

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KAHVE ÇEKİRDEĞİ EKSTRELERİNİN VE KAHVE
FİTOKİMYASALLARINDAN KLOROJENİK ASİT, KAFEİK ASİT,
KAFEİN VE TRİGONELLİNİN COLO-205 İNSAN KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNDE ANTİPROLİFERATİF VE ANTİTÜMÖRAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TSA-11-3616

Proje Türü: Normal Araştırma Projesi (NAP)

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr.Müberra KOŞAR
Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı

Yardımcı Araştırmacılar

Doç.Dr.Nalan İMAMOĞLU-ŞİRVANLI
Erciyes Üniv. Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı

Yrd.Doç.Dr.Haydar ÇELİK
Erciyes Üniv. Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı

Doç. Dr. Kemal SARIOĞLU
Erciyes Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Bilimleri Anabilim Dalı

Doç. Dr. M. Betül AYCAN
Erciyes Üniv. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Şubat 2014

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. GEREÇLER	11
3.2. YÖNTEM.....	11
3.2.1. Kahve Çekirdekleri Ekstrelerinin Hazırlanması	11
3.2.2. Kahve Çekirdekleri Ekstrelerinin Kafein, Trigonellin, Nikotinik Asit, Kafeik Asit ve Klorojenik Asit İçeriklerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Yöntemi ile Kantitatif Analizleri	11
3.2.3. Hücre Kültürü.....	12
3.2.4. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid) Hücre Canlılık Testi	13
3.2.5. Western Blot Yöntemi Kullanılarak Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin İfadesindeki Değişimlerin İncelenmesi	13
3.2.6. RNA İzolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi	14
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	15
4. BULGULAR	16
4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analiz Sonuçları	16
4.2. MTT Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları.....	17
4.3. Western Blot Analiz Sonuçları.....	18
4.4. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	26
6. KAYNAKLAR.....	28

**KAHVE ÇEKİRDEĞİ EKSTRELERİNİN VE KAHVE FİTOKİMYASALLARINDAN
KLOORJENİK ASİT, KAFEİK ASİT, KAFEİN VE TRİGONELLİNİN COLO-205
İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİPROLİFERATİF VE
ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Düzenli meyve ve sebze tüketiminin kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer bir takım kronik ve dejeneratif hastalık risklerini azalttığına dair güçlü bilimsel verilerin bulunuşu, son yıllarda bitkisel kaynaklı fenolik ve diğer biyoaktif bileşiklerin hastalık koruyucu etkilerine ve bu etkilerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik ilgiyi arttırmıştır. Kahve dünyada en çok tüketilen farmakolojik olarak aktif içecekler arasında yer almaktadır. Yüzlerce farklı biyoaktif kimyasal bileşenden meydana gelen ve kompleks bir karışım olan kahve önemli bir fenolik bileşik kaynağıdır ve yüksek bir antioksidan kapasiteye sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar kahve tüketiminin çeşitli kanser tiplerini, tip II diyabet, Alzheimer, Parkinson ve karaciğer hastalığı risklerini azalttığını öne sürmüştür. Proje kapsamında farklı kavrulma derecesine sahip kahve çekirdeklerinde hem kompozisyon hem de COLO-205 hücre hattında antikanser aktivite deneyleri yapılmıştır. Bu kapsamda ayrıca antikanser aktiviteden sorumlu genler de incelenmiştir. Kompozisyon analizlerinde HPLC metod, protein ve gen analizlerinde ise Western blot ve real time PCR yöntemleri kullanılmıştır. Kahve çekirdeklerinde kavrulma derecesine göre trigonellin maddesinin 3-metil pridinyum'a dönüştüğü, klorojenik asitin tamamen kaybolduğu ama kafein oranının kavrulmayla değişmediği tespit edilmiştir. COLO-205 hücre hattında yapılan antikanser araştırmalarında ise kavrulmayla sitotoksitenin arttığı ve apoptotik etkinin Bcl-2 geninin inhibisyonu üzerinden geliştiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antitümör etki, Apoptoz, Kafeik asit, Kafein, Kahve, Klorojenik asit, Kolon Kanseri, Trigonellin

**INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE AND ANTITUMORAL EFFECTS OF
COFFEE EXTRACTS AND CHLOROGENIC ACID, CAFFEIC ACID, CAFFEINE
AND TRIGONELLINE FROM COFFEE PHYTOCHEMICALS IN COLO-205
HUMAN COLON CANCER CELL LINE**

ABSTRACT

Regular consumption of fruits and vegetables reduce the risk of cancer, cardiovascular disease and a number of other chronic and degenerative diseases therefore, in recent years, plant-derived phenolic compounds and other bioactive compounds has increased the interest. Coffee is the most consumed in the world is the pharmacologically active beverages. Coffee has many of different bioactive chemical components and is an important source of phenolic compounds and has a high antioxidant capacity. Epidemiological studies shown to reduce the risk of diabet, cancer, Alzheimer, Parkinson and liver diseases. In this work, chemical composition analyses and anticancer activities of different roasted coffee seed were done on COLO-205 cell line. HPLC were used for chemical composition analysis and protein and gene analyses were also shown using Western blot and real time PCR methods. Trigonellin was changed to 3-methyl pyridinium and chlorogenic acid was decreased but caffeine to be same by roasting procedure. Cytotoxicity on COLO-205 cell line was increase with roasting. Apoptotic effect was improve on Bcl-2 gene inhibition.

Key Words: Antitumoral effect, Apoptose, Caffeic acid, Trigonellin, Chlorogenic acid, Colon cancer, Coffee

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Düzenli meyve ve sebze tüketiminin kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer birtakım kronik ve dejeneratif hastalık risklerini azalttığına dair güçlü bilimsel verilerin bulunuşu, son yıllarda bitkisel kaynaklı fenolik ve diğer biyoaktif bileşiklerin hastalık koruyucu etkilerine ve bu etkilerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik ilgiyi arttırmıştır. Meyve ve sebzeler besleyici özelliklerinin yanısıra flavanoitler, terpenler, alkaloidler ve fenolik bileşikler gibi düşük moleküler ağırlığa sahip ve çeşitli biyolojik aktiviteler gösterebilen çok fazla sayıda bileşikler içermektedir. Bitkilerin antikarsinojen, antioksidan ve antienflammatuar gibi sağlık açısından faydalı değişik aktiviteler gösterebilen çeşitli biyoaktif bileşenlere sahip olması, günümüzde bu bileşenleri ve/veya ekstraktları içeren yeni birtakım nutrasötiklerin, bitkisel ilaçların veya fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine yönelik ilgiyi arttırmıştır.

Kahve dünyada en çok tüketilen farmakolojik olarak aktif içecekler arasında yer almaktadır. Yüzlerce farklı biyoaktif kimyasal bileşenden meydana gelen ve kompleks bir karışım olan kahve önemli bir fenolik bileşik kaynağıdır ve yüksek bir antioksidan kapasiteye sahiptir. Oldukça rağbet gören bir içecek olmasından ve bir alışkanlık şeklinde tüketilmesinden dolayı, kahve tüketiminin sağlığa yararlı etkilerinin veya sağlık açısından oluşturduğu risklerin ortaya konması özellikle son yıllarda ilgi çekici bir konu olmuştur. Epidemiyolojik çalışmalar kahve tüketiminin çeşitli kanser tiplerini, tip II diyabet, Alzheimer, Parkinson ve karaciğer hastalığı risklerini azalttığını öne sürmüştür. Bunun yanısıra laboratuvar hayvanları kullanılarak yürütülen deneysel karsinogenez çalışmalarında kahve bileşenlerinin antikarsinojenik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur.

Önerilen proje kapsamında kahve çekirdekleri ekstraktlarının ve kahvede bulunan birtakım biyoaktif fitokimyasalların antiproliferatif ve antitümöral etkilerinin insan kolon kanser hücrelerinde karşılaştırılmalı olarak gösterilmesi planlanmaktadır. Elde edilecek sonuçlar, klinikte kolon kanser tedavisinde kullanılan ve önerilen çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılacak bir kemoterapi ilacının (5-Fluorourasil) göstereceği etkiler ile mukayese edilecektir. Bu amaçla yapılması planlanan çalışmalar ve ulaşılmak istenen özgün hedefler aşağıda sıralanmaktadır:

Kahve tüketimi ve düşük kolorektal kanser riski arasındaki ilişki mevcut verilerle henüz kesin olarak ispatlanamasa da pekçok çalışma yüksek kahve tüketimi ile düşük kolorektal kanser riski arasındaki bağlantıyı işaret etmektedir (referanslar için Literatür Özeti kısmına bakınız). Çalışmamızda birinci özgün hedef olarak yeşil kahve çekirdeklerinden ve açık kavrulmuş ve koyu kavrulmuş kahve çekirdeklerinden elde edilecek ekstrelerin, bununla beraber kahve çekirdeğinde ve içeceğinde bulunan biyoaktif bileşenlerden seçilmiş dört saf bileşiğin [klorojenik asit (3-O-kafeoil kuinik asit), kafeik asit, kafein ve trigonellin] insan kolon kanser hücrelerindeki muhtemel antiproliferatif etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenecektir. Ayrıca, kahve çekirdeklerinden elde edilecek ekstrelerin bu dört aktif bileşenden ve nikotinik asitten hazırlanacak standartlara göre içerik ve miktar tayinleri de yapılacaktır. İnsan kolon kanser hücreleri için COLO-205 hücre hatlarının kullanılması planlanmaktadır. COLO-205 kolorektal kanser hücre dizisi kanser araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılan ve antiproliferatif ve apoptoz indükleyici etkenlerin mekanistik çalışmalarına imkan sağlayan hücrelerdir. Ayrıca, önerdiğimiz proje kapsamındaki çalışmaları gerçekleştirmek için COLO-205 hücre dizisinin seçilmesine dair diğer gerekçeler de Literatür Özeti kısmında detaylı olarak anlatılmıştır.

Yeşil kahve çekirdeklerinin kavrulması neticesinde ham kahve çekirdekleri içerisinde bulunan birtakım fenoliklerin ve bileşiklerin parçalandığı ve biyolojik olarak aktif bazı yeni ürünlerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Önerdiğimiz çalışma neticesinde yeşil kahve çekirdeklerinin kavrulmuş diğer kahve çekirdeklerinden farklı olarak COLO-205 hücrelerinde nasıl bir etki göstereceği aynı zamanda kahve çekirdeklerinin kavrulması işleminin bu çekirdeklerden hazırlanacak sulu ekstrelerin antiproliferatif etkisinde ne tür değişiklikler meydana getireceği aydınlatılacaktır. Ulaşılmak istenen bir diğer sonuç ise, klorojenik asit (3-O-kafeoil kuinik asit), kafeik asit, kafein ve trigonellinin kahve çekirdeği ekstrelerinden farklı olarak tek başlarına kolon kanser hücre sistemlerinde gösterecekleri etkilerin mukayese edilecek olmasıdır.

Kahve ve içerdiği aktif bileşenlerin antiproliferatif ve antitümöral etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Önerdiğimiz çalışmada hücreler üzerinde en fazla antiproliferatif etki gösterecek kahve çekirdeği ekstresinin sitotoksik aktivitesinden sorumlu olabilecek apoptoz indükleyici etkilerin ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalarının detaylı olarak incelenmesi planlanmaktadır. Bu amaçla, apoptoz belirteçleri olarak kahve ekstresine maruz bırakılmış hücrelerde DNA fragmentasyonu analizleri ve kaspaz-3 aktivite tayinleri gerçekleştirilecektir. Apoptotik

yolaklarda rol alan Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ifadesindeki değişimler Western blot ve semi-kantitatif PCR teknikleri ile belirlenecektir. Bunun yanısıra, apoptoz ile ilgili kaspazların (kaspaz-3, -8, -9, -7) aktivasyonları ve bir apoptoz belirteci olarak PARP'ın ("Poly ADP ribose polymerase") enzimatik kesilmesi Western blot tekniği ile gösterilecektir. Ayrıca, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler semi-kantitatif PCR tekniği ile belirlenecektir.

Bununla beraber, çalışmamızda kullanılacak kahve aktif bileşenlerinden trigonellinin yakın zamanda fitoöstrojenik bir kimyasal olduğu, östrojen bağımlı insan meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) proliferasyonunu düşük dozlarda arttırdığı ve bu etkisini östrojen reseptörü yoluyla gösterdiği bulunmuştur (referanslar için Genel Bilgiler kısmına bakınız). Östrojen hormonunun ise meme kanseri ve kolon kanseri hücrelerinde farklı davrandığı gösterilmiştir. Östrojenin, östrojen bağımlı meme kanseri hücrelerinin büyümesini teşvik ederken kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (referanslar için Literatür Özeti kısmına bakınız). Önerdiğimiz çalışma kapsamında trigonellin bileşiminin MCF-7 meme kanseri hücrelerinden farklı olarak COLO-205 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltabileceği ve antitümöral etki gösterebileceği hipotezi de ayrıca test edilmiş olacaktır. Bu amaçla, trigonellinin çok düşük konsantrasyon değerleri de dahil olmak üzere farklı dozlarının COLO-205 hücreleri üzerindeki etkisi test edilecektir. Çalışmamızda böylece üçüncü özgün hedef olarak trigonellinin COLO-205 hücrelerindeki muhtemel antiproliferatif etkileri ve bu etkilerin altında yatan apoptotik mekanizmalar da yukarıda bahsedildiği şekilde kahve çekirdeği ekstresi ile birlikte moleküler teknikler kullanılarak detaylı olarak araştırılacaktır.

Teklif edilen proje ileri ki zamanlarda yeni projelerin üretilmesine zemin oluşturabilecek niteliktedir ve hücre kültürü ve moleküler biyoloji çalışmaları için altyapı oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birtakım poligenik ve multifaktöriyel hastalıkların ortaya çıkmasında diyet ve yaşam tarzı gibi çevresel faktörlerin çok önemli olduğu bilinmektedir. Kahve dünyada en çok tüketilen ve en popüler iki içecekten biridir. Farmakolojik ve fizyolojik olarak aktif bir içecek olan kahvenin alışkanlık şeklinde tüketiminin sağlık üzerindeki muhtemel etkileri oldukça yoğun bir ilgi görmektedir (1, 2). Değişik ülkelerde yürütülen epidemiyolojik çalışmalar kahve tüketiminin Parkinson hastalığı, kolorektal kanser, karaciğer hastalığı (siroz ve hepatoselüler karsinoma) ve tip II diyabet gibi birtakım kronik hastalıklara karşı koruyucu olabileceğini öngörmektedir (3-8).

Kahve Kökboyasığıllar (Latince: *Rubiaceae*) familyasının *Coffea* (genus *Coffea*) cinsinde yer alır. *Coffea* yaklaşık 85 tür içerir ve bunlardan yalnızca üçü; *C. arabica*, *C. canephora* (robusta) and *C. liberica* ticari olarak yetiştirilmektedir (8). Kahve içeceği, kahve bitkisinin meyvesinden elde edilen çekirdeklerin farklı derecelerde kavrulması, değişik boyutlarda çekilmesi ve sonrasında sıcak su içerisinde farklı yöntemlerle hazırlanması ile elde edilir (örneğin Türk kahvesi, filtre kahve, French press kahve gibi). Bunun yanısıra hazır kahve veya “instant coffee” olarak bilinen kahve çeşidi de oldukça yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Bu kahve çeşidi, klasik şekilde işlenmiş kahve çekirdeklerinin kavrulup çekildikten sonra sıcak su ile karıştırılmasıyla elde edilen kahveden suda çözünmeyen parçacıkların filtrelenip ayıklanması ve sonrasında geride kalan kısmın spray kurutma, dondurarak ve topaklandırma yöntemleri ile kurutulması sonucu elde edilmektedir.

Kahve çok fazla sayıda kimyasal bileşik içermekle birlikte göstermiş olduğu antimutajenik, antikarsinojenik ve antioksidan etkilerin pek çoğu, alkaloit bir bileşik olan kafein, polifenolik bileşiklerden klorojenik asitler ve onların parçalanma ürünleri, diterpen bileşiklerden kafestol ve kahveol (“kahweol”) ve diğer birtakım fenolikler ile ilişkilendirilmiştir (2, 8). Kahve özellikle klorojenik asitlerden oluşmuş yüksek miktarlarda fenolik antioksidanlar içermektedir. Klorojenik asitler, kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit gibi hidroksisinamatların kuinik asite ester bağı ile bağlandığı ve sırasıyla kafeoil kuinik asit, feruloil kuinik asit ve p-kumaroil kuinik asit olarak bilinen bir dizi konjuge yapılardır. Bu bileşiklerdeki hidroksisinamat kısmı kuinik asitin 3-, 4-, ve 5-O pozisyonlarından herhangi birine bağlanabildiğinden, kahvede farklı klorojenik asit izomerleri bulunmaktadır. Kahvede en bol miktarlarda bulunan klorojenik asitlerden biri 5-O-kafeoil kuinik asittir. Bunun

yanısıra, kahvede 4-O-kafeoil kuinik asit ve 3-O-kafeoil kuinik asit izomerleri de önemli miktarlarda bulunmaktadır (9-11). Kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik asit) kahvede, şarapta, meyve, sebze, tohumlar ve diğer birtakım yenilebilir ve yenilemez bitkilerde bulunan polifenolik bir bileşiktir (12-16). Kafeik asit yeşil kahve çekirdeğinin kavrulması esnasında kafeoil kuinik asitin degradasyonu sonucunda önemli miktarlarda da oluşabilmektedir (17). Kahvede bulunan biyoaktif bileşiklerin en önemlilerinden bir diğeri ise bir purin alkaloiti olan kafeindir. Kahve kafein gibi metilksantinlerin en önemli kaynaklarından biridir (18). N-metil nikotinik asit (trigonellin) ise kafeinden sonra yeşil kahve çekirdeğinde en bol miktarda bulunan bir alkaloit bileşiğidir. Piridin tarzında ve niasin benzeri bir bileşik olan trigonellin kavrulmuş kahve çekirdeklerinde de kavrulma derecesine bağlı olarak değişik miktarlarda bulunabilmektedir (19).

Yeşil kahve çekirdeklerinin işlenmesi ve kavrulması kahve çekirdeğindeki biyoaktif bileşik içeriğini değiştirmekte ve Maillard reaksiyon ürünleri oluşturabilmektedir (20). Örneğin, yeşil kahve çekirdeğinde bol miktarlarda bulunan klorojenik asitlerin bir kısmının termal degradasyona bağlı olarak kafeik asit, katekol, pirogallol vb. diğer ürünlere dönüştüğü gösterilmiştir (17, 21). Bunun yanısıra trigonellinin kavrulma süresine bağlı olarak kahve çekirdeğindeki miktarı azalmakta ve buna bağlı olarak N-metil piridinyum iyonu, nikotinik asit (niasin, vitamin B₃) vb. diğer ürünler oluşmaktadır (17, 19, 22). Dolayısı ile trigonellin/N-metil piridinyum veya trigonellin/nikotinik asit oranları kahve endüstrisi tarafından kahve çekirdeklerinin kavrulma derecesini yansıtan bir gösterge olarak kullanılmaktadır (19). Kahve çekirdeklerinin kavrulması sonunda oluşan N-metil piridinyum iyonunun biyolojik olarak aktif bir bileşen olduğu gösterilmiştir. N-metil piridinyumun, HT29 kolon kanser hücrelerinde Nrf2 [“nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2”] / ARE (“antioxidant response element”) detoksifiye yolağını indüklediği ve N-metil piridinyum iyonunca zengin kahve içeceğinin ise in vitro ve in vivo koşullarda Nrf2/ARE yolağı üzerinden kemopreventif faz II enzimlerini indüklediği gösterilmiştir (17, 23). Bu çalışmalar, N-metilpiridinyum bileşiğinin kolon kanserine karşı potansiyel koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini önermektedir.

Normal sağlıklı hücrelerin çeşitli aşamalardan geçerek kanser hücrelerine dönüşmesi olarak tanımlanabilecek karsinogeneze karşı, doğal ürünlerin ve fitokimyasalların kemopreventif etkilerinin ve bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar deneysel hayvan modelleri ve hücre kültürü sistemlerinde halen yoğun bir şekilde sürdürülmektedir (24, 25). Kanseröz hücrelerin yok edilmesine

yönelik önemli stratejilerden bazıları bu hücrelerin proliferasyonunun baskılanması, diferansiyonlarının indüklenmesi veya apoptoza yönlendirilmeleridir (24, 25). Birtakım popülasyon çalışmalarında kahve tüketiminin bazı kanser risklerini azalttığı gösterilmesine rağmen, kahve ve içerdiği aktif bileşenlerin kemopreventif etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar halen tam olarak açıklanabilmiş değildir. Bu amaçla, hücre kültürü sistemlerinde ve laboratuvar hayvanları üzerinde yürütülen mekanistik çalışmaların özellikle son yıllarda arttığı görülmektedir (17, 22, 26-29).

Önerdiğimiz çalışmada yeşil kahve çekirdeklerinden ve farklı derecelerde kavrulmuş kahve çekirdeklerinden elde edilecek ekstraların ve kahve aktif bileşenlerinden, klorojenik asit (3-O-kafeoil kuinik asit), kafeik asit, kafein ve trigonellinin COLO-205 insan kolon kanser hücrelerindeki muhtemel antiproliferatif etkilerinin karşılaştırılması olarak gösterilmesi amaçlanmaktadır. Bunun yanı sıra hücreler üzerinde en güçlü sitotoksik etki gösterecek kahve çekirdeği ekstresinin antiproliferatif etkisinden sorumlu olabilecek apoptotik mekanizmaların da detaylı olarak çalışılması planlanmaktadır. Kahvenin memeli hücre sistemlerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisine dair bizim bilgimize göre literatürde yalnızca 3 çalışma (2004, 2010 ve 2011 yıllarına ait) gözükmektedir. Bu çalışmalarda ise kahve içeceğinin antiproliferatif etkilerinden sorumlu moleküler mekanizmalara dair herhangi bir bilgi mevcut değildir. Üstelik, bu çalışmaların hiçbirinde yeşil kahve çekirdekleri veya kavrulma derecesi farklı kahve çekirdekleri test edilmemiştir. Bu çalışmalarda ortaya konan bulgular aşağıda özetlenmiştir:

Bir sağlık merkezinin dört farklı yerinden satın alınan taze demlenmiş normal (“regular coffee”) ve dekafeine kahve içecekleri alikotlanarak soğukta muhafaza edilmiş ve sonrasında bu numunelerin insan ovaryum kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (30). Ancak söz konusu çalışmada antiproliferatif etkiden sorumlu olabilecek mekanizmalar gösterilmemiştir. Hazır kahvenin (“instant coffee”) düşük konsantrasyonlarda rat hepatoma hücrelerinin proliferasyonunu engellediği ve yüksek konsantrasyonlarda apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (31). Rat hepatoma hücreleri kullanılarak yürütülen bu çalışmada ise apoptotik etkinin altında yatan moleküler mekanizmalar gösterilmemiştir. Orta derecede kavrulmuş üç farklı kahve türüne (*C. arabica* Brazil, *C. arabica* Columbia ve *C. Robusta* India) ait kahve çekirdeklerinden hazırlanan içeceklerin ise bildirilen konsantrasyon değerlerinde HT-29 insan kolon kanser hücrelerinde herhangi bir sitotoksositeye neden olmadığı gösterilmiştir (17). Söz konusu bu çalışmada ise kahve içeceğinin ve aktif bileşenlerinin antiproliferatif etkilerinden ziyade Nrf2/ARE yolağına ve ARE-bağımlı

birtakım antioksidan faz II enzimlerinin gen ekspresyonuna olan etkileri çalışılmıştır. Bilindiği gibi NRF2/ARE yolağı, oksidatif strese karşı hücrenin savunma sistemini harekete geçirir ve oksidatif stresle mücadele eden birtakım enzim ve proteinlerin indüklenmesini regüle eder. Ancak, bu çalışmada kahve içeceğinin hücrelerin proliferasyonuna olan etkilerinin gösterilmesine dair kullanılan konsantrasyon değerleri 500 µg/ml ile sınırlı kalmıştır. Hücre sistemleri ile yürütülen bu tarz çalışmalarda, test edilen bitki ekstraktlarının, ekstraktların hazırlanış yöntemlerine, uygulanan dozlara, deneysel parametrelerdeki farklılıklara ve de en önemlisi kullanılan memeli hücre sistemlerine bağlı olarak hücreler üzerinde farklı etkiler gösterebileceği aşıkardır.

Kahve aktif bileşenlerinden de olan klorojenik asit, kafein ve kafeik asitin antiproliferatif ve antitümöral etkilerinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik olarak son yıllarda farklı hücre sistemlerinde çalışmaların arttığı görölmektedir. Bu çalışmalar çok sınırlı sayıdadır ve söz konusu mekanizmalar halen tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Üstelik, bu bileşiklerin farklı hücre sistemlerinde değişik etkiler gösterebileceği de gözardı edilmemesi gereken diğer bir önemli noktadır. Oldukça yeni olan 2011 yılına ait bir araştırmada hazır kahveden hazırlanmış kahve ekstresinin ve kahve fenolik fitokimyasallarından klorojenik asitin, farelerde CT-26 fare kolon kanser hücreleri ile indüklenmiş akciğer metastazını, ERK (“extracellular signal-regulated kinases”) ların fosforilasyonunu bloke ederek inhibe ettiği gösterilmiştir (26). Kahve ve kafeik asitin (kafein hariç) ise ERK’ların fosforilasyonunu ve AP-1 (“activator protein-1”) ve NF-κB (“Nuclear factor-kappa B”) transaktivasyonunu inhibe ettikleri ve böylece fare epidermal hücrelerinin (JBP P+) neoplastik transformasyonlarını engelledikleri gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca kahve tüketen kolon kanseri hastalarda ERK’ların fosforilasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Ancak, bu çalışmada dahil olmak üzere literatürde kahve ekstresi veya içeceği ile birlikte kahve biyoaktif bileşenlerinden seçilmiş birtakım önemli fitokimyasalların direkt olarak insan kolon kanser hücrelerindeki antitümöral etkilerini ve bu etkilerden sorumlu muhtemel apoptoz indükleyici yolları veya hücre döngüsünün düzenlenmesine dair mekanizmaları gösteren çalışmalar bulunmamaktadır.

Çalışmamızda kolon kanser hücrelerindeki etkisi detaylı olarak çalışılacak kahve aktif bileşenlerinden bir diğeri niasin benzeri bir bileşik olan trigonellindir. Bu bileşiğin Allred ve ark. (2009) (32) tarafından bir fitoöstrojen olduğu ve östrojen-bağımlı MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu çok düşük konsantrasyon değerlerinde bile arttırdığı ve bu etkisini östrojen reseptörü yoluyla gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Çalışmada ilginç olan nokta ise trigonellinin şu ana kadar fitoöstrojen olarak belirlenen kimyasallarla herhangi bir

yapı benzerliğinin olmamasıdır. Genistein (bir izoflavon bileşiği) gibi estradiolle yapı benzerlikleri olan birtakım fitoöstrojenlerin bu özelliklerinden dolayı östrojen reseptörüne bağlanabildikleri bilinmektedir. Ancak, söz konusu çalışmada trigonellinin ne östrojen reseptörü α (ESR α)'ya ne de östrojen reseptörü β (ESR β)'ya bağlanma konusunda estradiolle bir yarış içerisinde olmadığı, ancak östrojen reseptör hedef genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve proliferatif etkisinin östrojen reseptör antagonisti tarafından bloke edildiği bildirilmiştir (32).

Trigonellinin kahve çekirdeklerindeki miktarı kavrulma derecesine bağlı olarak değişmekle birlikte kavrulmuş çekirdeklerde yaklaşık %1'lik kuru maddeyi oluşturmaktadır ve ham çekirdeklerde en çok bulunan ikinci alkaloit bileşiğidir (32). Trigonellinin memeli hücre sistemlerindeki etkisine dair çalışmalar oldukça azdır. Trigonellin ile muamele edilmiş rat hepatoma hücrelerinin invazyonunun in vitro koşullarda doz-bağımlı olarak engellendiği (2.5 – 40 $\mu\text{mol/l}$), belirtilen konsantrasyonlarda ise hücre proliferasyonunda herhangi bir değişimin olmadığı gösterilmiştir (33). Trigonellinin biyolojik etkilerine dair de çok az çalışma bulunmaktadır. Alzheimer modeli farelerde, trigonellinin (30-100 $\mu\text{mol/l}$) kortikal neuronlardaki dendritlerin ve aksonların rejenerasyonunu sağladığı ve hafızayı geliştirdiği bildirilmiştir (34). Trigonellinin tükürük-kaplanmış hidroksiapatit boncukları kullanılarak insanlarda diş çürüklerine neden olduğu bilinen *Streptococcus mutans* bakterisinin adhesiv etkisini azalttığı gösterilmiştir (35). Bunun yanı sıra trigonellinin hipokolesterolemik, hipoglisemik, antimigren ve sedatif etkiler gösterdiği, farelerde P-338 lenfositik lösemi hücrelerine karşı antikarsinogenik aktivite sergilediği de rapor edilmiştir (36, 37). Trigonellinin bitkilerde hücre döngüsü düzenleyicisi bir bileşik olduğu, G2 fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve bitkilerde oksidatif stres sonrası miktarının artmasından dolayı sinyal iletilici bir molekül olabileceği de rapor edilmiştir (36, 38).

Trigonellin yeşil kahve çekirdeklerinde bulunmakla birlikte çemenotu (*Fenugreek*; *Trigonella foenum – graecum*) tohumlarında da oldukça yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Çemenotu Mısır, Hindistan ve Orta Doğu ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilen ve tohumları özellikleri baharat ve pastırma imalatında kullanılan bir bitkidir. Çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilen çemenotunun bu ülkelerde pekçok rahatsızlığın tedavisinde kullanıldığı da bilinmektedir (39). Çemenotu tohumlarının myeloblastik lösemi hücrelerine karşı antineoplastik etki gösterdiği de rapor edilmiştir (40, 41).

Östrojen hormonunun meme gibi birtakım dokularda hücre bölünmesini arttırdığı kolorektal kanser hücrelerinde ise antiproliferatif ve apoptotik etkiler gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (42, 43). Bu farklılığın, farklı dokularda farklı östrojen reseptör subtiplerinin baskın olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. ESR α yaygın olarak meme gibi birtakım dokularda bulunur. Dolayısıyla, ESR α 'nın meme gibi birtakım dokularda östrojenin proliferatif etkisinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. ESR β ise kolon hücrelerinde baskın olarak bulunmaktadır. Bu reseptör tipinin ise östrojenin kolon kanseri hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisinden sorumlu aracı olduğu ileri sürülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmalar her iki reseptör subtipinin hücrelerde birbirinin tersi yönünde etki ettiğini; ESR α 'nın bir hayatta kalma aracısı olarak, ESR β 'nin ise apoptoz indükleyicisi olarak çalıştığını öngörmektedir (42, 43). Bununla beraber, ESR α seviyesi değişmezken ESR β 'nin kolon kanseri hücrelerindeki ekspresyonunun normal kolonik dokulara göre azaldığı ve kadınlarda hormon replasman terapisinin kolorektal kanser insidansını azalttığı gösterilmiştir (44, 45). Ancak, ESR β 'nin kolon kanserindeki koruyucu rolüne dair pekçok çalışma var olsa da, östrojen/ESR β 'nin kolon kanserindeki kesin rolüne dair yeterli bilgi henüz mevcut değildir (46).

Fitoöstrojenik isoflavonların kolon kanser hücreleri dahil birtakım memeli hücre sistemlerinde koruyucu etkiler gösterdiği bilinmektedir (47). Kahve tüketiminin ise kadınlarda östrojene duyarlı kanserlerin gelişimini etkilediği epidemiyolojik ve klinik çalışmalarca gösterilirken, kahve tüketiminin birtakım popülasyon çalışmalarında kadınlarda kolon riskini azalttığı görülmüştür (3, 32). Ayrıca trigonellin bileşiğini içerdiği bilinen çemenotu tohumlarının da MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği ve östrojenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (48).

Bu amaçla teklif edilen projede, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilen trigonellinin literatürde daha önce hiç gösterilmemiş olan kolon kanser hücrelerine olan etkisi çalışılacaktır. Trigonellinin hücre proliferasyonunu stimüle edici etki gösterdiği MCF-7 meme kanseri hücrelerinin baskın östrojen subtipi olarak ESR α içerdiği bilinmektedir. Dolayısıyla, trigonellinin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu arttırıcı etkisinin ESR α yoluyla gerçekleştiği düşünülebilir. ESR β 'nin kolon kanser hücrelerindeki rolünün önemine istinaden ise çalışmalarımızda ESR α 'yı ifade etmediği yalnızca ESR β 'yi ifade ettiği rapor edilen COLO-205 hücreleri kullanılacaktır (42, 43). Dolayısı ile önerdiğimiz projede trigonellinin MCF-7 hücrelerinden farklı olarak COLO-205 hücrelerinde

antiproliferatif ve antitümöral bir etki gösterebileceği hipotezi test edilmiş olacaktır. Bu amaçla, trigonellinin COLO-205 hücreleri üzerinde çok düşük konsantrasyon değeri de dahil olmak üzere farklı dozlarının etkisi test edilecektir. Trigonellinin kolon kanser hücrelerine yönelik antiproliferatif bir etkisinin gösterilmesi halinde, bu etkinin altında yatan muhtemel apoptotik mekanizmalar kahve çekirdeği ekstresi ile birlikte ayrıntılı olarak araştırılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Deneysel çalışmalar, hücre kültürü ve analitik çalışma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup ilgili tüm gereçler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm sarf malzemeler steril hücre kültürü için üretilmiştir. Tüm kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kahve Çekirdekleri Ekstrelerinin Hazırlanması

Tüm kahve çekirdekleri *Coffee arabica* Brazil türüne ait kahve çekirdekleridir.

Kavrulma süreleri ve ısı işlem özellikleri:

Yeşil kahve çekirdeği ekstresi: Isıl işlem uygulanmamış

Açık kavrulmuş kahve çekirdeği: 180°C 24 dakika

Orta kavrulmuş kahve çekirdeği: 180°C 27 dakika

Koyu kavrulmuş kahve çekirdeği: 180°C 30 dakika

Açık, orta ve koyu kavrulmuş kahve çekirdekleri öğütülüp toz haline getirildi (aktarlarda satılan el değirmeni kullanılarak). Yeşil (çiğ) kahve çekirdekleri ise öğütülmeden önce sıvı azot ile muamele edildi. Öğütülüp toz haline getirilen çekirdeklerden 30 gr tartıldı ve 30 gr'lık kahve tozlarından 500 ml deiyonize su içerisinde kahve makinası (Fakir marka) kullanılarak kahve ekstraları hazırlandı. Hazırlanan tüm kahve ekstraları liyofilizatör kullanılarak suyundan ayrıldı. Toz haline getirilen ekstralar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Kahve Çekirdekleri Ekstrelerinin Kafein, Trigonellin, Nikotinik Asit, Kafeik Asit ve Klorojenik Asit İçeriklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Yöntemi ile Kantitatif Analizleri

Kahve çekirdeklerinden hazırlanan ekstradaki kafein, trigonellin, nikotinik asit, kafeik asit ve klorojenik asit miktar tayinleri YBSK-fotodiyod array dedektörü sistemi ile gerçekleştirildi.

YBSK çalışma şartları:

Cihaz : Agilent sıvı kromatografisi sistemi

Dedektör : PDA dedektör (200-500 nm arası)

Kolon : C18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çapı)

Sıcaklık : 22 °C

Akım hızı : 1 mL/dak

Hareketli faz : A) metanol/su/asetik asit (10:88:2, h/h/h)

B) metanol/su/asetik asit (90:8:2, h/h/h)

C) metanol

Gradient akış :

zaman (dak)	hareketli faz A (%)	hareketli faz B (%)	hareketli faz C (%)
0	15	85	0
15	30	70	0
18	40	60	0
30	40	60	0
35	0	100	0
37	0	85	15
48	0	70	30
50	15	85	0

YBSK da ayrılan bileşiklerin tutunma zamanları ve UV spektrumları standartlarla karşılaştırılarak tanımlanacaktır. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kere analiz edilerek ortalama değerler verilecektir.

3.2.3. Hücre Kültürü

Kolon kanser hücre dizisi COLO-205 hücreleri, 75 ml'lik hücre kültür kapları içerisinde ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml penisilin içeren RPMI-1640 besiyerlerinde 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında humidifiye edilmiş inkübatörde çoğaltıldılar. Hücrelerin yaklaşık olarak %90-95 oranında kültür kabını kaplamasının ardından tripsinizasyon yöntemi ile hücreler pasajlandılar. Bütün hücre kültür işlemleri steril laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde gerçekleştirildi. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile günlük olarak takip edildi.

3.2.4. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid) Hücre Canlılık Testi

Kahve ekstralarının ve kahve aktif bileşenlerinin (klorojenik asit (3-O-kafeoil kuinik asit), kafeik asit, kafein ve trigonellin) COLO-205 kolon kanser hücre hatları üzerindeki hücre canlılığına olan etkileri, sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondride bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından mor renkli formazon kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan MTT hücre canlılık testi kullanılarak belirlendi. Bunun için öncelikle, COLO-205 hücreleri her bir kuyucukta 5×10^4 hücre/100 μ l konsantrasyonunda olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'lere ekildiler. Hücrelerin kuyucuklara tutunmasını sağlamak için hücrelerin ekildiği plate 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, her bir kuyucuktaki hücelere kahve ekstraları ve kahve aktif bileşikleri doza bağlı bir tarzda eklendi ve plate tekrar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kahve ekstraları ve biyoaktif bileşiklerinin her bir dozu için 3 kuyucuk kullanıldı. Hücre bulunan fakat test maddesi içermeyen kuyucuklara sadece besiyeri eklendi ve bu kuyucuklar pozitif kontrol olarak kullanıldı. Hem hücre hem de test maddesi içermeyen kuyucuklara ise yine benzer şekilde sadece besiyeri eklendi ve bu kuyucuklar da negatif kontrol olarak kullanıldı. 24 saatlik sürenin sonunda her bir kuyucuğa final konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde 50 μ l MTT solusyonu eklendi ve plate 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra, oluşan mor renkli formazan ürünü çözmek için her bir kuyucuğa 100 μ l DMSO eklendi. Her bir kuyucuktaki formazanın absorbands değeri 570 nm dalga boyunda multifonksiyonel mikropate okuyucu kullanılarak ölçüldü ve ölçülen absorbands değerlerinden % sitotoksosite hesaplandı.

3.2.5. Western Blot Yöntemi Kullanılarak Apoptoz ile İlişkili Proteinlerin İfadesindeki Değişimlerin İncelenmesi

Kahve ekstraları (yeşil, açık, orta koyu ekstralar) ve kahve içeriğinde var olan standart maddeler (kafein, kafeik asit, klorojenik asit) ile tedavi sonrası hücrelerde apoptozisile ilgili protein düzeyleri western blot yöntemi ile tayin edildi.

Colo-205 hücreleri, 1.000.000 hücre 25 cm² hücre kültür kabına 3 ml DMEM besiyeri içersinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edild. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve etkisi test edilecek ekstralar (4mg/ml) besi yerinde verilir. İnkübasyon süresi sonunda besi yeri atılır ve hücreler kültür kabı tabanından kopartılarak toplanır. Toplanan hücreler RİPA tampon ile lizis edilir ve lizattan total protein tayini (Lowry protein tayini) yapılır. Proteinler kuyucukda 30 mikrogram olacak şekilde SDS-poliakrilamid jele yüklenerek 100 V da 1 saat elektroforez edildi. Süre

sonunda jeldeki protein 200 mAmp akımda 1 saat 30 dakika PVDF membrana transfer edildi. Membran uygun dilüsyondaki antikorla Anti kaspaz-3 (1:100), anti kaspaz-9 (1:100), anti kaspaz-7 (1:200), anti bax (1:250), anti PARP (1:200) gece boyu inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası sekonder (HRP-bağı) antikorla işaretlenen uygun bandlar ECL reaksiyonu ile görünür hale getirilir ve X-ray filme basılır.

3.2.6. RNA İzolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Analizi

Kahve ekstralarının ve kahve aktif bileşenlerinden kafein, kafeik asit ve klorojenik asitin COLO-205 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması amacı ile apoptoz ile ilişkili proteinlerden Bax (pro-apoptotik) ve Bcl-2 (anti-apoptotik) proteinlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler ve kaspazların apoptozdaki olası rollerinin belirlenmesi amacı ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler kantitatif real-time PCR tekniği kullanılarak belirlendi.

Bunun için öncelikle COLO-205 hücrelerinden total RNA'lar izole edildi. Total RNA izolasyonu için Trizol kit kullanıldı ve kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokol uygulandı. Elde edilen RNA'ların saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümü ile hesaplandı. COLO-205 hücrelerinden izole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirmek için, ticari olarak satın alınan cDNA sentez kiti kullanıldı ve kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için her bir örneğe ait total RNA ve kit karışımları, ayrı ayrı uygun sıcaklıklarda belirli bir süre inkübe edildi ve böylece RNA'ların cDNA'ya ters transkripsiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen her bir örneğe ait cDNA ile, incelenecek genlere spesifik primer-problar (FastStart Essential DNA Probes Master) kullanılarak, kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun şekilde gerçek zamanlı-PCR gerçekleştirildi. Böylece incelenecek genlerin mRNA transkript düzeyleri kantitatif olarak belirlendi.

Sonuçlar, her dokuda ifade edildiği bilinen β -aktin kontrol geninin ifade seviyeleri ile normalize edildi. Böylece, incelenen her bir genin COLO-205 hücrelerinde ifade edilip edilmediği veya ifade seviyesindeki değişiklikler tespit edildi. Tüm analizler her bir gen için üç kez tekrarlandı.

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler SPSS ver. 13 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ Standart Sapma (SS) olarak %95 güvenilirlik sınırları dahilinde verildi. Ortalamalar arasındaki farkın önemliliği, One-way ANOVA testi posthoc test olarak Tukey ile gerçekleştirildi. Farklılıklar, $p < 0.05$ ve $p < 0.001$ de istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Analiz Sonuçları

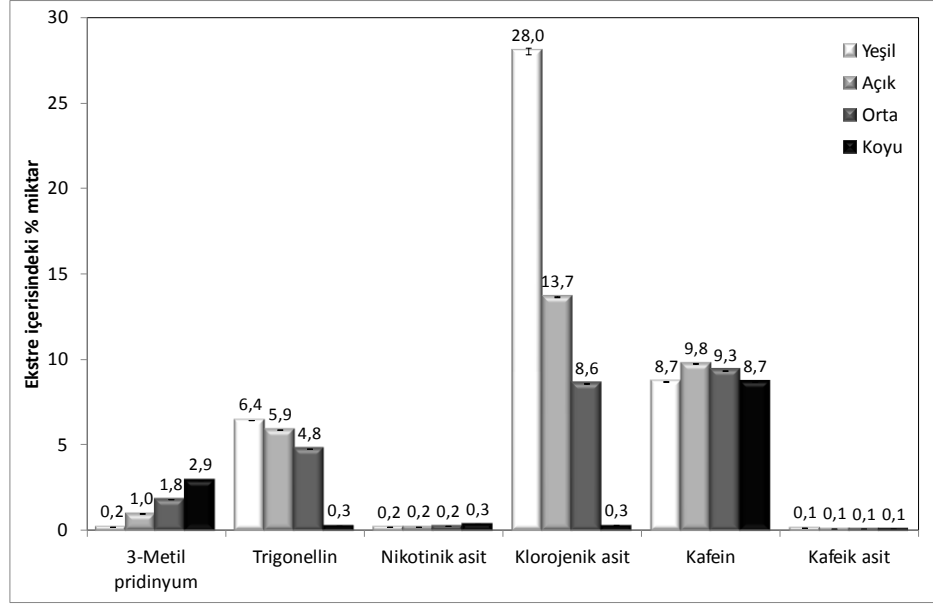
Farklı kavrulma derecelerindeki kahve çekirdeklerinden kahve makinesi ile hazırlanan ve liyofilizatörde kurutulan ekstreler -18 °C de analiz edilene kadar bekletildi. Ekstrele ait verimler Tablo 4.1.' de verilmiştir.

Tablo 4.1. : Kahve ekstrelerinin % verimleri

Ekstre*	Verim [%]
Yeşil	22.83
Açık	21.33
Orta	21.00
Koyu	24.00

Ekstrelerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ile yapılan analizlerinde PDA dedektör kullanılmış ve miktar tayinleri maddelerin maksimum absorbands vermiş oldukları dalga boylarındaki alan değerleri kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1. de verilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında hem tutunma zamanları hem de UV spektrumları kullanılmıştır.

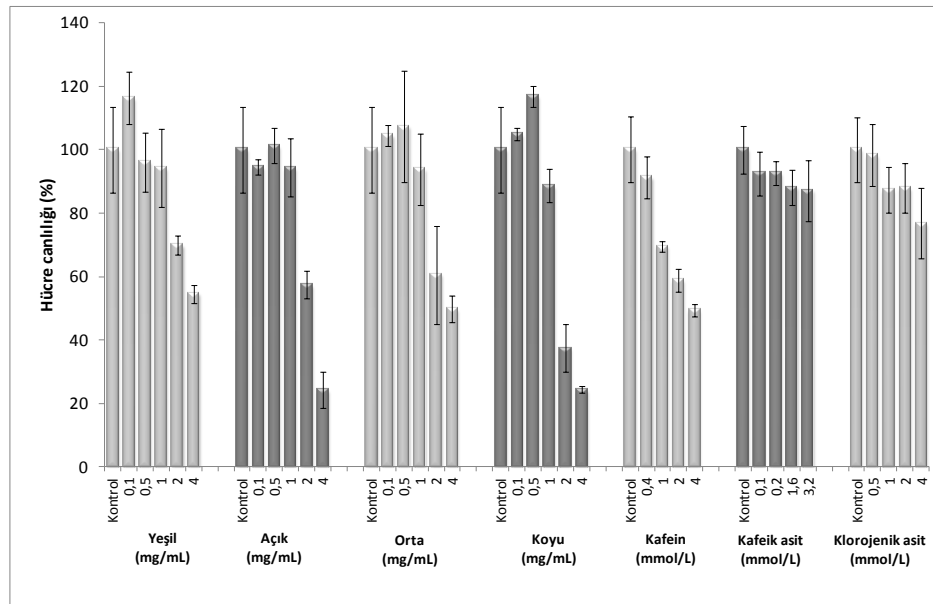
Tüm ekstrelerde klorojenik asit, kafein, kafeik asit, nikotinik asit, trigonellin ve 3-metil pridinyum hem kalitatif hem de kantitatif olarak incelenmiştir. Tüm ekstrelerde kafeik asit ve nikotinik asit az miktarda bulunmuştur. Klorojenik asit en fazla yeşil ektrede (%28) bulunurken kafein ise en fazla koyu ektrede (%8.7) rastlanmıştır. Kahve çekirdeklerinde kavrulmayla trigonellin 3-metil pridinyuma dönüşmektedir. Bu nedenle yeşil ektrede trigonellin bulunurken, koyu ektrede ise 3-metil pridinyum gözlenmiştir.



Şekil 4.1: Kahve çekildeklerinin HPLC analiz sonuçları

4.2. MTT Hücre Canlılığı Analiz Sonuçları

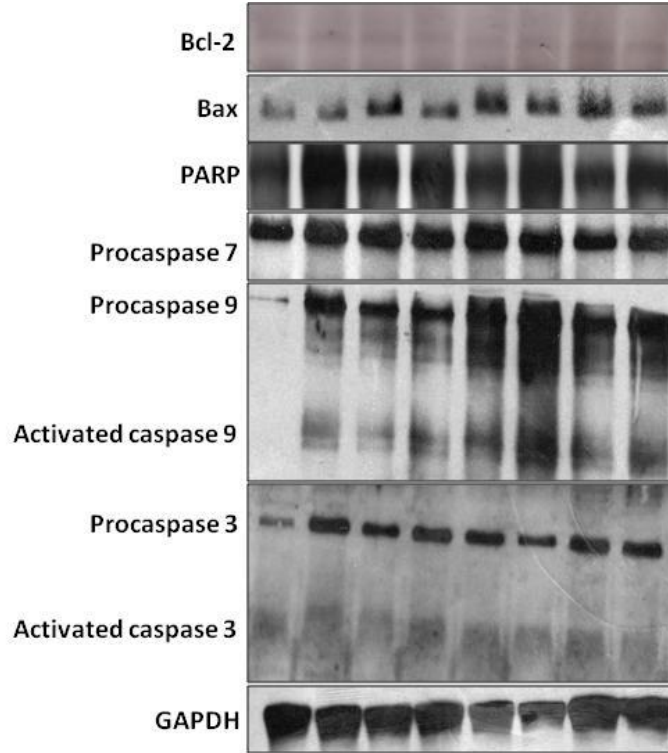
Ekstrelerin hücreler üzerindeki canlılık deneyleri doza bağımlı olarak incelenmiş ve sonuçlar MTT boyası kullanılarak kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen ortalama değerler Şekil 4.2’de verilmiştir. Kavrulma derecesine ve doz artışına bağlı olarak sitotoksisitede artış gözlenmiştir. Çalışılan standartlarda da doza bağımlı olarak kafeinin sitotoksik etkisinin kafeik asit ve klorojenik asite göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Ekstrelerin colo-205 hücre serisi üzerindeki canlılık analiz sonuçları

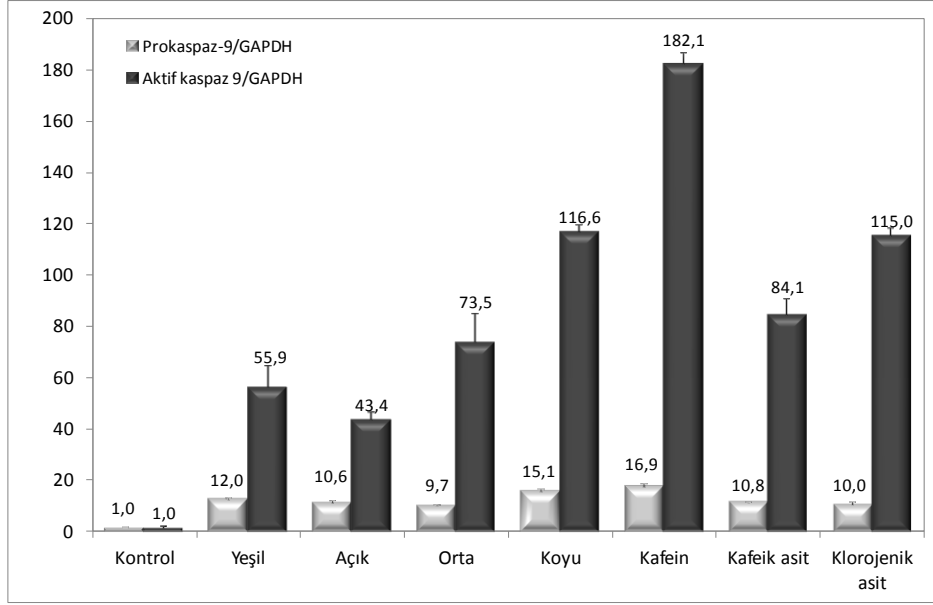
4.3. Western Blot Analiz Sonuçları

Kahve ekstreleri (yeşil, açık, orta koyu ekstreler) ve kahve içeriğinde var olan standart maddeler (kafein, kafeik asit, klorojenik asit) ile tedavi sonrası hücrelerde apoptozisle ilgili protein düzeyleri western blot yöntemi ile tayin edildi. Deney sonrası protein düzeylerini gösterir film görüntüleri Şekil 4.3 de verilmiştir.



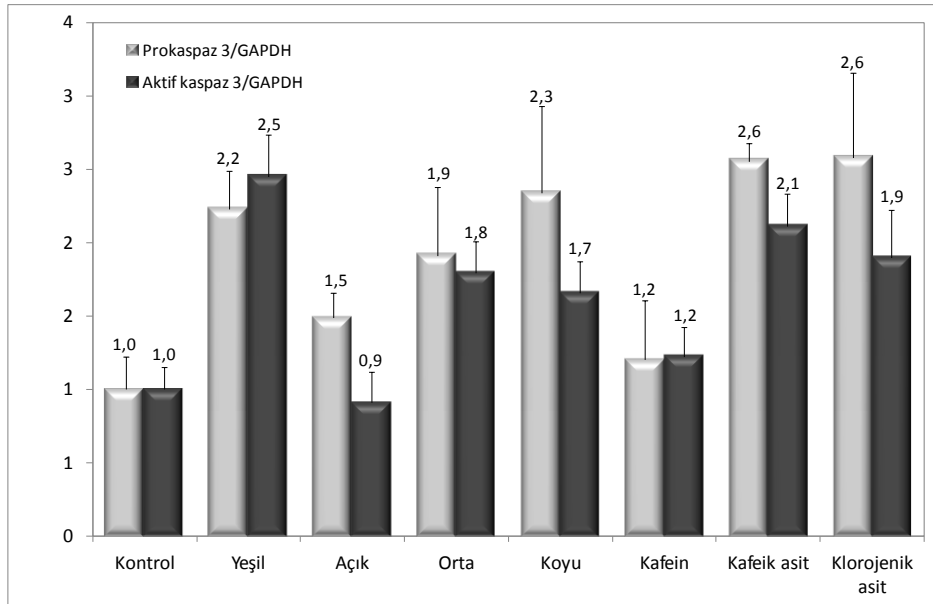
Şekil 4.3: 24 saat kahve ekstreleri ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde apoptozisle ilişkili proteinlerin ifadenme düzeyleri

Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında hem pro form hem de aktif form kaspaz 9' un anlamlı derecede artışına neden olmuştur (Şekil 4.4).



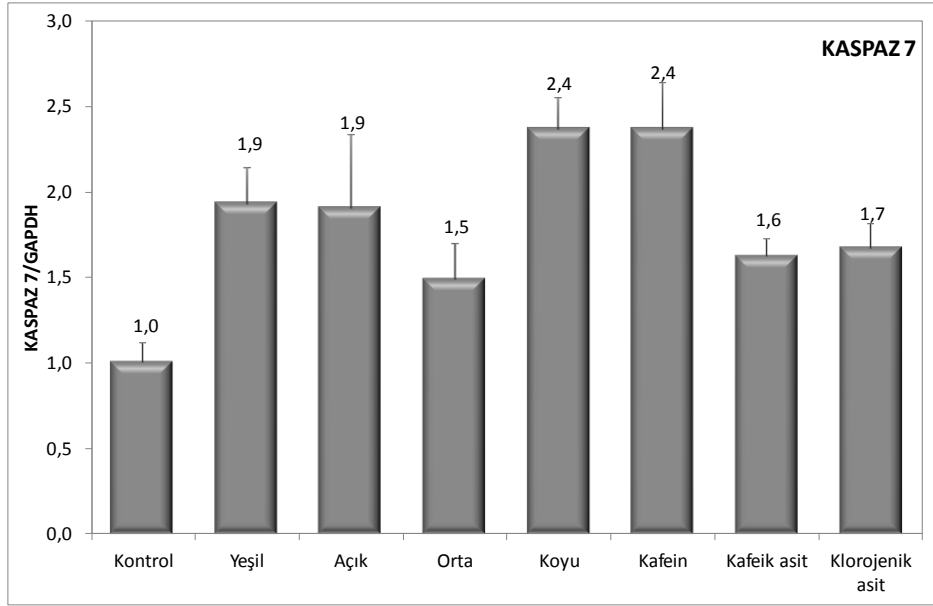
Şekil 4.4: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde pro kaspaz 9 ve aktif kaspaz 9 proteinlerin ifadenme düzeyleri.

Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında pro ve aktif form kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri hemen hemen tüm gruplarda artarken açık ekstre ile tedavi grubunda aktif kaspaz 3 düzeyleri azalmıştır. Ancak kafein grubunda ki artış ve açık ekstre ile tedavi grubunda aktif kaspaz 3 düzeylerinde ki azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.5).



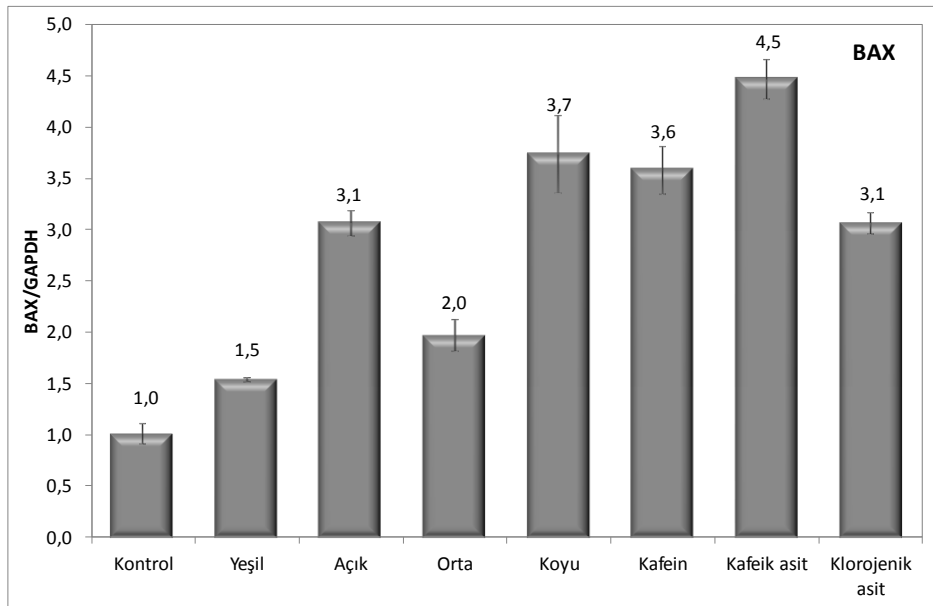
Şekil 4.5: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde pro kaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 proteinlerin ifadenme düzeyleri.

Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında kaspaz 7 düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.6).



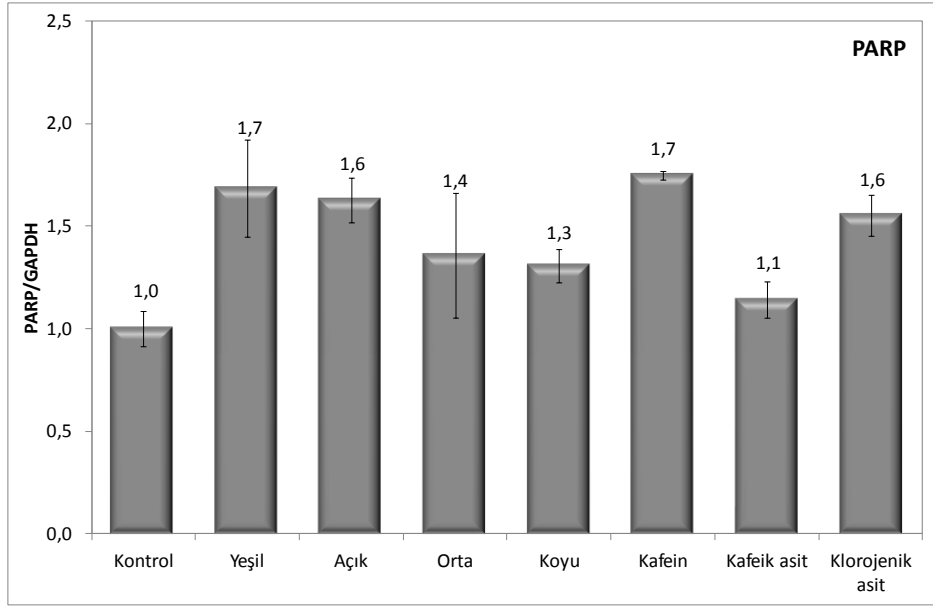
Şekil 4.6: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde kaspaz 7 proteinlerin ifadenme düzeyleri.

Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında pro apoptotik Bax proteini düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.7).



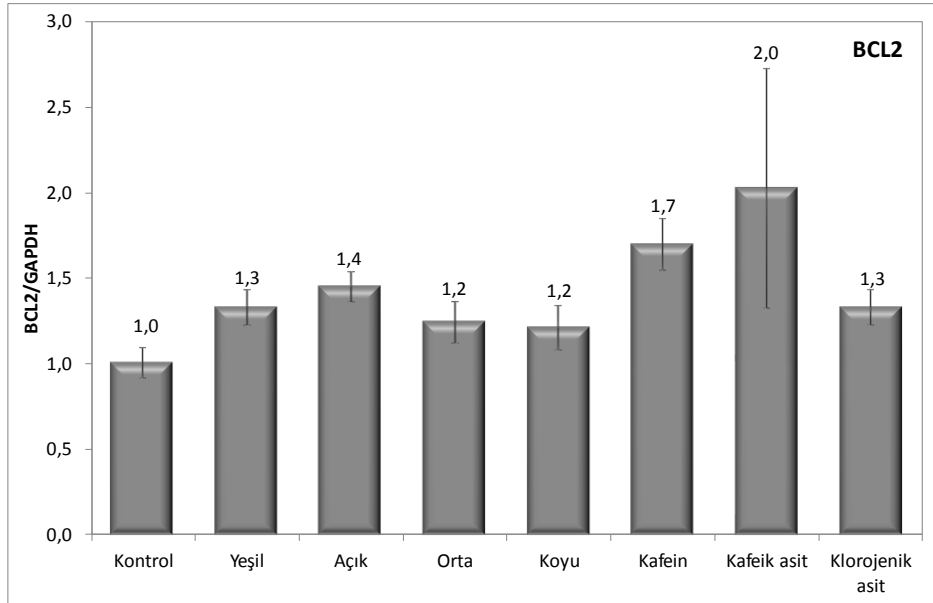
Şekil 4.7: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde pro apoptotik Bax proteinlerin ifadenme düzeyleri.

Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında kafeik asitle tedavi grubu hariç tüm gruplarda PARP proteinini düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde PARP proteinlerin ifadenme düzeyleri.

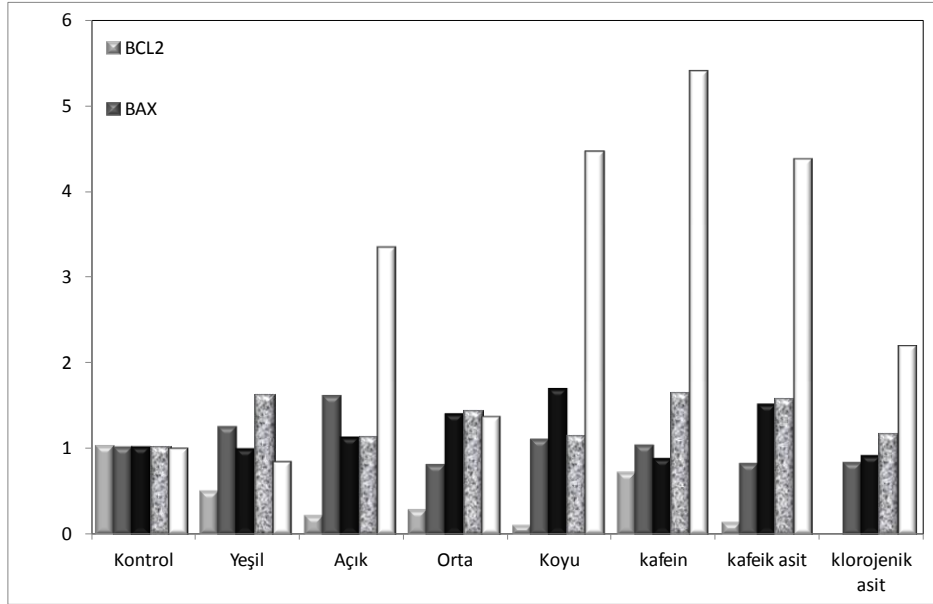
Ekstreler ve standart maddelerin tamamı 24 saat inkübasyon sonrasında tüm gruplarda Bcl-2 proteinini düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: 24 saat kahve ekstraları ve standart maddeleri ile tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde Bcl-2 proteinlerin ifadenme düzeyleri.

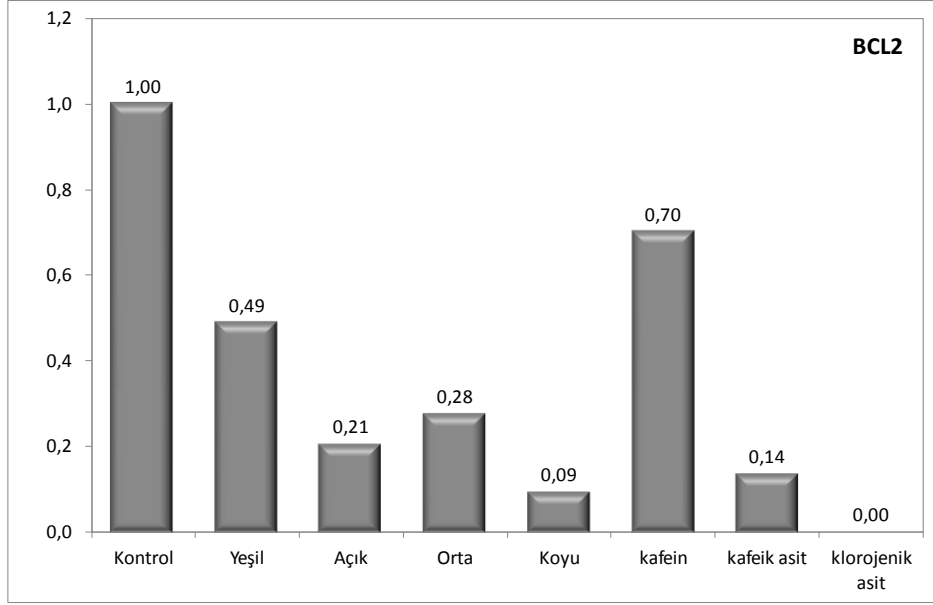
4.4. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Analizi Sonuçları

Dört farklı kahve ekstresinin ve kahve aktif bileşenlerinin COLO-205 hücreleri ile 24 saat inkübasyonundan sonra apoptotik yolda görev alan Bax, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 genlerinin mRNA transkript düzeyleri üzerindeki etkisi Real Time-PCR (qRT-PCR) kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Analiz sonucu Grafik 1’de gösterilmiştir.



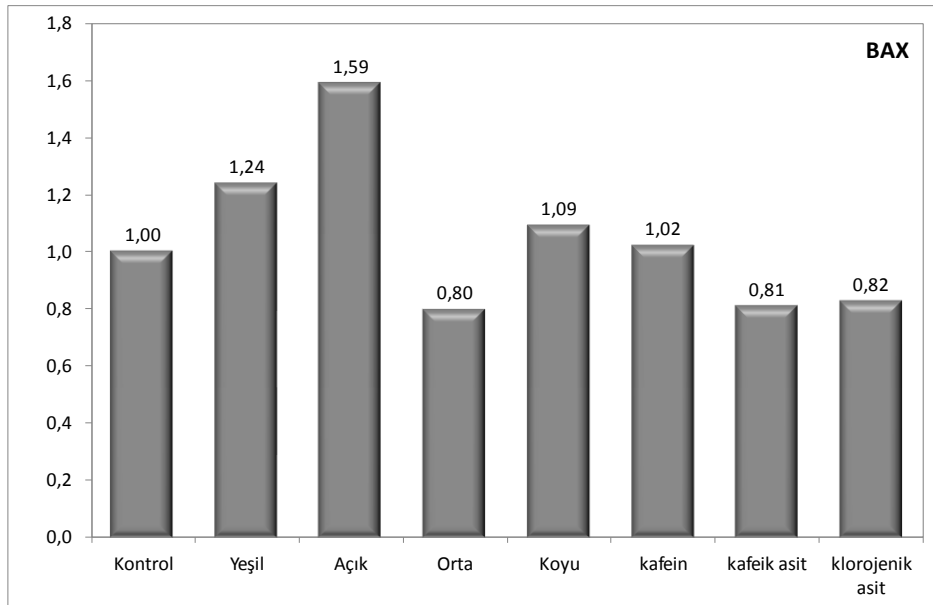
Şekil 4.10. Kahve ekstraktları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 genlerinin ifadenme düzeyleri.

Colo-205 hücrelerinin ekstrakt ve standart maddelerle 24 saat inkübasyonu sonrasında anti apoptotik Bcl-2 geninin ifadenme düzeyi tüm gruplarda anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 4.10). Özellikle dört farklı kahve ekstresi ile tedavi edilen gruplarda anti apoptotik Bcl-2 geninin ifadenmesinin kavrulma derecesine bağlı olarak inhibe olduğu görülmüştür.



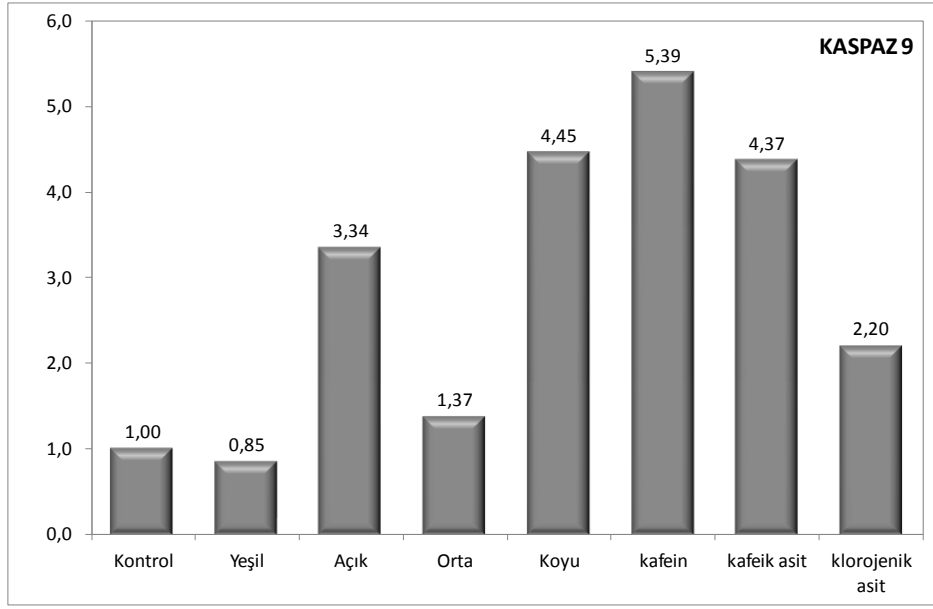
Grafik 2. Kahve ekstraları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde anti apopttik Bcl-2 geninin ifadenme düzeyi.

Colo-205 hücrelerinin ekstralar ve standart maddelerle 24 saat inkübasyonu sonrasında pro apoptotik Bax geninin ifadenme düzeyi yeşil ve açık ekstre ile tedavi grubunda anlamlı derecede artırmıştır (Grafik 3).



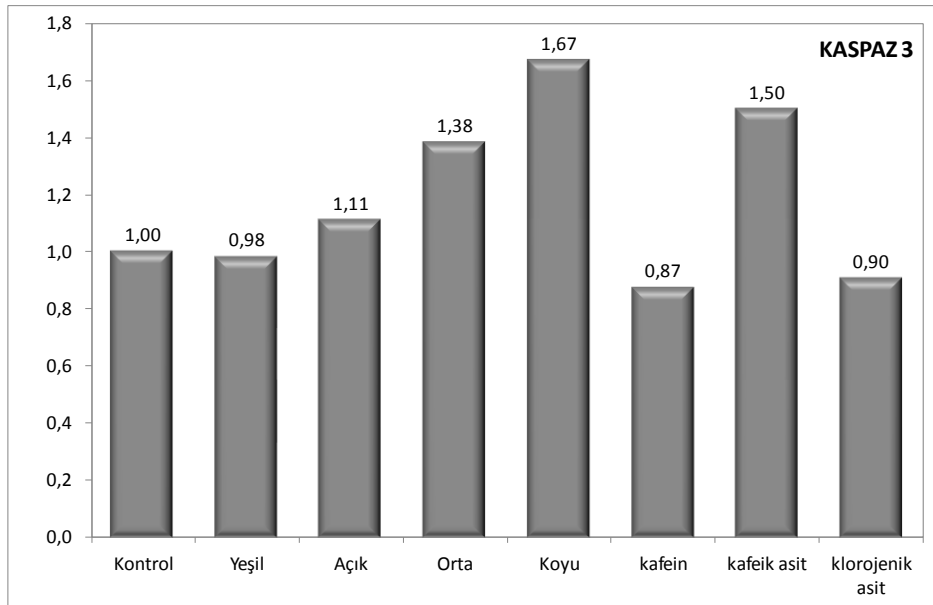
Grafik 3. Kahve ekstraları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde pro apoptotik Bax geninin ifadenme düzeyi.

Colo-205 hücrelerinin ekstralar ve standart maddelerle 24 saat inkübasyonu sonrasında Kaspaz 9 geninin ifadenme düzeyi, yeşil ekstre ile tedavi grubu hariç tüm gruplarda anlamlı derecede artış göstermiştir (Grafik 4).



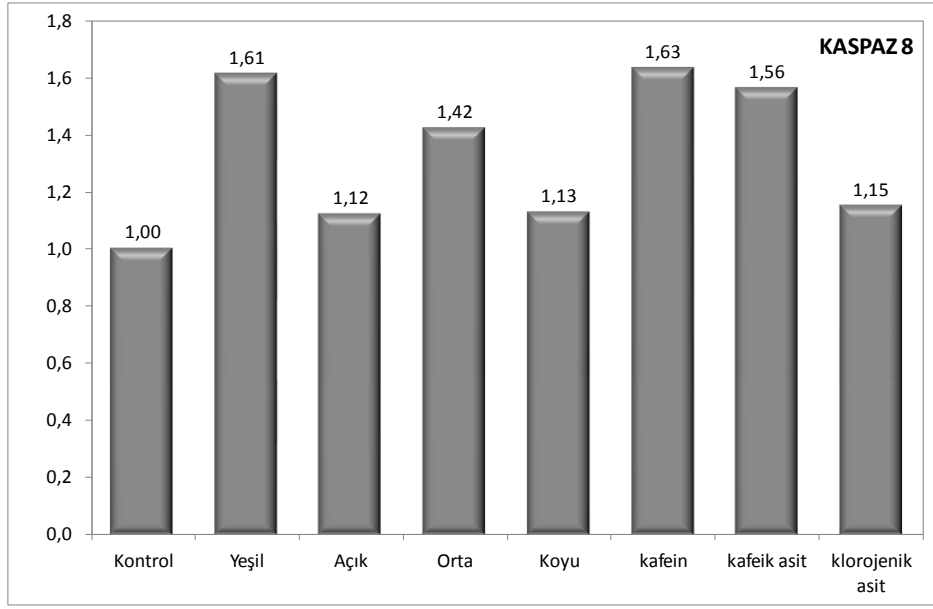
Grafik 4. Kahve ekstraları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde Kaspaz 9 geninin ifadenme düzeyi.

Colo-205 hücrelerinin ekstralar ve standart maddelerle 24 saat inkübasyonu sonrasında Kaspaz 3 geninin ifadenme düzeyi yeşil ekstre, kafein ve klorojenik asit ile tedavi grupları hariç diğer tüm gruplarda anlamlı derecede artış göstermiştir (Grafik 5).



Grafik 5. Kahve ekstraları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde Kaspaz 3 geninin ifadenme düzeyi.

Colo-205 hücrelerinin ekstralar ve standart maddelerle 24 saat inkübasyonu sonrasında Kaspaz 8 geninin ifadenme düzeyi tüm gruplarda anlamlı derecede artış göstermiştir (Grafik 6).



Grafik 6. Kahve ekstraları ve standart maddeleri ile 24 saat tedavi sonrası colo-205 hücrelerinde Kaspaz 8 geninin ifadenme düzeyi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kahve tüm dünyada en yaygın tüketilen içeceklerin başında gelmektedir. Tüm kültürlerde farklı şekillerde hazırlanan kahve içecekleri sıcak ya da soğuk olarak tüketilmektedir. Kahve ayrıca uzun yıllardan bu yana fizyolojik etkileri bakımından da kullanılmaktadır.

Son yıllarda kahvenin etkileri üzerinde çalışmalar da hızla artmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar kahve tüketiminin çeşitli kanser tiplerini, tip II diyabet, Alzheimer, Parkinson ve karaciğer hastalığı risklerini azalttığını öne sürmüştür. Bunun yanısıra laboratuvar hayvanları kullanılarak yürütülen deneysel karsinogenez çalışmalarında kahve bileşenlerinin antikarsinojenik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Kahvenin bu tip fizyolojik etkilerinden zengin fenolik bileşiminin sorumlu olduğu da yapılan çalışmalarda yer almaktadır.

Bu proje kapsamında da farklı kavrulma tiplerinin hem fenolik bileşime hem de içildikten sonra barsaklarda gelişen kolon kanseri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Projede kahve çekirdekleri yeşil, açık, orta ve koyu olmak üzere dört farklı kavrulma derecesinde hazırlandıktan sonra su ile ekstre edilmiş ve hem kimyasal bileşimleri hem de kolon kanseri üzerine olan etkileri hücre kültüründe denenmiştir.

Ekstre verimlerine bakıldığında genel olarak yakın olmasına rağmen en yüksek verim koyu kavrulmuş çekirdeklerden (%24) elde edilmiştir. Ekstrelerin kimyasal bileşimleri ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Trigonellin, 3-metil pridinyum, nikotinik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve kafein standart olarak kullanılmıştır. Yapılan kalitatif ve kantitatif analizlerde yeşil çekirdeklerde ana bileşen olarak klorojenik asit (%28.0) bulunmuştur. Kavrulma derecesine bağlı olarak fenolik bileşikler hızla bozunmaya uğramıştır. Bu nedenle klorojenik asit de hızla bozunarak koyu çekirdeklerde eser miktarda (%0.3) rastlanmıştır. Kafein ısı ile etkilenmemi ve tüm çekirdeklerde yaklaşık %9 oranında bulunmuştur. Yeşil çekirdeklerde %6.4 oranında bulunan trigonellin ise yine kavrulma ile azalmakta ve 3-metil pridinyuma dönüşmektedir. Bu nedenle kavrulma ile trigonellin miktarı azalırken 3-metil pridinyum miktarı ise artmıştır.

❖ PCR analizlerinde;

Farklı derecelerde kavrulmuş kahve çekirdeklerinden elde edilen ekstrelerle Colo-205 hücrelerinin muamelesi sonucunda, kahve çekirdeklerinin kavrulma derecesi arttıkça anti-apoptotik Bcl-2 geninin inhibe olduğu, buna karşılık Kaspaz 8, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin ise aktive oldukları görülmüştür. Bu değişimler sonucunda hücre apoptotik ölüme gitmektedir.

Kahve çekirdeğinde bulunan fitokimyasallardan olan kafein, kafeik asit ve klorojenik asit ile Colo-205 hücrelerinin muamelesi sonucunda ise, çalışılan tüm aktif bileşiklerin anti apoptotik Bcl-2 genini inhibe ettikleri, pro apoptotik Bax geni ifadenme düzeyini ise değiştirmedikleri görülmüştür. Yine, çalışılan tüm aktif bileşiklerin Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 genlerini aktive ettikleri, buna karşılık seçilen üç saf bileşikten sadece Kafeik asitin Kaspaz 3 genini aktive ettiği, kafein ve klorojenik asitin ise Kaspaz 3 geninin ifadenme düzeyini değiştirmedikleri görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans: Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal, vol. 51, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1991.
2. Higdon JV, Frei B (2006) Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(2):101-23.
3. Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S; JPHC Study Group (2007) Coffee consumption and risk of colorectal cancer in a population-based prospective cohort of Japanese men and women. *Int J Cancer.* 121(6):1312-8.
4. van Dam RM (2008) Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. *Appl Physiol Nutr Metab.* 33(6):1269-83.
5. Barranco Quintana JL, Allam MF, Serrano Del Castillo A, Fernández-Crehuet Navajas R (2007) Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review. *Neurol Res.* 29(1):91-5.
6. Sääksjärvi K, Knekt P, Rissanen H, Laaksonen MA, Reunanen A, Männistö S (2008) Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. *Eur J Clin Nutr.* 62(7):908-15.
7. Muriel P, Arauz J (2010) Coffee and liver diseases. *Fitoterapia.* 81(5):297-305.
8. George SE, Ramalakshmi K, Mohan Rao LJ (2008) A perception on health benefits of coffee. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(5):464-86.
9. Clifford MN (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 79:362-72.
10. Clifford MN (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric.* 80:1033-43.
11. Renouf M, Guy PA, Marmet C, Fraering AL, Longet K, Moulin J, Enslen M, Barron D, Dionisi F, Cavin C, Williamson G, Steiling H (2010) Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. *Mol Nutr Food Res.* 54(6):760-6.
12. Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (1998) Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z Ernährungswiss.* 37(2):190-7.
13. Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 405(6789):903-4.
14. Mattila P, Kumpulainen J (2002) Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem.* 50(13):3660-7.

15. Bryngelsson S, Dimberg LH, Kamal-Eldin A (2002) Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (*Avena sativa* L.). *J Agric Food Chem.* 50(7):1890-6.
16. Soleas GJ, Goldberg DM, Grass L, Levesque M, Diamandis EP (2001) Do wine polyphenols modulate p53 gene expression in human cancer cell lines? *Clin Biochem.* 34(5):415-20.
17. Boettler U, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, Lang R, Hofmann T, Marko D (2011) Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J Nutr Biochem.* 22(5):426-40.
18. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zwartau EE (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 51(1):83-133.
19. Perronea D, Donangelo CM, Farah A (2008) Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 110(4):1030-5.
20. del Castillo MD, Ames JM, Gordon MH (2002) Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem.* 50(13):3698-703.
21. Perrone D, Donangelo R, Donangelo CM, Farah A (2010) Modeling Weight Loss and Chlorogenic Acids Content in Coffee during Roasting. *J Agric Food Chem.* 58:12238-43.
22. Bakuradze T, Lang R, Hofmann T, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2010) Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 54(12):1734-43.
23. Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V, Stiebitz H, Bytof G, Lantz I, Lang R, Hofmann T, Marko D (2011) Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res.* doi: 10.1002/mnfr.201100115. [Epub ahead of print]
24. Manson MM (2003) Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med.* 9(1):11-8.
25. Manson MM, Foreman BE, Howells LM, Moiseeva EP (2007) Determining the efficacy of dietary phytochemicals in cancer prevention. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5):1358-63.
26. Kang NJ, Lee KW, Kim BH, Bode AM, Lee HJ, Heo YS, Boardman L, Limburg P, Lee HJ, Dong Z (2011) Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis.* [Epub ahead of print]
27. Cavin C, Marin-Kuan M, Langouët S, Bezençon C, Guignard G, Verguet C, Piguet D, Holzhäuser D, Cornaz R, Schilter B (2008) Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol.* 46(4):1239-48.

28. Huber WW, Rossmanith W, Grusch M, Haslinger E, Prustomersky S, Peter-Vörösmarty B, Parzefall W, Scharf G, Schulte-Hermann R (2008) Effects of coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol on cytochrome P450 and sulfotransferase in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 46(4):1230-8.
29. Abraham SK, Stopper H (2004) Anti-genotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse lymphoma cells. *Mutat Res.* 561(1-2):23-33.
30. Tai J, Cheung S, Chan E, Hasman D (2010) Antiproliferation effect of commercially brewed coffees on human ovarian cancer cells in vitro. *Nutr Cancer.* 62(8):1044-57.
31. Miura Y, Ono K, Okauchi R, Yagasaki K (2004) Inhibitory effect of coffee on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 50(1):38-44.
32. Allred KF, Yackley KM, Vanamala J, Allred CD (2009) Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. *J Nutr.* 139(10):1833-8.
33. Hirakawa N, Okauchi R, Miura Y, Yagasaki K (2005) Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(3):653-8.
34. Tohda C, Kuboyama T, Komatsu K (2005) Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals.* 14(1-2):34-45.
35. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G (2002) Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem.* 50(5):1225-9.
36. Trigonelline: Review of Toxicological Literature. Prepared for Errol Zeiger, Ph.D. National Institute of Environmental Health Sciences. Submitted by Raymond Tice, Ph.D. Integrated Laboratory Systems. December 1997.
37. Monago CC, Nwodo, OFC (2010) Antidiabetic effect of crude trigonelline of *Abrus precatorius* linn seed in alloxan diabetic rabbits. *J Pharm Res.* 3(8):1916-19.
38. Mazzuca S, Bitonti MB, Innocenti AM, Francis D (2000) Inactivation of DNA replication origins by the cell cycle regulator, trigonelline, in root meristems of *Lactuca sativa*. *Planta.* 211(1):127-32.
39. Toppo FA, Akhand R, Pathak AK (2009) Pharmacological actions and potential uses of *Trigonella foenum-graecum*: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2(4):29-38.
40. Sur P, Das M, Gomes A, Vedasiromoni JR, Sahu NP, Banerjee S, Sharma RM, Ganguly DK (2001) *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. *Phytother Res.* 15(3):257-9.
41. Alizadeh S, Jahanmehr SA, Ardjmand AR, Rezaian M, Dargahi H, Einolahi N, Sadrossadat M (2009) Antineoplastic Effect of Fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum*) Seed Extract against Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line (KG-1). *IJBC.* 4:139-46.

42. Qiu Y, Waters CE, Lewis AE, Langman MJ, Eggo MC (2002) Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. *J Endocrinol.* 174(3):369-77.
 43. Wilkins HR, Doucet K, Duke V, Morra A, Johnson N (2010) Estrogen prevents sustained COLO-205 human colon cancer cell growth by inducing apoptosis, decreasing c-myc protein, and decreasing transcription of the anti-apoptotic protein bcl-2. *Tumour Biol.* 31(1):16-22.
 44. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, Zhao C, Williams C, Ström A, Gustafsson JA (2009) Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res.* 69(15):6100-6.
 45. Martinetti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML (2005) ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer.* 12(2):455-69.
 46. Janakiram NB, Steele VE, Rao CV (2009) Estrogen receptor-beta as a potential target for colon cancer prevention: chemoprevention of azoxymethane-induced colon carcinogenesis by raloxifene in F344 rats. *Cancer Prev Res (Phila).* 2(1):52-9.
 47. Bielecki A, Roberts J, Mehta R, Raju J (2011) Estrogen receptor- β mediates the inhibition of DLD-1 human colon adenocarcinoma cells by soy isoflavones. *Nutr Cancer.* 63(1):139-50.
- Sreeja S, Anju VS, Sreeja S (2010) In vitro estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. *Indian J Med Res.* 131:814-19.