

BUĞDAY ÇİMİNİN İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF WHEATGRASS ON HUMAN LYMPHOCYTE CELLS

Okan SANCER^{1,2}, Zehra SAFİ ÖZ³, Pınar ASLAN KOŞAR¹

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Genetik Araştırmalar Birimi, Isparta, TÜRKİYE

³ Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

Cite this article as: Sancer O, Safi Öz Z, Aslan Koşar P. Buğday Çiminin İnsan Lenfosit Hücreleri Üzerine Etkisi. Med J SDU 2023; 30(1): 47-55.

Öz

Amaç

Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili iken aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de hasar oluşturabilmektedir. Bu çalışmada, buğday çimi (*Triticum aestivum* L.) ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin analizi ve bu ekstraktın kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in sağlıklı hücrelerde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çimlendirilmiş buğdayların metanol ekstraktı hazırlanarak HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile fenolik bileşen analizi yapıldı. Buğday ekstraktı konsantrasyonuna bağlı hücre canlılık testi uygulanarak IC₅₀ (Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) ve LD₅₀ (ortalama öldürücü doz) değerleri hesaplandı. Belirlenen bu konsantrasyon değerleri ile hücreler in kübe edilerek DNA hasarı varlığı Comet metodu ile değerlendirildi.

Bulgular

Fenolik bileşen analizi sonucunda p-hidroksibenzoik asit en yüksek miktarda, o-kumarik asit ise en düşük düzeyde tespit edildi. Lenfosit hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki buğday çimi ekstraktı, etoposid ve sisplatin için değerler sırasıyla IC₅₀=204,6 µg/mL, LD₅₀=15,84 µg/mL ve LD₅₀=24,51 µg/mL ola-

rak bulundu. Comet analizi sonucunda kontrol grubuna kıyasla, etoposid LD₅₀ ve etoposid LD₅₀+buğday çimi ekstraktı IC₅₀ grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (p<0,05), etoposid LD₅₀ ve etoposid LD₅₀+buğday çimi ekstraktı IC₅₀ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (p>0,05). Bu sonuca benzer olarak kontrol grubuna kıyasla, sisplatin LD₅₀ ve sisplatin LD₅₀+buğday çimi ekstraktı IC₅₀ grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (p<0,05), etoposid LD₅₀ ve etoposid LD₅₀+buğday çimi ekstraktı IC₅₀ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (p>0,05).

Sonuç

Çalışmamızda buğday çiminin etoposid ve sisplatin nedeni ile oluşan DNA hasarında azalmaya neden olduğu görülmüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Buğday çimi, Comet metodu, HPLC, MTT

Abstract

Objective

While chemotherapeutic drugs are effective at eliminating cancer cells, they can also damage healthy cells. The aim of this study was to analyze the phenolic component content of wheatgrass extract (*Triticum aestivum* L.) and to determine the effect of this

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: O.S. / okansancer@hotmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 24.01.2023 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 28.02.2023

ORCID IDs of the authors: O.S: 0000-0001-7935-5004; Z.S.Ö: 0000-0003-1359-5026;

P.A.K: 0000-0003-2602-5145

extract against DNA damage caused by cisplatin and etoposide used in chemotherapeutic treatment in healthy cells will.

Material and Method

Sprouted wheat methanol extract was prepared and analysis of phenolic components was performed by HPLC (high performance liquid chromatography). IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) and LD₅₀ (median lethal dose) values were calculated by applying a cell viability assay based on wheat extract concentration. Cells were incubated at these determined concentration levels and the presence of DNA damage was assessed by the Comet method.

Results

As a result of the phenol component analysis, p-hydroxybenzoic acid was determined in the highest amount and o-coumaric acid in the lowest amount. The values for wheatgrass extract, etoposide and cisplatin at different concentrations applied to lymphocyte cells were found to be IC₅₀=204.6 µg/mL,

LD₅₀=15.84 µg/mL and LD50=24.51 µg/mL, respectively. As a result of comet analysis, it was found that etoposide LD₅₀ and etoposide LD₅₀+wheatgrass extract IC₅₀ group were statistically significant (p<0.05), compared to the control group, there was no statistical significance between etoposide LD₅₀ and etoposide LD₅₀+wheatgrass extract IC₅₀ group (p>0.05). Similar to this result, cisplatin LD₅₀ and cisplatin LD₅₀+wheatgrass extract IC50 group were found to be statistically significant compared to the control group (p<0.05), while there was no statistical significance between etoposide LD₅₀ and etoposide LD₅₀+wheatgrass extract IC₅₀ group (p> 0.05).

Conclusion

Although wheatgrass was observed in our study to cause a reduction in DNA damage caused by etoposide and cisplatin, no statistical significance was found.

Keywords: Comet method, HPLC, MTT, Wheatgrass

Giriş

Kanser tedavisinde birçok farklı seçenek mevcut olmakla birlikte her geçen gün tedavi yöntemlerine bir yenisi daha eklenmektedir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını engelleyerek, onları ortadan kaldırmayı hedefleyen güçlü ilaçların kullanıldığı bir yöntem olup kanser tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Bu yöntemde kullanılan ilaçlar kimyasal yapılarına ve vücuttaki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır.

Sisplatin, mesane, kan, meme, servikal, özofagus, baş ve boyun, akciğer, yumurtalık, testis ve sarkom gibi insan kanserlerinin tedavisinde yaklaşık 50 yıldır kullanılan ve klinik olarak oldukça etkili kemoterapötik ajanlardandır. Ancak ciddi yan etkileri nedeniyle klinik pratikte kullanımı sınırlılık göstermektedir. Sisplatin kanser hücresi tarafından alındıktan sonra hücrel makromoleküllerle etkileşime girer ve sitotoksik etkilerini bir dizi biyokimyasal mekanizma yoluyla DNA'ya bağlanarak gerçekleştirir. Bu bağlanma ile DNA sentezi ve hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açar. Birincil moleküler etki mekanizması, lipid peroksidasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesinden kaynaklanan apoptotik yollarının indüklenmesi, çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonu, p53 aracılı hücre döngüsünün durması, pro-apoptotik genlerin/protein-

lerin yukarı regülasyonu ve proto-onkogenlerin ve anti-apoptotik genlerin/proteinlerin aşağı regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (2-4).

Etoposide klinik olarak kullanılan bir diğer kemoterapötik ajandır. Kliniklerde yaygın olarak kullanılan bu ajan akciğer ve meme kanseri, lenfoma, lösemi gibi çok sayıda kanserin tedavisi için kombinasyon kemoterapilerinin temel ve önemli bir parçasıdır. Etoposid hücrelerde bir Topoizomeraz II (TOP2) inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Bu inhibisyon, etoposidin anti-kanser mekanizması olarak kabul edilir. TOP2 (alfa ve beta izoformları), DNA replikasyonu sırasında üzerinde oluşan düğümleri düzenleyen, eksik ve fazla sarılmasını düzenleyen enzimlerdir. TOP2 enzimlerinin inhibitörü olan etoposid, DNA üzerinde çift sarmal kırılmalarına neden olarak yapısında bozulmalara neden olur. Bu yapıların hücrelerde birikmesi sonucunda apoptotik mekanizma tetiklenir. Böylece kanser tedavisinde bütünleyici bir rol oynar. Genel olarak, TOP2 enzimleri geçici bir TOP2-DNA bölünme kompleksi (TOP2cc) oluşturur ve işlem tamamlanınca bu yapı ayrılır. İnhibitörler, TOP2 ile etkileşime girdiğinde ise DNA moleküllerini bağlama yeteneğini inhibe ederek veya enzim aracılı DNA parçalanma oranını arttırarak çift zincir kırığı birikimine yol açar. Zamanla bu çift zincir kırıkları tamir edilemezse hücre apoptoz sürecine doğru ilerler (5, 6).

Kanser tedavisi farklı kemoterapötik ajanların hiperproliferatif özellikte olan hücrelerin yanı sıra, normal hücrelerin de birçok yönden toksik olarak etkilenmesi ile yönetilmektedir (7). Kanser hastaları arasında tamamlayıcı tıp yöntemlerinin kullanımı yaygındır ve kullanım oranı her geçen gün artmaktadır. Hastaların bu seçeneği standart onkoloji tedavilerine bir 'alternatif' olarak mı yoksa ek olarak mı kullandıkları açık değildir (8).

Buğday çimi (*Triticum aestivum* L.) ekstraktının sağlıklı ve hasta kişiler tarafından besin takviyesi olarak tüketimi oldukça yaygındır. Bunun nedeni diğer besinlerin yanı sıra buğday çiminin yüksek konsantrasyonlarda vitamin, mineral, klorofil ve enzimler de dahil olmak üzere çok etkili bir sağlık besin maddesi içermesinden kaynaklanmaktadır. Buğday çimi yeryüzünde bulunan 102 elementten 98'ini içeren bir besin kaynağıdır. Bu sayede vücuttan toksinleri bir miknatıs gibi çekme özelliğine sahiptir (9). Yüksek miktarda klorofil içeriği sayesinde ise kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu engellediği ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmektedir. Buğday çiminin, ROT'u hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüştürme potansiyeline sahip süperoksit dismutaz (SOD) ve sitokrom oksidaz gibi antioksidan enzimler içerdiği bilinmektedir. Bu sayede DNA hasarını önleme ve onarmada etkilidir (10). Fenolik bileşikler, oksidatif stresin etkisini tersine çeviren ve çeşitli dejeneratif hastalık ve bozuklukların insidansını azaltan buğday çiminin bir başka ilginç bileşenini temsil eder (11). Apigenin, kersitin ve luteolin gibi yüksek biyoflavonoid konsantrasyonu, bitkiye önemli antioksidan aktivite kazandırır. Demir, fosfor, magnezyum, manganez, bakır ve çinko büyük miktarlarda bulunur. Buğday çimi, diğer diyetlerde görülmeyen 20 farklı amino asit ve yüzlerce enzime sahiptir. Ayrıca yüksek miktarlarda E vitamini, C vitamini, karoten ve tokoferoller de içerir (9). Genel olarak, buğday çimindeki biyolojik olarak aktif bileşikler, kardiyovasküler hastalıkların, ülseratif kolit, talasemi, karaciğer hasarı, diyabet, kanser ve alerjinin iyileştirilmesine ve önlenmesine de katkıda bulunur (12).

Bu çalışmada, buğday çim ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin analizi ve kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Buğday Çim Ekstraktı Hazırlığı ve Fenolik Bileşen Analizi

Bu çalışmada, çimlendirme ve ekstraksiyon yönteminde bazı modifikasyonlar uygulanarak aşağıdaki adımlar takip edilmiştir (7, 13).

Organik buğday taneleri (*Triticum aestivum* L.) içerisindeki istenmeyen yabancı maddelerden temizlenip, distile su ile yıkanarak hacminin yaklaşık 3 katı kadar su içerisinde 8-10 saat boyunca bekletildi ve suyu süzildükten sonra yıkanarak petri kaplarında kurutma kâğıtları arasına yerleştirilmiş bir şekilde su ile ıslatılarak $20\pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 10 gün boyunca çimlendirilmesi takip edildi ve tohumların kurumamasına özen gösterildi. Buğday çimleri taze şekilde kesilerek 15 gr olacak şekilde tartıldı ve distile su ile yıkandı. Daha sonra üzerine 120 mL metanol (Merck, Almanya) eklenerek homojenize edildi ve ultrasonik banyoda 1 saat boyunca bekletildi. Ekstrakt Whatman 1 nolu filtre kağıdından süzülüp 40°C 'de evapore edildi. Ekstrakt evapore edilmesinin ardından içerisine 5 mL metanol eklenerek çözünmesi sağlandı. Çözünen bu karışımdan HPLC analizi 20 µl kullanıldı. Fenolik bileşik içeriklerinin tespiti için 278 nm dalga boyu, 0,8 mL/dk akış hızı ve Agilent Eclipse XDB C18 (4,6x250 mm) (5 µm) ters faz kolonu kullanıldı. Kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlendi. Ayırma, bir gradyan programı kullanılarak ikili çözücüler sistemi ile gerçekleştirildi. A çözültisi yüzde üç asetik asit ve B çözültisi metanol içermekteydi.

Hücre kültürü için metanol ekstraktının evapore edilmesinin ardından, tartılan 0.4 gr kuru ekstrakt, RPMI 1640 (Biological Industries, Beith Haemek, İsrail) ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonların hazırlanması sağlandı.

Kan Örneğinin Eldesi

Çalışmada 26 yaşında kadın gönüllü yer almıştır. Gönüllünün katılım kriterleri arasında sigara içmemesi, 6 ay süre boyunca radyasyona maruz kalmamış olması (radyolojik görüntüleme geçirmemiş), düzenli olarak gıda takviyesi ve herhangi bir medikal ilaç kullanmaması ve bilenen bir rahatsızlığı olmaması kriterleri yer almaktadır. Çalışmaya katılım sağlayan gönüllüden lityum heparinli tüplere (vacu SEL, Türkiye) 20 mL kan örneği alınmıştır. Çalışma Helsinki Bildirgesi kurallarına uygun olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır (02.11.2022-2022/19).

Lenfosit Hücrelerinin Eldesi

Lenfositlerin eldesi için kan örnekleri ilk işlem olarak 1:1 oranında RPMI 1640 ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışım tekrar 1:1 oranında olacak şekilde yavaşça histopak-1077 (Sigma-Aldrich, İsviçre) üzerine eklenmiş ve 2000 rpm'de 4°C 'de 20 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Alınan lenfosit tabakası yeni tüpler içerisinde RPMI 1640 medyumunu ile homojen hale getirilerek 2500 rpm'de 4°C 'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası süpernatant kısım uzaklaştırıldı.

rılarak bu aşama tekrar edildi. Elde edilen hücrelerin canlılığı tripan mavisi kullanılarak %98 oranında belirlenmiştir (14).

Hücre Kültürü

Elde edilen lenfosit hücreleri 96 kuyucuklu mikropalakalara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde eklendi. Hücre kültürü ortamı RPMI-1640, penisilin (100 IU/mL), streptomisin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ve %10 fetal bovin serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) içerecek şekilde hazırlandı. Bu medyumda hücreler 37°C'de 5% CO₂ içeren ve nemli ortamda 24 saat kültüre edildi (15).

Lenfositler'lere Farklı Konsantrasyonlarda Buğday Çimi Ekstraktı, Etoposid Ve Sisplatin Uygulanması

Hücrelerin inkübasyonundan sonra kuyucuklara buğday çimi ekstraktından 39.05, 78.1, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500 µg/mL, sisplatin'ten (Koçak Farma, Türkiye) 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL, etoposid'den (Koçak Farma, Türkiye) 11.71, 23.43, 46.87, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500 µg/mL ve negatif kontrol grupları olacak şekilde uygulandı. Her konsantrasyon olası bir hatayı engellemek üzere üç tekrarlı olarak çalışıldı. Hücrelerin ekstraktla ve ilaçlarla 37 °C'de 5% CO₂ içeren ve nemli ortamda 24 saat kültür edilmesini takiben son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) solüsyonu eklendi. Mikropalakanın 4 saat 37 °C'de 5% CO₂ içeren etüvde inkübasyonu sonrası inverted mikroskop altında hücreler incelendi. Daha sonra tüm medyum alınarak 200 µL DMSO eklendi. Mikropalte okuyucu ile 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü (16).

Comet Yöntemi

Comet uygulaması Singh et al. (1988) referans alınıp (14) ve bazı adımların modifikasyonları ile aşağıdaki şekilde uygulandı;

Comet çalışması için kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich olarak kullanılmıştır. Elde edilen lenfositlerden oluşturulan çalışma grupları; buğday çimi IC₅₀ ve etoposid LD₅₀ konsantrasyon değerleri, buğday çimi IC₅₀ ve sisplatin LD₅₀ konsantrasyon değerleri, negatif ve pozitif kontrol olmak üzere 96 kuyucuklu mikropalakalarda 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 1 saat 37 °C'de 5% CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Pozitif kontrol grupları sisplatin ve etoposid için belirlenen LD₅₀ konsantrasyon değerleri kullanılırken, negatif kontrol grubu için hiçbir etken madde olmadan hücreler inkübe edildi. Daha sonra hücreler 4 °C, 2500 RPM'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve bu aşama PBS

(fosfat tampon tuzu) ilave edilerek tekrarlandı. Yıkama sonrası hücreler 37 °C'de yaklaşık 1 saat bekletildi. Daha önceden hazırlanmış olduğumuz %0,7'lik düşük erime noktalı agarozdan 100 µL (Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), hücre süspansiyonundan 20 µL karıştırıldı. Bu karışım yine daha önceden hazırlanan %1 normal erime noktalı agaroz (Serva Electrophoresis, Almanya) üzerine yayıldı. Lamlar 4 °C'de 60 dakika boyunca; pH: 10, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %10 DMSO ve %1 Triton X-100 olarak hazırlanmış lizis tamponunda bekletildi. Sürenin tamamlanması sonrasında lamlar; pH: 13, 300 M NaOH, 1 mM EDTA olacak şekilde hazırlanmış soğuk elektroforez tamponunda karanlık ortamda 30 dakika boyunca bekletildi ve sonrasında 4 °C'de 30 dakika boyunca 25 V'de elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez işlemi ardından lamlar nötralizasyon tamponu ile yıkandı. 20 µg/mL etidyum bromür ile boyanan lamlar Zeiss Imager A1 floresan mikroskopu ve Zeiss Axiocam Icc 1 kamera ile rastgele seçilen 50 hücrenin fotoğrafı çekildi. OpenComet programı ile fotoğrafı çekilen hücrelerin DNA hasar tespiti gerçekleştirildi. DNA hasarı parametresi olarak kuyruk DNA yüzdesi kullanıldı.

İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar SPSS v20 programında one-way Anova (Tukey) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Konsantrasyon-canlılık grafiği, IC₅₀ ve LD₅₀ değerleri GraphPad Prism 5 programı ile normalize edilerek belirlendi.

Bulgular

HPLC analizine ait standart ve numune kromatogramları şekil 1'de gösterilmiştir. Analizi yapılan 22 adet fenolik bileşen sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma sonucumuzda p-hidroksibenzoik asit en yüksek miktarda, o-kumarik asit ise en düşük düzeyde tespit edilmiştir.

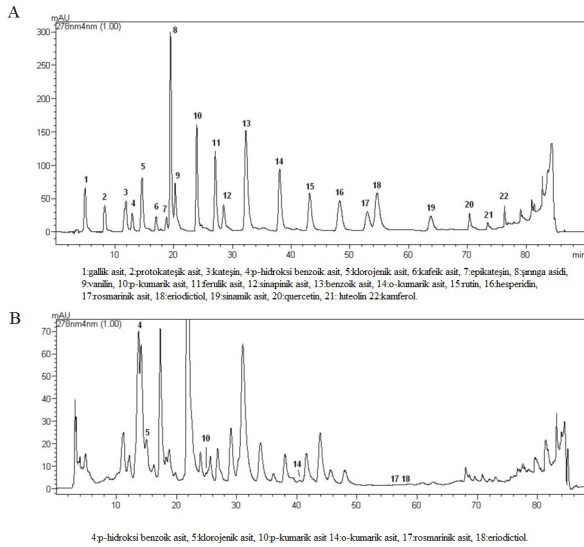
Konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin canlılık değerleri hesaplanmış ve buğday çimi ekstraktı için IC₅₀=204,6 µg/mL, etoposid için LD₅₀=15,84 ve sisplatin için LD₅₀=24,51 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlara ait grafik şekil 2'de gösterilmiştir.

Comet analizinde lenfositlere farklı dozlarda uygulanan; kontrol grubu, buğday çim suyu (IC₅₀) grubu, sisplatin (LD₅₀) grubu, sisplatin (LD₅₀) ile buğday çim suyu (IC₅₀) grubu, etoposid (LD₅₀) grubu, etoposid (LD₅₀) grubu ile buğday çim suyu (IC₅₀) grubu yer almaktadır. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve buğday çim suyu arasında, etoposid ve

Tablo 1 Fenolik bileşen analiz sonuçları

Fenolik Bileşenler	<i>Triticum aestivum</i> L. (µg/gr)	Fenolik Bileşenler	<i>Triticum aestivum</i> L. (µg/gr)
Gallik asit	*	Sinapinik asit	*
Protokateşik asit	*	Benzoik asit	*
Kateşin	*	o-kumarik asit	0,8
p-hidroksibenzoik asit	75,5	Rutin	*
Klorojenik asit	41,2	Hesperidin	*
Kafeik asit	*	Rosmarinik asit	1,5
Epikateşin	*	Eriodictiol	2,7
Siringik asit	*	Sinamik asit	*
Vanilin	*	Quercetin	*
p-kumarik asit	1,1	Luteolin	*
Ferulik asit	*	Kamferol	*

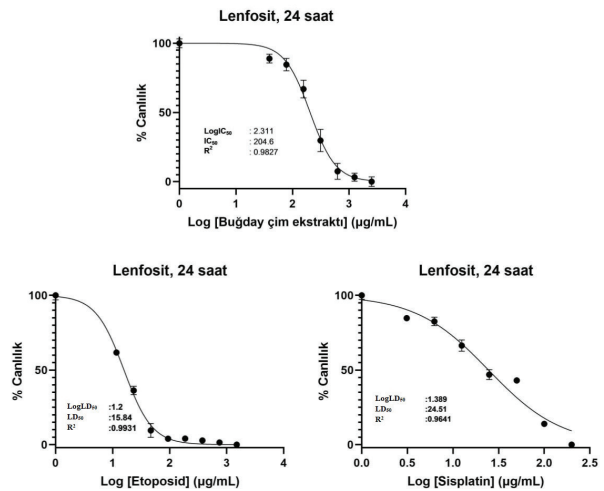
*:tespit edilemedi.



Şekil 1:

A. Standart kromatogramı. B. Numune kromatogramı.

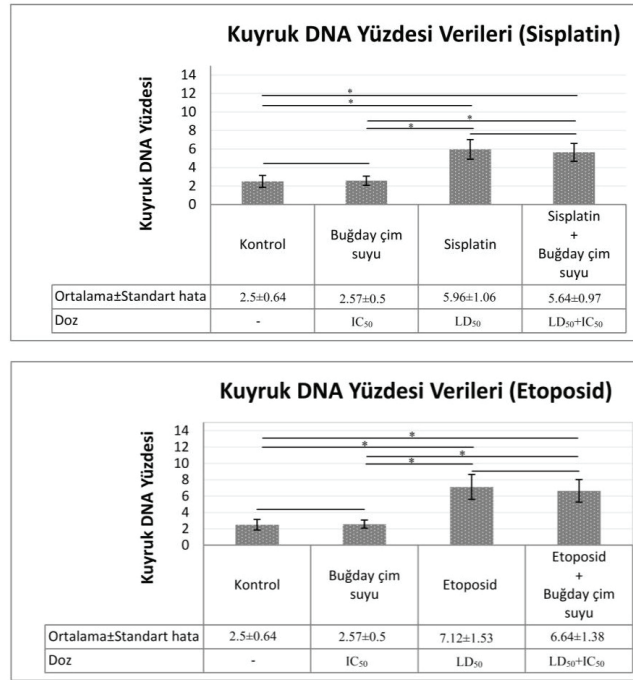
etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında, sisplatin ve sisplatin ile buğday çim suyu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamazken ($p>0,05$), kontrol grubuna karşı sisplatin grubu, sisplatin ile buğday çim suyu grubu, etoposid grubu, etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında, buğday çim suyu grubuna



Şekil 2:

Hücre canlılık (%) - konsantrasyon eğrisi

karşı sisplatin grubu, sisplatin ile buğday çim suyu grubu, etoposid grubu, etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p<0,05$). Comet analizine ait sonuçlar şekil.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3
Comet analizine ait veriler

Tartışma

Bu çalışmada, buğday çim ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin saptanması ve bu ekstraktın kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarını üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Buğday çimi sularının bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri, özellikle bitki rengi, kuru maddeler, çözünür katılar, proteinler, toplam fenolikler ve flavonoidler, C vitamini, antioksidanlar ve mineral içeriği gibi özellikler açısından önemli ölçüde değişiklik gösterebilir (17, 18). Buğday çimi sularının bu özellikleri, kullanılan buğday çimi türü, genetik, agronomik ve çevresel koşullar, pH, ışık yoğunluğu, ışığa maruz kalma türü, sıcaklık ve bitki tarafından kökler yoluyla emilen mineraller gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (18).

Fenolik bileşikler flavonoidler ve fenolik asitler olarak sınıflandırılır. Yapılan çalışmalarda buğday çimi suyu tanımlanan fenolikler bileşenler; kateşin, epikateşin, rutin, kuersetin, izokuersetin, apigenin-7-glukozit, apigenin, viteksin, izoviteksin, kaempferol, luteolin, pirogallol, krizin, vanilik asit, ellagik asit, gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, siringik asit, ferulik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, skopoletin, sinapik asit ve ros-

marinik asit olarak belirlenmiş. Ayrıca polifenolik öncü bileşik olan sinamik asit ve resveratol de bulunmuştur (11, 19-24).

Bu çalışmada buğday çimine ait fenolik bileşenler; p-hidroksibenzoik asit 75,5 µg/gr, klorojenik asit 41,2 µg/gr, eriodictiol 2,7 µg/gr, rosmarinik asit 1,5 µg/gr, p-kumarik asit 1,1 µg/gr, o-kumarik asit 0,8 µg/gr olarak bulunmuştur.

Buğday çiminden elde edilen metanol ekstratı ile Hep2 hücre hattının 48 saat kültüre edilmesi ile yapılan bir çalışmada IC₅₀ değeri 200 µg/mL olarak bulunmuştur (25). Yapılan bir başka çalışmada HL60 ve kan hücrelerini buğday çiminin 0.5-17.5 µg/mL değişen konsantrasyon ve 24, 48, 72 saat olarak kültüre edilmiş ve çalışma sonucunda herhangi bir sitotoksik etki görülmediği bildirilmiştir (16).

Çalışmamızda buğday çiminin lenfosit hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 204,6 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Sisplatin ile etoposid kombinasyonu bazı agresif kanser türlerine sahip hastalar için etkili bir tedavi seçeneğidir. Fakat hastalarda nefrotoksisite meydana gelmemesi için uygulanacak dozun iyi belirlenmiş olması gerekmektedir (26). Sisplatin ile etoposid ile yapılmış olan çalışmalarda LD₅₀ ve LC₅₀ değerleri farklı hücre

hatlarında ve farklı sürelerde kültür edilmesi sonucunda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan bazılarını örnek verecek olursak;

Renal hücreli karsinom kemoterapi dirençli bir yapıya sahiptir. Bu nedenle renal hücre hattında sisplatin LD₅₀ değeri 19,6 µg/mL olarak görülmüştür. Bu hücrelere NOX4 (siRNA) transfekte edildiğinde LD₅₀ değerinin 9,9 µg/mL'ye düştüğü ve böylelikle düşük dozda sisplatinin daha çok etkinlik gösterebildiği belirtilmiştir (27). Mirmalek vd. tarafından MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada sisplatin LD₅₀ değeri 20 µg/mL olarak bulunmuştur (28). Gibb vd. tarafından dört farklı hücre hattında yapılan çalışmada ise sisplatine ait LD₅₀ değerleri OVCAR-3, 5 µg /mL, SKOV-3, 5 µg/mL, UL-1, 7 µg/mL, and UL-2, µg/mL olarak bulunmuştur (29). Hosoyamada vd. tarafından yapılan bir başka çalışma da S3 hücre hattının sisplatin ile 20 saat inkübasyonunda LD₅₀: 12 µg/mL, 40 saat inkübasyonunda LD50: 2,55 µg/mL olarak saptanmıştır. Ayrıca OMCD hücrelerinde 40 saat inkübasyon sonrasında LD₅₀: 8,7 µg/mL olarak belirlenmiştir (30). Sisplatin'in HepG2 hücrelerine uygulandığı bir çalışmada LD₅₀ değeri 11,06 µg/mL olarak bulunmuştur (31). HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde sisplatinin sitotoksik dozlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (32).

Örneğin 0, 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL konsantrasyon aralığında sisplatin dozlarının kullanıldığı bir çalışmada, yüksek dozların (40 ve 80µg/mL) HepG2 hücrelerinde proliferasyonu ancak % 30–40 oranında azaltabildiği belirtilmektedir (32). MCF-7 ve DA-MB-231 hücrelerinin değişen dozlarda etoposid ile 12 saat inkübe edilmesi sonucunda LD₅₀ değeri 200 µM olarak bulunmuştur (33). Astrozitom hücre hattı ile yapılan bir diğer çalışmada 24 saat kültür sonucunda etoposid'in LD₅₀ değeri 75 µg/mL olarak bulunurken 24 saat sonunda 40 µg/mL olarak bulunmuştur (34). Çalışmalar kemoterapi tedavisinin başlangıç sırasında ya da ilerleyen aşamalarında dolaşımdaki lenfosit düzeyinin azaldığını göstermektedir(35-39).

Sisplatin ve etoposid ile yapılan hücre kültürü çalışmaları hücrelerin bu ajanlarla olan etkileşim süresi arttıkça hücreler üzerindeki toksik etkisi artmaktadır. Bunun sonucunda bu ajanlarda daha az süre etkileşimde bulunan hücrelere ait LC ve LD konsantrasyon değerleri yüksek bulunurken, sürenin artması ile birlikte LC ve LD konsantrasyon değerleri daha düşük bulunmuştur (30, 34, 40).

Çalışmamızda yapmış olduğumuz 24 saatlik hücre kültürü sonucunda etoposid'e ait LD₅₀: 15,84 µg/mL, sisplatine ait LD₅₀: 24,51 µg/mL olarak bulunmuştur.

Literatürde yapılan diğer çalışmalara kıyasla bizim çalışmamızda buğday çimine ait IC₅₀, etoposid ve sisplatin'e ait LD₅₀ değerlerinin diğer çalışmalar ile benzer olmamasının nedeni farklı hücre türlerinde ve farklı inkübasyon süreleri uygulanmasından kaynaklanabilmektedir.

Çeşitli ilaç ve kimyasalların hücre toksisitesini ölçmek için MTT, XTT, ATP gibi çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Bu yöntemlere ilave olarak DNA tek iplik kırığını analiz etmeye yönelik olan ve klinik araştırmalarda da yaygın olarak kullanılabilen bir yöntem olan Comet metodudur (41). Yapılan bir çalışma sonucunda cisplatin LD₅₀ konsantrasyonu hücrelere uygulanmış olup comet skoru 13,67±2,07 olarak bulunmuştur (31). Çin hamsteri yumurtalarına uygulanan etoposid'in meydana getirdiği DNA hasarını GC-MS/MS ve Comet yöntemi ile değerlendirme sonucunda; alkalın Comet yönteminin DNA iplik kırıklarını saptayabildiği, GC-MS/MS yönteminin ise DNA lezyonlarını saptayabildiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bu iki yöntemin birlikte kullanılmasının daha kullanışlı olabileceğini de belirtmişlerdir (42).

Çalışmamız sonucunda sadece sisplatin ve etoposid uygulanan hücrelerin kontrol ve buğday çim suyu uygulanan hücrelere kıyasla DNA kuyruk yüzdesinde artış olduğu (p<0,05), sadece sisplatin ve etoposid uygulanan hücrelere kıyasla, sisplatin ve etoposid ile birlikte buğday çim suyu uygulanan hücrelerin DNA kuyruk yüzdesinde anlamlı bir azalmanın olmadığı (p>0,05) bulunmuştur.

Sonuç

Bu çalışma, buğday çimi ekstraktının, etoposid ve sisplatin kaynaklı DNA hasarı üzerindeki etkisinin bağımsızlık sisteminde yer alan lenfosit hücrelerinde incelenmiş olması nedeni ile diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Buğday çimi, etoposid ve sisplatin kaynaklı DNA hasarında azalmaya neden olmuş ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm bu değerlendirmeler sonucunda, çalışmamız hastaların demografik özelliklerinin göz önünde bulundurulmuş geniş örneklemle yapılmış klinik çalışmalar ile desteklemesinin konunun aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüştür.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (02.11.2022 tarih ve 2022/19 sayılı karar).

Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüştür.

Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Tüm veriler makalede mevcuttur.

Yazar Katkıları

OS ve ZSÖ: Çalışmanın planlanması; Metodoloji; Araştırma; Formal Analizler; Makalenin Yazımı, Görüşleme.

PAK: Çalışmanın planlanması; Metodoloji; Araştırma; Validasyon; Makalenin düzenlenmesi.

Kaynaklar

- Rommasi F, Esfandiari N. Liposomal nanomedicine: applications for drug delivery in cancer therapy. *Nanoscale Research Letters*. 2021;16(1):1-20.
- Sun C-Y, Zhang Q-Y, Zheng G-J, Feng B. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:518-27.
- Fang C-y, Lou D-y, Zhou L-q, Wang J-c, Yang B, He Q-j, et al. Natural products: Potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021;42(12):1951-69.
- Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of experimental pharmacology*. 2021;13:303.
- Kim SS, Wengier DL, Ragland CJ, Sattely ES. Transcriptional Reactivation of Lignin Biosynthesis for the Heterologous Production of Etoposide Aglycone in *Nicotiana benthamiana*. *ACS synthetic biology*. 2022;11(10):3379-87.
- Zhang W, Gou P, Dupret J-M, Chomienne C, Rodrigues-Lima F. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Translational oncology*. 2021;14(10):101169.
- Gore RD, Palaskar SJ, Bartake AR. Wheatgrass: Green blood can help to fight cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2017;11(6):ZC40.
- Adams M, Jewell A. The use of complementary and alternative medicine by cancer patients. *International Seminars in Surgical Oncology*. 2007;4:10.
- Hassan N, Siddique MS. Wheat Grass (*Triticum aestivum* L.) Benefits Health in a Pandemic Scenario. *Journal of Research in Applied Sciences and Biotechnology*. 2022;1(1):24-9.
- Patel JB. Anticancer & cytotoxic potential of aqueous extract of *Triticum aestivum* on hela cell line. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2016;6(3):84-9.
- Kaur N, Singh B, Kaur A, Yadav MP, Singh N, Ahlawat AK, et al. Effect of growing conditions on proximate, mineral, amino acid, phenolic composition and antioxidant properties of wheatgrass from different wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2021;341:128201.
- Garg M, Sharma A, Vats S, Tiwari V, Kumari A, Mishra V, et al. Vitamins in cereals: a critical review of content, health effects, processing losses, bioaccessibility, fortification, and biofortification strategies for their improvement. *Frontiers in nutrition*. 2021;8:254.
- Caponio F, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*. 1999;64(2):203-9.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
- Molaae N, Mosayebi G, Pishdadian A, Ejtehadifar M, Ganji A. Evaluating the proliferation of human PeripheralBlood mononuclear cells using MTT assay. *International Journal of Basic Science in Medicine*. 2017;2(1):25-8.
- Alitheen NB, Oon CL, Keong YS, Chuan TK, Li HK, Yong HW. Cytotoxic effects of commercial wheatgrass and fiber towards human acute promyelocytic leukemia cells (HL60). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;24(3): 243-250
- Ghumman A, Singh N, Kaur A. Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International journal of food science & technology*. 2017;52(10):2191-200.
- Rodríguez FC, Gallagher E, Rai DK, Burgess CM. Nutritional and physiochemical properties of wheatgrass juice and preservation strategies. *Food Chemistry Advances*. 2022:100136.
- Choi M-H, Lee MY, Yang S-H, Shin H-J, Jeon YJ. Hydrophobic fractions of *Triticum aestivum* L. extracts contain polyphenols and alleviate inflammation by regulating nuclear factor-kappa B. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2021;26(1):93-106.
- Rosa L, Moreno-Escamilla J, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic compounds. *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. 2019:253-71.
- Eissa HA, Mohamed SS, Hussein A. Nutritional value and impact of wheatgrass juice (Green Blood Therapy) on increasing fertility in male albino rats. *Bulletin of the National Research Centre*. 2020;44(1):1-11.
- Hebbani AV, Bulle S, Kanu VR, Balachandrababu Malini A, Reddy VD, Chakravarthula VN. Nephro-protective activity of wheatgrass juice against alcohol-induced oxidative damage in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2020;30(9):679-86.
- Skoczylas Ł, Korus A, Tabaszewska M, Gędoś K, Szczepańska E. Evaluation of the quality of fresh and frozen wheatgrass juices depending on the time of grass harvest. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;42(1):e13401.
- Thakur N, Dhaliwal HS, Sharma V. Qualitative and Quantitative RP-HPLC-PDA Method of Analysis of Polyphenols in Lyophilized Wheat Seedling Juice Powder. *International Journal on Emerging Technologies* 11(2): 36-43
- Shakya G, Balasubramanian S, Rajagopalan R. Methanol extract of wheatgrass induces G1 cell cycle arrest in a p53-dependent manner and down regulates the expression of cyclin D1 in human laryngeal cancer cells-an in vitro and in silico approach. *Pharmacognosy Magazine*. 2015;11(42):139.
- Fjällskog MLH, Granberg DP, Welin SL, Eriksson C, Öberg KE, Janson ET, et al. Treatment with cisplatin and etoposide in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2001;92(5):1101-7.
- Maranchie JK. Silencing of Nox4 enhances cisplatin chemosensitivity of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 2008;179(4S):37-37.
- Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cancer cell international*. 2015;16(1):1-9.

29. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gerçel-Taylor Ç. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic oncology*. 1997;65(1):13-22.
30. Hosoyamada M, Obinata M, Suzuki M, Endou H. Cisplatin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV40 large T-antigen gene. *Archives of toxicology*. 1996;70(5):284-92.
31. Hazman Ö, Evin H, Bozkurt MF, Cığerci İH. Hazman, Ömer, et al. "Two faces of arbutin in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells: Anticarcinogenic effect in high concentration and protective effect against cisplatin toxicity through its antioxidant and anti-inflammatory activity in low concentration. *Biologia*. 2022; 77 :225–239
32. Shu X, Fan C, Long B, Zhou X, Wang Y. The anti-cancer effects of cisplatin on hepatic cancer are associated with modulation of miRNA-21 and miRNA-122 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(21):4459-65.
33. Parihar A, Parihar MS, Ghafourifar P. Significance of mitochondrial calcium and nitric oxide for apoptosis of human breast cancer cells induced by tamoxifen and etoposide. *International journal of molecular medicine*. 2008;21(3):317-24.
34. Ardeshiry LA, Rezaie TM, Mortazavi SA, Barzegar M, Moghadamnia SH, Rezaee MB. Study of anti cancer property of *Scrophularia striata* extract on the human astrocytoma cell line (1321). 2010; 9 (4): 403-410.
35. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, Granstam-Björneklett H, Helander I, Lekander M, et al. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo-and radiotherapy. *British journal of cancer*. 2007;97(1):105-11.
36. Wijayahadi N, Haron M, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *Journal of chemotherapy*. 2007;19(6):716-23.
37. Murta EFC, de Andrade JM, Falcio RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori Journal*. 2000;86(5):403-7.
38. Sabbioni ME, Bernhard J, Siegrist H-P, Schmitz S-FH, Gertsch MC, Thürlimann B, et al. Does subjective burden of early breast cancer and its treatment affect immune measures during adjuvant therapy? *Breast cancer research and treatment*. 2004;87(1):75-86.
39. Onyema OO, Decoster L, Njemini R, Forti LN, Bautmans I, De Waele M, et al. Chemotherapy-induced changes and immunosenescence of CD8+ T-cells in patients with breast cancer. *Anticancer research*. 2015;35(3):1481-9.
40. Kumar A, Fillmore HL, Kadian R, Broaddus WC, Tye GW, Van Meter TE. The Alkylphospholipid Perifosine Induces Apoptosis and p21-Mediated Cell Cycle Arrest in Medulloblastoma Perifosine Induces Apoptosis and Mitotic Arrest. *Molecular Cancer Research*. 2009;7(11):1813-21.
41. Suman G, Jamil K. Application of human lymphocytes for evaluating toxicity of anti-cancer drugs. *Int J Pharmacol*. 2006;2(4):374-81.
42. Atha DH, Coskun E, Erdem O, Tona A, Reipa V, Nelson BC. Genotoxic effects of etoposide, bleomycin, and ethyl methanesulfonate on cultured CHO cells: Analysis by GC-MS/MS and comet assay. *Journal of nucleic acids*. 2020;2020:1-10