarni N.R., Alger H. M., Maffini M.V., Bongard E.D., Fortin N.D., Olson E.D., Navigating the U. S. Food Additive Regulatory Program. *Comprehensive Reviews Food Science & Food Safety*; 10;342-368, **2011**.
- [12] Neltner T. G., Alger H. M., Leonard J. E., Maffini M. V, Data gaps in toxicity testing of chemicals allowed in food in the United States, *Reproductive Toxicology*, vol. 42, 85–94, **2013**.
- [13] www.turktox.org.tr/gida (Erişim: Aralık, **2014**).
- [14] <http://www.faia.org.uk/e-numbers/> (Erişim: Aralık, **2014**).

- [15] McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., Sonuga-Barke E., Warner J. O., and Stevenson J., Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, *Lancet*, vol. 370, no. 9598, 1560-1567, **2007**.
- [16] Ceyhan B.M, Gültekin F., Kumbul Doğuc D, Kulac E., Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning on memory in rats, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 56, p.145-48, **2014**.
- [17] Anonim, Benzyl Benzoate, Toxicology Data Network
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+120-51-4> (Erişim: Aralık, **2014**).
- [18] Anonim, Benzyl Benzoate Compound Summary, Open Chemistry Database
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzyl_benzoate#section=Pharmacology-and-Biochemistry (Erişim: Aralık, **2014**).
- [19] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Sixth Edition, Wiley Blackwell's Publishing, Volume 5, 89, **2003**.
- [20] Kamm O ve Kamm W.F., Benzyl benzoate Organic Synthesis, Coll. 1: 104, **1941**.
- [21] Kamm W.F. ve Matthews A.O., Benzyl Benzoate, *Journal of American Pharmacist Association*, 11, 599, **1922**.
- [22] Editör: Burdock, G.A., *Encyclopedia of Food and Color Additives*, CRC Press, 1. Cilt, 263, **1996**.
- [23] Walia M., Mann T.S., Kumar D., Agnihotri V.K. and Singh B. Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic Activation of Essential Oil of Leaves of *Malus Domestica* Growing in Western Himalaya (India), *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**.
- [24] Jantan I., Ayop N., Ali N.A.Z., Ahmad A.B., Yalvema M.F., Muhammad K. and Azizi A. R., The essential oils of *Cinnamomum rhyncophyllum* Miq. as natural sources of benzyl benzoate, safrole and methyl (E)-cinnamate, *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 260-262, **2004**.
- [25] Ciccio J.F., Essential oil components in leaves and stems of *Piper bisasperatum* (Piperaceae), *Revista de Biologia Tropical*, 44-45:35-8, **1997**.

- [26] Anonim, Everything Added to Food in the United States, FDA <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?filter=benzyl&sortColumn=&rpt=eafusListing> (Erişim: Aralık, **2014**).
- [27] Ash M and Ash I., *Handbook of Preservatives*, Synapse Information Resources, 292, **2004**.
- [28] Shaikh J., Benzyl Benzoate, in Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology* (2nd ed.), Elsevier, 264–265, **2005**.
- [29] [http://www.epa.gov/chemrtk/hpvis/hazchar/Category Benzyl%20Derivatives September 2010.pdf](http://www.epa.gov/chemrtk/hpvis/hazchar/Category_Benzyl%20Derivatives_September_2010.pdf) (Erişim: Aralık, **2014**)
- [30] JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Toxicological evaluation of certain food additives. Prepared by the 44th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA). International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, **1996**.
- [31] Koçkaya E.A. and Kılıç. A., Developmental toxicity of Benzyl Benzoate in Rats After Maternal Exposure Throughout Pregnancy, *Environmental Toxicology*, **2011**.
- [32] Rivero-Cruz B., Rivero –Cruz I., Rodriguez-Sotres R. and Mata R., Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, 68,
- [33] Scientific Opinion on the Safety and Efficacy of benzyl alcohols, aldehydes, acids, esters, and acetals (chemical groups 23) when used as flavourings for all animal species, EFSA Journal, 10 (7): 2785, 2012
<http://www.efsa.europa.eu/de/search/doc/2785.pdf> (Erişim: Aralık 2014)
- [34] Sharma D.K., Saxena V.K., Sanil N.K. and Singh N.K., Evaluation of oil of Cedrus deodara and benzyl benzoate in sarcoptic mange sheep, *Small Ruminant Research*, 26, 1-2, 81-86, **1997**.
- [35] Dimri U., Sharma M.C., Effects of Sarcoptic Mange and its control with Oil of Cedrus Deodara, Pongamia glabra, Jatropa curcas and Benzyl Benzoate, both with and without Ascorbic Acid on Growing Sheep: Assesment of Wight Gain, Liver Function, Nutrient Digestibility, Wool Production and Meat Quality, *Journal of Veterinary Medicine*, A 51, 79-84, **2004**.
- [36] Ong G.S.Y., Somerville C.P., Jones T.W. and Walsh J.P., Anaphlaxis Triggered by Benzyl Benzoate in Preparation of Depot Testosterone Undecanoate, *Case Reports in Medicine*, 1-3, **2012**.

- [37] Sette L., Comis A., Marcucci F., Sensi L., Piacentini G.L. and Boner A.L., Benzyl-benzoate foam: effects on mite allergens in mattress, serum and nasal secretory IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus* and bronchial hyperactivity in children with allergic asthma, *Pediatric pulmonology*, 18 (4): 218-27, **1994**.
- [38] Alberici F, Pagani L., Ratti G. and Viale P., Ivermectin alone or in combination with benzyl benzoate in the treatment of human immunodeficiency virus-associated scabies, *British Journal of Dermatology*, 142:969-972, **2000**.
- [39] Lau S., Wahn J., Schulz G., Sommerfeld C., Wahn U., Placebo-controlled study of the mite allergen-reducing effect of tannic acid plus benzyl benzoate on carpets in homes of children with house dust mite sensitization and asthma, *Pediatric Allergy Immunology*, 13: 31-36, **2002**.
- [40] Biele M., Campori G., Colombo R., De Giorgio G., Frascione P., Sali R., Starnini G., Milani M., The ISaC Investigator Group, Efficacy and tolerability of a new synergized pyrethrins thermofobic foam in comparison with benzyl benzoate in the treatment of scabies in convicts: the ISaC study. *Journal of European Academy of Dermatology and Venerology*, 20, 717-720, **2006**.
- [41] Mytton OT, McGready R., Lee S.J., Roberts C.H., Ashley E.A., Carrara V.I., Thwai K.L., Jay M.P., Wiangambun T., Singhasivanon P., Nosten F., Safety of benzyl benzoate lotion and permethrin in pregnancy: a retrospective matched cohort study, *BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 114:582-587, **2007**.
- [42] Hashimoto Y., Kawaguchi M., Miyazaki K., Nakamura M., Estrogenic activity of tissue conditioners in vitro, *Dental Materials* 19, 341-346, **2003**.
- [43] Khamis S., Bibby M.C., Brown J.E., Cooper P.A., Scowen I., Wright C.W., Phytochemistry and Preliminary Biological Evaluation of *Cyathostemma argenteum*, a Malaysian Plant Used Traditionally for the Treatment of Breast Cancer, *Phytotherapy Research*, 18, 507-510, **2004**.
- [44] Ohno O., Ye M., Koyama T., Yazawa K., Mura E., Matsumoto H., Ichino T., Yamada K., Nakamura K., Ohno T., Yamaguchi K., Ishida J., Fukamizu A., Inhibitory effects of benzyl benzoate and its derivatives on angiotensin II induces hypertension. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7843-7852, **2008**.

- [45] Charles A.K. ve Darbre P.D. Oestrogenic activity of benzyl salicylate benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 29: 422-434, **2009**.
- [46] Lo J.T., Chen B.H., Lee T-M., Han J., Li J.-L., Self-Emulsifying O/W formulations of paclitaxel prepared from mixed nonionic surfactants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 5, 2320-2332, **2010**.
- [47] Tuntipaleepun M., Chakthong S., Chanita P., Ptaimaporn P., Antifungal and cytotoxic substances from the stem barks of *Desmos chinensis*, *Chinese Chemical Letters*, 23, 587-590, **2012**.
- [48] Prieto P., Curren R., Gibson R.M., Raabe H., Tumainen A.M., Whelan M., Kisner-O.A., Assessment of predictive capacity of 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substance not classified for acute oral toxicity (LD50>2000 mg/kg) Results of an ECVAM validation study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2013**.
- [49] Castell J.V. ve Lechon J.G., *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Chapter 3: Continuous Cell Lines as a Model for Drug Toxicity Assessment, Academic Press, 34-51, **1997**.
- [50] Broadhead C.L., Combes R.D. The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of Three Rs. *ATLA*, 29, 471-485, **2001**.
- [51] Eisenbrand G., Pool-Zobel B, Baker V., Balls M., Blaauboer B., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.-C., Pieters R. ve Kleiner J., Methods of in vitro toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, 40, (2-3), 193-236, **2002**.
- [52] Freshney, R.I. *Culture of Animal Cells, a Manual Basic Technique*, Wiley-Liss Fifth Edition, New York, **2010**.
- [53] Niles A.L., Moravec R. A., Riss T.L., Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development, *Expert Opinion Drug Discovery*, 3(6): 655-669, **2008**.
- [54] Stacey G.N., Doyle A., Ferro M., *Cell Culture Methods for in vitro Toxicology*, Kluwer Academic Publishers, Chapter 2: Application of Cell Cultures to Toxicology, 9-26, **2001**.
- [55] Wyllie A.H., Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture) *British Journal of Cancer* 67, 205-208, **1993**.

- [56] Nicotera P., Leist M., Manzo L., Neuronal cell death: a demise with shapes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20: 46-51, **1999**.
- [57] Rixe O., Fojo T., Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis deficient? *Clinical Cancer Research*, 13: (24), 7280-7287, **2007**.
- [58] Niles A.L., Moravec R.A. ve Riss T.L., In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening, *Current Chemical Genomics*, 3, 33-41, **2009**.
- [59] Kepp O., Galluzzi L., Lipinski M., Yuan J., Kroemer G., Cell Death Assays for Drug Discovery, *Nature Reviews*, Volume 10, 221-237, **2011**.
- [60] Riss T.L. ve Moravec R.A., *Cell Biology A Laboratory Handbook*, Editör: Celis J.E., Chapter 4: Cell Proliferation Assays: Improved Homogeneous Methods Used to Measure the Number of Cells in Culture, Third Edition, 25-31, **2006**.
- [61] http://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol_Colorimetric.pdf (Erişim: Aralık, **2014**).
- [62] Jonsson B., Liminga G., Csoka K., Fridborg H., Dhar S., Nygren P., Larsson R., Cytotoxic Activity of Calcein Acetoxymethyl Ester (Calcein/AM) on Primary Cultures of Human Haematological and Solid Tumors, *European Journal of Cancer*, 32A, (5), 883-887, **1996**.
- [63] Vichai V., Kirtikara K., Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening, *Nature Protocols*, 1, (3), 1112-1116, **2006**.
- [64] Kupscik L., *Mammalian Cell Viability Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Editör: Stoddart M.J., Chapter 3: Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: MTT Reduction Assay, Springer, 13-19, **2011**.
- [65] Sieuwerts A.M., Klijn J.G.M., Peters H.A., Foekens J.A., The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC₅₀-Values and Cell Survival, *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 33: 813-823, **1995**.
- [66] Editör: Pörtner R., *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Chapter 12: Monitoring Cell Growth, Viability and Apoptosis, Vol. 1104, 169-192, **2014**.

- [67] Wang G., Zhang J., Dewilde A.H., Pal A.K., Bello D., Therrien J.M., Braunhut S. J., Marx K.A., Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay, *Toxicology*, 299, 99-111, **2012**.
- [68] Repetto G., Peso A.d., Zurita J.L., Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity, *Nature Protocols*, Vol.3 No.7, 1125-1131, **2008**.
- [69] Behl C., Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches, *Progress in Neurobiology*, 57: 301-323, **1999**.
- [70] Javadov S., Hunter J.C., Barreto-Torres G., Parodi-Rullan R., Targeting the mitochondrial permeability transition: cardiac ischemia-reperfusion versus carcinogenesis, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27:179-190, **2011**.
- [71] Maicas N., Ferrandiz M.L., Brines R., Ibanez L., Cuadrado A., Koenders M.I., Van der berg W.B., Alcaraz M.J., Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease, *Antioxidant & Redox Singaling*, 15, (4), 889-901, **2011**.
- [72] Stohs S.J. ve Bagchi D., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine*, 18:321-336, **1995**.
- [73] Editör: Gupta R.C., *Veterinary Toxicology*, Chapter 27: Oxidative Stress and Chemical Toxicity, Elseiver, 426-439, **2012**.
- [74] Halliwell B., Whiteman M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255, **2004**.
- [75] Wang H. ve Joseph J.A., Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 612-616, **1999**.
- [76] Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennery P.A., Forman H. J., Grisham M. B., Mann G. E., Moore K., Roberts L. J., ve Ischiropoulos H., Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations., *Free Radic. Biol. Med.*, 52, (1), pp.1-6, Jan. **2012**.
- [77] O'Driscoll L., O'Connor R. ve Clynes M., *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Editör: Celis J.E., Chapter 40: Methods in Apoptosis, Academic Press, Third Edition, Volume 1, 335-342, **2006**.

- [78] Wahab S.I.A., Abdul A.B., Alzubairi A.S., Elhassan M.M., Mohan S., In Vitro Ultramorphological Assesment of Apoptosis Induced by Zerumbone on (HeLa), *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 769568, **2009**.
- [79] Louis K.S., Siegel A.C., *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Editör: Stoddart M.J., vol.740, Chapter 2: Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods, Springer, 7-12, **2011**.
- [80] Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V. ve Lialiaris T., Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine, *Food and Chemical Toxicology*, 48, (10), 2934–2944, Oct. **2010**.
- [81] Amin K. A., Abdel Hameid H. ve Abd Elsttar A. H., Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats., *Food Chem. Toxicol.*, 48, (10) , 2994–2999, **2010**.
- [82] Forman S., Kas J., Fini F., Steinberg M., Ruml T., The Effect of Different Solvents on the ATP/ADP Content and Growth Properties of HeLa Cells, *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, Volume 13, 11-15, November **1999**.
- [83] Vandhana S., Deepa P.R., Aparna G., Jayanthi U., Krishnakumar S., Evaluation of suitable solvents for testing the antiproliferative activity of triclosan – a hydrophobic drug in cell culture, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 47, 166-171, **2010**.
- [84] Jacobson S.O.P., Rongard E., Stridh M., Tigger G. ve Fowler C.J., Serum Dependent Effects of Tamoxifen and Cannabinoids upon C6 Glioma Cell Viability, *Biochemical Pharmacology*, 60, 1807-1813, **2000**.
- [85] Umebayashi C., Oyama Y., Chikahisa- Muramastu L., Nakao H., Nishizaki Y., Nakata M., Soeda f., Takahama K., Tri-*n*-butyltin-induced cytotoxicity on rat thymocytes in presence and absence of serum, *Toxicology in Vitro*, 18, 55-61, **2004**.
- [86] Talorete T.P.N., Bouaziz M., Sayadi S., Isoda H., Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells, *Cytotechnology*, 52: 189-198, **2006**.

- [87] Funk D., Schrenk H.-H., Frei E., Serum albumin leads to false positive results in the XTT and MTT assay, *BioTechniques*, 43, 178-186, **2007**.
- [88] Kojima T., Hashimoto Y., Inamura Y., Koide T., Nagata H., Ito N., Suzumura K., Serum factors that suppress cytotoxic effect of methotrexate, *Experimental Oncology*, 31, 4, 209-213, **2009**.
- [89] Faheina-Martins G.V., Silveria A.L.d., Ramos M. V., Marques-Santos L.F. ve Araujo D.A.M., Influence of Fetal Bovine Serum on Cytotoxic and Genotoxic of Lectins in MCF-7 Cells, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25, (5) , 290-296, **2011**.
- [90] Bilimin K., Kopczynska ve Grieb P., Influence of serum and albumin on the in vitro anandamide cytotoxicity toward C6 glioma cells assessed by the MTT cell viability assay: implications for the methodology of the MTT tests, *Folia Neuropathologica*, 51 (1): 44-50, **2013**.
- [91] Fotakis G. ve Timbrell J.A., In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT, and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160, 171-177, 2006.
- [92] Swiss R., Niles A., Cali J.C., Nadanaciva S. ve Will Y., Validation of HTS-amenable assay to detect drug-induced mitochondrial toxicity in the absence and presence of cell death, *Toxicology in Vitro*, 27, 1789-1797, **2013**.
- [93] Riss T.L. ve Moravec R.A., Use of Multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin and plating density in cell-based cytotoxicity assays, *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2, (1) , 51-62, **2004**.
- [94] Kendig D.M. ve Tarloff J.B., Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies, *Toxicology in Vitro*, 21, 125-132, **2007**.
- [95] Putnam K.P., Bombick D.W. ve Doolittle D.J., Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, *Toxicology in Vitro*, 16, 599-607, **2002**.
- [96] Kim H., Yoon S.C., Lee T.Y., Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages, *Toxicology Letters*, 184, 13-17, **2009**.
- [97] Heiden M.G.V., Cantley L.C., Thompson C. B., Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation, *Science*, 324, 1029-1033, **2009**.

- [98] Roy A. ve Sil P.C., Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine, *Pathophysiology*, 19, 137- 148, **2012**.
- [99] Berghe T.V., Grootjans S., Goossens V., Dondelinger Y., Krysko D.V., Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo, *Methods*, 61, 117-129, **2013**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Aslı KARTAL

Doğum Yeri: İzmir

Medeni Hali: Bekar

E-posta: aslikartal.bio@gmail.com , aslikartal@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Beytepe Öğrenci Evleri N Blok Çankaya / Ankara

Eğitim Bilgileri:

Lise: Buca Anadolu Lisesi

Lisans: Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Zooloji Ağırlıklı)

Yabancı Dil:

İngilizce ve Fransızca

İş Deneyimi:

2014 – : Ar-Ge Personeli, Poyraz Biyoteknoloji Limited Şirketi (ANKARA)

Deneyim Alanları:

In Vitro Toksikoloji, Hücre Biyolojisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi (-)

Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

Kartal A., Selmanoğlu G., Cytotoxic Effects of Benzyl Benzoate on L929 cells, 5th International Congress on Cell Membrane and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels, 9-12 Eylül, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta