ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND

SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANILARAK 4-MEI'UN TOKSİSİTE VE KORUYUCU ETKİSİNİN *IN VIVO* VE *IN VITRO* KOŞULLARDA BELİRLENMESİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SITOGENETIK VE MOLEKÜLER TEKNIKLER KULLANILARAK 4-MEI'UN TOKSİSİTE VE KORUYUCU ETKİSİNİN *IN VIVO* VE *IN VITRO* KOŞULLARDA BELİRLENMESİ

Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 30/05/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……	……	……
Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ DANIŞMAN	Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU ÜYE	Prof. Dr. Hasan Basri İLA ÜYE
……	……	
Prof. Dr. Eyyüp RENCUZOĞULLARI ÜYE	Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2014-2617

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANILARAK 4-MEI'UN TOKSİSİTE VE KORUYUCU ETKİSİNİN *IN VIVO VE* IN *VITRO* KOŞULLARDA BELİRLENMESİ

Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Yıl: 2016, sayfa: 107
Jüri : Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. Eyyüp RENCUZOĞULLARI
Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışmada test maddesi olarak 4-metilimidazol (heterosiklik organik kimyasal bileşiği) (4-MEI) yaygın olarak insanların besinlerinde yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı karemelizasyon sırasında ortaya çıkan 4-metilimidazol (4-MEI)'un kanserojenik ve antikanserojenik etkilerinin olup olmadığını oluşturduğumuz kolon kanserli sıçan modellerinde K-ras ve β-catenin genlerine ait mRNA ve proteinlerin Real Time PCR ve Western Blot teknikleri ile ekspresyon düzeyleri belirlemektir. Ayrıca bu araştırmada 4-MEI'nın genotoksik, antigenotoksik, sitotoksik ve antisitotoksik etkileri *in vivo* olarak fare kemik iliğinde araştırılmıştır. Bunlarla birlikte 4-MEI'nın antibakteriyel etkisi *Bacillus subtilis, E. coli, Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* türünde bakılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kolon kanseri oluşturulmuş sıçanlarada 4-MEI'nın beta catenin ve K-ras genleri mRNA ve proteinlerinin ekspresyon seviyelerin düşürmek suretiyle antikanser özelliğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca 4-MEI'nın fare kemik iliğinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu ve antigenetoksik etki göstermediği bu çalışmada saptanmıştır. Bunların yanı sıra 4-MEI'nın dört farklı bakteri türünde antibakteriyel etki gösterdiği de ortaya çıkmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın antikanser özelliğe sahip olabileceğini ama sağlıklı hücreler için genotoksik etkili olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 4-Metilimidazol, genotoksisite ve antigenotoksisite, kanserojenite ve antikanserojenite, sitotoksisite ve antisitotoksisite, antibakteriyal.

ABSTRACT

PhD THESIS

IN VIVO AND _IN VITRO_ INVESTIGATION OF TOXICITY AND PROTECTIVE EFFECTS OF 4-MEI USING CYTOGENETIC AND MOLECULAR TECHNIQUES

Mostafa NORIZADEH TAZEHKAND

BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
ÇUKUROVA UNIVERSITY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Year: 2016, Page: 109
Members : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Prof. Dr. Eyyup RENCUZOĞULARI
Assoc. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

4-methylimidazole (heterocyclic organic chemical compound) (4-MEI) is commonly found in human diet. This research was aimed to study of carcinogenic and anti-carcinogenic effects of 4-MEI, which was arisen during caramelization. The analysis was carried out by evaluating K-ras and the β-catenin gene expression in colon cancer rat models, made in our lab, by Real Time PCR and Western Blot techniques. Also, in this study genotoxic, antigenotoxic, cytotoxic and anti-cytotoxic effects of the 4-MEI were investigated in mice bone marrow cells. In addition, antibacterial effect of 4-MEI was examined using *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as bacterial strains.

The results of this study showed that 4-MEI had anticancer properties by reducing both the transcription and translation level of the beta- catenin and K-ras genes in cancerous rats. In addition, the genotoxic and cytotoxic effects of the 4-MEI were approved in mouse bone marrow cells and it was found that these substance had no antigenotoxic effect on these cells. Also, it was supported that the 4-MEI has anti-bacterial effect on four different types of bacteria. The result of this study showed that 4-MEI can have anticancer effect but it can also be harmful for normal cells.

Key Words: 4-Metthyl imidazole, genotoxicity and antigenotoxicity, carcinogenity and anticarcinogenity, cytotoxicity and anticytotoxicity, antibacterial.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım bana hep şanslı olduğumu hissettiren hocalarım, başta tezin ilk aşamasından son aşamasına kadar hep yanımda olan hocalarım Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ ve Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'a çok teşekkür ederim. Bunların yanı sıra tüm çalışmalarımda bilgilerinden ve laboratuvar imkânlarından faydalandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya, Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu günlere ulaşmamda büyük emekleri olan başta annem ve babam, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen vefalı can dostum hayat arkadaşım Uzman Biyolog Orkideh HAJIPOUR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca değerli arkadaşlarım, Dr. Ebrahim VALIPOUR'a, Uzman Biyolog Taygun TİMOÇİN'e, Uzman Biyolog Rima ÇELİK'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……..…….I
ABSTRACT..... II
TEŞEKKÜR..... III
İÇİNDEKİLER IVV
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1. GİRİŞ……...1
1.1. DMH ile ortaya çıkan kanserin moleküler mekanizması 3
1.2. Kanser oluşumu ile genlerin ekspresyonları arasındaki ilişki 5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALARI 9
2.1. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları 9
2.1.1. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları 9
2.1.2. Gıda Renklendiricileri İle Yapılan Antigenotoksisite Çalışmaları 10
2.2. Gıda Renklendiricileri İle Yapılan Kanserojenite Ve Antikanserojenite Çalışmaları 12
2.2.1. Gıda Renklendiricileri İle Yapılan Kanserojenite Çalışmaları 12
2.2.2. Gıda renklendiricileri ile yapılan Antikanserojenite çalışmaları 12
2.3. Gıda Renklendiricilerin Antibakteriyel Etkileri ile Yapılan Araştırmalar 14
2.4. DMH İle Yapılan Kanserojenite Ve Genotoksisite Çalışmaları 14
3. MATERYAL VE METOT 17
3.1. Materyal 17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 17
3.1.1.1. 4-Methilimidazol (4-MEI) 17
3.1.1.2. Kolşisin (Sigma) 18
3.1.1.3. Etil Metan Sülfonat (Ethyl Methanesulphonate=EMS) 19
3.1.1.5. Fizyolojik Çözelti 20
3.1.1.6. Hipotonik Eriyik 20
3.1.1.7. Fiksatif 21

3.1.1.8. Giemsa 21
3.1.1.9. Entellan 21
3.1.1.10. Nitrik Asit (HNO_3) 21
3.1.1.11. Agaroz (Sigma, A9539) 22
3.1.1.12. 10X TBE (Tris Borik asit EDTA) Elektroforez Tampon Çözeltisi (Fermentas, B52) 22
3.1.1.13. 6X Loading Dye Solution (Fermentas, #R0611) 22
3.1.1.14. Primerler (Promega) 22
3.1.1.15. Etidyum Bromür (Sigma, E7637) 23
3.1.1.16. Kullanılan Mikroorganizmalar 23
3.1.1.17. Besiyerleri 23
3.1.1.18. SDS-PAGE İçin Eriyik A (akrilamid/bis) Çözeltisinin Hazırlanması 24
3.1.1.19. SDS-PAGE İçin Eriyik B Çözeltisinin Hazırlanması 24
3.1.1.20. SDS-PAGE İçin Eriyik C Çözeltisinin Hazırlanması 24
3.1.1.21. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 24
3.1.1.22. %10 Amonyum Persülfat (AMPS) 24
3.1.1.23. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine) 25
3.1.1.24. SDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu 25
3.1.1.25. SDS-PAGE Yürütme Tamponu 25
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları 25
3.1.2.1. Hassas Terazi 25
3.1.2.2. Masa Santrifüj 26
3.1.2.3. Soğutmalı Santrifüj 26
3.1.2.4. İnkübatör 26
3.1.2.5. Otoklav 26
3.1.2.6. Benmari (Su Banyosu) 26
3.1.2.7. Isıtıcı 27
3.1.2.8. Vorteks 27
3.1.2.9. Elektroforez Sistemi 27
3.1.2.10. Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Imaging Systems) 27

3.1.2.11. Mikroskop 27
3.1.2.12. pH Metre 28
3.1.2.13. Applied Biyosystem 7500 28
3.1.2.14. Thermal Cycler (Techne) 28
3.1.2.15. Nanodrop ND-1000 29
3.1.2.16. Flow Kabin (Steril Kabin) 29
3.2. Metod 29
3.2.1. 4-MEI'nın Genotoksisite Ve Antigenotoksik Etkisinin Belirlenmesi 29
3.2.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik etkisinin belirlenmesi 29
3.2.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmes……....…29
3.2.1.1.1. Kromozom İncelemeleri İçin Preparatların Hazırlanması 30
3.2.1.1.1.2. Preparatların Boyanması 31
3.2.1.1.1.3. Mikroskobik İncelemeler 31
3.2.1.1.1.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme 31
3.2.1.1.1.5. Kromozom Anormalliklerinin Saptanması 32
3.2.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmesi 32
3.2.2. 4-MEI'nın Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 33
3.2.2.1. 4-MEI'nın Mitotik İndeksin (MI) Saptanması İle Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 33
3.2.3. 4-MEI ve DMH'nin kanser oluşumu ile ilişkilerinin belirlenmesi 33
3.2.3.1. K-ras ve β-Catenin Geninin Real Time PCR ile Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi 34
3.2.3.1.1. RNA İzolasyonu……..……..…34
3.2.3.1.2. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi……...……35
3.2.3.1.3. Real-Time PCR Analizi……..……....……..35
3.2.4. 4-MEI'nın Kanserojenik Ve Anti Kanserojenik Etkisinin Western Blot Yöntemi İle Araştırılması 37
3.2.4.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi…..... 38
3.2.5. 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması 40

3.2.5.1. Kullanılan Suşların Genel Özellikleri 41
3.2.5.1.1. *Bacillus subtilis'*in Genel Özellikleri…….....……..41
3.2.5. 1. 2. *Escherichia coli'n*in Genel Özellikleri…….....41
3.2.5. 1.3. *Pseudomonas aeruginosa'nın* Genel Özellikleri....…..…...41
3.2.5. 2. 0.5 McFarland bulanıklık standardının hazırlanması……42
3.2.5.3. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MIC) Saptanması ... 42
3.2.5.4. En Küçük Bakterisidal Konsantrasyonun (MBC) Saptanması .. 43
3.2.5.5. Disk Difüzyon ile 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisi…….....43
3.3 . İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi 44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 45
4.1. Bulgular 45
4.1.1. 4-MEI'nın Genotoksisite Ve Antigenotoksik Etkisi 45
4.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik etkisinin belirlenmesi..... 45
4.1.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmes…….45
4.1.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmesi..... 53
4.1.2. 4-MEI'nın Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi..... 58
4.1.2.1. 4-MEI'nın Mitotik İndeksin (MI) Saptanması İle Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 58
4.1.3. 4-MEI ve DMH'nin Kanser Oluşumu İle İlişkilerinin Real Time PCR ile Belirlenmesi..... 61
4.1.4. 4-MEI'nın Kanserojenik ve Anti Kanserojenik Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması..... 64
4.1.5. 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması 67
4.1.5.1. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MIC) saptanması 67
4.1.5.2. En küçük bakterisidal konsantrasyonun (MBC) saptanması 72
4.1.5.3. Disk Difüzyon Yöntemi 72
4.2. Tartışma..... 79
4.2.1. 4-MEI'nın Genotoksik etkisinin belirlenmesi..... 79

4.2.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmesi 79
4.2.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmesi 81
4.2.2. 4-MEI'nın Sitotoksik etkisinin Tartışılması 83
4.2.3. 4MEI'un Kanserojenik ve Antikanserojenik Etkilerinin Tartışılması . 85
4.2.4. 4-MEI'nın antibakteriyel etkisine ait tartışma 88
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 91
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 107

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Real Time PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri. 23
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI ile 12 ve 24 Saat Muamele Edilmiş Olan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri ve Anormal Hücre Yüzdesi 48
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI ve EMS ile karışım halinde 12 ve 24 Saat Muamele Edilmiş Olan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri ve Anormal Hücre Yüzdesi 54
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI 12 ve 24 Saat Muamele Edilen Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks (MI) 59
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI+ 240 mg/kg EMS karışımı ile 12 ve 24 Saat Muamele Edilen Farelerin Kemik iliğinde Mitotik İndeks). .. 60
Çizelge 4.5. 4-MEI ve DMH ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras genlerin ekspresyon düzeyleri. 63
Çizelge 4.6. 4-MEI ve DMH ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras 65
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi. 73
Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Bacillus Subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi. 74
Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi. 75
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi. 76

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. DMH ile oluşan kolon kanseri.. 3
Şekil 3.1. Real Time PCR Applied Biyosystem 7500 cihazı. 28
Şekil 3.2. SDS-PAGE Jeline ait görüntü. 39
Şekil 3.3. Thermo semi-dry blotting cihazına ait görüntü. 39
Şekil 4.1. Erkek fare'ye ait kromozomların metefaz plağındaki durum. 46
Şekil 4.2. Dişi fare'ye ait kromozomların metafaz plağındaki durum. 46
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (130 mg/kg, ♀) 49
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (130 mg/kg 4-MEI, ♀). 49
Şekil 4.5. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (♂) 50
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 mg/kg ,♂). 50
Şekil 4.7. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (100 mg/kg, ♂). 51
Şekil 4.8. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 mg/kg, ♀). 51
Şekil 4.9. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 mg/kg, ♀). 52
Şekil 4.10. Kromatid tipi fragment(F') bulunan metafaz plağı (100 mg/kg, ♂). 52
Şekil 4.11. Kromatid tipi fragment(F') bulunan metafaz plağı (130 mg/kg, ♀). 53
Şekil 4.12. Kromozom kırığı (B') bulunan metafaz plağı (EMS+130 mg/kg, ♀)..... 55
Şekil 4.13. Kromatid tipi fragment bulunan metafaz plağı (EMS+130mg/kg,♀). 55
Şekil 4.14. Kromatid tipi fragment bulunan metafaz plağı (EMS+130mg/kg, ♂). ... 56
Şekil 4.15. Kromatid tipi fragment bulunan metafaz plağı (EMS+100mg/kg, ♀) . .. 56
Şekil 4.16. KKB bulunan metafaz plağı (EMS+100 mg/kg 4-MEI, ♀) 57
Şekil 4.17. KD bulunan metafaz plağı (EMS+160 mg/kg 4-MEI ,♂). 57
Şekil 4.18. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (EMS+160 mg/kg, ♂). 58
Şekil 4.19. Muamele edilen sıçanlarda β-catenin genin ekspresyonu. 63
Şekil 4.20. Muamele edilen sıçanlarda K-ras genin ekspresyonu..... 64
Şekil 4.21. Muamele edilen sıçanlardan elde edilen western blot görüntüsü.. 66
Şekil 4.22. 4-MEI ile muamele edilen sıçanların western blot görüntüsü. 66
Şekil 4.23. 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Bacillus subtilis*'in antibakteriyel etkisi.... 68
Şekil 4.24. 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Bacillus subtilis*'in antibakteriyel etkisi ... 68
Şekil 4.25. 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi. 69

Şekil 4.26. 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi (tekrar).69
Şekil 4.27. 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *E.coli* üzerine antibakteriyel etkisi.....70
Şekil 4.28. 4-MEI'nın *E.coli* üzerine antibakteriyel etkisi (tekrar). 70
Şekil 4.29. 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.....71
Şekil 4.30. 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* antibakteriyel etkisi (tekrar). 71
Şekil 4.31. 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi. 73
Şekil 4.32. 4-MEI'nın *Bacillus Subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi.....74
Şekil 4.33. 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.....75
Şekil 4.34. 4-MEI'nın *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi. 76
Şekil 4.35. *Staphylococcus aureus bakterisine* ait zon çapı (5 mg 4-MEI).....77
Şekil 4.36. *Bacillus Subtilis* bakterisine ait zon çapı (10 mg 4-MEI).....77
Şekil 4.37. *E.coli* bakterisine ait zon çapı (15 mg 4-MEI).....78
Şekil 4.38. *Pseudomonas Aeruginosa* bakterisine ait zon çapı (12 mg 4-MEI). 78

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB : Avrupa Birliği
AH : Anormal Hücre
B’ : Kromatid Kırığı
B’’ : Kromozom Kırığı
CA : Chromosome Aberration
Cox2 : Cyclooxigenase
DMH : 1,2 Dimethylhydrazine
DNA : Deoksiribonukleik Asit
DS : Disentrik Kromozom
F : Fragment
FDA : Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
HSK : Hepatosellüler karsinoma
ISCN : International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA : Kromozom Anormalliği (Kromozom Aberasyonu)
Kb : Kilobaz
KCl : Potasyum klorür
KD : Kromatid Değişimi
KKB : Kardeş Kromatid Bileşimi
KKD : Kardeş Kromatid Değişimi
KRK : Kolorektal kanser
MBC : En Küçük Bakterisidal Konsantrasyonu
4-MEI : 4-methylimidazole
MI : Mitotik indeks
MIC : Minimum inhibition concentration
MMP : Matrix metalloproteinase
MN : Mikronükleus
NaCl : Sodyum klorür
OD : Optical Density

PK : Pozitif Kontrol

r : Korelasyon katsayısı

RI : Replikasyon İndeksi

rpm : Revolution Per Minute (devir/dakika)

SCE : Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)

TGF : Tumor growth factor

UV : Ultraviyole

1. GİRİŞ

Tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıda hammaddesi ya da yardımcı madde olarak kullanılmayan, besleyici değeri olan veya olmayan; gıdanın üretilmesi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak için kullanılmasına izin verilen maddelere gıda katkı maddesi denmektedir. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin kullanımını onayladığı gıda katkı maddesi sayısı 2008'dir. Avrupa Birliğinde (AB) kullanımı onaylanan gıda katkı sayısı ise 297'dir. Eskilerde tüm alanlarda birkaç bin kimyasal madde kullanılırken, günümüzde 80000 kimyasal madde farklı amaçlar için kullanılmaktadır ve bu sayı her gün artmaktadır. Dünyanın kimyasal madde üretimi 1950 yılında yedi milyon ton iken bu rakam günümüzde dört yüz milyon ton/yıl olarak görülmektedir (Boğa ve Binokay, 2010).

Gıda katkı maddelerinden biri gıdaları daha cazip hale getirmek için gıdalara katılan renk maddeleridir. Renk maddeleri sentetik veya doğal maddelerdir. Doğal renklendiriciler grubunda yer alan karameller de önemli bir renklendirici grubunu oluşturur. En eski besin renklendiricisi olan karameller kahverengi ve koyu kahverengi renklerinde olup koyu, sıvı ve hidroskobik toz şeklindedir (Curnha ve ark., 2011). Karameller kontrollü bir ısıtma işlemi uygulanılarak dekstroz, laktoz, malt şurubu, hidrolize nişasta ve özellikle sakkaroz gibi bazı karbonhidratların 190 ℃ 'ye kadar ısıtılmaları (yakılmaları) sonucunda elde edilir ve bu olaya karemelizasyon denir. Karameller 4 gruba ayrılır: 1-Sade karamel, 2- Kostik sülfit karamel, 3-Amonyum karamel, 4- Sülfit amonyum karamel. Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan 4-metilimidazol (4-MEI) karemelizasyon sırasında meydana gelir ve karemelizasyonun işaretidir. Özellikle 3. ve 4. grup karameller 4-MEI içerirler (Cunha ve ark., 2011)

4-metilimidazol (heterosiklik organik kimyasal bileşiği) (4-MEI) yaygın olarak insanların besinlerinde yer almaktadır (Jacobson, 2011). Karamel (en çok yemek ve boyalı içeceklerde), kahverengi bira ve genellikle kolalı içeceklerle 12-ons (340.1943 gram) başına en az 100 µg tüketilir. Ayrıca, bu madde kavrulmuş

gıdalarda, ızgara etlerde ve kahvede bulunur. Karemellerin yaygın kullanımı bilim adamları arasında ciddi endişeleri ortaya çıkarmıştır. 4-MEI ile ilgi bazı çalışmalardan şu sonuçlar alınmıştır: Tuormaa (1994), 4-metilimidazol' un etkisini sıçan, fare ve tavşanlar üzerinde araştırmıştır. Bu araştırma sonucunda sıçan ve farelerin beyaz kan hücrelerinin ve lenfositlerinin sayısında düşüş gözlenmiştir. Tavşanlarda ise düşük konsantrasyonlarda dahi B6 vitamin'in emilimini inhibe ettiği belirlenmiştir.

Chan ve ark. (2006) dişi ve erkek sıçanlarda yaptıkları çalışmada 106 hafta boyunca erkek sıçanlara 0, 625, 1250, 2500 ppm ve dişi sıçanlara ise ise 0, 1250, 2500, 5000 ppm 4-metilimidazol vermişlerdir. Sonuçta en yüksek konsantrasyonlarda 4-MEI verilen dişi sıçanlarda heyecanlanma, hiperaktivite ve yürüyüşte bozukluk gözlenmişlerdir. Ayrıca dişilerde mononükleer lösemili hücre görülme sıklığı kontrol grubuna nazaran artış göstermiştir. Bu araştırıcılar tarafından verilen sonuçlara göre 4-metilimidazol'ün erkek ve dişi sıçanlarda alveolar/bronşiyal adenom ve karsinom için indükleyici olabilme özelliğe sahip olması ve dişi sıçanlarda mononükleer lösemi hücrelerin meydana gelmesine neden olabileceğini açıklamışlardır. Çelik ve Topaktaş (2013) yüksek lisans tez çalışmasında 4-MEI'ın insan periferal lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu saptamıştır.

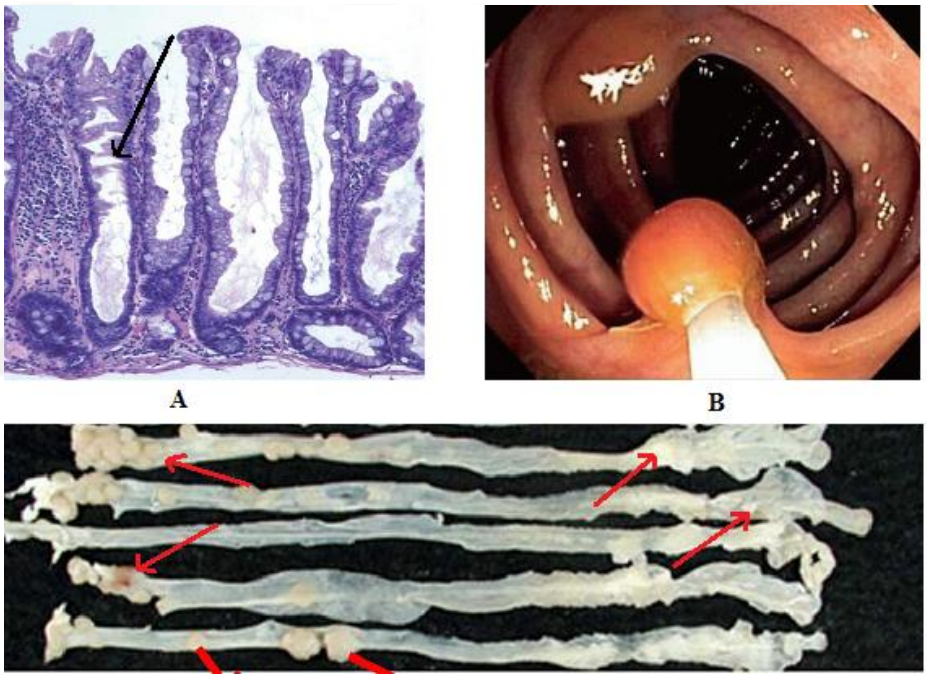
2010 verilerine göre kolalı ürünlerin kişi başı tüketiminin yıllık ortalaması 89 şişe ve Türkiye'de kolalı ürünlerin kişi başı tüketiminin yıllık 159 şişe olduğu belirlenmiştir ve Türkiye'nin tüketimi dünya ortalamasından yüksek olduğu belirlenmiştir. Türkiye'de yıllık kişi başı alkolsüz içeceklerin yüzde 70'i Coca kolalı içeceklere aittir (Hürriyet gazetesi, 2012). Türk halkının 2012'deki yıllık toplam kola tüketimi 2.6 milyar litre olarak belirlenmiştir (Gazete5, 2013).

Sağlık Bakanlığının 2000–2006 yıllarını kapsayan son çalışmasına göre, Türkiye'de 396 bin kanser vakası bulunmaktadır. Her yıl 140 bin kişi kanserden ölüyor, bu rakamın önümüzdeki 20 yılda 500 bine çıkacağı tahmin edilmektedir (www.gidahareketi.org, 2014).

Dünya çapında her yıl yaklaşık bir milyon kolorektal kanser (KRK) tanısı konulurken, 500.000 hasta KRK nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Winawer ve

Sherlock, 2007). Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2007–2008 yıllarında 12 ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görülme sıklığı açısından tüm kanser türleri içerisinde % 7.8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7.5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (Sağlık Bakanlığı 2008).

1,2 Dimethylhydrazine (DMH) kolonda aberrant crypt foci oluşturması ile kanserin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Park ve ark. 1997). Bu nedenle araştırmalarda model organizma oluşturmak için DMH kullanılmaktadır. DMH ile oluşan aberrant cryptler ve tümörler aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (şekil 1.1).



Şekil 1.1 DMH ile oluşan kolon kanseri. A: DMH muamelesi sonucunda sıçanların bağırsaklarında aberant crpyt oluşumu. B: DMH muamelesi sonucunda sıçan bağırsağında oluşan tümör C: DMH muamelesi sonucunda sıçan bağırsağında oluşan tümörler.

1.1. DMH ile Ortaya Çıkan Kanserin Moleküler Mekanizması

DMH karaciğer ve kolonda p450 tarafından Methyldiazuniom'a metabolize olur (Tacchi-Bedford ve ark. 1998; Rijnkels ve Alink. 1988) ve ortaya çıkan Methyldiazuniom DNA'ya bağlanarak DNA da O_6-Methyl Guanine mutasyonuna

sebep olur (Jackson ve ark. 2003). DMH ile muamele sonucunda ortaya çıkan mutasyonlar şu genlerde meydana gelmektedir:

APC/B: Vücutta tümör süpresör aktivitesine sahip bir gendir ki DMH bu gende mutasyona neden olarak kolon dokusunda tümör oluşumuna yol açar (Sparks ve ark., 1998). Yapılan araştırmalarda DMH'nin, 18 inci kromozom üzerindeki APC geninde delesyona sebep olduğu ispatlanmıştır (Femia ve ark. 2010).

β-catenin: β-katenin Wnt sinyal yolağında görev yapan bir protoonkogen gendir (Morin ve ark. 1997). APC geni β catenin genini regüle eden bir gendir ve APC geninde DMH'nin mutasyona sebep olduğu zaman β-catenin geninde de mutasyon ortaya çıktığı belirlenmiştir (Sparks ve ark., 1998).

K-ras: GTPaz aktivitesine sahip ve protoonkogen olarak hücre siklusunda önemli bir gendir. DMH'in K-ras geninde ortaya çıkardığı mutasyondan dolayı bu gen onkogen haline dönüşü ve kanserin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktır (Morin ve ark. 1997).

DMH farklı genlerde mutasyona sebep olma dışında bazı genlerin ekspresyon seviyesini değiştirerek kanserin ortaya çıkmasını kolaylaştırır. Bu genler aşağıda sıralanmıştır:

DMH, APC genindeki mutasyona sebep olması nedeni ile CyclinD ve C-myc genlerin ekspresyonunda artışa sebep olur (Wali ve ark. 2002) ve bu nedenle hücreler hızlı bölünür ve hücre siklusu devam eder, yeni bölünen hücre tekrar bölünür bu da kanser oluşması için önemli bir kritik devredir (Kolligs ve ark. 2002).

DMH, ayrıca β-catenin geninin ekspresyonunun artması ile MMP7 (matrix metalloproteinase-7) geninin ekspresyonunda artışa neden olur ki bu gende kanserli hücrede adhezyonun bozulmasına neden olması ile metastaz oluşumuna yol açar (Lu ve ark., 2008). Bunların yanı sıra DMH, K-ras genindeki mutasyon oluşumu ile P13k/Akt geninin ekspresyonunda artışa neden olur. Fakat P21 geninde herhangi bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir. P13k/Akt geni glikoz metabolizmasında ve hücre siklusunda Cyclin D'nin sentezinde promoter olarak görev yapan gendir. Bu yüzden P13k/Akt geninin ekspresyonunun artması ile fazla miktarda Cyclin D sentezlenir ve Cyclin D miktarında artış olması ile hücre devamlı bölünür ve tümör oluşumu gerçekleşir (Bissonnette ve ark. 2000).

Cox2: K-ras genindeki mutasyon sonucunda Cox2 (Cyclooxigenase-2) geninin ekspresyonu artar. Cox2 geni arachidonic acid'in prostaglandin endoperoksidaz'a dönüşümünü yapan bir proteindir (Bissonnette ve ark., 2000).

TGFβ: DMH, TGFα ve TGFβ genlerinin ekspresyonunda azalmaya fakat $TGF\beta_1$ genin ekspresyonunda yükselmeye yol açar. TGFβ hücrede iki farklı fonksiyona sahip olmaktadır ki bunlardan biri normal hücrelerde tümör süpresör özeliğine sahip bir gendir ve hücre döngüsü bitmesinden sonra döngüyü G1 fazında durdurur ve hücrede anormallik olduğu zaman hücrenin apaptozu girmesini sağlar ama kanserli hücrede ise immün regülasyonuna (immune regulation) ve mikroçevrenin modifikasyonuna (microenvironment modification) neden olmaktadır ve bunlar tümör yayılması (invazyon) için önemli şartlardır (Massague, 2008).

DMH' nin P53 geninde etkisi: Tek iplikli konformasyon polimorfizmi metodu ile yapılan araştırmalarda DMH'nin P53 geninde herhangi bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir (Shivapurkar ve ark., 1995; Shivapurkar ve ark., 1997; Erdman ve ark., 1997; Sohn ve ark., 1999).

Bu yüzden bizim yaptığımız araştırmada DMH enjekte edilmiş sıçanların kalın bağırsak (kolon) dokusunda 4-MEI ve DMH'in K-ras ve β-catenin genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

1.2. Kanser Oluşumu ile Genlerin Ekspresyonları Arasındaki İlişki

KHDAK (Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri = Human Lung Squamous Carcinoma Cells)'nın % 60'ında epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü alfa'nın (TGFα) aşırı ekspresyonu gözlenmiştir (Rabıasz ve ark., 1992).

Ay ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada kolorektal kanserli hastaların kolon dokusunda p21, p27 ve p57 (hücre siklusunda görev yapan genler) genlerinin ekspresyon düzeylerini incelemişlerdir ve sonuçta kolon kanseri hastalarda bağırsak dokularında p21, p27 ve p57 genlerinin ekspresyon düzeylerinin kontrol gurubuna nazaran (hasta olmayan gurup) arttığını göstermişlerdir.

BCL2 ve Siklin D genlerinin ekspresyonu KHDAK (Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanser)'de yüksek bir oranda olduğu gözlenmiştir (Betticher ve ark. 1996).

Yapılan çalışmalarda E-kaderin ekspresyonu ile tümör invazyonu arasında ilişki saptanmıştır. Tümörün büyüklüğü arttıkça E-kaderin genin ekspresyon düzeyinde azalma ve β-catenin ekspresyonunda artış ortaya çıkmıştır (Scholten ve ark. 2006).

E-kaderin, hücrelerin birbiriyle yapışmasını sağlar ve hücrenin hareketlilik özelliğinin yok olmasına neden olur. E-kaderin ekspresyonundaki azalmanın epitel hücrelerinin diferansiyasyonun azalmasına ve hücrelerin göç yeteneklerinin artmasına sebep olduğu saptanmıştır (Lee, 1996).

İnsan kaynaklı kanser hücrelerinde proliferasyon, hücre siklusu, apoptozis ve metastazı düzenleyen p53, BRCA1, Rb, Ras ve ß-catenin gibi genlerde mutasyon ortaya çıktığı gözlenmiştir. Hepatosellular karsınoma (HSK)'da gen mutasyonu diğer kanser tiplerine göre daha çeşitlidir. HSK'da P53 ve ß-catenin genleri en sık mutasyona uğrayan genlerdir. Yapılan çalışmalarda hücresel onkogenlerin ekspresyonunun artması yada tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda Wnt/ßcatenin, Ras, p14Arf/p53, p16INK4A/Rb, TGFß ve PTEN/Akt yolakları gibi çeşitli sinyal yolaklarının regülasyonunun bozulduğu ve hücrenin kanserleştiği bildirilmiştir (El-Serag ve Rudolp, 2007).

C-myc, N-myc ve L-myc genlerinden oluşan myc grup genleri sıklıkla amplifikasyon ve transkripsiyonel regülasyon bozulması ile onkogen haline dönüşmektedir. KHAK'lerinin % 18- 31'inde myc geninin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. C-myc'nin, tümör büyüme hızında artış ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Tümör hücrelerini apopitozisden koruyan başlıca onkoprotein Bcl-2'dir. Bcl-2 ekspresyonu KHDAK'lerinin % 70-90'ında gösterilmiştir. (Fong ve ark. 1999; Hastürk, 2000).

60'a yakın kanser çeşidinde survivin geninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Meme, kolon, beyin, lösemi-lenfoma, akciğer, malign melanoma, over, prostat, böbrek kanserleri, nöroblastoma ,mide, hepatosellüler karsinoma ve özefagus kanserlerinde bu genin ekspresyon düzeyinin arttığı gözlenmiştir (Tamm ve ark., 1998) .

COX-2 nin bazı kanser dokularında ekspresyon düzeyinin yükseldiği ve karsinogenezisde önemli rolü olduğu saptanmıştır (Sano ve ark.,1995). İnsan kanserlerinde COX-2 geninin aşırı ekspresyonu ile apoptozun inhibisyonu, metastatik potansiyelin artması ve anjiogenezin ortaya çıkması arasında ilişki olduğu bulunmuştur (Murata ve ark., 1999). Friday ve Adjei (2005), K-ras geninin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ile akciğer ve kolon kanserlerin tanımında bir marker olarak kullanabileceğini saptamışlardır. Bu araştırıcılar K-ras geninin ekspresyonunun arttığını bulmuştur.

Kolon kanseri ve adenomların ortaya çıkma nedeni incelendiğinde bu kanserlerde en çok K-ras geninin aktivitesinin yükselmesi ve onkogen olarak çalışması olduğu görülmektedir (Kumar ve ark., 2005). β-catenin genin ekspresyon seviyesinin yükselmesi ve mutasyonu, karaciğer kanseri, kolorektal kanseri, akciğer kanseri ve meme kanseri gibi kanserlerin ortaya çıkmasına neden olur (Morin ve ark., 1997).

K-ras geni, kolorektal karsinom gelişiminde rol oynayan ve 12. kromozom üzerinde yer alan yaklaşık 5 Kb (kilo baz) uzunluğunda olan bir proto-onkogendir. K-ras geninin ürünü olan protein ekstrasellüler mitojenik sinyallerin iletiminde rol alan, GTP bağlayabilen bir hücre zarı proteinidir. Bu gen sitoplazma zarının içinden sinyal iletimini sağlayan intrinsik GTPaz aktivitesi olan bir proteini kodlamaktadır. Hücre büyümesi ve bölünmesini uyaran herhangi bir dış uyarı ile K-ras proteinini GTP'ye bağlayıp aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına göndererek hücre büyümesinde ve bölünmesinde fizyolojik role sahiptir. K-ras mutasyonu ile GTPaz aktivitesi ortadan kalkar ve böylece hücre proliferasyonu düzensiz hale dönüşür (Zeng ve ark. 2010). Yapılan çalışmalarda K-ras mutasyonunun insan kanserlerinde sık görüldüğü belirlenmiştir. Mutasyonlar Ras protoonkogeninin onkogene dönüşmesine neden olur ve böylece hücrenin kanserleşmesinin yolu açılır (Karapetis ve ark., 2008). Ras onkoproteinlerini aktifleştiren mutasyonlar, Ras proteinin GTPaz aktivitesini bozar ve Ras proteinin GTP hidrolizini engeller ve böylece normal dışı aktiviteye sahip Ras-GTP formu ortaya çıkar ve bu protein hücre çoğalmasını tetikler (Gibbs ve ark., 1984).

β-catenin, hücreler arası bağlantılardaki E-kadherin kompleksinin yapısal bir bileşenidir ve kadherin hücre adhezyon molekülünün sitoplazmik alanına bağlanıp ve hücre-hücre adhezyonunda görev alan bir polipeptiddir (Gumbiner, 1997; Nelson ve Nusse, 2004; Willert ve Jones, 2006). Bu gen üçüncü kromozom üzerinde yer almaktadır ve bu genin yaklaşık uzunluğu 6 Kb'dır. Bir başka görevi ise nükleusda transkripsiyonu aktif etmek için kromatinin yeniden modelleme kompleksine katılmasıdır (Willert ve Jonnes, 2006). Ayrıca β-catenin, Wnt proteinleri tarafından başlatılan sinyal iletim yolağının en önemli anahtar molekülüdür (Willert ve Nusse, 1998). β-catenin düzeyi Wnt uyarımı olmadığında, proteozomal yolak tarafından yıkıldığından düşüktür. Ancak Wnt sinyali varlığında proteozomal yıkımdan kurtulur ve düzeyi artar (Nelson ve Nusse, 2004, Habas ve Dawid, 2005).

Gıda renklendiriciler ile yapılan bazı çalışmalarda bazı gıda renklendiricilerin antibakteriyel etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Örneğin: Gül ve Bakht (2015)'ın yaptıkları bir çalışmada turmeric boya isimli maddenin antibakteriyel etkisi *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* sp. bakterilerinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda turmeric az da olsa antibakteriyel etki göstermiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda ise gıda renklendiricilerin antioksidan etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Yolmeh ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada annatto boyasının antioksidan etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile annatto sarısının antioksidan özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı karemelizasyon sırasında ortaya çıkan 4-metilimidazol (4-MEI)'un farelerde *in vivo* genotoksik ve antigenotoksik etkilerini araştırmaktır. Ayrıca bu çalışmada 4-MEI'nın sıçanların kalın barsağında kanserojenik ve antikanserojenik etkilerinin olup olmadığını K-ras ve β-catenin genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi yoluyla saptamaktır. Bunlarla birlikte 4-MEI'nın antibakteriyel etkisi *Bacillus subtilis, E. coli, Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* suşlarında araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları

Gıdalara renk vermek için gıdalara sonradan katılan maddeler şunlardır; eritrozin, annatto, beta karoten, demir oksit, gümüş, safran, likopen, karamel, klorofil, zerdeçal, titanyumdioksit, kırmızı 2g boyası, sunset sarısı vb.

2.1.1. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Alija ve ark. (2004) sıçan hepatositlerinde beta karoten'in 0.1, 1, 10 µM konsantrasyonlarının genotoksik etkisini KKD testleri ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda Beta karoten maddesinin genotoksik olmadığı ortaya çıkmıştır.

Khan ve Sultana (2004), Wistar albino sıçanlarında soya izoflavonlarının potasyum bromat'ın oksidatif stres etkisi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada potasyum bromat intraperitonal yolla (125 mg/kg) ve soya izoflavon ise oral yol ile (5 ve 10 mg/kg) sıçanlara verilmiştir ve sonuçta her iki maddenin DNA sentezi düzeylerinde önemli derecede azalmaya neden oldukları saptamışlardır.

Hong ve ark. (2011), demir oksitin farklı fonksiyonel gruplarının sıçan L-929 fibroblast hattında sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olup olmadığını komet testi ile araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda demir oksit ile muamele edilen gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında demir oksitin genotoksik olduğu saptanmıştır.

Konczol ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada demir oksit'in insan akciğer epitel hücrelerinde genotoksik etkisi komet testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre demir oksit reaktif oksijen üretimini daha da arttırdığı, DNA hasarının yükseldiği ve demir oksidin genotoksik olduğu belirlenmiştir.

Sayed ve ark. 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada sunset sarısının insan somatik ve üreme hücreleri üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını

araştırmışlardır ve bu çalışmanın sonucunda sunset sarısının somatik hücrelerde KKD'yi uyardığı ve genotoksik olduğu saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada gıda renklendiricisi olarak kullanılan sunset boyasının genotoksik etkisi *Brassica campestris* bitkisinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sunset boyası mitotik indeksin düşmesine sebep olmuştur. Ayrıca sunset boyası ile muamele edilen gruplarda kromozom anormalliğinin kontrole göre arttığı saptanmıştır (Dwivedi ve Kumar, 2015).

Başka bir çalışmada orange-red boyasının genotoksisitesi KA yöntemi ile *Allium cepa* bitkisinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre orange-red boyasının genotoksik olduğu saptanmıştır (Tripathy ve Rao, 2015).

Kaur ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada sky blue ve orange red boyalarının genotoksisitesi ames testi ile *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşu üzerinde ve kromozom aberasyonu yöntemi ile *Allium cepa* bitkisi üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bu gıda renklendiricilerinin nokta mutasyonuna sebep olmadıkları fakat kromozom aberasyonunu indükledikleri ortaya çıkmıştır.

2.1.2. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Antigenotoksisite Çalışmaları

Gasiorowski ve ark. (1997) *Aronia melanocarpa'*dan izole edilen antosiyaninlerin benzo (a)pyrene ve 2-amino fluorene'in mutajenik etkilerine karşı antimutajenik etkisini Ames testi ve *in vitro* insan lenfositlerinde KKD testi ile araştırmışlar ve bu maddenin antimutajenik olduğunu belirlemişlerdir.

Başka bir çalışmada ise Agner ve ark. (2004) annattonun antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada N-nitrosodiethylamine (DEN) (200 mg/kg vücut ağırlığı) Wistar albino sıçanların karaciğerlerinde DNA hasarına neden olduğu komet testi ile belirlenmiştir. Ayrıca araştırıcılar annattonun sıçan karaciğer mediumu-term testi ile kanserojenitesini ve antikarserojenitesini araştırmışlardır. Bu araştırmada 20, 200, 1000 ppm konsantrasyonlarında annatton

kullanmış ve en yüksek konsantrasyonda annattonun antigenotoksik ve antikanserojenik olduğu saptanmıştır.

Antunes ve ark. (2005) çalışmalarında içerisinde Annatto maddesi içeren *Bixa orellana L*. ekstraktının insan lenfositlerinde klastojenik ve cisplatinin klastojenik etkisine karşı antiklastojenik etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonuçlarına göre ekstraktın bütün konsantrasyonlarında (1, 2.5, 5 ve 10 μg/mL) cisplatinin neden olduğu aberasyonlu metafazların sayısı düşmüştür.

Muzandu ve ark. (2006), kronik inflamatuar gibi hastalıklarda rol oynayan reaktif tür olan peroksinitrite (0.31- 10μM)'nin etkisine karşı beta karotenin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada Çin hamsteri'nin karaciğer fibroblast DNA'ları üzerindeki test maddelerinin etkisi komet tekniği (comet assay) ile araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucuna göre peroksinitrit ve diğer reaktif oksijen türlerinin DNA üzerindeki zararlı etkilerini beta karoten azaltmıştır.

Dos Santos ve ark. (2012), bir antikanser ilacı olarak kullanılan cisplatine'in etkisine karşı içerisinde annatto maddesi olan *Bixa orella L.* ekstraktının antigenotoksik etkisini komet testi ile araştırmışlardır. Sonuç olarak annatto içeren *Bixa orella L*. ekstraktının, sitotoksik olmadığı ve PC12 hücrelerinde cisplatinin neden olduğu DNA hasarını düşürdüğü ve mikronukleus oluşumunu uyarmadığı saptanmıştır.

Yurtcu ve ark (2012), beta karoten'in insan lenfositlerindeki L-arjinin ile oluşturulmuş oksidatif reaktiflere karşı koruyucu etkisini komet testi ile araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda L-arjinin'in oksidatif hasarı indüklediği ve beta karotenin ise genotoksik hasarı azalttığı ortaya konulmuştur.

2.2. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları

2.2.1. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Kanserojenite Çalışmaları

Gaunt ve ark. (1977) yaptıkları bir çalışmada open-pan ve close-pan kimyasalları amonyak yöntemi ile yapılmış karameli sıçanlara % 4 , % 8, % 16 oranlarında vermişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda tüm konsantrasyonlarda lenfositopeni (kandaki lenfosit sayısının azalması) ortaya çıkmıştır ve en yüksek iki konsantrasyonda timüs ve dalak ağırlıklarının azaldığı gözlenmiştir. Karaciğer ve böbrek ağırlığının ise arttığı belirlenmiştir.

Maekawa ve ark. (1982) amonyaklı karamelin F344 sıçanlarında kanserojenitesini araştırmışlar ve bu maddenin kanserojenik olmadığını belirlemişlerdir.

Hagiwara ve ark. (1983) karamellerin fareler üzerinde kanserojenik etki göstermediğini saptamışlardır.

2.2.2. Gıda Renklendiricileri ile Yapılan Antikanserojenite Çalışmaları

Agner ve ark. (2004), annattonun kanserojenik etkiyi azaltıp azalmadığını araştırmışlardır. Wistar sıçan karaciğerlerinde N-nitrosodiethylamine (DEN) (200 mg/kg vücut ağırlığı)'nın neden olduğu DNA hasarları komet tekniği ile saptanmış, ayrıca sıçan karaciğer medium-term testinde kanserojenitesi ve antikanserojenitesi araştırılmıştır. Çalışma için 20, 200, 1000 ppm dozları kullanılmış ve en yüksek konsantrasyonda annattonun antigenotoksik ve antikanserojenik olduğu saptanmıştır.
Shi ve ark. (2006) zerdeçal'ın insan over kanser hücrelerinde antiproliferasyon ve apoptozis etkisini araştırmışlardır ve sonuç olarak zerdeçal'ın kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptozisi uyardığı belirlenmiştir.

Cao ve ark. (2008), HepG2 (hepatoselüler kanser) hücrelerinde zerdeçal'ın antikanser etkisini mikronukleus testi ile araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre zerdeçal'ın antikarsinojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Bar–Sela ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada bir antioksidan olarak tanınan kurkuminin antikanser ajanı olabilirliğini pankreas kanseri hastalarında araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda kurkumin pankreas kanseri hastalarının tedavisinde antikanser ilacı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Amin ve ark. (2011), yaptıkları bir araştırmada diethylnitrosamin (DEN) ile oluşturulan karaciğer kanserli sıçanlarda safran'ın antikanser etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bu araştırmada DEN'in verilmesinden iki hafta önce 150 ve 300 mg/kg olacak şekilde sıçanlara her gün oral yol ile safran verilmiş ve sıçanlar 22 hafta sonra öldürülmüş ve sıçanların karaciğer dokuları incelenmiştir. Bu araştırma sonucunda safran ile muamele olan sıçanların karaciğerlerinde tümörlerin küçüldüğü ve sayısının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca Tunel testi sonuçlarına göre safran verilen sıçanların karaciğer hücreleri incelendiğinde safranın DEN' e karşı apoptoza yol açtığı belirlenmiştir.

Bathaie ve ark. (2013), Krosetin renk maddesinin antikanserojenik etkisini insan mide kanseri ve modellenmiş mide kanserli sıçanlar üzerinde MTT tekniği ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda Krosetin'in antiprolatif etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Ayrıca aynı araştırıcılar RT-PCR yöntemi ile Krosetin'in Bcl-2, Bax genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini yine insan mide kanseri ve modellenmiş mide kanserli sıçanlar üzerinde araştırmışlardır ve bu çalışmanın sonucunda Krosetin'in Bcl-2, Bax genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve apoptotik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Görüldüğü gibi gıda renklendirici olarak kullanılan bazı maddelerin genotoksik oldukları, bazılarının genotoksik olmadıkları ve bazılarının da antigenotoksik etkiye sahip oldukları farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Ayrıca bazı gıda renklendiricilerinin antikarsinojenik etkiye sahip oldukları farklı çalışmalarda gösterilmiştir.

2.3. Gıda Renklendiricilerin Antibakteriyel Etkileri Üzerine Yapılan Araştırmalar

Yolmeh ve ark. (2014)' nın yaptıkları bir çalışmada annatto boyanın antibakteriyel etkisi 8 farklı bakteri suşunda (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecalis, Salmonella enteritidis, Listeria innocua*) araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar annatto boyasının antibakteriyel etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmanın sonucuna göre gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere nazaran annatto boyasına daha hassas oldukları saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada 8 farklı bitkiye (*Acacia catechu L., Bixa orellana L., Cassia auriculata L., Embillica officinalis Gaertn, Punica granatum L., Rubia tinctorum L., Tagetes erecta L. ve Terminalia chebula L.*) ait boya ekstraktı elde edilmiştir ve bu bitkilerden ekstrakt edilen boyaların antibakteriyel etkileri farklı bakterilerde (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Vibrio fischeri, Yersinia enterocolitica, Proteus vulgaris, Lactobacillus sp., Lactococcus sp., Pediococcus pantosaceus, Staphylococcus sp., Pseudomonas sp*.) araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçları incelediğimizde kırmızı renkli boyaların sarı renkli boyalara nazaran daha iyi antibakteriyel etkilerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca catechu (*Acacia catechu*) ve myrobalan (*Terminalia chebula*) bitkilerinden ekstrakte edilen boyaların antibakteriyel etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir (Ramamoorthy ve ark., 2011).

Gul ve Bakht (2015)'ın yaptıkları bir çalışmada turmeric boya isimli maddenin antibakteriyel etkisi *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* sp. bakterilerinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda turmeric az da olsa antibakteriyel etki göstermiştir.

2.4. DMH İle Yapılan Kanserojenite ve Genotoksisite Çalışmaları

Deeptha ve ark. (2006) DMH'in etkisini Wistar albino sıçanlarda araştırmışlardır. Bu çalışmada 20 mg/kg DMH 4 hafta boyunca haftada bir defa deri

altı yolu ile sıçanlara enjekte edilmiştir. 15 hafta sonra sıçanların kolon ve karaciğer dokularında superoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmadan ortaya çıkan sonuçlara göre DMH, kolon ve karaciğer dokularında SOD ve CAT enziminin aktivitesinin azalmasına yol açarak kolonda tümör oluşumuna neden olmuştur.

Prabhu ve ark. (2009)'nın yaptıkları bir çalışmada DMH'i, 40 mg/kg iki hafta, haftada iki kere deri altı yolu ile sıçanlara vermişlerdir ve 16 hafta sonra sıçanların kolon dokularında tümör oluşumu gözlenmiştir ve ayrıca sıçanlarda SOD, CAT, GPx (glutatyon peroksidaz) enzimlerinin aktivitesinin önemli derecede azaldığı saptanmıştır.

Wu ve ark.(2012)'nın yaptıkları bir araştırmada bir hafta içerisinde 3 kere 40 mg/kg olacak şeklinde sıçanlara DMH enjekte etmişlerdir ve sonra sıçanların kolon dokusunda β-catenin ekspresyonu RT-PCR ve western blot teknikleri ile incelenmiştir. Bu araştırıcıların ortaya koydukları sonuçlara göre DMH, β-catenin genin ekspresyon seviyesini artırmıştır.

Okada ve ark. (2013) yılında yaptıkları çalışmada 1,2 dimetilhidrazinin ve farklı maddelerin kolon dokusunda ve kemik iliği eritrositlerinde etkisini mikronukleus testi ile araştırmışlardır. Sonuçta DMH'nin mikronukleus oluşumunu uyardığını saptamışlardır. Bu araştırmadan alınan sonuçlar oral yol ile alınan maddelerin kolon, kemik iliği, mesane ve mide dokularında MN testi ile genotoksik risklerinin araştırılmasının yararlı olduğunu göstermişlerdir.

Mohania ve ark. (2013), Wistar albino sıçanlara iki hafta, haftada iki kere 40 mg/kg DMH deri altı yolu ile enjekte edildiğinden 32 hafta sonra deney hayvanlarında oksidatif stres oluştuğunu ve sıçanların kolon dokularında tümör oluşumunu gözlemişlerdir.

Pesarini ve ark. (2013) tarafından yapılan bir araştırmada iki hafta boyunca haftada iki kere 30 mg/kg olacak şeklinde sıçanlara DMH verilmiştir ve DMH verilmesinden 8 hafta sonra sıçanların periferik kanlarında DMH'in etkisi mikronukleus ve komet testi ile incelenmiştir. Bu araştırmanın sonucunda DMH'in kanserojenik ve mutajenik etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Ayrıca bu sürenin bitmesinden sonra sıçanların bağırsaklarında tümör oluşumu gözlenmiştir.

Yapılan başka bir araştırmada 20 mg/kg DMH 5 hafta boyunca haftada bir kere intraperitonal yol ile sıçanlara verilmiştir.16 hafta sonra sıçanların kolon dokuları alınıp RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RT-PCR ile β-catenin geninin ekspresyonu incelenmiştir. Bu araştırmadan alınan sonuçlara göre DMH, β-catenin genin ekspresyonunun artmasına yol açmıştır (Allameh ve ark., 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada test maddesi olarak 4-metilimidazol (4-MEI), materyal olarak da fare kemik iliği ve sıçan kalın bağırsağı kullanılmıştır. Araştırmamızda 4-MEI'nın *in vivo* genotoksik ve antigenotoksik etkisinin olup olmadığı fare (Swiss albino) kemik iliği hücrelerinde, kanserojenik ve antikanserojenik etkisinin olup olmadığı da sıçan kalın bağırsağında (kolonunda) araştırılmıştır. Bunlarla birlikte 4-MEI'nın antibakteriyel etkisi *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* suşlarında bakılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

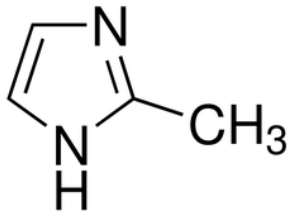
3.1.1.1. 4-Methilimidazol (4-MEI)

Yapılmış olan bu çalışmada test maddesi olarak Sigma firmasından temin edilmiş olan 4-methilimidazol kullanılmıştır. 4-MEI'nin 'in kimyasal özellikleri aşağıda görülmektedir.

İlacın ticari adı **:** 4-methilimidazol
Sistematik adı **:**1H-Imidazole, 4-methyl (9Cl); imidazole, 4-methyl; 4(5)-methylglyoxaline;4(5),4(5)-methylimidazole;5-methylimidazol
Kapalı Formülü **:** $C_4H_6N_2$
Molekül ağırlığı **:** 82.11 g/mol
Yoğunluğu **:** 1.22 g/cm³
Erime Sıcaklığı **:** 114–116 °C (237–241 °F)
Kaynama Sıcaklığı: 432 °C (810 °F)
Cas No **:** 61337-67-5

Üreten firma **:** Sigma

Açık formülü:



3.1.1.2. Kolşisin (Sigma)

Kromozom incelemeleri için farenin kemik iliğinden preparat yapmak amacıyla bölünen kemik iliği hücrelerini metafaz devresinde durdurmak için mitotik zehir olarak kolşisin (Sigma Cat. No. C9754) kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve 3 mg/kg konsantrasyonunda olacak şekilde sıçanlara intraperitonal yol ile verilmiştir.

Cas no **:** 64-86-8

Kapalı formülü **:** $C_{22}H_{25}NO_6$

Moleküler ağırlığı : 399.44 g/mol

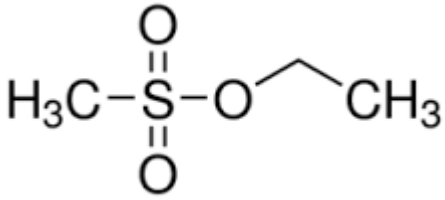
Açık formülü **:**



3.1.1.3. Etil Metan Sülfonat (Ethyl Methanesulphonate=EMS)

Genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında mutajen olarak (pozitif kontrol) EMS kullanılmıştır. EMS (Sigma, M0880) % 50'lik etil alkolde hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. EMS stok çözeltisi her hafta taze olarak hazırlanmış ve her dişi sıçana 50 mg/kg v.a. EMS intraperitonal olarak verilmiştir. EMS'nin kimyasal özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Kapalı formülü : $C_3H_8O_3S$
Molekül Formülü : $CH_3SO_3C_2H_5$
Diğer Adları : Ethyl mesylate, Ethyl methanesulphonate, Methanesulfonic acid ethyl ester, half-myleran, MSC 26805, ENT 26396.
CAS No : 62-50-0
Sigma No : M-0880
Saflık düzeyi : ≥%99.9
Molekül Ağırlığı : 124.16 g/mol
Yoğunluğu : 1.15 g/cm3 (22 °C)
Erime Noktası : < 25 °C
Kaynama Noktası : 213–213.5 °C
Açık Formülü :

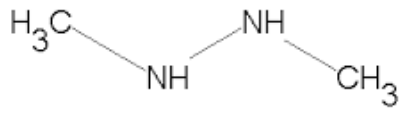


3.1.1.4. 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)

Dimethylhydrazine sıçanların kalın barsağında (kolonda) aberrant crypt foci oluşturması ile kanserin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Park ve ark., 1997).

İlacın ticari adı **:** Dimethylhydrazine
Sistematik adı **:** 1,2-Dimethylhydrazine
Kapalı Formülü **:** $C_2H_8N_2$
Molekül ağırlığı **:** 60.10 $g \cdot mol^{-1}$
Yoğunluğu **:** 827.4 kg m^{-3} (at 20 °C)
Erime Sıcaklığı **:** −9 °C (16 °F; 264 K)
Kaynama Sıcaklığı: 87 °C; 188 °F; 360 K
Cas No **:** 540-73-8
Üreten firma **:** Sigma

Açık formül:



3.1.1.5. Fizyolojik Çözelti

Bu çalışmanın *in vivo* genotoksisite ve antigenotoksisite çalışması bölümünde kemik iliğinin enjektör içerisine çekilmesinde (aspire edilmesinde) destile su içinde hazırlanmış NaCI eriyiği (% 0,9) (stok fizyolojik sıvı buzdolabında +4ºC'de saklanmış kemik iliği alınacağı zaman sıcaklığı 37°C'ye yükseltilerek kullanılmıştır) kullanılmıştır. Bu izotonik sıvı içine alınan kemik iliği hücrelerinden kromozom incelemeleri için preparatlar hazırlanmıştır.

3.1.1.6. Hipotonik Eriyik

Kromozom incelemeleri için preparat yapma aşamasında kemik iliği hücrelerinin şişirilmesi için hipotonik eriyik olarak % 0.4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidestile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam

kapta buzdolabında (+4 ºC) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37ºC'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

Kromozom incelemeleri için kemik iliği hücrelerinden preparat hazırlama aşamasında hücrelerin hızlı bir şekilde öldürülmesi için kullanılan fiksatif olarak 1 hacim glasial asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmış eriyik kullanılmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.8. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiği preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.9. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

3.1.1.10. Nitrik Asit (HNO_3)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.1.11. Agaroz (Sigma, A9539)

Agaroz, moleküler biyolojide özellikle DNA ve RNA moleküllerin elektroforezle ayrıştırılması için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada DNA ve RNA elektroforez işleminde % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır.

3.1.1.12. 10X TBE (Tris Borik Asit EDTA) Elektroforez Tampon Çözeltisi (Fermentas, B52)

Agaroz jeli hazırlamak ve örnekleri jelde yürütmek amacıyla eriyik 20 kat sulandırılarak 0.5 X TBE tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

3.1.1.13. 6X Loading Dye Solution (Fermentas, #R0611)

Jelde yürütülen DNA'nın nereye kadar yürütüldüğünü belirlemek amacıyla 6 (DNA)/ 1 (yükleme solüsyonu) oranında yükleme solüsyonu olarak kullanılmıştır.

3.1.1.14. Primerler (Promega)

4-MEI'nın kanserojenite ve antikanserojenite etkisinin belirlenmesi için β-catenin ve K-ras genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu araştırmada β-aktin geni kontrol gen olarak kullanılmıştır. Söz konusu genlerin dizileri çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Real Time PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri.

Primer	**Primer sekansı (5'→3')**
β-aktin	F: CATGTGCAAGGCCGGCTTCG R: GTAGCAGGAGAAGTTGTTGG
β-catenin	F: CTGCAGGGGTCCTCTGTG R: TGCATATGTCGCCACACC
K-ras	F: AAGTACTTGATAATCTTGTGTGGAACA R: AGGATGACTGCCACCCTTTA-

3.1.1.15. Etidyum Bromür (Sigma, E7637)

Etidyum Bromür 5 µg/mL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Elektroforez sonrası RNA ve DNA'nın UV ışığı altında görünür hale getirilmesi için kullanılmıştır.

3.1.1.16. Kullanılan Mikroorganizmalar

Araştırmada bakteri kültürleri olarak Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bakteriyoloji laboratuvarına ait mikroorganizma koleksiyonunda bulunan *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanılmıştır.

3.1.1.17. Besiyerleri

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için uygulanan disk difüzyon yönteminde mueller hinton Agar (Merck) ve MİK değerinin belirlenmesi için ise LB (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.1.18. SDS-PAGE İçin Eriyik A (akrilamid/bis) Çözeltisinin Hazırlanması

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid bir miktar distile suda çözündükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu eriyik proteinin SDS-PAGE ile yürütülmesinde kullanılmıştır.

3.1.1.19. SDS-PAGE İçin Eriyik B Çözeltisinin Hazırlanması

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşur. Bu eriyik proteinin SDS-PAGE ile yürütülmesinde kullanılmıştır.

3.1.1.20. SDS-PAGE İçin Eriyik C Çözeltisinin Hazırlanması

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su karışımı ile hazırlanmıştır. Bu eriyik proteinin SDS-PAGE ile yürütülmesinde kullanılmıştır.

3.1.1.21. %10 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

10 g SDS distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. hazırlanan çözelti protein elektroforezinde kullanılacaktır.

3.1.1.22. %10 Amonyum Persülfat (AMPS)

0,5 g Amonyum Persülfat distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.1.23. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.1.24. SDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu

0,075 g Tris 5 mL distile suda çözündükten sonra HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış ve 0,2 g SDS, 1 mL gliserol, 0,0855 mL 2-β-merkaptoetanol, 0,005 g bromfenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.1.25. SDS-PAGE Yürütme Tamponu

3 g Tris, 14,4 g glisin, 1 g SDS tartıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Masa Üstü Santrifüj

Masa santrifüjü, kemik iliği hücrelerinden kromozom incelemeleri için preparat yapılması aşamasında hücreleri dibe çöktürmek amacıyla maksimum hızı 4000 devir/dk olan HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.3. Soğutmalı Santrifüj

RNA izolasyonunda eppendorf tüplerindeki örneklerin santrifüj edilmesi amacıyla Thermo marka soğutmalı santrifüj cihazı (24 x 2,2 - 1,5 ml rotor için maksimum 15.300 rpm/dk hızına erişebilen) kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücreleri 37 ºC' de inkübe etmek amacıyla Incucell marka inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.5. Otoklav

Deney esnasında kullanılacak olan malzemelerin sterilizasyonu amacıyla Hirayama marka Hiclave HV-25 L otoklav cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.6. Benmari (Su Banyosu)

RNA izolasyonu aşamasında örneklerin gerekli sıcaklıkta inkübasyonu için Nüve BM 302 marka su banyosu kullanılmıştır.

3.1.2.7. Isıtıcı

Agaroz jel hazırlamada Chiltern Scientific marka manyetik karıştırıcılı ısıtıcı tabla kullanılmıştır.

3.1.2.8. Vorteks

Örneklerin karıştırılması için Velp. Scientifica marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.1.2.9. Elektroforez Sistemi

Atto marka elektroforez sistemi RNA örneklerini jelde yürütmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.10. Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Imaging Systems)

Jeldeki ürünlerinin görüntülenmesi için kullanılmıştır.

3.1.2.11. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu kemik iliğinden yapılmış preparatlarda kromozom incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital olarak fotoğraf makinesiyle çekilmiştir.

3.1.2.12. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için WTW 315i (Germany) marka pH metre kullanılmıştır.

3.1.2.13. Applied Biyosystem 7500

K-ras β-catenin genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi Real Time-PCR Applied Biyosystem 7500 cihazı kullanarak araştırılmıştır. Bu cihaza ait görüntü şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Real Time PCR Applied Biyosystem 7500 cihazı.

3.1.2.14. Thermal Cycler (Techne)

Bu cihazdan faydalanark RNA'dan c-DNA'lar sentezlenmiştir.

3.1.2.15. Nanodrop ND-1000

c-DNA sentezinden sonra c-DNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi Nanodrop ND-1000 cihazında yapılmıştır.

3.1.2.16. Steril Kabin

RNA izolasyonu steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m^3/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampulü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. 4-MEI'nın Genotoksisite ve Antigenotoksik Etkisinin Belirlenmesi

3.2.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik etkisinin belirlenmesi

3.2.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu araştırmada 4-MEI farelere (erişkin Wistar albino) intraperitonal (i.p.) olarak verilmiştir. Deney hayvanı olarak 30-35 gram ağırlığında genç erişkin (12-16 haftalık) albino fareler kullanılmıştır. Nishie ve ark. (1969) 4-MEI için sıçanlarda letal doz 50 (LD50) olarak 165 mg/kg v.a. konsantrasyonunu saptamışlardır. Bu konsantrasyon göz önüne alınarak 4-MEI'nın LD50 konsantrasyonu saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın farelerdeki LD50 değerinin 160 mg/kg v.a. olduğunu ortaya konmuştur. Genotoksisite çalışmalarında her grup için 3 dişi ve 3 erkek fare kullanılmıştır. Bu araştırmada 4-MEI suda çözülmüştür ve farelere intraperitonal yolla verilmiştir. Her gruptaki muamelenin başlanmasından 12 ve 24 saat sonra preparat yapma işlemi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullandığımız etil

metan sulfonat (EMS) 240 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde tek doz olarak 2 ayrı muamele süresinde (12 ve 24 saat) intraperitonal yolla deney hayvanlarına verilmiştir. Ayrıca bu araştırmada muamelesiz kontrol grubu da kullanılmıştır.

3.2.1.1.1.1. Kromozom İncelemeleri İçin Preparatların Hazırlanması

4-MEI enjeksiyonundan 12 ve 24 saat sonra farelerin kemik iliğinden preparatlar hazırlanmıştır. Bu preparasyon işleminden 2 saat önce ise mitoz bölünmeyi metafaz safhasında durdurmak için stok kolşisin çözeltisi 3 mg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonda olacak şekilde farelere intraperitonal yolla enjekte edilmiştir. Süre sonunda hayvanlar boynu kırılmak suretiyle öldürülmüş ve sonra hayvanların arka bacakları alınmış, bacaktaki kaslar kemikten bisturiyle kazınarak alınıp ve daha sonra kemiğin proksimal ucu (vücuda yakın olan kısmı) ilik kanalı açıklığına kadar makasla kesilmiştir ve 2 ml 37ºC'de serum fizyolojik eriyiği (% 0.9 NaCl) enjektörün içine çekilmiştir. daha sonra bu enjektörün içine kemik iliği hücreleri aspire edilerek alınmıştır. Eğer enjektör içine çekilen ilik büyük partiküllü bir halde olursa enjektör çalkalanarak partiküllerin dağılması sağlanmıştır ve böylece homojen dağılmış hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılmış ve sonra 2000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süre bitiminden sonra üst sıvı pastör pipeti ile alınmıştır ve tüpün dibinde yaklaşık 1 ml kadar hücre süspansiyonu bırakılmıştır. Sonra dipteki hücreler tekrar homojenize edilip ve daha önce inkübatörde 37ºC'de ısıtılmış hipotonik eriği (% 0.4 KCl) damla damla tüplere ilave edilmiştir, hücreler her hipotonik eriyik ilavesinde resüspanse edilmiştir. Daha sonra her tüpe yaklaşık 5 ml hipotonik eriyik ilave edilmiş ve hücreler 37ºC'de 23 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler 1200 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipteki sıvı içerisindeki hücreler tekrar homojenize edilmiş ve daha sonra taze hazırlanmış soğuk fiksatiften (1 asetik asit: 3 metanol) tüplere damla damla ilave edilmiştir. Tüm tüplerde fiksatif miktarı 5 ml'ye tamamlanmıştır ve hücreler oda sıcaklığında 20 dakika fikse edilmiştir. Fiksatif muamelesi üç kere tekrarlanmıştır. Son fiksatif muamelesinin bitiminde hücre süspansiyonu 1200 devir/dak.'da 10 dakika santrifüj

edilmiştir. Santrifüj işleminin sonunda tüpün dibine çökmüş hücrelerin üzerindeki sıvı tüpte 1 ml kalıncaya kadar alınıp atılmıştır. Hücreler tekrar resüspanse edilmiştir ve bu hücre süspansiyonundan az miktarda Pastör pipetine çekilerek yaklaşık 50 cm yükseklikten daha önce temizlenmiş ve distile su içerisinde 4 ºC'de bekletilen lamlar üzerine 3 damla damlatılmıştır ve hazırlanmış preparatlar kurumak için oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

3.2.1.1.1.2. Preparatların Boyanması

Oda sıcaklığında kurumuş bir günlük preparatlar sorensen tamponu içerisinde hazırlanmış % 5'lik Giemsa boyası ile 8 dakika boyanmıştır.

Boyadan çıkarılan preparatlar 3 ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmıştır ve preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

%5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5ml Giemsa karıştırılarak üzerine 85 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kağıdı ile süzülmüştür.

3.2.1.1.1.3. Mikroskobik İncelemeler

Hazırlanan preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (1000x büyütmede).

3.2.1.1.1.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). İnceleme sırasında saptanan bazı KA'ların fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.1.1.1.5. Kromozom Anormalliklerinin Saptanması

Her bir hayvandan (erişkin fare) hazırlanan preparatlarda kromozomları iyi dağılmış 100 ve her gruptan (her konsantrasyon için 6 hayvan) toplam 600 metafaz plağı incelenerek kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. Her hayvan için kromozom aberasyonlu hücre yüzdesi (KA'lı hücre %'si) ve hücre başına düşen KA sayısı (KA/hücre) saptanmıştır.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark. 1978). Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar (Kauderer ve ark. 1991)tarafından açıklanan yöntemle belirlenmiştir. Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki veya her iki kromatiddeki boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından fazladır. Bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, halka kromozom, fragment ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi ile Belirlenmesi

Yapılmış olan bu çalışmada 4-MEI'nın EMS'nin etkisine karşı antigenotoksik etkisi 12 ve 24 saatlik muamele süresince KA testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada genotoksik etkiye sahip olduğu bilinen 240 mg/kg v.a. konsantrasyonunda EMS üç farklı konsantrasyonda (100, 130, 160 mg/kg) 4-MEI ile karıştırılıp ve intraperitonal yolla farelere enjekte edilmiştir. 4-MEI'nın antigenotoksik etkisini incelemek için

yukarıdaki belirlediğimiz metot ile elde edilen kemik iliği hücrelerinde KA ve MI incelemeleri yapılmıştır.

3.2.2. 4-MEI'nın Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

3.2.2.1. 4-MEI'nın Mitotik İndeksin (MI) Saptanması ile Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Test maddelerinin mitoz bölünme üzerindeki etkileri MI'nin belirlenmesi ile saptanmıştır. Bunun için her hayvandan 3000 ve her gruptan toplam 18000 hücre incelenmiş ve bunlardan metafaz devresindeki hücrelerin sayıları belirlenmiştir. Her bir hayvanın incelenen 3000 hücresi içinde metafaz devresindeki hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak her bir hayvan için MI saptanmıştır.

3.2.3. 4-MEI Ve DMH'nin Kanser Oluşumu ile İlişkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada bir kanserojen olan 1,2 dimetilhidrazin (DMH)'nin kanser oluşturma etkisine karşı 4-MEI'nin antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca 4-Metilimidazol (4-MEI) ve 1,2 dimetilhidrazin (DMH)'in K-ras ve β-catenin onkogenlerin ekspresyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bunların yanı sıra DMH'in belirtilen onkogenlerin ekspresyonu üzerindeki etkisine karşı 4-MEI'nin etkisi belirlenmiştir. Çalışmada, hayvan modeli olarak Sprague-Dawley erişkin sıçanlar (4-6 haftalık) kullanılmıştır. Çalışma öncesinde Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu`ndan onay alınmıştır. Yapılacak olan araştırmada sıçanlar 6 gruba ayırılmışlar ve her grup için 8 sıçan (4 ♂ ve 4♀) kullanılmıştır ve guruplar şu şekilde oluşturulmuştur:

1- Kontrol grubu: Bu guruptaki sıçanlara deney süresi boyunca (10 hafta) sadece yem ve su verilmiştir.

2- DMH grubu: Bu gruptaki sıçanlarda kolorektal kanseri oluşturmak için iki hafta boyunca haftada iki defa 40 mg/kg vücut ağırlığı (v.a) olacak şekilde 1,2 dimethylhidrazin (Matrix scientific) 1 mM suda çözerek karın zarı içerisine

(intraperitonal) verilmiştir ve bu muamelelerden sonra deney süresinin sonuna kadar (10 hafta) normal yem ve su verilmiştir (Mohania ve ark. 2013).

3- Bu gruplardaki sıçanlara 10 hafta boyunca haftada 5 gün intraperitonal yolla 25 mg/kg 4-MEI intraperitonal yolla verilmiştir.

4- Bu gruplardaki sıçanlara 10 hafta boyunca haftada 5 gün 50 mg/kg intraperitonal yolla 4-MEI verilmiştir.

5- Bu gruplardaki sıçanlara iki hafta boyunca 40mg/kg vücut ağırlığı (v.a) konsantrasyonunda DMH haftada iki defa intraperitonal yolu ile verilmiştir ve DMH muamelesinin 1 hafta öncesinden itibaren 10 hafta boyunca haftada 5 gün 25 mg/kg 4-MEI verilmiştir.

6- Bu gruplardaki sıçanlara iki hafta haftada iki defa DMH intraperitonal yolu ile 40mg/kg vücut ağırlığı (v.a) konsantrasyonunda verilmiştir ve DMH muamelesinden 1 hafta sonra başlamak üzere 10 hafta boyunca haftada 5 gün 25 mg/kg 4-MEI verilmiştir.

Yukarıda belirtilen yöntemle 4-MEI ve DMH verilen hayvanların deney süresi sonunda ağırlıklıları tartılmıştır ve daha sonra boynu kırarak öldürülmüş hayvanların kalın bağırsakları soğuk 0,9%'luk NaCl ile temizlenip ve daha sonraki araştırmaların yapılıncaya kadar -80 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.3.1. K-ras ve β-Catenin Geninin Real Time PCR ile Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

3.2.3.1.1. RNA İzolasyonu

Bu araştırmanın test maddesinin kanser ile ilişkilerini incelemek için kullanılan deney hayvanlarının kalın bağırsağından alınan doku parçaları kullanılmıştır. Bunun için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır;

Kolon dokusundan RNA izolasyonu için TRIzol (Invitrogen) protokolü uygulanmıştır (Cheng ve ark., 2014). Öncelikle kolon dokuları 80°C'den alınıp dokular bistüri ile küçük parçalara bölünmüştür. Daha donra parçalanmış dokular

steril tüplere konulmuştur ve üzerine 1000 µl TRIzol eklenip 1 dakika vorteksleyerek karıştırılmıştır. Sonraki aşamada tüpün içine 200 µl kloroform eklenip iyice çalkalandıktan sonra vorteksle karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra 25 dakika, 13000 devir/dak (rpm), 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pipetle üsteki tabaka (RNA tabakası) alınıp başka tüpe aktarılmıştır ve üzerine 500 µl izopropanol konulup vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 dakika, 13000 devir/dak, 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde pellet oluşumu görülmüştür ve izopropanol dökülüp yerine 1000 µl % 70 etanol koyulup 5 dakika, 1000 devir/dak 4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama iki kere tekrar edilmiştir. Sonraki aşamada etanol atılmıştır ve RNA peletinin çözülmesi için 40 µl RNase Free su koyulup pipetaj edilmiştir.

3.2.3.1.2. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi

Elde edilen RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi için Invitrogen firmasına ait cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bunun için 10 µg RNA, 2 µl 10X RT Buffer, 0.8 µl dNTP, 2µl 10X RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ ters transkriptaz (reverse transcriptase) ve 3.2 µl dH_2O (distile su) toplam hacim 20 µl olacak şekilde bir PCR tüpüne konulmuştur. Sonra 30 saniye 1000 devir/dak santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüpler thermal cycler (Techne) cihazına konulmuş, 25 ^{o}C'de 10 dakika, sonra 37 ^{o}C'de 120 dakika ve en son 85 ^{o}C'de 5 dakika boyunca inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanılmıştır. cDNA'ların Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı ile kantitatif olarak ölçümü yapılmıştır.

3.2.3.1.3. Real-Time PCR Analizi

Kantitatif Real-Time PCR (gerçek zamanlı) teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan ve hassasiyeti yüksek olan bir uygulamadır. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilgi miktarını üst düzeye

çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Temel olarak amplifikasyon ürünlerini aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyonun gidişini ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, floresans boya veya problar ile oluşan floresansı saptayabilen ısıdöngü aygıtları (thermal cycler) kullanılır. Floresans boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green'dir. Reaksiyon sırasında hedef nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green I molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur (Turhan, 2008; Uzun, 2008).

Real-Time PCR ile tek nükleotid polimorfizminin saptanması, gen ekspresyonunun miktarını belirleme, DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi), anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı, hemoglobinopatilerin prenatal tanısında, farmakogenetikte, klinik mikrobiyolojide ve ilaç geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Uzun, 2008).

Real-Time PCR analizi için sentezlenen cDNA'ların, K-ras ve β-catenin genlerinin amplifikasyonları öncesinde kontrolü, iyi korunmuş gen olarak tanınan β-aktin geni kullanılmıştır ve primerlerin dizisi şu şekilde olacaktır:

K-ras (forward): 5′- AAGTACTTGATAATCTTGTGTGGAACA-3′

K-ras (reverse): 5′- AGGATGACTGCCACCCTTTA-3′

β-catenin (forward): 5′- CTGCAGGGGTCCTCTGTG -3′

β-catenin (reverse): 5′ TGCATATGTCGCCACACC -3′

β-aktin (forward):5'- CATGTGCAAGGCCGGCTTCG -3′

β-aktin (reverse): 5'- GTAGCAGGAGAAGTTGTTGG -3′

Aşağıdaki protokol uygulanarak PCR yapılmıştır ve veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre analiz edilmiştir:

- *Power* SYBR Green PCR Master Mix: 10 µl
- Forward Primer (10pmol/ µl): 1,5 µl
- Reverse Primer (10pmol/ µl): 1,5 µl
- cDNA: 1 µl (100 ng)
- Distile Su: 6 µl

Toplam Hacim: 20 µl

Real Time PCR aşağıdaki koşullarda ve 40 döngüde yapılmıştır (Applied Biosystem 7500):

95°C'de 10 dakika: Başlangıç denatürasyonu takiben	Bir döngü
95°C'de 15 saniye: Denatürasyon	40 döngü
60°C'de 60 saniye. Primer bağlanması ve uzatma	

Real Time PCR deneylerinde her grup için 8 sıçan kullanılmış (toplam 48 sıçan) ve her bir sıçandan ise 3 tekrar yapılmıştır. K-ras ve β-aktin genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlemesini sağlayan Real Time PCR analizinden elde edilen Ct (Treshould Cycle) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct$ Hedef (kontrol-örnek) - ΔCt Referans (kontrol-örnek)]

$E= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Ct: eşik döngüsü

E: Ekspresyon kat değeri

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) eş zamanlı PCR yönteminde önemli bir değişkendir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir deyişle üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı gösterir. Bu değerlendirmeden elde edilen sonuç hedef genin kontrole göre kaç kat eksprese olduğunu göstermektedir (Wong ve Medrano, 2005).

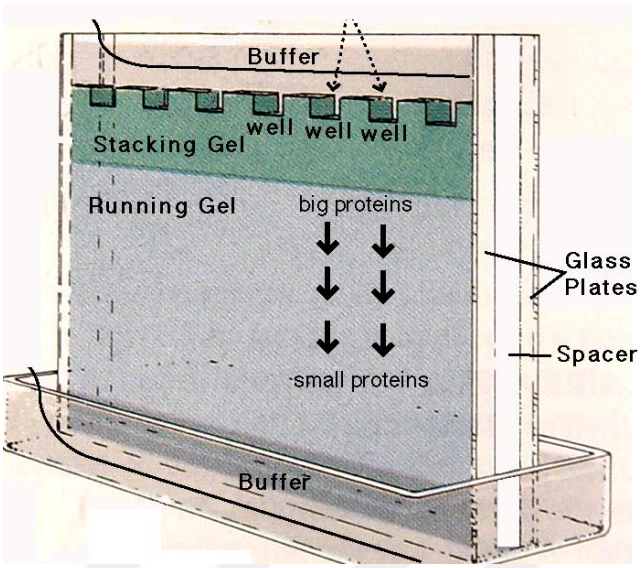
3.2.4. 4-MEI'nın Kanserojenik ve Anti Kanserojenik Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması

Bu çalışmanın test maddelerinin kanser oluşumu ile ilişkileri kısmında kullanılan deney hayvanlarının kalın bağırsak dokularında β-catenin ve K-ras proteinlerin ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. Bunun için aşağıdaki yöntem kullanılmıştır. Kolon dokusundan protein izolasyonu Thermo firmasına ait T-PER kit ile aşağıdaki protokole göre yapılmıştır;

Kolon dokuları -80 ^{o}C'den alınmıştır. 50 mg olacak şekilde steril ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 1 mL T-PER'den eklenmiştir. T-PER'in ilavesinden sonra dokular homojenizatör cihazı ile 30 saniye homojenize edilmiştir. Daha sonra tüpler 13000 devir/dak santrifüj edilmiştir ve süpernatant protein kaynağı olarak -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.4.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Kolonun protein örneklerinde K-ras ve β-catenin genlerinin proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile analizleri için Laemmli (1970) tarafından belirlenen yöntem kullanılmıştır. SDS-PAGE için alt jel bileşimi ve üst jel bileşimi şu şekilde olmuştur: Alt Jel; (% 15), Bis-akrilamid çözeltisi (% 30), Jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), Saf su, SDS (% 10), Amonyum persülfat (% 10), TEMED. Üst jel; Bis-akrilamid çözeltisi (%10), Jel tamponu (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), Saf su, SDS (% 4), Amonyum persülfat (% 10),TEMED. Jel katılaştıktan sonra yürütücü tampon olarak 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glisin, % 0,4 SDS'den oluşan çözelti kullanılmıştır. Elde edilen protein örneklerine 200 mM TrisCl pH 6,8, 400 mM DTT, % 8 SDS, % 0,4 bromfenol mavisi, % 35 gliserol'den oluşan çözelti 6:1 oranında eklenmiştir. Hazırlanan örnekler kuyucuklara konulmuştur (Şekil 3.2). Elektroforez 25 mA'de 1 saat boyunca yapılmış ve proteinler jelde yürütülmüştür. Elektroforez işleminden sonra jeller Western Blot analizinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. SDS-PAGE Jeline ait görüntü.

Western-Blot analizi Naureckiene ve ark. (2000)'nın kullanıldıkları metoda göre yapılmıştır. İlk aşamada jel ve filtre kağıtları 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glisin, % 0,04 SDS, % 20 Metanol içeren transfer tamponu ile 15 dakika nemlendirilmiştir. PVDF membran önce metanol içerisinde (15 saniye) daha sonra transfer tamponu içerisinde (15 dakika) ıslatılmıştır.

Elektro emdirim yarı kuru (Thermo semi-dry blotting) cihazıyla yapılmıştır. Elektrotransfer cihazının anot kısmından başlamak koşuluyla sırasıyla; iki filtre kağıdı, membran, jel ve iki filtre kağıdı konularak 25 voltta 15 dakika akım uygulanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Thermo semi-dry blotting cihazına ait görüntü.

Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran 30 dakika bloklama çözeltisi (Thermo) içerisinde bekletilmiştir. Süre bitiminden sonra çözelti ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra birinci antibody (antikor) 1/1000 oranında antibody diluent solution (antikor sulandırma eriyiği) (Thermo) ile seyretilip ve membran 1 saat boyunca hazırlanan çözeltide bekletilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat süren inkübasyon işleminden sonra membran 5 dakika yıkama solusyonuna (Thermo) konulmuştur. Daha sonra membran 10 dakika oda sıcaklığında Optimized HRP Reagent Working Dilution (Thermo) çözeltisinde bekletilmiştir. Süre bitiminde membran tekrar yıkama solusyonu ile yıkanmıştır ve 5 dakika SuperSignal West Femto Working Solution (Thermo) içerisine konulmuş ve tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra membran üzerine karanlık odada fotoğraf filmi konulmuş 5 dakika bekletilelerek β-aktin, K-ras ve β-catenin'e ait protein bandı belirlenmiştir. K-ras ve β-catenin proteinlerinin film üzerinde ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için Vilber Lormat cihazını kullanarak filmlerden fotoğraf çekilmiş ve elde edilen görüntüler Quantity One programı ile değerlendirilmiştir.

3.2.5. 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

4-MEI'nın antimikrobiyal etkisinin belirlenmesinde özellikle insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara sebep olan bakteri türleri seçilmiştir. Yapılan bu araştırmada bakteri suşları olarak Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı'na ait mikroorganizma koleksiyonunda bulunan, *Bacillus subtilis, Escherichia coli, pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* suşları kullanılmıştır.

3.2.5.1. Kullanılan Suşların Genel Özellikleri

3.2.5.1.1. *Bacillus subtilis'*in Genel Özellikleri

*Bacillus subtilis***,** gram (+) olup 1872 yılında Ferdinand Cohn ve öğrencisi Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Hareketli, sporları oval ve subterminal olup, kapsülsüzdür ve ön zenginleştirme yapılmayan besiyerinde rahatlıkla üreyebilen bakteri suşudur. *Bacillus subtilis* toprak kökenli bakteri olup, mezofiliktir ve optimum gelişme sıcaklığı 25-35^{o}C'dır. *Bacillus subtilis,* insanlarda düşük derecede patojeniteye sahip olup, "subtilisin" adı verilen proteolitik enzim üretmektedir. Subtilisin, düşük toksijenik özelliğe sahip olmakla beraber sürekli maruz kalındığında, alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (Fritze ve Pukall., 2001).

3.2.5. 1. 2. *Escherichia coli'n*in Genel Özellikleri

Gram negatif (-), az hareketli bakteri suşudur. *E.coli*'ler sporsuzdurlar. Genel kullanım besiyerinde üreyebilirler. McConkey agarda pembe-kırmızı koloniler oluştururlar. *E.coli,* normal barsak florası üyelerinden olup bağırsaklarda enterit, enterokolit gibi enfeksiyonlara neden olabilirler. Bağırsak lümeni dışında piyelit, piyelonefrit ve özellikle sistit gibi idrar yolu enfeksiyonları da oluşturabilirler (Bilgehan, 1992).

3.2.5. 1.3. *Pseudomonas aeruginosa'nın* Genel Özellikleri

Küçük, bazen ikişerli, bazen zincir oluşturacak gibi fakat çoğu kez tek tek görülen, sporsuz, uçlarındaki tek, çok hareketli, gram negatif (-) bakteri suşudur. Her hangi bir besiyerinde üreyebilirler. İnsanlarda ve özellikle savunma mekanizmaları

zayıf olan kişilerde önemli hastalıklar oluşturabilirler. Antibiyotiklere dirençli olduğundan hastane ortamında kolayca yuvalanır ve yanık yarası enfeksiyonlar, kronikleşmeye eğilimli idrar yolları enfeksiyonlar, menenjitler, kornea ülseri, panoftalmi, bronşit, bronkopnömoni, septisemi ve orta kulak enfeksiyonlar gibi hastalıklara neden olabilirler (Bilgehan, 1992).

3.2.5. 1.4. *Staphylococcus aureus'*un Genel Özellikleri

Gram pozitif (+) olup tek tek, çiftler veya düzensiz kümeler tarzında görülürler. hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob bakteri suşudur. Stafilokok türleri, insan ve hayvanların derisinde, üst solunum yolu, alt sindirim, ürogenital sistem mukoza membranları ile ilişkili mikroorganizmalardır. İnsan ve hayvanlarda fırsatçı patojen olarak tanımlanırlar. Bunların yanı sıra hayvanlarda mastitis, kuzu piyemisi, atlarda botriyomikozis olmak üzere lokal ve genel irinli enfeksiyonlara yol açarlar. İnsanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonlara yol açtıkları için halk sağlığı açısından çok önemlidirler (Akan, 2006).

3.2.5. 2. 0.5 Mcfarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması

0.048 mol/L $BaCl_2$ (%1.175 w/v BaCl2·2H20)'den 0.5 mL'yi, 0.18 mol/L (0.36 N) H_2S0_4 (%1 v/v)'den 99.5 mL'ye eklenip karıştırılmıştır. Süspansiyonun yoğunluğu spektrofotometrede kontrol edilmiştir (Absorbans, 625 nm'de 0.08-0.13 arasında olmalıdır) (Chapin ve Lauderdale, 2007).

3.2.5. 3. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MIC) Saptanması

MIC değerleri, seri seyreltme yöntemine göre 7.6 -250000 µg/mL 4-MEI aralığındaki konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Bu amaçla, 4-MEI saf suda eritildikten sonra farklı konsantrasyonlarda LB besiyerine (toplam hacim 4 mL) ilave

edilmiştir. Bunların yanı sıra 4 farklı mikroorganizma 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlanmışlardır ve hazırlanan bakteri kültüründen 200 µL alıp ve farklı konsantrasyonda hazırlanmış LB besiyerlerine eklenmiştir. Daha sonra tüpler 37°C'de 12 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında üremenin görülmediği konsantrasyon MIC değeri olarak saptanmıştır (Johnston ve ark., 2001; Yu ve ark., 2004). Ayrıca konsantrasyon-etki ilişkisinin olup olmadığını saptamak için süre bitiminde farklı konsantrasyonda kültürü yapılan örneklerin absorbansı 600 nm'de ölçülmüştür.

3.2.5. 4. En Küçük Bakterisidal Konsantrasyonun (MBC) Saptanması

Bir gecelik inkübasyondan sonra canlı bakterilerin sayımı esasına dayanır. MBC değeri başlangıçtaki bakterileri öldüren en düşük antibiyotik yoğunluğudur (Yu ve ark., 2004). MIC değerini saptamak için yapılan bakteri kültürlerinden süre bitiminde 200 µL alıp yayma metodu ile LB agar besiyerine ekilmiştir ve 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde bakteri üremeyen en düşük konsantrasyon MBC değeri olarak saptanmıştır.

3.2.5.5. Disk Difüzyon Yöntemi ile 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

Bu yöntemin esası, etken maddenin bakteri kültüründe bulunduğunda bakterilerin etrafında, inkübasyon sonrasında oluşan zon çapının ölçülmesine dayanmaktadır (Janseen ve ark., 1987). Yapılan bu araştırmada her bir bakteri suşu için 3 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Doz belirlenmesi bakteri suşların MIC değerlerine göre yapılmıştır. Çalışmada yayma ekim yöntemi ve Muller hinton Agar besiyeri kullanılmıştır. Ekilecek mikroorganizmaların ön kültürleri hazırlanmıştır. Mikroorganizma süspansiyonları 37 °C'de 12 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında mikroorganizma süspansiyonları 0.9% NaCl ile 0,5 McFarland olacak şekilde hazırlanmıştır ve bu hücre süspansiyonundan 0.2 mL

alınarak yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra 1 cm çapındaki diskler farklı konsantrasyonda hazırlanmış 4-MEI ile emdirilmişlerdir ve petri kutularına yerleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada her bir petride bir adet muamele edilmemiş disk (negatif kontol olarak) ve bir adet Ampicilin (5mg) disk (pozitif kontrol olarak) ve her bir doz için üç paralelli tekrar yapılmıştır. Daha sonra petriler 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşan zonlar ölçülerek zon çapı cm cinsinden saptanmıştır (Dorantes ve ark., 2000; Novak ve ark., 2001; Yıldırım ve ark., 2003).

3.3 . İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada muameleli grupların ortalamaları ile kontrol grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı Minitab 17 programında *t*-testi ile analiz edilmiştir. Konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

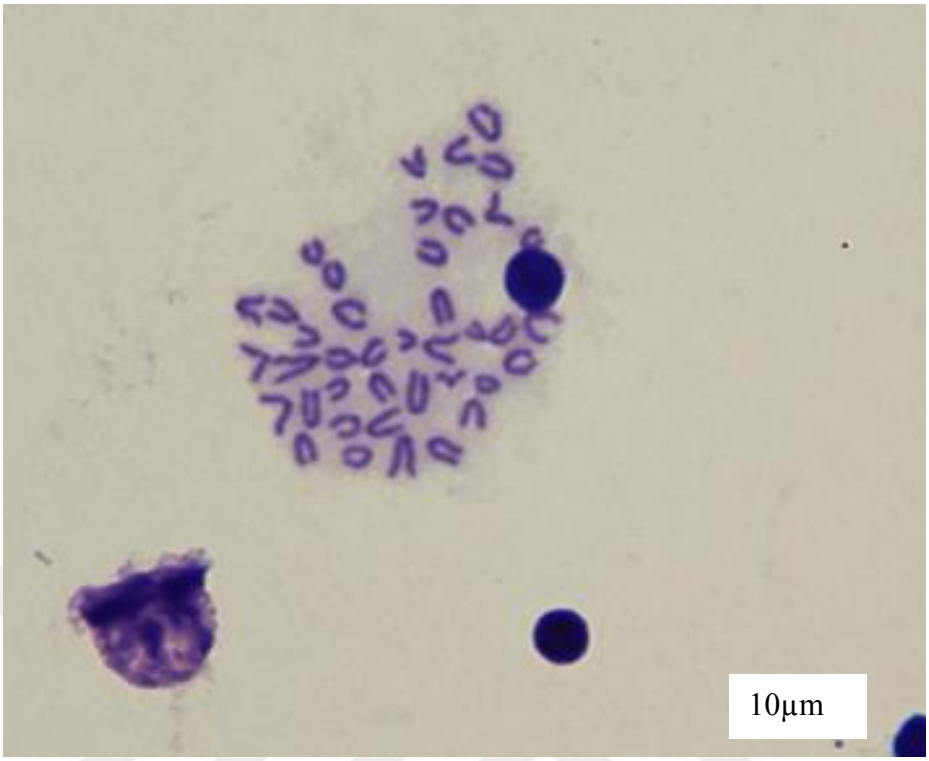
4.1. Bulgular

4.1.1. 4-MEI'nın Genotoksisite ve Antigenotoksik Etkisi

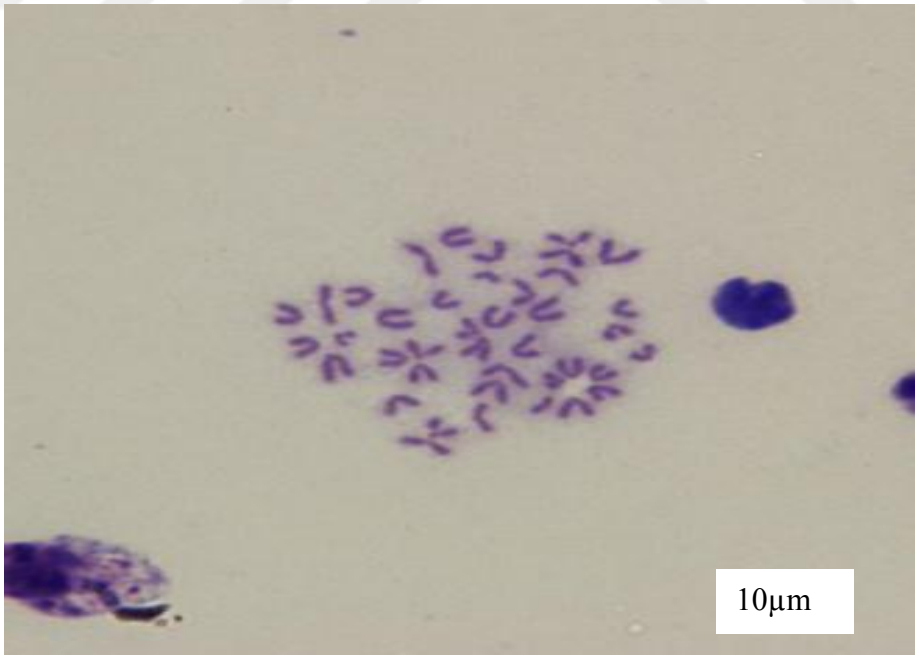
4.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.1.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi ile Belirlenmesi

4-MEI'nın kromozom aberasyonu oluşumu üzerindeki etkisi fare kemik iliği hücrelerinin kromozom aberasyonları incelenerek ortaya konmuştur. Fare genomunda 19 çift avtozom ve bir çift gonozom olmak üzere 2n = 40 kromozom bulunmaktadır. Erkek fertte 19 çift avtozom'da birlikte XY gonozomları, dişisinde ise 19 çift avtozomla birlikte XX gonozomları bulunmaktadır. Erkek ve dişi fare'ye ait metafaz plağındaki kromozomlar şekil 4.1 ve şekil 4.2 'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Erkek fareye ait kromozomların metafaz plağındaki durum (x1000).



Şekil 4.2. Dişi fareye ait kromozomların metafaz plağındaki durum (x1000).

Üç farklı konsantrasyonda (100, 130, 160 mg/kg) 4-MEI ile 12 ve 24 saat muamele edilen fare kemik iliğinde ortaya çıkan kromozom anormallik çeşitleri, kromozom anormalliğine sahip olan anormal hücre yüzdesi (kromozom aberasyonlu hücre %'si) çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

4-MEI, 12 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda 24 saatlik muamelede ise sadece 160 mg/kg konsantrasyonunda kromozom aberasyonunu uyarmış ve bu nedenle muameleli gruplarda anormal hücre yüzdesi kontrole nazaran yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1). Ayrıca pozitif kontrol olarak kullandığımız EMS kromozom aberasyonunu önemli derecede uyarmıştır.

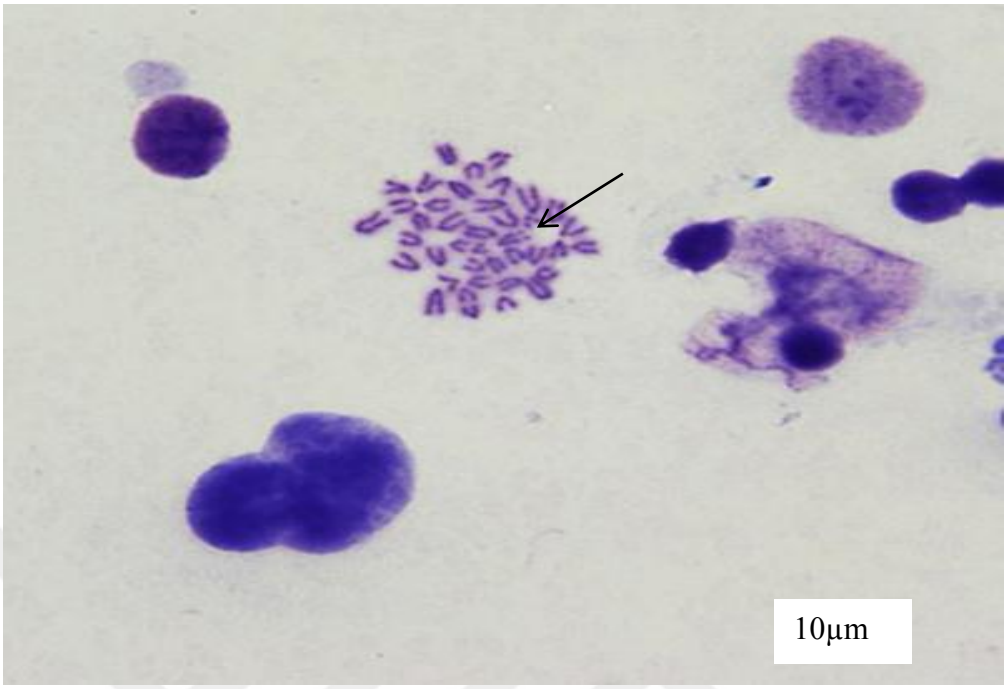
4-MEI ile muamele edilen fare kemik iliğinde değişik tipte yapısal kromozom aberasyonlarına rastlanmıştır (Şekil 4.3- Şekil 4.11) görülen kromozom kırığı (B''), fragment (F), kardeş kromatid birleşmesi (sister union) (KKB) ve kromatid kırığı (B') sık rastlanan anormallikleri oluşturmaktadır.

Tek başına verilen 4-MEI ile karışım halinde verilen EMS+4-MEI grupların karşılaştırdığımızda 12 saatlik muamelede 130 mg/kg ve 24 saatlik muamelede 100 ve 130 mg/kg konsantrasyonların arasında önemli fark bulunmaktadır.

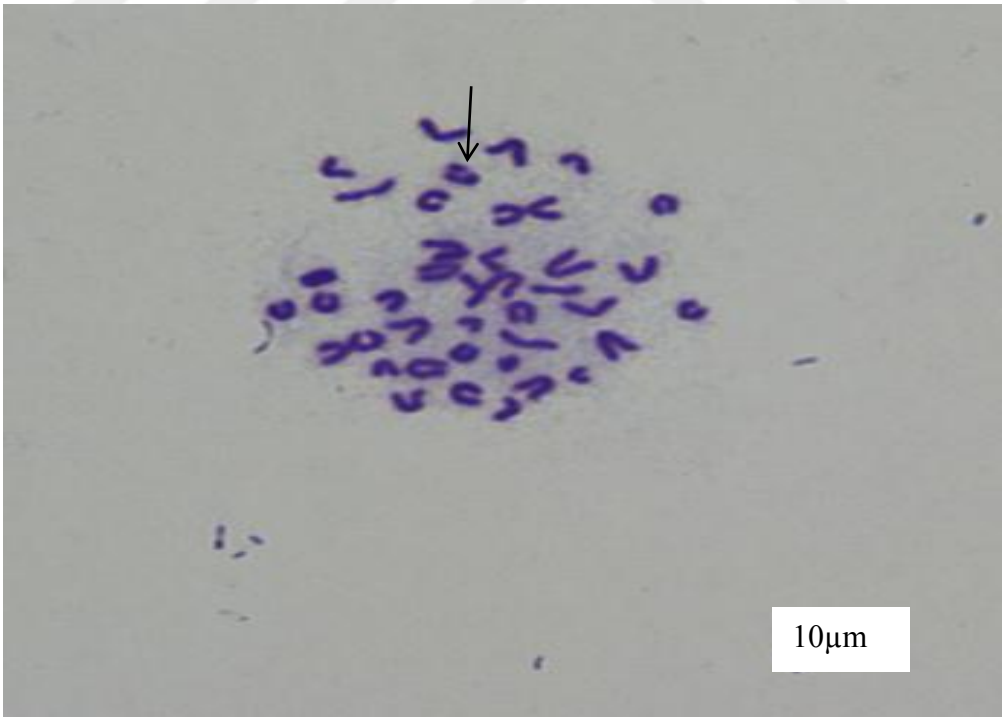
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI ile 12 ve 24 Saat Muamele Edilmiş Olan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri ve Anormal Hücre Yüzdesi

Test Maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri						Anormal Hücre (%)'si ± SH
	Süre (saat)	Kons. (mg/kg)	B"	F"	B'	F'	KKB	KD	
Kontrol	--	--	2	1	0	0	3	0	1.00± 0.258
EMS(PK)	12	240	1	0	12	7	2	1	3.83± 0.401 a_3
4-MEI	12	100	0	1	5	1	6	1	2.33± 0.333 a_1 b_2
		130	1	1	5	1	4	2	2.33± 0.333 a_1 b_2
		160	1	1	8	1	3	1	2.50± 0.500 a_1 b_1
EMS(PK)	24	240	1	0	9	3	1	4	3.00± 0.447 a_2
4-MEI	24	100	1	0	2	1	1	1	1.00± 0.258 b_3
		130	1	0	2	1	4	0	1.33± 0.422 b_1
		160	0	0	4	3	4	3	2.33 ± 0.333 a_1

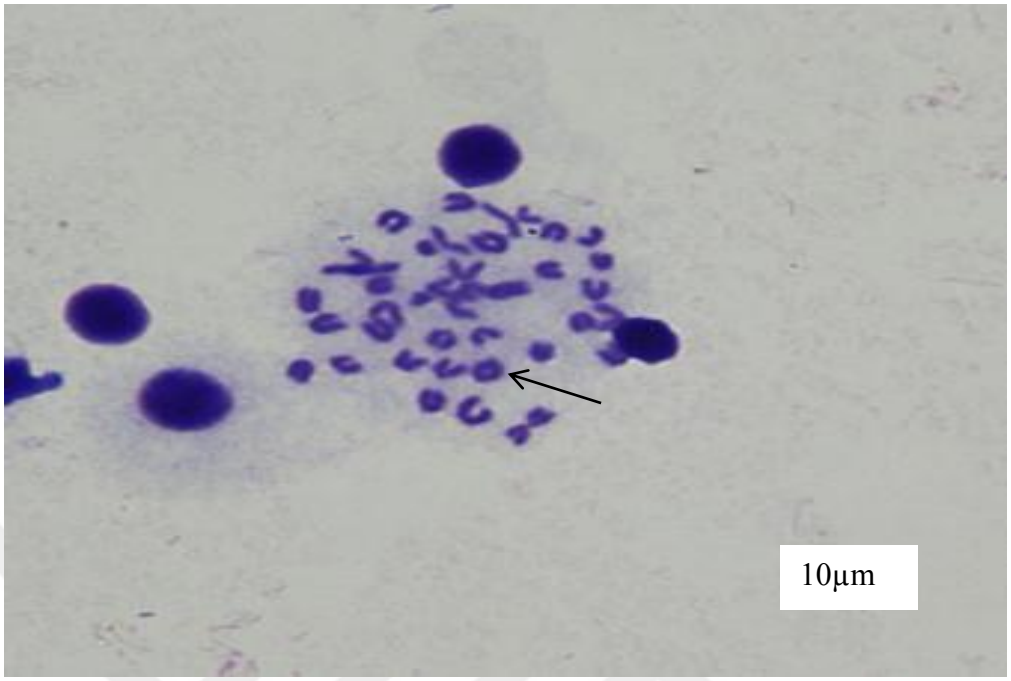
B': Kromatid kırığı, B": Kromozom kırığı,
F": kromozom tipi Fragment, KD: Kromatid değişimi, F': kromatid tipi fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (sister union).
a: Kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. a_1b_1: $P \leq 0.05$ a_2b_2: $P \leq 0.01$ a_3b_3: $P \leq 0.001$



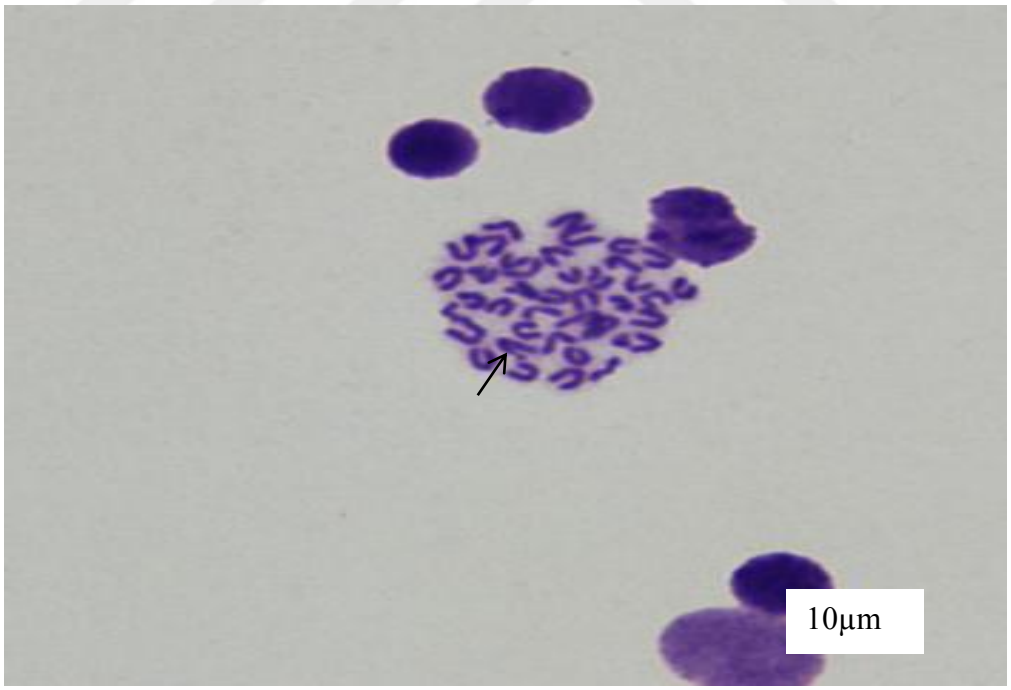
Şekil 4.3. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (130 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♀) (x1000).



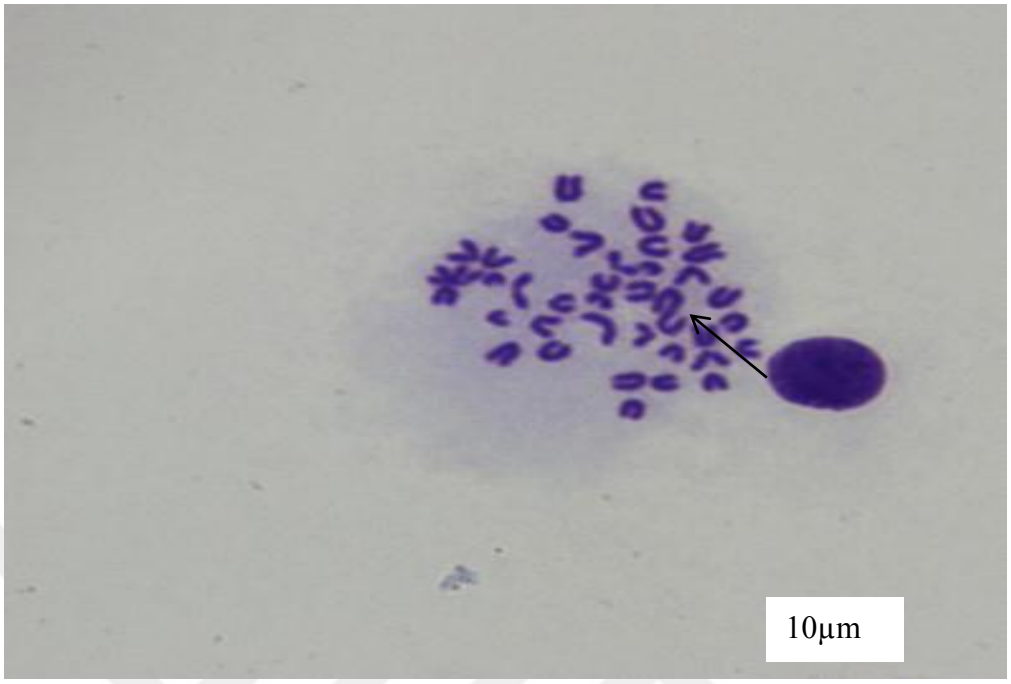
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (130 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♀) (x1000).



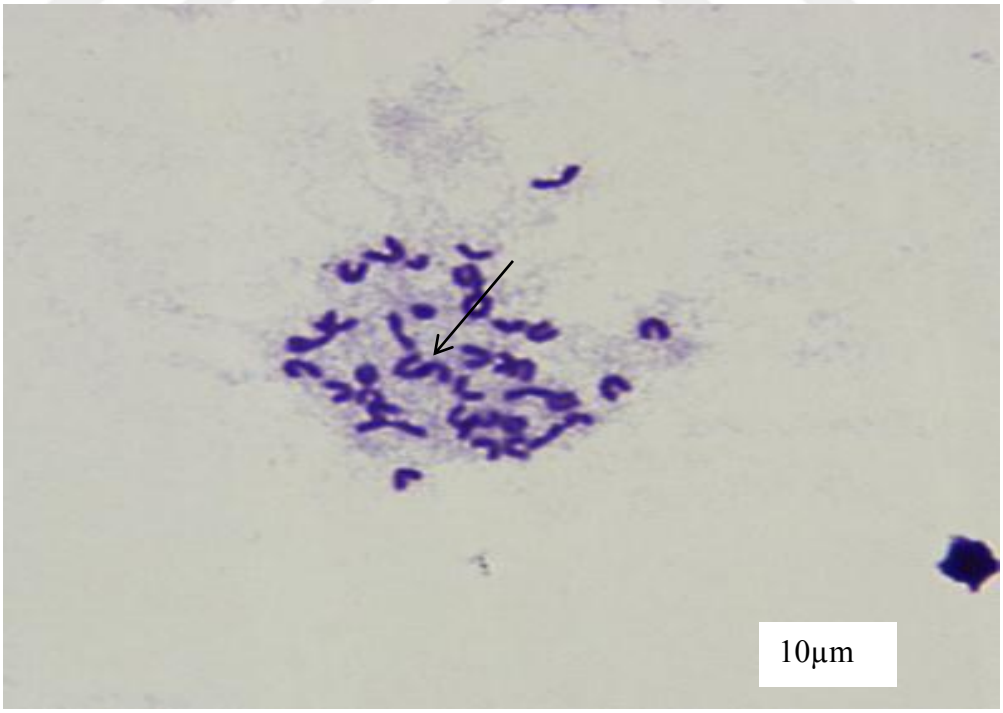
Şekil 4. 5. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (100 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



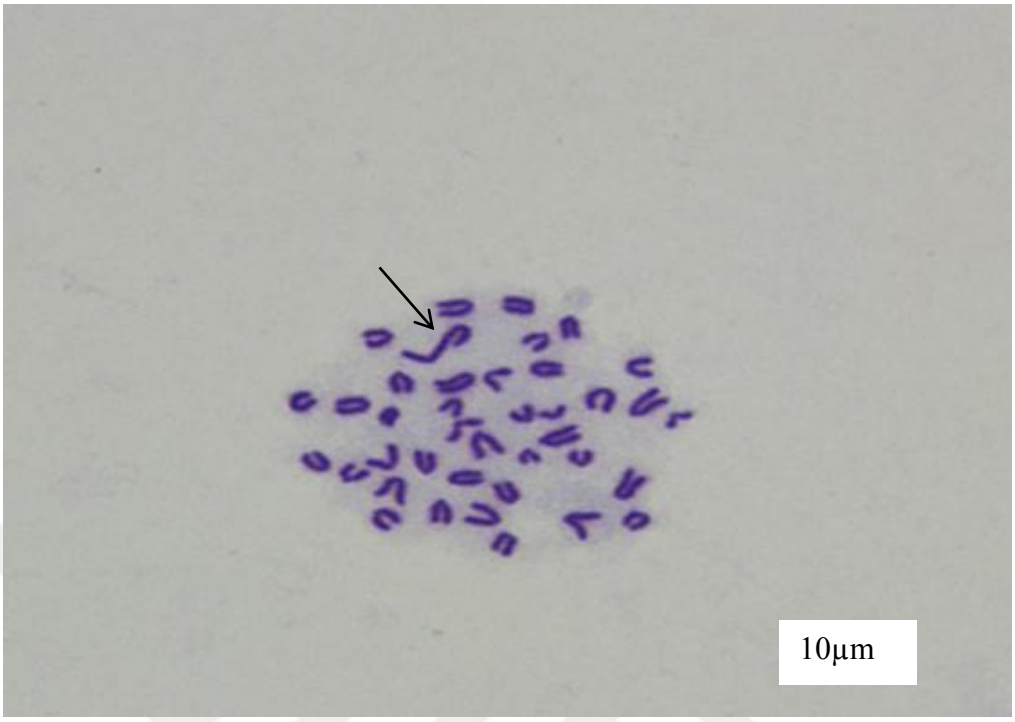
Şekil 4. 6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (160 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



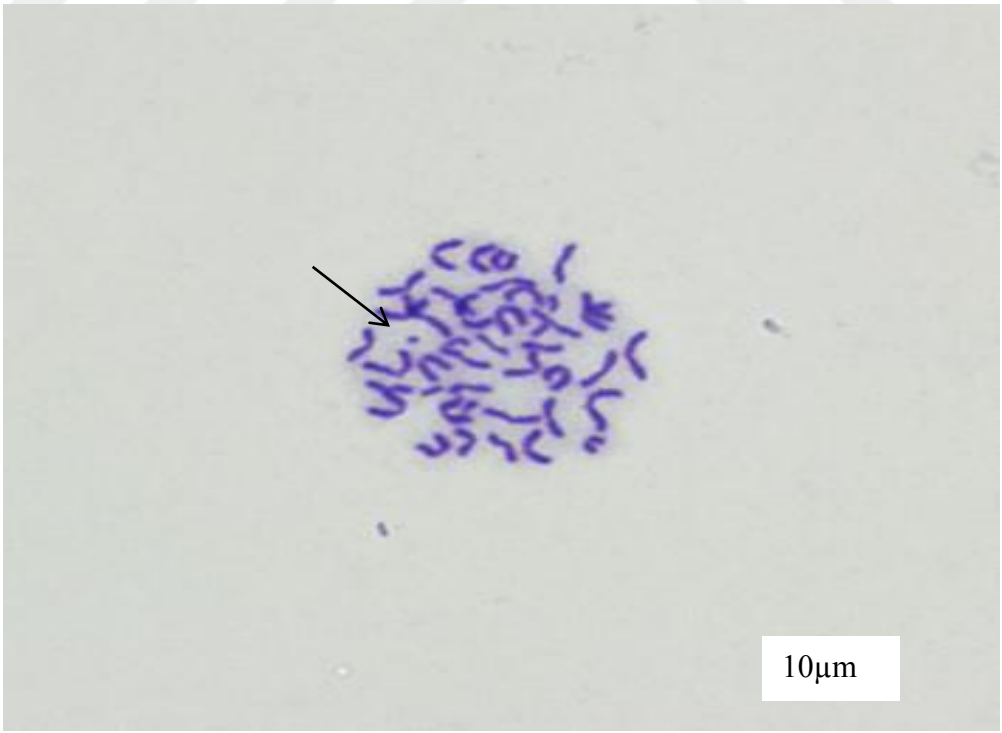
Şekil 4.7. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (100 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♂) (x1000).



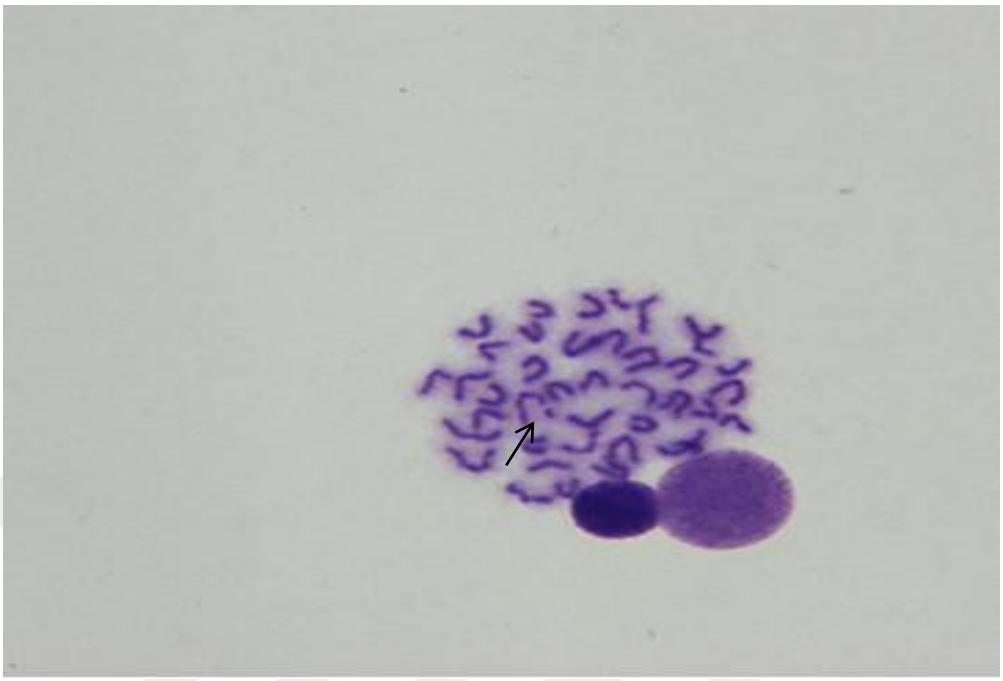
Şekil 4.8. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♀) (x1000).



Şekil 4.9. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (160 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♀) (x1000).



Şekil 4.10. Kromatid tipi fragment(F') bulunan metafaz plağı (100 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.11. Kromatid tipi fragment(F') bulunan metafaz plağı (130 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♀) (x1000).

4.1.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi İle Belirlenmesi

4MEI'nin antigenotoksik olup olmadığı etilmetan sülfonatla birlikte farelere verilmesiyle araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışmada 4-MEI'nın EMS'ye karşı antigenotoksik etkisinin olup olmadığı 12 ve 24 saatlik muamele süresince KA testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada genotoksik etkiye sahip olduğu bilinen 240 mg/kg EMS ile birlikte üç farklı konsantrasyonda (100,130,160 mg/kg) 4-MEI farelere intraperitonal yoluyla enjekte edilerek verilmiş ve elde edilen kemik iliği hücrelerinde KA incelemeleri yapılmıştır.

EMS ve 4-MEI'nın karışım halinde verildiği farelerin kemik iliğinden elde edilen kromozom incelemeleri sonucunda 12 saatlik 100mg/kg ve 130mg/kg konsantrasyonlarında 24 saatlik muamelede yüksek iki konsantrasyonda (130mg/kg, 160mg/kg) kromozom aberasyonunu kontrole nazaran arttığı saptanmıştır. Pozitif

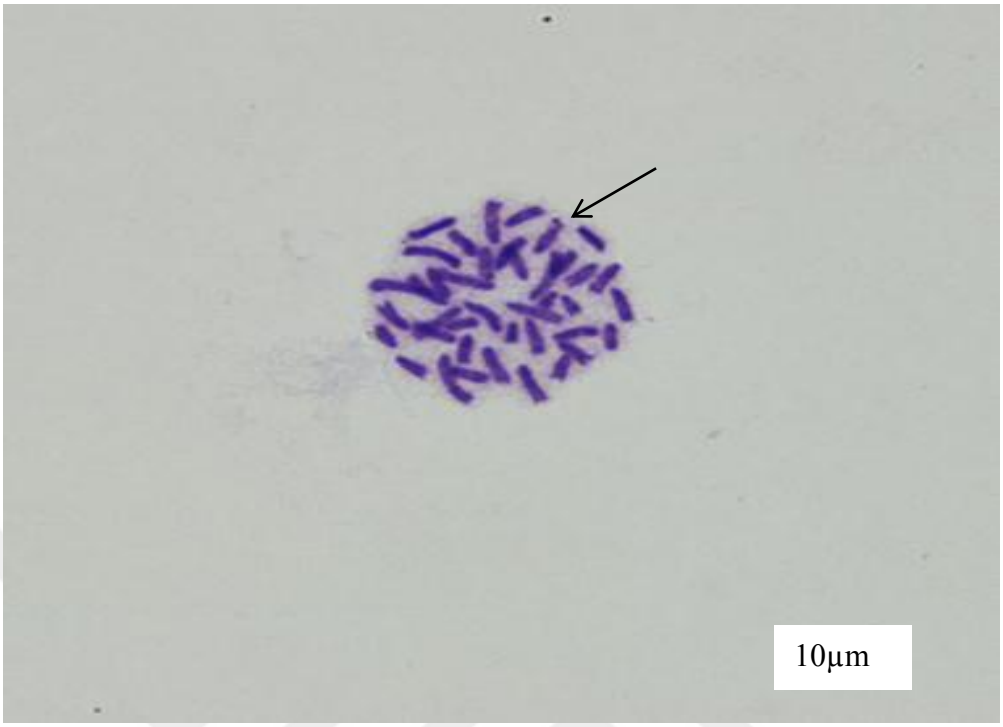
kontrol ile karşılaştırdığımızda 4-MEI, EMS'nin genotoksik etkisi azaltmamıştır. 240mg/kg EMS ile 160mg/ kg 4-MEI verilen farelerde kromozom aberasyonlu hücre sayısı tek başına verilen EMS grubuna nazaran artmıştır ama bu artışda istatistik bakımında önemli olmamıştır.

EMS ve 4-MEI ile muamele edilen fare kemik iliğinde görülen bazı kromozom anormallikleri şekil 4.12-şekil 4.18'de gösterilmiştir.

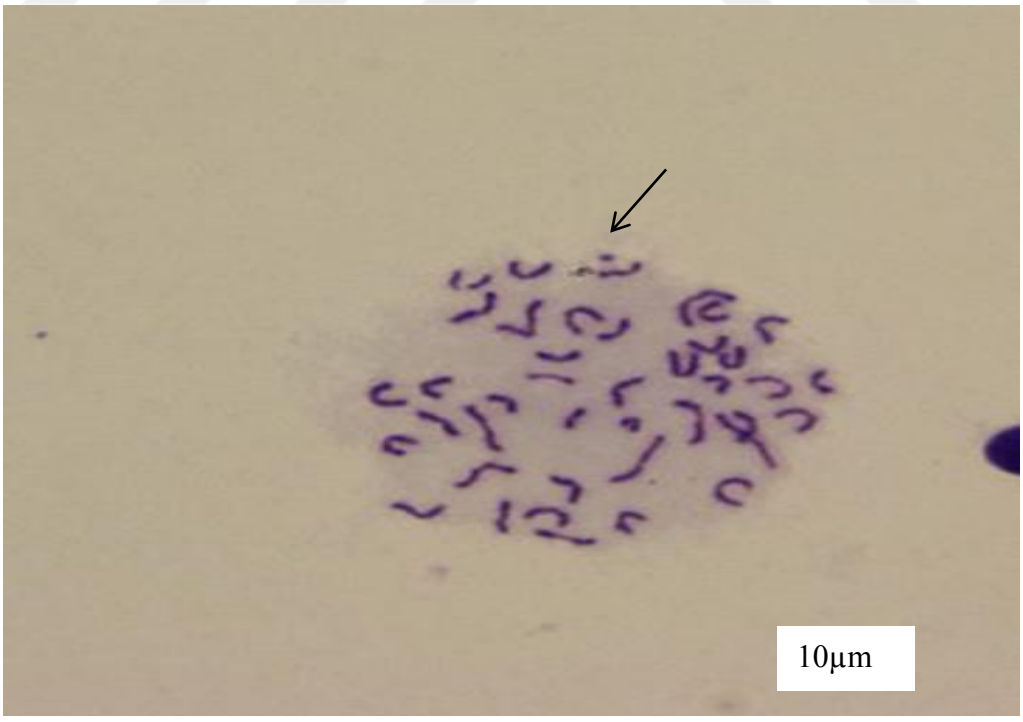
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI ve EMS ile karışım halinde 12 ve 24 Saat Muamele Edilmiş Olan Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri ve Anormal Hücre Yüzdesi

Test Maddesi	**Muamele**		**Anormallik Çeşitleri**						**Anormal Hücre (%)'si ± SH**
	Süre (saat)	**Kons. (mg/kg)**	**B"**	**F"**	**B'**	**F'**	**KKB**	**KD**	
Kontrol	--	--	2	1	0	0	3	0	1.00± 0.258
EMS(PK)	12	240	1	0	12	7	2	1	3.83± 0.401a_3
4-MEI + EMS	12	100+240	0	1	3	6	4	3	2.83± 0.307 a_2
		130+ 240	3	1	10	3	3	2	3.66± 0.422 a_3
		160+240	0	0	7	5	0	4	2.67± 0.558
EMS(PK)	24	240	1	0	9	3	1	4	3.00± 0.447 a_2
4-MEI + EMS	24	100+240	0	0	8	7	3	0	3.00± 0.577
		130+ 240	0	0	13	6	0	0	3.16± 0.543 a_1
		160+240	1	0	13	7	2	2	4.16 ± 0.792 a_1

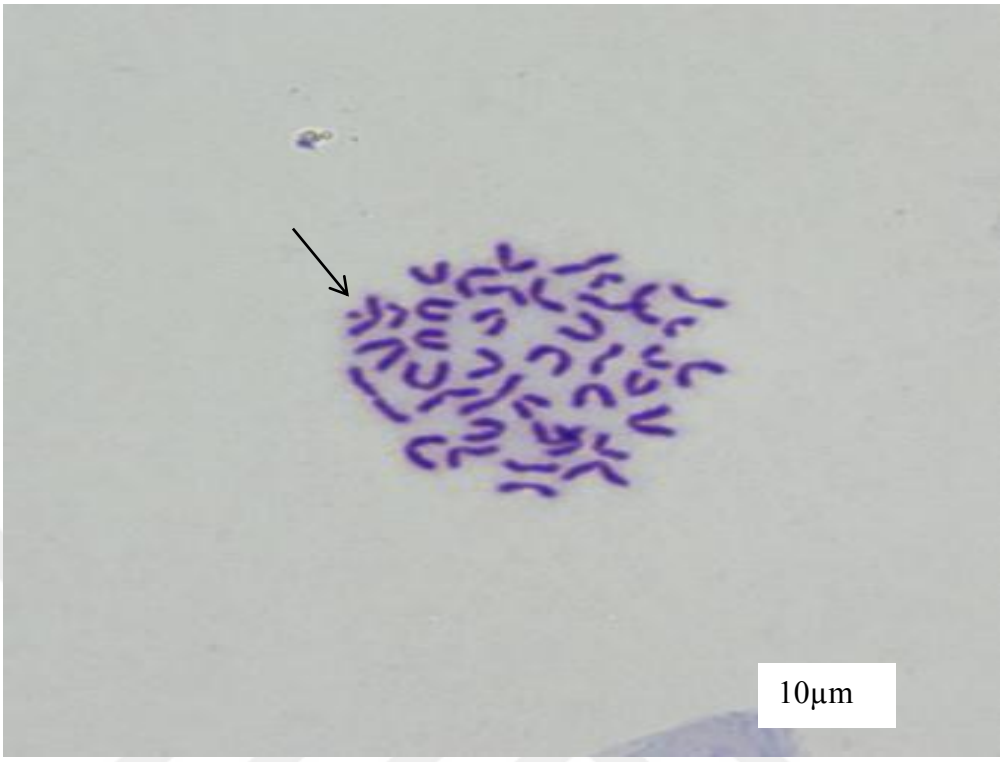
B': Kromatid kırığı, B": Kromozom kırığı,
F": kromozom tipi fragment, KD: Kromatid değişimi, F': Kromatid tipi fragment, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (sister union).
a: Kontrol ile; b: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. a_1b_1: $P \leq 0.05$ a_2b_2: $P \leq 0.01$ a_3b_3: $P \leq 0.001$



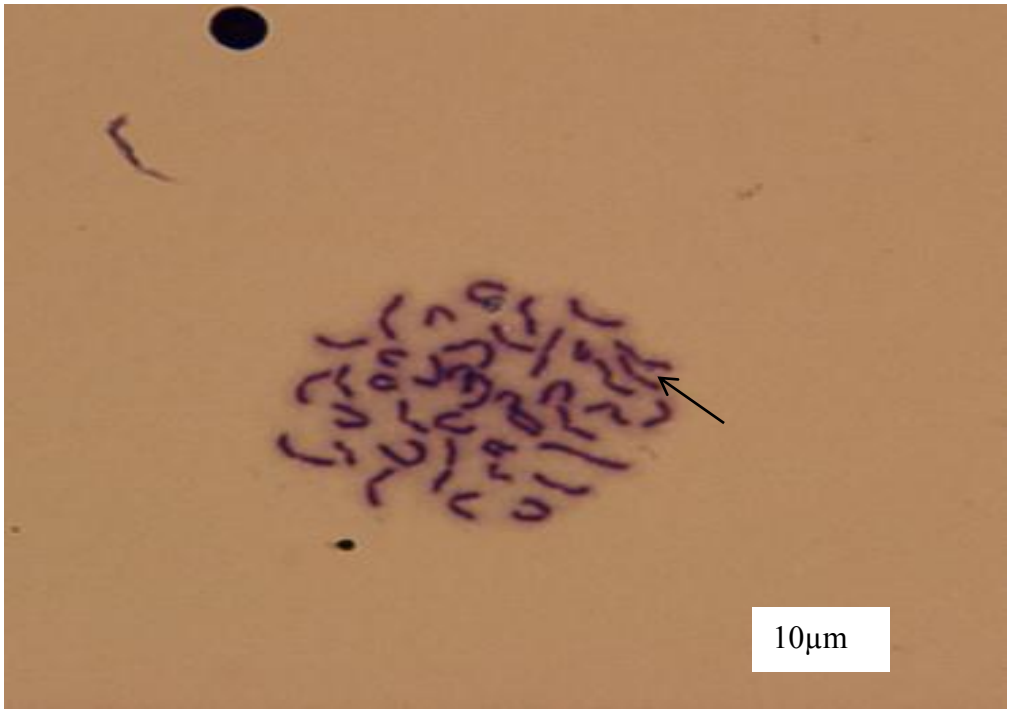
Şekil 4.12. Kromozom kırığı (B') bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+130 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♀) (x1000).



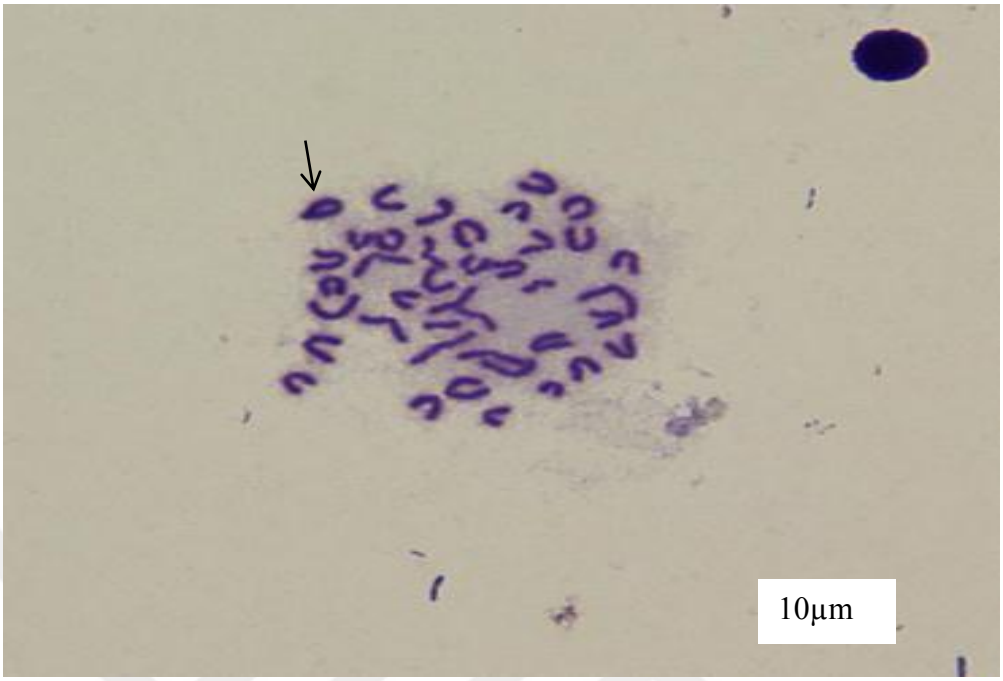
Şekil 4.13. Kromatid tipi fragment (F') bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+130 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♀) (x1000).



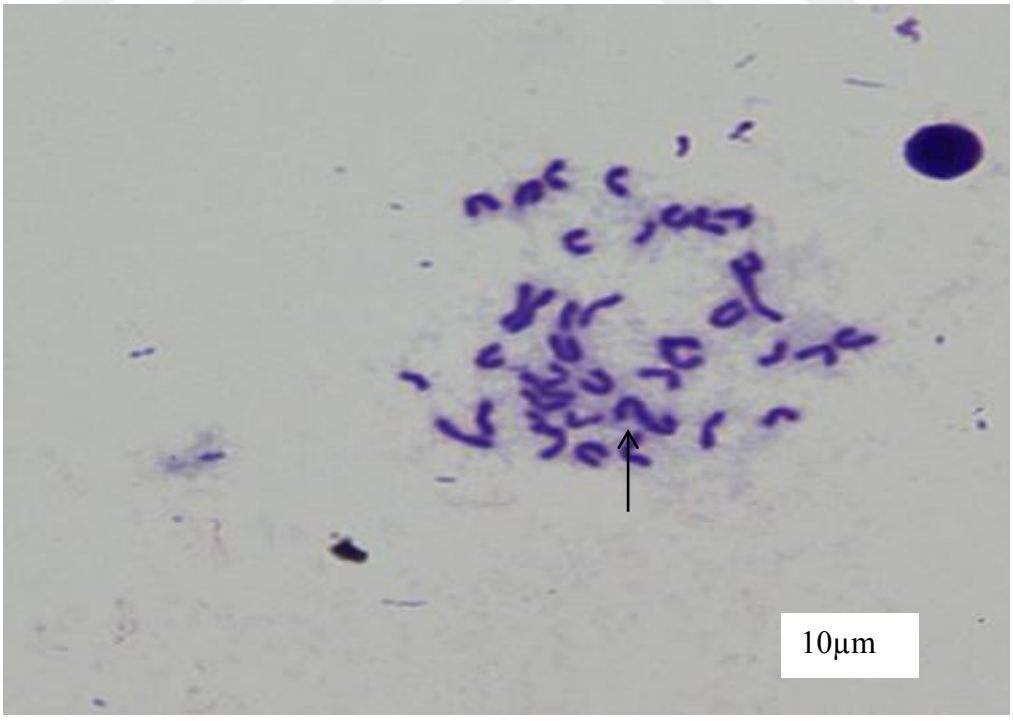
Şekil 4.14. Kromatid tipi fragment (F') bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+130 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



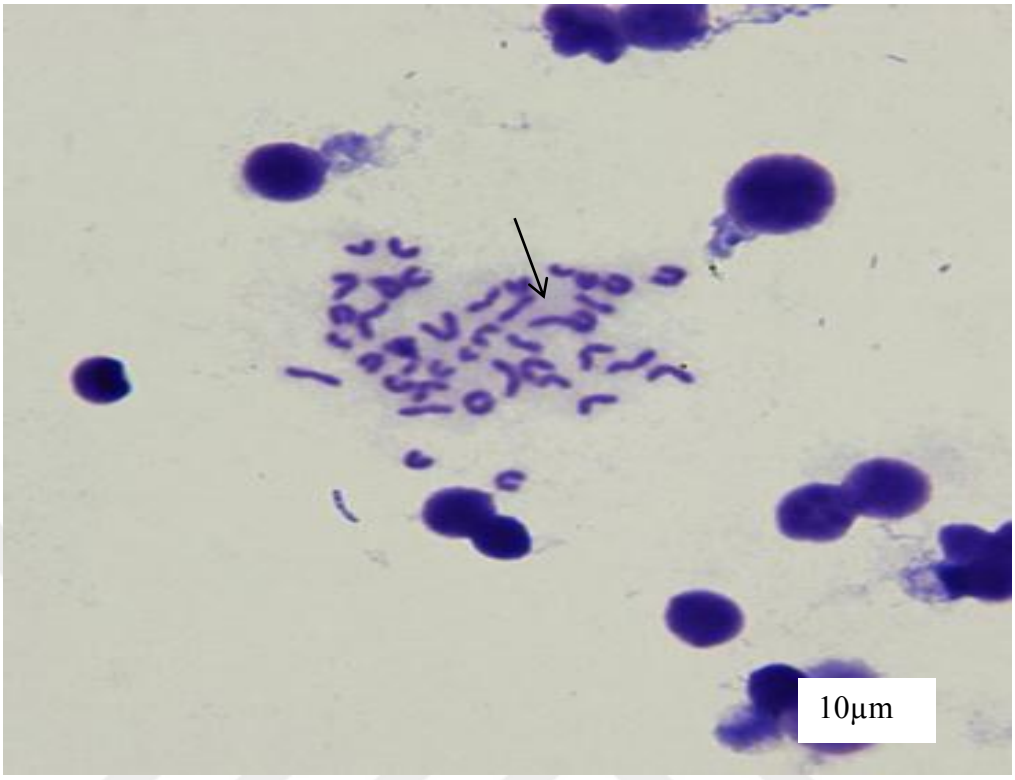
Şekil 4.15. Kromatid tipi fragment (F') bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+100 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♀) (x1000).



Şekil 4.16. Kardeş Kromatid Birkeşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+100 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♀) (x1000).



Şekil 4.17. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+160 mg/kg 4-MEI, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.18. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (240mg/kg EMS+160 mg/kg 4-MEI, 12 saatlik muamele, ♂) (x1000).

4.1.2. 4-MEI'nın Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.2.1. 4-MEI'nın Mitotik İndeksin (MI) Saptanması İle Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4-MEI'nın mitoz bölünme üzerindeki etkisi de mitotik indeks (MI)'in saptanmasıyla belirlenmiştir. Üç farklı konsantrasyonda (100, 130 ve 160 mg/kg) 4-MEI ile 12 ve 24 saat muamele edilen fare kemik iliği hücrelerine ait mitotik indeks çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

4-MEI 12 ve 24 saatlik muamelelerde tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksin kontrola nazaran düşüşüne sebep olmuştur ama 4-MEI ile 12 saat muamele edilen kültürlerde sadece 160 mg/kg kontrasyonunda, 24 saatlik muamelede ise tüm

konsantrasyonlarda mitotik indeks istatiksel olarak önemli derecede düşmüştür. Bu düşüş 24 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı durum göstermiştir.

4MEI ile 12 saat muamele edilen hayvanlarda en yüksek konsantrasyonda (160mg/kg) MI'deki düşüş EMS'deki kadar, 160mg/kg konsantrasyonunda 4MEI ile 24 saat muamele edilen hayanlardaki MI'deki düşüş EMS'dekinden daha fazla olmuştur. Yani 4MEI en yüksek konsantrasyonunda 24 saatlik muamelede fare kemik iliği hücrelerinin mitoz bölünmesini EMS'den daha fazla olumsuz yönde etkilemiştir (çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI ile 12 ve 24 Saat Muamele Edilen Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks (MI)

Test Maddesi	**Muamele**		**MI±SH**
	Süre (saat)	**Kons. (mg/kg)**	
Kontrol	--	--	5.532± 0.315
EMS(PK)	12	240	2.217± 0.294 a_3
4-MEI	12	100	4.512± 0.437 b_2
		130	4.965± 0.351 b_2
		160	2.222± 0.438 a_3
EMS(PK)	24	240	2.683± 0.273 a_3
4-MEI	24	100	2.983± 0.445 a_2
		130	2.863± 0.432 a_2
		160	1.862± 0.191 a_3 b_1

a: Kontrol ile; b: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
a_1b_1: $P\leq0.05$ $_2b_2$: $P\leq0.01$ a_3b_3 : $P\leq0.001$

4-MEI ve EMS karışımının mitoz bölünme üzerindeki etkisi mitotik indeks (MI)'in saptanmasıyla belirlenmiştir. Bu araştırmada 240 mg/kg EMS üç farklı konsantrasyonda (100, 130 ve 160 mg/kg) 4-MEI ile karıştırılmıştır. Karışım 12 ve 24 saat muamele için farelere intraperitoneal yolla verilmiştir. Fare kemik ilişine ait mitotik indeks çizelge 4-3'de gösterilmektedir.

EMS ve 4-MEI karışımı ile 12 ve 24 saatlik muamelelerde tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksin kontrola nazaran önemli derecede düşüşüne sebep olmuşdur. EMS ve 4-MEI karışımının etkisi ile tek başına verilen EMS'nin etkisini karşılaştırdığımızda karışım halinde verilen 4-MEI'ye ait mitotik indeks 12 saatlik 100 ve 130 mg/kg konsantrasyonu dışında tüm muamele ve konsantrasyonlarda mitotik indeksin artışına sebep olmuştur ama bu etki istatistik bakımından önemli bulunmamıştır.

4-MEI+EMS karışımından elde edilen sonuçları tek başına verilen EMS grubu ile karşılaştırdığımızda bu grupların arasında istatisk bakımından önemli fark bulunmamıştır. 4MEI'un tek başına kullanıldığı konsantrasyondan elde edilen sonuçlar ile 4-MEI+EMS karışımından elde edilen sonuçları karşılaştırdığımızda sadece 12 saatlik muamelenin 100 ve 130 mg/kg konsontrasyonlar ile tek başına verilen 4-MEI grubu arasında istatistik bakımından önemli fark bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI+ 240 mg/kg EMS karışımı ile 12 ve 24 Saat Muamele Edilen Farelerin Kemik iliğinde Mitotik İndeks (MI).

Test Maddesi	**Muamele**		**MI ± SH**
	Süre (saat)	**Kons. (mg/kg)**	
Kontrol	--	--	5.532± 0.315
EMS(PK)	12	240	2.217± 0.294 a_3
4-MEI+ EMS	12	100+240 130+240 160+240	1.943± 0.230 a_3c_3 1.915± 0.263 a_3 c_3 2.320 ± 0.182 a_3
EMS(PK)	24	240	2.683± 0.273 a_3
4-MEI+ EM	24	100+240 130+240 160+240	2.308± 0.334 a_3 2.912± 0.439 a_2 2.250± 0.279 a_3

a: Kontrol ile; b: pozitif kontrol ile c: tek başına verilen 4-MEI ile fark önemlidir. a_1b_1 : $P\leq0.05$ a_2b_2 : $P\leq0.01$, a_3b_3 : $P\leq0.001$

4.1.3. 4 -MEI ve DMH'nin Kanser Oluşumu İle İlişkilerinin Real Time PCR ile Belirlenmesi

Bu çalışmada bir kanserojen olan 1,2 dimetilhidrazin (DMH)'nin kanser oluşturma etkisine karşı 4-MEI'nin antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca 4-Metilimidazol (4-MEI) ve 1,2 dimetilhidrazin (DMH)'in K-ras ve β-catenin onkogenlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bunların yanı sıra DMH'in belirtilen onkogenlerin ekspresyonu üzerindeki etkisine karşı 4-MEI'nin etkisi belirlenmiştir. Çalışmada, hayvan modeli olarak Sprague-Dawley erişkin sıçan (4-6 haftalık) kullanılmıştır. Yapılmış olan araştırmada sıçanlar 6 gruba ayırılmışlar ve her grup için 8 sıçan (4♂ ve 4♀) kullanılmıştır ve guruplar şu şekilde olmuştur:

A grup, Kontrol grup: Bu guruptaki sıçanlara deney süresi boyunca (10 hafta) sadece yem ve su verilmiştir.

B grup, DMH grup: bu gruptaki sıçanlarda kolorektal kanseri oluşturmak için iki hafta boyunca haftada iki defa 40 mg/kg vücut ağırlığı (v.a) olacak şekilde 1,2 dimethylhidrazin (Matrix scientific) 1 mM suda çözerek karın zarı içerisine (intraperitonal) verilmiştir ve bu muamelelerden sonra deney süresinin sonuna kadar (10 hafta) normal yem ve su verilmiştir (Mohania ve ark. 2013).

C grup: Bu gruplardaki sıçanlara iki hafta 40 mg/kg vücut ağırlığı (v.a) konsantrasyonunda DMH haftada iki defa intraperitonal yol ile verilmiştir ve DMH muamelesinin 1 hafta öncesinden itibaren 10 hafta haftada 5 gün 50 mg/kg 4-MEI verilmiştir.

D grup: Bu gruplardaki sıçanlara iki hafta boyunca haftada iki defa DMH intraperitonal yol ile 40 mg/kg vücut ağırlığı (v.a) konsantrasyonunda verilmiştir ve DMH muamelesinden 1 hafta sonra başlamak üzere 10 hafta boyunca haftada 5 gün 25 mg/kg 4-MEI verilmiştir.

E grup: Bu gruplardaki sıçanlara 10 hafta boyunca intraperitonal yolla 25 mg/kg 4-MEI intraperitonal yolla verilmiştir.

F grup: Bu gruplardaki sıçanlara 10 hafta boyunca 50 mg/kg 4-MEI intraperitonal yolla verilmiştir.

K-ras ve β-catenin genlerin RT-PCR'da saptanan ekspresyon sonuçları çizelge 4.5'de verilmiştir. 4-MEI'nın kanserojenik riskinin olup olmadığını ve antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığını saptamak için yapılan bu araştırmadan elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu araştırmada DMH verilen sıçanların kalın bağırsağında β-catenin ve K-ras genlerin ekspresyonu önemli derecede artmıştır (çizelge 4.5 b grubu). Bu da moleküler seviyede kanserin oluştuğunu göstermektedir ama gözlemsel olarak bu gruptaki sıçanların kolon dokularında herhangi bir tümör görülmemiştir. 4-MEI ile muamele edilen gruplardan elde edilen sonuçları incelediğimizde 4-MEI hem 1 hafta önceden verildiğinde (C Grup) ve hem bir hafta sonradan (D Grup) verildiğinde DMH'nin etkisini β-catenin genin ekspresyon seviyesini azaltarak düşürmüştür yanlız bu düşüş istatistik olarak önemli bulunmamıştır. K-ras geninin ekspresyon seviyesini incelediğimizde hem 4-MEI'nın bir hafta önceden verildiğinde (C Grup) ve hem de bir hafta sonradan (D Grup) verildiğinde DMH'nin etkisini K-ras geninin ekspresyon seviyesini azaltarak düşürmüştür yanlız bu düşüş sadece C grupta istatistik olarak önemli bulunmuştur.

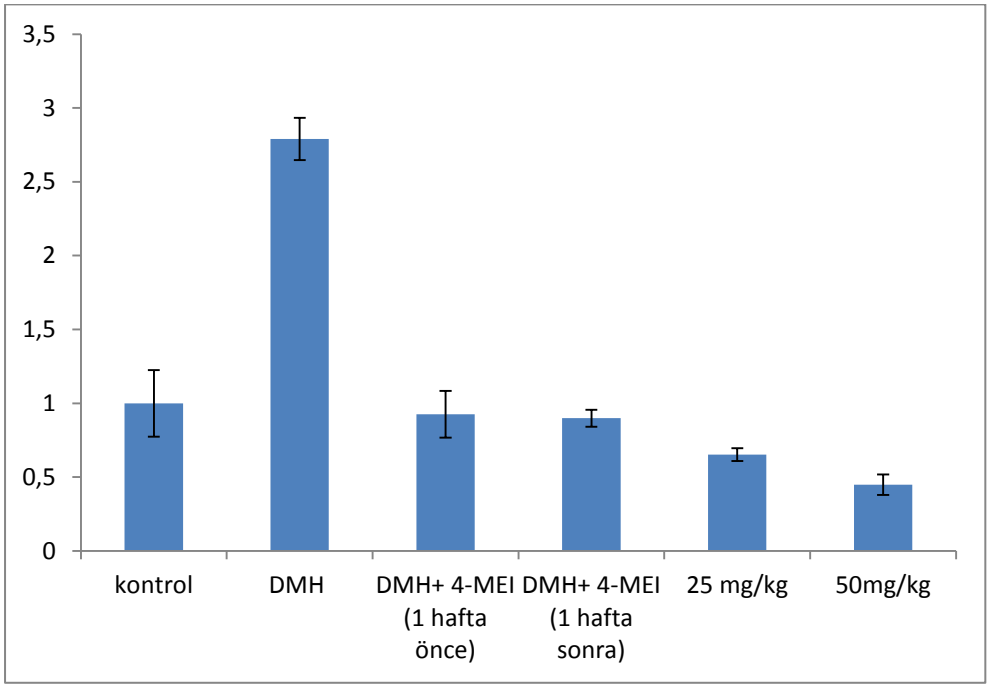
İki farklı konsanrasyonda (25 ve 50 mg/kg) verilen 4-MEI her iki konsantrasyonda β-catenin genin ekspresyonunu kontrole göre azaltmıştır ve bu azalma istatistik bakımından önemli bulunmuştur. İki farklı konsanrasyonda (25 ve 50 mg/kg) 4-MEI ile muamele edilen sıçanların K-ras ekspresyonlarını incelediğimizde 4-MEI'nın K-ras genin ekpresyon seviyesini düşürdüğünü görebiliriz. Yanlız bu düşüş sadece 50 mg/kg konsantrasyonunda istatistik olarak önemli olmuştur.

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın antikanserojenik özelliğe sahip olabilirliğini göstermektedir. Tek başına 4-MEI ile muamele edilen sıçanlardan elde edilen sonuçlar bu maddenin K-ras ve β-catenin genlerin ekspresyon seviyelerini düşürerek sitotoksik etkiye yol açtığını göstermektedir.

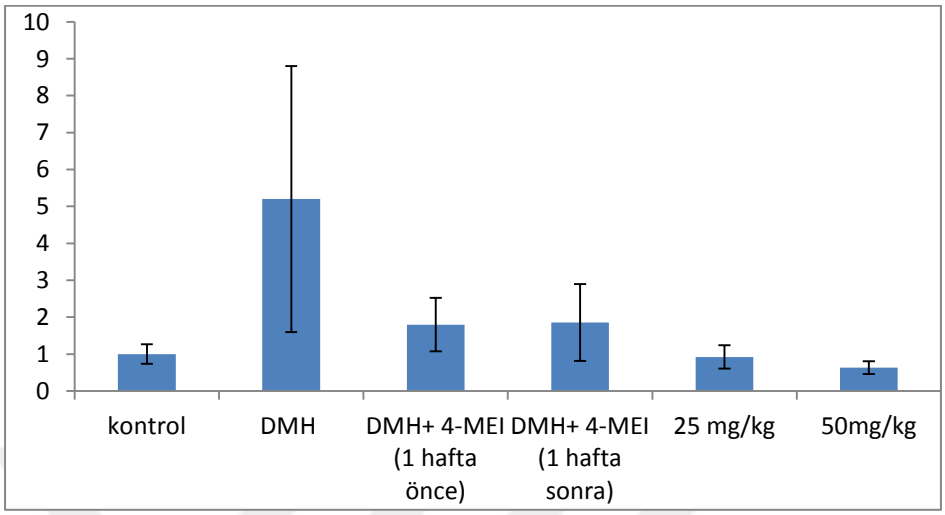
Çizelge 4.5. 4-MEI ve DMH ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras genlerin ekspresyon düzeyleri.

Gruplar	**β-catenin genin ekspresyonu ± SH**	**K-ras genin ekspresyonu ± SH**
A Grup (kontrol)	1.000±0.096 b_3	1.000±0.128 b_3
B Grup (DMH grup)	2.790±0.739 a_1	5.200±1.270 a_1
pretreatment	0.926±0.289 b_3	1.798±0.259 a_1 b_3
Post treatment	0.899±0.352 b_3	1.860±0.368 b_3
E Grup (25mg/kg 4-MEI)	0.652±0.155 a_1 b_3	0.923±0.113 b_3
F Grup (50 mg/kg 4-MEI)	0.449±0.075 a_3 b_3	0.635±0.061 a_2 b_3

a: Kontrol ile ; b: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. a_1b_1: P≤0.05; a_2b_2: P ≤0.01; a_3b_3: P ≤0.001. SH=standart hata.



Şekil 4.19. DMH ve 4-MEI ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin geninin ekspresyon düzeyi.



Şekil 4.20. DMH ve 4-MEI ile muamele edilen sıçanlarda K-ras geninin ekspresyon düzeyi.

4.1.4. 4-MEI'nın Kanserojenik ve Anti Kanserojenik Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması

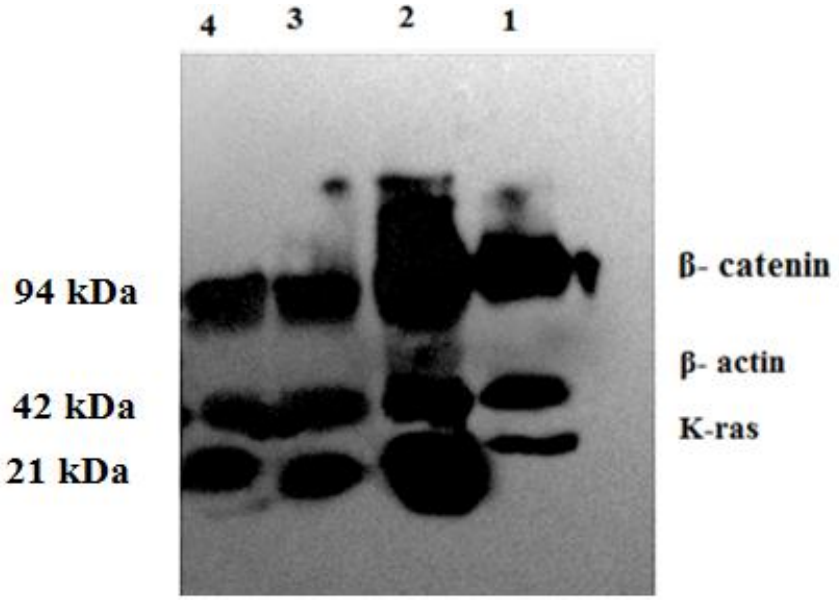
Bu çalışmanın test maddesinin kanser oluşumu veya antikanser etkisinin olup olmadığını saptamak için muamele edilen deney hayvanlarının kalın bağırsak dokularında β-catenin ve K-ras proteinlerinin ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. Bunun için kolon dokusundan Western Blot analizi yapılmıştır.

Western Blot analizinden elde edilen görüntüler Quantity One programında analiz edilmiştir ve bu analizde her protein'in oluşturduğu band mm^2 cinsinden verilmiştir. Western Blot analizinden elde edilen sonuçlar Real Time PCR 'dan elde edilen sonuçları desteklemektedir. Western Blot çalışmasından elde edilen görüntüler şekil 4.21 ve şekil 4.22'de görüldüğü gibi DMH ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras proteinlerin sentez seviyeleri artmıştır. Bu da bu gruplardaki sıçanların kolon dokularında moleküler seviyede kanserin oluştuğunu ispatlamaktadır. Antikanser etkisinin olup olmadığını araştırdığımız 4-MEI ile birlikte DMH verilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras protenlerinin sentezinin tek başına muamele edilen DMH grubuna nazaran azaldığı görülmektedir. Ayrıca iki

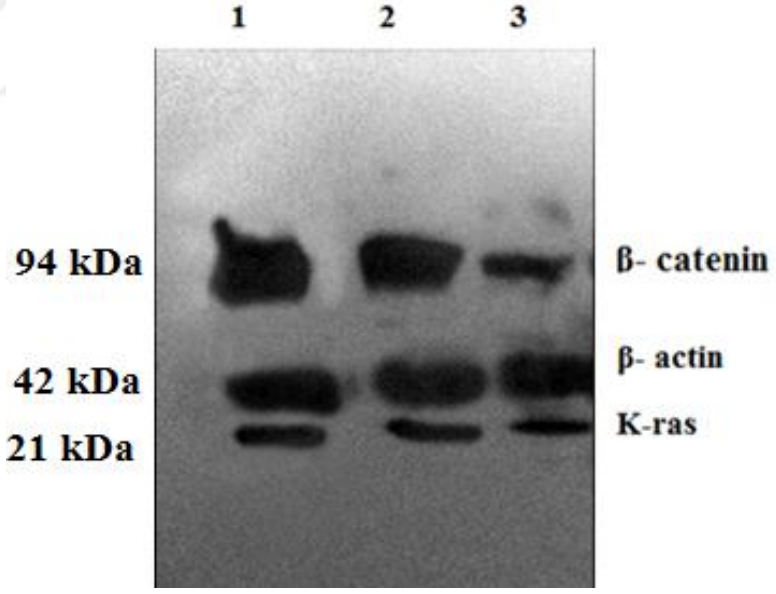
farklı konsantrasyonda (25 ve 50 mg/kg) 4-MEI ile tek başına muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras proteinlerinin ekspresyonları kontrole nazaran azalmıştır. Bu da 4-MEI'nın normal hücrelerde bu proteinlerin ekspresyonlarının azaltılmasıyla sitotoksik etkiye neden olabildiğini ortaya koymaktadır. Yapılan bu çalışmada β-aktin proteinin ekspresyonu tüm gruplarda yaklaşık olarak aynıdır ve muameleli gruplar ile kontrol grubu arasında miktar bakımından bir fark gözlenmemiştir. Muameleli ve kontrol gruplarda β-aktin'in aynı miktarda eksprese olması ama β-catenin ve K-ras proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin değişmesi bu değişimin gerçekten 4-MEI tarafından oluşturulduğunu ispatlamaktır.

Çizelge 4.6. 4-MEI ve DMH ile muamele edilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras proteinlerin ekspresyon düzeyleri (mm^2)

Gruplar	**β-Catenin**	**K-ras**	**β actin**
A Grup (kontrol)	8.85	1.81	4.2
B Grup (DMH grup)	19.85	7.18	4.6
Pretreatment	8.51	3.47	4.4
Post treatment	9.32	3.95	4.3
E Grup (25mg/kg 4-MEI)	7.19	1.51	4.2
F Grup (50 mg/kg 4-MEI)	2.8	0.59	4.2



Şekil. 4.21. 4-MEI ve DMH ile muamele edilen sıçanların kolon dokularından elde edilen western blot görüntüsü. 1: Kontrol, 2: DMH grup , 3: DMH+bir hafta önce verilen 4-MEI grup, 4: DMH+bir hafta sonra verilen 4-MEI grup.



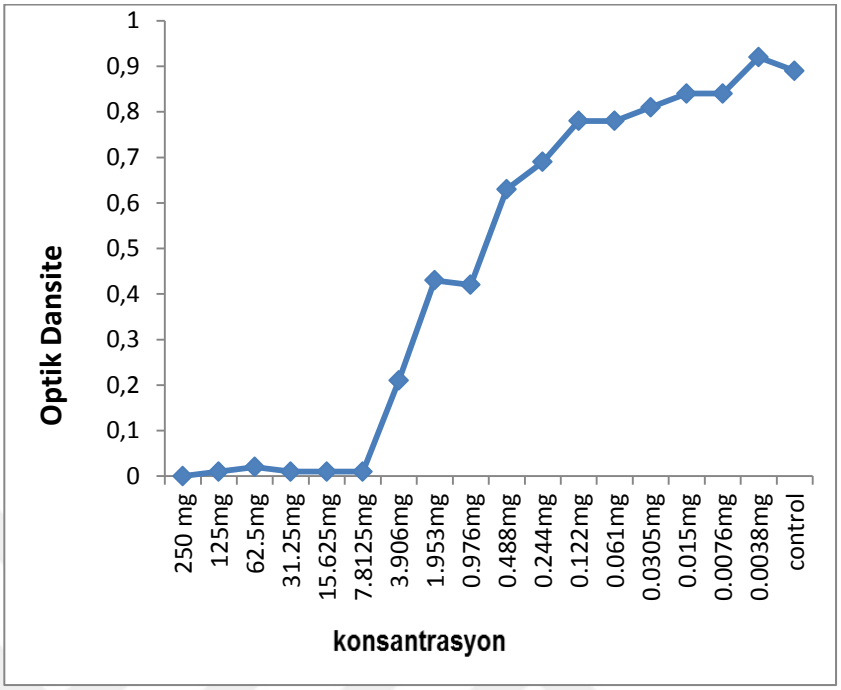
Şekil. 4.22. 4-MEI ile muamele edilen sıçanların kolon dokularından elde edilen western blot görüntüsü.1: Kontrol, 2: 25 mg/kg 4-MEI grup, 3: 50 mg/kg 4-MEI grup.

4.1.5. 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

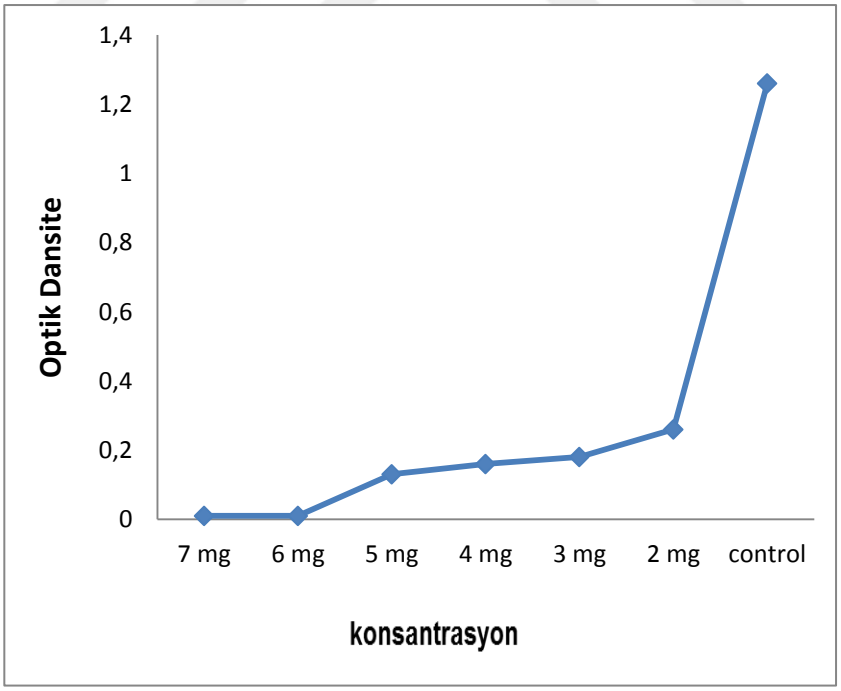
4-MEI'nın antibakteryal etkisini araştırmak için Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı'na ait mikroorganizma koleksiyonunda bulunan *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları kullanılmıştır.

4.1.5.1. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MIC) Saptanması

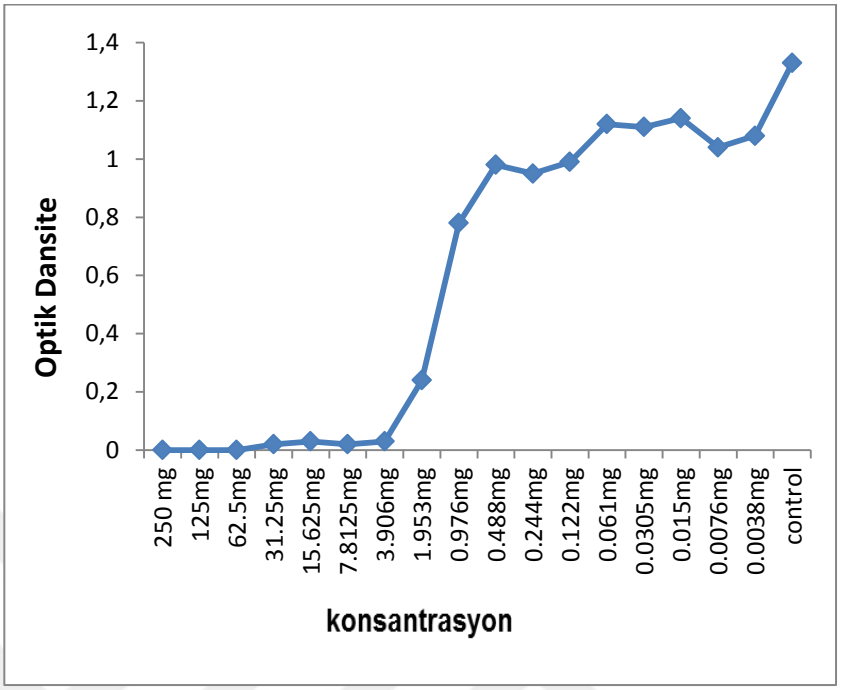
Minimum inhibe edici konsantrasyon değerleri, değişik konsantrasyonlarda 4-MEI (7.6 -250000 µg/mL) ilave edilmiş sıvı besiyerinde bakteri çoğalmasının göstergesi olan bulanıklığa bakılarak belirlenmiştir. Her bakterinin gerçek MIC değerinin saptanması için MIC deneyi tekrar edilmiş ve bu kez birbirine daha yakın aralıklardaki konsantrasyonlar denenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar şekil 4.23- şekil 4.30'da gösterilmiştir. Konsantrasyon etki ilişkisinin olup olmadığını saptamak için süre bitiminde (12 saat 37 ^{o}C) farklı konsantrasyonda kültürü yapılan örneklerin absorbansı 600 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçları incelediğimizde *Bacillus subtilis* bakterisine ait MIC değeri 6 mg/mL, *Staphylococcus aureus* bakterisine ait MIC değeri 3 mg/mL, *E.coli* bakterisine ait MIC değeri 15 mg/mL ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine ait MIC değeri 12 mg/mL olarak belirlenmiştir.



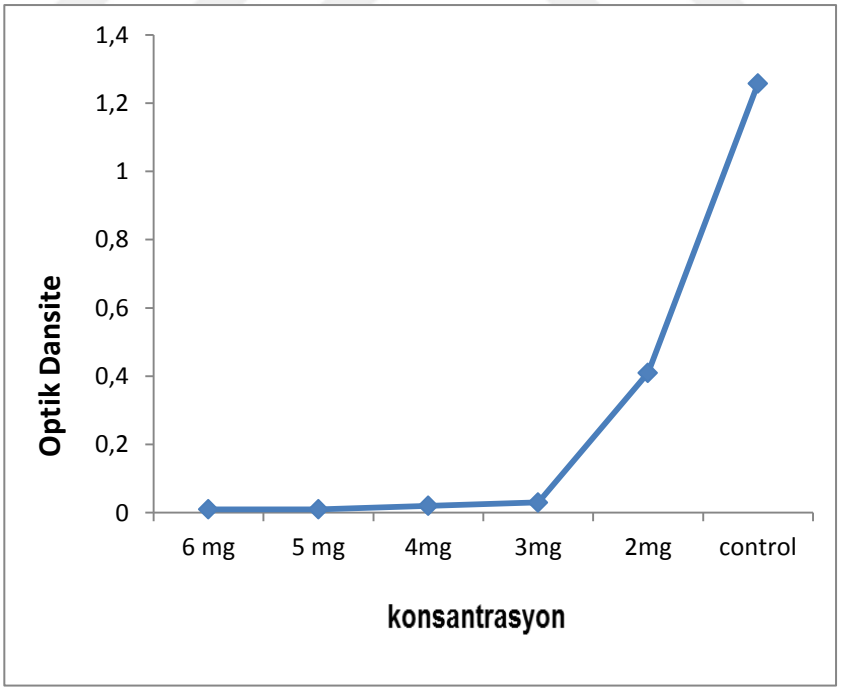
Şekil. 4.23. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Bacillus subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi.



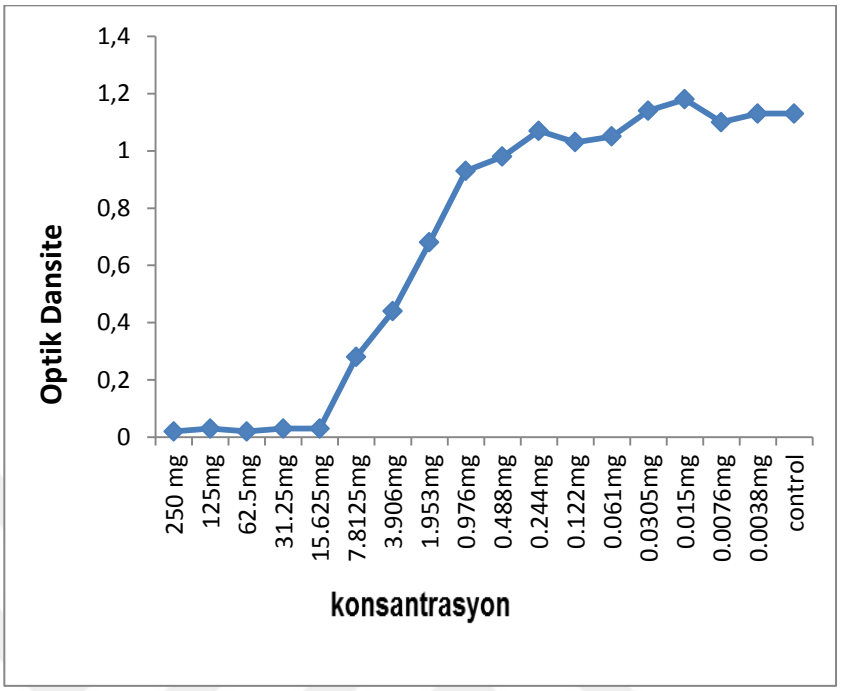
Şekil. 4.24. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Bacillus subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi (ikinci tekrar).



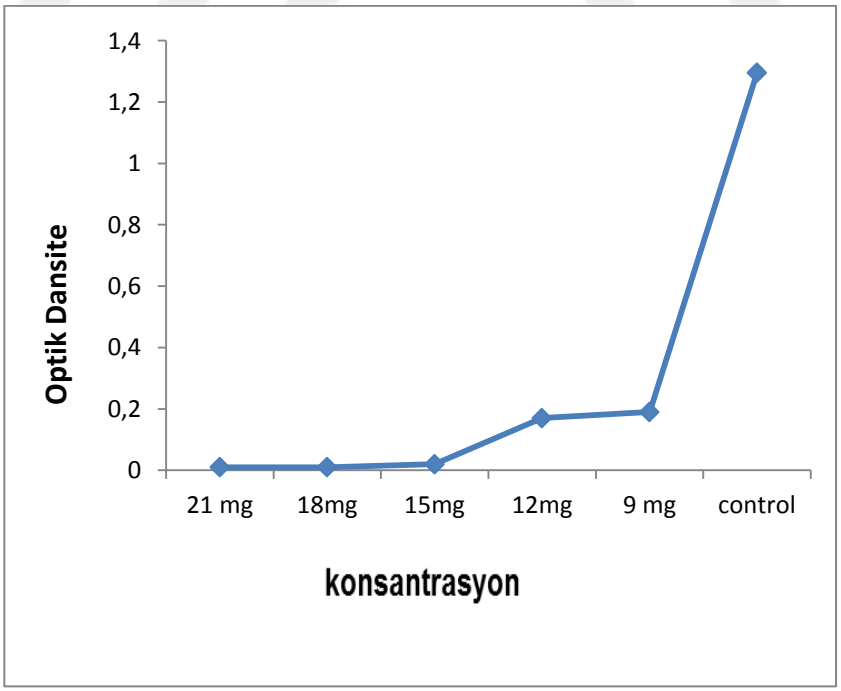
Şekil. 4. 25. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi.



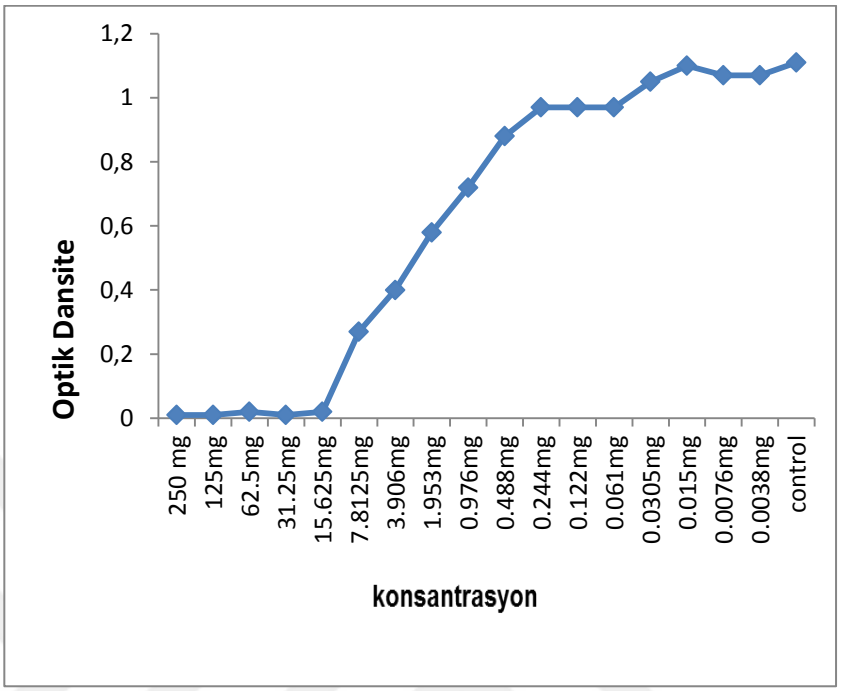
Şekil. 4.26. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi (ikinci tekrar).



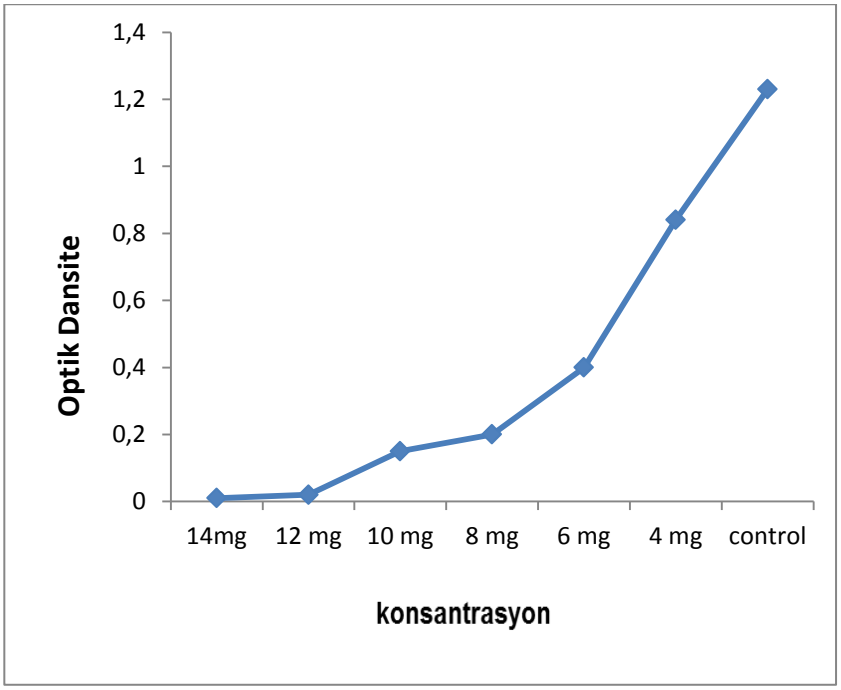
Şekil. 4. 27. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *E.coli* üzerine antibakteriyel etkisi.



Şekil. 4.28. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *E.coli* üzerine antibakteriyel etkisi (ikinci tekrar).



Şekil. 4.29. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.



Şekil. 4.30. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın sıvı besiyerisinde *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi (ikinci tekrar).

4.1.5.2. En Küçük Bakterisidal Konsantrasyonun (MBC) Saptanması

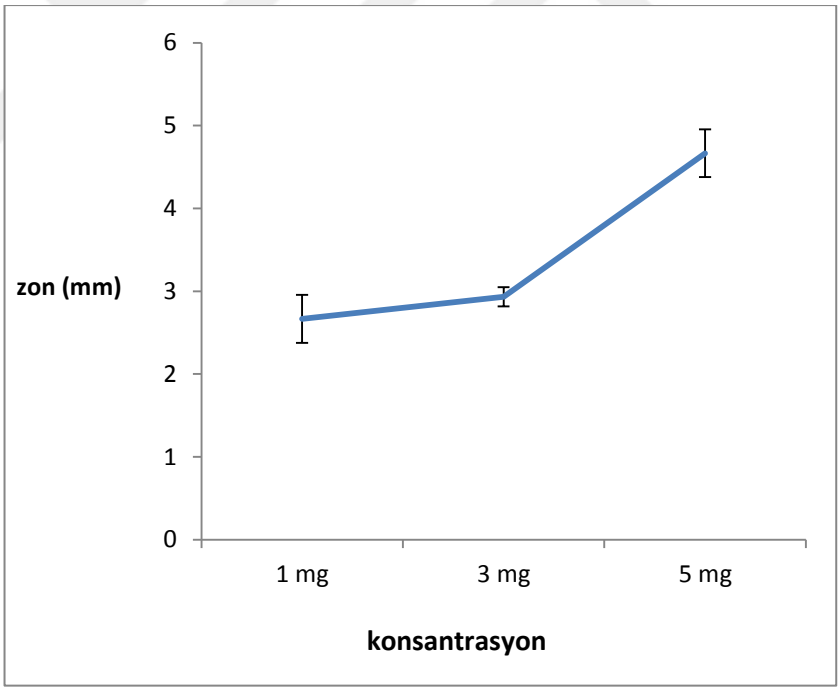
Farklı konsatrasyonlarda (7.6-250000 µg/mL) bakterilerin kültürlerine ilave edilen 4-MEI bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Sonra bakteri kültürlerinden 200 µL alıp yayma metodu ile LB (Luria Broth) agar besiyerine ekilmiştir. Daha sonra 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde ürememiş en az konsantrasyon MBC değeri olarak saptanmıştır. *Bacillus subtilis* bakterisine ait MBC değeri 290 mg/mL, *Staphylococcus aureus* bakterisine ait MBC değeri 62.5 mg/mL, *E.coli* bakterisine ait MBC değeri 62.5 mg/mL ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine ait MBC değeri 62.5 mg/mL olarak belirlenmiştir.

4.1.5.3. Disk Difüzyon Yöntemi

4-MEI'nın 4 farklı bakteri suşunda MBC değerinin incelenmesinde kullanılan konsantrasyonlar önceki aşamada elde ettiğimiz MIC değerlerrine göre seçilmiştir. Bu araştırmada *Bacillus subtilis* bakterisi için 2, 6 ve 10 mg; *Staphylococcus aureus* bakterisi için 1, 3 ve 5 mg; *E.coli* bakterisi için 5, 15 ve 25 mg ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi için de 4, 12 ve 20 mg konsantrasyonları denenmiştir. 4-MEI'nın farklı bakteri suşlarında farklı konsantrasyonlardaki etkisi test edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın tüm konsantrasyonlarda antibakteriyel etkisini ortaya konmuştur. Ayrıca bu etki konsantrasyona bağlı olarak da artmıştır. Yapılan bu araştırmada *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerinde 4-MEI, pozitif kontrol olarak kullandığımız Ampicilin (10 mg)'e nazaran daha çok antibakteriyel etki göstermiştir. Ampicilin *E.coli* üzerinde antibakteriyel etki göstermemiştir ama 4-MEI *E.coli'*nin üremesini engelleyerek antibakterial etki ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi.

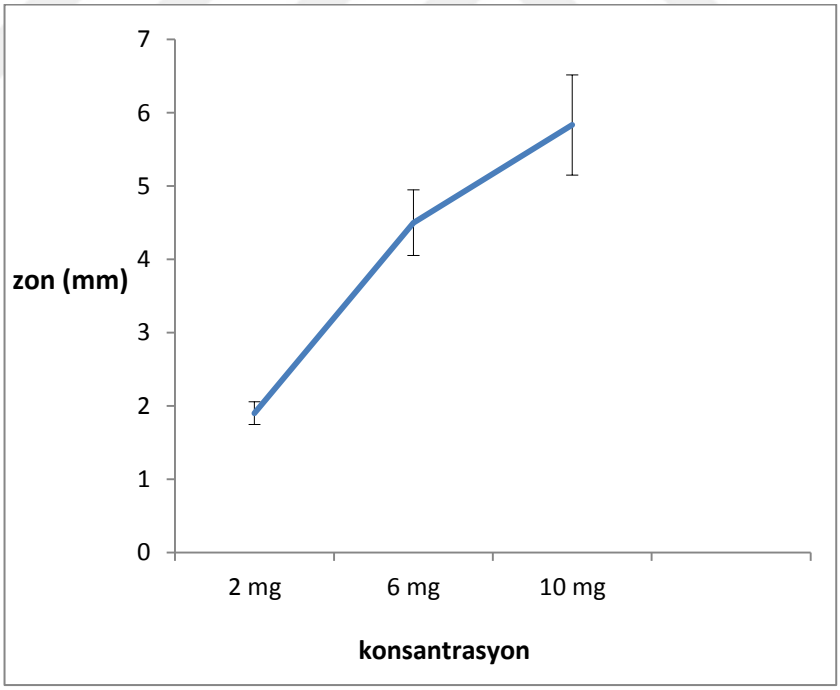
Konsantrasyon	Zon çapları (mm)			Ortalama
1 mg	3	2.5	2.5	2.66
3 mg	3	3	2.8	2.93
5 mg	5	4.5	5.5	4.66
Amp (10mg)	0	0.6	0.3	0.3



Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Staphylococcus aureus* üzerine antibakteriyel etkisi.

Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Bacillus Subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi.

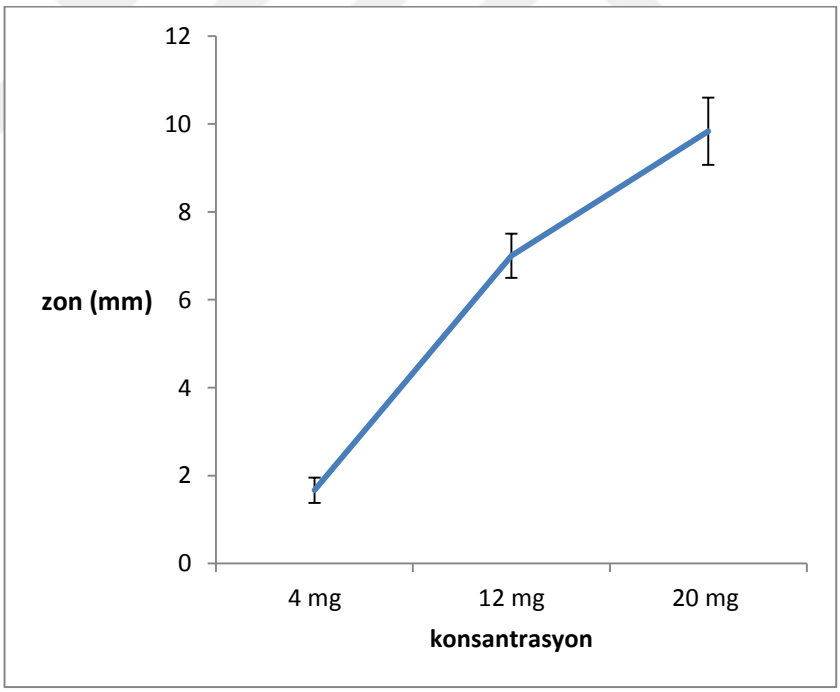
Konsantrasyon	Zon çapları (mm)			Ortalama
2 mg	1.7	2	2	1.9
6 mg	5	4	4.5	4.5
10 mg	5	6	6.5	5.83
Amp (10mg)	0.8	0	0.5	0.43



Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Bacillus Subtilis* üzerine antibakteriyel etkisi.

Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.

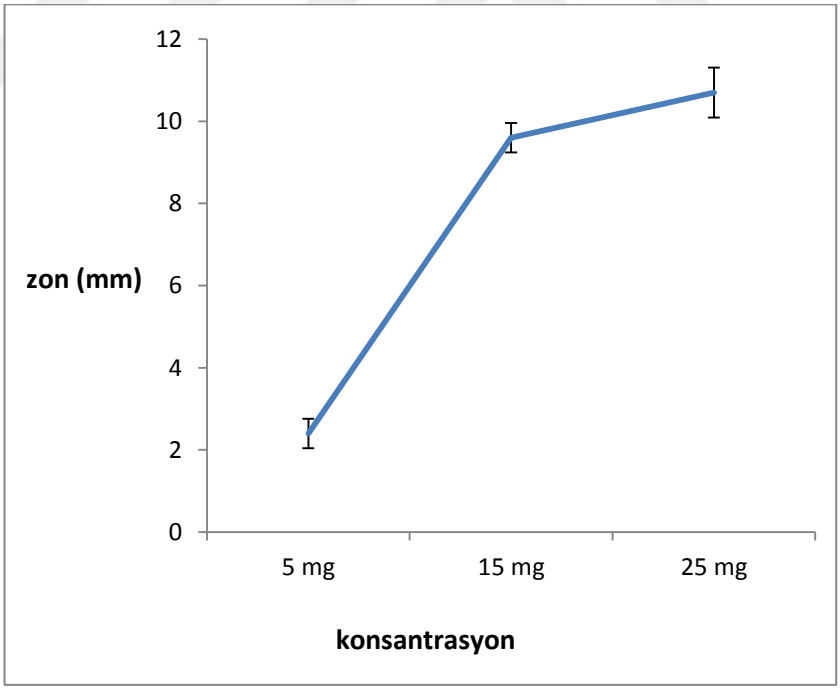
konsantrasyon	Zon çapları (mm)			ortalama
4 mg	2	1.5	1.5	1.66
12 mg	6.5	7	7.5	7
20 mg	10	9	10.5	9.83
Amp (10mg)	1	0.75	0.5	0.75



Şekil .4. 33. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.

Çizelge 4. 10. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi.

konsantrasyon	Zon çapları (mm)			ortalama
5 mg	2.5	2	2.7	2.4
15 mg	9.3	10	9.5	9.6
25 mg	11	10.7	11.1	10.7
Amp (10mg)	0	0	0	0



Şekil 4. 34. Farklı konsantrasyonlarda 4-MEI'nın *E. coli* üzerine antibakteriyel etkisi.



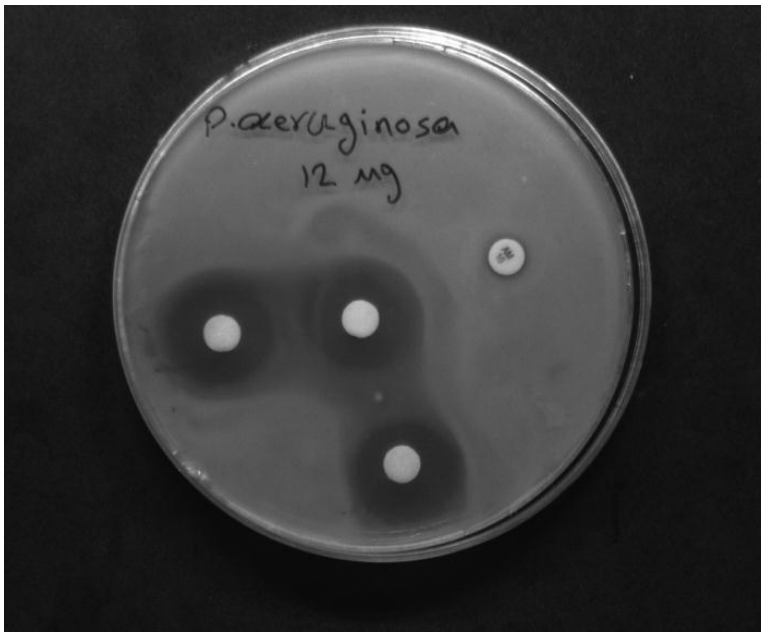
Şekil 4.35. *Staphylococcus aureus bakterisine* ait zon çapı (5 mg 4-MEI).



Şekil 4.36. *Bacillus subtilis* bakterisine ait zon çapı (10 mg 4-MEI).



Şekil 4.37. *E.coli* bakterisine ait zon çapı (15 mg 4-MEI).



Şekil 4.38. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine ait zon çapı (12 mg 4-MEI).

4.2. Tartışma

4.2.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.2.1.1. 4-MEI'nın Genotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi ile Belirlenmesi

Bugüne kadar 4-MEI'nın genotoksik etkisi ile ilgili *in vivo* kromozom aberasyonu çalışmasına literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada, 4-MEI ile muamele edilen farelerin kemik iliği hücreleri kromozomlarında meydana gelen anormalliklerin çoğu kromatid tipi anormallikleri olup bu anormalliklerin artışının kontrole nazaran istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir.

Gıda renklendiriciler ile yapılan genotoksisite çalışmalarını incelediğimizde bazıların genotoksik olduğu ve bazıların genotoksik olmadığı görülmektedir.

Çelik ve Topaktaş (2013) tarafından yapılan bir çalışmada 4-MEI'nın gentotoksik ve sitotoksik etkisi insan periferal kan lenfositlerinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 4-MEI'nın genotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada Alija ve ark. (2004) sıçan hepatositlerinde beta karoten'in 0.1, 1, 10 µM konsantrasyonlarda genotoksik etkisini KKD testleri ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda Beta karoten maddesinin genotoksik olmadığı açıklanmıştır. Başka bir çalışmada Ozaki ve ark. (1998), red 3, red 40, red 102, blue 1, blue 2 sentetik boyalarının fare kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucuna göre bu beş sentetik boyandan Blue 2 boyası hariç diğerlerinin KA'yı uyarmadığı saptanmıştır. Loprieno ve ark. (1992) *in vitro* olarak Çin hamster yumurtalık hücrelerinde karminik asidin genotoksik olup olmadığını araştırmışlar ve araştırıcılar karminik asidin KKD'yi uyarmadığını açıklamışlardır. Brusick ve ark. (1992) karamelin 4. grubunun Çin hamster üreme hücrelerindeki kromozom aberasyonunu uyarıp uyarmadığını araştırmışlar ve araştırıcılar test maddesinin KA'yı uyarmadığını saptamışlardır. Das ve ark. (2004) sentetik boyaların sıçanlarda in vivo kemik iliği hücrelerinde

genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada sentetik boyaların mutajenik ve genotoksik olmadığı açıklanmıştır. Belirtilen bu araştırmaların sonuçları bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlardan farklılık göstermektedir.

Bunların yanı sıra, çalışmamızın sonucuyla farklılık gösteren bazı çalışmalar mevcuttur.

Hong ve ark. (2011), demir oksitin farklı fonksiyonel gruplarının sıçan L-929 fibroblast hattında sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olup olmadığını comet testi ile araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda demir oksit ile muamele edilen gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında demir oksitin genotoksik olduğu saptanmıştır. Könczol ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada demir oksit'in insan akciğer epitel hücrelerinde genotoksik etkisi komet testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre demir oksit reaktif oksijen üretimini daha da arttırdığı, DNA hasarının yükseldiği ve demir oksidin genotoksik olduğu belirlenmiştir. Sayed ve ark. 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada sunset sarısının insan somatik ve üreme hücreleri üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır ve bu çalışmanın sonucunda sunset sarısının somatik hücrelerde KKD'yi uyardığı ve genotoksik olduğu saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada gıda renklendirici olarak kullanılan sunset boyasının genotoksik etkisi *Brassica campestris* bitkisinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sunset boyası mitotik indeksin düşmesine sebep olmuştur. Ayrıca sunset boya ile muamele edilen gruplarda kromozom anormalliğinin kontrole göre arttığı saptanmıştır (Dwivedi ve Kumar, 2015). Başka bir çalışmada orange-red boyasının genotoksisitesi KA yöntemi ile *Allium cepa* bitkisinde araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre orange-red boyasının genotoksik olduğu saptanmıştır (Tripathy ve Rao, 2015). Kaur ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada sky blue ve orange red boyalarının genotoksisitesi ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA100 suşu üzerinde ve kromozom aberasyonu yöntemi ile *Allium cepa* bitkisi üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bu gıda renklendiricilerin nokta mutasyonuna sebep olmadığı ama kromozom aberasyonunu indükledikleri ortaya çıkmıştır. Agarwala ve ark. (1994), aspir sarısı ve kokum kırmızısı Swiss albino erkek farelerinde

klastojenik etkilerinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan KA testine göre soz konusu maddenin az da olsa klastojenik olduğu ortaya çıkmıştır.

Yukarıdaki gıda renklendiricileri ile yapılan çalışmaların sonuçları toplu olarak değerlendirilecek olursa bazı renklendiricilerin genotoksik oldukları ve bazıların genotoksik olmadıklarına dair bilgiler vardır. Yapılan bu çalışmalardaki sonuçların farklılık göstermesi test edilen gıda boyalarının her birinde yapısal farklılıkların bulunmasıdır.

In vivo olarak yapılan bu çalışmada 4-MEI, KA'yı uyarmıştır. Çeşitli gıda renklendiricisiyle yapılan çalışmaların sonuçlarıyla bizim elde ettiğimiz sonuçlar aynı yöndeler. Ancak bazı renklendiricilerin ise KA'yı uyarmadığı daha önce de belirttiğimiz gibi mevcuttur. Bu araştırmalar göz önünde bulundurulacak olursa gıda renklendiricilerin piyasaya sunulmadan önce mutlaka genotoksik risk taşıyıp taşımadıklarının araştırılmasının gerektiğini söyleyebiliriz.

4.2.1.2. 4-MEI'nın Antigenotoksik Etkisinin *İn Vivo* Kromozom Aberasyonu (KA) Yöntemi ile Belirlenmesi

EMS ve 4-MEI'nın karışım halinde verildiği farelerin kemik iliğinden elde edilen kromozom incelemelerin sonucunda 12 saatlik muamele süresinde 160 mg/kg ve 24 saatlik muamele süresinde 100 mg/kg konsantrasyonların dışında tüm konsantrasyon ve muamelelerde kromozom aberasyonun kontrole nazaran arttığı saptanmıştır. EMS'nin kromozom aberasyonunu uyarıcı etkisi üzerinde 4MEI'nin antogonotoksik veya sinerjitik etki göstermediği saptanmıştır. Ancak 24 saatlik muamelede en yüksek konsantrasyonda 4MEI'un EMS'nin etkisinde önemli olmayan bir artışa neden olduğu saptanmıştır.

Bianchi-Santamarıa ve ark. (1993), yapmış oldukları çalışmada bitki ekstraklarından elde edilen beta karotenin ve kantaksantinin *Salmonella typhimurium* TA102 suşlarının oksidatif mutajenleri olan 8-metoksiporalen ve benzo(a)pirene karşı antimutajenik etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda Beta karotenin ve kantaksantinin antimutajenik olmadığı saptanmıştır. Offord ve ark.

(2002), beta karoten ve likopen'in UV ışığına maruz kalan insanların fibroblastlarında oksijen radikallerinin oluşumuna karşı koruyucu olup olmadığını araştırmışlardır. Beta karoten ve likopen kullanıldığı zaman UV-A ile indüklenen MMP (metal proteinaz) mRNA'sı yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre beta karotenin koruyucu etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Charoensin ve ark. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada *Cleistocalyx Nervosum* bitkisinden elde edilen orange-red boyasının antiklastojenk etkisi mikronukleus testi ile araştırılmıştır ve bu çalışmanın sonucunda bu boyanın antigenotoksik etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu araştırmalarda elde edilen sonuçların bizim çalışmadan elde edilen sonuçları destekler yöndedir.

Bazı renk maddelerinin de antigenotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır. Gasiorowski ve ark. (1997) *Aronia melanocarpa'*dan izole edilen antosiyaninlerin benzo (a)pyrene ve 2-amino fluorene karşı antimutejenik etkisini Ames testi ve *in vitro* insan lenfositlerinde KKD testi ile araştırmışlardır ve bu maddenin antimutagenik olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Agner ve ark. (2004)' da Annattonun antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada N-nitrosodiethylamine (DEN) (200 mg/kg vücut ağırlığı) Wistar albino sıçanların karaciğerlerinde DNA hasarına neden olduğunu komet testi ile belirlemişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda annattonun antigenotoksik olduğu saptanmıştır. Antunes ve ark. (2005) çalışmalarında içerisinde Annatto maddesi içeren *Bixa orellana L.* ekstraktının insan lenfositlerinde klastojenik ve cisplatinin klastojenik etkisine karşı antiklastojenik etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Bu araştırmanın sonucunda annato boyasının antigenotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise Dos Santos ve ark. (2012), içerisinde annatto maddesi olan *Bixa orella L*. eksraktının cisplatine karşı antigenotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak annatto ekstraktının antigenotoksik etkisini saptamışlardır. Shukla ve ark. (2002)'nın yaptıkları bir araştırmada zerdeçal (Curcumin)'ın Cyclophosphamide'e karşı antigenotoksik etkisini sıçanlarda araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar curcumin'in antigenotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. Ragunathan ve Panneerselvam (2007), kurkumin (Zerdeçal)'in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde

sodyum azidin (SA) neden olduğu kromozom aberasyonlarına karşı antimutajenik etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu araştırma sonucunda kurkuminin antimutajenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Yurtçu ve ark (2012), beta karoten'in insan lenfositlerinde antigenotoksik etkisini komet testi ile araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda beta karoten'in antigenotoksik olduğu saptanmıştır.

Yukarıdaki gıda renklendiricileri ile yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde bazı renklendiricilerin antigenotoksik etkiye sahip oldukları ve bazıların antigenotoksik olmadıkları görülmektedir. Yapılan bu araştırmalardaki sonuçların farklılık gösterme nedeni test edilen gıda renklendiricilerin her birinde yapısal farklılıkların bulunmasıdır.

Ayrıca bu çalışmanın test maddesi olan 4MEI karamelizasyon esnasında meydana gelen ve karamelllerin içerisinde bulunan maddedir. Bu nedenle karamellerin de antigenotoksik bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Halbuki antigenotoksik etkisi olan renk maddeleri ise bitkilerin metabolizması sonucu meydana gelmektedir.

4.2.2. 4-MEI'nın Sitotoksik Etkisinin Tartışılması

Bu çalışma 4-MEI'nin fare kemik iliği hücrelerinde sitotoksik etkisinin araştırılması ile ilgili ilk çalışmadır. Yapılan bu araştırmada 4-MEI 12 ve 24 saatlik muamelelerde tüm konsantrasyonlarda fare kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksin kontrola nazaran düşüşüne sebep olmuştur. Fakat 4-MEI ile 12 saat muamele edilen kültürlerde sadece 160 mg/kg kontrasyonunda, 24 saatlik muamelede ise tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksin düştüğü istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Farklı renklendiriciler ile yapılan sitotoksisite çalışmalarını değerlendiğimizde farklı sonuçların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Örneğin Wise ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada gümüş nanopartiküllerin balık hücrelerinde sitotoksik olduğunu saptanmışlardır. Ying ve Hwang. (2010) demir oksit'in *in vitro* olarak insan lenfositlerinde sitotoksik etkisini araştırmışlar ve demir oksit'in hücrelerin

bölünmesini inhibe ettiğini açıklamışlardır. Yapılan başka bir çalışmada Gomes ve ark. (2013) sunset sarısı, bordo kırmızısı ve tartrazin sarısının *Allium cepa* L. kök meristematik hücrelerinde 24 ve 48 saatlik muamelede boyaların mitotik indeksi düşürerek sitotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır. Abdullaev ve ark. (2003)'nın yaptıkları bir çalışmada safranın sitotoksik etkisinin olup olmadığını HeLa hücrelerinde araştırmışlardır ve sonuçta safranın bu hücreleri inhibe ettiği bu araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada Shi ve ark. (2006) kurkumin'in insan over kanser hücreleri üzerinde antiproliferasyon ve apoptozis etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışma sonucuna göre kurkuminin hücre büyümesini engelleyerek ve apoptozisi harekete geçirerek kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellemekte ve apoptozisi uyarmaktadır.

Yapılan bu araştırmaların sonuçları bizim çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Bazı gıda renklendiriciler ile yapılan araştırmalardan alınan sonuçları incelediğimizde bu renklendiricilerin sitotoksik etkiye sahip olmadıkları ile ilgili bilgiler vardır. Örneğin; Ortega ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada titanyumun sitotoksik etkisini fare lenfoma hücrelerinde araştırmışlardır. Bu araştırmada titanyum'un sitotoksik olmadığı ortaya çıkmıştır. Dos Santos ve ark. (2012), annato içeren *Bixa orella L*. eksraktının PC12 hücrelerinde sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak *Bixa orella L.* eksraktının sitotoksik olmadığı ortaya çıkmıştır.

Yapılan bu çalışmada 4-MEI'nın EMS'ye karşı mitoz bölünme üzerindeki etkisi mitotik indeks (MI)'in saptanmasıyla belirlenmiştir. Bu araştırmada 240 mg/kg EMS üç farklı konsantrasyonda (100, 130 ve 160 mg/kg) 4-MEI ile karıştırılmıştır ve 12 ve 24 saat muamelelerde farelere intraperitonal yolla verilmiştir. EMS ve 4-MEI karışımın etkisi ile tek başına verilen EMS'nin etkisini karşılaştırdığımzda karışım halinde verilen 4-MEI'ye ait mitotik indekste bir artış gözükmemiştir. Gıda renklendiriciler ile yapılan başka çalışmaları incelediğimizde bazı renklendiricilerin antisitotoksik olduğu ve bazıların ise antisitotoksik etkiye sahip olmadıkları saptanmıştır. Shukla ve ark. (2002)'nın yaptıkları bir araştırmada zerdeçal (Curcumin)'ın Cyclophosphamide'e karşı antisitotoksik etkisini sıçanlarda

araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar curcumin'in antisitotoksik etkisinin olmadığını ortaya çıkarmıştır.

Bizim ve diğer araştırmacıların sonuçlarını toplu olarak değerlendirecek olursak, bazı gıda renklendiricilerin gerek normal hücrelerde gerekse tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterdikleri, hücre bölünmesini baskı altına aldıkları ve apoptozise neden oldukları görülmektedir.

4.2.3. 4MEI'un Kanserojenik ve Antikanserojenik Etkilerinin Tartışılması

Kolon kanseri ve adenomların ortaya çıkma nedenleri incelendiğinde bu kanserlerde en çok K-ras geninin aktivitesinin yükselmesi ve onkogene dönşdüğü saptanmıştır (Kumar ve ark. 2005). K-ras geninin ürünü olan protein, ekstrasellüler mitojenik sinyallarin iletiminde rol alan ve GTP bağlayabilen bir hücre zarı proteinidir. Yapılan çalışmalarda K-ras mutasyonunun insan kanserlerinde sık görüldüğü belirlenmiştir. Mutasyonlar Ras protoonkogeninin onkogene dönüşmesine neden olur ve böylece hücrenin kanserleşmesinin yolu açılır (Karapetis ve ark. 2008).

β-catenin, hücreler arası bağlantılardaki e-kaderin kompleksinin yapısal bir bileşenidir. Kaderin hücre adhezyon molekülünün sitoplazmik alanına bağlanarak hücre-hücre adhezyonunda görev alan bir polipeptittir (Gumbiner 1997; Nelson ve Nusse, 2004; Willert ve Jones, 2006). β-catenin geninin ekspresyon seviyesinin yükselmesi ve mutasyonu, karaciğer kanseri, kolorektal kanseri, akciğer kanseri ve meme kanseri gibi kanserlerin ortaya çıkmasına neden olur (Morin ve ark. 1997).

Bu araştırmada DMH verilen sıçanlarda β-catenin ve K-ras genlerinin ekspresyonu önemli derecede artmıştır. Bu da moleküler seviyede kanserin uyarıldığını göstermektedir. DMH ve 4-MEI ile muamele edilen gruplardan elde edilen sonuçları incelediğimizde 4-MEI, DMH'dan hem 1 hafta önceden verildiğinde ve hem bir hafta sonradan verildiğinde DMH'nin etkisini β-catenin genin ekspresyon seviyesini azaltarak düşürmüştür, yalnız bu düşüş istatistik olarak önemli bulunmamıştır. K-ras geninin ekspresyon seviyesini incelediğimizde 4-MEI'nın hem bir hafta önceden verildiğinde ve hemde bir hafta sonradan verildiğinde DMH'nin

etkisini K-ras geninin ekspresyon seviyesini azaltarak düşürmüştür yalnız bu düşüş sadece C grubunda istatistik olarak önemli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın antikanser etkiye sahip olabilirliğini göstermektedir zira elde edilen değerleri DMH grup ile karşılaştırdığımızda beta catenin ve K-ras genlerin ekspresyon seviyelerinin düştüğünü görmekteyiz. İstatistik olarak önemli çıkmama nedeni 4-MEI'nın kısa süreli muamelesinden kaynaklanabilir.

İki farklı konsantrasyonda (25 ve 50 mg/kg) verilen 4-MEI her iki konsantrasyonda β-catenin geninin ekspresyonunu artırmamıştır. İki farklı konsanrasyonda (25 ve 50 mg/kg) 4-MEI ile muamele edilen sıçanların K-ras geninin ekspresyonu incelediğimizde 4-MEI'nın K-ras geninin ekpresyon seviyesinin kontrole göre düşmesine neden olmuştur ve bu düşüş 50 mg/kg konsantrasyonunda da önemli bulunmuştur.

Yapılan bu araştırmada 10 hafta muamele edilen sıçanlara ait kilo artış miktarı incelendiğinde DMH ve 4-MEI ile muamele edilen gruplarda 4-MEI 1 hafta önceden verildiğinde (C Grup) sıçanların kilo kaybını engellemiştir ama DMH'nin bir hafta sonrasından itabaren 4-MEI'nın verilmesi sıçanların kilo kaybını engellememiştir. Bir hafta sonradan 4-MEI verilen grup ile DMH grup arasında önemli fark gözlenmemiştir. İki farklı konsanrasyonda (25 ve 50 mg/kg) tek başına muamele edilen 4-MEI gruplarına ait sıçanların ağırlık miktarı incelendiğinde her iki konsantrasyonda sıçanların ağırlıkları kontrole göre azaltmıştır ve bu azalma istatistik bakımındn her iki konsantrasyonda önemli bulunmuştur.

Bu güne kadar farklı renklendiriciler ile yapılan bazı kanserojenite ve antikanserojenite çalışmalar vardır.

Maekawa ve ark. (1982) amonyaklı karamelin F344 sıçanlarında kanserojenitesini araştırmışlar ve bu maddenin kanserojenik olmadığını belirlemişlerdir. Hagiwara ve ark. (1983) karamellerin fareler üzerinde kanserojenik etki göstermediğini saptamışlardır. Bunların yanı sıra gıda renklendiriciler ile yapılan antikanserojenite çalışmalarıda bulunmaktadır. Örneğin:

Agner ve ark. (2004), annattonun kanserojenik etkiyi azaltıp azalmadığını araştırmışlardır. Bu araştırma sıçan karaciğer dokularında medium-term testi ile yapılmıştır . Çalışma için 20, 200, 1000 ppm dozlarını kullanmış ve en yüksek

konsantrasyonda annattonun antikanserojenik olduğu ve herhangi bir kanserojenik etkiye sahip olmadığı ortaya çıkmıştır. Agner ve ark. (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada annatto boyasının antikanserojenik etkisi sıçan kolon kanserinde araştırılmıştır. Bu çalışmadan alınan sonuçlar annatto'nun antikanserojenik etkisinin olduğunu saptamıştır. Shi ve ark. (2006) kurkumin'in insan over kanser hücrelerinde antiproliferasyon ve apoptozis etkisini araştırmışlardır ve sonuç olarak kurkumin'in kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptozisi uyardığı belirlenmiştir. Kunnumakkara ve ark. (2008), kurkumin'in antikanserojenik etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu araştırmanın sonucunda cox-$_2$ ve β-catenin genlerin ekspresyonlarının kurkumin tarafından inhibe edildiği açıklanmıştır. Bar–Sela ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada kurkuminin antikanser ajanı olabilirliğini pankreas kanseri hastalarında araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda kurkuminin pankreas kanseri hastalarının tedavisinde antikanser ilacı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Amin ve ark. (2011), yaptıkları bir araştırmada diethylnitrosamin (DEN) ile oluşturulan karaciğer kanserli sıçanlarda safran'ın antikanser etkisinin olup olmadığını çalışmışlardır. Bu araştırmada DEN'in verilmesinin iki hafta öncesinden 150 ve 300 mg/kg olacak şekilde sıçanlara her gün oral yol ile safran verilmiştir ve sıçanlar 22 hafta sonra öldürülmüştür ve sıçanların karaciğer dokuları incelenmiştir. Bu araştırma sonucunda safran ile muamele olan sıçanların karaciğerlerinde tümörlerin küçüldüğü ve sayısının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca Tunel testi sonuçlarına görede safran, sıçanlar karaciğer hücrelerinde apoptoza yol açtığı belirlenmiştir. Abdel-Rahman ve ark. (2013)'nın yaptıkları bir çalışmada N-methylnitrosourea' ile oluşturulmuş kolon kanserine karşı kurkumin'in antikanserojenik etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu araştırmada β-catenin ve K-ras genlerinin ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile ve Cox_2 proteinin ekspresyonu immunohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre kurkumin'in her üç gen ve proteinin ekspresyonlarını düşürmüş ve bu sonuçlardan da kurkuminin antikanser etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Pierpaoli ve ark. (2013), gıda renklendiricisi olarak kullanılan annato'nun antikanser etkisini HER-2/neu transjenik farelerde Real Time PCR ve Western Blot analizleri ile araştırmışlardır. Yapılan bu araştırmanın sonucunda HER-2/neu ve P185 genleri ve

bu genlere ait proteinlerin ekspresyon seviyelerinin düştüğü ve böylece annatto'nun antikanser etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bathaie ve ark. (2013), Krosetin renk maddesinin antikanserojenik etkisini insan mide kanseri ve modellenmiş mide kanserli sıçanlar üzerinde MTT tekniği ile araştırmışlardır ve bu araştırmanın sonucunda Krosetin'in antiproliferatif etkiye sahip olduğu açıklanmıştır. Ayrıca aynı araştırmacılar RT-PCR yöntemi ile Krosetin'in Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini yine insan mide kanseri ve modellenmiş mide kanserli sıçanlar üzerinde araştırmışlardır ve bu çalışmanın sonucunda Krosetin'in Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve apoptotik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Qiu ve ark. (2013)'nın yaptıkları *in vitro* bir çalışmada gıda renklendiricisi olarak kullanılan likopen'in antikanserojenik etkisi prostat kanseri hücre hattında araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada mass spectrometry analizi ile apoptoz yolağındaki proteinler incelenmiştir ve sonuçta likopenin antikanser etkisinin olduğu saptanmıştır. Festuccia ve ark. (2014), safran'ın antikanser etkisini *in vitro* olarak prostat kanseri hücrelerinde araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar β-catenin geninin safran tarafında ekspresyon seviyesinin düşürüldüğü ve böylece antikanser özelliğe sahip olduğunu göstermiştir.

4.2.4. 4-MEI'nın Antibakteriyel Etkisine Ait Tartışma

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar 4-MEI'nın tüm konsantrasyonlarda antibakteriyel etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca bu etki konsantrasyona bağlı olarak da artmıştır. Farklı gıda renklendiriciler ile yapılan çalışmaları incelediğimizde bu renklendiricilerin bazılarının bakteri üremesini inhibe ettiğini görmekteyiz.

Galindo ve ark. (2003)'nın yaptıkları bir çalışmada gıda renklendiricisi olarak kullanılan annato boyasının antimikrobiyal etkisini *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus casei, Lactococcus lactis* ve *Paenibacillus polymyxa* bakterilerinde araştımışlardır ve sonuçta annato' nun tüm bakterilerde antimikrobiyal etkisinin olduğunu saptamışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada 8 farklı bitkiye (*Acacia catechu L., Bixa orellana L, Cassia auriculata L., Embillica officinalis Gaertn, Punica granatum L., Rubia tinctorum L, Tagetes erecta L., ve Terminalia chebula*) ait boya ekstrakt edilmiştir ve bu bitkilerden ekstrakt edilen boyanın antibakteriyel etkileri farklı bakterilerde (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Vibrio fischeri, Yersinia enterocolitica, Proteus vulgaris, Lactobacillus sp., Lactococcus sp., Pediococcus pantosaceus, Staphylococcus sp., Pseudomonas sp*.) araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçları incelediğimizde kırmızı renkli boyaların sarı renkli boyalara nazaran daha iyi antibakteryal etkilerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca catechu (*Acacia catechu*) ve myrobalan (*Terminalia chebula*) bitkilerinden ekstrakte edilen boyaların antibakteriyel etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir (Ramamoorthy ve ark., 2011).

Dlim ve ark. (2013), *Beta vulgaris* (pancar) bitkisinden elde edilen ve gıda renklendirici olarak kullanınan boyanın antimikrobiyal etkisini *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* üzerinde denemişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda bu boyanın *Staphylococcus aureus* suşu üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu ama *E.coli* 'de etkisiz olduğu açıklanmıştır. Pancar bitkisinden elde edilen ekstraktın gram pozitif bakteri zarının geçirgenliğini artırmasıyla hücrenin şişmesine neden olduğu ve bakterinin ölümüne yol açtığı bu araştırmacılar tarafından açıklanmıştır.

Gul ve Bakht (2015) tarafından yapılan bir çalışmada metanol ile elde edilen turmeric ekstraktının (zerdeçal bitkisi) antimikrobiyal ve antifungal etkisi *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* ve *Candida albicans* suşlarında araştırılmıştır ve bu araştırmanın sonucunda turmeric'in antimikrobiyal ve antifungal etkisinin olduğu açıklanmıştır. Yolmeh ve ark. (2014)' nın yaptıkları bir çalışmada annatto boyasının antibakteriyel etkisi 8 farklı bakteri suşunda (*E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecalis, Salmonella enteritidis, Listeria innocua*) araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar annatto boyasının antibakteriyel etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmanın sonucuna göre gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere nazaran daha hassas oldukları saptanmıştır.

4-MEI ve antibakteriyel etki gösteren farklı renklendiricilerin kimyasal yapısını incelediğimizde imidazol halkası içeren renklendiricilerin antibakteriyel ve

antifungal etkilerinin olduğunu görmekteyiz. Cetokenazole, metronidazole ve miconazole gibi imidazol halkası içeren ilaçlar antifungal ve antibiyotik olarak kullanılmaktadır (Castano ve ark., 2008).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gıda renklendiricileri, hazır gıdaların tüketimi ile insanların sağlığı için tehlikeli veya yararlı olabilir. 4-MEI sık olarak kola ve farklı yiyeceklerde kullanılmaktadır. Bununla birlikte 4-MEI ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmadan alınan sonuçlar 4-MEI'nın genotoksik etkiye sahip olduğu, antigenotoksik özelliğe sahip olmadığı, kanser ve normal hücrelerde sitotoksik etkisinin olduğunu, beta catenin ve K-ras genleri ve bu genlere ait proteinlerin ekspresyon seviyesini düşürdüğü ve antibakteriyel etki gösterdiği ortaya çıkmıştır.

4-MEI'nun normal hücrelerde risk oluşturabilmesiyle birlikte kanserleşmiş hücrelerde önleyici etki gösterebilirliği bu araştırma ile ortaya çıkmıştır. 4-MEI'nın gerçekten antikanser etkisinin olup olmadığını ortaya konmak için daha uzun süreli çalışmalar yapılmalıdır, bu maddenin etkisi farklı kanserlerde ve farklı genler üzerinde denenmelidir ve aynı zamanda gen mutasyon testleri yapılmalıdır. Bu çalışmada 4-MEI beta catenin ve K-ras genlerin ekspresyon seviyesini düşürmüştür. Bu DNA tamir mekanizmasında rol oynayan enzimlerin aktifleşmesinden dolayı olmuş olabilir. Gelecekte böyle bir çalışmanın yapılması önerilir.

KAYNAKLAR

ABDEL-RAHMAN, M., AHMED, H. H., SALEM, F. E. H., SHALBY, A. B., and LOKMAN, M. S., 2013. Curcuma longa and Colon Cancer: Evidence and Mechanisms. World Journal of Medical Sciences, 8(3): 279-295.

ABDULLAEV, F. I., RIVERON-NEGRETE, L., CABALLERO-ORTEGA, H., MANUEL HERNANDEZ, J., PEREZ-LOPEZ, I., PEREDA-MIRANDA, R., and ESPINOSA-AGUIRRE, J. J., 2003. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (Crocus sativus L.). Toxicol In Vitro, 17(5-6): 731-736.

AGARWAL, K., MUKHERJEE, A., and CHAKRABARTI, J., 1994. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to natural food colourings. Food Chem Toxicol, 32(9): 837-838.

AGNER, A. R., BARBISAN, L. F., SCOLASTICI, C., and SALVADORI, D. M., 2004. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. Food Chem Toxicol, 42(10): 1687-1693.

AKAN, M., 2006. Staphylococcus infeksiyonları. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar): 5-13.

ALIJA, A. J., BRESGEN, N., SOMMERBURG, O., SIEMS, W., and ECKL, P. M., 2004. Cytotoxic and genotoxic effects of beta-carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. Carcinogenesis, 25(5): 827-831.

ALLAMEH, A., DADKHAH, A., RAHBARIZADEH, F., ASHRAFI-HELAN, J., and FATEMI, F., 2013. Effect of dietary caraway essential oils on expression of beta-catenin during 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinogenesis. J Nat Med, 67(4): 690-697.

AMIN, A., HAMZA, A. A., BAJBOUJ, K., ASHRAF, S. S., and DAOUD, S., 2011. Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. Hepatology, 54(3): 857-867.

ANTUNES, L. M., PASCOAL, L. M., BIANCHI MDE, L., and DIAS, F. L., 2005. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. Mutat Res, 585(1-2): 113-119.

AY, M. E., TERZIOGLU, O., TERZI, C., and İZCI AY, O., 2006. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi*. Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 5(1).

BAR-SELA, G., EPELBAUM, R., and SCHAFFER, M., 2010. Curcumin as an anti-cancer agent: review of the gap between basic and clinical applications. Current medicinal chemistry, 17(3): 190-197.

BATHAIE, S. Z., HOSHYAR, R., MIRI, H., and SADEGHIZADEH, M., 2013. Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. Biochemistry and Cell Biology, 91(6): 397-403.

BETTICHER, D. C., HEIGHWAY, J., HASLETON, P. S., ALTERMATT, H. J., RYDER, W. D., CERNY, T., and THATCHER, N., 1996. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. Br J Cancer, 73(3): 294-300.

BIANCHI-SANTAMARIA, A., TATEO, F., and SANTAMARIA, L. (1993). Antimutagenic action of beta carotene, canthaxanthin and extracts of Rosmarinus officinalis and Melissa officinalis. Genotoxicity of basil and tarragon oil. In, (pp. 75-81). Cambridge: Royal Society of Chemistry (RSC).

BILGEHAN, H., 1992. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 1. Baskı. Barış Yayınları Fakülteler kitabevi, İstanbul: 484-485, 385-386, 423-426, 390.

BISSONNETTE, M., KHARE, S., VON LINTIG, F. C., WALI, R. K., NGUYEN, L., ZHANG, Y., HART, J., SKAROSI, S., VARKI, N., BOSS, G. R., and BRASITUS, T. A., 2000. Mutational and nonmutational activation of p21ras in rat colonic azoxymethane-induced tumors: effects on mitogen-activated protein kinase, cyclooxygenase-2, and cyclin D1. Cancer Res, 60(16): 4602-4609.

BOĞA, A., and BINOKAY, S., 2010. Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımıza Etkileri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 19(3).

BRUSICK, D. J., JAGANNATH, D. R., GALLOWAY, S. M., and NESTMANN, E. R., 1992. Genotoxicity hazard assessment of Caramel Colours III and IV. Food Chem Toxicol, 30(5): 403-410.

CAO, J., LIU, Y., JIA, L., JIANG, L. P., GENG, C. Y., YAO, X. F., KONG, Y., JIANG, B. N., and ZHONG, L. F., 2008. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. J Agric Food Chem, 56(24): 12059-12063.

CASTANO, T., ENCINAS, A., PEREZ, C., CASTRO, A., CAMPILLO, N. E., and GIL, C., 2008. Design, synthesis, and evaluation of potential inhibitors of nitric oxide synthase. Bioorg Med Chem, 16(11): 6193-6206.

CHAN, P., MAHLER, J., TRAVLOS, G., NYSKA, A., and WENK, M., 2006. Induction of thyroid lesions in 14-week toxicity studies of 2 and 4-methylimidazole in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. Arch Toxicol, 80(3): 169-180.

CHAPIN, K. C., and LAUDERDALE, T.-L., 2007. Reagents, stains, and media: bacteriology. Manual of Clinical Microbiology. 2007 Apr: 334-364.

CHAROENSIN, S., TAYA, S., WONGPORNCHAI, S., and WONGPOOMCHAI, R., 2012. Assessment of genotoxicity and antigenotoxicity of an aqueous extract of Cleistocalyx nervosum var. paniala in in vitro and in vivo models. Interdiscip Toxicol, 5(4): 201-206.

CHENG, J. Z., YU, D., ZHANG, H., JIN, C. S., LIU, Y., ZHAO, X., QI, X. M., and LIU, X. B., 2014. Inhibitive effect of IL-24 gene on CD133(+) laryngeal cancer cells. Asian Pac J Trop Med, 7(11): 867-872.

CURNHA, S.C., FERNANDES, J.O., ALVES, A., OLİVEİRA, M.B.P.P., 2009. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. Journal of Chromatography A 1216,119–126.

ÇELİK, R., TOPKTAŞ, M., 2013. *In vıtro* genotoxıc effects of 4-methylımıdazol on human perıpheral lymphocytes. Çukurova Unıversty Instıtute Of Naturel And Applıed Scıences Department Of Bıology.

DAS, A., MUKHERJEE, A., and CHAKRABARTI, J., 2004. Sanguinarine: an evaluation of in vivo cytogenetic activity. Mutat Res, 563(1): 81-87.

DEEPTHA, K., KAMALEESWARI, M., SENGOTTUVELAN, M., and NALINI, N., 2006. Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. Invest New Drugs, 24(6): 479-488.

DLIM, M. M., ALSABRI, S. G., MOHAMED, S. S., ZETRINI, A. E., SALEM, A. A. H., AUZI, A. A., and MOHAMED, S. B., 2013. Use of Beta vulgaris as natural coloring agent for foods and cosmetics in Libya. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research, 5(11).

DORANTES, L., COLMENERO, R., HERNANDEZ, H., MOTA, L., JARAMILLO, M. E., FERNANDEZ, E., and SOLANO, C., 2000. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by Capsicum annum extracts. International Journal of Food Microbiology, 57(1): 125-128.

DOS SANTOS, G. C., MENDONCA, L. M., ANTONUCCI, G. A., DOS SANTOS, A. C., ANTUNES, L. M., and BIANCHI MDE, L., 2012. Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. Food Chem Toxicol, 50(2): 335-340.

DWIVEDI, K., and KUMAR, G., 2015. Genetic Damage Induced by a Food Coloring Dye (Sunset Yellow) on Meristematic Cells of Brassica

EL-SERAG, H. B., and RUDOLPH, K. L., 2007. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology, 132(7): 2557-2576.

ERDMAN, S. H., WU, H. D., HIXSON, L. J., AHNEN, D. J., and GERNER, E. W., 1997. Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine-treated rats. Mol Carcinog, 19(2): 137-144.

FEMIA, A. P., LUCERI, C., TOTI, S., GIANNINI, A., DOLARA, P., and CADERNI, G., 2010. Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. BMC Cancer, 10: 194.

FESTUCCIA, C., MANCINI, A., GRAVINA, G. L., SCARSELLA, L., LLORENS, S., ALONSO, G. L., TATONE, C., DI CESARE, E., JANNINI, E. A., LENZI, A., D'ALESSANDRO, A. M., and CARMONA, M., 2014. Antitumor effects of saffron-derived carotenoids in prostate

FONG, K. M., SEKIDO, Y., and MINNA, J. D., 1999. Molecular pathogenesis of lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg, 118(6): 1136-1152.

FRIDAY, B. B., and ADJEI, A. A., 2005. K-ras as a target for cancer therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1756(2): 127-144.

FRITZE, D., and PUKALL, R., 2001. Reclassification of bioindicator strains Bacillus subtilis DSM 675 and Bacillus subtilis DSM 2277 as Bacillus atrophaeus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 35-37.

GALINDO, B. E., VACQUIER, V. D., and SWANSON, W. J., 2003. Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(8): 4639-4643.

GASIOROWSKI, K., SZYBA, K., BROKOS, B., KOLACZYNSKA, B., JANKOWIAK-WLODARCZYK, M., and OSZMIANSKI, J., 1997. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits. Cancer Lett, 119(1): 37-46.

GAUNT, I. F., LLOYD, A. G., GRASSO, P., GANGOLLI, S. D., and BUTTERWORTH, K. R., 1977. Short-term study in the rat on two caramels produced by variations of the "ammonia process". Food Cosmet Toxicol, 15(6): 509-521.

GIBBS, J. B., SIGAL, I. S., POE, M., and SCOLNICK, E. M., 1984. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. Proc Natl Acad Sci U S A, 81(18): 5704-5708.

GOMES, K. M. S., OLIVEIRA, M. V. G. A. D., CARVALHO, F. R. D. S., MENEZES, C. C., and PERON, A. P., 2013. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on

Allium cepa L. root meristematic cells. Food Science and Technology (Campinas), 33: 218-223.

GUL, P., and BAKHT, J., 2015. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. J Food Sci Technol, 52(4): 2272-2279.

GUMBINER, B. M., 1997. Carcinogenesis: a balance between β-catenin and APC. Current Biology, 7(7): R443-R446.

HABAS, R., and DAWID, I. B., 2005. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? J Biol, 4(1): 2.

HAGIWARA, A., SHIBATA, M., KURATA, Y., SEKI, K., FUKUSHIMA, S., and ITO, N., 1983. Long-term toxicity and carcinogenicity test of ammonia-process caramel colouring given to B6C3F1 mice in the drinking-water. Food Chem Toxicol, 21(6): 701-706.

HASTÜRK, S., 2000. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi. Akciger Kanseri. İstanbul: Özlem Grafik Matbacılık: 1-27.

HONG, S. C., LEE, J. H., LEE, J., KIM, H. Y., PARK, J. Y., CHO, J., LEE, J., and HAN, D. W., 2011. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. Int J Nanomedicine, 6: 3219-3231.

JACKSON, P. E., O'CONNOR, P. J., COOPER, D. P., MARGISON, G. P., and POVEY, A. C., 2003. Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. Carcinogenesis, 24(3): 527-533.

JACOBSON, M., 2011. Petition to bar the use of caramel colorings produced with ammonia and containing the carcinogens 2-methylimidazole and 4-methylimidazole. Center for Science in the Public Interest.

JANSSEN, A. M., SCHEFFER, J. J., and BAERHEIM SVENDSEN, A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med, 53(5): 395-398.

JOHNSTON, W. H., KARCHESY, J. J., CONSTANTINE, G. H., and CRAIG, A. M., 2001. Antimicrobial activity of some Pacific Northwest woods against anaerobic bacteria and yeast. Phytotherapy Research, 15(7):

KARAPETIS, C. S., KHAMBATA-FORD, S., JONKER, D. J., O'CALLAGHAN, C. J., TU, D., TEBBUTT, N. C., SIMES, R. J., CHALCHAL, H., SHAPIRO, J. D., ROBITAILLE, S., PRICE, T. J., SHEPHERD, L., AU, H. J., LANGER, C., MOORE, M. J., and ZALCBERG, J. R., 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 359(17): 1757-1765.

KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F. J., and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. Environ Mol Mutagen, 18(1): 28-34.

KAUR, M., ARORA, S., NAGPAL, A., and KATNORIA, J. K., 2014. Clastogenic effects of synthetic food dyes using Salmonella typhimurium and Allium cepa test systems. Indian Journal of Biotechnology, 13(4): 547-550.

KHAN, N., and SULTANA, S., 2004. Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. Toxicology, 201(1-3): 173-184.

KOLLIGS, F. T., BOMMER, G., and GOKE, B., 2002. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. Digestion, 66(3): 131-144.

KONCZOL, M., EBELING, S., GOLDENBERG, E., TREUDE, F., GMINSKI, R., GIERE, R., GROBETY, B., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., MERFORT, I., and MERSCH-SUNDERMANN, V., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of ROS, JNK, and NF-kappaB. Chem Res Toxicol, 24(9): 1460-1475.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., and FAUSTO, N., 2005. Neoplasia: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease., 7 ed. Philadelphia. Elsevier Saunders Company: 289-342.

KUNNUMAKKARA, A. B., ANAND, P., and AGGARWAL, B. B., 2008. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett, 269(2): 199-225.

KAUR, M., ARORA, S., NAGPAL, A., KATNORİA, J.,2014. Clastogenic effects of synthetic food dyes using Salmonella typhimurium and Allium cepa test systems.Indian Journal of Biotechnology 13(4):547-550 ·

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the

LEE, S. W., 1996. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. Nat Med, 2(7): 776-782.

LOPRIENO, G., BONCRISTIANI, G., and LOPRIENO, N., 1992. Genotoxicity studies in vitro and in vivo on carminic acid (natural red 4). Food Chem Toxicol, 30(9): 759-764.

LU, Q., JIANG, B., LIN, C., and SHAN, T., 2008. Dark Aberrant Crypt Foci with activated Wnt pathway are related to tumorigenesis in the colon of AOM-treated rat. J Exp Clin Cancer Res, 27: 26.

MACE, M. L., JR., DASKAL, Y., and WRAY, W., 1978. Scanning-electron microscopy of chromosome aberrations. Mutat Res, 52(2): 199-206.

MAEKAWA, A., OGIU, T., ONODERA, H., FURUTA, K., MATSUOKA, C., OHNO, Y., and ODASHIMA, S., 1982. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. Food Chem Toxicol, 20(1): 25-33.

MASSAGUE, J., 2008. TGFbeta in Cancer. Cell, 134(2): 215-230.

MOHANIA, D., KANSAL, V. K., KUMAR, M., NAGPAL, R., YAMASHIRO, Y., and MAROTTA, F., 2013. Modulation of expression of Programmed Death-1 by administration of probiotic Dahi in DMH-induced colorectal carcinogenesis in rats. Acta Biomed, 84(2): 102-109.

MOHANIA, D., KANSAL, V. K., SAGWAL, R., and SHAH, D., 2013. Anticarcinogenic effect of probiotic Dahi and piroxicam on DMH-induced colorectal carcinogenesis in Wistar rats. American Journal of Cancer Therapy and Pharmacology, 1(1): 8-24.

MORIN, P. J., SPARKS, A. B., KORINEK, V., BARKER, N., CLEVERS, H., VOGELSTEIN, B., and KINZLER, K. W., 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or

MURATA, H., KAWANO, S., TSUJI, S., TSUJI, M., SAWAOKA, H., KIMURA, Y., SHIOZAKI, H., and HORI, M., 1999. Cyclooxygenase-2 overexpression

enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. Am J Gastroenterol, 94(2): 451-455.

MUZANDU, K., ISHIZUKA, M., SAKAMOTO, K. Q., SHABAN, Z., EL BOHI, K., KAZUSAKA, A., and FUJITA, S., 2006. Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications.

NAURECKIENE, S., SLEAT, D. E., LACKLAND, H., FENSOM, A., VANIER, M. T., WATTIAUX, R., JADOT, M., and LOBEL, P., 2000. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. Science, 290(5500): 2298-2301.

NELSON, W. J., and NUSSE, R., 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science, 303(5663): 1483-1487.

NISHIE, K., WAISS, A., and KEYL, A., 1969. Toxicity of methylimidazoles. Toxicol Appl Pharmacol, 14(2): 301-307.

NOVAK, J., ZITTERL-EGLSEER, K., DEANS, S. G., and FRANZ, C. M., 2001. Essential oils of different cultivars of Cannabis sativa L. and their antimicrobial activity. Flavour and fragrance journal, 16(4): 259-262.

OFFORD, E. A., GAUTIER, J. C., AVANTI, O., SCALETTA, C., RUNGE, F., KRAMER, K., and APPLEGATE, L. A., 2002. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. Free Radic

OKADA, E., FUJIISHI, Y., NARUMI, K., YASUTAKE, N., and OHYAMA, W., 2013. A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats. Mutat Res, 758(1-2): 87-94.

ORTEGA, A. L., MENA, S., and ESTRELA, J. M., 2010. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. Cancers (Basel), 2(2): 274-304.

OZAKI, A., KITANO, M., ITOH, N., KURODA, K., FURUSAWA, N., MASUDA, T., and YAMAGUCHI, H., 1998. Mutagenicity and DNA-damaging activity of decomposed products of food colours under UV irradiation. Food Chem Toxicol, 36(9-10): 811-817.

PARK, H. S., GOODLAD, R. A., and WRIGHT, N. A., 1997. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. Cancer Res, 57(20): 4507-4510.

PESARINI, J. R., ZANINETTI, P. T., MAURO, M. O., CARREIRA, C. M., DICHI, J. B., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S., and OLIVEIRA, R. J., 2013. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. Genet Mol Res, 12(2): 1646-1659.

PIERPAOLI, E., VIOLA, V., BARUCCA, A., ORLANDO, F., GALLI, F., and PROVINCIALI, M., 2013. Effect of annatto-tocotrienols supplementation on the development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. Carcinogenesis, 34(6): 1352-1360.

PRABHU, P. N., ASHOKKUMAR, P., and SUDHANDIRAN, G., 2009. Antioxidative and antiproliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. Fundam Clin Pharmacol, 23(2): 225-234.

QIU, X., YUAN, Y., VAISHNAV, A., TESSEL, M. A., NONN, L., and VAN BREEMEN, R. B., 2013. Effects of lycopene on protein expression in human primary prostatic epithelial cells. Cancer Prev Res (Phila), 6(5): 419-427.

RABIASZ, G. J., LANGDON, S. P., BARTLETT, J. M., CREW, A. J., MILLER, E. P., SCOTT, W. N., SMYTH, J. F., and MILLER, W. R., 1992. Growth control by epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in human lung squamous carcinoma cells. Br J Cancer, 66(2): 254-259.

RAGUNATHAN, I., and PANNEERSELVAM, N., 2007. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Allium cepa. J Zhejiang Univ Sci B, 8(7): 470-475.

RAMAMOORTHY, S., MEERA, G., LUBAINA M., DIPITA B., RAJANARAYANAN M., 2011. Evaluation of Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Properties of Some Food Dyes. Food Sci. Biotechnol. 20(1): 7-13.

RIJNKELS, J. M., and ALINK, G. M., 1998. Effects of a vegetables-fruit mixture on liver and colonic 1,2-dimethylhydrazine-metabolizing enzyme activities in rats fed low- or high-fat diets. Cancer Lett, 128(2): 171-175.

SAĞLIK Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları Türkiye Kanser İnsidansı, www.kanser.gov.tr.

SANO, H., KAWAHITO, Y., WILDER, R. L., HASHIRAMOTO, A., MUKAI, S., ASAI, K., KIMURA, S., KATO, H., KONDO, M., and HLA, T., 1995. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res, 55(17): 3785-3789.

SAYED, H. M., FOUAD, D., ATAYA, F. S., HASSAN, N. H., and FAHMY, M. A., 2012. The modifying effect of selenium and vitamins A, C, and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. Mutat Res, 744(2): 145-153.

SCHOLTEN, A. N., ALIREDJO, R., CREUTZBERG, C. L., and SMIT, V. T., 2006. Combined E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin expression is a favorable prognostic factor in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Cancer, 16(3): 1379-1385.

SHI, M., CAI, Q., YAO, L., MAO, Y., MING, Y., and OUYANG, G., 2006. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. Cell Biol Int, 30(3): 221-226.

SHIVAPURKAR, N., BELINSKY, S. A., WOLF, D. C., TANG, Z., and ALABASTER, O., 1995. Absence of p53 gene mutations in rat colon carcinomas induced by azoxymethane. Cancer Lett, 96(1): 63-70.

SHIVAPURKAR, N., NIKULA, K. J., TANAKA, T., TANG, Z. C., and ALABASTER, O., 1997. Absence of p53 gene mutations in rat colon carcinomas induced through the synergistic interaction between methylazoxymethanol and X-irradiation. Cancer Lett, 113(1-2): 9-16.

SHUKLA, Y., ARORA, A., and TANEJA, P., 2002. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. Mutat Res, 515(1-2): 197-202.

SOHN, K. J., PUCHYR, M., SALOMON, R. N., GRAEME-COOK, F., FUNG, L., CHOI, S. W., MASON, J. B., MEDLINE, A., and KIM, Y. I., 1999. The effect of dietary folate on Apc and p53 mutations in the dimethylhydrazine rat model of colorectal cancer. Carcinogenesis, 20(12): 2345-2350.

SPARKS, A. B., MORIN, P. J., VOGELSTEIN, B., and KINZLER, K. W., 1998. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. Cancer Res, 58(6): 1130-1134.

TACCHI-BEDFORD, A. M., WHYMAN, G. D., and MCLEAN, A. E., 1988. DNA alkylation by 1,2-dimethylhydrazine in the rat large intestine and liver: influence of diet and enzyme induction. Toxicology, 50(2): 181-191.

TAMM, I., WANG, Y., SAUSVILLE, E., SCUDIERO, D. A., VIGNA, N., OLTERSDORF, T., and REED, J. C., 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res, 58(23): 5315-5320.

TRIPATHY, S., and RAO, D., 2015. Mitotic aberrations induced by orange red (a food additive dye) as a potential genotoxicant on root tip cells of onion (Allium cepa L.). International Food Research Journal, 22(1): 377-386.

TUORMAA, T.E., 1995. The adverse effects of food additives on health: A review of the literatüre with special emphasis on childhood hyperactivity. Journal of Orthomolecular Medicine. 10(4).

TURHAN, H., 2008. Mide kanserli hastalarda periferik kanda telomeraz mRNA ekspresyonunun real time PCR kullanılarak belirlenmesi ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisinin saptanması. Uzmanlık Tezi(Atatürk Üniversitesi, Erzurum).

UZUN, D., 2008. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında HER-2/NEU ve EGFR genlerinin real time PCR yöntemiyle incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi(Osmangazi Üniversitesi, Saðlýk Bilimleri Enstitüsü, Eskiþehir).

WALI, R. K., KHARE, S., TRETIAKOVA, M., COHEN, G., NGUYEN, L., HART, J., WANG, J., WEN, M., RAMASWAMY, A., JOSEPH, L., SITRIN, M., BRASITUS, T., and BISSONNETTE, M., 2002. Ursodeoxycholic acid and F(6)-D(3) inhibit aberrant crypt proliferation in the rat azoxymethane model

of colon cancer: roles of cyclin D1 and E-cadherin. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,

WILLERT, K., and JONES, K. A., 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes & Development, 20(11): 1394-1404.

WILLERT, K., and NUSSE, R., 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev, 8(1): 95-102.

WINAWER, S. J., and , SHERLOCK., P., 2007. Best practice and research clinical gastroenterology. Colorectal cancer screening, 21, 6: 1031.

WISE, J. P., SR., GOODALE, B. C., WISE, S. S., CRAIG, G. A., PONGAN, A. F., WALTER, R. B., THOMPSON, W. D., NG, A. K., ABOUEISSA, A. M., MITANI, H., SPALDING, M. J., and MASON, M. D., 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat Toxicol, 97(1): 34-41.

WONG, M. L., and MEDRANO, J. F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39(1): 75-85.

WU, K., YANG, Q., MU, Y., ZHOU, L., LIU, Y., ZHOU, Q., and HE, B., 2012. Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/beta-catenin signaling. Int J Oncol, 41(1): 292-298.

YILDIRIM, A., MAVI, A., and KARAT, A. A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of Polygonum cognatum Meissn extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(1): 64-69.

YING, E., and HWANG, H. M., 2010. In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. Sci Total Environ, 408(20): 4475-4481.

YOLMEH, M., HABIBI NAJAFI, M. B., FARHOOSH, R., and SALEHI, F., 2014. Modeling of antibacterial activity of annatto dye on Escherichia coli in mayonnaise. Food Bioscience, 8: 8-13.

YU, J. Q., LEI, J. C., YU, H. D., CAI, X., and ZOU, G. L., 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Scutellaria barbata. Phytochemistry, 65(7): 881-884.

YURTCU, E., KASAPOĞLU, E., and ŞAHIN, F. İ., 2012. Protective effects of β-carotene and silymarin on human lymphocytes. Turk J Biol, 36: 47-52.

ZENG, M., KIKUCHI, H., PINO, M. S., and CHUNG, D. C., 2010. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. PLoS One, 5(6): e10966.

http://www.hurriyet.com.tr/ekonomi/20590196.asp, 20 Mayıs (2012)

http://www.gazete5.com/haber/turkiyede-en-fazla-tuketilen-icecek-kola-325162.28 Nisan (2013).

http://www.gidahareketi.org/Dunya-Kansere-1-Trilyon-Turkiye-Ise-3,1-Milyar-Dolar-Harciyor-1231. 2015.

ÖZGEÇMİŞ

09/8/1987 tarihinde Iran, Miyandoab'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Miyandoab'da tamamladı ve sonra 2006 yılında Tonekabon Azad Üniversitesi, Hücrenin Moleküler Biyolojisi Bölümünde okumaya başladı ve 2010 yılında lisans eğtimini bitirip ve aynı yılda Çukurova Üniversitesinde Fen Bilimleri Enstitüsü Biyteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans eğitimini 2012 yılında bitirip ve aynı yılda aynı Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.