

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜLKEMİZDE ADANA YÖRESİNDEN TOPLANAN
KIRMIZI BİBERLERDE (*CAPSICUM ANNUUM* L.)
BİBER VE ÇEKİRDEĞİNDEKİ KAPSAİSİN
MİKTARININ TESPİT EDİLMESİ VE KOLON KANSER
HÜCRELERİ (CACO-2) ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine Kübra BİLİR
FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ender YARSAN

ANKARA
2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

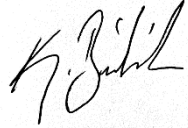
Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ülkemizde Adana Yöresinden Toplanan KırmızıBiberlerde (*Capsicum annuum* L.) Biber ve Çekirdeğindeki Kapsaisin Miktarının Tespit Edilmesi ve Kolon Kanseri Hücreleri (Caco-2) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Emine Kübra BİLİR

Tarih: 09.01.2020

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Emine Kübra BİLİR tarafından hazırlanan “Ülkemizde Adana Yöresinden Toplanan KırmızıBiberlerde (*Capsicum annuum* L.) Biber ve Çekirdeğindeki Kapsaisin Miktarının Tespit Edilmesi ve Kolon Kanseri Hücreleri (Caco-2) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09.01.2020

İmza

Prof. Dr. Ender YARSAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK-DİKMEN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Üye)

İmza

Doç. Dr. Mert PEKCAN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
(Üye)

İmza

Doç. Dr. Ebru YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Üye)

İmza

Doç. Dr. Hüsamettin Ekici
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Raportör)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kapsaisin ve KırmızıBiber	1
1.1.1. Türkiye’deki Yaygınlığı	2
1.1.2. Moleküler Yapısı	3
1.1.3. Miktar Tayini	4
1.1.4. Farmakolojik Özellikleri	10
1.1.5. Etki Mekanizması	14
1.2. Kanser	15
1.2.1. Kolon Kanseri	17
1.2.2. Kanserli Hücrede Apoptoz Süreci	20
1.3. Kanser Sağaltımı	22
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Gereç	24
2.1.1. Kimyasal Malzemeler	24
2.1.2. Sarf Malzemeler	25
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	26
2.2. Yöntem	27
2.2.1. Biber Örneklerinin Hazırlanması	27
2.2.2. Biber ve Çekirdeklerinden Kapsaisin Ekstraksiyonu	27
2.2.3. İnce Tabaka Kromatografi (İTK) Yöntemiyle Uygun Çözücünün Belirlenmesi	28
2.2.4. HPLC Analiz Yöntemi ile Kapsaisin Miktarının Belirlenmesi	28
2.2.5. Biber ve Çekirdek Ekstraktlarının Hücre Kültüründe Kullanılmak Üzere Hazırlanması	31
2.2.6. Hücre Kültürünün Hazırlanması	31
2.2.7. Hücrelere Kapsaisin, Biber ve Çekirdek Ekstraktlarının Uygulanması	33
2.2.8. MTT Deney	36
2.2.9. Hücre Lizatlarının Oluşturulması	37
2.2.10. Protein Miktar Tayini (660 nm Deneyi)	37
2.2.11. Western Blot Analizi	37
3. BULGULAR	39
3.1. İnce Tabaka Kromatografi Sonuçları	39
3.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	39
3.2.1. Doğruluk (Accuracy) ve Kesinlik (Precision)	39
3.2.2. Duyarlılık (Sensitivity)	40

3.2.3. Doğrusallık (Linearity)	40
3.2.4. Seçicilik (Selectivity)	41
3.2.5. Metodun Hesaplama Formülü	42
3.3. Caco-2 Hücrelerinin Morfolojik İncelemesi	43
3.4. MTT Canlılık Testi Sonuçları	45
3.5. Protein Miktarının Belirlenmesi (660 nm Deneyi)	46
3.6. Kapsaisin Apoptozis Üzerine Etkileri	46
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	54
ÖZET	56
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68

ÖNSÖZ

Kanser tedavisinde en bilinen yöntem kemoterapidir. Ancak kemoterapinin yan etkileri kemoterapiye alternatif olacak kanser tedavi yöntemi araştırmalarını zorunlu kılmaktadır. Bugün Dünya’da kullanılan tıbbi bitki sayısı Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4000’i ilaç hammaddesi için yaygın bir şekilde kullanılırken yaklaşık %10’unun ticari olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Özellikle son on yılda bitkisel ilaçlara olan ilgi ve talebin artması, bitkilerin doğrudan ilaç olarak kullanımının ve bitkilerden ilaç geliştirme çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır.

Çalışmamızda, ülkemizde kırmızı biberin yaygın olarak üretiminin yapıldığı Adana İli’nden toplanan olan *Capsicum annum* L. cinsi biberlere ve çekirdeklerine uygun ekstraksiyon yöntemi geliştirilerek ve HPLC sistemi ile içerdikleri kapsaisin miktarları belirlenip, Caco-2 hücre hattı üzerine uygulanıp konsantrasyon ve zamana bağlı, sitotoksik açıdan hücre canlılığına etkileri; ilaç uygulanmış hücrelerden elde edilen protein miktarlarına bağlı olarak hücrelere etki mekanizması incelenerek kapsaisinin potansiyel anti-kanser ajan olabilme özelliğine yeni bir bakış açısı getirilmesi açısından literatüre önemli katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen başta değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN, hücre kültürü ile ilk kez tanışmamı sağlayan, bakış açısı kazandıran, laboratuvar bilgi, becerileri ile Farmakoloji alanında yönlendirmelerini esirgemeyen tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN’e; tez çalışmalarım esnasında yardım ve desteğini esirgemeyen, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Görkem KISMALI’ya ve tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. Mert PEKCAN’a, eğitimim süresince çalışmalarında destek ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ’a; katkılarını ve yardımlarını

her daim hissettiren Dr. Sedat SEVİN'e ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Hidayet TUTUN'a; çalışma süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Kimyager Süreyya KARAASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Üniversite hayatımın ilk gününden bu güne arkadaşlıktan öte kardeşliğiyle her durumda yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen Veteriner Hekim Dilruba AÇIKALIN'a ve bu tezi bitirmemi benden daha çok isteyen, her zaman, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, özveri ve sevgilerini her daim hissettiğim “beni ben yapan herşeyi oluşturan” annem Ayfer BİLİR, ve babam Mitat BİLİR'e çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP1	Aktivator Protein
DF	Dilüsyon faktörü
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	1-1'-difenil-2-pikrilhidrazi
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IC50	Inhibitör Konsantrasyon 50
kg	Kilogram
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
mg	Miligram
ml	Mililitre
MS	Kütle Spektrofotometrisi
NF-KB	Nükleer Faktör-Kappa B
nm	nanometre
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
ppm	Milyonda bir birim (mg/kg veya L)
RSD	Relatif standart sapma
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Ankyrin Transient Receptor Potential
TRPC	Canonical Transient Receptor Potential
TRPM	Melastatin-Related Transient Receptor Potential
TRPN	No Mechanoreceptor potentials
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid receptor-1
VR1	Vanilloid Reseptör 1
µg	Mikrogram

μl	Mikrolitre
μm	mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
%	Yüzde



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Biberin anatomisi	1
Şekil 1.2. Kapsaisinin moleküler yapısı	3
Şekil 1.3. VR1 Reseptörü	15
Şekil 1.4. Kanseri hücrelerinin çoğalması	16
Şekil 1.5. Mutasyon sonrası kanser hücrelerinin gelişimi	17
Şekil 1.6. Sindirim sisteminde kolonun pozisyonu	19
Şekil 1.7. Kolon kanserinde poliplerin zamanla kansere dönüşümü	19
Şekil 1.8. Apoptoz yolları	21
Şekil 2.1. Adana İli Karaisalı İlçesinden toplanan Demre Sivrisi (<i>Capsicum annum</i> L.)	27
Şekil 2.2. Hücre kültürünün hazırlanması	34
Şekil 2.3. Hücrelere kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktlarının uygulanması için hücrelerin hazırlanması	35
Şekil 2.4. MTT analizi için 96 kuyucuklu platte kapsaisin, biber ve çekirdek ekstratı dozlarının uygulanması.	35
Şekil 3.1. Çeşitli çözücülerin denendiği ekstraktların plaka görüntüleri.	39
Şekil 3.2. Kapsaisin ve dihidrokapsaisinin kalibrasyon eğrileri	41
Şekil 3.3. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin yüklü kromatogramları.	42
Şekil 3.4. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin istatistiksel karşılaştırması.	43
Şekil 3.5. Caco-2 hücreleri kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktı uygulaması sonrası gruplar arası morfolojik farklılıklar	44
Şekil 3.6. Artan doz ile alınan yüzde sitotoksosite cevapları arasında pozitif bir ilişki	44
Şekil 3.7. Protein Kalibrasyon Eğrisi	46
Şekil 3.8. Bax ve survivin proteinlerinin Western Blot sonucu	47

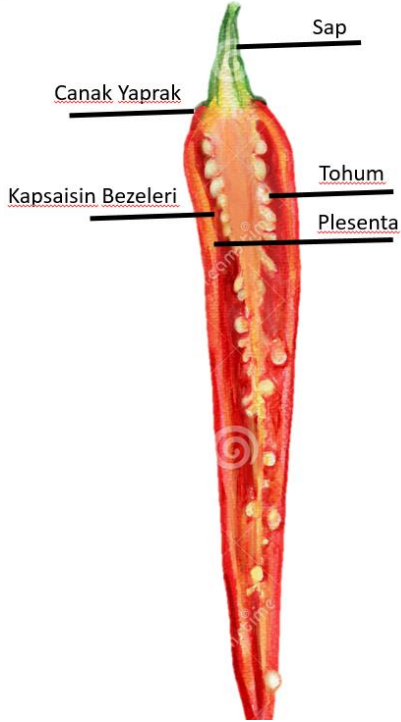
ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kırmızıbiberlerde acılık veren bazı bileşiklerin kimyasal özellikleri ve acılık oranları	4
Çizelge 1.2. Kırmızıbiber türlerinde kapsaisinoit komponentlerinin bileşimi	4
Çizelge 1.3. Doğal ve sentetik kapsaisinoitler.	5
Çizelge 1.4. Kapsaisin içeren müstahzarlar	11
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	24
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	25
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	26
Çizelge 2.4. HPLC-FL sistemi şartları	29
Çizelge 3.1. Doğruluk ve kesinlik değerlendirmesine göre yöntemin performansı	40
Çizelge 3.2. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin LOD ve LOQ değerleri	40
Çizelge 3.3. Kalibrasyon eğrisi formülleri	41
Çizelge 3.4. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin analizleri alıkonulma zamanları	42
Çizelge 3.5. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin miktar sonuçları (ppm)	43
Çizelge 3.6. IC50 değerleri ve en yüksek belirtme katsayıları	45
Çizelge 3.7. Örneklerin protein miktarlarının hesaplanması	46
Çizelge 4.1. HPLC için seçilen koşullar çalışmalar arası farklılıklar	50
Çizelge 4.2. Biberin türüne göre kapsaisin miktarları	51

1.GİRİŞ

1.1. Kapsaisin ve Kırmızıbiber

Ekonomik bakımdan önemli olan birçok bitki ile yakından ilişkili olan ve aynı ailede bulunan kırmızıbiber botanik bilimde Solanacea familyasının Capsicum (biber) cinsindedir (Govindarajan, 1986). Kırmızıbiberin anatomik yapısı Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Biberin anatomisi.

Taksonomik olarak “capsicum” teriminin kullanılmasına rağmen bilimsel literatürde “pepper” ifadesi daha fazla kullanılmaktadır. Capsicum terimi ayrıca (Kırmızıbiber, Cayenne biberi, Kuş biberi, Çili biberi, Dolma biber, gibi) bitkinin büyüklüğü, şeklini, kaynağını, acılığını (yakıcılığı) ve rengini ifade etmektedir. Biber terimi ticaret ve tarım ile ilgili olan istatistiklerde kırmızıbiber, çili biber, paprika,

karabiber terimleri ile karıştırılması problemlere sebep olmuştur. Farklı ülkelerde kullanılan farklı terimler kullanılmasına ek olarak aynı ülke içerisinde dahi farklı terimler kullanılması karışıklığa sebep olabilmektedir. Örneğin Uzak Doğu ülkeleri İngiltere, Hindistan ve Afrika çili terimini diğer ülkelere göre yaygın olarak kullanılırken, Amerika’da bu terim kullanılmamaktadır (Govindarajan, 1985). Farklı anatomik ve fizyolojik bakımından farklılıklar olmamasına rağmen, botanik sınıflandırmada karışıklık meydana gelmiştir. Çili ve paprika *Capsicum annuum* türüne ait iken, *Capsicum frutescens* türüne ait biberler, fazlaca acılığa sahip küçük çeşitlerdir. Sonuç olarak gerçekte “capsicum” terimi *Capsicum frutescens* ve *Capsicum annuum* türleri için kullanılmaktadır. Ayrıca Güney Amerika’nın kuzeyi, Meksika, Orta Amerika ve bu bölgede yer alan adaları kapsayan tropikal alanda Amerikan kökenli 20-30 kadar tür belirlenmiştir (Govindarajan, 1985).

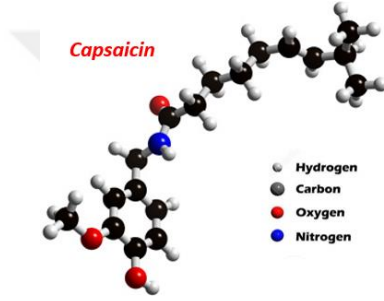
1.1.1. Türkiye’deki Yaygınlığı

Biber bitkisinin anavatanı Meksika olarak bilinmektedir ve 1492 yılında Amerika’nın keşfi ile birlikte Avrupa’ya getirildiği düşünülmektedir. Kırmızıbiberin kullanımı Azteklere kadar dayandığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Azteklere ait yazıtlardan acı kırmızıbiberi, antimikrobiyal ve antihemolitik ajan olarak kullandıkları gösterilmiştir. Bitkinin Latince ismi olan *Capsicum* Fransız botanikçi Turneyfort tarafından verilmiştir. Biberin acılığını veren alkaloid yapıdaki kapsaisin ilk olarak Tresh tarafından 1846 yılında izole edilmiş ve isimlendirilmiştir. Nelson ise 1919 yılında yaptığı çalışmada kapsaisinin kimyasal yapısının vanilloid olduğunu tespit ederek Tresh’in bulgularını teyit etmiştir (Szallasi ve Blumberg, 1999).

Ülkemizde, Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde üreticiliği yapılan tür genellikle *Capsicum annuum* L. olarak sınıflandırılmaktadır (Topak ve ark., 2008). Bu tür ülkemizde ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Şener ve ark., 2010).

1.1.2. Moleküler Yapısı

Ekonomik açıdan önemli pekçok bitki ile yakından ilişkili olan ve aynı ailede bulunan kırmızıbiberler botanik bilimde Solanacea familyasının Capsicum (biber) cinsidir (Govindarajan, 1985). Kapsaisin ($(CH_3)_2CHCH=CH(CH_2)_4CONHCH_2C_6H_3-4-(OH)-3-(OCH_3)$ (8methyl-N-vanillyl-6 nonen mide) (Şekil 1.2), biberin acı olmasını sağlayan maddedir ve oldukça kuvvetli, kararlı, acı, yakıcı, beyaz ve kokusuz özellikte alkaloid ($C_{18}H_{27}NO$) yapıda bir maddedir (Lopez-Hernandez ve ark., 2001).



Şekil 1.2. Kapsaisinin moleküler yapısı.

Kapalı formülü $C_{18}H_{27}NO$ (Molekül Ağırlığı: 305,41 g) olan kapsaisinin, erime derecesi 57-66 °C arasındadır. Alkolde, kloroformda ve benzende çözünür, karbon disülfitte az çözünür ve soğuk suda neredeyse hiç çözünmez (25 °C’de 10,3 mg/L). Oktanol-su dağılım katsayısı (log Kos) 3,04’tür. Bekletme, dondurma ve pişirmeye rağmen kapsaisin orijinal potensini korur (HSDB, 2006).

Dünyada yaygın olarak kullanılan kırmızıbiberlerin acılığının temel sebebi kapsaisin bileşiğidir (Iwai, 2001). Kapsaisinoid bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesini L-fenilalanin oluşturur. Başlangıç mekanizmasında sinamik asit ve onun türevleri de yer almaktadır. Bu mekanizma pek çok aşamadan olup içerisinde pek çok detay bulunmaktadır. Farklı enzimlerin özellikleri ve kontrol mekanizmaları kapsaisinoidlerin karakteristik kompozisyonu şeklindedir. Kapsaisinoit bileşikleri % 90 olarak tüm biberde, % 40 oranında meyvede ve % 10 oranında ise tohumda bulunur (Balbaa ve ark., 1968). Kırmızıbiberde yer alan ve yapısal olarak kapsaisin gibi acılık

veren diğer farklı bileşiklerin çeşitli özellikleri ve acılık oranları Çizelge 1.1’de, kırmızıbiber meyvelerinin kapsaisinoid bileşimi ise Çizelge 1.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Kırmızıbiberlerde acılık veren bazı bileşiklerin kimyasal özellikleri ve acılık oranları (Govindarajan, 1986; Govindarajan ve Sathyanarayana, 1991; Jurenitsch ve ark., 1979).

İsim	Açık formülü	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı	Erime Noktası (°C)	Max UV Abs. (nm)	Acılık oranı (%)
Kapsaisin	N-Vanillyl-8-metil-6-nonamit	C ₁₈ H ₂₇ NO ₃	305	64.5-65.62	280.5	69
Dihidroksapsaisin	N-Vanillyl-8-metil nonamit	C ₁₈ H ₂₉ NO ₃	307	65.6-65.8	281	22
Nordihidroksapsaisin	N-Vanillyl-7-metil oktanamit	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃	293	65.6	280	7
Homokapsaisin	N-Vanillyl-9-metil-7-dekanamit	C ₁₉ H ₂₉ NO ₃	319	-	282	1
Homodihidroksapsaisin	(N-Vanillyl-9-metil dekanamit	C ₁₉ H ₃₁ NO ₃	321	66.5	280.5	1

Çizelge 1.2. Kırmızıbiber türlerinde kapsaisinoid bileşimi (Jurenitsch ve Leinmueller, 1980).

Tür	Kapsaisinoid Komponentlerinin Bileşimi (%)								
	OV	NDC	NV	C	DC	DV	HC	HDC	C:DC ORANI
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i>	0.63	13.96	0.67	49.66	34.52	0.55	-	-	1:0.7
	0.09	8.35	1.80	44.63	36.02	4.17	-	4.94	1:0.8
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	-	3.45	1.29	64.86	29.47	0.93	-	-	2.2:1
	-	3.75	1.24	37.35	54.64	1.57	-	1.45	1:1.15
<i>C. frutescens</i> L.	-	0.55	0.35	66.97	28.73	0.66	2.32	0.42	2.3:1
<i>C. chinense</i> Jacq	0.54	6.04	1.06	61.66	24.75	1.44	2.73	1.79	2.5:1
<i>C. pubescens</i> R&P	-	3.47	1.23	36.57	45.97	0.68	-	12.08	1:1.3

OV: Oktoilvanililamit; NDC: Nordihidroksapsaisin; NV: Nonoilvanililamit; C : Kapsaisin;
DC: Dihidroksapsaisin; DV : Desilvanililamit; HC : Homokapsaisin; HDC : Homodihidroksapsaisin

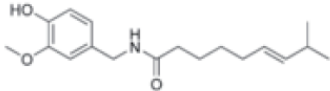
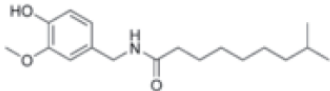
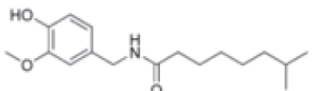
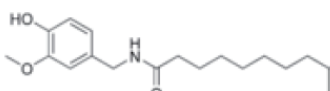
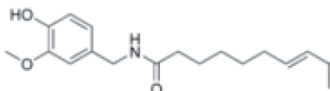
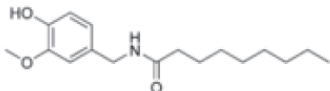
Temel kapsaisinoidler içerisinde yer alan dihidroksapsaisin ve kapsaisinin tat algısı ve sinirler üzerindeki etkisi en küçük kapsaisinoidlere (nordihidroksapsaisin, homodihidroksapsaisin ve homokapsaisine) göre iki kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Diğer biber türlerine ait (*Capsicum frutescens*, *annuum* ve *chinese*) kapsaisinoid içeriğinin 0,22-20 mg/g olarak hesaplanmıştır. Kapsaisinoidlere ait bağıl oran, kimyasal yapı ve acı tatlarının derecesini ifade eden Scoville dereceleri Çizelge 1.3’de gösterildi (Thomas ve ark., 1998).

1.1.3. Miktar Tayini

Kapsaisinin miktar tayininde yaygın olarak kullanılan yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemidir (Kopek ve ark., 2002; Turgut ve ark., 2004).

Ayrıca gaz kromatografisi (Ha ve ark., 2008) ve LC/MS metotlarının da kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Massaki ve ark., 2006). Kapsaisine ait kimyasal analiz için yapılan bir çalışmada katı faz mikroekstraksiyon-gaz kromatografisi (GC)- kütle spektrometresi (MS) kullanılmıştır (Pena-Alvarez ve ark., 2009).

Çizelge 1.3. Doğal ve sentetik kapsaisinoidler.

Kapsaisinoid	Bağıl oran	Scoville acı derecesi	Kimyasal Yapı
Kapsaisin	69%	16,000,000	
Dihidrocapsaisin	22%	15,000,000	
Nordihidrocapsaisin	7%	9,100,000	
Homodihidrocapsaisin	1%	8,600,000	
Homokapsaisin	1%	8,600,000	
Nonivamid			

Kurian ve ark. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada *C. chinese* türü biberden metanol kullanılarak kapsaisin ekstraksiyonu yapılmış Whatman 1 numaralı kâğıttan süzülerek HPLC için hazırlanmıştır. Çalışmada C18, 100 mm Lx 4.6ID 3 mm parça boyutlu kolon kullanılmıştır. Başka bir çalışmada (Collins ve ark., 1995); Capsicum cinsi biberindeki kapsaisin miktarı HPLC-Florasana detektör ile ekstasyon 280 nm ve emisyon 338 nm’de ölçülmüş ve Nova-Pak (Waters Corp.) C-18, 100 5-mm büyüklükte kolon kullanılmıştır. Aynı çalışmanın biber ekstraksiyonu: 1g toz biber 10 mL asetonitril içerisinde çözündürülüp 80 °C’de 4 saat su banyosunda bekletilmiş,

süpernatant kısmı 0,45-mm filtreden geçirilmiş ve HPLC sistemine verilmiştir. Tapha ve ark. (2009), 16 tür Capsicum meyvesinde HPLC-UV sistemiyle ve RP18 Fluofix 3NW415 (4,6-150 mm) kolonla kapsaisin miktarlarını karşılaştırmıştır. Başka bir çalışmada (Chantai ve ark., 2012), ise *C. annum* biberine katı faz ekstraksiyonu ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu denenmiş ve RP-HPLC- Flourescence sistemi ile kapsaisin ve dihidrokapsaisin miktarları belirlenmiştir.

Ancak analitik bir metodun doğruluğundan emin olunabilmesi için bir takım kriteri yerine getirdiği ortaya konulmalıdır. Miktar analizlerinde kullanılan metot validasyon bulgularında aşağıdaki kriterler yer almalıdır:

- Doğruluk (Accuracy): Kesinlik (Precision)
- Tayin Limiti (LOD-Limit of detection)
- Ölçüm Limiti (LOQ-Limit of quantitation)
- Doğrusallık / Ölçüm Aralığı (Linearity / Reportable Range)
- Lineer Aralık (Linear Range)
- Sağlamlık (Robustness / Ruggedness)
- Geri Kazanım Oranı (Recovery)
- Spesifiklik (Specifity)
- Selektivite / Seçicilik (Selectivity)
- Hassasiyet / Duyarlılık (Sensitivity)
- Stabilitate (Tiryaki ve Aysal, 2003)

Tüketicilerin gıdalara olan talebinin artması nedeniyle keskinliğin ölçümü önem kazanmıştır; ayrıca, farmasötik açıdan artan kullanımlarından dolayı çeşitli kapsaisinlerin seviyelerinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Gıda endüstrisi araştırmacıları, farklı örnekler arasındaki keskinlik seviyelerinin karşılaştırılmasında yararlı olan güvenilir, güvenli ve standart analitik prosedürlere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, enstrümantal metotlar organoleptik testlerin yerini almıştır.

Pek çok alanda olduğu gibi ilaç analizlerine ait yöntemlerde, biyolojik numunelerin analizlerinde, biyoeşdeğerlilik araştırmalarında, farmakokinetik çalışmalarında, ilaç etken maddelerinde metabolitlerinin tayininde analitik yöntemler kullanılmaktadır. İyi karakterize edilmiş ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için ise geçerliliği kabul edilen analitik yöntemler kullanılmalı ve/veya geliştirilmelidir (Altınsoy, 2010).

Bir yöntemle yapılan lm sonuçlarının birçok faktöre (laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal maddeler, standart, operatör deneyimi) bağlı olduğu bilinmektedir (Akdağ, 2004). Validasyon sırasında elde edilen bulgular rakamla gösterilmeli, sonucun elde edilişi sırasında oluşabilecek hata kaynakları ve yine hataların sonuç üzerindeki etkisi açıklanmalıdır. Güvenilir bir analiz sonucu elde etmek için yöntemin en az üç defa farklı örneklerle tekrarlanması gerekir. Daha az analiz ile elde edilen sonuçların gerçeği ne derece ortaya koyduğunu hesaplamak oldukça güç, hatta imkansızdır (Shabir, 2003).

Doğruluk: Analitik prosedürün doğruluğu, bilinen gerçek değer veya bilinen referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade etmektedir (ICH, 2005). Analitik yöntemin doğruluğu kullanılan yöntem ve gerçek değer tarafından elde edilen test sonuçlarına dayanmaktadır. Doğruluk için gerekli olan gerçek değer pekçok farklı açıdan elde edilebilmektedir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmak olarak açıklanmaktadır. Diğer yol ise; doğruluğu bilinen derişimlere sahip olan bir örneğin analizi ile karşılaştırılmasıdır (Ertaş ve ark., 2005). Derişimi bilinen bir örneğin analizi ile elde edilen değer, gerçek değerle karşılaştırılması gerekir. Bunun için iyi tanımlanmış örnek (referans standart) kullanılmalıdır (Apvma, 2004). Bulgular ortalama % geri kazanım olarak açıklanır. Bu sonuç kullanılan analitin analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini ifade eder. Kullanılan cihazlardan yapılan lmlere dayalı olarak hesaplama yapılır (Altınsoy, 2010).

Standart Sapma: Analitik kimyagerlerin laboratuvarlar sonuçlarının hangi oranda doğru olabileceği bazı yöntemlerle hesaplanabilmektedir. Araştırmacının elde edilen sonucun rakamla ifadesi, bu sonuca ulaşılması sırasında oluşabilecek hata kaynakları ve bu hataların bulgular üzerinde etkisinin belirtilmesi gerekmektedir (Demir, 2009). Ölçümler sonucu bulunan rakamsal ifadeler, sadece ölçüm hataları ile birlikte ifade edilince anlam kazanır (Ozansoy, 2011). Hata (bias) gerçek değerle ölçülen değer arasındaki fark olarak açıklanmaktadır (Altınışik, 2005). Deneysel işlemlerde sistematik hatalar ve rastgele hatalar olmak üzere doğruluğu ve kesinliği etkileyen iki tür analitik hata bulunur (Güngör, 2008).

Rastgele istatistiksel hata: Tüm fiziksel ve kimyasal ölçümde yer alan, düzeltilmesi mümkün olmayan ve kontrol edilemeyen pekçok farklı değişkene bağlı hatalar olarak ifade edilir. Oda sıcaklığı veya nemindeki hafif oynamalar, okuma esnasındaki titreşimler, cihaz okuması sırasında her seferinde farklı durumlarda yapılan ölçümler gibi faktörler rastgele hata kaynakları olarak bilinmektedir (Güngör, 2008). Daha fazla sayıda ölçüm yapılarak istatistiksel hatalar azaltılabilmesi mümkündür (Ozansoy, 2011).

Sistematik hata (bias): Laboratuvar analizinin herhangi bir basamağında bilinçsizce ancak sürekli olarak aynı hatanın tekrarlanması açıklanır. Daha sonraki analiz basamaklarında bu hata katlanarak ortaya çıkmaktadır (Kafalı, 2008). Bu tür hatalar, ölçüm aletlerinin çeşitliliğinden, araştırmacının deneyimsizliğinden, deney protokolünden ve dış etkenlerden kaynaklanabilmektedir. Hatalar sonucu sadece tek yönde etkilemektedir. Sistematik hataları, deney protokolünü ya da ölçüm aletlerini değiştirerek veya deney sonucunda gerekli düzeltmeleri yaparak ortadan kaldırılabilme mümkündür (Ozansoy, 2011). Ölçüm sonuçlarının ortalaması alınıp gerçek değer ile arasındaki farkın bulunmasına gerçeklik, ölçümün sistematik hatası olarak belirtilir. Sistematik hata gerçek değerle arasındaki mesafenin ölçüsü olarak açıklanır. Sistematik hatanın kullanılmasıyla da gerçeğe yakınlık yüzdesi (bağıl hata) hesap edilmektedir (Kafalı, 2008).

$$\% \text{ Standart Sapma} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Doğrusallık ve Çalışma Aralığı: Bir analitik prosedürün doğrusallığı, test sonuçlarının, örnekteki analitin derişimi ile doğru orantılı olması anlamındadır (ICH, 2005). Bulunan grafikte noktaların düz bir hat üzerinde olması gerekmektedir. Eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısı doğrusallığı veren parametreleri ifade eder (Altınsoy, 2010). Bir dizi standart kullanarak yapılan ölçüm sonuçlarıyla çizilen kalibrasyon eğrisi aynı zamanda doğrusallığın sınırlarını belirlemek için kullanılmaktadır (Altınışik, 2005). Yöntemin ölçüm sınırları; bir yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak bulunmuş en küçük ve en yüksek değerler arasında yer alır (Ertaş ve ark., 2005). Bir analitik prosedürün çalışma aralığı, numunedeki analitin en alt ve en üst derişim arasındaki aralığı ifade etmektedir. Analitik prosedür uygun doğrusallık, doğruluk ve kesinlik seviyesine sahip olmalıdır (ICH, 2005).

Seçicilik ve Kesinlik: Seçicilik, mevcut bileşenlerin içinden istenen maddenin belirlenmesini ifade etmektedir (ICH, 2005). Analit ve örnekte içerisinde yer aldığı tespit edilmiş analiti diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğini gösterir. USP kriterlerine göre seçicilik ölçüm sırasında analitin bulunmasını doğru tayin etmek amacıyla kullanılmaktadır (Ertaş ve ark., 2005). Testin amacı, analiz edilen maddelerin matriksten doğru olarak ölçülebilirliğinin belirlenmesi olarak açıklanır. Bunun için kullanılan yöntemin, matriksde yer alan analitin veya analitin metabolitlerini belirleyebilecek kapasitede olması gerekmektedir (Kafalı, 2008). Kesinlik, herhangi bir ölçümü tekrarlanabilme yeteneği veya farklı araştırmacılar tarafından bulunan test sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir (Ertaş ve ark., 2005). Aynı şartlar altında birden fazla örnekten elde edilen ölçümlerin arasındaki yakınlığı gösterir. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve yeniden üretilebilirlik şeklinde üç düzeyde açıklanabilir (ICH, 2005).

1.1.4. Farmakolojik Özellikleri

1.1.4.1. Analjezik ve Anti-inflamatuar Etkisi

Acı kırmızıbiberden elde edilen kapsaisin krem şeklinde cilde uygulanabilen preparatları mevcuttur (Çizelge 1.4). Kapsaisin merkezi sinir sisteminde ağrı uyarılarının iletilmesinde ve inflamasyonda rol alan P maddesini azaltarak etkili olduğu bilinmektedir. P maddesi duyu C-liflerinden salınan bir nörotransmitter bir maddedir. P maddesinin antagonisti kapsaindir. Böylece kapsaen ekstreleri sinir incinmeleri ve aşırı ağrıya neden olan zonada ağrıyı dindirmek amacı ile lokal olarak kullanılmaktadır. Günde 4 kez topikal kullanım, lokal ısı artımına ve 1-2 hafta içinde başlayan analjezik etkiye yol açtığı ifade edilmiştir. Romatoid artrit, osteoartrit, fibromiyalji, diyabetik nöropati ve kronik nonspesifik ağrı gibi durumların tedavisinde de kullanılabilmektedir. Kapsaisin tekrar tekrar kullanılması P maddesinin direnç mekanizması gibi az salınmasına neden olur. Burada P maddesinin sentez ve transportunda spesifik bir blokaja yol açtığı, ağrı eşiğini yükselterek ağrıyı uzun süreli kestiği belirtilmiştir. Desensitizasyon etkisi geri dönüşümlü bir etki olarak açıklanabilir. Farmakodinamik ve çift-kör yapılan klinik çalışmalar lokal kapsikum preparatlarının inflamatuvar komponenti olan veya olmayan kas-iskelet hastalıkları ve nöropatik ağrıların tedavisinde oldukça yararlı olduğunu ifade etmiştir (Frederik ve ark., 2003; Mason ve ark., 2004).

Çizelge 1.4. Kapsaisin içeren müstahzarlar.

İlaç Adı	Farmasötik Form	Kapsaisin İçeriği	Ülke	Üretici Firma
Roll Yakı	Yakı	3.8 mg	Türkiye	Kurtsan
Algipan	Krem	% 0.1*	İrlanda	Wyeth
Antiphlogistine Rub A-535 Capsaicin	Krem	%0.05	Kanada	Carter Horner
Arthricare for Women Ultra	Krem	0.75 mg/ml	Kanada	Del
Arthritic Pain Relief	Krem, jel	-----	Kanada	Mentholatum
Atomo Desinflamante C	Krem	-----	Arjantin	Imvi
Axsain	Krem	% 0.25	Kanada	GenDerm
Capsicin	Krem	%0.075	İspanya	Vinas
Capsicolle	Yama	25 mg/cm ²	Çek Cumhuriyeti	Chemopharma
Capsicum Farmaya	Krem	% 0.025	İspanya	Alacan
Capsidol	Krem	% 0.025*	Meksika	Janssen- Cilag
Capsig	Krem	-----	Avustralya	Schering
Cliptol Sport	Jel	-----	Fransa	Pierre Fabre Sante
Disalgil	Pomat	-----	İtalya	Also
Dolorac	Krem	-----	ABD	GenDerm
Dr Theiss Rheuma Creme	Krem	-----	Çek Cumhuriyeti	Naturwaren
Gelcen	Krem	%0.025	Yunanistan	Intramed
Infrarub	Merhem	-----	Brezilya	Whitehall
Katrum	Krem	% 0.025	İspanya	Smaller
Midalgan	Krem	-----	Hollanda	Sanofi Midy
Presyc	Krem	%0.025	Şili	Pasteur
R-Gel	Jel	-----	ABD	Healthline
Rati Salil Crema	Krem	-----	Arjantin	Gramon
Thermazet	Krem	-----	Almanya	Zwintscher
Zacin	Krem	%0.025	İngiltere	Zeneus
Zostrix	Krem	%0.025	Kanada	Medicis

1.1.4.2. Antibakteriyel Etkisi

Bakterilerin eliminasyonunda bitki ekstraları ve düşük pH gibi antimikrobiyal parametrelerin kombine edilerek kullanılması yaygındır. Kırmızıbiber ekstralarının *Listeria monositogenes*, *Salmonella tifimurium*, *Basillus cereus*, *Pseudomonas aereginosa* ve *Stafilokok aureus* üzerindeki inhibitor etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Carega ve ark., 2003) agar difüzyon metodu kullanılarak deneme yapılmış

ve sonuç olarak kırmızı biber ekstralarının doğal bir antibakteriyel olduğu tespit edilmiştir.

1.1.4.3. Antioksidan Etkisi

Kırmızıbiber, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler, A vitamini, askorbik asit ve tokoferoller gibi antioksidanları ve kapsaisinoidleri en yüksek oranda bulunduran kaynaklarından biridir. Kapsaisinoidlerin antioksidan aktivitesileri yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. *In vitro* sistemlerde kapsaisin analogları linoleik asiti, hem otooksidasyonunu hem de demir veya EDTA ya bağlı oksidasyonu önleyerek serbest radikal hasarlarına karşı koruyabildiği ve vanilinonanoat ve dimerizasyon ürünleri gibi basit sentetik analoglar bu etkiye sahip olduğu yapılan bir çalışmayla (Rosa ve ark., 2002) gösterilmiştir.

Kapsantin ve kapsorubin lipid peroksidasyonu tarafından indüklenen serbest radikal oluşumu, süperoksit ve nitrik oksit oluşumunu engelleyerek antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2003). Kapsorubin kapsantin, kapsantin 3,6 epoksid ve sikloviyolaksantin 2,2'-azobis (2,4-dimetil vareronitril) tarafından başlatılan metil linolat oksidasyonunu inhibe etmektedir. Antioksidatif aktiviteler; kapsorubin > kapsantin 3,6-epoksid > kapsantin > sikloviyolaksantin > β -karoten sırasına göre azalmaktadır. Kapsaisin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, forbolesterinin indüklediği aktivator protein-1(AP-1) ve nükleer faktor-kappa B(NF-KB) aktivasyonunu önler, ayrıca apoptoz induksiyonunu ve mitokondriyal kompleks içine elektron transferini engeller (Sancho ve ark., 2002; Zang ve ark., 2003). Ayrıca lipid peroksidasyonunu da engellediği sudaki $-OH$ radikallerini, etanol ve membranlardaki 1-1'-difenil-2-pikrilhidrazi (DPPH) radikallerini yok ettiği çeşitli çalışmalarda (Kogure ve ark., 2002) ifade edilmiştir.

1.1.4.4. Enerji Dengesi Üzerine Etkisi

Kırmızıbiber ve kafein alımının makro-nutrisyon ve enerji dengesi üzerine etkisini araştırıldığı çalışmada, toplam enerji alımını azaltıp, harcanmasını artırdığını ifade edilmiştir. Kalp hızının spektral analizi kırmızıbiberin bu etkiyi sempatik: parasempatik sinir sistemi aktivitesi oranını artırması ile ilgili olduğu da bu çalışmada gösterilmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde kan dolaşımını artırıp fibrin oluşumunu azaltmak amacı ile kullanılan ticari formda kapsaisin içeren tablet ilaçlar bulunmaktadır (Chaiyata ve ark., 2003; Yoshika ve ark., 2001).

1.1.4.5. Antikarsinojen Etkisi

Kapsaisin apoptozu indükleyici etkisi ile çeşitli immortal ve maling hücrelerin büyümesini baskılayabilmektedir. İndüksiyon yeteneklerinin, hücrelerde intraselüler reaktif oksijen türlerindeki üretiminin artmasıyla bağlantılı olabileceği ifade edilmiştir (Bernatchez ve ark., 1999; Hanai ve ark., 2002). Kapsaisinin kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğunu gösteren çalışmalarda kapsaisinin bazı prostat kanser hücrelerindeki apoptoz oranını artırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca doğal kapsaisinin kan kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği, akciğerde yer alan kanserli hücrelerin ve karaciğer kanser hücreleri olan HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Hunnang ve ark., 2009). Kapsaisin sebep olduğu apoptozun yolağı hala kesin olmamakla birlikte bazı hücrelerel makromoleküller üzerindeki oksidatif strese bağlı geri dönüşümsüz hasarın neden olduğu deneysel çalışma fikirleri arasında yer almaktadır (Czaja, 2002). Kapsaisinin kaspazla aktive edilen DNaz inhibitörünün ekspresyonunu baskılayarak apoptoza sebep olduğu insan melanoma hücrelerinde, hepatokarsinoma hücrelerinde ise hücre içi antiapoptotik Bcl-2 oranını azalttığı ve kaspaz-3 aktivitesini artırdığı yine çeşitli çalışmalarla ifade edilmiştir (Gong, 2005; Gung ve ark., 2001).

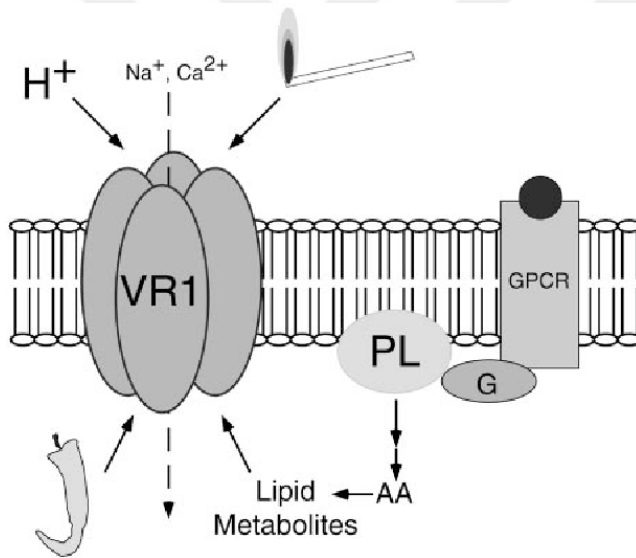
Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, kapsaisinin farklı dozlarının Caco-2 hücre membranı üzerinde apikalden bazolateral yönünde (A->B) ve bazolateralinden apikal yönünde (B->A) gerçekleşen transportuna etkisi araştırılmış ve bulgular bazı dozlarda kapsaisinin P-gp inhibitörü gibi etkisi olabileceğini göstermiştir (Çizelge 1.5.) (Tsukura ve ark., 2007). Caco-2 hücreleriyle yapılan farklı bir çalışmada ise kapsaisinin farklı dozlarını uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Ca kanal blokörü olarak bilinen verapamilin digoksinin permeabilitesi üzerine etkisiyle karşılaştırıldığında, sonuçlar kapsaisinde verapamile benzer olduğu kanıtlanmıştır (Han ve ark., 2006).

1.1.5. Etki Mekanizması

Nelson 1919 yılında kapsaisinin kimyasal yapısının vanilloid olduğu tespit etmiştir (Szallasi ve Blumberg, 1999). Vanilloidler ekzojen ve endojen olarak ikiye ayrılırlar ve organizmada bunların bağlandıkları reseptörler vanilloid reseptör adlandırılır. Endojen vanilloidlere örnek olarak yangıya bağlı pH değişiklikleri ve yüksek sıcaklık değişiklikleri, ekzojen vanilloidlere ise, kapsaisin gösterilebilir (Szallasi, 2001).

Geçici reseptör potansiyel ailesi (TRPV1, Transient receptor potential vanilloid receptor-1) ilk olarak dorsal root, trigeminal ve nodos gangliyonlarda eksprese edilmiş, seçici olmayan bir iyon kanal proteini olarak ifade edilmektedir. Vanilloid reseptörlerin aktifleşmesi farklı uyarılarla ve bunların uyarım aralıklarındaki farklılıklarla oluşmaktadır. Isı, protonlar, lipidler, forboller, fosforilasyon, ektesellüler osmolarite ve basıncın değişmesi ve hücrelerarası Ca^{+2} iyon miktarının tükenmesi reseptörlerin aktivasyonunu değiştirdiği ve ayrıca kapsaisin gibi vanilloidlerin kanallarını aktive etmektedir. Kapsaisinin spesifik olarak bağlandığı reseptöre Kapsaisin reseptörü ya da vanilloid reseptör 1 (TRPV1 ya da VR1) adı verilmektedir (Katarina ve Julius, 1999).

VR1 426 aminoasit içeren ve ~ 95 kDa ağırlığında bir proteindir. VR1 TRP (Transient Receptor Potential) ailesinde yer alan bir iyon kanal reseptörüdür. TRP ailesi en az 6 alt familya içerir ve bunlar; TRPA (Ankyrin Transient Receptor Potential), TRPC (Canonical Transient Receptor Potential), TRPM (Melastatin–Related Transient Receptor Potential), TRPN (No Mechanoreceptor potentials), TRPP (Polycystin Transient Receptor Potential) ve TRPV1’inde içinde bulunduğu TRPV (Vanilloid Receptor–Related Transient Receptor Potential) aileleridir. Kapsaisinle aktivite gösteren TRPV1 (VR1), TRP’lere sonradan eklenen bir alt gruptur. VR1 reseptörü Nagy ve ark. (2004), tarafından Şekil 1.3’de gösterildiği gibi şematize edilmiştir.



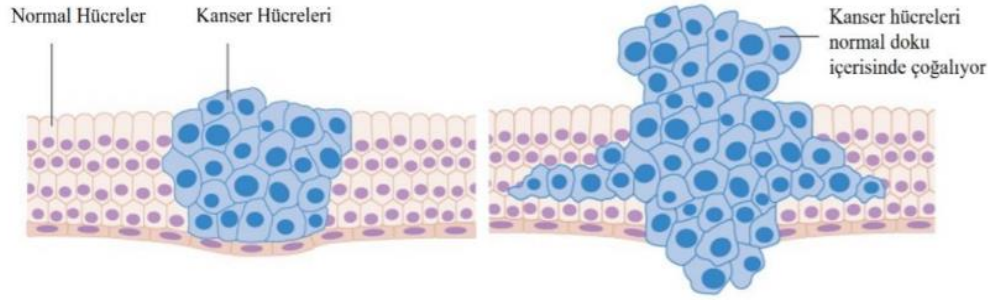
Şekil 1.3. VR1 Reseptörü. (AA, arakidonik asit; G, heterotrimerik G protein; GPCR, G protein-coupled reseptör; PL, fosfolipaz.) (Catherine ve ark. 2001)

1.2. Kanser

Kanser, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Akciğer, mide, kolorektal, karaciğer ve meme kanserleri, dünyanın en yaygın kanserleri olarak listenin başında yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye’de

sindirim sisteminde görülen kanser vakaları arasında mide ve kolon kanserlerinin ön sıralarda bulunduğu belirtilmektedir (TİK, 2016).

Kanserin başlangıç noktası hücredir. İnsan vücudu yüz milyondan fazla hücreye sahiptir. Herhangi bir hücre veya hücre grubunda meydana gelen değişiklikler kansere sebep olur (Şekil 1.4). Bu değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve bu bölünen hücreler yine kontrolsüz şekilde yayılmaya başlar. Kaynaklarına göre yapılan sınıflandırmada; lösemi ve lenfoma, kan doku; sarkoma, bağ ve kas dokulardan; karsinoma, epitel dokulardan orjin alır (Alberts ve ark., 2007).

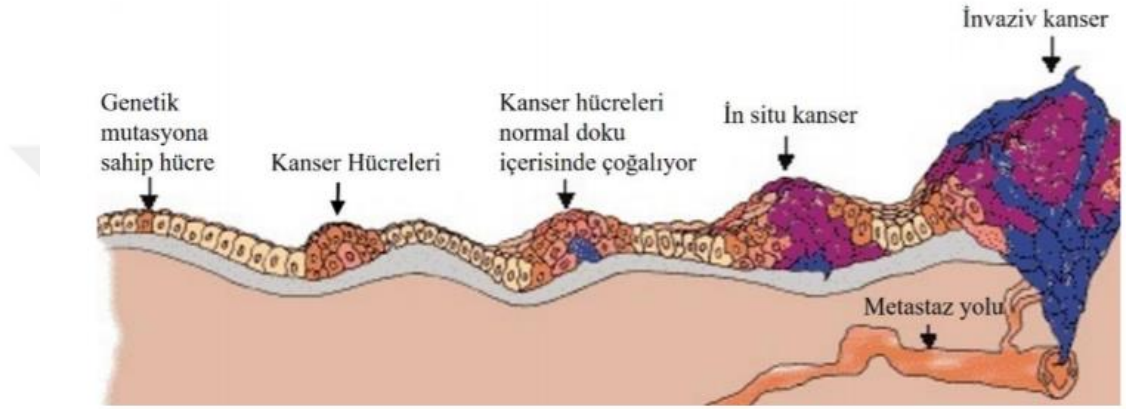


Şekil 1.4. Kanser hücrelerinin çoğalması (Alberts ve ark., 2007).

Kanserlerin oluşumunun pek çok aşaması vardır ve her adım kanserin gelişimini hızlandırmaktadır (Dilsiz, 2004). Kanser oluşumu ve gelişimi sürecinde gerçekleşen olaylar henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, bu süreçte bazı genlerde meydana gelen ve kanserli hücrelere büyüme ve gelişmelerine fırsat veren mutasyonların olması öncelikle düşünülmektedir (Lakritz ve ark., 2014; Lüleyap, 2008).

Normal hücrelerde hücre içi ve dışı ile iletişim kurmasında görevli sinyaller, hücrelerde sınırlı ve doğru bölünmeyi kontrol ederken, kanser hücrelerinde sınırsız ve yanlış bölünmelere sebep olmaktadır (Öner, 2003; Pogribny, 2010). Bu yanlış sinyallere DNA'da yer alan hücre bölünmesini düzenleyen genlerde meydana gelen değişiklikler sebep olur (Lüleyap, 2008). Sağlıklı hücrelerde bu genler, hücrelerin düzenli ve kontrollü bir şekilde çoğalmasını sağlarken, hücre bölünmesinde genlerde mutasyon adı verilen değişiklikler hücrelerin sınırsız bölünme yeteneği kazanmasına

sebepe olur. Genlerdeki mutasyonlar sadece sınırsız çoğalmaya değil, bir hücrenin bölünmesini tetikleyen proteinlerin çok fazla ya da hücrenin bölünmesini durdurabilen proteinlerin çok az üretilmesine de neden olabilir (Dilsiz, 2004). Beslenmelerini kolaylaştırabilmek için anjiyogeneze (damarlanmaya) sebep olabilir ve bunun sonucunda metastaz yaparak diğer dokulara dağılabilir ve bu dokularda çoğalmaya devam edebilme yeteneğine sahiptirler (Şekil 1.5) (Alberts ve ark., 2007).



Şekil.1.5. Mutasyon sonrası kanser hücrelerinin gelişimi (Alberts ve ark., 2007).

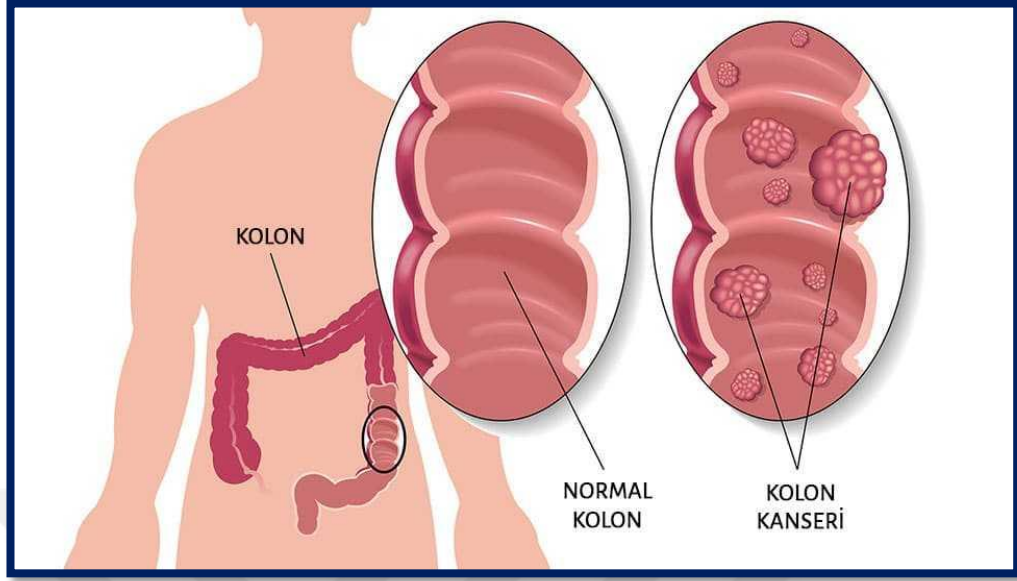
Sonuç olarak, çoğalan hücreler hem yapısal hem de fonksiyonel açıdan normal olmayan bir doku kitlesi oluşturur ve bu kitle tümör olarak adlandırılır. Tümörler bulundukları alanlarda sınırlı kalarak büyüme gösteriyorsa yani başka doku ve organlara dağılım göstermiyorlarsa iyi huylu (benign); büyüme gösteriyor ve metastaz yaparak vücudun diğer bölgelerine dağılıma gösteriyorsa kötü huylu (malign) tümörler olarak adlandırılmaktadır (Lüleyap, 2008).

1.2.1. Kolon Kanseri

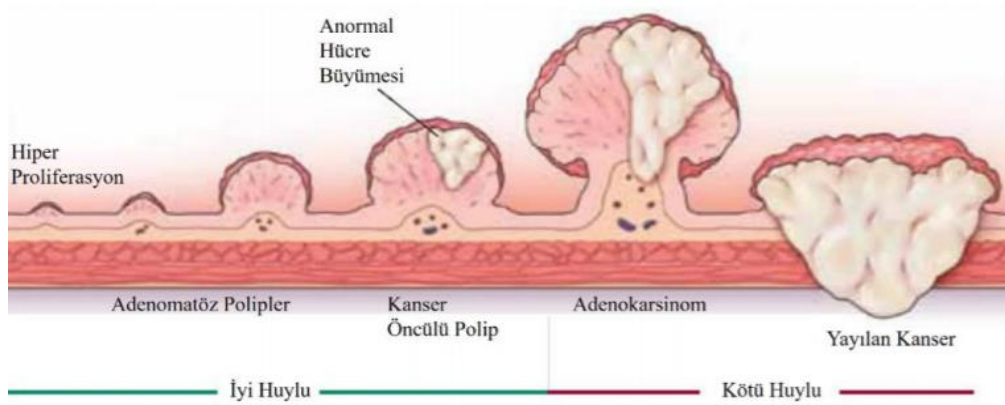
Kolorektal kanser, dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (WHO, 2002). Tüm kanser insidansının % 9'undan fazlasını oluşturur (Boyle ve ark., 2000; World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007). Dünya çapında üçüncü en yaygın kanser ve dördüncü en yaygın ölüm nedenidir

(World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007). 2002 yılından itibaren kaydedilen yaklaşık 1 milyon vakada kadın ve erkekleri eşit olarak etkilemektedir (Boyle ve ark., 2005; Ferlay ve ark., 2004; Parkin ve ark., 2006). İnsidans oranının en yüksek olduğu ülkeler arasında Avustralya, Yeni Zelanda, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'nın bazı bölgeleri bulunmaktadır. En düşük risk taşıyan ülkeler arasında Çin, Hindistan ve Afrika ile Güney Amerika'nın bazı bölgeleri bulunmaktadır (Boyle ve ark., 2000).

Kolon kanseri, sindirim kanalında yer alan kalın bağırsakta (kolon), rektal kanser ise kolonun son kısımlarını oluşturan rektumda gözlenir (Şekil 1.6), ikisi birlikte kolorektal kanser olarak adlandırılır (Ricchi ve ark., 2003). Pek çok kolon kanseri hastalarında, kanser adenomatöz polip ismi verilen kanserli olmayan küçük hücre toplulukları halinde başlar ve zaman geçtikçe bu poliplerden bazıları kolon kanserlerini şekillendirebilir. Kolon kanserleri vakalarının pek çoğu, kolon ve rektum duvarlarında yer alan benign poliplerin zamanla malign poliplere (Şekil 1.7) dönüşümüyle meydana gelir (Borinstein ve ark., 2010). Kanser ilk aşamalarında semptomlar tespit edilebilir değildir, ancak tarama yöntemleri ile tespit edilebilir. Sonraki aşamalarda karın ağrısı, iştahsızlık, kilo kaybı ve rektal kanamalarla devam edebilir. Tedavi hastalığın evresine bağlı olarak kanserli dokunun alınmasıyla yapılır; ancak ilerlemiş evrelerde operasyona ek olarak kemoterapi ve radyoterapi de uygulanabilir (Borinstein ve ark., 2010).



Şekil 1.6. Sindirim sisteminde kolonun pozisyonu (Öztürk, 2018).



Şekil 1.7. Kolon kanserinde poliplerin zamanla kansere dönüşümü (Polipgentr, 2018).

Kolon kanserinde prognoz aşırı önemli olduğundan farklı evreleme yöntemleri bulunmaktadır. En çok kullanılan sistemler Dukes tarafından açıklanan evreleme sistemi ve TNM sistemi (T: Tümör invazyonu, N: Lenf nodu tutulumu, M: Metastaz)'dir. Kolon kanseri, Dukes sınıflamasına göre A'dan D'ye doğru derecelendirilir. A seviyesinde, kolonik muskularis mukozadan submukozaya penetre olması ile B seviyesinde seroza içine musculus propia içine doğru uzanır. C

seviyesinde bölgesel lenf nodu metastazı oluşurken, D evresinde uzak bölgelere metastazlar izlenir.

Kolorektal kanser vakalarının da %90'ının sporadik, yaklaşık %10'unun genetik nedenli olduğu gözlenmiştir. Yapılan pek çok araştırma, kolon kanserinin bir dizi mekanizma ile meydana geldiğini ifade etmektedir. Bu mekanizmalar tümör baskılayıcı genlerdeki (APC, p53) mutasyonlar, onkogen aktiviteleri ve epigenetik değişim mekanizmaları (metilasyon, asetilasyon) olarak açıklanmaya çalışılmaktadır (Bogaert ve Prenen, 2014; Tuynman ve ark., 2004).

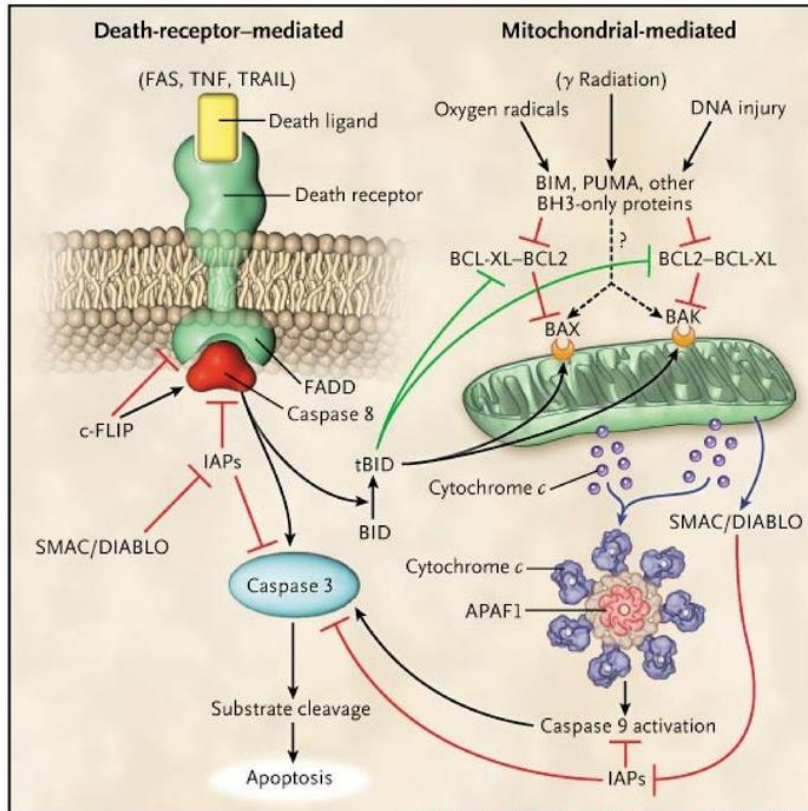
Kolon kanseri vakalarının görülme yoğunluğu yaşa göre değişim göstermekle beraber 65 yaş ve üstünde yoğunlaştığı gözlenmektedir (Guessous ve ark., 2010). Kolon kanserine yakalanma oranı yaşa bağlı artış göstermesiyle birlikte, yaşam tarzında düzensizlik ve yeme alışkanlıkları hastalığın gelişiminde etkilidir. Aşırı kilo, aşırı kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, alkol tüketimi, yüksek yağ veya düşük lifli diyet hastalığa yakalanma riskini artıran faktörlerdendir (Lakritz ve ark., 2014).

1.2.2. Kanserli Hücrede Apoptoz Süreci

Genetik olarak düzenlenen apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Lüleyap 2008; Renehan ve ark., 2001). Hücre döngüsü, bağışıklık sistemindeki sağlıklı gelişim ve işleyiş, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli aşamaların bileşenidir (Elmore, 2007). Apoptozdaki aksaklıklar birçok problemle birlikte kansere sebep olan faktörlerden biridir (Dilsiz, 2004). Hücrenin ölümü kontrol etme yeteneği, apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin büyük açıklanmış olsa da, anti-apoptik proteinlerin eylemsizliği veya eylemlerinin artmasının moleküler mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır (Elmore, 2007).

Apoptozun evreleri, kısaca başlatma, genetik düzenlenme ve efektör mekanizmaları olarak sıralanabilir (Lüleyap, 2008; Renehan ve ark., 2001).

Apoptozun başlatıcıları, antikarsinogen ilaçlar, ultraviyole ışınlar, interleukin-1 ve sitokinler gibi hayatta kalma faktörlerinin önlenmesini sağlayan sebepler olabilir. Genetik düzenlenme ve efektör mekanizmalarda ise Bcl-2 gen ailesiyle açıklanmaya çalışılmıştır (Renehan ve ark., 2001). Bu mekanizmalarda yer alan kaspazlar adı verilen (kaspaz-9, -8, -3, vd.) proteinler ise proteaz ailesi üyeleridir (Şekil 1.7) (Lüleyap 2008; Renehan ve ark., 2001). Bazı araştırmalar, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki ana apoptoz yolu olduğunu ifade etmektedir. Bunlardan ekstrinsik yolak ölüm reseptörü yolu ve intrinsik yolak ise mitokondriyal yolak olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte, iki yolağın birbirleriyle ilişkili olduğunu ve bir yolda bulunan moleküllerin diğer yoldaki molekülleri etkileyebileceği kanıtlanmıştır (Şekil 1.7) (Igney ve Krammer, 2002).



Şekil 1.8. Apoptoz yolları (Türkçapar, 2012).

1.3. Kanser Sağaltımı

Kanser tedavisinde başlıca kullanılan yöntemler arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi sayılabilir. Ayrıca hormonal tedavi ve biyoterapi de kullanılan yöntemler arasındadır.

1809 yılında, Ephraim McDowell yumurtalık tümörünü anestezi kullanmadan çıkarmasıyla, cerrahi kanser tedavisinde kullanılabilir ilk yöntem olmuştur. Yapılan ilk abdominal ameliyattan sonra, tümör kitlelerinin cerrahi yöntemler genel anlamda kullanılmaya başlamıştır (DeVita ve Rosenberg, 2012). Cerrahi lokalize primer tümörler ve ilişkili bölgesel lenfatik dokular için en etkili tedavi yöntemidir. Kanser cerrahisindeki kısıtlamalarında metastaz en önemli unsuru oluşturmuştur. Bunun sonucunda, vücudun diğer bölgelerine yayılmış olan hücrelerin yok edilebilmesi için sistemik tedaviler geliştirilmeye çalışılmıştır. 1920’lerde radyoterapi, 1940’lardan sonra da kemoterapi geliştirilmiştir (Urruticoechea ve ark., 2010).

Radyoterapi lokal ve metastatik tümörlerde hızlı etki sağlayan önemli bir tedavi yöntemini oluşturur (Urruticoechea ve ark., 2010). Radyoterapi çağı 1895’te Röntgen’in (DeVita ve Rosenberg, 2012; Roentgen, 1896) X-ışınlarını keşfetmesiyle başlamış ve 1898’de radyumun Pierre ve Marie Curie (DeVita ve Rosenberg, 2012) tarafından bulunmasıyla hızlanmıştır. Radyoterapinin cerrahi ve/veya kemoterapi ile birlikte kullanımı daha yaygın tedavi yöntemlerindendir. Operasyon öncesi radyoterapi günümüzde, rektal ve özofagus kanserleri gibi sınırlı tümör lokasyonlarında kullanılırken, operasyon sonrası radyoterapi meme, merkezi sinir sistemi tümörleri ve diğerlerini de içeren birçok tümör lokasyonunda sağaltım amaçlı kullanılmaktadır.

Kemoterapi, sınırsız çoğalma yeteneği olan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileriyle, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan, hala en önemli tedavi yöntemini oluşturur. 20. yüzyılın başında Paul Ehrlich’in çalışmaları sayesinde kanserin tedavisi için kimyasallar geliştirilmeye başlanmıştır.

Paul Ehrlich Avrupa 20. yüzyılda yaygın hastalık olan frenginin tedavisinde kullanılan ilk antibakteriyel ilacı (Salvarsan) bulmuş ve bağışıklık alanında yaptığı çalışmaların tanınmasıyla ödülünü almıştır (Bosch ve Rosich, 2008; Kaufmann, 2008). Yaklaşık yüz yıldır kanserin sistemik tedavisi için yaygın olarak sitotoksik kemoterapötikler kullanılmaktadır. Bu ilaçların birçoğu, hızla çoğalan hücreleri öldürmek ya da engellemek için dizayn edilmiş, DNA hasarına sebep olan maddelerdir (Urruticoechea ve ark., 2010).

Kapsaisinin karsinogenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda genotoksisite ve karsinogenez analizleri *in vitro* ve *in vivo* olarak farklı sonuçlar göstermektedir. 2000 yılından sonra yapılan çalışmalarda kapsaisinin antikarsinojen etkileri ve kapsaisinin saflığının bu etkiler açısından önemli olduğu gösterilmeye çalışılmıştır. Kapsaisinin önemli terapötik madde olarak sınıflanması, kanser hücre hatları ile fare modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar kapsaisinin kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etki göstermesi özellikle apoptozu indüklemesinden kaynaklanmaktadır. Ancak apoptozun hangi moleküler mekanizmalar üzerinden uyarıldığı net olarak bilinmemektedir. Bazı sonuçlar, kapsaisinlerin normal hücrelerden kanserli hücreleri ayırabildiğini gösteriyor olsa da bunun nasıl gerçekleştiği hala belli değildir. Potansiyel antikarsinojen ajan olarak farklı gruplarca araştırılan kapsaisinin ülkemizde Adana bölgesinde üretilen capsicum cinsi biberlerde de miktar yönünden benzerlik gösterebileceği ayrıca antikarsinojen etkileri açısından da kolon kanseri üzerine etkili olabileceği çalışmanın hipotezi olarak belirlendi. Bu sebeple bu tez çalışmasında öncelikle; Ülkemizde kırmızıbiberin yaygın olarak üretiminin yapıldığı Adana İlinden toplanan olan *C. annum* L. cinsi biberlere ve çekirdeklerine uygun ekstraksiyon yöntemi geliştirilerek ve HPLC sistemi ile içerdikleri kapsaisin miktarları belirlenmesi amaçlandı. Daha sonra biber, çekirdek ve ticari kapsasin Caco-2 hücre hattı üzerine uygulanıp konsantrasyon ve zamana bağlı, sitotoksik açıdan hücre canlılığına etkileri; ilaç uygulanmış hücrelerden elde edilen protein miktarlarına bağlı olarak hücrelere etki mekanizması araştırılması planlandı. Deney sonuçlarının anlamlılığına bağlı olarak da, kolon kanserine karşı sağaltım noktasında, kapsaisinin potansiyel anti kanser ajan olabilme özelliğine yeni bir bakış açısı getirilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışmaları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı In Vitro ve Toksikoloji Laboratuvarları'nda yürütüldü. Kimyasal ve sarf malzemeler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı imkanlarıyla sağlandı.

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1'de gösterildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Fetal Bovine Serum	Lonza	DE14-801F
Trypsin/ EDTA	Lonza	BE02-007E
DMEM hücre besiyeri	Lonza	BE12-169F
%1 Penisilin/streptomisin 10000units/ml	Lonza	DE17-602E
%1 Non-essential aminoasit(100X)	Lonza	BE13-114E
DMSO 5X	Sigma-Aldrich	D2650-5X10
L-glutamin	Invitrogen	25030081
Esansiyel olmayan amino asit (NEAA)	Invitrogen	11140076
PBS (Phosphate buffer saline, 7.4 pH, 1X)	Invitrogen	10010-031
MTT((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma	M5655
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	L238412
Western Blot cihazı	Bio-Rad	1658005EDU
Bradford method kiti	CALBIOCHEM	2740-1KIT
Etidiyum bromür	Fisher	BD102-1
Agaroz	Lonza	50002
Triton X-100	Fisher	BP151-500
Methanol (moleküler grade)	Sigma	82762-10ML-F

Etanol (moleküler grade)	JT Baker	8006.2500
Bovine Serum Albumin	CST-E product	9998S
Azot Gazı	Ildam	CRYO YDS-10
Benzen	Sigma	12540-50ML-F
Eter	Sigma	60-29-7
Kloroform	Sigma	25666-500ML
Ripa Buffer	Thermo Scientific	89900
Transfer Buffer	Bio-Rad	1610734
Washing Buffer	Bio-Rad	BUF031A
Loading Buffer	Thermo Scientific	NP0007
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad	1610700
Bax Protein	Thermo Scientific	A300-297A
Survivin Protein	Thermo Scientific	46-9176-42
Goat Serum	ThermoFisher	A-11001

2.1.2. Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.2’de verildi.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Serolojik steril pipetler, 1 ml	Sarstedt	86.1251.001
Serolojik steril pipetler, 5 ml	Sarstedt	86.1253.001
Serolojik steril pipetler, 10 ml	Sarstedt	86.1254.00
Steril tüpler, 15 ml	Sarstedt	62.554.502
Steril tüpler, 50 ml	Sarstedt	62.547.254
Flask T-25	Sarstedt	83.3910.002
Flask T-75	Sarstedt	83.1813.002
96 kuyucuklu plate	Sarstedt	83.1835
Cryo tüp 2 ml	Biosigma	N40.3683
Lam	Marienfeld	C100000
Lamel	Marienfeld	C911040
Neubaure hemositometre	Marienfeld	0630010
1000 µl pipet ucu	BIOHIT	791004
200 µl pipet ucu	FL	28052
10 µ filtreli pipet ucu	BIOHIT	790011F

0,2 S PAT enjektör filtre	Sarstedt	83.1826.001
0,45 S PAT enjektör filtre	Sarstedt	83.1826
1,5 ml mikrosantrifüj tüpü	Bioplastic	B74011
2 ml eppendorf tüp	Bioplastic	B71420
Watmann 2 Numaralı filter kağıdı	Sigma	WHA1002150
İnce Tabaka Kromatografi Plakası	Orlab	M105715.0001
HPLC Kolon	İntersil	ODS-3
Transfer Membran	Thermo Scientific	77012

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
HPLC	Thermo Scientific	AS3000 P4000 SN4000 UV2000
Dedektör (UV 100 vis)	Thermo Scientific	20768
Auto sampler	Thermo Scientific	UHPLC PN 60057-60020 - 9745
Laminar akımlı kabin	Holten	1.8
İnvert Mikroskop	Juli BR	JULI-BR04
CO ₂ inkubatör	Nüve	GP217745
Su arıtma cihazı (ultrasaf su)	Milliporex	Synergy 185
Su banyosu (ısıtmalı)	Nüvex	BM402
SpectraMax	Molecular Devices	İ3x
Dikey Elektroforez tankı	BioRad	Mini Trans Blot
Pipet 1000 µl	Gilson Pipetman	F123602
Pipet 100 µl	Gilson Pipetman	F144057P
Pipet 10 µ	Gilson Pipetman	F81022
Kırık buz makinesi	Frocchetti	AF-100
Santrifüj	Sigma	3K30
Vorteks	Biosan	Biovortex VI
UV jel görüntüleme	Kodak	Gel logic 200
Evaporatör	YUCHENGTECH	3L RE-301
Hassas terazi	SELES EHB	PFB.600-2M
Manyetik Karıştırıcı	IsoLab	61305001

2.2. Yöntem

2.2.1. Biber Örneklerinin Hazırlanması

Araştırmada, Adana İli Karaisalı İlçesi'nden 2018 yılı Kasım ayında Demre Sivrisi biberi toplandı. Toplanan biberlerin tanımlanması Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde, Demre Sivrisi (*Capsicum annum* L.) olarak yapıldı.

Alınan *C. annum* L. cinsi biberlerin çekirdekleri ayrılıp, ince ince doğranıp, 25 °C'lik etüvde kurumaya bırakıldı. Kurutulduktan sonra biberler ve çekirdekleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında bulunan değirmen de toz haline getirildi.



Şekil 2.1. Adana İli Karaisalı İlçesinden toplanan Demre Sivrisi (*Capsicum annum* L.).

2.2.2. Biber ve Çekirdeklerinden Kapsaisin Ekstraksiyonu

Toz halindeki biberden 1 gram tartılarak 15 ml falkon içerisinde her birinde 10 ml olacak şekilde asetonitril, metanol, etanol, kloroform, petrol eteri ve dimetilsülfoksit (DMSO) ekstraksiyon için çözücü olarak kullanıldı.

Çeşitli solventlerde çözdürülmüş örnekler 15 dakika ultrasonografik banyoda ekstrakte edildi. 50 °C’de manyetik karıştırıcıda 4 saat masere edildi. Ekstraksiyon sonucu örnekler 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Ekstrakt no:2 Watman kağıdı ve susuz sodyum sülfattan ve tekrar 0.45 S Pat enjektör filtreden geçirildi (Pankar ve ark., 1977).

2.2.3. İnce Tabaka Kromatografi (İTK) Yöntemiyle Uygun Çözücünün Belirlenmesi

İnce tabaka kromatografisi kapsaisinin saflaştırılması için geçmiş yıllarda çokça kullanılan bir metot olmuştur (Spanyár ve ark., 1969).

Kapsaisin standardı 5 µg/ml stoktan 2, 3, 4, 5, 6, 10 µl olacak şekilde bir plakaya uygulandı ve hareketli fazda yürütüldü. En uygun konsantrasyon bulunduktan sonra ekstraktlar slikajel 60 F254 İTK plakalarına her biri kapsaisin kontrolüyle eşit konsantrasyonda olacak şekilde yüklendi ve benzen:asetik asit (9:3) hareketli fazında yürütüldü (Soetarno ve ark., 1997). Kapsaisinin görünürlüğü artırarak için %0,35 Sülfanik asit : %0,35 Sodyum nitrit (1:1) ve 0,1 N Sodyum hidroksit solüsyonu içeren sprej uygulanıp mavi renk ayraç olarak kullanıldı.

2.2.4. HPLC Analiz Yöntemi ile Kapsaisin Miktarının Belirlenmesi

2.2.4.1. HPLC Şartlarının Belirlenmesi

Günümüzde, kapsaisinoidlerin analizi, spektrofotometrik, gaz kromatografik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) prosedürleri kullanılarak

gerçekleştirilmektedir. HPLC kullanan teknikler, bir örnekte bulunan kapsaikinoidlerin içeriğinin ve türünün doğru ve verimli bir analizini sağlar. Kapsaikinoid içeriğini belirlemek için en yaygın kullanılan HPLC prosedürü ASTA, 1985 kılavuzunda belirtilmektedir (Chanthai ve ark., 2012).

Çalışma kapsamında kullanılan kromatografik işlemler HPLC sistemi ile yapıldı ve Floresan detektör kullanıldı. Analiz şartları Çizelge 2.4'te belirtildiği şekilde optimize edildi.

Çizelge 2.4. HPLC-FL sistemi şartları.

HPLC şartları	
Kolon:	C18 5 µm, 4.6 150-mm (intersil ODS-3)
Hareketli Faz:	Metanol: Su (80:20)
Analiz süresi:	10 dk.
Akış Hızı:	0,6 mL/dk. (3000 psi)
Detektör:	280-338nm
Enjeksiyon hacmi:	10 µL

2.2.4.2. Yöntemin Validasyonu

Çalışmada doğruluk, yüzde geri kazanım hesaplanarak gösterildi. İçerisinde kapsaisin ve dihidrokapsaisin olmadığı bilinen numunelere ve 2 kör numuneye 6 farklı derişimde ekim yapılarak her bir derişimden 6 paralel çalışıldı ve cihaza uygulandı. Geri kazanım, standart çözeltileri ile çizilen kalibrasyon eğrileri yardımıyla hesaplandı. Hesaplama aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan Derişim}}{\text{Gerçek Derişim}} \times 100$$

Standart eğrinin belirlenmesi amacıyla kapsaisin standardı 1 mg hassas terazide tartılıp 1000 µl moleküler grade etanolde çözdürülerek 1000 ppm stok solüsyonu olacak şekilde çözdürüldü. Dilüsyonlar 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm,

5 ppm ve 1 ppm olarak hazırlandı ve HPLC sisteminde optimize edilen şartlarda uygulandı. Standart eğri hesaplamaları GraphPad Prism versiyon 6.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapıldı. Belirlenen derişimlerde doğrusallık elde edilerek çalışma aralığı ortaya konuldu.

2.2.4.3. Seçicilik ve Kesinlik

Kapsaisin standardı eklenerek hazırlanan pozitif örnekler ve içerisinde standart olmadığı önceden bilinen boş örnekler analize alındı. Sonuçta elde edilen kromatogramlar incelenerek boş örnekte kapsaisin standartları ile yakın alıkonma zamanında çıkan herhangi bir pik olmadığı görüldü. Çalışmanın kesinliği tekrarlanabilirlik hesabıyla ortaya konuldu. Yöntemin tekrarlanabilirlik çalışması için her bir analitten boş numuneye 3 farklı derişimde ekim yapılarak 6 paralel çalışıldı. Çalışma 3 farklı günde tekrarlanarak % Relatif standart sapma (RSD) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ RSD} = \text{Ortalama Standart Sapma} \setminus \text{Ortalama Değer} \times 100$$

2.2.4.4. Tayin Sınırı ve Ölçüm Sınırı

Bir analitik prosedürün ölçüm sınırı, örnekteki analitin nicel olarak tespit edilebildiği en düşük miktarı ifade etmektedir (ICH, 2005). Yöntemde belirtilen çalışma koşulları altında, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerlerinde belirlenen en küçük derişim olmalıdır (Shabir, 2003). Tayin ve ölçüm sınırı, aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{LOD: } (3.3 \times \sigma) / S$$

$$LOQ: (10 \times \sigma) / S$$

σ : Cevabın standart sapması (boş örneklerden alınan cevaplar)

S: Kalibrasyon eğrisi eğimi

2.2.5. Biber ve Çekirdek Ekstraktlarının Hücre Kültüründe Kullanılmak Üzere Hazırlanması

Metanolde ekstre edilmiş biber ve çekirdek örneklerinin 40 derecede, azot evaporatörde metanolü uçuruldu. Uygun dozları elde etmek için uygun hacimlerde hücre mediumları ile dilüe edildi.

2.2.6. Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.2.6.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Çalışma kapsamında, kolon adenokarsinoma hücrelerinde kapsaisin miktarı belirlenecek olan biber ve çekirdek ekstraktının farklı zaman dilimlerinde farklı konsantrasyonlarının apoptik etkilerini araştırmak ve etki mekanizmasını belirlemek üzere Ankara Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalından temin edilen ve pasaj sayısı 12 olan Caco-2 hattı (HTB37) kullanıldı. Hücreler temin edilen kriyotüpler içinde saklandıkları derin dondurucudan çıkarılarak 37 °C'deki steril su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve genel sterilizasyon kurallarına göre tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı kabine yerleştirildi. Hücreler hafifçe pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 non-essential aminoasit içeren DMEM kültür besiyerinin olduğu falkon tüplere toplandı. 5 dakika süreyle 1200 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj bittiğinde tüp tekrar alkolle silinerek laminar akımlı kabine yerleştirildi. Santrifüj sonrası üstte kalan medyum çekilip uygun şekilde atılımı sağlandı.

Falkon tüp içerisindeki hücreler, hücre üremesine uygun DMEM besi ortamı ile 75 cm²'lik hücre kültürü üretim kabına (flask) alındı ve 37 °C'deki %5 karbondioksit (CO₂) ortamındaki inkübatöre koyuldu. Dondurmayı takiben ilk kez çözölmüş olan hücrelerin besi yerleri ertesi gün değıştirilerek hücreler beslendi. Daha sonraki değıştirmeler ise hücrelerin gereksinimlerine bağı olarak 2-3 günde bir gerçekleştirildi.

2.2.6.2. Hücre Pasajlanması

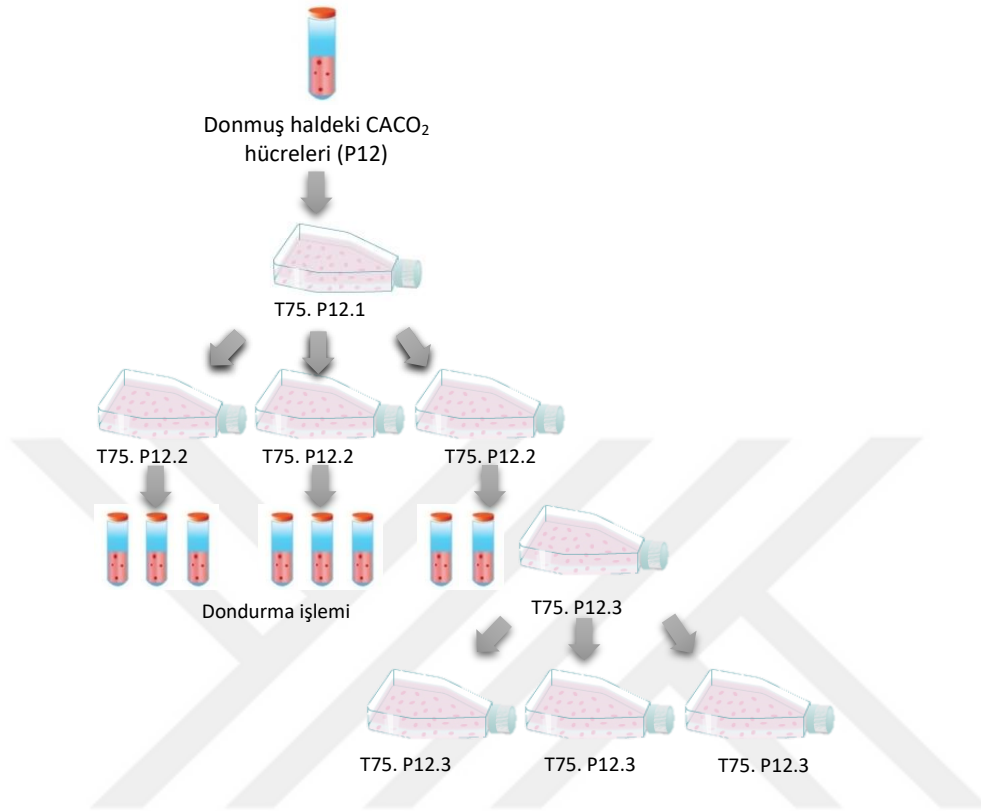
Caco-2 hücreleri araştırmalara başlamadan önce, kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler subkültüre edildi. Hücrelerin bir kısmı, %20 Fetal bovine serum ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) şeklinde hazırlanan dondurma kültür vasatında 1'er ml'lik vialler içerisinde dondurularak saklandı. Büyümeye devam eden diğere hücrelerin çoğalmaları ve bölünmeleri hücre kültürü mikroskobu (invert mikroskop) kullanılarak kontrol edildi. Flasklarda belli çoğunluğa ulaşan hücrelerin, Tripsin/EDTA kullanılarak üzerinde büyüdükleri yüzeyden kaldırılması amacıyla, flasklar önce alkolle silinerek laminar kabine koyuldu. Üzerindeki medyum atıldı ve yerine kültür ortamındaki hücre metabolizma yan ürünlerinin, serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla divalent katyonları (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzey yıkaması yapıldı. Bunun nedeni serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisinin inhibe edilmesidir. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve 3 ml tripsin EDTA solüsyonu eklendi ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 3 dakika inkübasyonu yapıldı. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendi. 75 cm²'lik flaskta 6-8 ml kadar besi yeri ilave edildi ve yerlerinden kalkmış hücreleri içeren karışım 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyum steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan peletin üzerine uygun miktarda medyum konularak pipetlendi ve 37 °C sıcaklıkta, %10 serum ve %1 antibiyotikli DMEM besi ortamı ile tek hücre halinde olacak şekilde pipetlenerek homojenizasyonu sağlandı. Hücre süspansiyonu 3 adet

T75 4wkültür kabına bölünerek hücre pasajlama işlemi tamamlandı ve bu şekilde 2 seri x pasaj yapıldı.

Hücreler gereksinimlerine göre 25, 75 cm²'lik flasklarda %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 non-essential aminoasit içeren DMEM kültür besiyeri üretilmiş ve kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler subkültüre edildi. Pasajlayabilmek için hücreler steril PBS ile yıkanarak Tripsine edilip, farklı pasajlara göre değişen 2-5 dakikalık tripsin inkubasyonundan sonra, yeni steril flasklara aktarıldı. Hücreler %5 CO₂, 37 °C'deki inkubatörde inkubasyona bırakıldı.

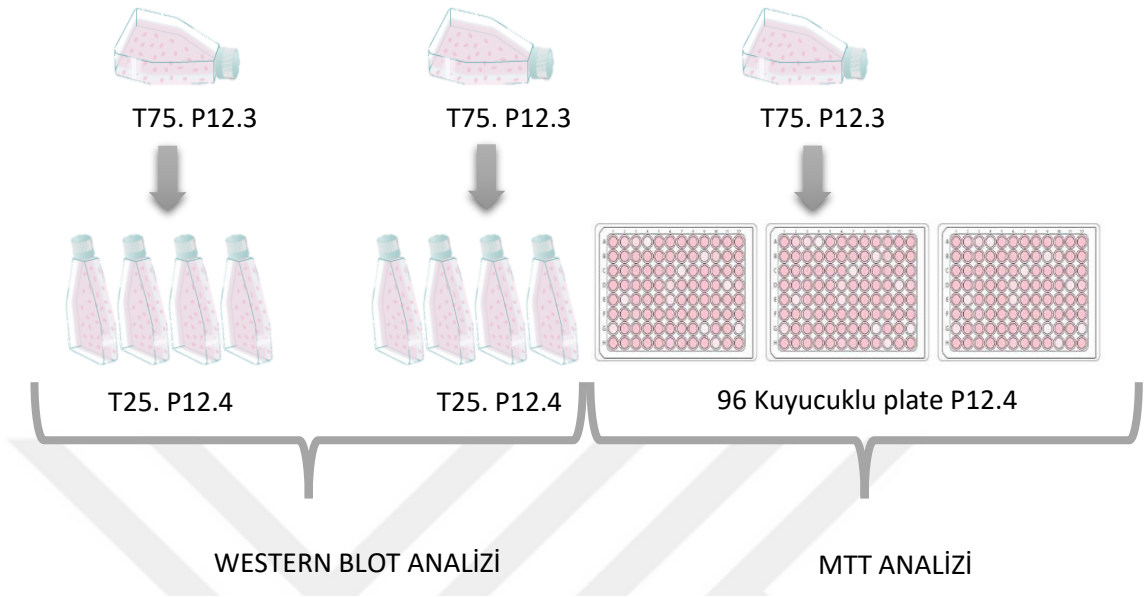
2.2.7. Hücrelere Kapsaisin, Biber ve Çekirdek Ekstraktlarının Uygulanması

Logaritmik üreme fazında olan, kültür kaplarında (T75, 75 cm²) aktif ve yüzeyi %80-90 oranında kaplamış hücreler, pasajlama işlemi olduğu gibi, kültür kabı yüzeyinden toplandı ve serumlu besiyeri ortamı ile süspansiyonu gerçekleştirildi. Platelere aktarılan hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla hemositometre lamı kullanıldı. Laminin üzerinin ince bir lamel ile kapatılmasından sonra steril ependorf içerisinde 10 µl örnek 200 µl besiyeri ile seyreltilip ve lamelin kenarına 10 µl yerleştirildi. Bu sonuç hücre sayısı X10⁴ olarak belirlendi ve millilitre süspansiyon başına hücre sayısını elde etmek için seyreltme faktörü olan 20 ile çarpıldı (Butler, 2004; Mather ve Roberts, 1998). Şekil 2.2'de hücre kültürünün hazırlanması gösterilmiştir.

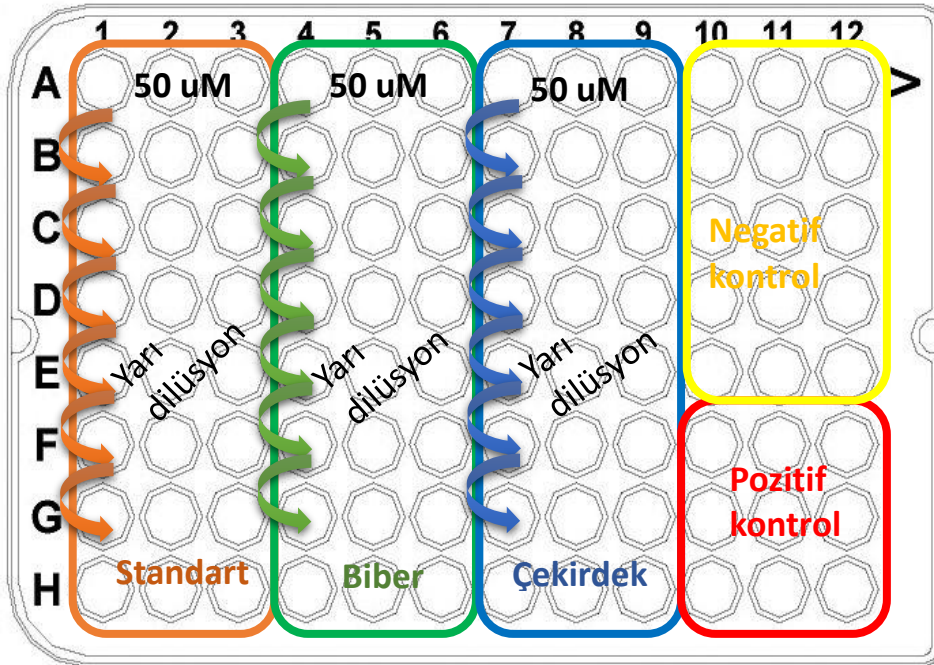


Şekil 2.2. Hücre kültürünün hazırlanması.

Hücreler %80 konfluent olduktan sonra her göze 6.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere ekildi. 24 saat sonra HPLC analizinde elde edilen sonunda kapsaisin miktarı belirlenen ve uygun koşullarda hazırlanan kapsaisin standardı biber ve çekirdek ekstraktları en yüksek doz 50 μM 'den başlayarak yarı dilüsyonlar halinde MTT analizi için, her platede 3 tekrar olmak üzere 3 plate de uygulandı. Western blot analizi için ise 50 μM ve 25 μM konstanrasyon dozlarındaki biber ve çekirdek ekstraktları T25 kültür kapları içinde hazırlandı. Kontrol grupları sadece hücre vasatı pozitif ve negatif kontrol olarak da Triton-X kültüre eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda, hücreler öncelikle morfolojik olarak incelendi, daha sonra MTT ve Western Blot yöntemleri ile analitik olarak değerlendirildi.



Şekil 2.3. Hücelere kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktlarının uygulaması için hücrelerin hazırlanması.



Şekil 2.4. MTT analizi için 96 kuyucuklu platte kapsaisin, biber ve çekirdek ekstratı dozlarının uygulanması.

2.2.8. MTT Deneyi

Kolorimetrik olan ve metabolizma redüktaz aktivitesi ile hücre canlılığının değerlendirilmesinin yapıldığı yöntemler arasında en yaygın kullanılanları tetrazolium ve resazurinden kaynaklanan absorbans düşüşünün değerlendirilmesidir. Tetrazolium tuzları ancak metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilirler (Butler, 2004). MTT ölçümü *in vitro* koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Br  nner, 1981).

Kapsaisin standardı, biber ve    irdek ekstresi uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri ayrıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve 10   l MTT   alışma solüsyonu eklendi. İki saatlik inkübasyondan sonra mikroskopik inceleme yapılacak ve takibinde 100   l %1'lik SDS ilave edildi. Işığa duyarlı bir yöntem oldu  ğundan çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirildi. Plateler, horizontal karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra (100 rpm, 10 dakika), optik dansiteleri mikropate okuyucuda 540 nm dalga boyunda okundu (Horakova ve ark., 2001; Mosmann, 1983).

2.2.8.1. Sitotoksite Değerlendirmesi

Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksite % olarak ifade edildi ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen pozitif kontrol grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ile %0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan negatif kontrol grubuna (Minimal Viabilite, Min V) göre aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı: (Ulukaya ve ark., 2008). IC50 değerlendirilmesi, klasik sigmoid-doz modellemesine göre ve istatistiksel analiz için tek yönlü- ANOVA testi ve Dunnett's multiple karışlaştırma testi seçilerek GraphPad Prism versiyon 6.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak gerçekleştirildi

$$\text{Sitotoksite (\%)} = [1 - (\text{test} - \text{MinV}) / (\text{MaxV} - \text{MinV})] \times 100.$$

2.2.9. Hücre Lizatlarının Oluşturulması

Analizlere başlamadan önce 75'lik flasklarda %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan Caco-2 hücrelerine optimum dozlarda kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktları ile 24 saat sürelerle muamele edildi. Ardından protein miktarlarını eşitlemek üzere deney gruplarından ayrı ayrı hücre lizatları hazırlandı. Deney gruplarından inkubatörde bulunan hücre flaskları alınarak laminar flowa konuldu. Lisis solusyonu eklemeyen önce, flaskların üzerindeki medium atılarak buz kaplarının içinde beklemeye alındı. Kullanıma hazır hale getirilen lisis çözeltisinden T75'lik kaplara 350 µl eklenerek 10 dk inkubasyonu sağlandı. Sonrasında işlemin buz içinde yapılmasına özen gösterilerek, tek yöne doğru kazıyıcı alet ile hücreler parçalanacak ve godelere alındı. +4 °C'de (soğutmalı) 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Köpük olmamasına dikkat edilerek supernatant kısmı başka ependorf tüplerine aktarıldı ve protein tayini için hazır hale getirildi.

2.2.10. Protein Miktar Tayini (660 nm Deneyi)

Protein miktarının belirlenmesinde, 96 kuyucuklu plaklara pozitif protein kontrol oluşturmak üzere farklı konsantrasyonlarda (2000 µg/ml; 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml) albumin proteini standart olarak konuldu. Herbir örnekten iki tekrarlı çalışılacak şekilde 10 µl kuyucuklara eklendi. Hazır ticari alınan Pierce protein assay solusyonundan (Thermo scientific) 150'şer µl ilave edildi. 37 °C'de minimum 10 dk inkubasyona bırakıldı. Görülen renk değişiminin ardından 660 nm'de spektrofotometrik okuyucuda değerlendirildi.

2.2.11. Western Blot Analizi

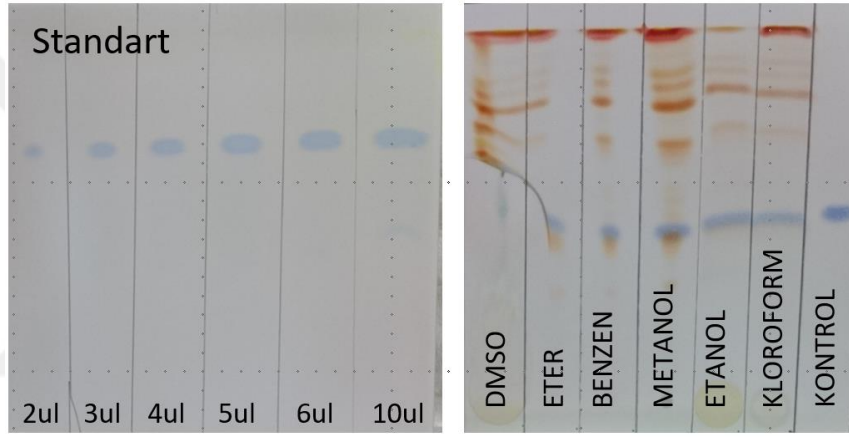
Bradford sonuçlarına göre kontrol ve deney grubundaki hücrelerin toplam hacim 15 ml olacak şekilde hesaplandı ve ripa bufferla protein miktarları eşitlendi. 100 mg APS tartılıp 1 ml steril suda çözündürülerek %10 SDS Poliakrilamid Jel hazırlandı ve 1

saat dikey elektroforez tankında donmaya bırakıldı. Bu sırada örnekler 95 °C de heating blokta 5 dakika bekletildi ve maksimum hızda santrifüj edildi. 900 µl Loading buffer ve 100 µl mercaptoethanol eklenerek yükleme solüsyonu hazırlandı ve her örnek ve kontrol 30 µl olacak şekilde jele yüklemesi yapıldı. 1X Running Buffer (Tris Glisin SDS Buffer) hazırlandı ve örnekler jel ve buffer içeren dikey elektroforez tankında 1,5 saat yürütüldü. Yürütme sonrası Westren Blot cihaz parçalarıyla jel ve transfer membranı bir araya getirildi ve cihaza yerleştirildi. Transfer aşaması için Transfer Buffer (Tris Glisin Metanol) hazırlandı ve cihaza yüklendi. 100 watt'a 2 saat membrana geçirilme işlemi tamamlandı. Membranlar washing buffer ile yıkandı. Bloklama işlemi için birincil antikor uygulaması için Goat serumla inkubasyon gerçekleştirildi. 24 saat sonra membran tekrar yıkandı ve ikincil proteinler (Bax, Survivin) karıştırıcıda 24 saat inkube ederek uygulandı. Nitroselüloz membranlar, Gel Logic 200 Görüntüleme Sistemi kullanılarak tarandı ve sinyal yoğunluğu, gruplar arasındaki ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak için Molecular Imaging Software kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. İnce Tabaka Kromatografi Sonuçları

Uygun kapsaisin miktarının belirlenmesi için yürütülen plakadan en uygun doz 0.02 µg/ml olarak belirlendi. Altı farklı çözücünün denendiği plakada ise en uygun çözücünün metanol olabileceği tespit edildi.



Şekil 3.1. Çeşitli çözücülerin denendiği ekstraktların plaka görüntüleri.

3.2. Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

3.2.1. Doğruluk (Accuracy) ve Kesinlik (Precision)

Çalışılan kapsaisin ve dihidrokapsaisin konsantrasyonlarında (biber ve çekirdek için 1, 10, 25, 50, 100 ppm) geri kazanım değerleri Çizelge 3.1'deki gibi hesaplandı.

Çizelge 3.1. Doğruluk ve kesinlik değerlendirmesine göre yöntemin performansı.

Matriks	Spike konsantrasyon (ppm)	Kapsaisin Geri kazanım (%)	Kapsaisin % Göreceli Standart Sapma (RSD)	Dihidro-kapsaisin Geri kazanım (%)	Dihidro-kapsaisin % Göreceli Standart Sapma (RSD)
Biber	1	71,76	4,25	80,74	1,54
	10	89,79	2,51	99,72	5,25
	25	97,26	0,17	90,66	2,22
	50	96,75	6,48	95,69	4,69
	100	91,79	2,16	90,80	0,42
Çekirdek	1	84,73	8,65	72,71	9,87
	10	71,20	7,29	65,97	17,90
	25	84,73	1,49	71,01	12,77
	50	91,82	13,47	83,25	13,94
	100	96,07	6,17	93,30	5,20

3.2.2. Duyarlılık (Sensitivity)

Kapsaisin için çalışılan dozlarda LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin LOD ve LOQ değerleri.

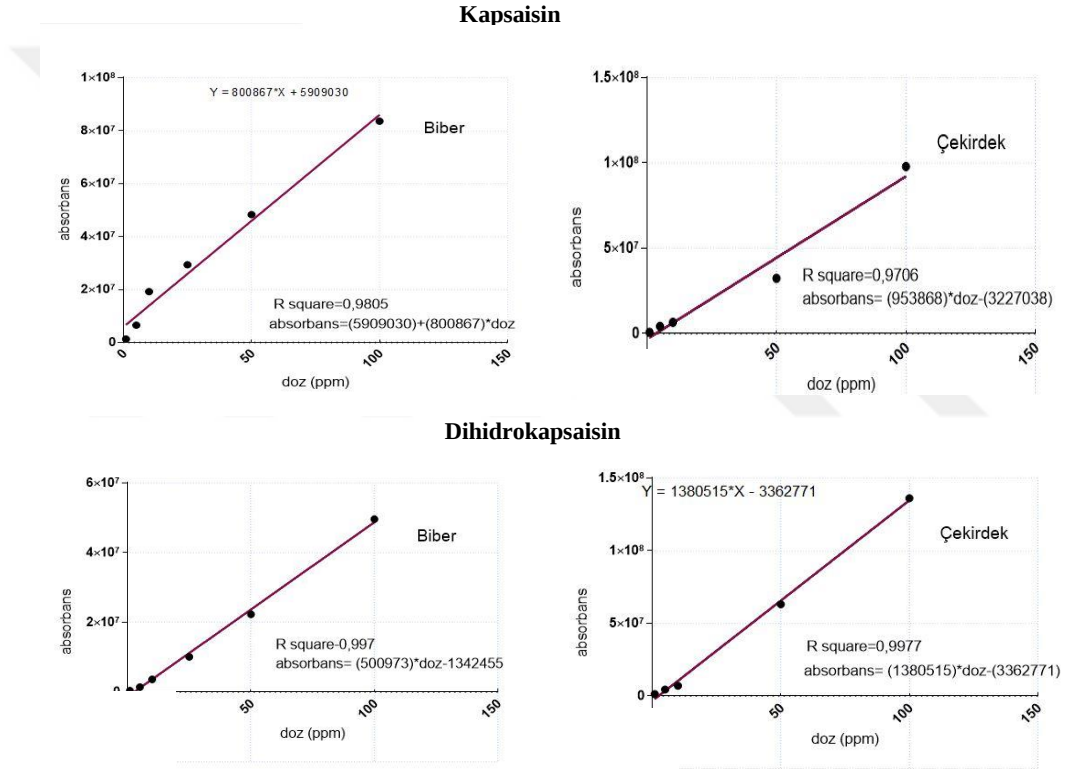
Matriks	Kapsaisin		Dihidro-kapsaisin	
	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Biber	2,93	9,67	1,94	5,90
Çekirdek	1,11	3,37	1,90	5,78

3.2.3. Doğrusallık (Linearity)

Biber ve çekirdek örneklerine ait regresyon eğrileri ve belirleme katsayılarına ait sonuçlar Çizelge 3.3 ve Şekil 3.1’de sunuldu.

Çizelge 3.3. Kalibrasyon eğrisi formülleri.

Matriks	Kapsaisin Lineer Eğri Formülü	r ²
Biber	$Y = 800867 \cdot X + 5909030$	0,9805
Çekirdek	$Y = 953868 \cdot X - 3227038$	0,9706
Matriks	Dihidro kapsaisin Lineer Eğri Formülü	r ²
Biber	$Y = 500973 \cdot X - 1342455$	0,9970
Çekirdek	$Y = 1380515 \cdot X - 3362771$	0,9977



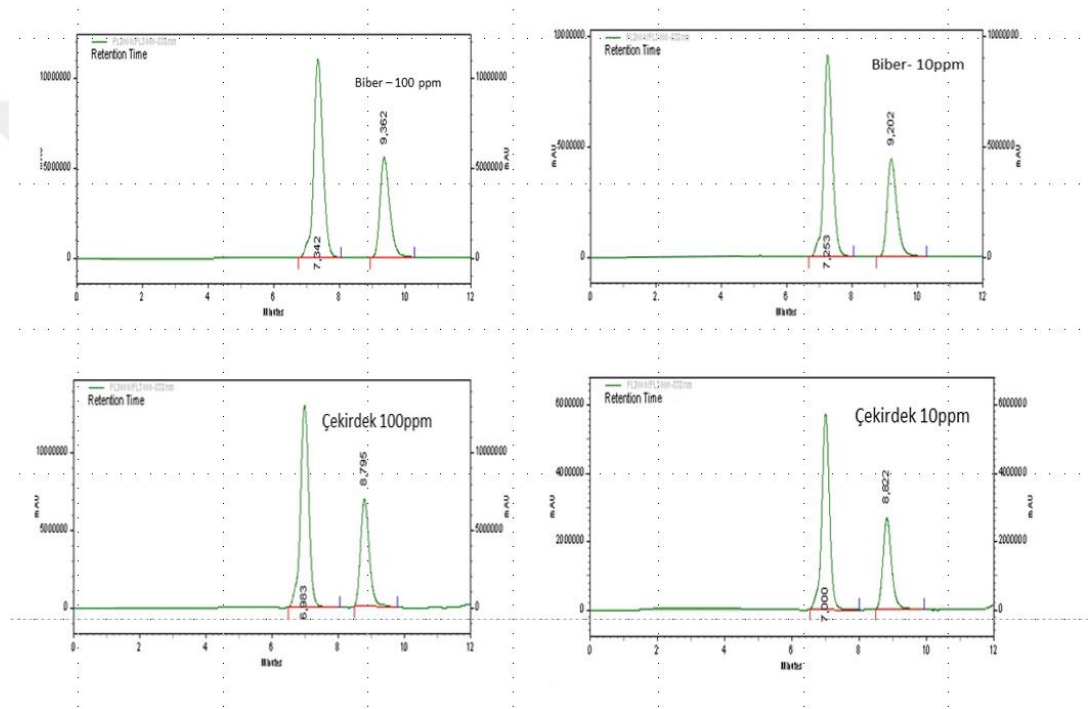
Şekil 3.2. Kapsaisin ve dihidrokapsaisinin kalibrasyon eğrileri.

3.2.4. Seçicilik (Selectivity)

Kapsaisin ve dihidrokapsaisin için alıkonulma zamanları akış hızı 0,6 ml/dk olan yüklü biber ve çekirdek numuneleri için Çizelge 3.4’de verildi. Yüklü numunelerin kromatogramları Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin analizleri alıkonulma zamanları.

Matriks	Kapsaisin Alıkonulma zamanı (dk)	Dihidrokapsaisin Alıkonulma zamanı (dk)
Kapsaisin	7.20 ± 0.22	9,21 ± 0.22
Biber	7.00 ± 0.26	8,88 ± 0.26
Çekirdek	7.34 ± 0.26	9,96 ± 0.26



Şekil 3.3. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin yüklü kromotogramları.

3.2.5. Metodun Hesaplama Formülü

Biber ve çekirdek örnekler homojen hale getirildikten sonra ekstraksiyon sonucu ayrılan kapsaisinler HPLC cihazında C18 kolonda ayrıldıktan sonra Floresans detektörle miktar tayini yapıldı. Bilgisayar yardımıyla kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra kapsaisin ve dihidrokapsaisin miktarları elde edilmiş oldu.

Ancak geri kazanım miktarının devreye girmesi nedeniyle aşağıdaki formüle göre kapsaisin ve dihidrokapsaisin gerçek miktarları Çizelge 3.5’de verilmiştir. Sonuçlar Student-t testine göre kapsaisin ve dihidrokapsaisin arası farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamış, ancak biber ve çekirdek arasındaki karşılaştırmaya göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

$$\text{Kapsaisin (ppm), (mg/ kg)} = ((A \times 100) / R) \times DF$$

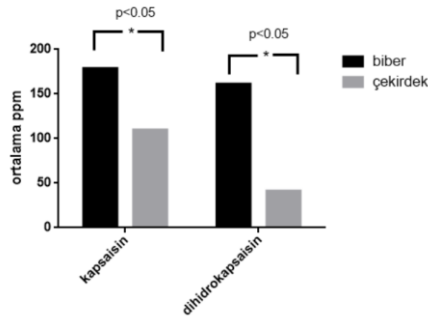
A = Örneklerden elde edilen kapsaisin, dihidrokapsaisin miktarı

R = Geri alım (geri kazanım) değeri (r)

DF= Dilüsyon faktörü

Çizelge 3.5. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin miktar sonuçları (ppm).

ppm(ortalama)	Kapsaisin	Dihidro-kapsaisin
Biber	178.788 ± 6.709	161.452 ± 3.493
Çekirdek	109.906 ± 3.586	41.193 ± 2.469

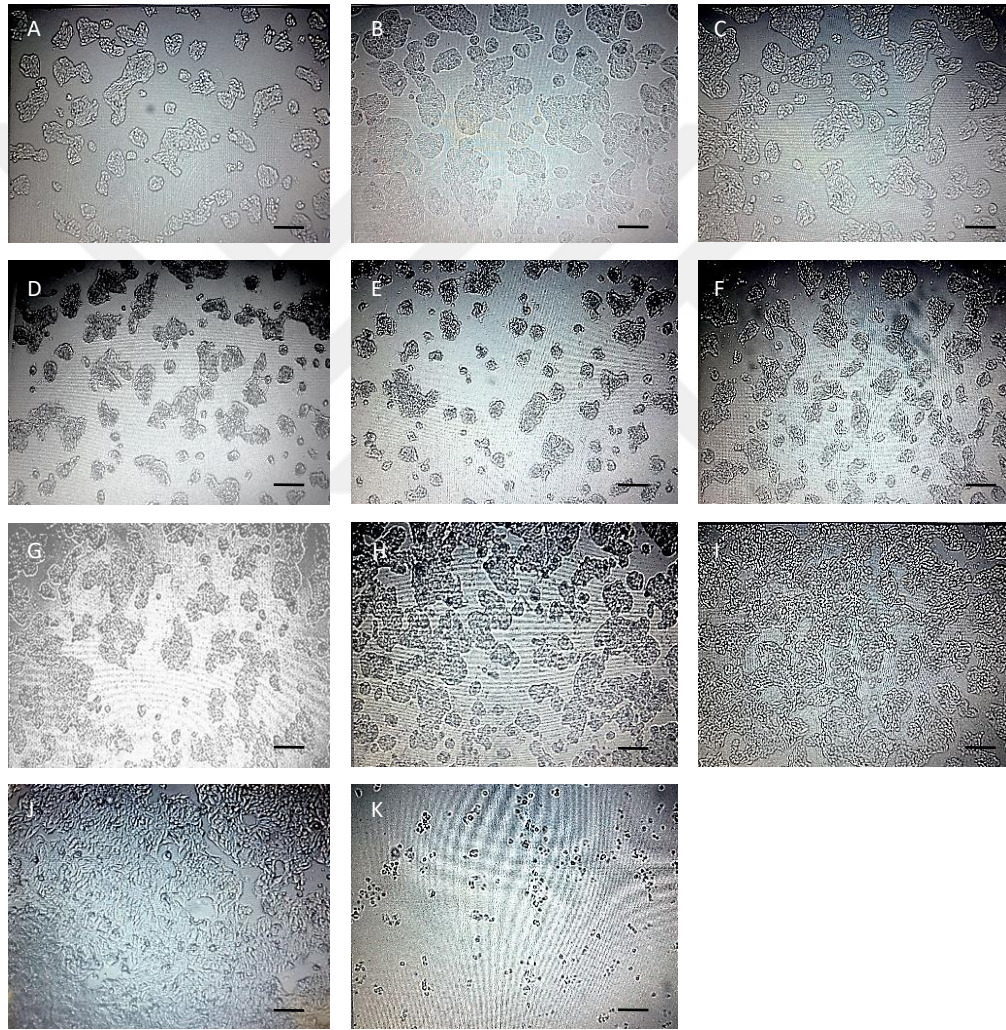


Şekil 3.4. Biber ve çekirdekte kapsaisin ve dihidrokapsaisin istatistiksel karşılaştırması.

3.3. Caco-2 Hücrelerinin Morfolojik İncelemesi

Caco-2 Kolon Andenokarsinoma hücrelerinin saf kapsaisin, içerisindeki kapsaisin miktarı belirlenmiş ve hücreler için uygun olan vasatta çözündürülmüş olan biber ve çekirdek ekstraktlarıyla farklı konsantrasyonlarda 24 saatlik inkubasyon sonrasında invert mikroskopta morfolojik inceleme yapıldı. Yapılan incelemede her

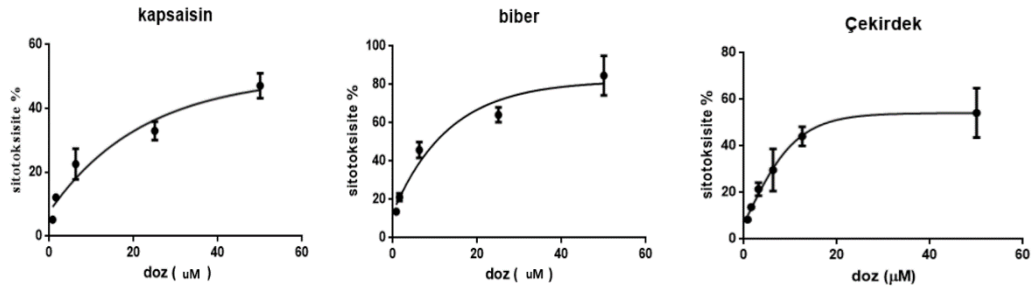
üç grupta da en yüksek doz olan 50 μ M da hücrelerin canlılık oranı %50 civarında olduğu gözlemlendi. Pozitif kontrol grubuyla (sadece hücre vasatı uygulaması yapılan hücreler) yapılan karşılaştırmada 12,5 μ M dozun altında gözle ayırt edilebilecek bir değişiklik gözlenmedi. Gruplar arası karşılaştırmada, en etkili grubun tüm dozlarda biber ekstraktı olduğu, en az etkili grubun ise biber ekstraktı olduğu belirlendi. Şekil 3.4'te gruplar arası morfolojik farklılıklar ortaya konuldu.



Şekil 3.5. Caco-2 hücreleri kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktı uygulaması sonrası gruplar arası morfolojik farklılıklar (Resim A, B, C saf kapsaisin uygulaması; D, E, F biber ekstraktı uygulaması; G, H, I çekirdek ekstraktı uygulaması; J sadece hücre besiyeri uygulanan pozitif kontrol grubunu; K ise TritonX uygulaması yapılan negatif kontrol grubunu göstermektedir. Ayrıca resim A, G, D 50 μ M; B, E, H 25 μ M ve C, F, I 12 μ M dozları ifade etmektedir (Scale Bar = 50 μ m).

3.4. MTT Canlılık Testi Sonuçları

Tüm deneylerde kullanılan 50 μM 'dan başlayarak yarım dilüsyonlar halinde uygulanan kapsaisin, biber ve çekirdek ekstraktları ile 24 saat inkübe edilen Caco-2 hücrelerinin canlılık değişimi MTT canlılık testi ile tayin edildi. 0 μM kapsaisin (kontrol) örneğin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer örneklerle ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. Hücre lizatlarında % canlılık oranları artan kapsaisin konsantrasyonlarına göre belirgin azalma gösterdi. Araştırmada kullanılan grupların tümünde artan doz ile alınan yüzde sitotoksosite cevapları arasında pozitif bir ilişki gözlemlendi (Şekil 3.5). Graph Pad® Prism 6.0 programı kullanılarak yapılan doz ve yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi analizine göre en yüksek belirtme katsayısı (R^2) değerlendirmeye alınarak IC_{50} hesaplanmasında kullanılan olan eğrinin formülüyle IC_{50} değerleri belirlendi (Çizelge 3.6). Hesaplanan IC_{50} değerlerine göre en yüksek biber, en az kapsaisin bulundu. Oneway Anova ve Dunnett's multiple karşılaştırma testlerine göre kapsaisinin biberle ve kapsaisinin çekirdekle olan karşılaştırması anlamlı ($p < 0,05$) ancak biberin ve çekirdekle olan karşılaştırması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



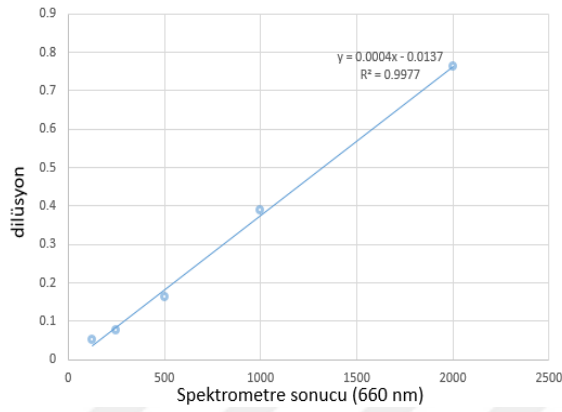
Şekil 3.6. Artan doz ile alınan yüzde sitotoksosite cevapları arasında pozitif bir ilişki.

Çizelge 3.6. IC_{50} değerleri

Gruplar	IC_{50} (uM)
kapsaisin	104.23
biber ekstraktı kapsaisin	24.84
çekirdek ekstraktı kapsaisin	26.06

3.5. Protein Miktarının Belirlenmesi (660nm Deneyi)

Western Blot için protein miktarının eşitlenmesi amacıyla yapılan testte öncelikle albumin ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi belirlendi (Şekil 3.6). Kalibrasyon eğrisinde bulunan formüle göre bütün örneklerin protein miktarları eşitlendi (Çizelge 3.7).



Şekil 3.7. Protein Kalibrasyon eğrisi.

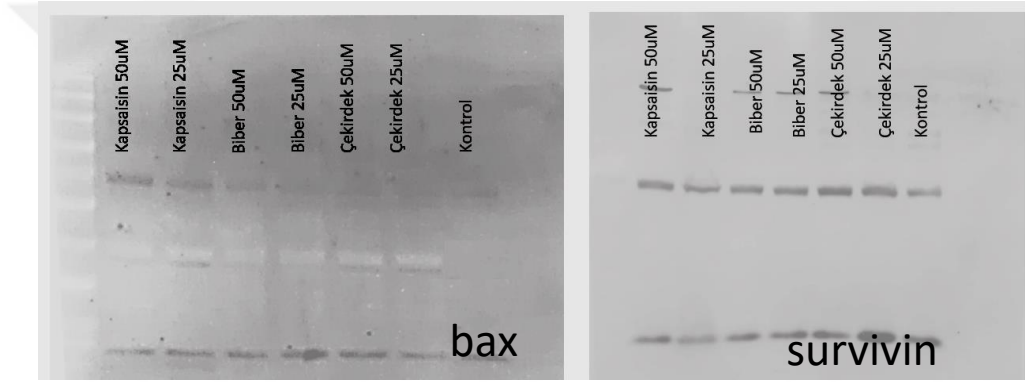
Çizelge 3.7. Örneklerin protein miktarlarının hesaplanması.

Örnekler	Okuma 1 (abs)	Okuma 2 (abs)	Ortalama (abs)	Sonuç (mg/ml)
Kapsaisin 50 µM	2,154	2,08	2,0315	5,0445
Kapsaisin 25 µM	2,284	2,28	2,199	5,46325
Biber 50 µM	1,775	1,78	1,6915	4,1945
Biber 25 µM	2,04	2,10	1,987	4,93325
Çekirdek 50 µ	1,937	1,98	1,871	4,64325
Çekirdek 25 µM	2,296	2,30	2,211	5,49325
Kontrol	2,233	2,25	2,157	5,35825

3.6. Kapsaisinin Apoptozis Üzerine Etkileri

Apoptozisi indükleyen (Bax, Bad, Bid, Bcl-2) ve inhibe eden (Bcl-2, Bcl-1) formları bulunan Bcl ailesi, kendi aralarında homo veya heterodimerler oluşturarak

hücrenin apoptotik durumu hakkında bilgi veren geniş bir ailedir. Survivin proteini ise kaspaz aktivasyonunu inhibe eder, böylece apoptoz veya programlanmış hücre ölümünün negatif regülasyonuna yol açar. Caco-2 hücrelerine uygulanan 50 ve 25 μ M dozlarında kapsaisin, biber çekirdek extractlarında bax ve survivin proteinleri karşılaştırıldı (Şekil 3.7.). Bu karşılaştırmada her grupta bax proteini pozitif reaksiyon vermişken, survivin proteininde hiç pozitif sonuç gözlenmedi. Ancak bax proteininde de dozlar ve gruplar arasında bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 3.8. Bax ve survivin proteinlerinin Western Blot sonucu.

4. TARTIŞMA

Acı biberin içerisindeki kapsaisinoidlerin belirlenmesine yönelik ilgi, topikal kremler, savunma silahları ve aerosol savunma spreylерinde ve alternatif tedavi yöntemleri gibi birçok alanda kullanılabilir olmalarından dolayı artmaktadır. Kapsaisinin, karotenoidler ve yağlar gibi engelleyici maddelerden ayrılmasını ve saptanmasını sağlayan ayrılma yöntemleri arasında ince tabaka kromatografi (Monforte ve ark., 2007) spektrofotometri (Bajaj, 1980; Ramos, 1979; Rymal ve ark., 1984), gaz kromatografisi (Krajewska ve Powers, 1987) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi analitik uygulamalar yer almaktadır (ASTA, 1985; Attuquayefio ve Buckle, 1987; Cooper ve ark., 1991; Hoffmanet ve ark., 1983; Law, 1983; Saria ve ark., 1981; Woodbury, 1980). HPLC teknikleri, bir biber örneğinde bulunan kapsaisinoidlerin içeriğinin ve türünün doğru bir şekilde analizini sağlar. Bu amaçla en yaygın kullanılan HPLC prosedürü ASTA metodu olarak ifade edilebilir. Bu yöntem bir biber numunesinin kurutulmasını ve öğütülmesini, ardından sodyum asetat ve % 95 etanol ile kapsaisinoidlerin ekstraksiyonunu ve numune ekstraktının HPLC cihazına yüklenilmesini içerir ve sonuç olarak kapsaisin ve dihidrokapsaisine karşılık gelen iki tepe gözlenir (ASTA, 1985). Bununla birlikte, özü içinde kalan birbirleriyle yakından ilişkili olan kapsaisinlerin her birinin tanımlanması için bu yöntemin bugün için hala geliştirilmesi gerekir.

Biber gibi karmaşık yapıdaki matrikslerde içeriğin analiz edilmesinde en önemli basamaklardan birisi özütleme (ekstraksiyon) aşamasıdır. Bilindiği gibi katı-sıvı özütleme birçok analitik yöntemde öngörülen çok yönlü örnek hazırlama tekniğidir. Kullanımının yaygın olmasına rağmen zaman alıcı, sıkıcı ve çok kademeli bir işlem olarak görülmektedir (Psillakis ve ark., 2003). Çünkü çok sayıda numune için fazla miktarda zehirli ve pahalı organik solvent kullanılmasına ve böylece çevre kirliliğine neden olduğu ifade edilmiştir (Pena-Pereira ve ark., 2009). Daha önceki yapılan çalışmalarda bildirildiği analiz metoduna uygun ve kapsamlı bir temizlik aşamasına sahip olmalıdır (Attuquayefio ve Buckle, 1987).

Kapsaisinoidlerin acı biberden ekstraksiyonu için, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Buck ve ark., 1986; Karnka ve ark., 2002), enzimatik ekstraksiyon (Sasamura ve ark., 1999), süperkritik sıvı ekstraksiyonu (Karnka ve ark., 2002), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Perucka ve ark., 2000), manyetik karıştırma ekstraksiyon (Karnka ve ark., 2002), katı-faz mikro-ekstraksiyon (Buck ve ark., 1986), mikrodalga-destekli ekstraksiyon (Jarret ve ark., 2003), Soxhlet ekstraksiyonu (Tucker, 2001) ve ultrasonik destekli ekstraksiyon (Pruthi, 2003) dahil birçok teknik kullanılmıştır. Bu yöntemlerin içinde en çok kullanılan ve çalışma kapsamında da yararlanılan, filtre kağıtlarıyla temizleme işlemi olmuştur.

Kurian ve Starks (2002) yaptıkları çalışmada soğuk olarak saklanan yaş biberlerden kapsaisin ekstraksiyonunu metanolla çözündürüp whatmann 1 nolu kağıt gerçekleştirmişlerdir. Collins ve ark. (1995), yaptığı çalışmada ise biberler tüm halde çekirdekleri ile birlikte kurutulup değirmende öğütüldükten sonra, metanol ve asetonitril kullanılarak ve 0.45µm filtereden geçirilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada (Thapan ve ark., 2018) ise biber ve çekirdekindeki kapsaisin miktarlarının farklı olabileceği göz önünde bulundurularak biber ve çekirdek birbirinden ayrılarak kurutulmuştur. Ekstraksiyon ise moleküler grade metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Chantai ve ark. (2012), yüksek sıcaklık ve basınçta organik çözücüler kullanılarak yaygın şekilde kullanılan modern tekniklerden biri olan hızlandırılmış solvent ekstraksiyonundan (ASE) yararlanmışlar ve çalışmalarında etanol, metanol ve asetonitrilden oluşan solvent sistemini kullanmışlardır. Başka çalışmalarda ise diklorometan ve kloroform gibi çeşitli solvenlerin içinden metanol yaygın olarak kullanılmıştır.

Çeşitli organik çözücüler kullanılarak yapılan ekstraksiyondan sonra kapsaisinoidlerin analizi için genellikle HPLC tercih edilmektedir. Çünkü diğer tekniklere göre HPLC, yüksek verimlilik, kısa analiz süresi ve düşük numune tüketimi

gibi avantajlar sağlar. HPLC için seçilen koşullar çalışmalar arası farklılık gösterse de analizin en önemli basamağını oluşturur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. HPLC için seçilen koşullar çalışmalar arası farklılıklar.

Kolon	Mobil Faz	Akış hızı	Detektör	Toplam Zaman	Kaynak
C18 3 µm, 4,6 mm i.d. × 100 mm L	%60 metanol, %20 su ve %20 asetonitril	1,9 ml/dk ⁻¹	Spektrofotometre detektör (280 nm)	20 dk	Kurian ve Starks 2002
C-18 3 µm, 5 mm i.d. × 100 mm L	70% solvent B (100% methanol) and 30% solvent A (10% metanol:su) gradient	1 ml/dk ⁻¹	UV absorbance detektör (280 nm), fluoresan detektör (Ekstaksiyon 280 nm ve emisyon 338 nm)	7 dk	Collins ve ark. 1995
RP18 Fluofix 4,6 mm i.d x 150 mm L	%0.1 Fosforik asit: asetonitril (3:2)	0,8 ml/dk ⁻¹	UV spektrofotometre detektör (281 nm)	25 dk	Thapan ve ark., 2018
C18 3 µm, 4,6 mm i.d. × 100 mm L	%60 Metanol %40 Su	0,9 ml/dk ⁻¹	Fluoresan detektör (Ekstaksiyon 278 nm ve emisyon 310 nm)		Chantai ve ark., 2012
T3 3 µm, 4,6 mm i.d. x 100 mm L	Metanol:Su gradient (3:4'ten 4:3'e)	1,50 ml/dk ⁻¹	UV/Vis detektör	15 dk	Waite ve Waters, 2008
C18 3 µm, 4,6 mm i.d. x 100 mm L	%80 Metanol %20 Su	1 ml/dk ⁻¹	PDA detektör (Ekstaksiyon 222 nm)	4 dk	Man Ng ve ark., 2015
C18 5 µm, 4,6 mm i.d. x 150 mm L	45% CH ₃ CN içinde 0.3% phosphate, pH 4.0)	1,50 ml/dk ⁻¹	Fluoresan detektör (Ekstaksiyon 280 nm ve emisyon 325 nm)	12 dk	Chiang ve ark. 1986

Farklı ülkelerde yapılan araştırmalarda, farklı tür biberlerin içerik analizlerinde biberin türüne göre kapsaisin ve dihidrokapsaisin miktarlarının farklılık gösterdiği

ifade edilmiştir (Çizelge 4.2) (Waite ve Waters, 2008). Bu sonuçlar çalışma kapsamında elde edilen verilerle de uyumluluk göstermiştir.

Çizelge 4.2. Biberin türüne göre kapsaisin miktarları.

Lokal isim	Latince isim	Kapsaisin	Dihidro-kapsaisin	Kaynak
Kırmızı acı biber	<i>C. annum</i>	0,228 mg/mL	0,122 mg/mL	Waite ve Waters, 2008
Jalapeno biberi	<i>C. annum</i>	0,069 mg/mL	0,037 mg/mL	Waite ve Waters, 2008
Habanero biberi	<i>C. chinense</i>	0,479 mg/mL	0,067 mg/mL	Waite ve Waters, 2008
Cayenne biberi		0,046 mg/mL	0,030 mg/mL	Waite ve Waters, 2008
Pasilla biberi	<i>C. annum</i>	0,195 mg/mL	0,144 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Cascabel biberi	<i>C. annum</i>	0,088 mg/mL	0,042 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Cubarella biberi	<i>C. annum</i>	0,834 mg/mL	0,291 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Jalapeno biberi	<i>C. annum</i>	0,1307 mg/mL	0,595 mg/mL	Collins ve ark., 1995
New Mexican biberi	<i>C. annum</i>	0,39 mg/mL	0,042 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Sarı Mantar biberi	<i>C. annum</i>	1,196 mg/mL	0,627 mg/mL	Collins ve ark., 1995
	<i>C. baccatum</i>	0,558 mg/mL	0,352 mg/mL	Collins ve ark., 1995
	<i>C. cardenasii</i>	0,984 mg/mL	0,934 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Habanero biberi	<i>C. chinense</i>	10,951 mg/mL	3,002 mg/mL	Collins ve ark., 1995
	<i>C. pubescens</i>	0,401 mg/mL	0,487 mg/mL	Collins ve ark., 1995
Lwang Khursani	<i>C. annum</i>	10 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Marchai	<i>C. annum</i>	3 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Jire Khursani	<i>C. annum</i>	9 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Suryamukhi	<i>C. annum</i>	5 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Dalle Khursani	<i>C. frutescens</i>	11 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Khursani	<i>C. annum</i>	4 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Chili	<i>C. annum</i>	5 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Nepali	<i>C. annum</i>	0,63 mg/g		Thapa ve ark., 2018
Cayenne	<i>C. annum</i>	1030 ug/g	771 ug/g	Man Ng ve ark., 2015
Jalapeno	<i>C. annum</i>	694 ug/g	428 ug/g	Man Ng ve ark., 2015

Besinlerin içerdiği etken maddeler, kanseri önlemek ve/veya tedavi etmek için hali hazırda var olan ilaçlara alternatif olarak görülmektedir (Zhang ve ark., 2008). *Capsicum* spp. (biber) bitkilerinin özgün olarak ürettiği ikincil bir metabolit olan kapsaisin, bu çeşitten bir etken maddedir ve farklı kanser türleri üzerinde iyileştirici etkisi olduğu ifade edilmiştir (Chow ve ark., 2007).

Kanser hücrelerini tanımlayan altı özellik; büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, doku invazyonu ve metastaz yapabilmedir (Olah, 2005). Kanserli hücrelerin yapısında çoğunlukla apoptoz baskılanmaktadır. Bunun sonucu olarak tümör dokusu sürekli büyüme eğilimi gösterir (Christmann ve ark., 2006).

Mori ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada kapsaisinin prostat kanser hücrelerinde apoptozu inhibe ettiğini belirtilmişlerdir. Bu çalışmaya göre; kapsaisin ile muamele edilen kanser hücreleri, hücre döngüsünün G1/S ya da G0 evresinde sabitlemektedir. Bu özel bir kontrol noktasıdır ve genetik anormallikler taşıyan hücreler burada tutularak bölünmenin gerçekleşmesi önlenir. Döngünün bu basamağında uzun süre hapsedilen hücre, sırasında programlanmış hücre ölümü olan apoptozu sağlar. Kapsaisinin bu tutulma sayesinde birçok kanser hücresinin bölünmesini engellediği ve hücreleri apoptozu yönlendirdiği tespit edilmiştir (Vermeulen ve ark., 2003).

Kapsaisinin bazı kanser hücrelerini önce hücre döngüsünün belirli bir basamağında tuttuğu bunu takiben de apoptozu yönlendirdiği farklı çalışmalarla da gösterilmiştir (Huang ve ark., 2009). Ancak, hücreleri yaşam döngüsünün belirli basamağında sabitlediği bilinen kimyasalların öncül uygulamasına bağlı olarak kapsaisinin etki gücünün ve özgüllüğünün nasıl değiştiğine ilişkin araştırmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Cömertpay ve ark. (2019), yaptığı çalışmaya göre, kapsaisinin normal besiyeri koşullarında ölümsüzleştirilmiş ve kanserli mezotelyum hücreleri üzerine etkisi belirgin bir farklılık göstermemektedir. Bu bulgular, kapsaisin uygulamasının seçim kabiliyetinin olmadığını, aynı dokunun yavaş ve hızlı bölünen hücrelerine benzer kuvvetlerde etki ettiğini ortaya koymaktadır.

Hindistan'da yapılan bir araştırmada (Gardner-Thorpe ve ark., 2003) kapsaisin molekülünün kolon kanser hücrelerinde toksik etki göstererek apoptozu uyardığı tespit edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde uygulanan kapsaisinin vanilloid reseptörüne bağımlı olmadan peroksizom aktivatör reseptörü yoluyla hücre ölümünü

indüklediği belirtilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalardan birinde kapsaisin ile uyarılan kolon kanseri Caco-2 hücre hattında transepitelial bağlantıların zayıflayarak ribozomal protein ekspresyonunun arttığı ifade edilmiştir. Ayrıca Caco- 2 hücrelerinde kapsaisinin 100 µM-1 mM artan konsantrasyon aralığında uygulanması ile epitelial bariyer fonksiyonlarının doza bağlı azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte kapsaisin kullanımında görülen etkinliğin doza ve süreye bağımlı değişkenlik gösterdiği anlaşılabilmektedir.

Kolon kanserinde kapsaisinin kemopreventif ve kemoterapotik etkinliğinin birlikte araştırıldığı bir çalışmada (Olson ve Garban, 2008), kaspaz aktivasyonu ve nitrik oksit üretimi yoluyla apoptoz görülmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında antiproliferatif ve proapoptotik aktivitelerin tam olarak açıklanması amacıyla böbrek, beyin, meme, karaciğer, kolon gibi farklı kanser türleri üzerinde kapsaisin denenmiştir.

Kolon kanseri hücre hatlarından olan HCT-116 ve Caco-2 için IC₅₀ değerleri sırasıyla $66,77 \pm 10,78 \mu\text{M}$ ve $163,70 \pm 9,32 \mu\text{M}$ olarak ölçülmüşken, çocukluk lösemisinden iki farklı hücre hattı için bu değerler (CEM / ADR 500 ile CCRF-CEM) $125,85 \pm 22,05 \mu\text{M}$ ve $67,55 \pm 6,29 \mu\text{M}$ olarak gösterilmiştir (Li ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada (Jin ve ark., 2016) osteosarcoma hücre hattı için IC₅₀ değeri $165,7 \mu\text{M}$ olarak ifade edilmiştir. Kondrosarkoma hücre hattı için ise IC₅₀ değeri $254 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Helvacı ve Cömertpay, 2018). Bizim bulduğumuz IC₅₀ değerleri içerisinde standart kapsaisin bu bulgularla eşdeğer benzerlik gösterirken biber ve çekirdek bu değerlere göre düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin biber ve çekirdek ekstraksiyonunda yer alabilecek başka etken maddelerden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

HTC116 hücrelerinde yapılan kapsaisin uygulaması sonrası PCR deney sonuçlarına göre bak geninde artış gözlenmiştir ve en çok artışın $50 \mu\text{M}$ dozda olduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2018). Bizim Western Blot test sonuçlarımız bu deneyle karşılaştırıldığında 24 saatlik kapsaisin standartı, biber ve çekirdek ekstraktının $50 \mu\text{M}$ doz uygulamasında önceki çalışmayla benzerlik göstererek pozitif bulunmuş ancak dozlar ve gruplar arasındaki farklılık saptanamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma kapsamında, öncelikle biberlerin düzgün şekilde kurutulup ekstrakte edilmesi ve kapsasin miktarının doğru şekilde hesaplanması amaçlandı. Bu amaçla bir metot geliştirmesi söz konusu olmuştur. Önceki yapılan çalışmaların metotlarıyla karşılaştırıldığında ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılan metanolün en uygun solvent olduğu ITK yöntemi ile gösterildi.

Ekstraksiyon yöntemi kadar kapsaisin miktarının belirlenmesinde kullanılan HPLC yönteminin koşulları da araştırma sonuçlarının güvenilirliğini etkilemektedir. Bu koşullar diğer araştırmalarla karşılaştırılarak laboratuvarımızda uygulamaya mümkün olan en uygun yöntem olarak seçildi; elde edilen doğruluk, duyarlılık ve doğrusallık sonuçları hesapların güvenilir olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen kapsaisin miktarı ise farklı araştırma gruplarınca gerçekleştirilen araştırma bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Ancak ülkemizin herhangi bir bölgesindeki biberlerde kapsaisin miktarlarının gösterildiği herhangi bir çalışma örneği de bulunamamıştır. Bu yönüyle söz konusu çalışma Adana Bölgesi'nden ve Türkiye içerisindeki biberlerin kapsaisin miktarının gösterilmesi açısından bir ilk olarak gösterilebilir.

Kanser tedavisinde en bilinen yöntem kemoterapidir. Ancak kemoterapinin yan etkileri kemoterapiye alternatif olacak kanser tedavi yöntemi araştırmalarını zorunlu kılmaktadır. Bugün dünyada kullanılan bitki sayısı Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre 20.000 civarındadır. Bunlardan 4000'i ilaçlar için yaygın bir şekilde kullanılırken yaklaşık %10'unun ticari olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Özellikle son on yılda bitkisel ilaçlara olan ilgi ve talebin artması, bitkilerin doğrudan ilaç olarak kullanımının ve bitkilerden ilaç geliştirme çalışmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Son yıllarda tüm dünyada bitkiler üzerinde klinik amaçlı ve salgın hastalıkların kontrolü yönünde çalışmalar sürdürülmekte, çeşitli enzim sistemleri kullanılarak,

bitkilerden biyoaktif maddelerin bulunması için ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır.

Çalışma kapsamında *in vitro* denemelerde ilk olarak kapsaisinin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri gözlenmiştir. Hücrelerin 24 saatlik morfolojik incelemeleri kapsaisinin Caco-2 kolon karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu kanıtlamaktadır. Ayrıca MTT testi ile IC50 değerleri hesaplanmıştır. İstatistiki sonuçlar bulguların anlamlı olduğunu teyit etmiştir. Ancak bulunan IC50 değeri diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında düşük düzeydedir. Bunun sebebi olarak hücreler arası farklar olabileceği ayrıca IC50 değerini tespit eden testin de etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (International Agency for Research on Cancer, IARC)'ne göre 30µM'dan düşük IC50 değerindeki bitkiler potansiyel antikarsinojen bitki olarak sınıflandırılmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada IC50 değerleri kapsaisin dozu temel alınarak yapılan hesaplamada bulunan IC50 değerleri 30µM'dan düşük bulunmuş ve bu yönüyle antikarsinojen bir bitki olabileceği yönündeki hipotezimizi desteklemiştir. Ancak biber ve çekirdek ekstreleri olarak tekrar doz uygulaması ve IC50 hesaplamaları yapılması gerekmektedir.

Yapılan başka çalışmalarda kapsaisinin apoptik yollar üzerinden etkisi olduğu kanıtlanmaya çalışılmıştır. Çalışma kapsamında bu yönde bir değerlendirme yapılabilmesi için Bax ve Survivin proteinlerinin regülasyonu incelenmiştir. Bu sonuçlar geçmiş çalışmalarla benzer sonuçlar göstererek kapsaisinin apoptik yolk üzerinde bir etkisi olduğunu kanıtlamıştır. Ancak yine de bu çalışmalar bu yolağın hangi aşaması üzerinde etkili olduğunu açıklamaya yetmemiştir. Kapsaisinin kolon kanseri tedavisinde daha yaygın kullanılabilmesi için ileri düzeyde moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Ülkemizde Adana Yöresinden Toplanan Kırmızı Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Biber ve Çekirdeğindeki Kapsaisin Miktarının Tespit Edilmesi ve Kolon Kanser Hücreleri (Caco-2) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Kolon kanseri, tüm kanseri insidansının % 9'undan fazlasını oluşturur ve sindirim kanalının son bölümü olan kalın bağırsakta (kolon) gözlenir. Kanser tedavisinde başlıca kullanılan yöntemler arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi sayılabilir. Yaklaşık yüz yıldır kanserin sistemik tedavisi için yaygın olarak sitotoksik kemoterapötikler kullanılmaktadır. Bu ilaçların birçoğu, hızla çoğalan hücreleri öldürmek ya da engellemek için dizayn edilmiş, DNA hasarına sebep olan maddelerdir.

Kapsaisinın karsinogenik potansiyelinin değerlendirildiği genotoksisite ve karsinogenez analizleri *in vitro* ve *in vivo* değişken sonuçlar göstermektedir. Ancak 2000 yılı itibariyle kapsaisinın antikarsinojen yönünün olduğu ve saflığının önemli olduğu standardize protokollerle gösterilmeye başlanmıştır. Ancak apoptozun hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla uyarıldığı net olarak bilinmemektedir. Bazı sonuçlar, kapsaisinlerin normal hücrelerden kanserli hücreleri ayırabildiğini gösteriyor olsa da bunun nasıl gerçekleştiği hala belli değildir. Bu sebeple bu tez çalışmasında öncelikle; Ülkemizde kırmızıbiberin yaygın olarak üretiminin yapıldığı Adana İlinden toplanan olan *C. annum* L. cinsi biberlere ve çekirdeklerine uygun ekstraksiyon yöntemi geliştirilerek ve HPLC sistemi ile içerdikleri kapsaisin miktarları belirlenmesi amaçlandı. Daha sonra biber, çekirdek ve ticari kapsasin Caco-2 hücre hattı üzerine uygulanıp konsantrasyon ve zamana bağlı, sitotoksik açıdan hücre canlılığına etkileri;

ilaç uygulanmış hücrelerden elde edilen protein miktarlarına bağlı olarak hücrelere etki mekanizması araştırıldı.

HPLC yönteminin koşulları diğer araştırmalarla karşılaştırılarak laboratuvarımızda uygulamaya mümkün olan en uygun yöntem olarak seçildi; elde edilen doğruluk, duyarlılık ve doğrusallık sonuçları hesapların güvenilir olduğunu kanıtladı ($p < 0,05$). Elde edilen kapsaisin miktarı ise başka ülkelerde gerçekleştirilen araştırma bulgularıyla benzerlik gösterdi. Ancak ülkemizin herhangi bir bölgesindeki biberlerde kapsaisin miktarlarının gösterildiği herhangi bir çalışma örneği de bulunamadığı için çalışmamız Adana Bölgesi'nden ve Türkiye içerisindeki biber ve çekirdeğindeki kapsaisin miktarının ayrı ayrı gösterilmesi açısından bir ilk olarak gösterilebilir.

Son yıllarda tüm dünyada bitkiler üzerinde klinik amaçlı ve salgın hastalıkların kontrolü yönünde çalışmalar sürdürülmekte, çeşitli enzim sistemleri kullanılarak, bitkilerden biyoaktif maddelerin bulunması için ileri düzeyde çalışmalar yapılmaktadır. Çalışma kapsamında *in vitro* denemelerde ilk olarak kapsaisinin kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri gözlenmiştir. Hücrelerin 24 saatlik morfolojik incelemeleri kapsaisinin Caco-2 kolon karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu kanıtlamaktadır. Ayrıca MTT testi ile IC50 değerleri kapsaisin için 104.23 uM biber ve çekirdek ekstraktı için sırasıyla 24.84 ve 26.06 uM olarak hesaplanmıştır. İstatistiki sonuçlar bulguların anlamlı olduğunu teyit etmiştir. Western Blot sonucuna göre bax protein pozitif bulunmuşken, survivin negatif bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Capsicum annum*, HPLC, Kapsaisin, Kolon Kanseri, hücre kültürü

SUMMARY

Determination of Capsaicin Content in Pods and Seeds of Red Peppers (*Capsicum annuum* L.) Collected From Adana Region of Turkey and Investigation of Its Cytotoxic Effects on Colon Cancer Cells (Caco-2)

Colon cancer, has more than 9% of the overall cancer incidence, is observed in the colon (colon) which is the last part of the digestive tract. The main methods used in cancer treatment are surgery, chemotherapy and radiotherapy. But also, cytotoxic chemotherapeutics have been used extensively for the systemic treatment of cancer for nearly one hundred years. Many of these drugs are substances that cause DNA damage, designed to kill or prevent rapidly proliferating cells.

Genotoxicity and carcinogenesis analyzes evaluating the carcinogenic potential of capsaicin show variable results in vitro and in vivo. In the years 2000s, capsaicin has been shown to have anticarcinogenic aspects and purity is important with standardized protocols. However, the molecular mechanisms of apoptosis is not clear. Although some results show that capsaicins can separate cancer cells from normal cells, it is still unclear how this occurs. For this reason, in this thesis; It is aimed to determine the amount of capsaicin contained by the HPLC system by developing suitable extraction method for *C. annum* L. type peppers and kernels collected from Adana province where red pepper is widely produced in our country. Then pepper, seed and commercial capsacin were applied onto the Caco-2 cell line. Cytotoxic effects on cell viability and the mechanism of action of the cells was investigated depending on the amount of protein obtained from the treated cells.

The conditions of the HPLC method were compared with other researches and selected as the most suitable method in our laboratory; accuracy, sensitivity and linearity results showed that the calculations were reliable ($p < 0.05$). The amount of capsaicin obtained was similar to the findings of research conducted in other countries.

Coversely, our study demonstrated as fires study showing the amount of capsaicin from pepper Adana region of Turkey. Also, cytotoxic effects of capsaicin on cancer cells were first observed in in vitro experiments.

In the recent years, the studies on plants for clinical purposes and control of epidemic diseases are being carried out in the whole over world. 24-hour morphological examination of the cells reveals the proliferation of Caco-2 colon carcinoma cells of capsaicin. IC50 values were calculated as 104.23 uM for capsaisin standart, as 24.84 ve 26.06 uM for pepper and seed extract, respectively by MTT test. Statistical results confirmed that the findings were significant. Depend on Western Blot analysis, bax protein confirmed as positive and survivin protein found negative.

Keywords: Capsaisin, *Capsicum annum*, Colon Cancer, HPLC, cell culture

KAYNAKLAR

- AKDAĞ İ (2004). Metot Validasyonu, Ölçüm Belirsizliği ve Önemi. Tubitak Ulusal Metroloji Enstitüsü. Kocaeli.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5. Baskı, Garland Science, New York.
- ALTINIŞIK M (2005). Analitik Ölçüm Yöntemlerinin Laboratuara Kurulması ile ilgili Hesaplamalar. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD.
- ALTINSOY S (2010). Kinapril HCL ve Hidroklorotiyazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi için Yeni Kromatografik Yöntem Gelistirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- AMERICAN SPICE TRADE ASSOCIATION (1985). Official analytical methods of the American Spice Trade Association. 3rd ed. Amer. Spice Trade Assn., Englewood Cliffs, N.J.
- AMERICAN SPICE TRADE ASSOCIATION (1993). Proc. 5th Annu. Spice Tech. Forum 4–5 Nov. 1993, Burlingame, Calif.
- ANON (2001). Erişim Adresi: <http://www.chilepepperinstitute.org/anatom.html>. Erişim Tarihi: 10.11.2019
- APVMA (2004). Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Pesticides & Veterinary Medicines Authority. p: 9.
- ATTUQUAYEFIO VK, BUCKLE KA (1987). Rapid sample preparation method for HPLC analysis of Capsicum fruits and oleoresins. *J. Agr. Food Chem*, **35**: 777–779.
- BAJAJ KL (1980). Colorimetric determination of capsaicin in Capsicum fruits. *J. Assn. Offic. Anal. Chem*, **63**:1314–1316.
- BALBAA SI, ZAKI AY, ABDEL-WHAB SM (1968). A Micro-Method For The Estimation Of Khellin In Presence Of Other Constituents Of Ammi Visnaga Fruits. *Planta Medica* **16**: 329-334
- BERNATCHEZ PN, SOKER S, SIROIS MG (1999). Vascular Endothelial Growth Factors Effect on Endothelial Cell Proliferation, Migration and Platelet-Activating Factor Synthesis is FLK-1-1 Dependent. *J Biol Chem*, **274**: 31047-31054.
- BOGAERT J, PRENEN H (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol*, **27(1)**: 9–14.
- BORINSTEIN SC, CONERLY M, DZIECIATKOWSKI S, BISWAS S, WASHINGTON MK, TROBRIDGE P, HENIKOFF S, GRADY WM (2010). Aberrant DNA Methylation Occurs in Colon Neoplasms Arising in the Azoxymethane Colon Cancer Model. *Molecular Carcinogenesis*, **49**: 94-103.
- BOSCH F, ROSICH L (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. *Pharmacology*, **82**:171-179.
- BOYLE P, FERLAY J (2005). Mortality and survival in breast and colorectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, **2(9)**: 424-425.

- BOYLE P, LANGMAN JS (2000). ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, **321**(7264): 805-808.
- BUCK SH, BURKS F (1986). The neuropharmacology of capsaicin: re- view of some recent observation. *Pharmacol Rev*, **38**:179– 226.
- BUTLER R (2004). In vitro interactions between Neoparamoeba sp. and Atlantic salmon epithelial cells. *Journal of Fish Disease*, **27**(6): 343-349.
- CAREAGA M, FERNANDEZ E, DORANTES L, MOTA L, JARAMILLO ME, HERNANDEZ-SANCHEZ H (2003). Antibacterial activity of Capsicum extract against Salmonella typhimurium and Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat. *Int J Food Microbiol*, **83**(3): 331-335.
- CATERAINA MJ, JULIUS D, (1999). Sense and specificity: A molecular identity for nociceptors current opinion. *Neurobiology*, **9**: 525-530.
- CATERAINA MJ, JULIUS D, (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Neurosci*. **24**:487-517
- ÇETİN K, POYRAZOĞLU E, YEM O, ARTIK N (2001). Kırmızı Biberde Acılık ve Renk Bileşenleri. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **7**(3): 359-366.
- CHAIYATA P, PUTTADECHAKUM S, KOMINDR S (2003). Effect of chili pepper (Capsicum frutescens) ingestion on plasma glucose response and metabolic rate in Thai women. *J Med Assoc Thai*, **86**(9): 854-860.
- CHANTHAI S (2012). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some chilli varieties using accelerated solvent extraction associated with solid-phase extraction methods and RP-HPLC-fluorescence. *E-Journal of Chemistry*, **9**(3): 1550–1561.
- CHIANG GH (1986). HPLC Analysis of Capsaicins and Simultaneous Determination of Capsaicins and Piperine by HPLC-ECD and UV. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb11165.x> *Journal of Food Science*, **51**(2): 499–503.
- CHOW J, NORNG M, ZHANG J, CHAI J (2007). TRPV6 Mediates Capsaicin-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells Mechanisms Behind A Possible New “Hot” Cancer Treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, **1773**(4): 565- 576.
- CHRISTMANN M, TOMIMIC MT, ROOS WP, KAINA B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, **193**(2): 3-34.
- COLLINS MD, WASMUND LM, BOSLAND PW (1995). Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using high-performance liquid chromatography. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.1.137>. *HortScience*, **30**(1): 137–139.
- CÖMERTPAY S, CEYLAN G (2019). Öncül Afidikolin ve Nokodazol Muamelesinin Kanserli ve Ölümsüzleştirilmiş Mezotelyum Hücrelerinde Kapsaisin Sitotoksitesine Etkisi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, **22**(3): 456-465.
- COOPER TH, JA, GUZINSKI C, FISHER (1991). Improved high-performance liquid chromatography method for the determination of major capsaicinoids in capsicum oleoresins. *J. Agr. Food Chem*, **39**: 2253– 2256.
- CZAJA MJ (2002). Induction and Regulation of Hepatocyte Apoptosis by Oxidative Stress, Antioxid. *Redox Signal.*, **4**: 759-767.
- DEMİR M (2009). Analitik Verilerin Degerlendirilmesi. Erişim Adresi: <http://web.adu.edu.tr/user/mdemir/K214/K21402/analitikveridegerlendirme090301.pdf>. Erişim Tarihi: 16.01.2018.

- DEVITA VT, ROSENBERG SA (2012). Two hundred years of cancer research. *The New England Journal of Medicine*, **366**: 2207-2214.
- DİLSİZ N (2004). Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara
- ELMORE S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, **35(4)**: 495–516.
- ERTAŞ ÖS, KAYALI A (2005). Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **34(1)**: 41-57.
- FERLAY J, BRAY F, PISANI P, PARKIN DM, GLOBOCAN (2002). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon; International Agency for Research on Cancer.
- FRERICK H, KEITEL W, KUHN U, SCHMIDT S, BREDEHORST A, KUHLMANN M (2003). Topical treatment of chronic low back pain with a capsicum plaster. *Pain*, **106**: 59-64.
- GARDNER-THORPE J, ITO H, ASHLEY S, WHANG EE (2003). Ribosomal protein P2: a potential molecular target for antisense therapy of human malignancies. *Anticancer Res.*, **23**: 4549–4560.
- GONG XF, WANG, MW, IKEJIMA T (2005). Mechanisms of Capsaicin-Induced Apoptosis of Human Melanoma A375-S2 Cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*, **27**: 401-403.
- GOVINDARAJAN VS (1986). Capsicum: Production, Technology, Chemistry and Quality. Part III. Chemistry of the Color, Aroma and Pungency Stimuli. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **24(3)**: 245-355.
- GOVINDARAJAN VS, SATHYANARAYANA MN (1991). Capsicum: Production, Technology, Chemistry And Quality. Part V. Impact On Physiology, Pharmacology, Nutrition And Metabolism; Structure, Pungency, Pain And Desensitization Sequences. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **29(6)**: 435-474.
- GUESSOUS I, DASH C, LAPİN P, DOROSHENK M, SMİTH RA, KLABUNDE CN (2010). Colorectal Cancer Screening Barriers and Facilitators in Older Persons. *Preventive Medicine*, **50**: 3- 10.
- GUNG BW, DICKSON H, SHOCKLEY S (2001). A concise synthesis of (+)- and (-)-adociacetylene B. *Tetrahedron Letters*. **42**:4761-4763
- GÜNGÖR M (2008). Klinik Biyokimya Ölçüm Belirsizliği. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarı.
- GÜZEL S, COŞAR N, BAĞLAMIŞ H. (2004). Şanlıurfa isot biberinin invitro ve invivo antioksidan gücü. 18. Ulusal Biyokimya Kongresi Kitapçığı. *Turk J Biochem*, **29(1)**: 1-176.
- HA J, HAN KJ, KIM K J, JEONG S (2008). Gas chromatographic analysis of capsaicin in gochujang. *Journal of AOAC International*, **91(2)**: 387–391.
- HAN Y, TAN TM, LIM LY (2006). Effects of Capsaicin on P-gp Function and Expression in Caco-2 Cells. *Biochem Pharmacol.*, **71**: 1727-1734.
- HANAI J, DHANABAL M, KARUMANCHI SA, ALBANESE C, WATERMAN M, CHAN B (2002). Eudostation Causes G1 Arrest of Endothelial Cells Through Inhibition of Cyclin DI. *J Biol Chem.*, **277**: 16464-16469.
- HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB), (2006). Capsaicin; U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Library of Medicine: Bethesda, MD.

- HELVACI N, COMERTPAY S (2018). In vitro Evaluation of The Effects of Capsaicin on Normal And Cancerous Cells of Human Cartilage. *Turk J Biol*, **42**: 422-434.
- HOFFMAN PG, MC LEGO, GALETTO (1983). Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high pressure liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem.*, **31**:1326–1330.
- HOLST-HANSEN C, BRÜNNER N (1998). MTT Cell Proliferation Assay, *Cell Biology: a Laboratory Handbook* San Diego: Academic Press. p: 16-18.
- HORAKOVA K, SOVCIKOVA A, SEEMANNOVA Z, SYROVA D, BUSANYOVA K, DROBNA Z, FERENCIK M (2001). Detection of drug induced, Superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. **30**: 650-664.
- HUANG SP, CHEN JC, WU CC, CHEN CT, TANG NY, HO YT, LO C, LIN JP, CHUNG JG, LIN JG (2009). Capsaicin-Induced Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Anticancer Res.*, **29**: 165-174.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (2011). Erişim adresi: <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>. Erişim tarihi:11.11.2019
- ICH (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Current Step 4 Version. p: 17.
- IGNEY FH, KRAMMER PH (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **2**: 277–288.
- IWAI Y, (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, **2**: pages261–268.
- JUNG MY, KANG HJ, MOON A (2001). Capsaicin-Induced Apoptosis in SK-Hep-1 Hepatocarcinoma Cells Involves Bcl-2 Down-regulation and Caspase-3 Activation, *Cancer*.
- JARRET RL, PERKINS B, FAN T, PRINCE A, KELLY G, SKOCZENSKI B (2003). Using EIA to screen Capsicum spp. germplasm for capsaicinoid content. *J Food Comp Anal*, **16**:189–194.
- JIN T, WU H, WANG Y, PENG H (2016). Capsaicin Induces Immunogenic Cell Death in Human Osteosarcoma Cells. *Exp Ther Med*, **12(2)**: 765-770.
- JURENITSCH J, LEINMUELLER R (1980). Quantification of Nonylic Acid Vanillylamide and Other Capsaicinoids in the Pungent Principle of Capsicum Fruits and Preparations by Gas-Liquid Chromatography on Glass Capillary Columns. *J. Chromatogr.*, **189**: 389-390.
- JURENITSCH J, BINGLER E, BECKER, H., KUBELKA, W (1979). Simple HPLC Method for Determination of Total and Single Capsaicinoids in Capsicum Fruits. *Planta Med.*, **36(1)**: 54-57.
- KAFALI H (2008). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sülfonamit Tespitinin Metot Validasyonu. Yüksek lisans tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KAUFMANN SHE, EHRLICH P (2008). Founder of chemotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**:373.
- KARNKA R, RAYANAKORN M, WATANESK S, VANEESORN Y (2002). Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Anal Sci.*, **18**:661–665.

- KOGURE K, GOTO S, NISHIMUR M, YASUMOTO M, ABE K, OHIWA, C., SASSA, H., KUSUMI, T., TERADA, H (2002). Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1573**: 84-92.
- KOPEC E, DEBELLIS RJ, IRWIN RS (2002). Chemical Analysis of Freshly Prepared and Stored Capsaicin Solutions: Implications for Tussigenic Challenges, *Pulm Pharmacol*.
- KRAJEWSKA AM, POWERS JJ (1988). Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. *J. Food Sci.*, **53**:902–905.
- KURIAN AL, STARKS AN (2002). HPLC Analysis of Capsaicinoids Extracted from Whole Orange Habanero Chili Peppers. *Journal Of Food Science*, **67**: 3.
- LAKRITZ JR, POUTAHIDIS T, LEVKOVICH T, VARIAN BJ, IBRAHIM YM, CHATZIGIAGKOS A, SHEYLA, MIRABAL S, ERIC J, ALM EJ, ERDMAN SE (2014). Beneficial bacteria stimulate host immune cells to counteract dietary and genetic predisposition to mammary cancer in mice. *Int J Cancer*, **135**: 529–540.
- LAW MW (1983). High pressure liquid chromatographic determination of capsaicin in oleoresin and personal protection aerosols. *J. Assn. Offic. Anal. Chem.*, **66**:1304–1306.
- LEE C, KIM M, YOON SW, LEE CH (2003). Short-term control of capsaicin on blood and oxidative stress of rats in vivo. *Phytotherapy Research*, **17**: 454-458.
- LI H, KRSTIN S, WANG S, WINK M (2018). Capsaicin and Piperine Can Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells to Doxorubicin. *Molecules*, **23**(3): 557.
- LOPEZ-HERNANDEZ J, ORUNA-CONCHA MJ, SIMALLOZANE J, GONZALES-CASTRO MJ, VARQUEZBLANCO ME (2001). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and parden peppers by HPLC. *Deutsche LebensmittelRundschau*, **92**: 393- 395
- LÜLEYAP HÜ (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, Ankara, 293-316.
- MASAAKI N, KAZUO I, FUMIYO, K, MASAYUKI, O, MIEKO, KK, YASUO S (2006). Study on the Analysis Capsaicin Glucuronide in Rat Urine by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry After Enzymatic Hydrolysis. *J Health Sci.*, **52**: 660-665.
- MASON L, MOORE RA, DERRY S, EDWARDS JE, MCQUAY HJ (2004). Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ*, **10**: 1-5.
- MONFORTE-GONZÁLEZ M, MEDINA-LARA F, GUTIÉRREZ-CARBAJAL G, VÁZQUEZ-FLOTA F (2007). Capsaicinoid quantitation by in situ densitometry of thin layer chromatography plates. <https://doi.org/10.1080/10826070701225041>. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **30**(11): 1697–1704.
- MORI A, LEHMANN S, O'KELLY J, KUMAGAI T, DESMOND JC, PERVAN M, MCBRIDE WH, KIZAKI M, KOEFFLER HP (2006). Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, **66**(6): 3222-3229.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- NAGY I, SANTHA P, JANCOS G, URBAN L (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (trpv1) in physiology and pathology. *European Journal of Pharmacology*, **500**: 351-369.
- NG CM, REUTER WM (2015). Analysis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Chili Peppers Using the PerkinElmer Altus HPLC System with PDA Detection, 3–7. Erişim Adresi: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Analysis-of-Capsaicin-and-

Dihydrocapsaicin-in-Chili-Peppers-Using-Altus-HPLC-012226_01.pdf. Erişim Tarihi: 25.11.2019.

- OLAH E (2005). Basic Concepts of Cancer: Genomic Determination. *The Journal of The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **16(2)**: 54-57.
- OLSON SY, GARBAN HJ (2008). Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide*, **32**: 67.
- ÖNER C (2003). Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara.
- ÖZTÜRK M (2018). Kolon Kanseri Nedir? Kolon Kanseri Belirtileri ve Tedavisi. Erişim Adresi: <https://www.aktuelbilgiler.com/kolon-kanseri-nedir-kolon-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi/> Erişim Tarihi: 16.12.2019.
- OZANSOY A (2011). Ölçüm, Ölçüm Hataları ve Anlamlı Rakamlar. Erişim Adresi: <http://80.251.40.59/science.ankara.edu.tr/aozansoy/olcme.pdf>. Erişim Tarihi: 16.01.2018.
- PARKIN D, BRAY F, FERLAY J (2006). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, **55**: 74-108.
- PEÑA-ALVAREZ A, RAMÍREZ-MAYA E, ALVARADO-SUÁREZ LÁ (2009). Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.053>. *Journal of Chromatography A*, **1216(14)**: 2843–2847.
- PENA-PEREIRA F, LAVILLA I, BENDICHO C (2009). Miniaturized Preconcentration Methods Based on Liquid-liquid Extraction and Their Application in organic Ultratrace Analysis and Speciation: A Review. *Spectrochimica Acta Part B*, **64**: 1-15.
- PERUCKA I, OLESZEK W (2000). Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chem*, **71**: 287–291.
- POGRİBNY IP (2010). Epigenetic Events in Tumorigenesis: Putting The Pieces Together. *Experimental Oncology*, **32**: 132-136.
- POLİPGENTR (2018). Adenomatöz Polip. Erişim adresi: <https://www.polip.gen.tr/adenomatoz-polip.html>. Erişim Tarihi: 11.11.2019
- PRUTHI JS (2003). Chemistry and quality control of Capsicum and Capsicum products. In: *Capsicum* (De AK, ed.). Taylor and Francis, London pp. 25–70.
- RENEJAN AG, PAINTER JE, ATKIN WS, POTTEN CS, SHALET SM, O'DWYER ST (2001). High-risk colorectal adenomas and serum insulin-like growth factors. *BJS* **88(1)**: 107-113
- ROENTGEN K (1896). On a new kind of rays. (Arthur Stanton, trans.), *Nature*, **53**: 274-276.
- RİCCHİ P, ZARRİLLİ R, PALMA A, ACQUAVİVA AM (2003). Nonsteroidal AntiInflammatory Drugs in Colorectal Cancer: From Prevention to Therapy. *British Journal of Cancer*, **88**: 803-807.
- ROSA A, DEIANA M, CASU V, PACCAGNINI S, APPENDINO G, BALLERO M, DESSI MA (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *J Agric Food Chem*, **50(25)**: 7396-7401.
- SANCHO R, LUCENA C, MACHO A, CALZADO MA, BLANCO-MOLINA M, MINASSI A, APPENDINO G, MUNOZ E (2002) Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *Eur J Immunol*, **32(6)**: 1753-1763.

- SARIA A, F LEMBECK G, SCOTFISCH (1981). Determination of capsaicin in tissues and separation of capsaicin analogues by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, **208**:41–46.
- SASAMURA T, KURAISHI Y. (1999). Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn J Pharmacol*, **80**:275–280.
- SCIENTIFIC E, COMPANY P, PANKAR DS (1977). Gibbs' reagent, **144**: 149–152.
- ŞENER E, ŞAHİN S (2010). Kapsaisin: Farmakokinetik, Toksikolojik ve Farmakolojik Özellikleri *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **29(2)**: 149-163.
- SHABİR GA (2003). Validation of High-performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, **987**: 57-66.
- SPANYÁR P, BLAZOVICH M (1969). A thin-layer chromatographic method for the determination of capsaicin in ground paprika. <https://doi.org/10.1039/an9699401084>. *The Analyst*, **94(1125)**: 1084–1089.
- SZALLASI A, (2001). Vanilloid receptor ligands: hopes and realities for the future. *Drugs and Aging*, **18**: 561-573.
- SZALLASI A, BLUMBERG PM (1999). Vanilliod (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, **51**: 159-211.
- THAPA B, SKALKO-BASNET N, TAKANO A, MASUDA K, BASNET P (2018). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Capsaicin Content in 16 Capsicum Fruits from Nepal. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **53(9)**: 1689–1699.
- THOMAS BV, SCHREIBER AA, WEISSKOPF PC (1998). Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography. *J Agric Food Chem.*, **46**: 2655-2663.
- TIRYAKI O, AYSAL P, (2003). Pestisit Kalıntı Analizlerinde Metotların Geçerli. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 15-17 Ekim 2003, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu-Erciyes Üniversitesi Kayseri, Bildiri Özetleri: 61.
- TOPAK H, ERBİ N, DİGRAK M, (2008). Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Yetistirilen Biberlerin (*Capsicum annum* L.) Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması. *J of Fırat Univ*, **20 (2)**: 257-264.
- TSUKURA Y, MORI M, HIROTANI Y, IKADA K, AMANO F, KATO R, IJIRI Y, TANAKA K (2007). Effects of Capsaicin on Cellular Damage and Monolayer Permeability in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Biol Pharm Bull.*, **30**: 1982-1986.
- TUCKER SP (2001). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in air in a pickle and pepper processing plant. *AIHAJ*, **62**:45–48.
- TURGUT C, NEWBY BM, CUTRIGHT TJ (2004). Determination of Optimal Water Solubility of Capsaicin for Its Usage as a Non-toxic Antifoulant. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **11**:7-10.
- TUYNMAN JB, PEPPELENBOSCH MP, RICHEL DJ (2004). Cox-2 İnhibition as a Tool to Treat and Prevent Colorectal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **52**: 81-101.

- TÜRKÇAPAR N (2012). Hücre Ölüm Mekanizmaları. Erişim adresi: <https://docplayer.biz.tr/5064124-Hucre-olum-mekanizmalari-apopitoz-otofaji-nekroz-vd.html>. Erişim Tarihi: 12.11.2019
- URRUTICOECHEA A, ALEMANY R, BALART J, VILLANUEVA A, VIÑALS F, CAPELLÁ G (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, **16(1)**: 3-10.
- VERMEULEN K, BOCKSTAELE DRV, BERNEMAN ZN (2003). The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.*, **36**: 131–149.
- WAITE MS, AUBIN AJ, CORPORATION W (2008). A Modular HPLC System for routine Analysis of Capsaicin from Hot Sauces. *Waters Corporation*, **1(1)**: 1–5.
- WOODBURY JE (1980). Determination of Capsicum pungency by high pressure liquid chromatography and spectrofluorometric detection. *J. Assn. Offic. Anal. Chem.*, **63**:556–558.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND AND AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC; American Institute for Cancer Research.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Cancer Incidence in Five Continents. Lyon; The World Health Organization and The International Agency for Research on Cancer.
- ULUKAYA E, ÖZDİKİCİOĞLU F, YILDIZTEPE ORAL A, DEMİRCİ M (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*. **22**: 232-239.
- YOSHIOKA M, DOUCET E, DRAPEAU V, DIONNE I, TREMBLAY A (2001). Combined effects of red pepper and caffeine consumption on 24 h energy balance in subjects given free access to foods. *Br J Nutr*, **85(2)**: 203-211.
- ZHANG J, NAGASAKI M, TANAKA Y, MORIKAWA S (2003). Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res*, **27(3)**: 275-283.
- ZHANG R, HUMPHREYS I, SAHU PR, SHI Y, SRIVASTAVA SK (2008). in vitro and in vivo Induction of Apoptosis by Capsaicin in Pancreatic Cancer Cells is Mediated Through ROS Generation and Mitochondrial Death Pathway. *Apoptosis*, **13(12)**: 1465-1478.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emine Kübra
Soyadı	Bilir
Doğum yeri ve tarihi	Edirne, 23/02/1992
Uyruğu	T.C.
Medeni Durumu	Bekar
İletişim Adresi	eminekubrabilir@gmail.com
Telefon	05437429124

Öğrenim Durumu:

Lisans	ANKARA ÜNİVERSİTESİ
2010 - 2015	VETERİNER FAKÜLTESİ

Eserler:

Yazılan ulusal kitaplardaki bölümler:

1. Yarsan E, Bilir EK. Zehirlenmeler. İçinde: Ender Yarsan (ed). Koyun ve Keçi Hekimliği, Ankara: Güneş Tıp Kitapevi, 2017 (ISBN: 978-975-277-677-7,) s.767-791

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Stephnie Michelle Kennedy, Carl Sheridan, Victoria Rosalind Kearns, Emine Kubra Bilir, Xiaochen Fan, Ian Grierson, 2019. Thrombospondin-2 is up-regulated by TGFβ2 and increases fibronectin expression in human trabecular meshwork cells. Experimental Eye Reserch.2019/10/4
2. EK BİLİR, H Tutun, S Sevin, G KISMALI, E Yarsan, 2018. Cytotoxic Effects of Rhododendron ponticum L. Extract on Prostate Carcinoma and Adenocarcinoma Cell Line (DU145, PC3) Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 24 (3)

3. EK Bilir, S Sevin, H Tutun, ME Alcigir, E Yarsan, 2018. Cytotoxic and antiproliferative effects of Rhododendron ponticum L. extract on rat glioma cell line (F98). Int J Pharm Sci Res 9 (5), 1000- 1007
4. Kuzukiran O, Yurdakok-Dikmen B, Totan FE, Celik C, Orhan EC, Bilir EK, Kara E, Filazi A. 2016. Analytical Method Development and Validation for Some Persistent Organic Pollutants in water and Sediments by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Int. J. Environ. Res., 10(3):401-410, Summer 2016. ISSN: 1735-6865

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Yarsan E, Bilir EK. 2016. Kolistin Direnci. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*. Cilt:16. Sayı:1-2 – 16. S.28. ISSN1302-9959

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. Bilir EK, Kennedy S, Fan X, Oldershaw R, Lane B, MacMahon M, Simpson S, Willoughby CE, Sheridan C. 2019. Genome-wide transcriptome profiling of human trabecular meshwork (TM) cell cultures, TM-derived spheres and their differentiated progeny. ISER/ Brightfocus Glaucoma Symposium. 23-26 Ekim 2019 Atlanta, GA, US. (Poster Sunumu)
2. Bilir EK, Oldershaw R, Sheridan C. 2019. Stem Cell Differentiation Into Functioning Trabecular Meshwork Cells. 1. Uluslararası ve 6. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi. 01-04 Eylül 2019. Kayseri, Türkiye (Sozlu Sunumu). *Kongre Kitapçığı*. s.80
3. Bilir E.K., Sevin S., Tutun H., Kısmalı G., Yarsan E., 2017. Cytotoxic Effects Of Rhododendron Ponticum L. Extract On Prostat Carsinoma And Adenocarsinoma Cell Line (du145, Pc3). 2nd International Conference on Advances in Veterinary Sciences & Technicsis. 4-8 October 2017, Skopje, Macedonia. (Sozlu Sunum).
4. Yurdakök-Dikmen B, Bilir EK, Sevin S, Alçıgır E, Yarsan E. Cytotoxic Effects of Propolis on Rat Glioma Cell Line (F98). 5th International Muğla Beekeeping and

- Pine Honey Congress. 1-5 November 2016. Ölüdeniz, Muğla, Turkey. (Sozlu Sunum) Congress Book.p.94
5. Bilir E.K., Sevin S., Tutun H., Kısmalı G., Yarsan E., 2017. Cytotoxic Effects Of The Genus Of Rhododendron Flowers Extract On Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Cell Line (Caco-2). (Poster Presentation). 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13 October 2017, Ankara
 6. Bilir EK, Sevin S., Tutun H, Alçıgır E, Yarsan E. Cytotoxic Effects of Phododendron Ponticum L. Extract on Rat Glioma Cell Line (F98). 1. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants “Natural and Healty Life”. 9-12 May 2017. Konya, Turkey. (Poster Presentation). *Abstract book*.p.1477
 7. Yarsan E, Bilir EK. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar. 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 10-11 Mart 2017. Ankara, Türkiye. (Poster Sunumu). *Kongre Kitapçığı*, s.505
 8. Yurdakök-Dikmen B, Bilir EK, Sevin S, Kısmalı G, Yarsan E. Cytotoxic Effects of Propolis on Prostat Carsinoma Cell Line (DU145). 5th International Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress. 1-5 November 2016. Ölüdeniz, Muğla, Turkey. (Poster Presentation). *Congress Abstract Book*.p.366
 9. Yarsan E, Bilir EK. Kolistin Direnci. 12. Uluslararası Katılımlı Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi. 30 Ağustos-02 Eylül 2016. Kapadokya, Nevşehir, Türkiye (Poster Sunumu). *Kongre Kitapçığı*. s.67.
 10. Filazi A, Kuzukiran O, Yurdakok Dikmen B, Totan E, Celik C, Orhan EC, Bilir EK, Kara E. Analytical Method Validation and Development for Some Persistent Organic Pollutants in Water and Sediments by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo. 13-17 March 2016. New Orleans, Lousiana, USA. (Poster Presentation). 2016 Anual Meeting Abstract Supplement- Late Breaking Abstract Submissions.p.31.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Bilir EK, Yarsan E. Antibiyotik Direnç ve Çevresel Bulaşma Kaynakları. 5. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi. 01-04 Eylül 2016. Bursa, Türkiye (Poster Sunumu). *Kongre Kitapçığı*. s.80

Diğer Bilimsel Etkinliklere Katılım:

- 4. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, 26- 30 Nisan 2017, Antalya.
- 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 10-11 Mart 2017, Ankara.
- Ankara TTO Girişimcilik Günleri Etkinliği, 8 Ekim 2016, Ankara.
- Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Vet-Arı Çalıştayı, 1 Ekim 2016, Ankara.
- Mezbaha Modernizasyonu: Türkiye’de Hayvan Refahı ve Et Kalitesini Geliştirmek Semineri, 13-14 Nisan 2015, Ankara.
- 62nd International Veterinary Students’ Association Winter Symposium (organized), 2-10 January 2014, Ankara.
- Parasitological Day “Parasites and other infectious agents of veterinary and human importance in Alpe Adria region”, 7 June 2013, Klagenfurt, Austria.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

- Peer Reviewer of Inspirit Imprint Journal of University of Liverpool (2019 – devam etmekte)
- Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği (2016 - devam etmekte).
- Veteriner Hekimliği Eğitim Kurumları ve Programları Değerlendirme ve Akreditasyon Derneği (2017 – devam etmekte).
- Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (IVSA) Uluslararası Veteriner Öğrencileri Topluluğu Topluluk Başkan Yardımcılığı (2014 – 2015)