

# Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Klorojenik Asit (Cga) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma

Investigation of Chlorogenic Acid (Cga) as An Antioxidant in Renal  
Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study

Derya Guzel<sup>1</sup>, Ayhan Tanyeli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., Sakarya

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., Erzurum

Yazışma Adresi / Correspondence:

**Ayhan Tanyeli**

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., Erzurum

T: +90 507 363 16 54 E-mail: dratanyeli@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.05.2018 Kabul Tarihi / Accepted : 31.05.2018

## Öz

Amaç	Bu çalışma, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek iskemii-reperfüzyon (İR) hasarında güçlü antioksidan olan Klorojenik asitin (CGA) antiinflatuar ve antioksidan etkilerini araştırmayı hedeflemektedir. <b>Sakarya Tıp Dergisi, 2018, 8(2):410-415</b>
Gereç ve Yöntem	Otuз altı adet erişkin, Wistar albino cinsi dişi sıçan, rastgele dört gruba ayrıldı. Sham grubundaki sıçanlar (Grup I), sırt bölgesinden açılarak sağ nefrektomi yapıldı. İskemi-reperfüzyon grubunda (Grup II), sıçanların sırt bölgesi açılıp sağ nefrektomi yapıldıktan sonra sol renal arter kleplendi. Grup III 'te 5 mg/kg CGA iskemiden 10 dk önce ve reperfüzyondan 10 dk önce olmak üzere iki doz şeklinde intraperitoneal olarak uygulandı. Sol böbreğe 1 saatlik iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulandı. Grup IV'te Grup III'ten farklı olarak 10 mg/kg CGA uygulandı. Böbrek dokusunda total antioksidan düzeyi (TAS), total oksidan düzeyi (TOS), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO) seviyeleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı.
Bulgular	Grup II'de Grup I'e göre TOS, MDA ve MPO düzeylerinin arttığı; TAS ve SOD düzeylerinin ise azaldığı görüldü (her bir parametre için p<0.001). CGA uygulanan gruplarda böbrek TOS, MDA ve MPO (her bir parametre için p<0.001) düzeylerinde azalma; TAS (p<0.05) ve SOD (p<0.001) değerlerinde ise artış tespit edildi.
Sonuç	Böbrek İR hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve bu hasara karşı CGA uygulamasının oksidatif hasan belirgin olarak azalttığı görüldü.
Anahtar Kelimeler	Klorojenik Asit; İskemi Reperfüzyon Hasarı; Böbrek.

## Abstract

Purpose	This study aims to investigate the antiinflammatory and antioxidant effects of chlorogenic acid (CGA), a potent antioxidant in experimental kidney ischemia-reperfusion (IR) injury in rats. ( <b>Sakarya Med J, 2018, 8(2):410-415</b> ).
Materials and Methods	Thirty-six adult, female Wistar Albino rats, were randomly assigned to four groups. Rats in the sham group (Group I) were opened through the dorsal area and right nephrectomy was performed. In the ischemia-reperfusion group (Group II), the left renal artery was clamped after the dorsal area of the rats was opened and right nephrectomy was performed. In Group III, 5 mg / kg CGA was administered intraperitoneally as two doses, 10 minutes before ischemia and 10 minutes before reperfusion. After 1 hour of ischemia, 24 hours of reperfusion was applied to the left kidney. In Group IV, 10 mg / kg of CGA was administered differently from Group III. Total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) level of renal tissues were measure spectrophotometrically. Oxidative stress index (OSI) was calculated.
Results	In comparison to Group 1, Group 2 had elevated TOS, MDA and MPO levels; meanwhile TAS and SOD levels were observed to have decreased.( p<0.001 per parameter). Groups with Chlorogenic acid applied to the kidneys had decreased levels of TOS, MDA and MPO (p<0.001 per parameter); and increased levels of TAS (p<0.05) and SOD (p<0.001).
Conclusion	The important role of oxidative stress in Renal IR damage, and the decrease in oxidative stress in the application of CGA against the damage, has been observed.
KeyWords	Chlorogenic Acid; Ischemia-Reperfusion Injury; Kidney

## Giriş

Akut böbrek hasarı yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Böbrek perfüzyonunun bozulduğu; böbrek transplantasyonu, kardiopulmoner cerrahi işlemler, kazalar veya iyatrojenik travma gibi nedenlerle oluşabilir.<sup>1</sup> Reperfüzyon ile iskemik dokunun yeniden kanlanması sonrası beklenenin aksine doku daha fazla hasara uğrayabilir. İskemi reperfüzyon (IR) hasarı, akut renal hasara en sık sebep olan durumdur. IR ile meydana gelen inflamasyon, akut renal hasarın patofizyolojisinde major rol oynar. IR böbrek dokusunda mikrovasküler hasar ve akut inflamatuvar değişimlere neden olarak renal disfonksiyona sebep olur.<sup>2</sup> IR ile oluşan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi moleküller böbrek hasarında rol oynar.<sup>3</sup> Bu inflamatuvar değişimler artmış lökosit adezyonu sonucu endotel aktivasyonu ve hasarı ile sonuçlanır.<sup>4</sup>

Akut renal hasara karşı doku tamiri için endojen antioksidan savunma sistemleri devreye girer ancak, hasarın yoğun olduğu durumlarda bu koruyucu sistemler yetersiz kalabilir. Eksojen anti-inflamatuvar-antioksidan moleküllerin renal IR hasarının önlenmesi üzerinde koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir.<sup>5,6</sup> Klorojenik asit (CGA) biyolojik olarak aktif fitokimyasal bir maddedir ve en yoğun olarak kahvede bulunur. CGA'nın antioksidan özellikleri bazı deneysel çalışmalarda gösterilmiş, serbest radikal süpürücü ve metal şelatlama aktivitelerine sahip olduğu ve bu sayede düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu ve DNA'nın oksidatif hasarlarını bastırdığı kanıtlanmıştır.<sup>7</sup> CGA'nın interlökin-1beta (IL-1 ) aracılı endotelial disfonksiyonu da inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>8</sup> Bu çalışmanın amacı, CGA'nın IR ile ilişkili renal oksidan hasar üzerindeki etkilerini biyokimyasal yöntemlerle araştırmaktır.

## Gereç Ve Yöntem

### Deney Hayvanları:

Çalışmamızda Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından yetişkin otuz altı adet Wistar albino dişi sıçan (12-16 haftalık 200-250 gr.) temin edildi. Sıçanlar, su ve standart sıçan yemi ile ad libitum beslendi. 12 saat aydınlık karanlık siklusu olan ortamda tutuldu.

### Deney Protokolü ve Deney Gruplarının Oluşturulması:

Hayvanlar her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba bölündü. Sıçanlara yapılan deneysel uygulamalar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (75 mg/kg) ve ksilazin (8 mg/kg) anestezisi altında yapıldı.

Grup I (Sham Kontrol, n=8): Deney hayvanları sırt bölgesinden açılıp sağ nefrektomi yapıldıktan sonra sırt bölgeleri kapatıldı.

Grup II (İskemi-reperfüzyon, n=8): Sıçanların sırt bölgesi açılıp sağ nefrektomiden sonra sol renal arter kleplendi.. Sol böbreğe 1 saatlik iskemiden sonra 24 saatlik reperfüzyon uygulandı.

Grup III (İskemi-reperfüzyon + 5 mg/kg Klorojenik asit, n=8): Klorojenik asit salinde çözüldü. Grup II'deki cerrahi işlemlere ek olarak 5 mg/kg Klorojenik asit iskemiden 10 dk önce ve reperfüzyondan 10 dk önce olmak üzere iki doz şeklinde sıçanlara uygulandı.

Grup IV (İskemi-reperfüzyon + 10 mg/kg Klorojenik asit, n=8): Grup II'deki cerrahi işlemlere ek

olarak 10 mg/kg Klorojenik asit iskemiden 10 dk önce ve reperfüzyondan 10 dk önce olmak üzere iki doz şeklinde sıçanlara uygulandı. Tüm gruplarda 24 saatlik reperfüzyon sonrası deney hayvanları sakrifiye edilerek böbrek dokuları analiz gününe kadar -80 derecede saklandı.

### **Biyokimyasal analizler:**

Analiz için dokulara fosfat tamponu ilave edilerek %10'luk homojenat oluşturuldu ve buz üzerinde 1-2 dakika 12,000 rpm'de homojenleştirildi (IKA, Almanya). Homojenat doku örnekleri, süpernatantı elde etmek için 5000 rpm'de 30 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, TAS, TOS, SOD, MPO ve MDA seviyeleri için test edildi.

Homojenattaki malondialdehit (MDA) seviyeleri, Ohkawa ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak analiz edildi.<sup>9</sup> Total antioksidan düzeyi (TAS, Rel Assay Diagnostics, Ref. No. RL0024) ve Total oksidan düzeyi (TOS, Rel Assay Diagnostics, Ref.No.:RL0005) analizi ticari kitleler kullanılarak yapıldı. Oksidatif stress indeksi (OSI) belirtilen formül ile hesaplandı:  $OSI = \frac{[TOS, mmol H_2O_2 \text{ eşdeğer} / L]}{[TAS, mmol Trolox \text{ eşdeğeri} / L]} \times 10$ .<sup>10</sup>

Myeloperoksidaz (MPO), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) varlığında MPO ve o-dianisidin oksidasyonunun sonucu olarak şekillenen sarımsı-turuncu renkli kompleks formun 460 nm dalga boyunda absorbansın kinetik ölçümü esas alınarak yapıldı. SOD, enzimatik reaksiyonların sonucu olarak oluşan süperoksida süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisinin yetersiz olduğu durumlarda, spektrofotometrede 560 nm dalga boyundaki bu reaksiyonun inhibisyon derecesini ölçerek formazan boyası oluşturmak üzere tetrazolyum tuzu ile reaksiyona sokulduktan sonra hesaplandı.<sup>11</sup>

### **İstatistiksel Analiz Yöntemleri:**

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21.0 programı (SPSS Inc. and Lead Tech. Inc. Chicago. USA) kullanılarak yapıldı. İki grup arasındaki farkın anlamlılık derecesi Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Veriler ortalama±SD olarak sunuldu. İstatistiksel değerlendirmede p<0.05 ise anlamlı kabul edildi.

### **Bulgular**

Deneyssel uygulamalar tüm gruplarda iyi tolere edildi ve deney hayvanı kaybı yaşanmadı. Renal iskemide reperfüzyon yapılan Grup-II'de TAS (2.718±0.184'den 1.593±0.135'e, p=0.000) ve SOD (464.758±40.009'den 219.850±18.734'e, p=0.000) seviyesi düşerken, TOS (6.664±0.584'den 10.892±1.366'e, p=0.000), OSI (0.245±0.021'den 0.688±0.108'e; p=0.000), MPO (29882.638±3556.816'den 59098.012±10120.835'e, p=0.000) ve MDA (73.048±8.629'den 109.290±6.854'e, p=0.000) seviyeleri arttı.

Kontrol grubu Grup III ile karşılaştırıldığında; TAS (2.718±0.184'den 2.397±0.206'e, p=0.036) ve SOD (464.758±40.009'den 371.706±20.226'e, p=0.000) düşerken, TOS (6.664±0.584'den 8.160±0.704'e, p=0.000), OSI (0.245±0.021'den 0.342±0.036'e; p=0.000), MPO (29882.638±3556.816'den 38516.028±6619.620'e, p=0.006) ve MDA (73.048±8.629'den 79.660±9.522'e, p=0.000) seviyeleri arttı. Kontrol grubu Grup IV ile karşılaştırıldığında; TOS (6.664±0.584'den 7.326±0.544'e, p=0.034) ve OSI (0.245±0.021'den 0.279±0.039'e; p=0.000) seviyeleri arttı.

5 mg/kg Klorojenik asit uygulanan Grup III Grup II ile karşılaştırıldığında; TAS (1.593±0.135'den 2.397±0.206'e, p=0.000) ve SOD (219.850±18.734'den 464.758±40.009'e, p=0.000) artarken, TOS (10.892±1.366'den 8.160±0.704'e, p=0.000), OSI (0.688±0.108'den 0.342±0.036'e; p=0.000) MPO (59098.012±10120.835'den 38516.028±6619.620'e, p=0.000) ve MDA (109.290±6.854'den 79.660±9.522'e, p=0.000) seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişti.

10 mg/kg Klorojenik asit uygulanan Grup IV Grup II ile karşılaştırıldığında; TAS (1.593±0.135'den 2.653±0.279'e, p=0.000) ve SOD (219.850±18.734'den 442.253±46.031'e, p=0.000) artarken, TOS (10.892±1.366'den 7.326±0.544'e, p=0.000), OSI (0.688±0.108'den 0.279±0.039'e; p=0.000), MPO (59098.012±10120.835'den 30689.666±5454.289'e, p=0.000) ve MDA (109.290±6.854'den 74.539±8.749'e, p=0.000) seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişti (Tablo-1).

**Tablo-1: Deney grupları arasındaki biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması**

Deney Grupları n=8	TAS (mmol/L) ort±S.D	TOS (µmol/L) ort±S.D	OSI (arbitrary unit) ort±S.D	SOD (U/mg protein) ort±S.D	MPO (U/g protein) ort±S.D	MDA (µmol/g protein) ort±S.D
Grup I (Sham Kontrol)	2.718±0.184	6.664±0.584	0.245±0.021	464.758±40.009	29882.638±3556.816	73.048±8.629
Grup II (İskemi- reperfüzyon)	1.593±0.135	10.892±1.366	0.688±0.108	219.850±18.734	59098.012±10120.835	109.290±6.854
Grup III (İskemi- reperfüzyon + 5 mg/kg Kloro- jenik asit)	2.397±0.206	8.160±0.704	0.342±0.036	371.706±20.226	38516.028±6619.620	79.660±9.522
Grup IV (İskemi- reperfüzyon + 10 mg/kg Klorojenik asit)	2.653±0.279	7.326±0.544	0.279±0.039	442.253±46.031	30689.666±5454.289	74.539±8.749
p değeri (gruplar arası anlamlılık)	0.000 (I-II) 0.000 (II-III) 0.036 (II-IV) 0.006(I-III)	0.000 (I-II) 0.000 (II-III) 0.000(II-IV) 0.000 (I-III) 0.034(I-IV)	0.000(I-II) 0.000 (II-III) 0.000 (II-IV) 0.000 (I-III) 0.049(I-IV)	0.000 (I-II) 0.000 (II-III) 0.000 (II-IV) 0.000 (I-III)	0.041(I-II) 0.000 (II-III) 0.000 (II-IV) 0.006(I-III)	0.000 (I-II) 0.000 (II-III) 0.000 (II-IV)

TAS = Total Antioksidan Düzeyi; TOS = Total Oksidan Düzeyi; OSI = Oksidatif Stres İndeksi; SOD= Süperoksit Dismutaz; MPO= Myeloperoksidaz; MDA= Malondialdehit. Ort±S.D: Ortalama ve Standart s-Sapma Değeri; N: Sayı.

## Tartışma

Sunulan bu çalışma ile literatürde ilk olarak; renal iskemi reperfüzyonun dokuda oksidatif dengeyi oksidan lehine bozduğu durumda in vivo klorojenik asit uygulamasının oluşan oksidatif hasarı düzelttiği spektrofotometrik yöntemlerle kanıtlandı.

İskemi reperfüzyon hasarı geniş kapsamlı klinik bir durumdur. Miyokard infarktüsü, inme, organ transplantasyonu, kardiyovasküler cerrahi hastalıklar, doku- flep ve reimplantasyonu iskemi-reperfüzyon hasarı ile karşılaşılabilen klinik durumlara örnektir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalara göre başlıca bu hasarda varsayılan mekanizmalar lökosit-endotelyum etkileşimleri, reaktif oksijen türleri ve komplementer sistemi içerir.<sup>12</sup> Oksijen radikalleri, endojen oksijen metabolizmasının yanı sıra çeşitli faktörler nedeniyle de oluşur ve doku hasarında rol oynar. Endojen antioksidan sistemler dokuda meydana gelen hasarın giderilmesinde rol oynar ancak kan akımının tamamen kesildiği iskemi veya reperfüzyonla lökosit ve salgılanan moleküllerin yoğun göçü nedeniyle oluşan stres durumlarında yetersiz kalabilir. Besin öğelerinde doğal antioksidatif, antikarsinojen moleküller de

bulunur.<sup>13</sup> Bu nedenle, farmakolojide de önem taşıyan bazı doğal oksijen radikali toplayıcıların araştırılması yeni bir tedavi stratejisi olabilir.

Reaktif oksijen radikal türleri (ROS) düşük seviyelerde üretildiğinde, bağışıklık yanıtı, kas kasılması ve egzersiz adaptasyonu gibi çeşitli fizyolojik aktivitelere katılan önemli sinyal moleküllerini tetikler. IR patofizyolojisinde ise yoğun ROS üretimi en önemli problemlerden biridir. Oksidan hasar göstergesi olarak TOS, MPO ve MDA molekül seviyeleri yükselir.<sup>14</sup> Sunulan bu çalışmada da bu molekül seviyeleri oksidan hasar lehine yükselmiştir. ROS'tan korunmak için TAS ve SOD gibi endojen antioksidan moleküller devreye girer.<sup>12</sup> Çalışmamızda renal IR gruplarında kontrol grubuna göre bu moleküllerin seviyesinin düşmesi IR ile meydana gelen hasar nedeniyledir.

Klorojenik asit; trans-sinamik asitler (kafeik, kumarik ve ferulik asit) ile quinik asidin esterleşme reaksiyonu sonrası meydana gelir.<sup>15</sup> CGA ve izomerleri, iso-CA ve neo-CA, kahve çekirdekleri, yaban mersini, üzüm, armut ve elmada tespit edilmiştir.<sup>16</sup> CGA'nın antioksidan, serbest radikal toplayıcı, antiinflamatuvar, radyoprotektif, antiülserojenik, analjezik ve antikanserojenik özellikleri in vitro ve in vivo deneysel uygulamalarda kanıtlanmıştır.<sup>17,18</sup> Santos ve ark. sıçanlarda CGA'nın anti-inflamatuar, antinosiseptif ve antipiretik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında kontrol ile karşılaştırıldığında, bu molekülün karragenenin neden olduğu pençe ödemi inihbe ettiğini, formalinle indüklenen ağrı testinin geç fazındaki kaçınma sayısını inihbe ettiğini (50 ve 100 mg/kg dozlarında), öte yandan, en yüksek test edilen dozda bile (200 mg / kg), CGA febril yanıtı engellemediğini göstermiştir.<sup>19</sup> Endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada CGA'nın SIRT1'i aktive ederek ve AMPK / PGC-1 sinyal yolunu modüle ederek oksLDL ile indüklenen endotel oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonu azalttığı moleküler mekanizmalar gösterilmiştir<sup>20</sup>. Karaciğer fibrozişi ile ilgili yapılan deneysel bir çalışmada da CGA'nın MDA düzeyini düşürdüğü ve karaciğer dokularında GSH, SOD ve CAT düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir<sup>21</sup>. Sunduğumuz çalışma sonuçlarına göre CGA uygulanan gruplarda TAS ve SOD düzeylerinde artma gözlenirken TOS, MPO ve MDA düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Bulduğumuz bu sonuçlar literatürde CGA'nın diğer dokularda gösterilen antiinflamatuvar-antioksidan etkilerine paraleldir.

Çalışmanın kısıtlılığı olarak CGA düzeyi uzun dönem etkileri araştırılabilir. CGA'nın sistemik etkileri, uzak dokuda meydana getirdiği etkiler, in vivo ve in vitro olarak apoptoz ve DNA üzerine olası etkileri umut verici yeni çalışma konuları olarak araştırılabilir.

**SONUÇ** Sonuç olarak, Klorojenik asit, böbrek dokusunda iskemi reperfüzyon hasarı ile meydana gelen hasarı azaltarak oksidatif dengeyi yeniden organize eder. Böylece, Klorojenik asit oksidan stresin yoğun olduğu durumlarda yeni bir alternatif olabilir.

1. Fadilloğlu E, Kurcer Z, Parlakpınar H, İraz M, Gursul C. Melatonin treatment against remote organ injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. *Archives of pharmacal research*, 2008, 31: 705-712.
2. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney international*, 2004, 66: 480-485.
3. Yun Y, Duan W, Chen P, Wu H, Shen Z, Qian Z, et al. In Ischemic post-conditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats, *Transplantation proceedings*, (editör). Elsevier: 2009; 3597-3602.
4. Linas SL, Shanley PF, Whittenburg D, Berger E, Repine JE. Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1988, 255: F728-F735.
5. Lin Y, Sheng M, Ding Y, Zhang N, Song Y, Du H, et al. Berberine protects renal tubular cells against hypoxia/reoxygenation injury via the Sirt1/p53 pathway, *Journal of Natural Medicines*: 1-9.
6. Vogelaar PC, Roorda M, de Vrij EL, Houwertjes MC, Goris M, Bourma H, et al. The 6-hydroxychromanol derivative SUL-109 ameliorates renal injury after deep hypothermia and rewarming in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2018.
7. de Sotillo DVR, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2002, 13: 717-726.
8. Chang W-C, Chen C-H, Lee M-F, Chang T, Yu Y-M. Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules upregulation in IL-1-treated endothelial cells. *European journal of nutrition*, 2010, 49: 267-275.
9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
10. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 2005, 38: 1103-1111.
11. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 1988, 34: 497-500.
12. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006, 117: 1024-1033.
13. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 1983, 221: 1256-1264.
14. Avci E, Akarslan Z, Erten H, Coskun-Cevher S. Oxidative stress and cellular immunity in patients with recurrent aphthous ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014, 47: 355-360.
15. Kasai H, Fukada S, Yamaizumi Z, Sugie S, Mori H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, 38: 467-471.
16. Sondheimer E. Chlorogenic acids and related depsides. *The Botanical Review*, 1964, 30: 667-712.
17. Cinkilic N, Cetintas SK, Zorlu T, Vatan O, Yilmaz D, Cavas T, et al. Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 359-363.
18. Obboh G, Agunloye OM, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha SA. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. *Neurochemical research*, 2013, 38: 413-419.
19. Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29: 2236-2240.
20. Tsai KL, Hung CH, Chan SH, Hsieh PL, Ou HC, Cheng YH, et al. Chlorogenic Acid Protects Against oxLDL Induced Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction by Modulating SIRT1 in Endothelial Cells. *Molecular nutrition & food research*, 2018: 1700928.
21. Shi H, Shi A, Dong L, Lu X, Wang Y, Zhao J, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 2016, 35: 1366-1373.