ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Tuba DÖRDÜ

ELAJİK ASİT (EA)'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELAJİK ASİT (EA)'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

Tuba DÖRDÜ

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez .../../2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……..	…….	……..……
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU	Prof. Dr. Sadık DİNÇER	Prof. Dr. Hasan Basri İLA
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE
……..	…….	
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ	Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN	
ÜYE	ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2014-3168

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

ELAJİK ASİT (EA)'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

Tuba DÖRDÜ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Yıl: 2018, Sayfa:139
Jüri : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
: Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN

Bu çalışma, doğal fenolik bir bileşik olan elajik asit (EA)'in insan periferal lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkilerini kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA), mikronukleus (MN) ve tek hücre jel elektroforezi (KOMET) testleri ile belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. İnsan periferal lenfositleri 24 ve 48 saat, komet testinde ise 1 saat boyunca 60, 80, ve 100 µg/ml konsantrasyonlardaki EA ile muamele edilmiştir. Ayrıca EMS ve H_2O_2'nin etkisine karşı EA'nın antigenotoksik etkisinin olup olmadığı araştırmak amacıyla hücreler EA ve bilinen klastojen ve mutajen olan EMS veya H_2O_2 karışımı ile muamele edilmiştir.

Bu çalışmada, EA incelenen konsantrasyon ve muamele sürelerinde KKD, KA/Hücre, anormal hücre yüzdesini ve mikronükleus oluşumunu kontrole ve çözücü kontrole oranla istatistiksel olarak uyarmamıştır. Komet testinden elde ettiğimiz sonuçlara göre de EA, nükleusta DNA hasarına sebep olmamıştır. Bu nedenle nükleustan göç eden DNA kırıklarının oluşturduğu nükleusa bağlı kuyruğun uzunluğu, kuyruktaki DNA yoğunluğu ve kuyruk momentinde önemli değişiklik olmamıştır. EA, test edilen muamele süreleri ve konstrasyonlarda proliferasyon indeksini (PI), mitotik indeksi (MI) ve nukleus bölünme indeksini (NBI) kontrole ve eritici kontrole nazaran önemli derecede etkilememiştir. Yani EA'nın genotoksik ve de sitotoksik etkisi yoktur.

EA+EMS uygulamasında incelenen muamele sürelerinde ve konsantrasyonlarda EA, kontrol ve çözücü kontrole oranla EMS kaynaklı artan KKD sayısını, KA/Hücre, anormal hücre yüzdesini ve MN oluşumunu önemli oranda azaltmıştır. EA+EMS uygulamasında EA, EMS kaynaklı azalan MI'yı pozitif kontrole göre 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde 100 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır. Yine EA, EMS kaynaklı azalan PI'yı pozitif kontrole oranla arttırmıştır. EA, EMS kaynaklı azalan NBI'yı test edilen muamele sürelerinde ve konsantrasyonlarda pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede arttırmıştır. EA+H_2O_2 uygulamasında EA, H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunu ve kuyruk momentini pozitif kontrole oranla 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, kuyruktaki DNA yoğunluğunu ise 100 µg/ml konsantrasyonda pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli oranda düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Elajik Asit (EA) , Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA), Mikronukleus (MN), Tek Hücre Jel Elektroforezi (KOMET).

ABSTRACT

PhD THESIS

IN VITRO GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF ELAGIC ACID (EA) ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Tuba DÖRDÜ

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Year: 2018, Pages:139
Jury : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
: Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN

The aim of this study was to investigate the genotoxic and antigenotoxic effects of Ellagic Acid (EA) (a natural phenolic compound found in plants) on human peripheral lymphocytes using sister chromatid exchange (SCE), chromosomal aberration (CA), micronucleus (MN) and single cell gel electrophoresis (SCGE) tests. Cells were treated with 60, 80 and 100 µg/ml EA for 24 and 48 hrs for chromosome aberration, micronucleus and sister chromatid exchange tests, and 1 hr for the comet assay. Furthermore, EA and EMS , H_2O_2 (a known clastogen and mutagen) were co-administered into the cell culture to investigate the antigenotoxic potential of EA.

In this study, EA did not induce a statistically significant increase in the SCEs, the aberrations per cell (CA/Cell) and the percentage of abnormal cells (AC%) either in 24- or 48-hr treatment periods and at all concentrations when compared to controls (negative and solvent control). According to the results obtained from the COMET assay, EA did not induce DNA damage. Therefore, EA did not significantly increase the lenght of the DNA tail caused by the DNA breaks migrating from the nucleus, the density of the DNA in the tail and the tail moment.

EA, when compared to control and solvent control, did not significantly affect PI, MI and NDI values at any concentration or treatment periods. EA, when applied to human lymphocyte cell culture alone, did not show genotoxic or cytotoxic effects.With the co-administration of EA and EMS (EA+EMS), EA significantly decreased the frequency of SCEs, the aberrations per cell (CA/Cell), the percentage of abnormal cells (AC%) and MN formation at all concentrations and all treatment periods. In the combination (EA+EMS), EA induced a concentration-dependent increase in the MI, but that increase was statistically significant only at the highest concentration for 24- and 48-hr treatment periods (100 µg/ml) when compared to positive control. EA increased the EMS-reduced PI when compared to positive control at 24 and 48-hr treatment times and at all concentrations. EA statistically significantly increased the EMS-reduced nucleus division index (NDI) at all concentrations and all treatment periods when compared to positive control. In EA+H_2O_2 application, EAdecreased the hydrogen peroxide-increased tail length, DNA intensity in tail and tail moment compared to the positive control, but this decrease was statistically significant only at the highest two concentrations (80 and 100 µg/ml) for tail lenght and tail moment, and at the highest concentrations (100 µg/ml) for the DNA intensity in tail.

Key Words: Ellagic Acid (EA), Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosom Aberration (CA), Micronucleus (MN), Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Antioksidanlar, organizmada oluşan anabolik ve katabolik olayları düzenleyerek tüm metabolizmayı etkileyen ve bazı enzimlerin aktif gruplarında yer alarak reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan, yokluğu veya yetersizliği gibi durumlarda fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan maddelerdir.

Bu çalışma; bitkilerde doğal fenolik bir bileşik olan elajik asit'in insan periferal lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkiye sahip olup olmadığını kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve tek hücre jel elektroforez (KOMET) testleri ile araştırmak ve bu testler yardımıyla elajik asit'in insanlar için herhangi bir genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını veya antikanserojenik etkiye sahip olup olmadığını saptamak amacıyla yürütülmüştür.

Araştırmada, KKD ve KA'yı saptamak amacıyla sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (22 ve 24 yaşlarında) ve iki kadından (22 ve 24 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri steril kültür tüpleri içerisindeki 2.5 ml'lik kromozom medyumlarına (Gibco, PB Max) steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Steril şartlarda, steril BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C'de 72 saat için inkübe edilmiştir. Elajik asit'in etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce daha önceden 1 M NaOH içerisinde hazırlanmış ve son konsantrasyonu 60, 80 ve 100 µg/ml olacak şekilde elajik asit kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü (1 M NaOH, 25 µl) ve bir de pozitif kontrol (10^{-3} M EMS) grubu oluşturulmuştur. EMS'nin etkisine karşı elajik asit'in antigenotoksik ve antisitotoksik etkisini ortaya çıkarmak için de ayrı bir kültür serisinde her bir kültür tüpüne test maddesine ilaveten EMS (son konsantrasyonu 10^{-3} M) ilave edilmiştir.

Hazırlanmış olan daimi preparatlarda KKD sayısı ve KA belirlenmiştir. Aynı preparatlarda proliferasyon indeksini (PI) hesaplamak için birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve mitotik indeksi (MI) saptamak için de toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

In vitro mikronükleus testinde ise sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki kadından (KKD ve KA testi için kan alınan kişilerden) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril koşullarda ekilmiş ve hücreler 37±1ºC'de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmanın test maddesi olan elajik asit'in MN oluşumu üzerindeki etkisini belirlemek için son konsantrasyon 60, 80 ve 100 µg/ml olacak şekilde elajik asit kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. İnkübasyon başlangıcından 44 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu 6 µg/ ml olacak şekilde sitokalasin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. EMS'nin'nin etkisine karşı elajik asit'in etkisini ortaya çıkarmak için de ayrı bir kültür serisinde her bir kültür tüpüne test maddesine ilaveten EMS (10^{-3} M) eklenmiştir.

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiş (4 kişi 4000 hücre) ve bu binükleer hücreler içerisinden mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan mikronükleuslu iki nükleuslu hücre %'si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronükleus sayısından MN yüzdesi (MN %) hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmanın bu kısmında nükleus bölünme indeksini (NBI) saptamak için MN preparatlarında tesadüfi seçilmiş alanlarda 1000 hücre içerisinde bir, iki, üç ve dört nükleuslu hücre sayısı belirlenmiş bu verilerden de NBI saptanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir test tekniği ise ilk defa 1978 yılında

Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan ve daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen komet testi için sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (22-24) ve iki kadından (22-24) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri ependorf tüplerine 100 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Elajik asit'in etkisini belirleyebilmek için daha önceden belirlenen dozlardaki test maddesi (elajik asit) son konsantrasyonu 60, 80 ve 100 µl olacak şekilde 100 µl içerisinde stok lenfositlere eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) (100 µl), çözücü kontrol olarak % 50'lik DMSO (100 µl) ve kontrol olarak ise distile su (100 µl) kullanılmıştır. H_2O_2'nin etkisine karşı elajik asit'in antigenotoksik etkisini ortaya çıkarmak için de ayrı bir kültür serisinde her bir kültür tüpüne test maddesine ilaveten H_2O_2 (100 µl) ilave edilmiştir.

Araştırmanın sonuçları, elajik asit'in insan periferal kan lenfositlerinde 24 veya 48 saatlik muameleli kültürlerde ve tüm konsantrasyonlarda KKD sayısını, hücre başına düşen anormallik sayısını (KA/Hücre) ve anormal hücre yüzdesini (AH %) kontrol ve çözücü kontrole nazaran önemli derecede uyarmadığını göstermiştir. EA, 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda MN oluşumunu genel olarak arttırmış olmasına rağmen bu artış kontrole nazaran önemli bulunmamıştır. EA, 24 saatlik 60 ve 80 µg/ml konsantrasyonlarda ve 48 saatlik 60 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda MI'yı genel olarak düşürmüş ancak bu düşüş kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır . EA, 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda PI ve nükleus bölünme indeksini (NBI) genel olarak düşürmesine rağmen bu düşüş kontrole oranla anlamlı bulunmamıştır. Komet testinin sonuçlarına göre de EA tüm konsantrasyonlarda önemli derecede DNA hasarına neden olmamıştır. Tüm bu sonuçlara göre EA genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip değildir.

Çalışmanın antigenotoksik kısmında ise EA+EMS uygulamasında hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda test maddesi olan EA,

kontrol ve çözücü kontrole oranla EMS kaynaklı artan KKD sayısını, KA/Hücre, anormal hücre yüzdesini ve MN oluşumunu pozitif kontrolle kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır. EA+EMS uygulamasında EA, EMS kaynaklı azalan mitotik indeksi pozitif kontrole oranla ve konsantrasyona bağlı olacak şekilde genel olarak attırmış ancak bu artış sadece 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml EA uygulamasında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Yine EA, EMS kaynaklı azalan PI'yı pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede ve de konsantrasyona bağlı olacak şekilde arttırmıştır. EA, EMS kaynaklı azalan NBI'yı 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede arttırmıştır. Komet testinde ise EA+H_2O_2 uygulamasında EA, H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunu pozitif kontrole oranla genel olarak düşürmüş, bu düşüş 80 ve 100 µg/ml konsantasyonlarda istatistiksel açıdan önemli seviyede olmuştur. Son olarak EA+H_2O_2 uygulamasında EA, H_2O_2 kaynaklı artan kuyruktaki DNA yoğunluğunu ve kuyruk momentini pozitif kontrole oranla genel olarak azaltmış, bu azalmalar kuyruktaki DNA yoğunluğu için 100 µg/ml konsantrasyonda, kuyruk momenti için ise 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel açıdan önemli olmuştur. Çalışmanın bu kısmından elde edilen sonuçlara göre EA antigenotoksik ve antisitotoksik etkiye sahiptir.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Danışman hocam emekli olduktan sonra kendisini daha yakından tanıma imkanı bulduğum, doktora eğitimim sırasında gerek tez çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanması sürecinde gerekse diğer konularda her daim yanımda olup benden destek ve emeğini esirgemeyen yine öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Genetik Laboratuarında beraber çalıştığımız ve çalışmam sırasında yine yardımlarını esirgemeyen Uzman Biyolog Taygun TİMOÇİN'e, Ar. Gör. Mehmet Tahir HÜSUNET'e ve Dr. Rima ÇELİK'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi yöneticilerine ve de tezimi 2211 C Öncelikli Alanlar kapsamında değerlendirip burs desteği sağlayan TÜBİTAK-BİDEB'e de teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her aşamasında olduğu gibi çalışmalarım boyunca da benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bana sonsuz emek ve sabır gösteren ve her koşulda yanımda yer alan sevgili annem Tülay CANITEZER, babam Emin CANITEZER, sevgili eşim Sezer DÖRDÜ ve biricik kızlarım Duru ve Beren DÖRDÜ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XXII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
2.1. Doğal Antioksidanlar İle Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları 9
2.1.1. C Vitamini (Askorbik Asit) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları 9
2.1.2. E vitamini (Takoferol) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları 11
2.1.3. Karotenoidler İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları 13
2.1.4. Polifenolik Bileşikler İle Yapılan Çalışmalar 15
2.1.4.1. Elajik Asit (EA) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları 16
3. MATERYAL VE METOD 31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları 31
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 31

3.1.1.1. Elajik Asit (EA) ve Kimyasal Özellikleri 31
3.1.1.1.(1). EA'nın Kimyasal Yapısı 32
3.1.1.2. Biocoll 33
3.1.1.3. 5' Bromo 2' deoxyuridine (BrdUrd) 33
3.1.1.4. Cytochalasin B 34
3.1.1.5. Elektroforez Tamponu 34
3.1.1.6. Entellan 35
3.1.1.7. Etidyum Bromid (EtBr) 35
3.1.1.8. Etil Metan Sülfonat (Ethyl Methanesulphonate=EMS) 35
3.1.1.9. Fiksatif 36
3.1.1.10. Fosfat Tamponu (PBS) 36
3.1.1.11. Giemsa 36
3.1.1.12. Glasiyal Asetik Asit 37
3.1.1.13. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 37
3.1.1.14. Hipotonik Eriyik 37
3.1.1.15. HMA Agar (High Melting Agar=Yüksek Kaynama Dereceli Agar) 37
3.1.1.16. Kolşisin (Kolkisin) 37
3.1.1.17. Kromozom Medyumu 38
3.1.1.18. Lizis Çözeltisi 38
3.1.1.19. LMA Agar (Low Melting Agar=Düşük Kaynama Dereceli Agar) 39
3.1.1.20. Lysing Çözeltisi 39
3.1.1.21. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol) 39
3.1.1.22. Nitrik Asit (HNO_3) 39
3.1.1.23. Nötralizasyon Tamponu 39
3.1.1.24. Sodyum Hidroksit (NaOH) 40
3.1.1.25. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer) 40

3.1.1.26. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği 41
3.1.1.27. Tripan Blue 41
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları 41
3.1.2.1. Elektroforez Sistemi 41
3.1.2.2. Steril Kabin 42
3.1.2.3. Güç Kaynağı 42
3.1.2.4. Hassas Terazi 42
3.1.2.5. İnkübatör 42
3.1.2.6. Mikroskop 42
3.1.2.7. Otoklav 43
3.1.2.8. pH Metre 43
3.1.2.9. Santrifüj 43
3.1.2.10. Soğutmalı Santrifüj 433
3.1.2.11. Su Banyosu (Benmari) 43
3.1.2.12. Vorteks 43
3.2. Lamların Temizlenmesi 44
3.3. Sterilizasyon 44
3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu 44
3.3.2. Test Maddesinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi, Hazırlanması ve Sterilizasayonu 44
3.3.3. Saf Suyun Sterilizasyonu 45
3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İnceleme 45
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması 45
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması 47

3.4.3. Daimi Preparatlarda Mikroskobik İnceleme 48
3.4.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması 49
3.4.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması 49
3.4.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması 49
3.4.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması 54
3.4.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması 54
3.4.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması 55
3.5. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler 55
3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması 55
3.5.2. Preparatların Boyanması 56
3.5.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskobik İnceleme 57
3.5.3.1. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması 57
3.5.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme 60
3.6. Komet Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İnceleme 60
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması 60
3.7. Mikroskobik İnceleme 62
3.8. İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi 69
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 71
4.1. Bulgular 71

4.1.1. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri 71
4.1.1.1. EA'nın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkileri..... 71
4.1.1.2. EA'nın Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkisi 73
4.1.1.3. EA'nın DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri..... 78
4.1.1.4. EA'nın Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri..... 80
4.1.2. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerindeki Antigenotoksik Etkileri 83
4.1.2.1. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri..... 83
4.1.2.2. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri 84
4.1.2.3. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi..... 88
4.1.2.4. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi (NBI) Üzerindeki Etkileri..... 90
4.1.3. EA'nın İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleustan Göç Eden DNA Parçalarının Oluşturduğu Nükleusa Bağlı Kuyruğun Uzunluğu, Kuyruktaki DNA Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri 95
4.1.3.1. EA'nın Genotoksik Etkisi..... 95

4.1.3.2. EA'nın Antigenotoksik Etkisi 95
4.2. Tartışma 103
4.2.1. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri 103
4.2.2. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri 104
4.2.3. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri 105
4.2.4. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Sitotoksik ve Antisitotoksik Etkileri 106
4.2.5. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleustan Göç Eden DNA Parçalarının Oluşturduğu Nükleusa Bağlı Kuyruğun Uzunluğu, Kuyruktaki DNA Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri 109
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 111
KAYNAKLAR 113
ÖZGEÇMİŞ 139

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Antioksidanların gruplandırılması 2

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı*..... 71

Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda EA İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre *..... 74

Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda EA ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferal Lenfositlerinde PI ve MI..... 79

Çizelge 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda EA İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI..... 81

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı. 83

Çizelge 4.6. Farklı Konsantrasyonlarda EA+EMS İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre 85

Çizelge 4.7. Farklı Konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferal Lenfositlerinde Proliferasyon İndeksi (PI) ve Mitotik İndeks (MI)..... 89

Çizelge 4.8. Farklı Konsantrasyonlarda EA+ EMS İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI. 91

Çizelge 4.9. Farklı Konsantrasyonlarda EA ve EA+H_2O_2 İle 1 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde DNA Parçalarının Oluşturduğu Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti 96

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1. Vitamin C'nin moleküler yapısı 10
Şekil 2.2. α- takoferol'ün moleküler yapısı 12
Şekil 2.3. β-karoten'in moleküler yapısı 14
Şekil 3.1. EA'nın açık formülü 32
Şekil 3.2. Sitokalasin B'nin açık formülü 34
Şekil 3.3. EMS'nin açık formülü 35
Şekil 3.4. Kolşisin'in açık formülü 38
Şekil 3.5. NaOH'ın açık formülü 40
Şekil 3.6. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi 49
Şekil 3.7. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in Kimyasal Yapıları 50
Şekil 3.8. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Gösterilmesi 52
Şekil 3.9. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000. 53
Şekil 3.10. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000. 53
Şekil 3.11. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000. 54
Şekil 3.12. Bir nukleuslu hücre. X1000. 58
Şekil 3.13. İki nukleuslu hücre. X1000. 59
Şekil 3.14. Üç nukleuslu hücre. X1000. 59
Şekil 3.15. Dört nukleuslu hücre. X1000. 60
Şekil 3.16. Komet testinden elde edilen sonuçlarda kullanılan farklı ölçümler 65

Şekil 3.17. Komet test yönteminin genel basamakları 66
Şekil 3.18. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) nükleuslar. X1000. 67
Şekil 3.19. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000. 68
Şekil 3.20. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000. 68
Şekil 4.1. 12 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 24 saatlik muamele,♀). X1000. 72
Şekil 4.2. 76 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000..... 72
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (80 µg/ml EA ile, 24 saatlik muamele, ♀). X1000..... 75
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100 µg/ml, EA 48 saatlik muamele, ♀). X1000..... 75
Şekil 4.5. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 48 saatlik saatlik muamele, ♂). X1000. 76
Şekil 4.6. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (100 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♀). X1000..... 76
Şekil 4.7. Kromatid tipi fragment (F) bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♀).X1000..... 77
Şekil 4.8. Kromozom tipi fragment (F) bulunan metafaz plağı (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♀).X1000..... 77
Şekil 4.9. Poliploid hücre kromozomları (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♂ (2n=92)). X1000. 78
Şekil 4.10. Tek mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♂) X1000..... 82
Şekil 4.11. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml EA, 48 saatlik muamele,♀) X1000..... 82

Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan AH %'sinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.001). 86
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan AH %'sinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.056). 86
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kayanklı artan KA/Hücre'nin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.007). 87
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan KA/Hücre'nin EA' nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.053). 87
Şekil 4.16. Pozitif kontrol EMS ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronükleus oluşumu. (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♀).X1000. 92
Şekil 4.17. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml EA+EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000. 92
Şekil 4.18. Bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml EA+EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000. 93
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin (MNNB %'si) EA'nın konsantrasyonuna bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.001). 94

Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı azalan nükleus bölünme indeksinin (NBI) EA'nın konsantrasyonunaa bağlı olarak artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.016). 94
Şekil 4.21. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nukleuslar (60 µg/ml EA, 1 saatlik muamele,♀). X1000. 97
Şekil 4.22. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nukleuslar (100 µg/ml EA, 1 saatlik muamele,♀). X1000. 97
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kuyruk uzunluğunun konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.031). 98
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'daki kuyruk yoğunluğunun konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.029). 98
Şekil 4.25. Pozitif kontrol H_2O_2 ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) nükleuslar (%35'lik H2O2, 1 saatlik muamele, ♂). X1000. 99
Şekil 4.26. Pozitif kontrol H_2O_2+60 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz) nukleuslar (% 35'lik H2O2, 1 saatlik muamele,♀). X1000. 99

Şekil 4.27. Pozitif kontrol H_2O_2+80 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nukleuslar (% 35'lik H_2O_2, 1 saatlik muamele, ♂). X1000..... 100

Şekil 4.28. Pozitif kontrol H_2O_2+100 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nukleuslar (% 35'lik H2O2, 1 saatlik muamele,♀). X1000..... 100

Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda EA+H_2O_2 ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunun EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.033)..... 102

Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda EA+H_2O_2 ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk momentinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.009)..... 102

SİMGELER VE KISALTMALAR

$A\beta_{42}$	: Amiloid beta 42
AD	: Alzheimer disease
AFB_1	: Aflatoxin B_1
AH	: Anormal Hücre
AKT/mTOR	: Normal hücresel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için gerekli olan başlıca sinyal yolakları
ALT	: Alanin transaminaz
AS_2O_3	: Arsenik trioksit
AST	: Asparatat transaminaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
$A\beta_{25\text{-}35}$	: Beta-amiloid$_{25\text{-}35}$
A549	: İnsan alveol eritrosit hücreleri
B’	: Kromatid Kırığı
B’’	: Kromozom Kırığı
Bcl-2	: Hücre ölümünü önleyici protein
BHA	: Bütillenmiş Hidroksiyanazol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitolüen
BLM	: Bleomisin
BrdUrd	: 5’-Bromo-2’-Deoxyuridine
CA	: Chromosome Aberration
CaCo-2	: İnsan kolon kanseri hücre hattı
CAL 27	: İnsan oral kanser hücre hattı
CAT	: Katalaz
CCl_4	: Karbon tetraklorür
CDK2	: Siklin bağımlı kinaz-2
CE	: Chromatid Exchange

CHO	: Chinese Hamster Ovary
CPM	: Siklofosfamid
Con A	: Konkanavalin A
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CPA	: Cyclophosphamid-A
Cyt-D	: Cytochalasin-D
DMH	: 1,2- dimetil hidrazin
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
dT	: Deoxytimidin
dU	: Deoxyuridin
DU 145	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
EA	: Elajik Asit
5637	: İnsan mesane kanseri hücre hattı
ERK 1/2	: Hücre dışı sinyaller tarafından regüle edilen protein kinazlar
EtBr	: Etidyum bromid
F	: Fragment
GEN	: Gentamisin
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GST	: Glutatyon-S-transferaz
HEL-299	: Sağlıklı insan akciğer fibroblast hücre hattı
Hep G2	: İnsan hapatoselüler karsinoma hücre hattı
HIV-1	: Human immunodeficiency virüs
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HNO_3	: Nitrik Asit
HOS	: İnsan sarkonoma hücreleri
HO-1	: Heme oxygenase-1
HPV E6	: İnsan servikal kanser hücre hattı
HSC-2	: İnsan oral kanser hücre hattı

Hs 578T	: İnsan meme kanseri hücre hattı
HT-29	: İnsan kolon kanseri hücre hattı
HT-1376	: İnsan mesane kanseri hücre hattı
HUVEC	: Sağlıklı insan endotel hücre hattı
IGFBP7	: İnsülin büyüme faktörü bağlayıcı protein
IL-6	: B hücrelerinin farklılaşmasını kontrol eden gen
IL-1β	: İnterlökin 1- beta
KA	: Kromozomal Anormallikleri
KB	: İnsan oral kanser hücre hattı
KCl	: Potasyum klorür
KD	: Kromatid Değişimi
KKB	: Kardeş Kromatid Bileşimi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
MAO-B	: Monoamin oksidaz B
MCF7	: İnsan göğüs kanseri hücre hattı
MDA	: Melandialdehit
MDA-MB231	: İnsan göğüs kanseri hücre hattı
MI	: Mitotik indeks
ML	: Maximum Level (Maksimum Miktar)
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronukleus
MNNG	: N-metil-N'- nitro-N- nitrosoguanidin
MTZ	: Mitoxantrone
NAC	: N-asetyl cystein
NaCl	: Sodyum Klorür
NBI	: Nukleus Bölünme İndeksi
NDEA	: N- nitrosodietilamin
NDGA	: Nordihidroguareyetik asit

NF-$_K$B	: Nuclear factor kappa (Tüm hücre tiplerinde bulunan transkripsiyon faktörü)
Nrf2	: Nuclear erythroid factor-2
NQ01	: Quinone oxidoreductase 1
NSC_S	: Nöral kök hücre
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
P	: Poliploidi
PANC-1	: Pankreatik karsinoma hücre hattı-1
PAT	: Patulin
PBS	: Fosfat tamponu
PC12	: Fekromositoma hücre hattı
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PD-L1	: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1
p53	: Kanseri baskılayan (hücre döngüsünü düzenleyen) transkripsiyon faktörü
PI	: Proliferasyon İndeksi
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
PK	: Pozitif Kontrol
PLN	: Fosalon
PQ	: Parakuat
P21	: Normal ve kanser hücrelerinin bölünmesini engelleyen protein geni
r	: Korelasyon Katsayısı
REF	: Sıçan embriyonik fibroblast hücreleri
RI	: Replikasyon İndeksi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif azot türleri
rpm	: Revolution Per Minute (devir/dakika)
RWEP1	: Normal insan prostat hücre hattı

QR : Kinon redüktaz
SCE : Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SCD : Sister Chromatid Differentiation (Kardeş Kromatid Farklılaşması)
SCGE : Single cell gel electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforezi)
SE : Standart Hata
SH-SY5Y : İnsan nöroblastoma hücre hattı
SKBR-3 : İnsan meme kanseri hücre hattı
SOD : Süperoksit dismutaz
SSC : Standart Saline Citrate
T : Translokasyon
TBHQ : Tersiyer butilhidrokinon
TNF-α : Tümör nekrozis faktör alfa
T24 : İnsan mesane kök hücre hattı
UM-UC-3 : İnsan mesane kanseri hücre hattı
UV : Ultraviyole
U87 : İnsan glioblastoma hücre hattı
v.a. : Vücut Ağırlığı
VEGF : Hücreler tarafından üretilen ve de novo (vaskulogenezis) ya da varolan damarlardan yeni damarların oluşumunu (angiogenezis) sağlayan sinyal proteini (Vascular endothelial growth factor)
VEGF-A : Vasküler endotel büyüme faktörü-A'nın reseptörü
V79-4 : Çin hamster'i akciğer fibroblast hücre hattı
Z-VAD-fmk : Kaspaz enzim inhibitörü

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, organizmada oluşan anabolik ve katabolik olayları düzenleyerek tüm metabolizmayı etkileyen ve bazı enzimlerin aktif gruplarında yer alarak reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan, yokluğu veya yetersizliği gibi durumlarda fizyolojik fonksiyonların durmasına ya da önemli ölçüde azalmasına neden olan maddelerdir.

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük yoğunlukta bulunduklarında çeşitli fiziksel etkenler veya kimyasal olaylar sonucunda meydana gelen reaktif oksijen (ROT) ve reaktif azot türleri (RNT) gibi hücrelere zarar verebilecek olan prooksidanları (lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonuna neden olan toksik meddeler) etkin bir şekilde indirgeyerek daha düşük toksisiteli ya da toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Böylece oksidasyonun sebep olabileceği zararları önlerler.

Antioksidan yetersizliğinde ROT fazlalığı nedeniyle meydana gelen oksidatif stres biyolojik sistemlerin temel bileşenlerinin (karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler) hasarına sebep olarak (Cao ve ark., 1997) yaşlanma, çeşitli kanser türlerinin gelişimi, böbrek fonksiyonlarının azalması, akciğer, kalp ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi problemlerin oluşmasına neden olmaktadır (Simone, 1992; Kozluca, 1993; Cos ve ark., 2000; Desmarchelier ve ark., 2000; Katalinic ve ark., 2006; Husain ve Kumar, 2012; Halliwell, 2012). Ayrıca yine ROT varlığında Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumu da tetiklenmektedir (Aitken ve ark., 1995).

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedirler. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Rice-Evans ve ark., 1997).

Antioksidanlar, katalitik aktivitelerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ise kaynağına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olarak gruplandırılırlar (Çizelge 1.1) (Rice-Evans ve ark., 1997; Kopani ve ark., 2006; Surveswaran ve ark., 2007).

Çizelge 1.1. Antioksidanların gruplandırılması

<table>
<tr><td rowspan="2">ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR</td><td colspan="2">ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR</td></tr>
<tr><td>DOĞAL ANTİOKSİDANLAR</td><td>SENTETİK ANTİOKSİDANLAR</td></tr>
<tr><td>Glutatyon peroksidaz (GPx)</td><td>Karotenoidler</td><td>Alkil gallat türevleri</td></tr>
<tr><td>Glutatyon redüktaz (GR)</td><td>Mineraller</td><td>Butillenmiş hidroksianizol (BHA)</td></tr>
<tr><td>Glutatyon-S-transferaz (GST)</td><td>Vitaminler</td><td>Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)</td></tr>
<tr><td>Katalaz (CAT)</td><td rowspan="2">Polifenolik bileşikler</td><td>Nordihidroguareyetik asit (NDGA)</td></tr>
<tr><td>Süperoksit dismutaz (SOD)</td><td>Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)</td></tr>
</table>

Bu çalışmanın test maddesi olan elajik asit (EA) doğal antioksidan grubunda yer alan polifenolik bir bileşiktir (Yang ve ark., 2001; Karakaya, 2004; Seeram ve ark., 2005).

Antioksidan aktiviteye sahip olan polifenolik bileşikler insan sağlığı üzerinde olumlu rollerinin olması nedeniyle bilim adamları, gıda üreticileri ve tüketiciler açısından önemli bir yere sahiptir (Lako ve ark., 2007). Ancak, çok amaçlı kullanım alanına sahip olan bu bileşiklerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, kısa süreli genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bugün kısa süreli genotoksisite

testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan testlerden bazıları; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994), mikronükleus (MN) (Heddle ve ark., 1991, Fenech, 2002) ve tek hücreli jel elektroforez (komet) (Singh ve ark., 1988) testleridir. Perry ve Evans (1975)'in bilinen mutajen ve kanserojenlerin Chinese hamster (Cricetulus griseus=Çin kemiricisi) yumurta (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından sonra bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır.

Bir kimyasal maddenin mutajenik ve kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını kısa sürede saptamak için 1970'li yıllarda bazı testler geliştirilmiştir. Bu tarihten itibaren genotoksisite incelemeleri için çok çeşitli inceleme sistemleri kullanılmıştır. Bunlar gen, kromozom yahut genom mutasyonlarını saptayan mutajenite testleri ve mutasyona paralel olarak indüklenen ve genotoksisiteyi gösteren indikatör testlerdir (Albertini ve ark., 2000). Carrano ve ark. (1978), mutajen ve kanserojenlerin toksik dozların altındaki dozlarda meydana getirdikleri genetik hasarların kısa zamanda, hassas bir şekilde ve kantitatif olarak gösterilmesinin KKD ve KA analizi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunun uyarılması arasında lineer bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Ayrıca Tucker ve ark. (1993) da Carrano ve ark. (1978)'nın görüşüne benzer görüşe sahiptirler.

Genotoksisitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan testlerden biri periferal kan lenfositlerinde KKD testidir. KKD, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin resiprokal değişimidir ve bir DNA zincir kırığı ve yeniden birleşme olayını gerektirir (Sonoda ve ark. 1999; Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan

insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı bulunmuştur (Perry ve Evans, 1975; Albertini ve ark. 2000). Ayrıca, tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu da saptanmıştır (Carrano ve ark, 1978). Yine DNA replikasyonunu inhibe eden çeşitli kimyasal ajanların KKD'yi indüklediği de bilinmektedir (Ishii ve Bender, 1980). KKD'nin artışıyla in vivo tümörlerin oluşumu arasında da benzer bir ilişkinin olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark. 2006).

Genotoksik riskleri belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biri, periferal kan lenfositlerindeki KA frekansının belirlenmesidir (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark. 1994). Kromozom anormallikleri DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin, kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi de, DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabilir (Savage, 1993). KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini ve ark., 2000; Bonassi ve ark. 2000; 2004; 2005; 2007). Yüksek KA frekansı (gap hariç), KA artışını başlatan sebebe bakmaksızın yüksek kanser riski olduğunu önceden gösterebilir. Hem kromatid tipi hem de kromozom tipi KA'ları kanser riskinin göstergesidir. Fakat kromozom tipi KA'lerinin kromatid tipi KA'lerine göre daha iyi bir belirleyici olduğuna dair kanıtlar vardır (Norppa, 2004; Norppa ve ark. 2006; Boffetta ve ark. 2006).

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik metodlardan bir diğeri ise MN testidir (Heddle ve ark. 1991; Fenech, 2002). Periferal kan lenfositlerinde kromozom hasarının göstergesi olarak MN'un

kullanılması ilk kez 1976 yılında Contryman ve Heddle tarafından öne sürülmüştür (Bonassi ve ark. 2001). Daha sonra sitokinez-bloklama mikronükleus metodunun Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilmesiyle, nükleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki MN'lar incelenmeye başlanmıştır. MN asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır (Surrallés ve ark. 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde, sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Dellarco ve ark. 1985). Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark. 1997; Norppa ve Falck, 2003). Sağlıklı bireylerden oluşan insan populasyonunda periferal kan lenfositlerindeki MN frekansının da KA frekansı gibi kanser riskinin tahmin edilmesinde belirleyici bir rol oynadığına dair epidemiyolojik bulgular mevcuttur (Bonassi ve ark., 2007, 2011). Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferal kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (Cheng ve ark. 1996; Duffaud ve ark. 1997). Ayrıca, Fenech ve ark. (2011)'nın uluslararası işbirliği ile yaptıkları insan mikronükleus projesindeki (HUMN ve $HUMN_{xL}$) bulguları, MN frekansının kanser riskinin tahmininde geçerli bir biyomarkör (biyolojik işaret) olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan bir diğer test ise tek hücre jel elektroforez testi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) olarak da bilinen komet test (Comet Assay) yöntemidir. Komet, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların DNA molekülünde oluşturabilecekleri genotoksik ve sitotoksik hasarları ölçmek ve analiz etmek amacıyla son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir

test yöntemidir. Oldukça basit, hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntem olan komet test tekniği gerek in vitro gerekse in vivo genotoksisite çalışmalarında kullanışlı ve tercih edilen bir yöntem olmuştur (Pavlica ve ark., 2001; Bandyopadhyaya ve ark., 2008).

İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan ve daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen komet test tekniği nötral pH'daki lizis şartlarında uygulanarak DNA çift iplik kırıklarının belirlenmesi sağlanmıştır (Rydberg ve Johanson, 1978, Ostling ve Johanson, 1984; Bandyopadhyaya ve ark. 2008). Ancak DNA hasarlarının tespitinde nötral şartlar alkali şartlar kadar hassas olmadığı için nötral şartlar altında yapılan lizis ve eletroforezis uygulamaları DNA çift iplik kırıklarının tespitine izin verirken, DNA tek iplik kırıklarının tespitine izin vermemektedir. Oysa çoğu ajanlar DNA'da çift iplik kırığından daha çok tek iplik kırığına sebep olmaktadır. Bu nedenle teknik Singh ve arkadaşları (1988) tarafından lizis ve elektroforezis işlemleri alkali koşullarda (pH>13) yapılmak suretiyle modifiye edilmiştir. Böylece komet test tekniği ile sadece DNA'da çift iplik kırıklarının tayini değil aynı zamanda DNA çapraz bağlarının ve tamamlanmamış eksizyon tamir bölgelerinin (tek iplik kırıklarının) tayinine de olanak sağlamıştır (Singh ve ark., 1988).

Nükleus içerisinde yoğun bir yapı halinde bulunan DNA molekülü çeşitli genotoksik ve sitotoksik ajanlarla hasara uğradığında eğer bu hasar DNA tamir mekanizması ile onarılmaz ise DNA molekülünde tek veya çift zincir kırıkları oluşur. Bu durumda DNA yoğun yapısını kaybeder ve ana nükleus bölgesinden dışarı doğru uzanır. Bu yapıya bir elektrik akımı uygulandığında yapısı itibariyle negatif (-) yüklü olan DNA molekülü elektroforetik ortamda molekül ağırlıklarına göre farklı hızlarda anotoda (+ uca) doğru hareket eder. Ancak ana nükleusu oluşturan ve hasarlı olmayan DNA zinciri çok büyük olduğu için elektrik akımı ile hareket etmez ve nükleus içerisinde kalır. Diğer taraftan küçük fragmentler elektrik akım uygulama sürecine bağlı olarak ana DNA'dan ayrılarak göç ederler. Bu

yöntemde floresan boyayla boyanan DNA floresan mikroskobunda nükleus dışında nükleusla birlikte dairesel bir formdan kuyruklu yıldıza benzer bir forma kadar çeşitli şekillerde görüntüler oluşturur. Bu yüzden bu yönteme kuyruklu yıldız anlamına gelen "komet yöntemi" adı verilmiştir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Komet testi, DNA hasarını belirlemede kullanılan KKD, KA ve MN gibi sitogenetik test yöntemlerine oranla:

- Az sayıda hücre örneği gerektirmesi
- Test edilen hücrede mitotik aktivitenin göz önünde bulundurulmaması
- Hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde uygulanabilmesi
- Hücredeki DNA kırıklarının görsel olarak değerlendirilmesine olanak vermesi
- Hızlı sonuç elde edilmesi
- Düşük düzeylerdeki hasar seviyesinin bile ölçülmesine olanak sağlaması

gibi birtakım avantajlara sahiptir (Vrzoc ve Petras, 1997; Tice ve ark., 2000; Choy, 2001; Piperakis, 2009; McArt ve ark., 2010).

Bu özellikleri sayesinde komet testi oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem günümüzde:

- DNA hasar ve onarım çalışmalarında
- Çeşitli kimyasal kaynaklı genotoksisite değerlendirmesinde
- Ekogenotoksikolojik değerlendirmelerde (Çevrenin genotoksik ajanlarla kontaminasyonunun analizi)
- İnsanlarda biyolojik izlemelerde (Çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan çalışanlarda mesleki maruziyetin ölçülmesinde)

- Beslenme çalışmalarında (Gıda, gıda katkı maddelerinin yararlı ve zararlı etkilerinin araştırılması)
- Klinik hastalık tanısında ve ilaç uygulamalarının etkilerinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Klaude ve ark., 1996).

Bu çalışmanın test maddesi olan ve aynı zamanda doğal bir antioksidan olarak işlev gören Elajik asit (EA) bitkisel kaynaklı fenolik bir bileşiktir. Gerek in vivo gerekse in vitro yapılan birçok çalışmada elajik asitin antioksidan, antienflamatuar, antidiabetik, antikanserojen ve antimutajenik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Vattem ve Sheitty 2005; Rogerio ve ark., 2008; Chao ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010; Malini ve ark., 2011; Rosillo ve ark., 2011).

EA ile yapılan çeşitli çalışmalar elajik asit'in serumda bulunan ve kansere sebep olan kimyasalları temizlediğini, hücresel DNA'ya bağlanarak kanserojenlerin bağlanmasını önlediğini, antioksidan olarak görev yaptığını ve çeşitli kanser türlerini yok ettiğini göstermiştir (Majid ve ark., 1991; Yang ve ark., 2001; Xu ve ark., 2003; Kang ve ark., 2006; Sharma ve ark., 2007; Tasaki ve ark., 2008).

Gallik asit ara ürünü olan elajitanin veya elajik asit glikozidleri şeklinde ahududu, böğürtlen, çilek ve nar gibi üzümsü taze meyveler ile ceviz, kestane ve fındık gibi kabuklu meyvelerin yapısında bulunan elajik asit ile şimdiye kadar yapılan çalışmalar EA'nın antioksidan ve antikanserojen özelliğe sahip olup olmadığının belirlenmesine yöneliktir. Ancak bugüne kadar elajik asit'in genotoksik olup olmadığını ortaya koyacak çalışma çok az sayıda yapılmış olup tatminkar düzeyde değildir. Bu nedenle bu çalışma bitkilerde doğal fenolik bir bileşik olan elajik asit'in ticari formunun insan periferal lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkiye sahip olup olmadığını KKD, KA, MN ve KOMET testleri ile saptamak amacıyla yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

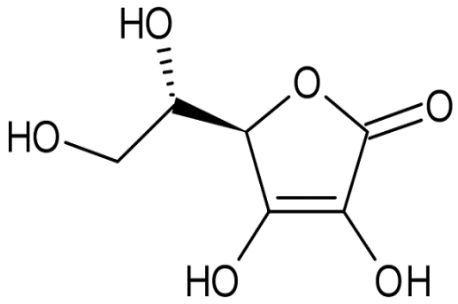
Bu çalışmanın test maddesi olan elajik asit (EA) doğal antioksidan grubunda yer alan polifenolik bir bileşiktir. Dolayısıyla burada sadece doğal antioksidan grubunda yer alan maddelerin in vivo deney hayvanları, in vitro insan ve deney hayvanlarının çeşitli dokuları kullanılarak yapılan genotoksik ve antigenotoksik çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

2.1. Doğal Antioksidanlar İle Yapılan Genotoksisite ve Antigenotoksisite Çalışmaları

C vitamini (askorbik asit), E vitamini (takoferol), karotenoidler ve polifenoller meyve ve sebzelerde yararlı bileşenler olarak bulunan en önemli doğal antioksidanlardır.

2.1.1. C Vitamini (Askorbik Asit) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları

Moleküler yapısı Şekil 2.1'de gösterilen C vitamini, düşük molekül ağırlıklı olup suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan ortadan kaldıran güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. Bu antioksidan, kollajen sentezi ve demir absorbsiyonunda gereklidir (Antmen, 2005). Ayrıca çeşitli besin maddelerinde acılaşma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. C vitamini doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler (Hudson, 1990).



Şekil 2.1. Vitamin C'nin moleküler yapısı

Vitamin C ile yapılan çok sayıdaki çalışmalar bu antioksidanın lenfosit DNA'sında reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA zararlarını (zincir kırıkları gibi) ve serbest radikallerin neden olduğu doku zararlarını engelleyerek hastalıkları önlediği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2003). Ayrıca vitamin C'nin KKD sayısını ve MN oluşum sıklığını azaltarak ve de gen mutasyonlarını engelleyerek çeşitli ajanların sebep olduğu klastojenik etkileri azalttığı da bildirilmiştir (Nefić, 2008).

Gürbüz ve ark. (2009) vitamin C'nin antigenotoksik özelliğinin olup olmadığını belirlemek amacıyla Swiss erkek albino farelerini kullanarak yaptıkları in vivo mikronukleus testinde farelerde toksisiteyi uyarmak için intraperitonal yoldan 7 gün boyunca günlük 51.6 mg/kg siklofosfamid (CP) vermiş ve ardından CP uygulamasından 24 saat önce ve CP uygulamasından 24 saat sonra olacak şekilde 10, 30 ve 60 mg/kg vitamin C vermişlerdir. Sonuçta farelerin mesane hücreleri kullanılarak yapılan MN testinde vitamin C'nin mikronukleus oluşumunu pozitif kontrole (CP ile muamele edilen grup) oranla istatistiksel açıdan önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Sharma ve Sharma (2012) vitamin C ve vitamin E'nin antigenotoksik özelliğini belirleyebilmek amacıyla karbofuran pestisidi ile genotoksisitesi indüklenmiş insan periferal lenfositlerini kullanarak in vitro çalışma yapmışlardır. Bunun için önce karbofuran ile muamele edilerek DNA zararlarının oluşması sağlanmış olan lenfosit hücrelerine sonradan 10 μM vitamin C ve vitamin E ilave etmişlerdir. Sonuçta her iki antioksidanın

hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek DNA zararlarını kontrole oranla anlamlı bir şekilde azalttığını saptamışlardır.

Kahl ve ark. (2012) vitamin C'nin antioksidan özelliğini belirlemek üzere nikotin ile toksik etkiler ve DNA zararları oluşturulmuş fareleri kullanarak yaptıkları in vitro komet ve MN testlerinde vitamin C'nin nikotin kaynaklı hücrelerde oluşan DNA zararlarını ve toksisiteyi büyük ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

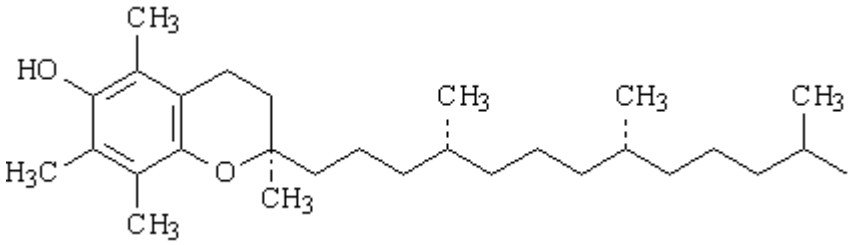
Vitamin C'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile DNA zararlarının oluşumu uyarılan insan kolerektal adenokarsinoma hücre hattı (HT29) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı in vitro comet testinde 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda kullanılan vitamin C'nin H_2O_2'nin sebep olduğu DNA zararlarını pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşürdüğü rapor edilmiştir (Kontek ve ark., 2013).

Guerriero ve ark. (2014) vitamin C'nin antineoplastik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla kemoterapide kullanılan ve çok sayıda yan etkisi olan mitoxantrone (MTZ) ile genotoksisitesi indüklenmiş insan meme kanseri hücre hatlarını (MDA-MB231 ve MCF7) kullanarak yaptıkları in vitro çalışmada vitamin C'yi hem tek başına hem de MTZ ile kombine ederek kullanmışlardır. Sonuçta vitamin C'nin her iki kullanımında da konsantrasyona bağlı olacak şekilde H2AX ve PI3K apoptoz sinyal yollarını aktive ederek kanserli hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

2.1.2. E vitamini (Takoferol) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları

Genellikle bitkisel ürünlerde bulunan E vitaminini hayvan organizmaları pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, yumurta, süt, ceviz ve fındıkta bulunur. Doğada 7 farklı izomer yapıda bulunan takoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzese de, biyolojik etkileri birbirinden oldukça farklıdır. 3 metil grubu taşıyan α-takoferol (Şekil 2.2)

vitamin olarak en etkili olanıdır ve sadece ‘E-vitamini’ dendiğinde α-takoferol anlaşılır.



Şekil 2.2. α- takoferol’ün moleküler yapısı

Güneş kremleri başta olmak üzere çeşitli cilt bakım kremlerinde yer alan E vitamininin kullanım oranına dikkat edilmelidir. Çünkü yapılan çalışmalarda E vitaminin aşırı kullanımının cilt kanserlerine yol açtığı gösterilmiştir (Mitchel ve Mccann, 1993).

Šiviková ve ark. (2001) koyun periferal lenfositlerinde karbon tetraklorür (CCl_4)’ün genotoksisitesine karşı vitamin E ve selenyum’un antigenotoksik etkilerini KA, KKD ve MN testlerini kullanarak araştırmışlardır. Sonuçta CCl_4’ün kromozom aberasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı için vitamin E ve selenyum’un KA oranında herhangi bir değişiklik oluşturmadığını, ancak KKD, MN oluşumunu ve mitotik indeksi kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Singh ve ark. (2008) E vitamininin atrazin (2-kloro-4-(etilamino)-6-(izopropilamino)-s-triazin) pestisinin neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu etkisininin olup olmadığını belirlemek için sıçanlarda jel elektroforezi, komet ve MN testleri ile araştırmışlardır. Bunun için sıçanlara önce 7, 14 ve 21 gün boyunca 300 mg/kg atrazin verip karaciğer ve kan hücrelerini incelemişlerdir. Ardından atrazin ile birlikte 100 mg/kg E vitamini verilmiş ve yine karaciğer ve kan hücreleri incelenmiştir. Araştırıcılar sonuçta atrazinin tek başına muamele edildiği gruplarda kuyruklu nükleusların kuyruk uzunluğunun ve mikronükleus oluşum oranında kontrole oranla belirgin bir artış olduğunu, ancak atrazin ile E vitamininin birlikte

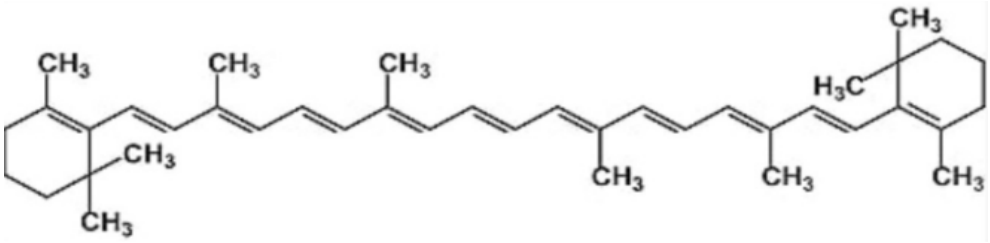
uygulandığı grupta E vitamininin kuyruklu nükleusların kuyruk uzunluğunu ve mikronükleus oluşum oranını azaltarak atrazinin oluşturduğu genotoksisiteyi büyük ölçüde engellediğini bildirmişlerdir.

Vitamin E kullanılarak yapılan Salmonella zincir test sistemlerinde vitamin E'nin N- nitrosodietilamin (NDEA)'nin neden olduğu DNA onarım mekanizması ve birincil savunma sistemlerinden kaçan reaktif oksijen türlerini (ROS) etkisiz hale getirerek NDEA ile indüklenen lezyonları büyük ölçüde önleyip DNA tamir genlerine yardımcı olduğu belirlenmiştir (Auib ve ark., 2009).

Boussema ve ark. (2013), patulin (PAT) ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde vitamin E'nin antioksidan ve antigenotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada vitamin E'nin PAT kaynaklı artan ROS üretimi, p53 aktivasyonu ve DNA zararlarını düşürdüğünü ve ayrıca PAT ile indüklenen kromozom aberasyonlarını önemli ölçüde azaltarak PAT'ın neden olduğu sitotoksisite ve genotoksisiteyi engelleme konusunda önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir.

2.1.3. Karotenoidler İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları

Karotenoidler, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen ancak yağ ve organik çözücülerde çözünen, açık sarıdan kırmızıya kadar değişik tonda renk içeren pigmentlerdir. Tereyağ, süt, yumurta sarısı gibi hayvansal gıdalarda ve havuç, mısır ve domates gibi birçok meyve ve sebzelerde bulunur. Karotenoidlerin çoğunun temel yapısı poliizoprenoidden oluşmaktadır (Deming ve ark., 2002). Karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri yapısında bulunan çifte bağların sayısına bağlıdır. En çok bilineni β-karotendir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. β-karoten'in moleküler yapısı

Salvadori ve ark. (1992) β-karoten'in siklofosfamid'in (CPA) neden olduğu genotoksisite üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemek için fare kemik iliği hücrelerini kullanarak in vivo KA testi yapmışlardır. Bunun için araştırıcılar farelere önce 5 gün boyunca gavaj yoluyla 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 mg/kg beta-karoten vermişlerdir. Son gün yapılan uygulamadan 4 saat sonra farelere intraperitonal yoldan 20 mg/kg CPA verilmiş ve 16, 24 ve 32 saat sonra hücreler anormallikleri açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta beta-karoten'in CPA tarafından indüklenen kromozom anormalliklerini azaltarak CPA'nın genotoksisitesine karşı önemli bir koruma sağladığını ancak kromozom anormallikleri olan hücrelerin frekansları üzerinde herhangi bir konsantrasyon-etki ilişkisinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Karotenoidlerin (β-karoten, likopen, lutein, zeaksantin) Jurkat E6.1 malign T-lenfoblast hücrelerinde kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, DNA yıkımı ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak kanserli hücreleri apoptoza uğrattıkları bildirilmiştir (Müller ve ark., 2002).

Beta-karoten (BC)'nin kemoterapötik bir madde olan ve serbest radikalleri üreten doksorubisinin *Drosophila melanogaster*'in somatik hücrelerinde oluşturduğu genotoksisiteye karşı herhangi bir antigenotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri kullanılarak yapılan çalışmalarda BC'nin doksorubisin'in oluşturduğu genotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Dias ve ark., 2009).

Peng ve ark. (2010) beta-karoten'in etanol ile indüklenen sitotoksisite üzerinde antioksidan ve antiapoptotik özelliklerinin olup olmadığını belirlemek üzere izole sıçan hepatositlerini kullanarak in vitro bir çalışma yapmışlardır. Sonuçta etanol ile muamele edilen hücrelerde hücre canlılığı azalmış, bununla birlikte glutatyon (GSH), lipit peroksit, sitokrom P450 2E1, kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyesi artmıştır. Beta-karoten'in ise GSH, lipit peoksit ve sitokrom P450 2E1 seviyesini arttırdığını, oksidatif stresi engelleyerek azalan hücre canlılığını tekrar arttırdığını ve kaspaz-3 ile kaspaz-9 enzimlerinin ekspresyonunu inhibe ederek etanol kaynaklı hücre ölümünü engellediğini bildirmişlerdir.

2.1.4. Polifenolik Bileşikler İle Yapılan Çalışmalar

Polifenoller, yani fenolik bileşikler, benzen halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren organik bileşiklerdir (Urquiaqa ve Leighton, 2000; Liu, 2004). Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve bu aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler, antioksidan aktivite başta olmak üzere birçok biyolojik aktivite gösterirler (Löliger, 1991; Hagerman ve ark., 1998). Antioksidatif etkiye sahip olmaları nedeniyle fenolik bileşikler beslenme açısından büyük öneme sahiptirler (Salah ve ark., 1995).

Polifenoller, C ve E vitaminleri ve karotenoidler meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlardır. Bu bileşiklerin sahip olduğu antioksidan aktiviteleri sayesinde vücudu kardiyovasküler hastalıklara ve bazı kanser türlerine karşı koruduğu bilinmektedir (Peto ve ark., 1981; Pietta, 2000). Polifenoller bitki dünyasının çok geniş bir kısmında mevcut olup fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluştururlar. Bitki polifenonelleri doğal antioksidanlar olarak bilinmelerine rağmen vücutta fazla miktarda bulunduklarında veya bakır, demir vb. gibi geçiş metal iyonları ile birleştiklerinde toksik etki göstererek DNA molekülünde oksidatif hasarlara neden olurlar. Dolayısıyla bu bileşiklerin bir çoğu hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteye sahiptirler (Rietjens ve ark., 2002; Hanif ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008). Örneğin askorbik asit serbest demir

iyonlarıyla etkileşerek askorbat radikalini oluşturur. Oluşan bu radikalin ise biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir (Childs ve ark., 2001).

2.1.4.1. Elajik Asit (EA) İle Yapılan Genotoksisite, Sitotoksisite, Kanserojenite ve Antikanserojenite Çalışmaları

Ahududu, böğürtlen, yaban mersini, çilek, nar ve cevizde bol miktarda bulunan EA'nın pankreas kanser hücreleri ve lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediği, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda antioksidan ve antienflamatuvar etkilerinin olduğu ve tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Bozkurt ve ark., 2002).

Tümör hücre hattı kullanılarak yapılan çok sayıdaki çalışmalarda EA'nın serviks kanseri (Narayanan ve ark., 1999), meme kanseri (Losso ve ark., 2004), kolon kanseri (Losso ve ark., 2004; Seeram ve ark., 2005; Larrosa ve ark., 2006), prostat kanseri (Losso ve ark., 2004; Seeram ve ark., 2005; Malik ve ark., 2011), pankreas kanseri (Edderkaoui ve ark., 2008), mesane kanseri (Qui ve ark., 2013) ve HL-60 lösemi hücre hattında (Hagiwara ve ark., 2010) kanserli hücreleri apoptoza uğrattığı gösterilmiştir.

EA'nın in vivo tümör büyümesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada EA'nın pH>7 suda çözündüğü ve Zn^{+2}, Ca^{+2}, Fe^{+2}, Cd^{+2} ve Cu^{+2} gibi katyonlarla şelasyon yaparak kanser hücrelerinin gelişiminde önemli bir rol üstlenen MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 gibi metalloproteinazları inaktive etme gücünün arttığı bildirilmiştir (Sartippour ve ark., 2002). Ayrıca EA'nın Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile yaptıkları şelasyonun tümör dokusunda anjiogeneze karşı bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (Sartippour ve ark., 2002; Camphausen ve ark., 2003).

Losso ve ark. (2004), EA'nın kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için CaCo-2 kolon, MCF-7 meme, Hs 578T meme ve DU 145 insan prostat kanser hücre hattı kullanark yaptıkları in vitro çalışmalarda ortalama 1-100 µmol/L EA'nın kanser hücrelerindeki proliferasyon

indeksini önemli ölçüde azalttığını ve kanser hücrelerindeki ATP üretimini azaltarak hücre canlılığını azalttığını ve sonuçta hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

Yine Losso ve ark., (2004) ile Labrecgue ve ark., (2005)'nın yaptıkları benzer bir çalışmada ise EA'nın tümör damarlanmasında ve gelişiminde rol alan VEGF ve PDGF reseptörlerinin fosforilasyonunu engelleyerek tümör gelişimini yavaşlattığı ve kanser hücrelerinin mitokondrilerindeki ATP miktarını azaltarak kanser hücrelerinin canlılığını da azalttığını göstermişlerdir. Li ve ark. (2005), T24 mesane kanserli insan hücre hattını kullanarak yaptıkları in vitro bir çalışmada EA'nın hücre siklusunun G0 ve G1 evrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını, p53 ve p21 genlerinin ekspresyonunu arttırdığını ve siklin bağımlı kinaz-2 (CDK2) geninin ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca EA'nın kaspaz-3 enziminin inhibitörünün (z-VAD-fmk) çalışmasını bloke ederek kaspaz-3 enziminin T24 hücrelerini apoptozise uğrattığını bildirmişlerdir. Erenoğlu (2012), EA'nın meme kanseri hücre hatları olan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada EA'nın on bir farklı dozunu (5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM ve 300 µM) 72 ve 96 saat süreyle uygulamıştır. Araştırıcı sonuçta EA'nın kanserli hücrelerde hücre proliferasyonunu uygulanan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak kontrole oranla istatiksel açıdan anlamlı bir şekilde azalttığını ve hücreleri apoptoza sevk ettiğini ve dolayısıyla kanserli hücreler üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiğini saptamıştır. Benzer şekilde Weisburg ve ark. (2013) EA'nın HSC-2 oral karsinoma hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiğini ve kaspaz-3 enzimini aktive ederek tümör hücrelerini apoptozise uğrattığını bildirmişlerdir.

Ceci ve ark. (2016), EA'nın kanser hücreleri üzerindeki antitümör etkisini incelemek için T24, UM-UC-3, 5637 ve HT-1376 olmak üzere dört farklı insan mesane kanser hücre hattı kullanarak in vitro ve intraperitonal yoldan UM-UC-3 hücreleri ($5x10^6$) enjekte edilen fareler ile in vivo çalışmalar yapmışlardır.

Araştırıcılar sonuçta EA'nın gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalarda konsantrasyona bağlı olacak şekilde tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu, VEGF-A'nın (vasküler endotel büyüme faktörü A) reseptörü olan VEGFR-2 geninin ekspresyonunu baskılayarak tümör hücrelerinin anjiyogenezini önlediğini ve PD-L1 genini (programlanmış hücre ölüm ligandı 1) aktive ederek tümör hücrelerini apoptozise sevk ettiğini bildirmişlerdir. Yine EA'nın antikanserojenik etkisini belirlemek üzere HCT-15 kolon adenokarsinoma hücreleri kullanılarak yapılan in vitro bir çalışmada 20-100 µM konsantrasyonlardaki EA'nın tümör hücrelerini G2/M fazında bloke ettiğini, Bax, kaspaz-3 ve sitokrom-C'nin ekspresyonunu ve Bcl-2 aktivitesini azalttığını, ROT üretimini arttırarak hücre proliferasyonunu arttırdığını ve sonuçta HCT-15 hücrelerini apoptozise sevk ettiğini bildirmişlerdir (Umesalma ve ark., 2015).
Benzer şekilde Guo ve ark. (2016), nar kabuğundan elde ettikleri EA'nın serviks kanseri üzerindeki antikanserojenik etkilerini belirlemek üzere HeLa hücrelerini kullanarak yaptıkları in vitro bir çalışmada EA'nın IGFBP7 geninin ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde arttırarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre yayılımı ve apoptoziste görev alan AKT/mTOR sinyal yolunu engellediğini ve böylece kanserli hücrelerin yayılımını önleyerek onları apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

EA ile muamele edilen kanserli ovaryum hücrelerinde EA, p53 ve p21 tümör supressör genlerinin seviyesini arttırmak ve siklin D1 ve siklin E'nin seviyesini azaltmak suretiyle hücre siklusunun G1 evresinde tümör hücrelerini apoptozise sevk etmiştir (Chung ve ark., 2013). Cheng ve ark. (2017), EA'nın pankreas kanseri üzerindeki olası etkilerini incelemek için insan pankreatik karsinoma hücre hattı (PANC-1) kullanarak in vitro, PANC-1 tümörlü fareleri kullanarak ise in vivo çalışmalar yapmışlardır. Sonuçta EA'nın konsantrasyona bağlı olacak şekilde in vitro ortamda kanserli hücrelerde hücre büyümesini, yenilenmesini ve yayılımını engellediğini, in vivo ortamda ise kanserli hücrelerde

hücre siklusunu G1 fazında durdurarak ve COX-2 ve NF-$_K$B genlerinin ekspresyonunu engelleyerek antitümör etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Constantinou ve ark. (1995) EA'nın in vitro ortamda kanserli hücrelerin gelişmesinde önemli rolü olan DNA topoizomeraz enziminin güçlü bir inhibitörü olduğunu ve EA'nın kanser hücrelerindeki topoizomeraz-I ve II gibi DNA replikasyonunda rol oynayan enzimlerin yapısını modifiye etmek suretiyle kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini bildirmişlerdir.

EA ile yapılan birçok çalışmada EA'nın tümör hücreleri üzerinde seçici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Losso ve ark. (2004)'nın yaptıkları bir çalışmada 1-100 µM konsantrasyonlardaki EA'nın seçici bir sitotoksisite ve antiproliferatif bir aktivite göstererek Caco-2 kolon kanseri, MCF-7 meme kanseri, Hs578T meme kanseri ve DU 145 prostat kanseri hücre soylarında apoptozise yol açtığını, buna karşılık HEL-299 normal insan akciğer fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmadığını bildirmişlerdir. Yine Larrosa ve ark. (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 1-30 µM konsantrasyonlardaki EA'nın Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak azaltırken, normal kolon hücrelerinde herhangi bir apoptotik etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca yine sağlıklı insan deri ve akciğer fibroblast hücrelerinde EA'nın hücre proliferasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Chung ve ark., 2013).

Seeram ve ark. (2005) ile Fjaeraa ve Nanberg (2009)' nın KB, CAL27 insan oral, HT-29 kolon, RWPE-1 prostat ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleriyle yaptıkları bir çalışmada 10-100 µM arası konsantrasyonlardaki EA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör bir etki oluşturduğunu, hücre canlılığını azalttığını ve apoptozisi uyardığını bildirmişlerdir. Han ve ark. (2006), EA'nın etkilerini incelemek üzere ortamına hidrojen peroksit konulmuş Çin hamster akciğer hücreleri (V79-4) ve insan sarkoma (HOS) hücrelerini kullanarak in vitro çalışmalar yapmışlardır. Sonuçta

EA'nın V79-4 hücrelerinde SOD- CAT- GP_X gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonunu arttırarak hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu ve HOS hücrelerinde ise Bax ve kaspaz-3 enzimlerinin aktivasyonunu arttırarak kanser hücrelerini apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde U87 insan glioblastoma ve C6 sıçan glioma hücre soylarında EA/ kitozan karışımıyla hazırlanan biyomateryal uygulamasının etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada EA'nın in vitro ortamda konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve in vivo koşullarda ise apoptozisi uyarmak ve anjiogenezisi inhibe etmek suretiyle tümör dokusunun büyümesini durdurduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2009). Ekinci (2009), sıçan C6 glioma hücrelerinin iki ve üç boyutlu hücre kültür modellerini kullanarak yaptığı bir çalışmada 1-100 µM EA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu ve canlılık oranını önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir.

Umesalma ve ark. (2014), EA'nın antikanserojenik etkisini belirlemek üzere 1,2-dimetil hidrazin (DMH) ile deneysel olarak kolon kanseri oluşturulmuş erkek albino Wistar sıçanlarını kullanarak yaptıkları in vivo bir çalışmada sıçanlara oral yoldan 15 hafta boyunca günlük 60 mg/kg v.a. EA vermişler ve sonuçta EA'nın tümörlü kolon hücrelerinde hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltarak antiproliferatif bir etki gösterdiğini ve aynı zamanda P53 gen ekspresyonunu arttırarak tümörü durdurduğunu ve de tümörlü hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

EA'nın insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücre hattı üzerinde antitümör etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere yapılan bir çalışmada hücrelere 22.5, 45 ve 90 µM konsantrasyonlarda verilen EA'nın konsantrasyona bağlı olarak hücre siklusunun G1/S fazlarında hücre bölünmesini inhibe ederek antiproliferatif bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca tümör hücrelerini apoptoza sevk edecek olan Bax ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonunu hızlandırmak ve apoptozu baskılayacak olan Bcl-2 proteinin ekspresyonunu yavaşlatmak suretiyle tümör hücrelerini apoptoza uğratarak antitümör etki

gösterdiğini saptamışlardır (Zhang ve ark., 2014). Kumar ve ark. (2016), ROS üretimi, DNA zararlarının oluşumu, p53 aktivasyonu ve apoptozis uyarılmış HeLa servikal karsinoma hücreleri üzerine EA ile kurkumin'in etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar EA ve kurkumin kombinasyonunun ROS üretimi ve DNA zararlarının oluşumunu arttırdığını ve de proapoptotik protein olan Bax'ın ekspresyonunu arttırarak tümör hücrelerini apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca her iki fitokimyasalın da HeLa hücreleri üzerinde HPV E6 onkogeninin aktivitesini azaltarak ve p53 geninin aktivitesini arttırarak anti-HPV etki gösterdiklerini bulmuşlardır.

Masamune ve ark. (2005), EA'nın PDGF-BB reseptörüne bağlı tirozin fosforilasyonunu engelleyip protein kinazı inhibe ederek pankreasta fibrozisi ve inflamasyonda rol alan stellat hücrelerde çoğalmayı ve göçü engellediğini göstermişlerdir.

EA'nın antikanserojenik etkisinin mekanizmasını açığa kavuşturmak amacıyla yapılan bir çalışmada EA'nın servikal kanser hücrelerinde apoptozisi siklinlere bağlı bir kinaz inhibitörü olan p21 (waf1/Cip1) ekspresyonunu p53'den bağımsız olarak arttırmak suretiyle gerçekleştirebileceği ileri sürülmüştür (Narayanan ve ark., 1999). Diğer yandan EA'nın mitokondriden sitozole salınan sitokrom-C düzeyi ile kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi apoptotik süreçte rol alan önemli proteazların miktarını arttırmak suretiyle apoptozisi uyardığı belirtilmiştir (Larrosa ve ark., 2006).

Falsaperla ve ark. (2005) prostat kanseri olan hastalar ile yaptıkları klinik bir araştırmada hastaya kemoterapi sırasında EA verilmiş ve hasta izlenime alınmıştır. Araştırıcılar kısa bir süre sonra EA'nın tümör hücrelerine direkt etkisi olmadığı halde kemoterapinin hasta üzerinde oluşturacağı toksik etkiyi büyük ölçüde engellediğini göstermişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda EA'nın Nrf2 (nuclear erythroid factor) antioksidan geninin aktivasyonunu, (Ding ve ark., 2014; Baluchnejadmojarad ve ark., 2017), siklooksijenaz 2 (COX-2) (Chatterjee ve ark., 2012) ve sitokinez geninin

inhibisyonunu (Anderson ve Teuber, 2010), NF-Kb (nuclear factor-kappa) geninin aktivasyonunu (Ahad ve ark., 2014), hücre yaşamını ve apoptozisi düzenleme (Ho ve ark., 2014) ve de antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmak (Anitha ve ark., 2013) gibi özellikleri sayesinde çeşitli yollarla hücrelerde meydana gelebilecek olan oksidatif stresi önlediği belirlenmiştir.

Barch ve Rundhaugen (1994), yaptıkları transfeksiyon çalışmalarında EA'nın çeşitli reaksiyonlar sonucunda meydana gelen oksidanların vücuttan atılımını sağlayan kinon redüktaz (QR) geninin transkripsiyonunu indüklemek suretiyle antioksidan olarak görev yaptığını göstermişlerdir. Pavlica ve ark. (2005) EA'nın nöral PC12 hücrelerindeki reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltarak hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu bildirmişlerdir.

Ateşşahin ve ark. (2006), çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kemoterapotik bir ajan olarak kullanılan ve hücrelerde oksidatif strese yol açan sisplatin (Cis-diamminedichloroplatinum=CP) ile uyarılmış sıçan böbrek hücrelerini kullanarak yaptıkları in vivo bir çalışmada sıçanlara 10 gün boyunca günlük 10 mg/kg EA vermiştir. Sonuçta EA'nın plazmadaki kreatin, üre ve kalsiyum seviyesinin yükselmesini engelleyerek CP'nin böbrekte nefrotoksisite ve stres oluşturma etkisini nötralize ettiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde Türk ve ark. (2011) CP ile oksidatif stres uyarılmış olan sıçan testislerini kullanarak yaptıkları in vivo bir çalışmada sıçanlara 8 hafta süreyle günlük 2 mg/kg EA vermişler ve sonuçta EA'nın testis hücrelerini MDA'yı (melandialdehit) azaltma ve SOD'u (süperoksit dismutaz) arttırmak suretiyle oksidatif strese karşı önemli ölçüde koruduğunu rapor etmişlerdir.

Hwang ve ark. (2010), EA'nın antioksidatif bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için oksidatif stresle uyarılmış hepatosit hücrelerini kullanarak in vitro, konkanavalin A (Con A) ile uyarılmış fare karaciğer hücrelerini kullanarak in vivo testler yapmışlardır. Sonuçta EA'nın in vitro ortamda apoptotik ve nekrotik hücresel zararı, mitokondriyal depolarizasyonu ve en önemlisi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek hepatosit hücrelerini oksidatif stresten

koruduğunu, in vivo ortamda ise glutatyon (GSH), alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) antioksidanların miktarını arttırarak hücre ölümünü engellediğini ve böylece fareleri, oluşabilecek karaciğer zararlarına karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Kim ve ark. (2013), EA'nın sitotoksik bir madde olan parakuat (PQ) ile muamele edilmiş insan alveol eritrosit hücreleri (A549) üzerine etkisini incelediği bir çalışmada EA'nın Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor) genini aktive ederek antioksidan özellik sağlamasına yardımcı olan HO-1 (heme oxygenase-1) ve NQO1 (quinone oxidoreductase 1) genlerinin ekspresyonunu arttırdığını ve böylece lipid peroksidasyonu ile intraselüler ROS miktarını azaltarak hücreleri oksidatif strese karşı koruduğunu göstermişlerdir.

Yine Saba ve ark. (2013), bleomycin (BLM) ve cyclophosphamide (CP) ile akciğer toksisitesi uyarılmış Wistar sıçanları ile yaptıkları çalışmada 15 mg/kg v.a EA'nın hidroksiprolin ve lipid peroksidasyon seviyesini, myeloperoksidaz aktivitesini ve nitrit oksit üretimini azaltarak akciğer hücrelerinde BLM ve CP kaynaklı oluşan oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığını kaydetmişlerdir.

Gehan ve Omar (2017), antikanser ilacı olarak kullanılan dexorubicin'in tedavi esnasında testislerde oluşturduğu toksisite üzerine EA'nın etkisini araştırdıkları bir çalışmada dexorubicin ile testis toksisitesi uyarılan Sprague-Dawley sıçanlarına 14 gün süreyle 20 mg/kg EA vermişlerdir. Araştırıcılar çalışmanın sonunda sadece dexorubicin verilen deney grubunda testis ağırlığının, sperm sayı ve hareketliliğinin, testesteron hormon miktarının, testiküler glikojen ve sialik asit miktarının azaldığını, bununla birlikte oksidatif stres, tümör nekrozis faktör alfa (TNF α)'nın arttığını bildirmişlerdir. Ancak dexorubucin ile muameleden sonra EA ilave edilen gruplarda EA'nın bu negatif yöndeki değişiklikleri büyük ölçüde tolere ederek testislerde oluşan toksisiteyi büyük ölçüde önlediğini göstermişlerdir.

Ergen ve ark. (2017), sodyum selenit ile deneysel olarak katarakt oluşturulmuş Sprague-Dawley sıçanları ile yaptıkları çalışmada intraperitonal

yoldan sıçanlara verilen 50 mg/kg EA'nın glutatyon (GSH) ve total antioksidan kapasitesini (TAS) kontrole oranla önemli ölçüde yükselttiğini ve melondialdehit (MDA) ile total oksidan kapasitesini (TOS) kontrole oranla önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır.

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada *Barringtonia racemosa* bitkisinden elde edilen EA'nın süperoksit dismutaz ve katalaz gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu belirtilmiştir (Kong ve ark., 2016).

Feng ve ark. (2009) EA'nın nöroprotektif bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek üzere $A\beta_{42}$ ile uyarılmış SH-SY5Y hücre hattını kullanarak bir çalışma yapmış ve sonuçta EA'nın oluşan nörotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde nörodejeneretif bir hastalık olan Alzheimer (AD)'e yol açan beta-amiloid$_{25-35}$ ($A\beta_{25-35}$) ile muamele edilmiş sıçan PC12 (fekromositoma) hücre hattı kullanarak yapılan bir çalışmada EA'nın ROS üretimini ve hücrelerarası sıvıya Ca^{++} iyonlarının geçişini azaltma yoluyla PC12 hücrelerinde oluşabilecek hücre zararlarını önemli ölçüde azaltarak nöroprotektif bir etki gösterdiği saptanmıştır. (Shen ve ark. 2017). Baluchnejadmojarad ve ark. (2017) parkinsonlu sıçanlara tedavi amaçlı verilen 6-hidroksidopamin (6-OHDA)'nin sıçan beyninde oluşturacağı nörotoksisite üzerine EA'nın olası etkilerini incelemek üzere yaptıkları çalışmalarda 6-OHDA verilen hastalara daha sonra bir hafta boyunca günlük 50 mg/kg EA vermişlerdir. Sonuçta EA'nın melondialdehit (MDA), reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA fragmentasyonunu azalttığı, monoamin oksidaz B (MAO-B), nükleer faktör-2 (Nfr-2) ve hemoksijenaz 1 (HO-1) miktarını ise arttırdığı ve dolayısıyla nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Farbood ve ark. (2015a ve 2015 b) da EA'nın 6-OHDA'nın beyinde oluşturacağı nöroinflamasyonu büyük ölçüde önleyerek travmatik beyin yaralanmalarına karşı beyni koruduğunu bildirmişlerdir. Liu ve ark. (2017a) EA'nın iskemik felçli sıçanlar üzerindeki etkisini belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada EA'nın nöron canlılığını ve Bcl-

2/Bax ekspresyon oranını arttırarak ve apoptozla hücre canlılığını azaltarak sinir bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırıcıların iskemik felçli sıçanları kullanarak yaptıkları benzer bir çalışmada EA'nın Wnt/β-katenin sinyal yolu aracılığıyla nöral kök hücrelerinin (NSC_S) proliferasyonunu arttırarak nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu bir etki sağladığı saptanmıştır (Liu ve ark. (2017b).

Hemmati ve ark. (2017), EA'nın lösemi ve tüberküloz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan arsenik trioksit (As_2O_3) ile kardiyotoksisitesi uyarılan erkek Wistar sıçanları üzerinde herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere sıçanlara oral yoldan günlük 30 mg/ kg olacak şekilde 10 gün boyunca EA vermişlerdir. Araştırıcılar sonuçta EA'nın As_2O_3 kaynaklı artan glutatyon peroksidaz ve malandialdehit konsantrasyonunu azaltarak kardiyak doku yaralanmasını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığını ve dolayısıyla kardiyoprotektif bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Lin ve Yin (2013) ve Keshtzar ve ark. (2016) EA'nın kardiyoprotektif özelliğe sahip olmasının altında yatan mekanizmayı EA'nın reaktif oksijen türlerinin üretimini engellemek, lipid peroksidasyonu ve azalan kaspaz-3 aktivitesine karşı korumak, mitokondriyal zararları önlemek, $NF\text{-}_KB$ geninin aktivitesini ve seviyesini baskılamak ve kinaz 1/2 (p-ERK 1/2) ekspresyonunu düzenlemek gibi görevlerinin olmasına bağlamışlardır.

Thresiamma ve Kuttan (1996) karaciğer doku hattı kullanarak yaptıkları bir çalışmada EA'nın karaciğerdeki fibrozisi azalttığını göstermişlerdir. Yine Thresiamma ve ark. (1998)'nın (1.5- 3.0 Gy) radyasyona maruz bırakılan farelerin kemik iliği hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada hücreleri 200 µM EA ile muamele etmişlerdir. Sonuçta EA'nın kromozomal bozukluk gösteren kemik iliği hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Narayanan ve ark. (1999) sıçan periferal kan lenfositleriyle yaptıkları bir çalışmada EA'nın sıçan lenfositlerinde radyasyona bağlı oluşan DNA dizilim defektlerini önemli ölçüde azalttığını ve oluşan tümör hücrelerini hücre siklusunun G1 fazında aşırı büyümeye

sevk ederek apoptozise uğrattığını bulmuşlardır. Leskovac ve ark. (2007) γ ışınlarına maruz bırakılarak mutasyon oluşturulmuş insan periferal lenfositlerini EA ve gallik asit içeren *Crataegus monogyna, Cornus mas* ve *Gentianella austriaca* bitki ekstraktlarını çıkartmışlar ve hücrelerin 0.1- 0.2- 0.3 ve 0.4 mg/ml dozlarıyla muamele etmişlerdir. Sonuçta EA ve gallik asit'in radyasyona uğramış hücrelerde mikronukleus sayısını, lipid peroksidasyonunu ve hücre canlılığını azaltarak hücreleri apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Salem ve ark. (2016), γ ışınları ve aliminyum klorid ($AlCl_3$) ile uyarılan sıçanlarda oluşan oksidatif zararlara karşı EA'nın koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sonuçta EA'nın γ ışınları ve $AlCl_3$'ün neden olduğu hepatik yaralanmaları iyileştirdiğini, karaciğerdeki MDA, PPC ve GSH seviyesini azalttığını, CAT, GP_X ve SOD aktivitesini yükselttiğini ve tüm bu değişiklikler sonucunda $AlCl_3$ ve γ ışınlarının indüklediği oksidatif zararlara karşı sıçanları koruduğunu bulmuşlardır.

Sepand ve ark. (2016), Gentamisin (GEN) ile muamele sonucunda oksidatif zarar, mitokondriyal bozukluk ve nefrotoksisite görülen sıçanlar üzerindeki EA'nın koruyucu etkisini belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada sıçanlara intraperitonal yoldan 10 gün boyunca günlük 10 mg/kg v.a. EA vermişlerdir. Sonuçta EA'nın GEN kaynaklı plazmada artan kreatin ve üre seviyesini önemli ölçüde azalttığını, lipid peroksidaz, katalaz (CAT), süperoksit dismütaz (SOD) enzimlerinin aktivitesini düzenleyerek oksidatif stresi büyük ölçüde engellediğini bulmuşlardır. Ayrıca mitokondrideki reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek GEN'nin sebep olduğu mitokondriyal zararları da engellediğini bildirmişlerdir.

EA'nın L-arjinin ile akut pankreatit oluşturulmuş sıçanlar üzerindeki terapatik etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada sıçanlara oral yoldan 85 mg/kg v.a. EA verilmiş ve 24 saat sonunda serumdaki TNF-α, IL-1β, IL-6, TAS ve TOS seviyeleri incelenmiştir. Sonuçta EA'nın L-arjinin'in arttırdığı TOS seviyesini önemli ölçüde azalttığı ve aynı ölçüde TAS seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca EA ile muamele edilen grubun serumunda bulunan TNF-α, IL-1β ve IL-6

seviyesinin L-arjinin ile muamele edilen gruba oranla önemli ölçüde daha az olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2016).

Cozzi ve ark. (1995), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve mitomisin-C ile uyarılan Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerini kullanarak yaptıkları in vitro bir çalışmada EA'nın reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve dolayısıyla DNA'ya bağlanmasını engelleme yoluyla DNA hasarlarını önlediğini bildirmişlerdir.

Labieniec ve Gabryelak (2003), EA'nın Çin hamsteri B14 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisini incelemek için kolorimetrik MTT testini ve oluşabilecek DNA zararlarını tespit etmek için ise komet testini kullanmışlardır. Sonuçta EA'nın MTT testine göre hücre canlılığını azaltarak sitotoksik bir etki oluşturduğunu ve komet testine göre ise DNA zincir kırıklarının oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Adluri ve ark. (2007) ile Sudheer ve ark. (2007) daha önce yapılan Komet ve MN deneylerinde toksik konsantrasyonu belirlenen nikotin (3 mM) ile sıçan periferal kan lenfositleri muamele edilmiş ve lipid proksidaz seviyesi, DNA zararları ve mikronükleus sayısı artmış hücrelerin ortamına 10, 50, 100, 150 ve 300 µM EA ilave etmişlerdir. Sonuçta EA'nın tüm konsantrasyonlarda hücrelerdeki lipid peroksidaz enziminin aktivitesini azaltarak lipid peroksidasyonu ve toksisiteyi önlediğini ve DNA zararlarının oluşumunu önleyerek mikronukleus sayısını önemli ölçüde azalttığını, ancak maksimum korumanın 100 µM konsantrasyondaki EA ile sağlandığını bildirmişlerdir.

Soni ve ark. (1997), TA 98 ve TA 100 suşlarını kullanarak yaptıkları Salmonella testinde EA'nın aflatoxin B_1 (AFB_1)'in oluşturacağı mutajeniteyi engellediğini ve aynı zamanda in vitro ve in vivo çalışmalarda EA'nın sahip olduğu hepatoprotetif özelliği sayesinde karbontetraklorür'ün toksik etkilerine karşı hücreleri koruduğunu bildirmişlerdir.

Gradecka-Meesters ve ark. (2011), C57BL/6J fare hücre hattı kullanarak yaptıkları komet testinde EA'nın, farelere 30 mg/kg konsantrasyonlarda verilen benzopren (BP)'nin DNA'da oluşturacağı zararları büyük ölçüde önlediğini ve fare

kemik iliği hücrelerindeki polikromatik eritrositlerde BP kaynaklı mikronukleus oluşumuna karşı hücrede koruyucu bir etki oluşturduğunu bulmuşlardır.

EA'nın antigenotoksik ve antioksidatif bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek üzere erkek Swiss albino fareleri kullanılarak yapılan in vivo bir çalışmada siklofosfamid (CMP) ile uyarılmış fare kemik iliği hücrelerine 7 gün boyunca intraperitonal yoldan (50 ve 100 mg/kg v.a) EA verilmiş ve muamele sonunda MN testi yapılmıştır. Deney sonucunda EA'nın MN oluşumunu kontrole oranla önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada farelerin böbrekleri kullanılarak yapılan çeşitli enzimatik testlerde EA'nın böbrek hücrelerinde siklofosfamid kaynaklı oksidatif stresi ve ardından devam edecek olan DNA zararlarını ve genotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Muneeb ve ark., 2012).

Godevac ve ark. (2011)'nın insan periferal lenfositlerini kullanarak yaptıkları in vitro MN testinde böğürtlen tohumlarından elde edilen EA ve türevlerinin sitokalasin-B ile muamele edilen hücrelerde MN oluşum sıklığını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Berni ve ark. (2012), EA'nın antigenotoksik bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla insan hepatoma hücreleri (HepG2) ile in vitro ve fare kemik iliği hücreleri ile ise in vivo yaptıkları MN testlerinde hücreleri kanserojen bir madde olan N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ile muamele etmişledir. Sonuçta EA'nın gerek in vivo gerekse in vitro yapılan çalışmalarda MN oluşum sıklığını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Ayrıca çeşitli hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda EA'nın karaciğerdeki dihidroksiprolin ve lipid peroksidaz enzimlerinin seviyesini önemli ölçüde azaltarak lipid oksidasyonunu engellediğini ve ayrıca karaciğerde yıkım olaylarını uyararak kanserojen maddeleri kandan uzaklaştırdığı gösterilmiştir (Tell 1986; Ahn ve ark., 1996; Thresiamma ve Kuttan, 1996).

Hartman ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada EA içeriğinden dolayı nar suyu verilen Alzheimer'lı laboratuaar hayvanlarında EA'nın beyinde hastalığa yol açan amiloid miktarını azalttığını gözlemlemişlerdir.

Abdallah ve ark. (2011), streptozotosin ile uyarılan diyabetik sıçanlarda cevizin kabuğundan izole ettikleri EA'nın hipoglisemik ve antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Nutan ve ark. (2013), Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) tohum ve yapraklarından elde etikleri EA'nın HIV-1 (Human immunodeficiency virus)'in ile enfekte edilmiş yapraklardan elde edilen hücreler ile muamelesi sonucu EA'nın HIV-1'in revers transkriptaz enziminin çalışmasını inhibe etmek suretiyle HIV-1'in enfeksiyonunu engellediğini göstermişlerdir.

Girish ve Pradhan (2012) karbontetraklorür ile karaciğer toksisitesi oluşturulan Swiss Albino fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada 7 gün boyunca günlük 50 ve 100 mg/kg EA verilen farelerde EA'nın karaciğer nekrozunu, yağ birikimini ve iltihabi reaksiyonları azalttığını göstermişlerdir.

Baeeri ve ark. (2017) fosalon (PLN) ile senesens uyarılmış sıçan embriyonik fibroblast (REF) hücreleri üzerine EA'nın koruyucu etkisinin olup olmadığını belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada EA'nın PLN kaynaklı toksisiteyi azalttığını, TNF-α, IL-1β, IL-6 ve NF-$_K$B gibi inflamasyon faktörlerinin miktarını azalttığını ve sonuç olarak REF hücrelerini senesense karşı kontrole oranla önemli ölçüde koruduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2017), EA'nın antiglioblastoma etkilerini belirlemek üzere insan glioblastoma hücre hatları olan U87 ve U118 ile in vitro, deneysel olarak glioblastoma oluşturulmuş fareler ile ise in vivo çalışmalar yapmışlardır. Sonuçta araştırıcılar EA'nın glioblastoma hücrelerinde in vitro ortamda hücre canlılığını ve PI'yı önemli ölçüde azalttığını, in vivo ortamda ise Akt ve Notch sinyal yollarını inhibe ederek tümör büyümesini engellediğini, matriks metalloproteinleri olan MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunu engellediğini, Bcl-2, siklin D1, CDK-2 (siklin bağımlı kinaz-2) ve CDK-6'nın ekspresyonu engellediğini saptamışlardır.

Silfeler ve ark. (2017), 15-45 mg/kg v.a. konsantrasyonunda parakuat herbisidi kullanılarak böbrekleri zarara uğratılmış sıçanlar üzerindeki EA'nın koruyucu etkisini belirlemek üzere yaptıkları bir çalışmada sıçanlara oral yoldan yine aynı konsantrasyonlarda EA vermişler ve sonuçta EA'nın parakuat'ın böbrekte oluşturduğu zararları kontrole oranla büyük ölçüde önlediğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada test maddesi olarak doğal antioksidan grubunda yer alan ve bitkisel kaynaklı fenolik bir bileşik olan elajik asit (EA), deney materyali olarak da sigara içmeyen yaşları birbirine yakın sağlıklı iki erkek (22-24 yaşlarında) ve iki kadından (22-24 yaşlarında) alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Elajik Asit (EA) ve Kimyasal Özellikleri

EA ahududu, böğürtlen, çilek ve nar gibi üzümsü taze meyveler ile ceviz, kestane ve fındık gibi kabuklu meyvelerin yapısında elajitanin şeklinde bulunan bitkisel kaynaklı fenolik bir bileşiktir. Bu meyvelerin yapısında bulunan EA dilakton ve heksahidroksidifenik asit gruplarını içerir ve tanenlerin hidroliz olması sonucu oluşur (Talcott ve Lee, 2002; Seram ve ark., 2004; Vekiari ve ark., 2008). Üzümsü meyvelerin yapısında bulunan elajitaninler bitki hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Bu salgılanma sürecinden sonra elajitaninler yine bitkilerce şeker molekülleri ile birleştirilerek EA formuna dönüştürülür. Böylece EA bitkilerde dış ortama salgılanan kimyasal bir asit olarak işlev görür (Amakura ve ark., 2000; Bala ve ark., 2005). Bitkiler tarafından salgılanan EA sıçan (Cerda ve ark., 2003), domuz (Espin ve ark., 2007) ve insanlarda (Cerda ve ark., 2004) kolon mikroorganizmaları tarafından dekarboksilasyon ve dehidroksilasyon reaksiyonları aracılığıyla metabolize edilerek ürolitin A ve onun metaboliti olan ürolitin B'ye dönüştürülür (Landete, 2011). Bunlardan ürolitin A elajitaninlerin vücuda alınımından sonra plazmada bulunan temel metabolit olup antioksidan ve antienflamatuar aktiviteye sahiptir (Ishimoto ve ark., 2011).

Smart ve ark. (1986) oral yolla alınan EA'nın 24 saat içinde gastrointestinal sisteme geçtiğini ve buradan yaklaşık % 19'unun dışkı ve % 22'sinin ise ürin olarak atıldığını belirtmişlerdir. Yine aynı araştırıcılar oral yolla

alınan EA'nın az miktarda absorbe edilip, hızlıca eliminasyona uğradığını bildirmişlerdir. Sıçanlara oral yolla verilen EA'nın sadece % 10'u idrar ve dışkıda tespit edilmiştir (Doyle ve Griffiths, 1980). Özellikle lipofilik formdaki EA'nın tamamı incebağırsak mukozasından hızlıca emilerek genel dolaşıma katılmaktadır (Cerda ve ark., 2004). Genel dolaşımdan hücre içerisine geçen EA ise DNA ve proteinlere geri dönüşümsüz olarak bağlanmaktadır (Whitley ve ark., 2003).

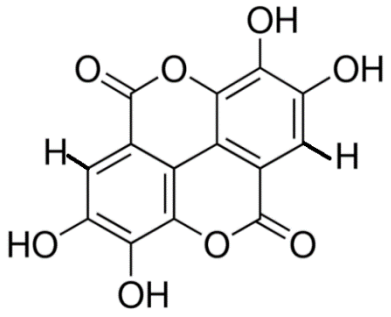
EA lipid peroksidasyonunda antioksidan aktiviteyi arttırıcı ve oksidatif hasarlara karşı hücre koruyucu etkiyi sağlayan 4 hidroksil grup (OH^-) ve 2 lakton halkasından oluşur (De Boer ve ark., 2004; Pari ve Siyasankari, 2008).

Büyük çapta olumlu etkilerinin olması sebebiyle önemi giderek artan EA Japonya'da sahip olduğu güçlü antioksidan aktivitesi sebebiyle besin katkısı olarak onay almıştır (Priyadarsini ve ark., 2002).

EA'nın kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğine dair çalışmalar ilk defa 1980'li yıllarda yapılmıştır. 1982 yılında ise EA'nın bakteri hücreleri ve Çin hamsteri V79 hücrelerinde in vitro karsinojenlerin etkisini azalttığı gösterilmiştir (Wood ve ark., 1982). Daha sonra tümörlü insan hücre hattı kullanılarak yapılan çok sayıdaki in vitro çalışmalarda EA'nın hücre proliferasyon ve apoptozis üzerine olan etkileri gösterilmiştir (Ateşşahin ve ark., 2010; Hwang ve ark., 2010).

3.1.1.1.(1). Elajik Asit'in Kimyasal Yapısı

EA'nın moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir (http:en.wikipedia.org/wiki/Elajik Asit):



Şekil 3.1. EA'nın açık foı

Kimyasal adı : EA (4,4',5,5',6,6'-hexahydroxydiphenic acid 2,6,2',6'-dilactone)

Kapalı formülü : $C_{14}H_6O_8$

Açık Formülü : Şekil 3.1

Molekül ağırlığı : 302.197 g/mol

Yoğunluk : 1.67 g/m^3

Çözünürlük : 1M NaOH içinde

Fiziksel durumu : Krem, toz

Erime sıcaklığı (ºC) : > 360 °C, > 680 F

CAS No : 476-66-4

3.1.1.2. Biocoll

Biocoll (Biochrom CAS No: L 6715) komet testinde lenfosit ayıracı olarak kullanılmıştır.

3.1.1.3. 5' Bromo 2' deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd, Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği, bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir. BrdUrd'nin moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı : 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

Kapalı formülü : $C_9H_{11}BrN_2O_5$

Molekül ağırlığı : 307.10 g/mol

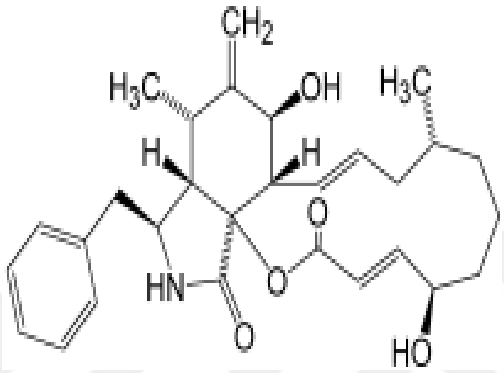
Erime noktası : 191-194 ºC

CAS No : 59-14-3

Sigma No : B 5002

3.1.1.4. Cytochalasin B

Mikronükleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla sitokalasin-B (Sigma) kullanılmıştır (6 µg/ml). Cytochalasin'in moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.2. Sitokalasin B'nin açık formülü

Kimyasal adı : Cytochalasin B
Kapalı formülü : $C_{29}H_{37}NO_5$
Açık formülü : Şekil 3.2
Molekül ağırlığı : 479.61 g/mol
Erime noktası : 218-223 ºC
Kaynama noktası : 218-223 ºC
Saflık düzeyi : % 98
CAS No : 14930-96
Sigma No : C-6762

3.1.1.5. Elektroforez Tamponu

Komet testinde elektroforez işlemini gerçekleştirmek için kullanılan elektroforez tamponu 10 M NaOH ve 0.2 M EDTA bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 1350 ml saf su ilave

edilmiştir. Çözeltinin pH'ı >13 olarak ayarlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 ºC'de saklanmıştır.

3.1.1.6. Entellan

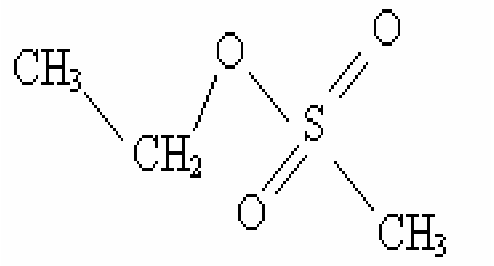
Şeffaf preparat kapatma solüsyonudur (Merck, CAS. No: 1.07961). Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılmıştır.

3.1.1.7. Etidyum Bromid (EtBr)

Bir floresan boya olan EtBr (Sigma Cas No: 1239-45-8) komet testinde DNA'nın boyanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için EtBr'den 1 mg alınıp üzerine 10 ml saf su ilave edilerek son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.1.8. Etil Metan Sülfonat (Ethyl Methanesulphonate=EMS)

KA, KKD ve MN testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. EMS % 50'lik alkolde son konsantrasyonu 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanmıştır. EMS'nin moleküler yapısına ait özellikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.3. EMS'nin açık formülü

Kimyasal adı **:** Ethyl methanesulphonate, Methanesulfonic acid ethyl ester
Kapalı formülü **:** $C_3H_8O_3S$
Açık formülü **:** Şekil 3.3

Molekül ağırlığı **:** 124.16 g/mol
Yoğunluğu **:** 1.15 g/cm^3
Erime noktası **:** < 25°C
Kaynama noktası **:** 213-213.5 °C
Saflık düzeyi **:** ≥% 99.9
CAS No: **:** 62-50-0

3.1.1.9. Fiksatif

KKD ve KA'yı incelemek amacıyla yapılan preparasyon için kullanılan fiksatif, 1 hacim glasial asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır.

MN'leri incelemek amacıyla yapılacak olan preparatların hazırlanmasında ise iki farklı fiksatif kullanılmıştır. İlk fiksatif muamelesi 1 kısım glasial asetik asit'in 5 kısım metanol ile karıştırılmasından sonra bu karışımın 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle (1 glasiyal asetik asit / 5 metanol / 6 NaCl) hazırlanmıştır. Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden (1/5) kullanılmıştır.

Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve ağzı kapalı cam bir kapta buzdolabında (+4 ºC) saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.10. Fosfat Tamponu (PBS)

PBS , komet testinde hücre kültürü için kullanılmıştır.

3.1.1.11. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (CAS. No: 1.09204) temin edilmiştir. Sorensen tamponu içerisinde hazırlanmış ve filtre edilmiş % 5'lik boya eriyiği, kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır. Boya her seferinde taze hazırlanmıştır.

3.1.1.12. Glasiyal Asetik Asit

Glasiyal asetik asit (CAS No: 64-19-7) KA, KKD ve MN testlerinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.13. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (CAS No: 7722-84-1) komet testi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Saf haldeki H_2O_2'den 6 µl alınıp 1000 µl saf suya tamamlanarak stok hazırlanmıştır. H_2O_2'nin bekletilmesinden doğabilecek olumsuz etkileri önlemek amacıyla her komet testi için taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.1.14. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0.4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam bir kap içerisinde buzdolabında (+4ºC) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda eriyik alınıp, inkübatör ile 37ºC'ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır.

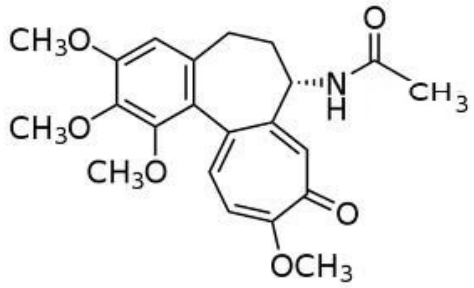
3.1.1.15. HMA Agar (High Melting Agar=Yüksek Kaynama Dereceli Agar)

HMA agar (Sigma CAS No: 9012-36-6) komet testinde lamların kaplanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için HMA agardan 0.65 gr alınıp 100 ml saf suda ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra rodajlı lamların tek tarafı hazırlanan bu agarla kaplanmış ve lamlar kurumaya bırakılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Lamların agarla kaplanması işlemi deneyden 1 gün önce yapılmıştır.

3.1.1.16. Kolşisin (Kolkisin)

Kolşisin (Colchicine) kromozomları incelemek için yapılan preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg

olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolşisin'e ait bazı özellikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.4. Kolşisin'in açık formülü

Kimyasal adı : Colchicine
Kapalı formülü : $C_{22}H_{25}NO_6$
Açık formülü : Şekil 3.4
Molekül ağırlığı : 399.4
Etil asetat içeriği : % 3.4
Kloroform içeriği : <% 0.1
CAS No : C-9754

3.1.1.17. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB Max. kromozom medyumu (CAS. No. 12557-013) hücre kültürü için kullanılmıştır. PB Max. medyumu tam medyumdur. Fakat heparin içermemektedir.

Bu medyum her tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir (12 ml'lik vida kapaklı, Cellstar, Cat No: 164 160)

3.1.1.18. Lizis Çözeltisi

Komet testinde lysing solüsyonunun bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Lizis solüsyonu 2.5 M NaCl (Merck CAS No: 1.06404), 10 µM EDTA (Sigma CAS No:

6381-92-6), 10 mM Tris (Merck CAS No: 77-86-1) ve saf su bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 270 ml saf su konup bir erlen içerisinde ısıtılarak çözülmüş ve soğuma işlemi gerçekleştikten sonra 10 M NaOH ile pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.1.19. LMA Agar (Low Melting Agar=Düşük Kaynama Dereceli Agar)

LMA agar (Sigma CAS No: 39346-81-1) komet testinde hücrelerin sandviç modeli gibi agara gömülmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için LMA agardan 0.065 gr tartılıp 10 ml saf suda kaynatılmıştır. Hücrelerin agarla karıştırılması işleminde agarın el yakmayacak sıcaklıkta olmasına özen gösterilmiştir.

3.1.1.20. Lysing Çözeltisi

Komet testinde DNA'daki hasar boyutunu belirlemek için çıplak DNA'nın elde edilmesi işleminde kullanılmıştır. Lysing solüsyonu 3 ml Triton X (Merck CAS No: 9036-19-5), 30 ml DMSO (Carlo ERBA CAS No: 67-68-5) ve 267 ml lizis çözeltisi kullanılarak son hacmi 300 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 ºC'de saklanmıştır.

3.1.1.21. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

KA, KKD ve MN testlerinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.1.22. Nitrik Asit (HNO_3)

Nitrik asit (Sigma 438073) lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

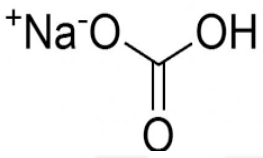
3.1.1.23. Nötralizasyon Tamponu

Nötralizasyon tamponu komet testinde elektroforezden çıkan preparatlarda pH dengesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. 0.4 M Tris (Merck Cas No: 77-86-

1) alınıp üzerine 300 ml saf su eklenmiştir. Daha sonra HCl ile çözeltinin pH'ı 7.5'e ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.1.24. Sodyum Hidroksit (NaOH)

1 M NaOH çalışmada EA eriticisi olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. NaOH'ın açık formülü

Kimyasal adı : Soydum hidroksit
Kapalı formülü : NaOH
Açık formülü : Şekil 3.5
Molekül ağırlığı : 40.0 g/mol
Yoğunluğu : 2.13 g/cm^3
Kaynama noktası : 1388 ºC
Erime noktası : 318 ºC
CAS No : 1310-73-2

3.1.1.25. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı: Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr $Na_2HPO_4.12H_2O$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

KKD'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde 254 nm dalga boyunda ışık yayan UV lambası ile

ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kapalı kaplarda saklanmıştır.

3.1.1.26. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

Bu eriyik, kromozom preparatlarının ışınlandırılmasından sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) (Merck 1.06448) ve 21.9 gr NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik 5xSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmasıyla elde edilen 1XSSC eriyiği kullanılmıştır.

3.1.1.27. Tripan Blue

Komet testi yapılırken izole lenfositlerin canlılık oranını belirlemek amacıyla tripan blue (Sigma CAS No: 72-57-1) boyası kullanılmıştır. Stok tripan blue hazırlamak için % 0.4'lük tripan blue'den 4 ml alınıp üzerine 1 ml saf su eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan stok tripan blue'den 10 µl alınıp üzerine 10 µl stok lenfosit ilave edilip canlılık testine bakılmıştır. Canlı hücreler şeffaf, ölü hücreler ise mavi renkte görülmüştür.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Elektroforez Sistemi

Komet testinde DNA örneklerini elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.2. Steril Kabin

Hücre kültürü tüplerine kromozom mediumu konulması, kan ekiminin yapılması ve test eriyiklerinin kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m^3/h emiş kapasiteli, UV ve fluoresan ampulü olan Labormed marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.2.3. Güç Kaynağı

Komet testinde DNA örneklerini yürütmek amacıyla elektroforez tankına bağlanabilen Cleaver nanoPAC-300 mA'lik güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.2.4. Hassas Terazi

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki Gec Avery marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.5. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında hipotonik eriyik ile muamele edilen hücrelerin 37ºC'de inkübe edilmesi ve bazı eriyiklerin 37ºC'ye kadar ısıtılmasında Incucell marka 0ºC-100ºC ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.1.2.6. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan Olympus marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital fotograf makinesi (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel) ile çekilmiştir. Komet testinde nükleus incelemeleri için de aynı marka floresan mikroskobu kullanılmıştır.

3.1.2.7. Otoklav

Test maddesinin belirlenen konsantrasyonlarını ayarlamak için kullanılan ekipmanların ve saf suyun steril edilmesi Hirayama marka otoklav ile sağlanmıştır.

3.1.2.8. pH Metre

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

3.1.2.9. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dakikaya kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli Hettich Universal marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.10. Soğutmalı Santrifüj

Komet testinde eppendorf tüplerindeki örneklerin santrifüj edilmesi amacıyla Vwr Micro Star 17 R marka soğutmalı santrifüj cihazı (24 x 2.2 - 1.5 mL rotor için maksimum 9.000 rpm hızına erişebilen) kullanılmıştır.

3.1.2.11. Su Banyosu (Benmari)

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60ºC'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 Nüve marka 0-60º ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu kullanılmıştır.

3.1.2.12. Vorteks

Örneklerin karıştırılması için çeşitli hız kademelerine sahip Velp. Scientifica marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit (HNO_3) konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır. Bu lamlar, preparat yapılacağı zaman buzdolabından çıkartılarak soğuk halde kullanılmıştır.

3.3. Sterilizasyon

3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda (İspirto ocağı yanında ve Flow kabinde) por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra ağzı vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Test Maddesinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi, Hazırlanması ve Sterilizasayonu

Test maddesinin deneylerde kullanılacak en uygun konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan doz belirleme çalışmaları sonucunda EA'nın sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Sitotoksik olmayan maddeler için kullanılabilecek en yüksek doz uygun çözücüde çözülebilecek maksimum miktarı olmalıdır (Madle ve ark. 1993). Çalışmamızda EA çözücüsü olarak 1 M NaOH kullanılmıştır. En yüksek konsantrasyon olarak çözücüde tamamen çözülebilen maksimum madde miktarı olan 100 µg/ml seçilmiştir. 60 µg/ml ve 80 µg/ml'lik diğer dozlar ise en yüksek dozun periyodik olarak seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

En yüksek konsantrasyonda 1 M NaOH'da çözülerek hazırlanan test maddesi BrdUrd eriyiğinde olduğu gibi filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Diğer

konsantrasyonlardaki test maddeleri ise flow kabin içerisinde steril şartlarda en yüksek konsantrasyondaki eriyikten hazırlanmıştır.

3.3.3. Saf Suyun Sterilizasyonu

Temiz vida kapaklı 100 ml'lik cam kültür şişesine saf su doldurularak şişenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum folyo ile örtülmüştür. Şişedeki saf su otoklavda 1.2 atm buhar basıncında ve 121°C'de 20 dk. steril edilmiştir.

3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İnceleme

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA ve MN testleri yardımıyla olabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslar arası yönergelere uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır. Bundan dolayı EA'nın insan lenfositlerindeki genotoksik veya antigenotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırıldığı bu çalışma Albertini ve ark. (2000)'ları tarafından yayınlanan IPCS (The International Programme on Chemical Safety) yönergesine göre gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Bu çalışmada KKD ve KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması için Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metodları modifiye edilerek kullanılmıştır.

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (22 ve 24) ve iki kadından (22 ve 24) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri

kromozom medyumuna (PB-Max, Gibco cat. no. 12552-013) steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1ºC'de 72 saat için inkübe edilmiştir.

EA'nın etkisini incelemek için kültür süresinin bitiminden 24 ve 48 saat önce daha önce belirlenmiş son konsantrasyonları olan 60, 80 ve 100 µg/ml'lik miktarlarındaki EA kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak EMS kullanılmıştır. EMS tüplere son konsantrasyonu 10^{-3} M olacak şekilde ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü ve bir de eritici kontrolü (1 M NaOH, 25 µl) vardır.

Ayrıca EMS'nin etkisine karşı EA'nın antigenotoksik etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak için de ayrı bir kültür serisinde her bir kültür tüpüne test maddesine ilaveten aynı anda EMS (10^{-3} M) eklenmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37ºC'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 2000 devir/dk. (rpm)'da 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37ºC'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 5 dk. hipotonik eriyikte 37ºC'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 devir/dk.'da santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda

sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 devir/dk.'da 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamların üzerine 50 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen tampon A, 5 ml Sorensen tampon B alınıp bu karşımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır.

Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 60ºC (±2ºC)'de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması:

4 ml tampon A, 4 ml tampon B ve 4 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 80 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kağıdı yardımı ile süzülmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 30 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra (en az iki gün) bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.4.3. Daimi Preparatlarda Mikroskobik İnceleme

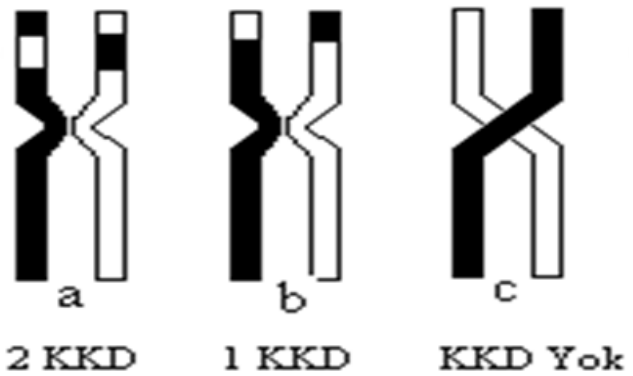
Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympos CX21 marka ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında KKD ve KA belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu değerler kullanılarak PI ve MI hesaplanmıştır.

3.4.3.1. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksi'nin (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

3.4.3.1.(1). KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.6.a).

Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.6.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.6.c).



Şekil 3.6. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

3.4.3.1.(2). Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması

EA'nın DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Bunun için her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan

tesadüfi seçilen 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak her bir kişinin kan kültüründeki PI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

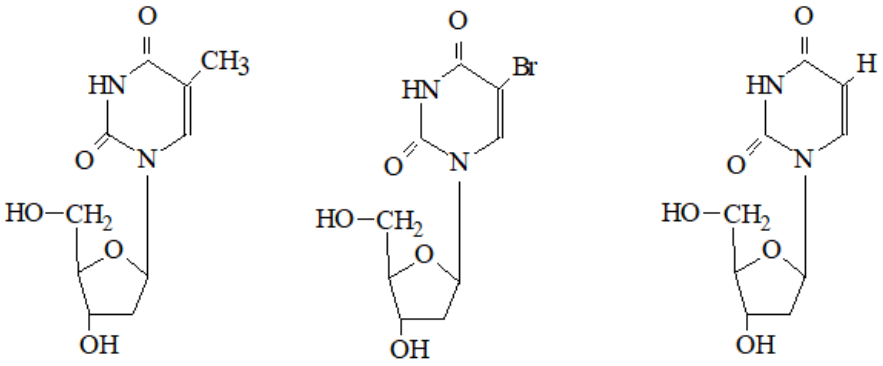
M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990):

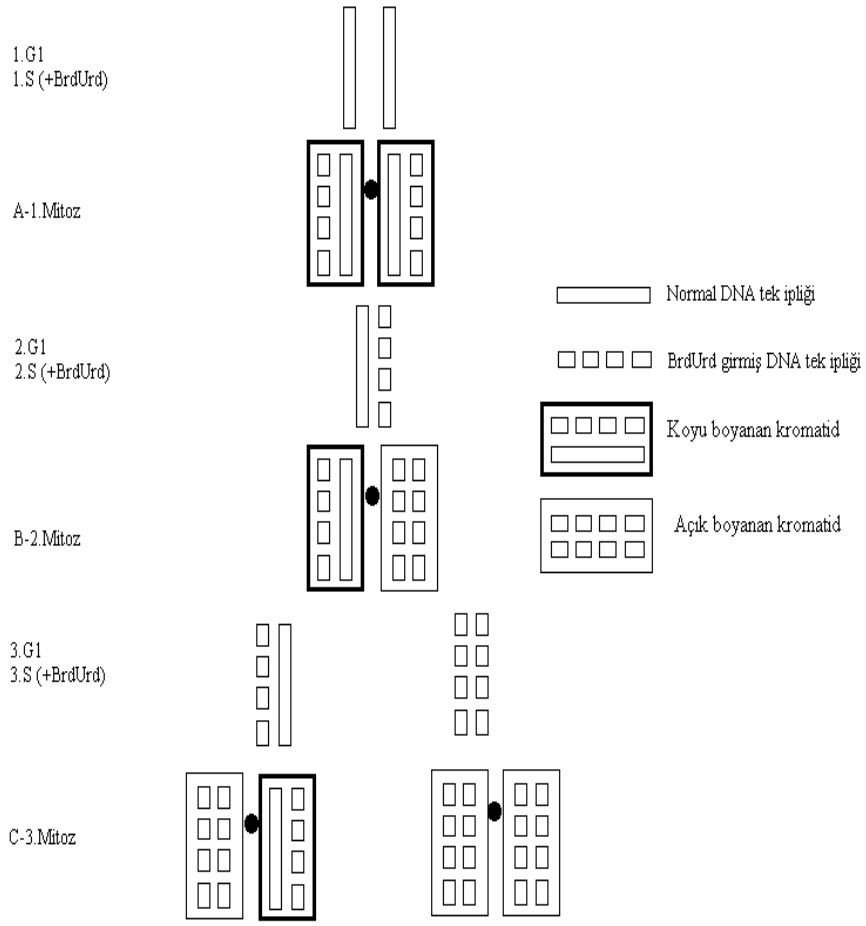
BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin anoloğu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH_3, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının anologu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT : dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 A ve Şekil 3.9). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd' li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinukleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır (BrdUrd/BrdUrd). İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/dT : BrdUrd/BrdUrd). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.8 B ve Şekil 3.10). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd/BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise (BrdUrd/ dT), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği timinli diğer ipliği BrdUrd'li olan bir kromozom (BrdUrd/BrdUrd:dT/BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır. İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil

3.8 C ve Şekil 3.11). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır.



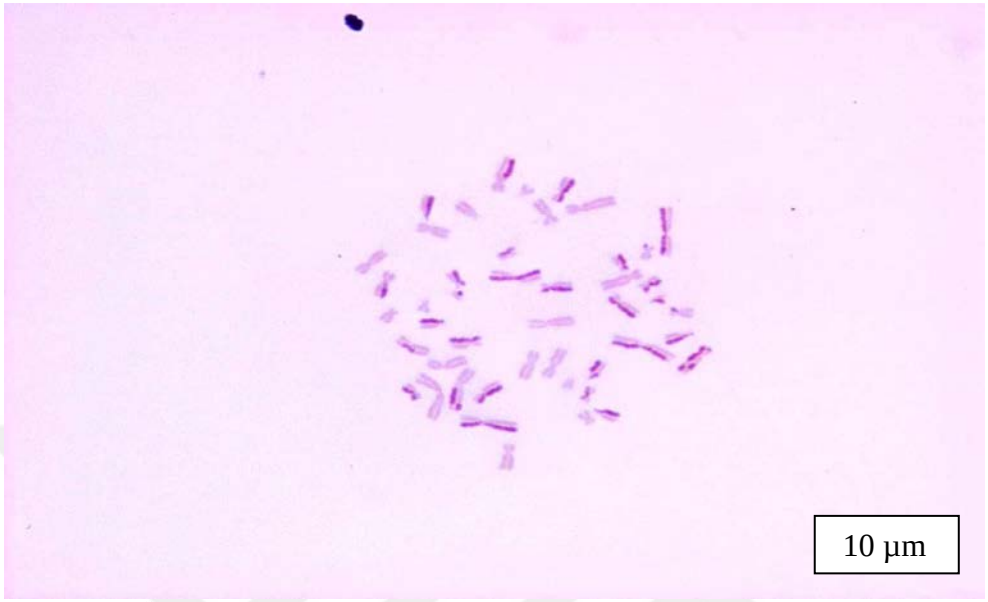
Şekil 3.8. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Gösterilmesi (During, 1985'e göre, Topaktaş ve Speit 1990'dan).



Şekil 3.9. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000.



Şekil 3.10. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000.



Şekil 3.11. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar. X1000.

3.4.3.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.4.3.2.(1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. KA'lı hücrelerin toplam incelenen hücreler (100 hücre) içerisindeki oranları hesaplanarak anormal hücre yüzdesi (%) belirlenmiştir. İncelenen 100 hücre içerisinde rastlanan toplam KA sayısı saptanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) bulunmuştur. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir (Mace ve ark. 1978). Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir (Kauderer ve ark. 1991'den): Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir

kromatidin kalınlığından daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda 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.

3.4.3.2.(2). Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

EA'nın mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'i belirlemek için her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında metafaz plaklarının sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde metafaz plaklarının oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.5. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İncelemeler

3.5.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro MN testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yönteme göre, sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki kadından (KA ve KKD testi için kan alınan kişiler) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) ekilmiştir ve hücreler 37±1ºC'de 68 saat inkübe edilmiştir.

Çalışmada doğal bir antioksidan olan EA'nın etkisini belirlemek için son konsantrasyon 60, 80 ve 100 µg/ml olacak şekilde EA kültür ortamına, kültürün

başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, çözücü kontrolü ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. Yine EMS'nin etkisine karşı EA'nın antigenotoksik etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarabilmek için kültür tüplerine test maddesine ilaveten EMS (10^{-3} M) eklenmiştir. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalasin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 devir/dk.da 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCI) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüj edilmiştir. Hipotonik eriyik, KKD ve KA deneylerinde olduğu gibi kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 1200 devir/dk.da 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCI) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 15 dk. muameleden sonra 1200 devir/dk.da 10 dk. daha santrifüj edilen tüplere bu kez glasiyal asetik asit / metanol (1/5) karışımından ibaret fiksatif ilave edilerek 10 dk. oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır (Bu fiksatif muamelesi iki kere tekrarlanmıştır). Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.5.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 4-5 dk. boyanmış ve boyanmış preparatlar üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek boyama işlemi durdurulmuş ve sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir.

3.5.3. Mikronukleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskobik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar Olympus marka ışık mikroskobunda 10 × 40=400 büyütmede incelenmiştir.

3.5.3.1. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması

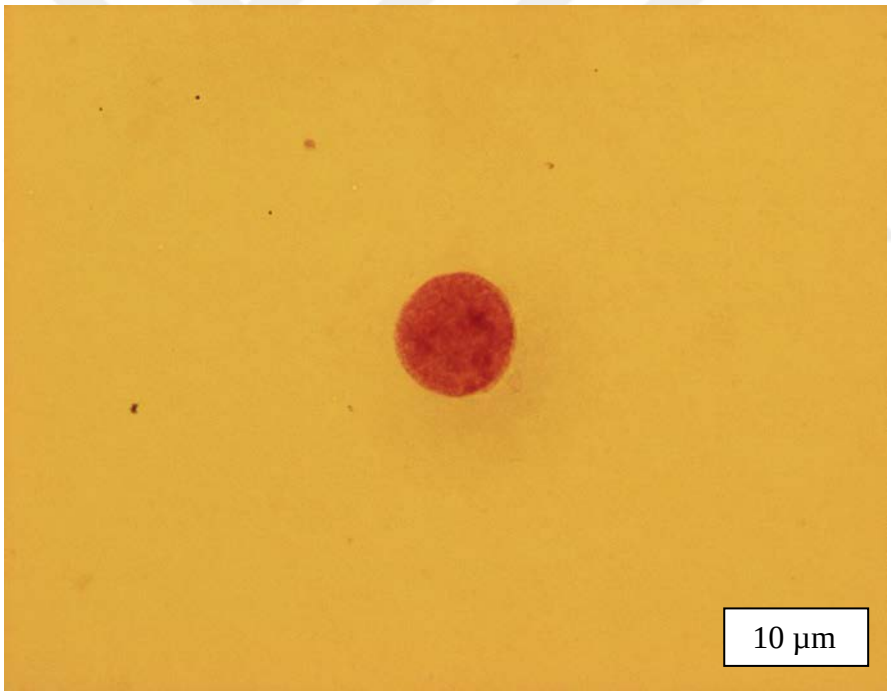
Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre (Şekil 3.13) incelenmiş ve bu binükleer hücreler içerisinden mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Böylece mikronükleuslu hücrelerin toplam hücrelere oranlanması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen hücre sayısına oranlanmasıyla de hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) saptanmıştır. Buradan da MN yüzdesi hesaplanmıştır.

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

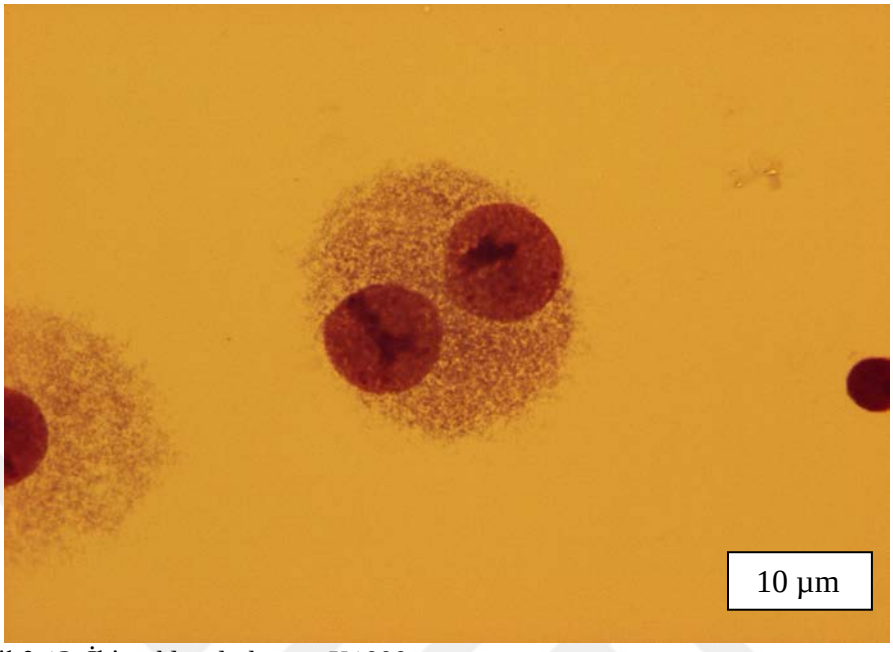
Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre populasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkanı vermesidir. Bu durum, sitokalasin-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, üç nükleuslu ve dört nükleuslu hücrelerin sayılarının belirlenmesiyle yapılır. Nükleus bölünme indeksi Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

NBI= (1x*MI* + 2x*MII* + 3x*MIII* + 4x*MIV*) / *N*

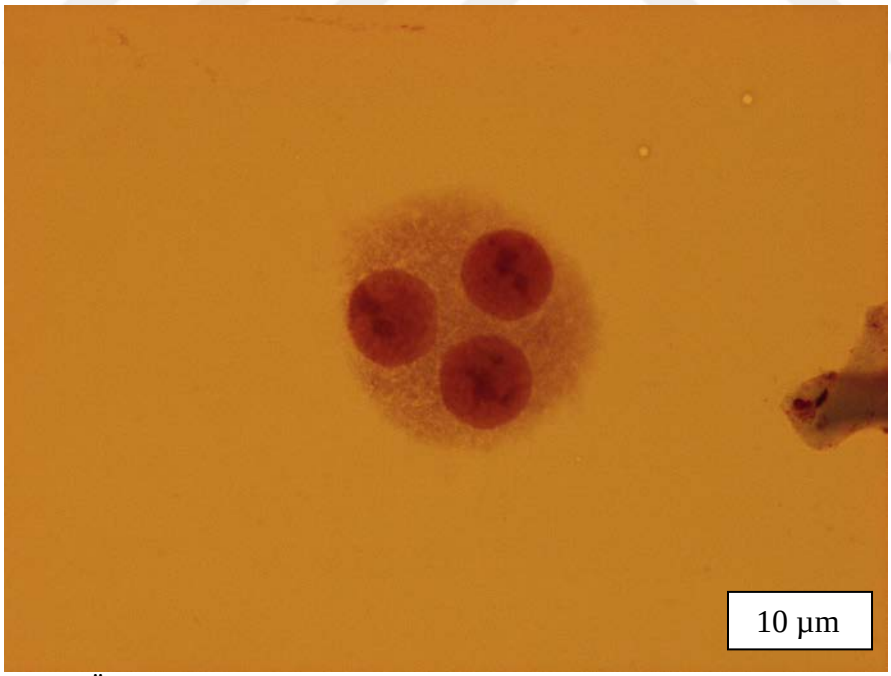
Formüle göre, *MI* bir nükleuslu (Şekil 3.12), *MII* iki nükleuslu (Şekil 3.13), *MIII* üç nükleuslu (Şekil 3.14), *MIV* dört nükleuslu (Şekil 3.15) hücrelerin sayısını, *N* ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal maddenin veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) (Nuclear Division Index=NDI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişide toplam 4000 hücre) incelenmiştir.



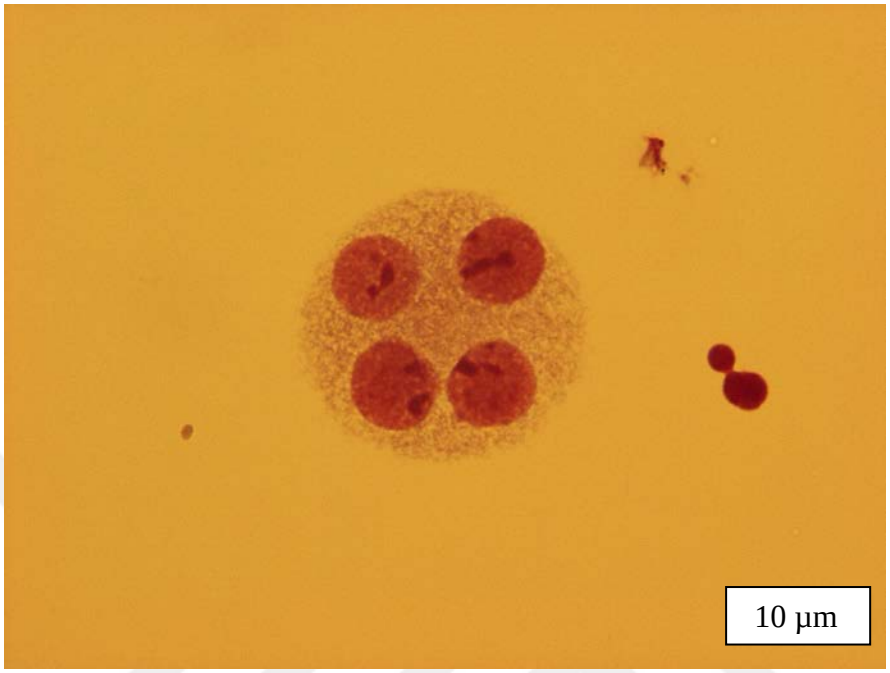
Şekil 3.12. Bir nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.13. İki nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.14. Üç nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.15. Dört nükleuslu hücre. X1000.

3.5.4. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, sık rastlanan ve ilginç olan KA'lara ait örneklerin, binükleer hücrelerden mikronükleusa sahip olanların ve 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. Komet Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskobik İnceleme

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Komet testinin uygulanması için preparatların hazırlanması ve gerekli diğer işlemler için Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metod laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Deney için sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek (22-24) ve iki kadından (22-24)

alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri ependorf tüplerine 100 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve üzerine 1000 µl PBS (Fosfat Tamponu) ilave edilerek kan süspanse edilmiştir. Bu şekilde tüpler 10 dakika süreyle buz üzerinde bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılacak tüm işlemler ışığın DNA molekülü üzerinde neden olabileceği tüm olumsuz etkileri engellemek amacıyla karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüplere lenfositleri izole etmek amacıyla 100'er µl biocoll eklenmiş ve bekletilmeden tüpler + 4 ºC ve 1000 devir/dakika (rpm)'da 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpler buz üzerine konulmuş ve 15-20 dakika bekletilerek lenfositlerin bulutsu bir yapı oluşturarak ara katmanda toplanması sağlanmıştır. Ara katmandan (lenfositler) 100 µl alınıp stok lenfosit oluşturmak üzere ayrı bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada izole lenfositlerde canlılık testine bakılmıştır. Bunun için temiz bir lam üzerine 10 µl seyreltilmiş tripan blue çözeltisi konulmuş ve üzerine kontrol tüpünden alınan 10 µl lenfosit ilave edilip süspanse edilmiştir. Ardından lamel ile kapatma işlemi yapılıp lenfositlerin canlılık oranına bakılmıştır. Şeffaf olarak görünen hücreler canlı, mavi renge boyalı olarak görünen hücreler ise cansız kabul edilmiştir. Deneye devam edebilmek için canlılık alt sınırının ≥ 90 olması dikkate alınmıştır. Canlılık testinin ardından daha önceden belirlenen dozlardaki test maddesi (EA) son konsantrasyonu 60, 80 ve 100 µg/ml olacak şekilde 100 µl içerisinde stok lenfositlere eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak % 35'lik hidrojen peroksit (H_2O_2) (100 µl), çözücü kontrol olarak % 50'lik DMSO (100 µl) ve kontrol olarak ise distile su (100 µl) kullanılmıştır. Tüplere test maddesi, pozitif kontrol, çözücü kontrol ve steril distile su ilave edildikten sonra hücreler 37 ºC' de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüpler + 4 ºC ve 3000 devir/dk' da 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant atılmıştır. Kalan lenfositlerin üzerine 100 µl PBS tamponu ilave edilerek tüpler dikkatlice karıştırılmıştır. Sonrasında daha önceden hazırlanan düşük kaynama dereceli LMA (low melting agar) agardan 75 µl alınıp ependorf tüplerinde bulunan 100 µl lenfosit ile hızlıca karıştırılmıştır. Bu karışımdan 150 µl alınıp bir gün önceden yüksek

kaynama dereceli HMA (high melting agar) agar kullanılarak kaplanmış olan lama yayılarak üzeri lamel ile kapatılmıştır. Kapatılan preparatlar kapalı kutu içerisinde 20-25 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda lam üzerindeki lameller tek bir hamlede yana çekilerek çıkartılmış ve lamlar içerisinde lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde preparatlar buzdolabında 16 saat (en az 1 saat en fazla ise 16 saat) bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamlar elektroforez tankında bulunan tampon içerisine konulmuş ve 25 V ve 300 mA'da 20 dakika elektroforezde DNA iplik parçalarının yürütme işlemi yapılmıştır. Elektroforez tankı bir gün önceden + 4 ºC'de bekletilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamlar elektroforez tamponundan dikkatli bir şekilde alınarak bir gün önceden hazırlanıp + 4 ºC'de bekletilen nötralizasyon tamponu içeren şale içerisine konulmuş ve yine + 4 ºC'de 5 dakika bekletilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. İşlemler sonrasında nötralizasyon tamponundan çıkartılan her bir lama 50 µl Etidyum Bromid (EtBr) (100 µg/ml) ilave edilerek hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Lamel ile kapatılan lamlar kapalı kutu içerisinde 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda fazla boyanın uçmasını sağlamak amacıyla lamlar karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde elde edilen preparatlarda EtBr'nin uçucu etkisinden dolayı görüntü kalitesinin bozulmaması için aynı gün içerisinde inceleme yapılmıştır.

3.7. Mikroskobik İnceleme

Etidyum bromid ile boyanmış preparatlar Olympus (CX31RTSF, 7.1 Megapixel) marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtre) altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan test maddesinin etkisini belirleyebilmek amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda her kişin her muamele grubu ve kontrollerinde rastgele seçilmiş 100'er hücre incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek görüntüleri kaydedilmiştir. Mikroskobik incelemeler sırasında nükleustan dışarı doğru göç etmiş DNA parçaları nükleusa bağlı bir kuyruk halinde (kuyruklu yıldıza benzer bir görünüm) görülür. Bu nükleuslarda DNA hasarının meydana

geldiği anlaşılır (Şekil 3.17-19). Daha sonra bu görüntüler "Comet Assay IV" programı kullanılarak her bir hücredeki DNA hasar derecesi kuyruktaki DNA yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti cinsinden analiz edilmiş ve gerekli istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

Dünyada uygulanan komet test tekniğinin genel basamakları Şekil 3.16'da gösterilmiş ve aşağıda özetlenmiştir (Tice ve ark., 2000; Çavaş ve Könen, 2007-2008):

1- **Hücrelerin İzolasyonu:** Lenfositlerin tam kandan ayrılması işlemidir.
2- **Preparasyon Aşaması:** Hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhadır.
3- **Lizis:** Agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarlarının ve proteinlerinin yıkımının gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamanın sonunda çıplak DNA elde edilir. Lizis işlemini gerçekleştirmek için önceden hazırlanan ve +4 ºC'de soğutularak saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisinin bileşeninde bulunan tuz proteinlerin hücre ile olan bağlarını ve RNA yapısını bozarken; deterjanlar ise hücre membran yapısını bozmaktadır. Böylece lizis işlemi sonrasında hücre yapısındaki membran, ptoteinler, RNA, sitoplazmik ve nükleer bileşenler parçalanmaktadır. Sonuçta nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözlenebileceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.
4- **DNA Sarmalının Çözülme Aşaması:** Lizis işleminden çıkan preparatlar soğuk elektroforez solüsyonu içeren (pH>13) tanka yerleştirilir ve burada 20 dakika süreyle bekletilir. Bu aşamada DNA zincirlerinin ayrılarak tek iplikli hale geçmesi sağlanır.
5- **Elektroforez Aşaması:** DNA sarmalı çözüldükten sonra aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda tek iplikli DNA molekülünde bulunan kırık fagmentler ve kırılma sonucu oluşan DNA ilmekleri negatif (-) yüklü

oldukları için boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda katoda (+ uca) doğru haraket etmektedir.

6- **Nötralizasyon Aşaması:** Elektroforez işlemini takiben pH'ı >13 olan solüsyon içeen tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak için nötralizasyon işlemine tabi tutulur. Bu işlem için preparatlar önceden hazırlanarak +4 ºC'de bekletilen soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınarak 30 dakika süreyle bekletilir.

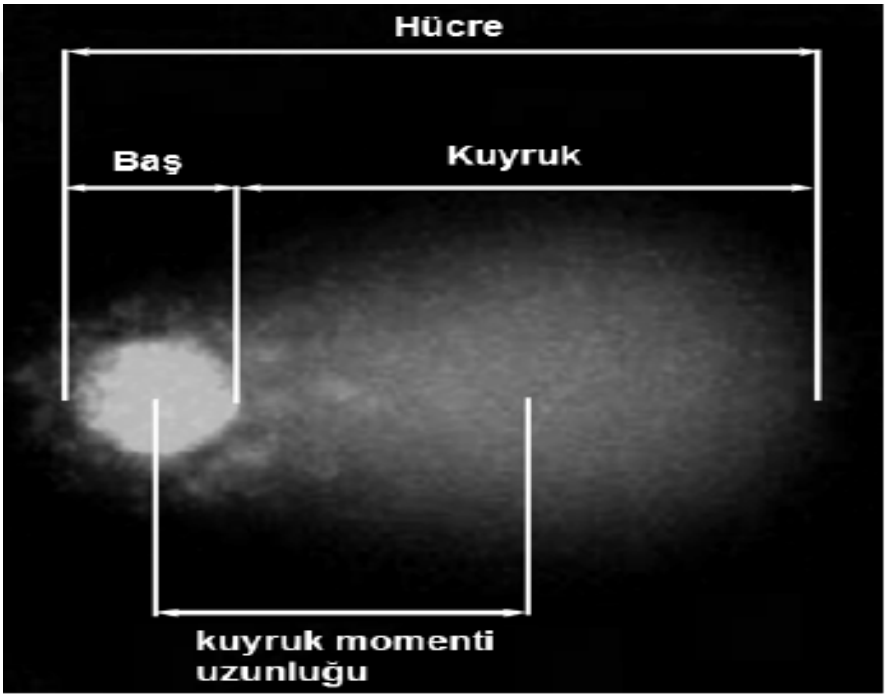
7- **Boyama Aşaması:** Nötralizasyon tamponundan çıkarılan preparatlar 2 kez soğuk distile sudan geçirilerek boyama işlemine tabi tutulur. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan floresan boya Etidyum bromid (EtBr)' dir. Ancak EtBr oldukça iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olduğu için bu boyaya alternatif olarak komet testinde akridin oranj, DAPI, YOYO-1 veya propidyumiyodit boyaları da kullanılmaktadır.

8- **Değerlendirme Aşaması:** Komet ölçümlerinde kullanılmak üzere birçok parametre geliştirilmiş olmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Komet test tekniği kullanılarak DNA'da oluşabilecek hasarların kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye dayalı ölçümler kullanılabileceği gibi en garantili yöntem olarak bilgisayarlı komet analiz programları da kullanılmaktadır. Komet yapısı içerisinde belirli bir bölgede bulunan DNA miktarı ile o bölgede bulunan floresan yoğunluğu arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bu özellikten faydalanılarak dijital görüntü sistemleri ve bilgisayar yazılım programlarında kullanılan çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir (Şekil 3. 16). Bunlar;

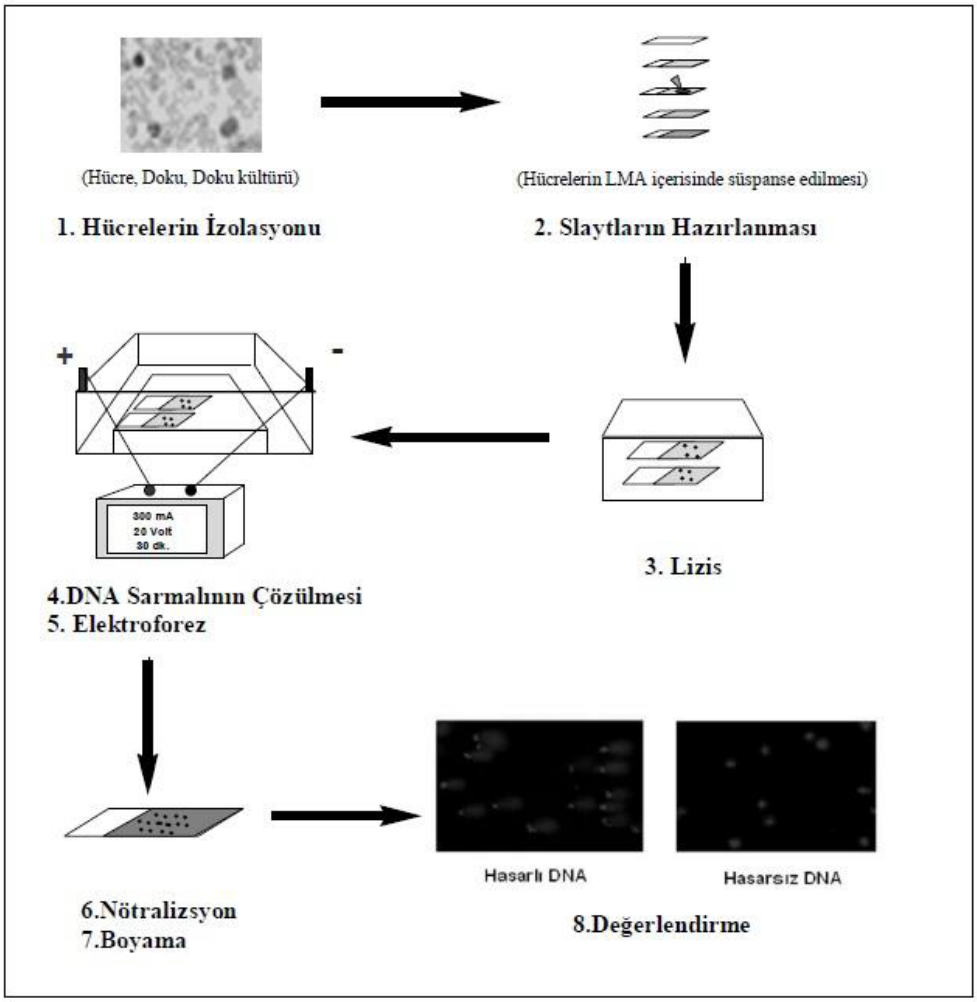
   - **Kuyruk Uzunluğu:** Çekirdek baş bölge dış kısmından itibaren göç eden DNA uzunluğunun ölçümüdür.
   - **Merkezden Kuyruk Uzunluğu:** Kuyruk uzunluğu+Baş çapı/2

- **Kuyruktaki DNA %'si:** Kuyrukta bulunan DNA'nın hücrede bulunan toplam DNA'ya olan yüzdesi
- **Kuyruk Momenti:** Kuyrukta bulunan toplam DNA yüzdesi ile baş bölgesinin merkezinden itibaren kuyruğun merkez kısmına kadar olan mesafenin ortak olarak hesaplanmasıdır.

$$\text{Kuyruk Momenti} = \frac{\text{Kuyruk uzunluğu X Kuyruktaki DNA Yoğunluğu}}{100}$$



Şekil 3.16. Komet testinden elde edilen sonuçlarda kullanılan farklı ölçümler.



Şekil 3.17. Komet test yönteminin genel basamakları (Fidan, 2008).

Nükleustaki DNA hasarının diğer bir değerlendirme yöntemi manuel yani gözle değerlendirmedir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar skorlanmaktadır. Bu skorlamada;

0→ kuyruğun hiç olmadığını

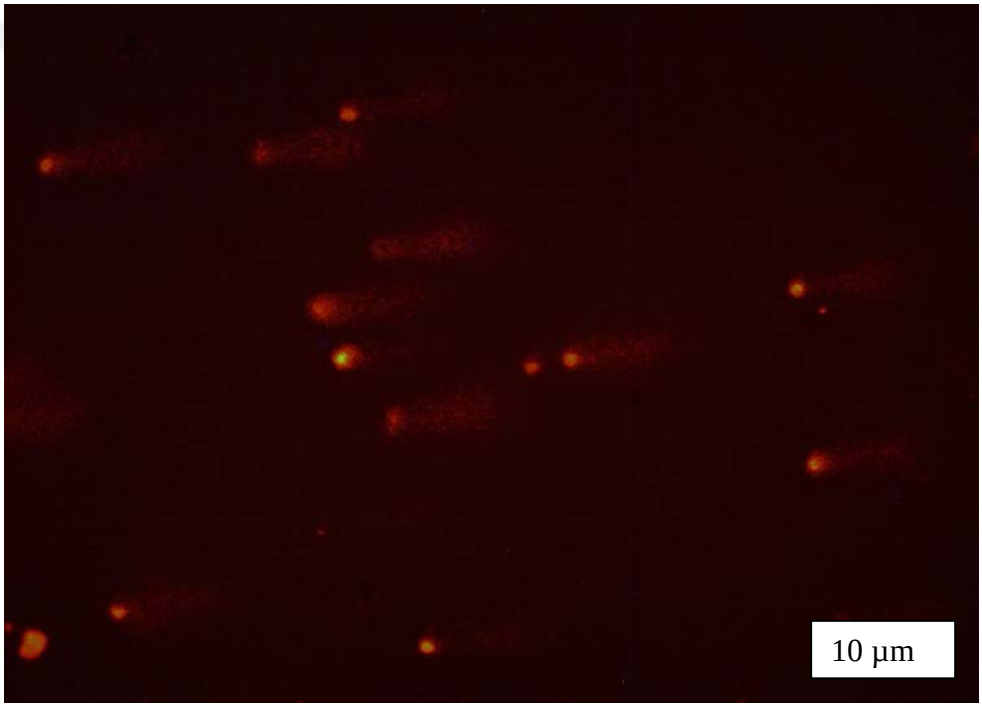
1→ kuyruk uzunluğunun çok az olduğunu

2→ kuyruk uzunluğunun az olduğunu

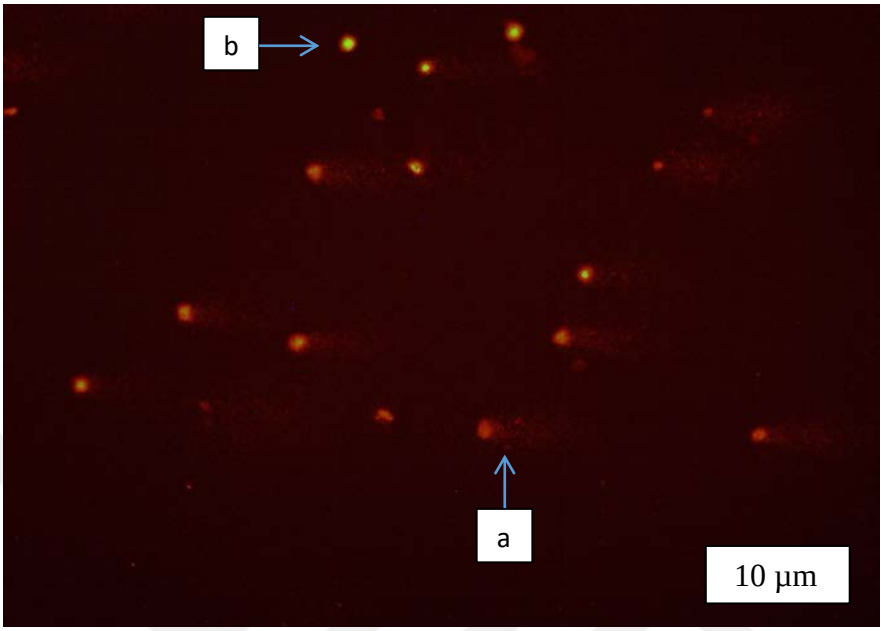
3→ kuyruk uzunluğunun çok olduğunu

4→kuyruk uzunluğunun çok fazla olduğunu göstermektedir (Bandyopadhyaya ve ark., 2008; Çavaş ve Könen, 2007, 2008).

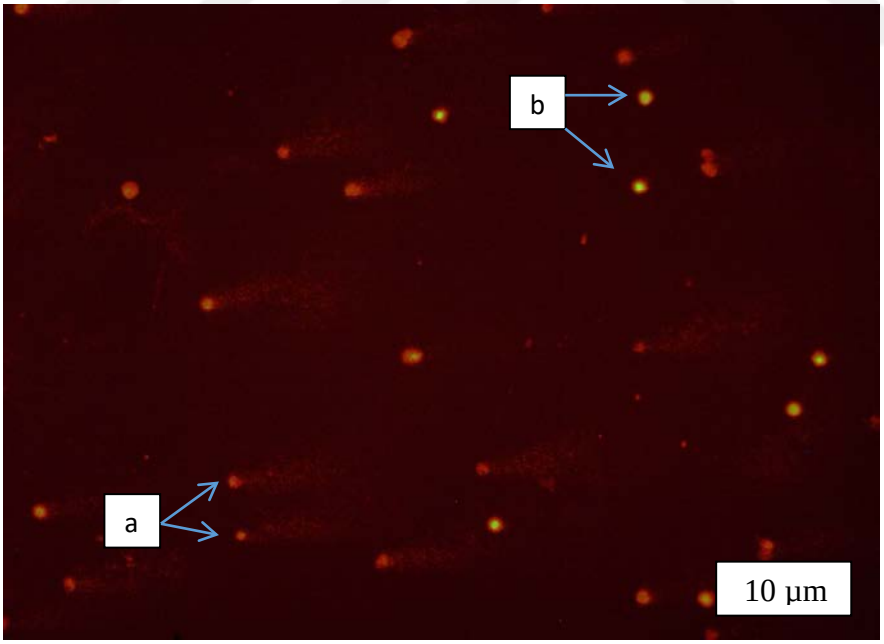
Ayrıca mikroskopta okülere yerleştirilen ve mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden (mikrometre) de yararlanarak ölçüm yapmak suretiyle gerekli parametreler hesaplanabilmektedir (Çavaş ve Könen, 2008).



Şekil 3.18. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) nükleuslar. X1000.



Şekil 3.19. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.



Şekil 3.20. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar. X1000.

3.8. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, MI, PI, MN, NBI ve KOMET parametrelerine ait veriler için her bir muameleli grubun ortalamaları ile kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile kontrol edilmiştir.

Konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular, çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

4.1.1.1. EA'nın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkileri

Üç farklı konsantrasyondaki (60, 80 ve 100 µg/ml) EA ile 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid değişim sayıları (KKD/Hücre) Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre test maddesi olan EA hiçbir muamele süresi ve konsantrasyonda KKD'yi önemli derecede uyarmamıştır.

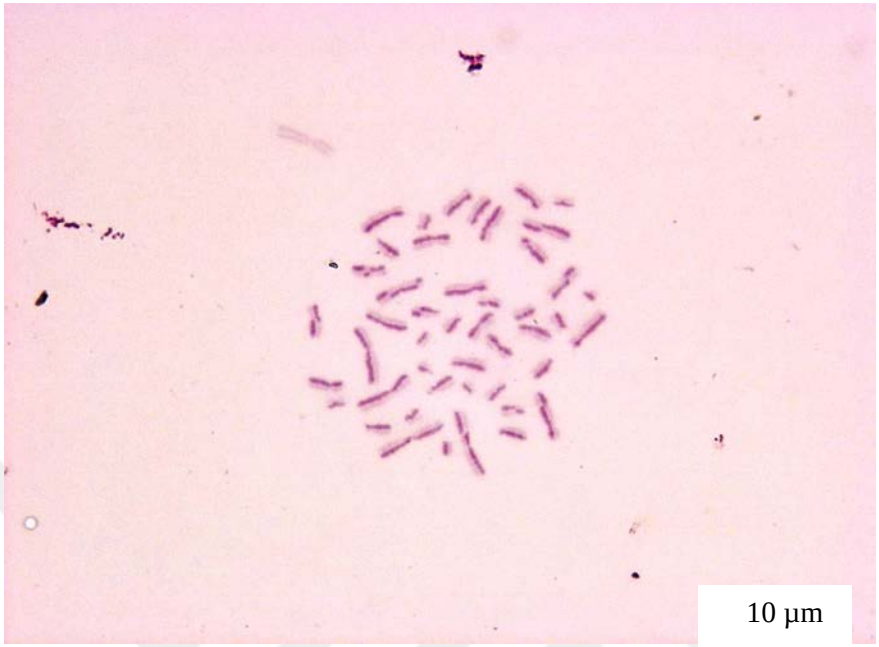
EA'nın KKD'yi önemli derecede uyarmamasına (Şekil 4.1) karşılık pozitif kontrol olan EMS, KKD'yi önemli derecede uyarmıştır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı*.

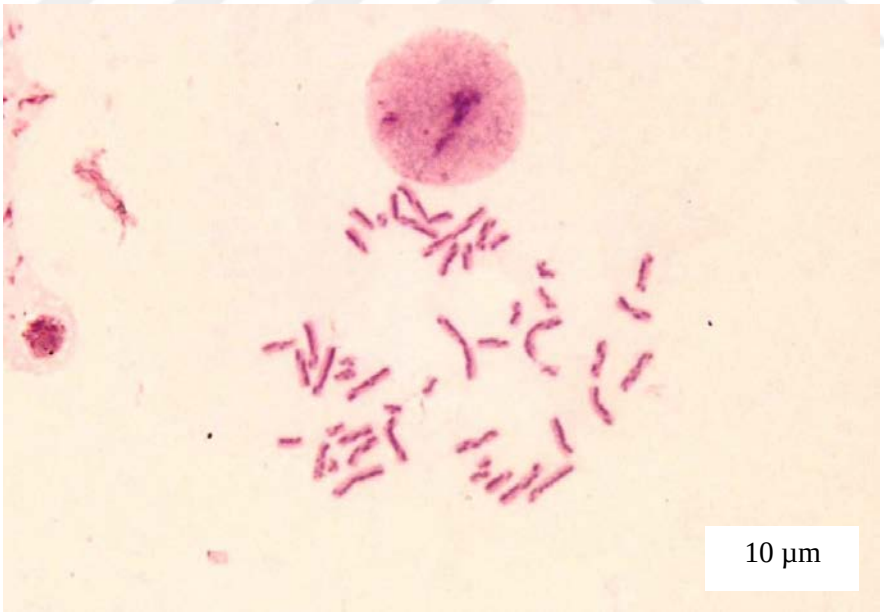
Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SH
Kontrol	-	-	1-13	5.932 ± 0.39
1 M NaOH (Ç.K)	24	25 µl	2-12	6.133 ± 0.35
EMS (P.K)	24	10^{-3} M	21-84	50.74 ± 1.18 a3
EA	24	60 80 100	1-11 1-13 1-15	6.010 ± 0.44 c_3 5.900 ± 0.25 c_3 6.110 ± 0.26 c_3
1 M NaOH (Ç.K)	48	25 µl	3-15	6.570 ± 0.14
EMS (P.K)	48	10^{-3} M	27-97	63.30 ± 1.51 a_3
EA	48	60 80 100	2-13 2-11 2-14	6.450 ± 0.28 c_3 5.775 ± 0.21 c_3 5.675 ± 0.35 c_3

a: kontrol ile fark önemlidir; b: çözücü kontrol ile fark önemlidir; c: pozitif kontrol ile fark önemlidir; $a_1b_1c_1$: $P \leq 0.05$; $a_2b_2c_2$: $P \leq 0.01$; $a_3b_3c_3$: $P \leq 0.001$

*: Her preparattan 25, herbir grupta toplam 100 II. metefaz evresi değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. 12 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 24 saatlik muamele,♀). X1000.



Şekil 4.2. 76 Kardeş kromatid değişimi bulunan metafaz plağı (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000.

4.1.1.2. EA'nın Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Üç farklı konsantrasyonda (60, 80, 100 µg/ml) EA ile 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kromozom anormallik çeşitleri, kromozom anormalliğine sahip anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormallikleri sayısı (KA/Hücre) Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

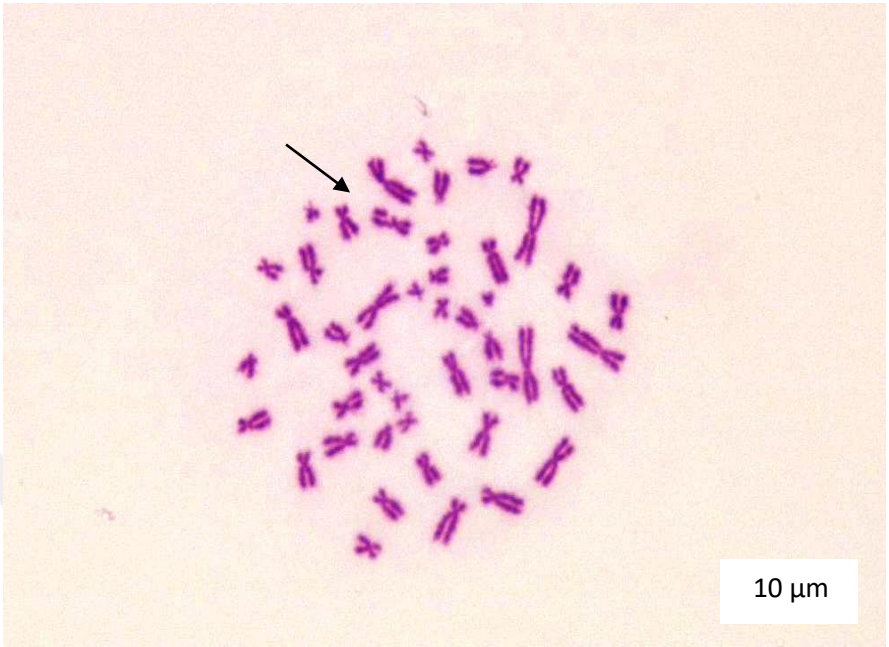
Muamele edilmiş kültürlerde, EA'nın etkisiyle ortaya çıkan anormal hücre (AH) yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik (KA/hücre) oranları ile kontrol ve çözücü kontrolden (1 M NaOH) elde edilen bulgular arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada test maddesinin hiçbir konsantrasyon ve uygulama süresinde, anormal hücre yüzdelerini ve hücre başına düşen anormallik oranlarını önemli düzeyde etkilemediği anlaşılmıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.2).

EA ile 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerde kromatid kırığı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4)), kromozom kırığı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), kromatid tipi fragment (Şekil 4.7), kromozom tipi fragment (Şekil 4.8) gibi yapısal kromozom anormallikleri ile poliploidi (Şekil 4.9) gibi sayısal kromozom anormalliğine rastlanmıştır.

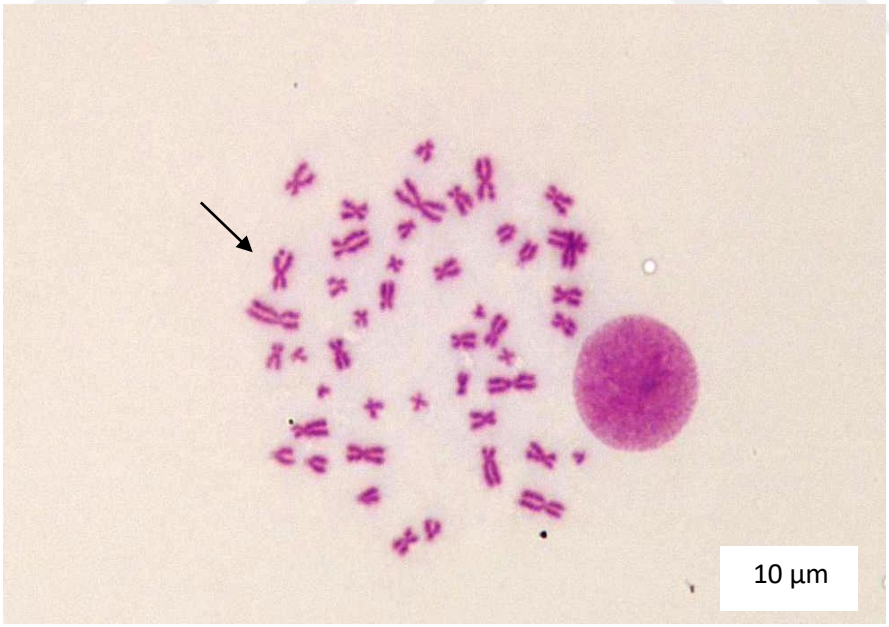
Çizelge 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda EA İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre *.

Test Maddesi	Muamele		Anormallik Çeşitleri						Anormal Hücre (%)'si ± SH	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B'	B''	F'	F''	KD	P		
Kontrol	--	--	12	1	-	-	-	-	3.25 ± 0.25	0.033 ± 0.003
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	13	1	-	-	-	-	3.50 ± 0.65	0.035 ± 0.007
EMS (PK)	24	10^{-3}M	42	14	8	2	1	-	16.25 ± 1.44 a_3	0.168 ± 0.01 a_3
EA	24	60	12	-	-	-	-	-	3.00 ± 0.41 c_3	0.030 ± 0.004 c_3
		80	13	2	-	-	-	-	3.75 ± 0.48 c_3	0.038 ± 0.005 c_3
		100	15	1	-	-	-	-	4.00 ± 0.41 c_3	0.040 ± 0.004 c_3
	48	25 µl	16	2	1	-	-	-	4.75 ± 0.48	0.048 ± 0.005
EMS (PK)	48	10^{-3}M	62	15	6	4	2	1	22.50 ± 0.65 a_3	0.225 ± 0.007 a_3
EA	48	60	13	3	1	-	-	-	4.25 ± 0.48 c_3	0.043 ± 0.005 c_3
		80	17	1	-	-	-	-	4.25 ± 0.48 c_3	0.045 ± 0.003 c_3
		100	16	2	1	-	-	-	4.75 ± 0.63 c_3	0.048 ± 0.006 c_3

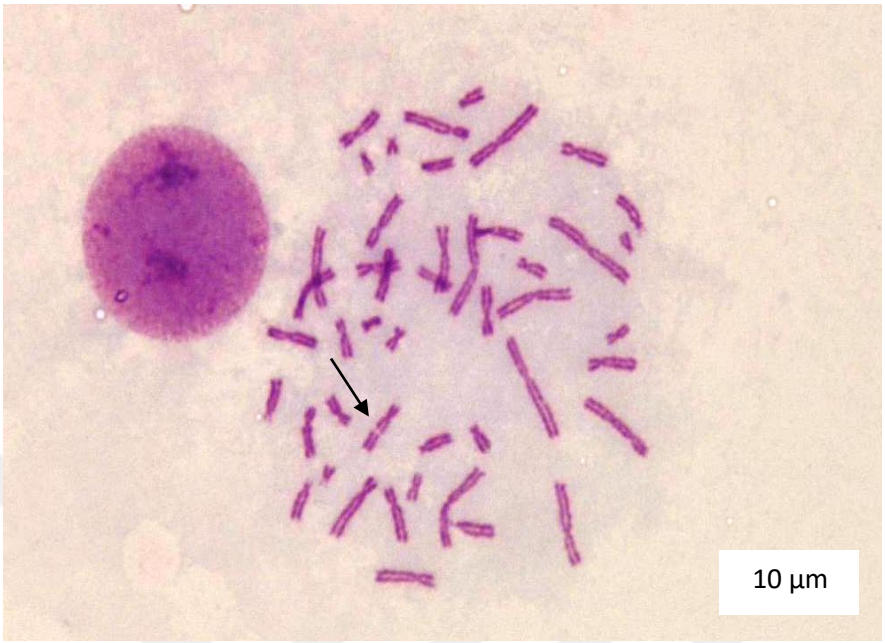
B': Kromatid kırığı, B": Kromozom kırığı, F': Kromatid Tipi Fragment , F'': Kromozom Tipi Fragment, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi
a: Kontrol ile ; b: Çözücü Kontrol ; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. $a_1b_1c_1$: $P < 0.05$ $a_2b_2c_2$: $P < 0.01$ $a_3b_3c_3$:$P < 0.001$
* Her bir preparattan 100, her muamele grubu için toplamda 400 metafaz plağı incelenmiştir.



Şekil 4.3. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (80 µg/ml EA ile, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.



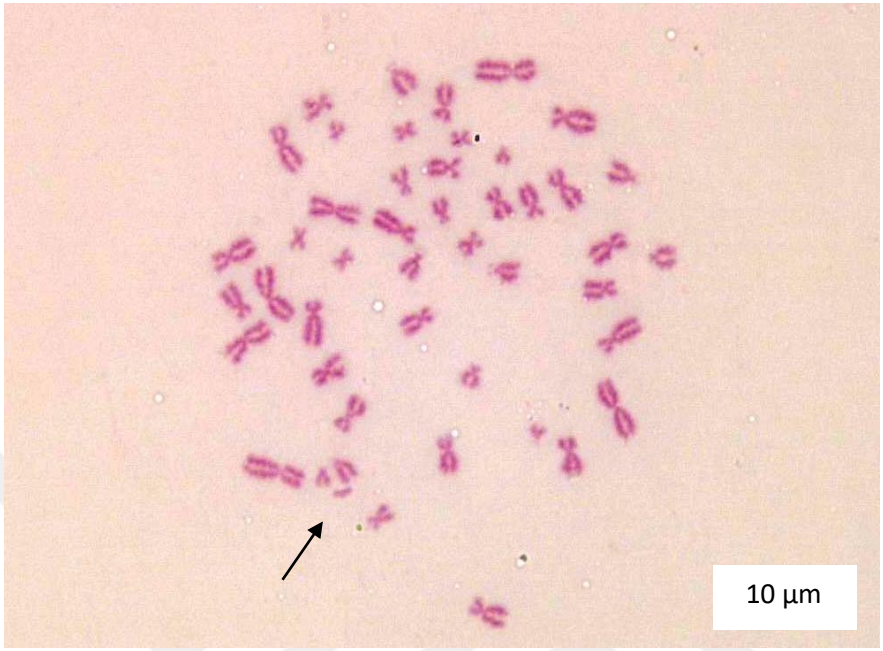
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100 µg/ml, EA 48 saatlik muamele, ♀). X1000.



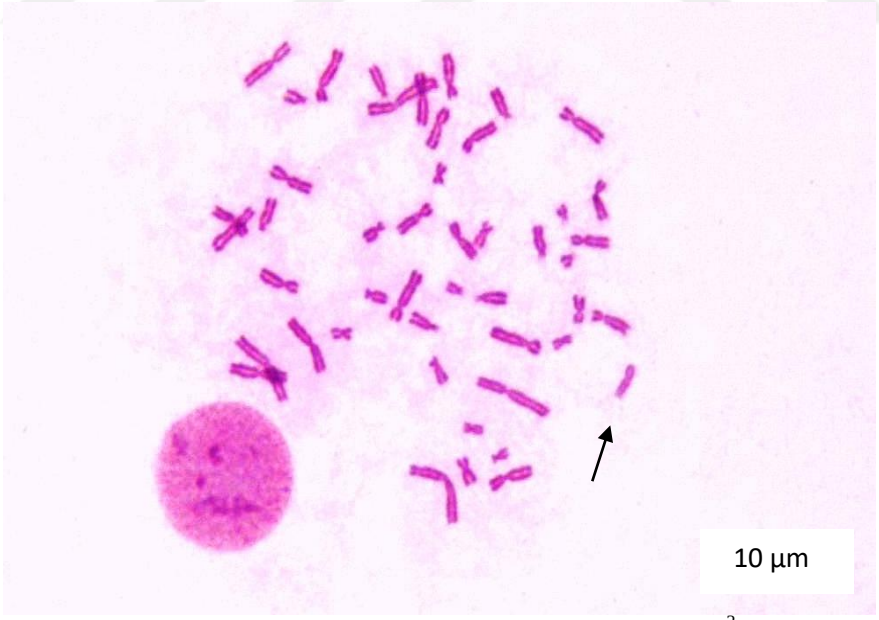
Şekil 4.5. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 48 saatlik saatlik muamele, ♂). X1000.



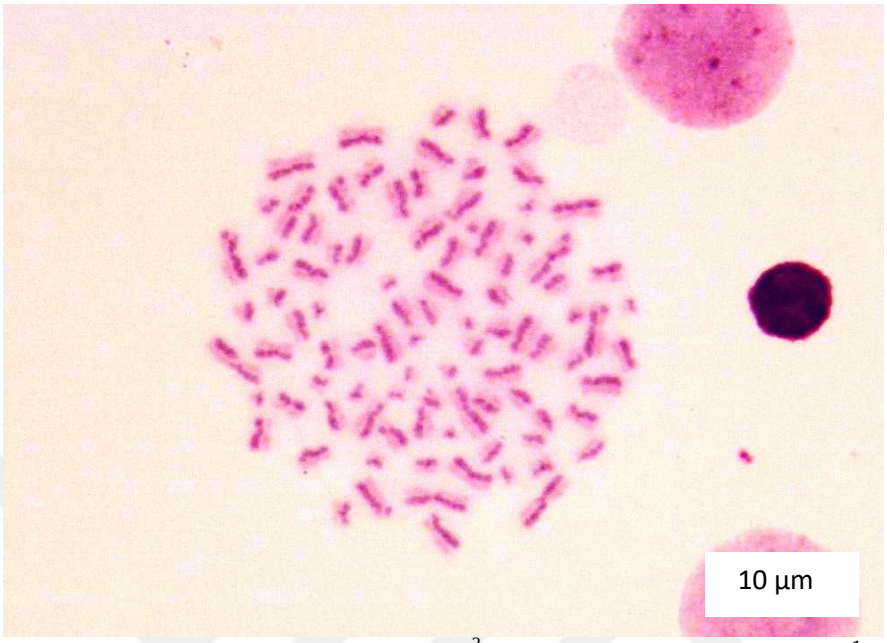
Şekil 4.6. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (100 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.



Şekil 4.7. Kromatid tipi fragment (F) bulunan metafaz plağı (60 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♀).X1000.



Şekil 4.8. Kromozom tipi fragment (F) bulunan metafaz plağı (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♀).X1000.



Şekil 4.9. Poliploid hücre kromozomları (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♂ (2n=92)). X1000.

4.1.1.3. EA'nın DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

EA'nın DNA replikasyonu üzerine etkisi PI ve mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise MI'nın bulunması yoluyla saptanmıştır.

Üç farklı konsantrasyondaki (60, 80 ve 100 µg/ml) EA ile 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan PI ve MI Çizelge 4.3.'de görülmektedir.

EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde DNA replikasyonunu etkilememiştir ve bu nedenle PI'de önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 4.3).

Test maddesi, mitotik indeks yönünden proliferasyon indeksine benzer tarzda etkiler sergilemişitir. Yani EA, 24 saatlik en düşük iki konsantrasyonda (60 ve 80 µg/ml) ve 48 saatlik en düşük (60 µg/ml) ve en yüksek (100 µg/ml) konsantrasyonda genel olarak MI'yı düşürmüş, ancak bu düşüş kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda EA ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferal Lenfositlerinde PI ve MI

Test Maddesi	Muamele		M1	M2	M3	PI±SH	MI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)					
Kontrol	--	--	125	193	82	1.892 ± 0.103	8.18 ± 0.750
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	166	170	64	1.745 ± 0.060	8.22 ± 0.969
EMS (PK)	24	10^{-3} M	266	124	10	1.360 ± 0.052 a_3	2.12 ± 0.198 a_3
EA	24	60	178	169	53	1.688 ± 0.109 c_1	6.59 ± 0.644 c_3
		80	148	154	98	1.875 ± 0.108 c_2	7.72 ± 0.799 c_3
		100	137	171	92	1.888 ± 0.112 c_2	8.41 ± 0.705 c_3
1M NaOH (ÇK)	48	25 µl	157	165	78	1.803 ± 0.057	8.40 ± 0.486
EMS (PK)	48	10^{-3} M	270	129	5	1.358 ± 0.029 a_3	1.83 ± 0.264 a_3
EA	48	60	155	181	64	1.773 ± 0.092 c_2	7.99 ± 0.538 c_3
		80	145	180	75	1.825 ± 0.099 c_2	8.28 ± 0.780 c_3
		100	141	181	78	1.843 ± 0.082 c_2	7.63 ± 0.671 c_3

a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05; $a_2b_2c_2$: P≤0.01; $a_3b_3c_3$: P≤0.001

4.1.1.4. EA'nın Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Üç farklı konsantrasyonda (60, 80 ve 100 µg/ml) EA ile 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MN oluşumu ve nükleus bölünmesi üzerine etkileri Çizelge 4.4.'de görülmektedir.

EA, 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm dozlarda MN'li iki nükleuslu hücrelerin %'sini (% MNBN) ve MN %'sini genel olarak arttırmış olmasına rağmen bu artış kontrole nazaran istatiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4.).

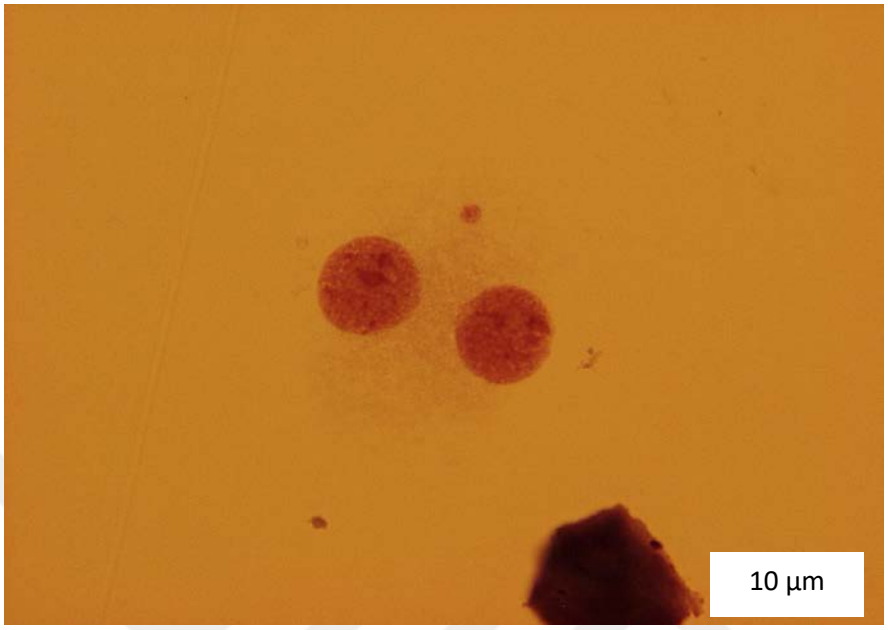
Her ne kadar EA, MN oluşumunu önemli derecede uyarmasada muameli kültürlerin hücrelerinde değişik sayı ve büyüklükte mikronükleuslara rastlanmıştır (Şekil 4.10, Şekil 4. 11).

EA'nın nükleus bölünmesi üzerindeki etkisi NBI bulunarak saptanmıştır (Çizelge 4.4). Buna göre EA, hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde NBI'yı kontrole oranla istatiksel açıdan anlamlı bir şekilde düşürmemiştir (Çizelge 4.4).

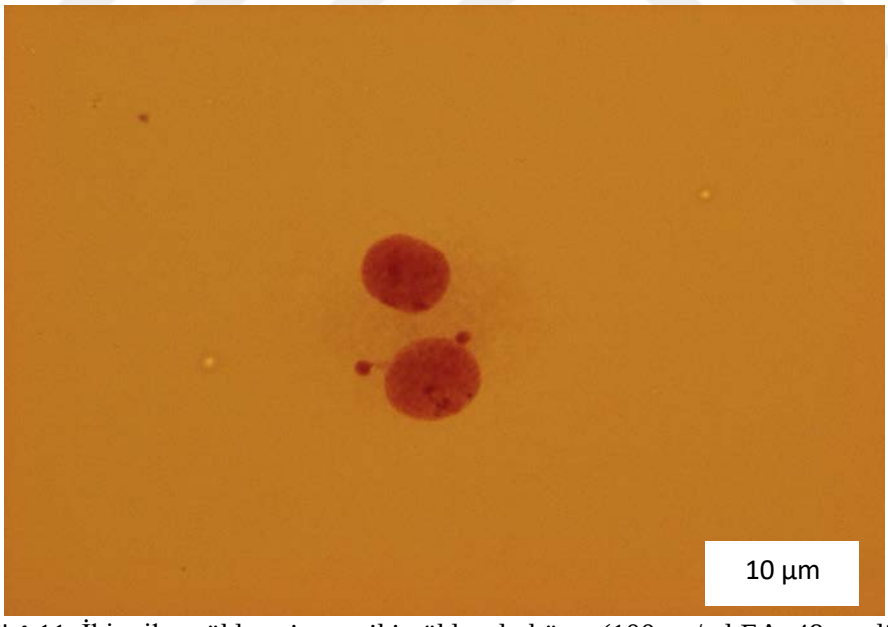
Çizelge 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda EA İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI.

Test Maddesi	Muamele		MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si	MN %'si	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			1	2	3	4	
Kontrol	--	--	0.250 ± 0.500	0.28 ± 0.063	541	3188	92	179	1.978 ± 0.046
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	0.225 ± 0.250	0.28 ± 0.025	806	2989	75	130	1.880 ± 0.043
EMS (PK)	24	10^{-3} M	0.775± 0.479 a3	0.95 ± 0.050 a_3	2990	911	81	18	1.283 ± 0.019 a_3
EA	24	60	0.375 ± 0.750 c3	0.38 ± 0.075 c_3	708	3169	38	85	1.875 ± 0.044 c_3
		80	0.350 ± 0.645 c3	0.40 ± 0.041 c_3	626	3084	94	196	1.965 ± 0.038 c_3
		100	0.375 ± 0.250 c3	0.38 ± 0.025 c_3	761	2927	122	190	1.935 ± 0.025 c_3
1M NaOH (ÇK)	48	25 µl	0.350 ± 0.289	0.38 ± 0.025	563	3143	121	173	1.978 ± 0.049
EMS (PK)	48	10^{-3} M	0.800 ± 0.408 a3	1.05 ± 0.065 a_3	3222	722	46	10	1.210 ± 0.007 a_3
EA	48	60	0.350 ± 0.289 c3	0.38 ± 0.025 c_3	617	3125	85	173	1.953 ± 0.037 c_3
		80	0.325 ± 0.250 c3	0.35 ± 0.029 c_3	543	3214	96	147	1.963 ± 0.033 c_3
		100	0.300 ± 0.707 c3	0.30 ± 0,071 c_3	674	3164	72	90	1.893 ± 0.052 c_3

a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05; $a_2b_2c_2$: P≤0.01; $a_3b_3c_3$: P≤0.001



Şekil 4.10. Tek mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml EA, 48 saatlik muamele, ♂) X1000.



Şekil 4.11. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml EA, 48 saatlik muamele,♀) X1000.

4.1.2. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerindeki Antigenotoksik Etkileri

4.1.2.1. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Test maddesinin antigenotoksisite potansiyelini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada kültür ortamına test maddesi olan EA'ya ilaveten EMS (10^{-3} M) konularak 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid sayıları (KKD/Hücre) Çizelge 4.5.'de görülmektedir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde ve Onların Kontrol Kültürlerinde Hücre Başına Düşen Ortalama KKD Sayısı*.

Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SH
Kontrol	-	-	1-12	6.115 ± 0.248
1 M NaOH (Ç.K)	24	25 µl	2-13	5.745 ± 0.229
EMS (P.K)	24	10^{-3} M	23-86	60.84 ± 2.69 a_3
EA + EMS (10^{-3}M)	24	60 80 100	17-67 21-59 19-78	45.09 ± 2.37 $a_3b_3c_1$ 46.79 ± 1.78 $a_3b_3c_1$ 34.66 ± 4.04 $a_3b_3c_3$
1 M NaOH (Ç.K)	48	25 µl	3-14	7.97 ± 0.68
EMS (P.K)	48	10^{-3} M	31-98	73.99 ± 1.92 a3
EA + EMS (10^{-3}M)	48	60 80 100	19-71 19-68 16-65	46.56 ± 2.07 $a_3b_3c_3$ 45.59 ± 1.57 $a_3b_3c_3$ 38.02 ± 1.99 $a_3b_3c_3$

a: kontrol ile fark önemlidir; b: çözücü kontrol ile fark önemlidir; c: pozitif kontrol ile fark önemlidir; $a_1b_1c_1$: $P \leq 0.05$; $a_2b_2c_2$: $P \leq 0.01$; $a_3b_3c_3$: $P \leq 0.001$

*: Her preparattan 25, herbir grupta toplam 100 II. metafaz evresi incelenmiştir.

EA+EMS uygulamasında hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde test maddesi olan EA, kontrole ve çözücü kontrole oranla EMS kaynaklı artan KKD sayısını pozitif kontrolle kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli oranda ($P \leq 0.001$) azaltmıştır (Çizelge 4.5). Yani EA, EMS'nin KKD'yi uyarıcı etkisine karşı engelleyici etki (antigenotoksik etki) göstermiştir. Bu azalış 24 saatlik muamele süresi ve 80 µg/ml'lik konsantrasyonun dışındaki tüm muamele gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.5).

4.1.2.2. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

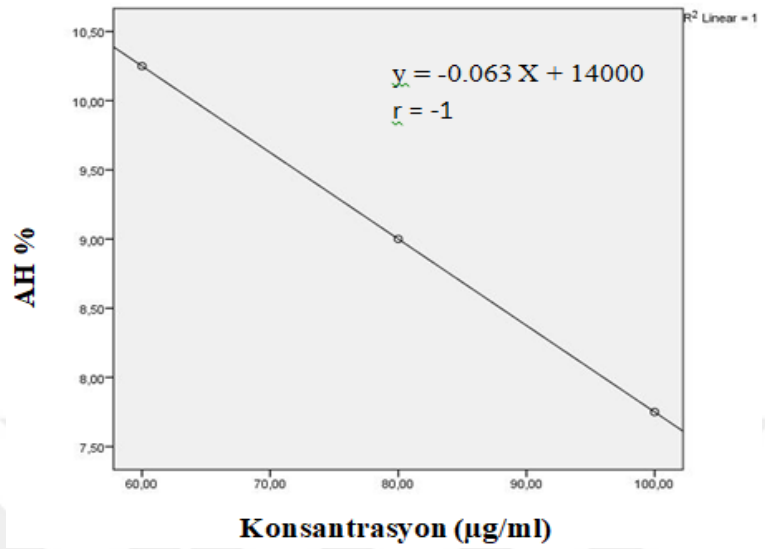
Test maddesinin antigenotoksisite potansiyelini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada kültür ortamına test maddesi olan EA'ya ilaveten EMS (10^{-3} M) konularak 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kromozom anormallik çeşitleri, kromozom anormalliğine sahip anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormallikleri (KA/Hücre) Çizelge 4.6.'da görülmektedir.

EA+EMS uygulamasında, EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı artan anormal hücre yüzdesini (AH) ve hücre başına düşen kromozom anormallik oranını (KA/Hücre) pozitif kontrole oranla isatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır ($P \leq 0.001$) (Çizelge 4.6). Anormal hücre yüzdesindeki ve hücre başına düşen kromozom anormallikleri oranındaki bu anlamlı azalış 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.12-4.15).

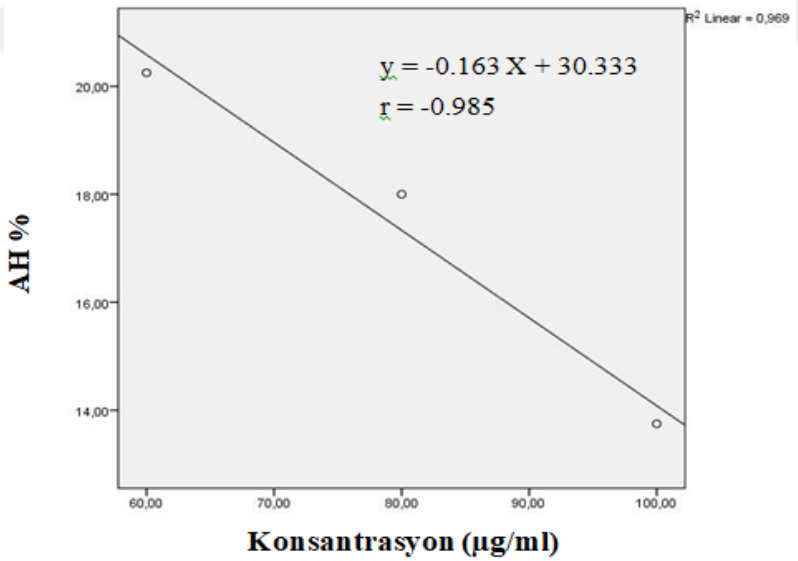
Çizelge 4.6. Farklı Konsantrasyonlarda Elajik Asit (EA)+ EMS İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/ Hücre *.

Test Maddesi	Muamele		15Anormallik Çeşitleri						Anormal Hücre (%)'si ± SH	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B'	B''	F'	F''	KD	P		
Kontrol	--	--	10	-	-	-	-	-	2.50 ± 0.29	0.025 ± 0.003
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	11	1	-	-	-	-	3.00 ± 0.41	0.030 ± 0.004
EMS (PK)	24	10^{-3}M	38	16	2	1	2	-	14.75 ± 1.11 a_3	0.148 ± 0.011 a_3
EA+EMS	24	60	32	8	-	1	-	-	10.25 ± 0.63 $a_3b_3c_2$	0.103 ± 0.006 $a_3b_3c_2$
		80	29	7	-	-	-	-	9.00 ± 0.707 $a_3b_3c_3$	0.090 ± 0.007 $a_3b_3c_3$
		100	23	6	1	-	1	-	7.75 ± 0.48 $a_2b_3c_3$	0.078 ± 0.005 $a_2b_3c_3$
	48	25 µl	15	2	-	-	-	-	4.25 ± 0.63	0.043 ± 0.006
EMS (PK)	48	10^{-3}M	66	18	10	4	2	1	25.25 ± 1.11 a_3	0.253 ± 0.011 a_3
EA+EMS	48	60	56	17	6	2	-	-	20.25 ± 1.38 $a_3b_3c_1$	0.203 ± 0.014 $a_3b_3c_1$
		80	51	13	7	-	1	-	18.00 ± 0.91 $a_3b_3c_2$	0.180 ± 0.009 $a_3b_3c_2$
		100	43	9	2	1	-	-	13.75 ± 1.65 $a_3b_3c_3$	0.138 ± 0.017 $a_3b_3c_3$

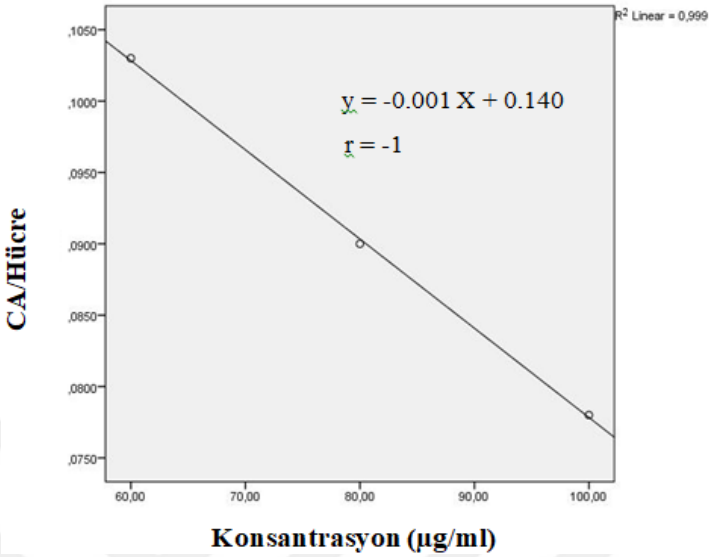
B': Kromatid kırığı, B": Kromozom kırığı, F': Kromatid Tipi Fragment , F'': Kromozom Tipi Fragment, KD: Kromatid değişimi, P: Poliploidi
a: Kontrol ile ; b: Çözücü Kontrol ; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir. $a_1b_1c_1$: $P < 0.05$ $a_2b_2c_2$: $P < 0.01$ $a_3b_3c_3$:$P < 0.001$
* Her bir preparattan 100, her muamele grubu için toplamda 400 metafaz değerlendirilmiştir.



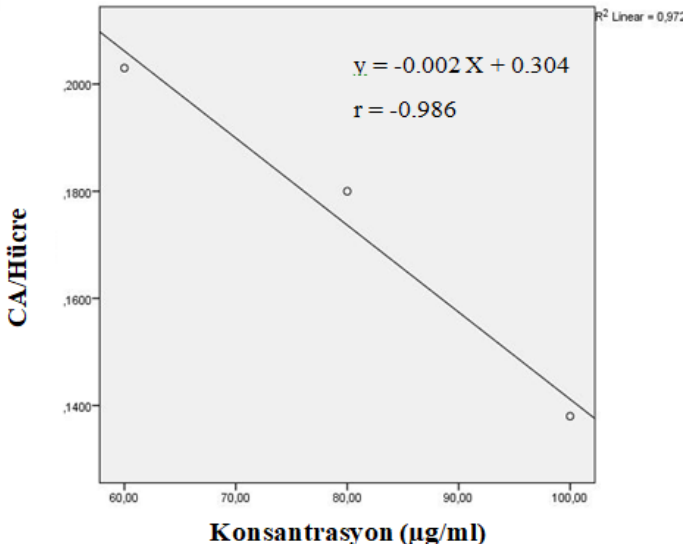
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan AH %'sinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.001).



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan AH %'sinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.056).



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kayanklı artan KA/Hücre'nin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.007).



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan KA/Hücre'nin EA' nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.053).

4.1.2.3. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkisi

EA'nın DNA replikasyonu üzerine etkisi proliferasyon indeksi (PI) (replikasyon indeksi (RI))'nin, bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeks (MI)'in bulunması yoluyla saptanmıştır.

Test maddesinin antisitotoksik potansiyelini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada kültür ortamına test maddesi olan EA'ya ilaveten EMS (10^{-3} M) konularak 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan PI ve MI Çizelge 4.7'de görülmektedir.

EA+EMS uygulamasında, EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı azalan PI'yı pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede arttırmış ve bu artış önem derecesine göre sırasıyla 60, 80 ve 100 µg/ml şeklinde ve de konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7).

24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde EA+EMS uygulamasında, EA EMS kaynaklı azalan MI'yı pozitif kontrole oranla genel olarak arttırmış ancak bu artış sadece 24 ve 48 saatlik en yüksek konsantrasyonlarda (100 µg/ml) istitistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Farklı Konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan Periferal Lenfositlerinde PI ve MI.

Test Maddesi	Muamele		M1	M2	M3	PI±SH	MI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)					
Kontrol	--	--	115	199	86	1.928 ± 0.075	7.67 ± 0.270
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	120	191	89	1.923 ± 0.045	8.11 ± 0.400
EMS (PK)	24	10^{-3} M	249	142	9	1.400 ± 0.034 a_3	2.04 ± 0.136 a_3
EA+EMS	24	60	201	179	20	1.548 ± 0.046 $a_3b_3c_1$	2.34 ± 0.186 a_3b_3
		80	190	191	19	1.573 ± 0.006 $a_3b_3c_2$	2.46 ± 0.260 a_3b_3
		100	161	219	20	1.648 ± 0.013 $a_3b_3c_3$	2.88 ± 0.238 $a_3b_3c_1$
1M NaOH (ÇK)	48	25 µl	127	210	63	1.840 ± 0.042	7.68 ± 0.444
EMS (PK)	48	10^{-3} M	297	98	5	1.270 ± 0.025 a_3	1.33 ± 0.122 a_3
EA+EMS	48	60	230	156	14	1.460 ± 0.029 $a_3b_3c_1$	2.07 ± 0.324 a_3b_3
		80	218	170	12	1.485 ± 0.048 $a_3b_3c_2$	2.19 ± 0.273 a_3b_3
		100	173	210	17	1.610 ± 0.043 $a_3b_2c_3$	2.46 ± 0.366 $a_3b_3c_1$

a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05; $a_2b_2c_2$: P≤0.01; $a_3b_3c_3$: P≤0.001

4.1.2.4. EA'nın EMS İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronükleus (MN) Oluşumu ve Nükleus Bölünmesi (NBI) Üzerindeki Etkileri

Test maddesinin antigenotoksisite potansiyelini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada kültür ortamına test maddesi olan EA'ya ilaveten EMS (10^{-3} M) konularak 24 veya 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan MN oluşumu ve nükleus bölünmesi üzerine ettkileri Çizelge 4.8.'de görülmektedir.

Genel olarak EMS ve EMS+EA ile muamele edilen kültürlerin hücrelerinde çok sayıda mikronükleusa rastlanmıştır (Şekil 4.16- 4.18). EA+EMS uygulamasında, EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı artan MNNB %'si ve MN/hücre sayısını pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşürmüştür (Çizelge 4.8). Bu düşüş 24 saatlik muamele süresinde en düşük iki dozda (60 ve 80 µg/ml) istatistiki açıdan daha önemli derecede olup ($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$) diğer tüm dozlarda da konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.19).

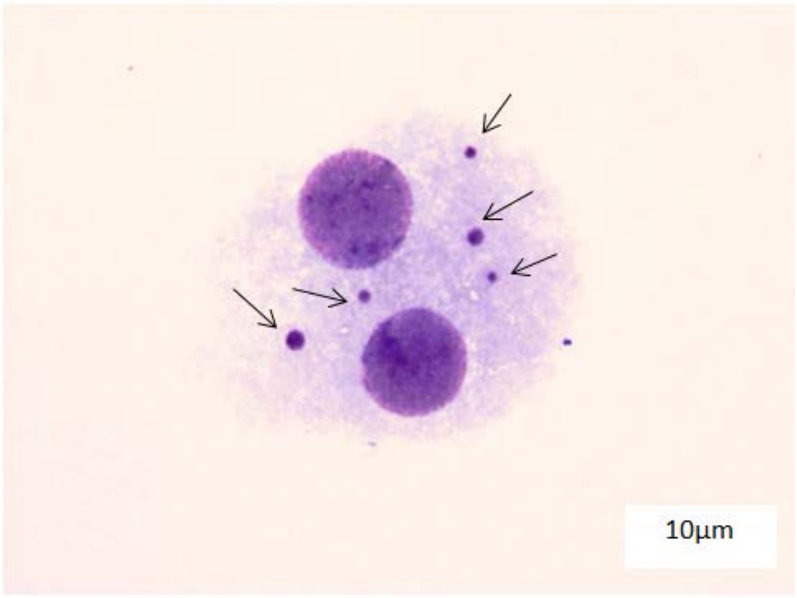
EA+EMS uygulamasında, EA'nın EMS kaynaklı artan MN oluşumu üzerine olan antigenotoksik etkisi de MN'li iki nükleuslu hücrelerin yüzdesine olan etkisine benzerlik göstermektedir. Yani EA, EMS'nin neden olduğu artan MN oluşumunu 24 veya 48 saatlik muamele süreleri ve tüm konsantrasyonlarda MN oluşum oranını pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır ($P \leq 0.001$). MN oluşum frekansındaki azalış her iki muamele süresinde de (24 ve 48 saat) konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.8).

EA+EMS uygulamasında, EMS kaynaklı azalan NBI'yı 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede ($P \leq 0.001$) arttırmıştır (Çizelge 4.8). NBI'deki bu artış EA'nın konsantrasyonun bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.20).

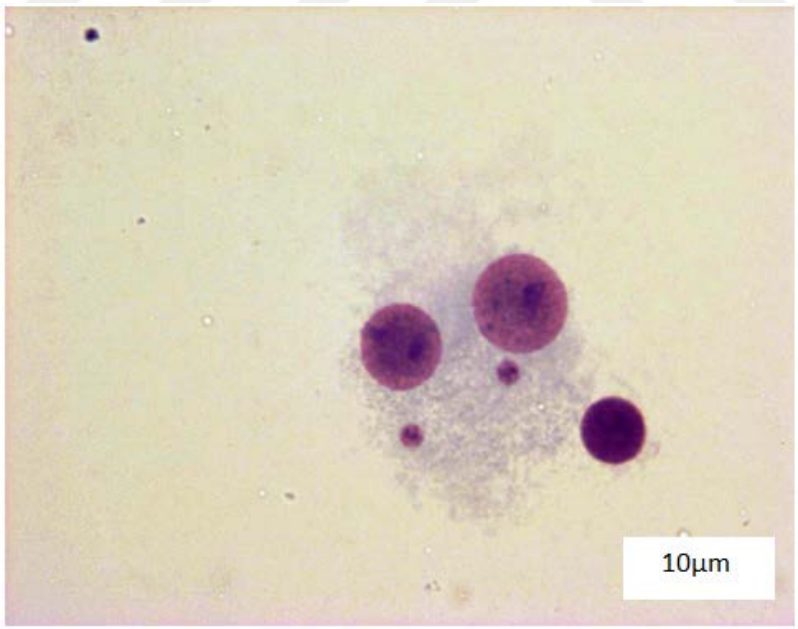
Çizelge 4.8. Farklı Konsantrasyonlarda EA+ EMS İle 24 veya 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN İçeren İki Nükleuslu Hücre%'si, MN %'si ve NBI.

Test Maddesi	Muamele		MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si	MN %'si	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			1	2	3	4	
Kontrol	--	--	0.20 ± 0.408	0.23 ± 0.048	517	3154	134	195	2.003 ± 0.053
1M NaOH (ÇK)	24	25 µl	0.25 ± 0.289	0.25 ± 0.029	772	3028	83	117	1.885 ± 0.047
EMS (PK)	24	10^{-3} M	0.775 ± 0.479 a_3	0.93 ± 0.048 a_3	3038	903	44	15	1.258 ± 0.022 a_3
EA+EMS	24	60	0.55 ± 0.289$a_3b_3c_1$	0.63 ± 0.025 $a_3b_3c_3$	2548	1318	103	31	1.405 ± 0.017 $a_3b_3c_3$
		80	0.50 ± 0.408 $a_3b_2c_2$	0.58 ± 0.025 $a_3b_3c_3$	2305	1542	119	34	1.473 ± 0.031 $a_3b_3c_3$
		100	0.45 ± 0.64 $a_2b_1c_3$	0.48 ± 0.048 $a_3b_3c_3$	1828	1986	132	54	1.603 ± 0.010 $a_3b_3c_3$
1M NaOH (ÇK)	48	25 µl	0.30 ± 0.408	0.33 ± 0.025	771	3005	102	122	1.893 ± 0.049
EMS (PK)	48	10^{-3} M	0.95 ± 0.500 a_3	1.10 ± 0.041 a_3	3136	824	27	13	1.228 ± 0.022 a_3
EA+EMS	48	60	0.60 ± 0.408 $a_3b_3c_3$ 0.60 ± 0.408	0.65 ± 0.029 $a_3b_3c_3$	2630	1274	73	23	1.373 ± 0.030 $a_3b_3c_2$
		80	$a_3b_3c_3$	0.63 ± 0.048 $a_3b_3c_3$	2349	1514	98	39	1.455 ± 0.026 $a_3b_3c_3$
		100	0.40 ± 0.408 a_1c_3	0.48 ± 0.025 $a_3b_1c_3$	2021	1800	118	61	1.553 ± 0.029 $a_3b_3c_3$

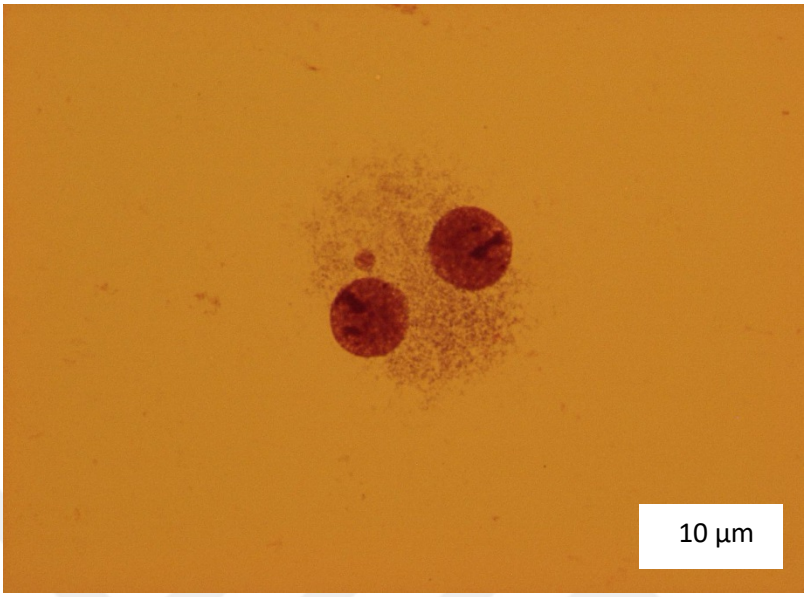
a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05; $a_2b_2c_2$: P≤0.01; $a_3b_3c_3$: P≤0.001



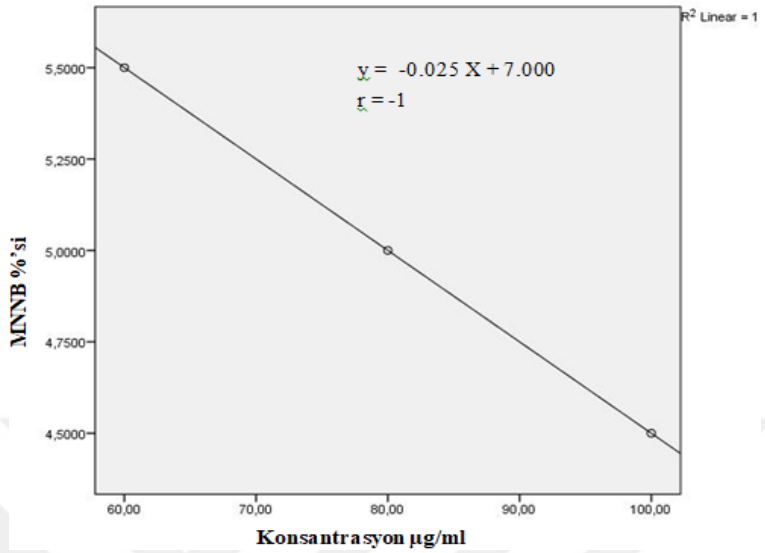
Şekil 4.15. Pozitif kontrol EMS ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde mikronükleus oluşumu. (10^{-3} M EMS, 48 saatlik muamele, ♀).X1000.



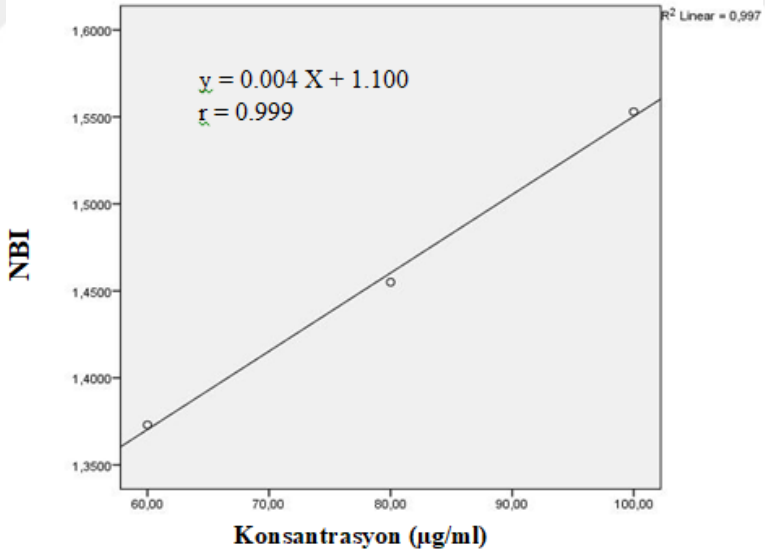
Şekil 4.17. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (80 µg/ml EA+EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000.



Şekil 4.18. Bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml EA+EMS, 48 saatlik muamele, ♂). X1000.



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı artan mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin (MNNB %'si) EA'nın konsantrasyonuna bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.001).



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda EA+EMS ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde EMS kaynaklı azalan nükleus bölünme indeksinin (NBI) EA'nın konsantrasyonunaa bağlı olarak artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.016).

4.1.3. EA'nın İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleustan Göç Eden DNA Parçalarının Oluşturduğu Nükleusa Bağlı Kuyruğun Uzunluğu, Kuyruktaki DNA Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

4.1.3.1. EA'nın Genotoksik Etkisi

EA'nın DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı komet testi ile belirlenmiştir. EA'nın 60, 80 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonları ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu Çizelge 4.9'da görülmektedir.

EA, tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti oranlarını konsantrasyona bağlı olacak şekilde genel olarak düşürmüş (Şekil 4.21 ve 4.22) ancak bu düşüş kontrole nazaran istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.9). Muameleler sonucu ortaya çıkan dalgalanmalar güven sınırları içinde kaldığı için istatistiksel anlam bulunmamıştır.

Kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğundaki azalışlar konsantrasyona bağlı bir şeklide gerçekleşmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24).

4.1.3.2. EA'nın Antigenotoksik Etkisi

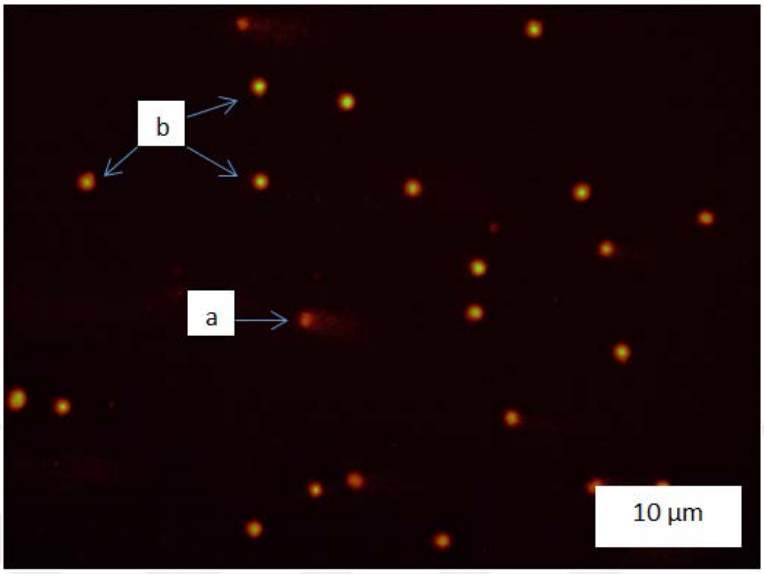
EA'nın DNA seviyesinde hasar oluşturup oluşturmadığı ve pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2'nin zararlı etkilerine karşı hücreyi koruyup koruyamadığı komet testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 60, 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonlardaki EA ile birlikte H_2O_2 ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde saptanan kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu Çizelge 4.9'da görülmektedir.

EA+H_2O_2 uygulamasında, EA H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunu pozitif kontrole oranla genel olarak düşürmüş (Şekil 4.25 ve 4.26) ancak bu düşüş en yüksek iki konsantrasyonda (80 ve 100 µg/ml) istatistiksel açıdan önemli seviyede olmuştur ($P\leq0.05$, $P\leq0.01$) (Çizelge 4.9).

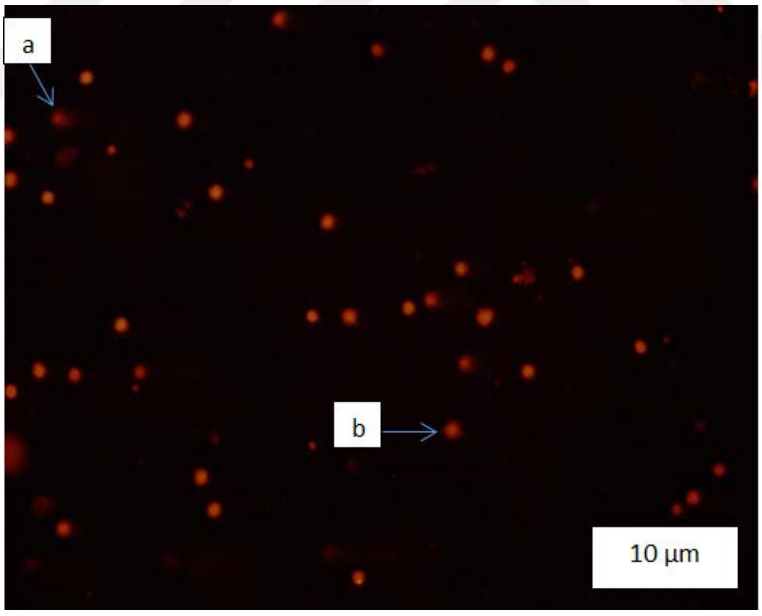
Çizelge 4.9. Farklı Konsantrasyonlarda EA ve EA+ 100 µM H_2O_2 İle 1 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde DNA Parçalarının Oluşturduğu Kuyruk Uzunluğu, Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti

Test Maddesi	Muamele		Kuyruk Uuznluğu ± SH (µm)	Kuyruk Yoğunluğu ± SH (%)	Kuyruk Momenti ± SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			
Kontrol	--	--	18.18 ± 2.87	9.71 ± 1.49	7.43 ± 2.10
DMSO (ÇK)	1	50 µl/ml	22.81 ± 4.26	11.85 ± 2.41	9.03 ± 2.40
H_2O_2 (PK)	1	100 µM	63.10 ± 16.1 a_2	29.36 ± 6.59 a_1	31.70 ± 10.50 a_1
EA	1	60	22.41 ± 6.73 c_1	12.35 ± 4.27	10.19 ± 4.08
		80	19.10 ± 6.70 c_1	10.05 ± 3.61 c_1	6.75 ± 2.98 c_1
		100	14.42 ± 4.86 c_2	6.89 ± 2.75 c_1	4.97 ± 2.59 c_1
EA + H_2O_2	1	60	28.26 ± 9.60	14.11 ± 5.18	13.36 ± 5.88
		80	21.90 ± 7.36 c_1	12.52 ± 4.58	9.93 ± 4.20 c_1
		100	17.47 ± 7.42 c_2	9.26 ± 4.29 c_1	6.13 ± 3.89 c_1

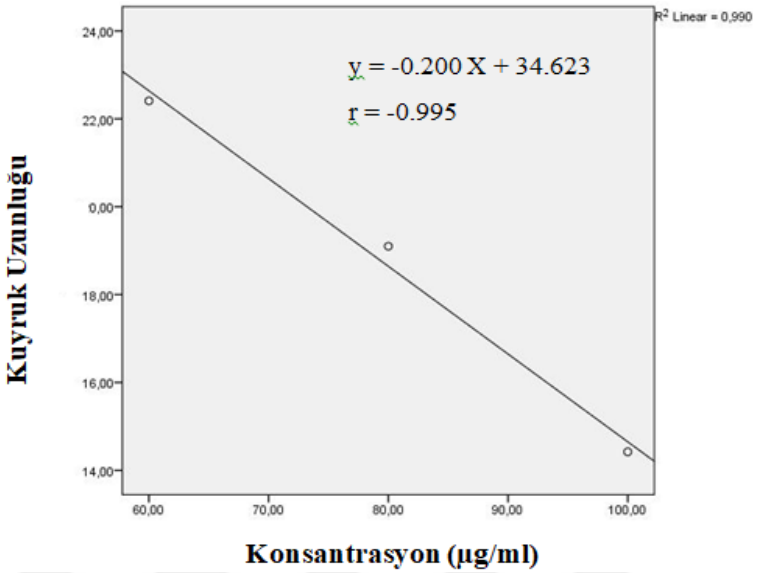
a: Kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile aradaki fark önemlidir.
$a_1b_1c_1$: P≤0.05; $a_2b_2c_2$: P≤0.01; $a_3b_3c_3$: P≤0.001



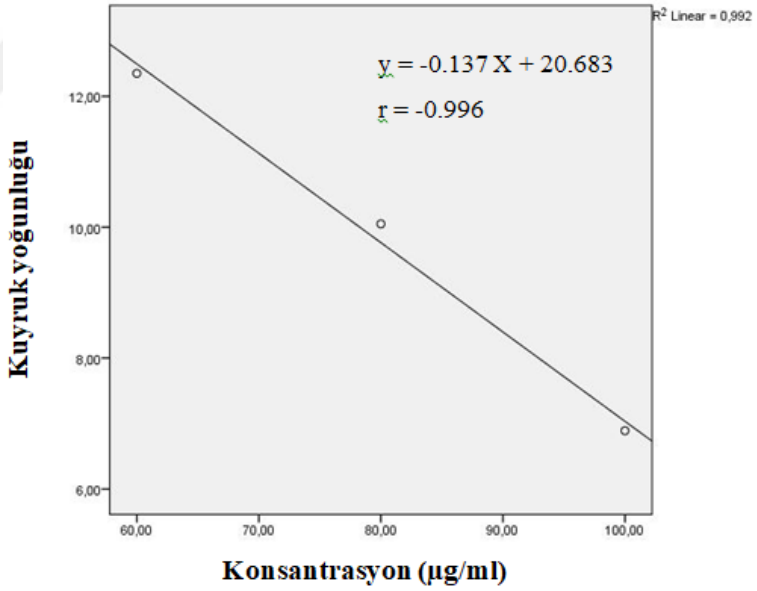
Şekil 4.17. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar (60 µg/ml EA, 1 saatlik muamele,♀). X1000.



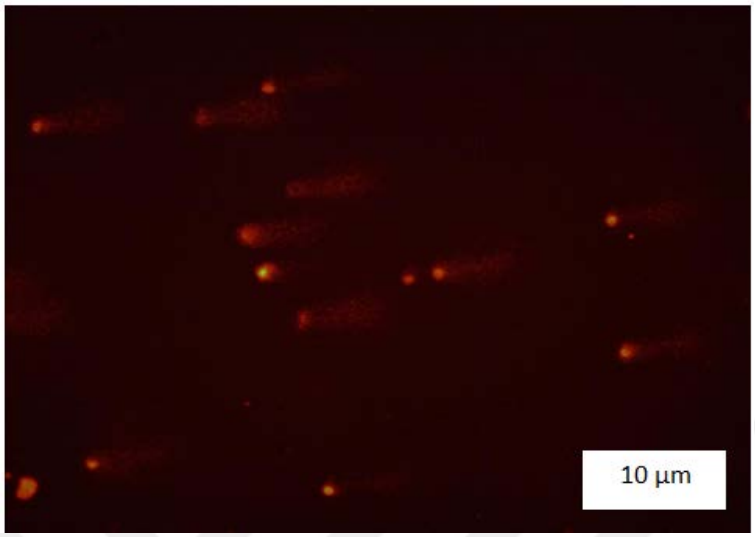
Şekil 4.22. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar (100 µg/ml EA, 1 saatlik muamele,♀). X1000.



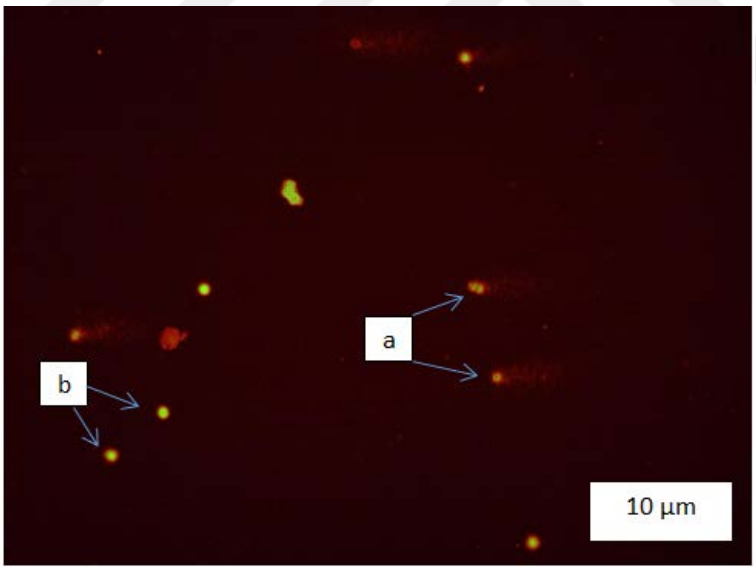
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kuyruk uzunluğunun konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.031).



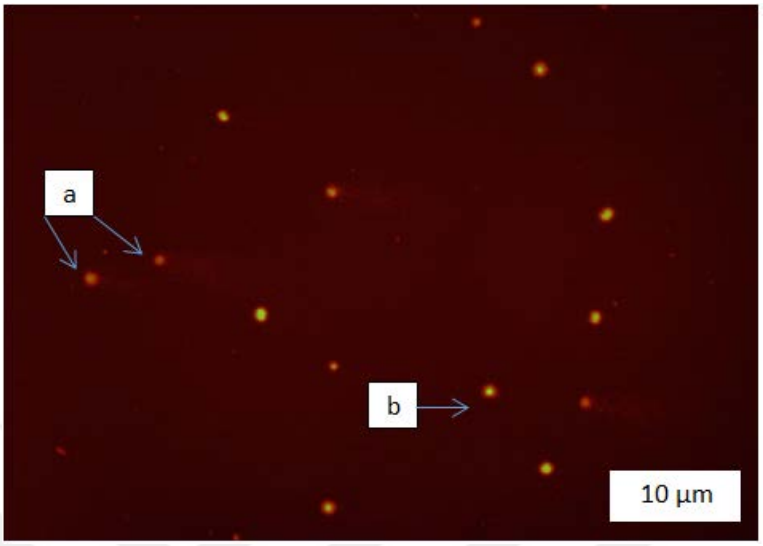
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda EA ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'daki kuyruk yoğunluğunun konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.029).



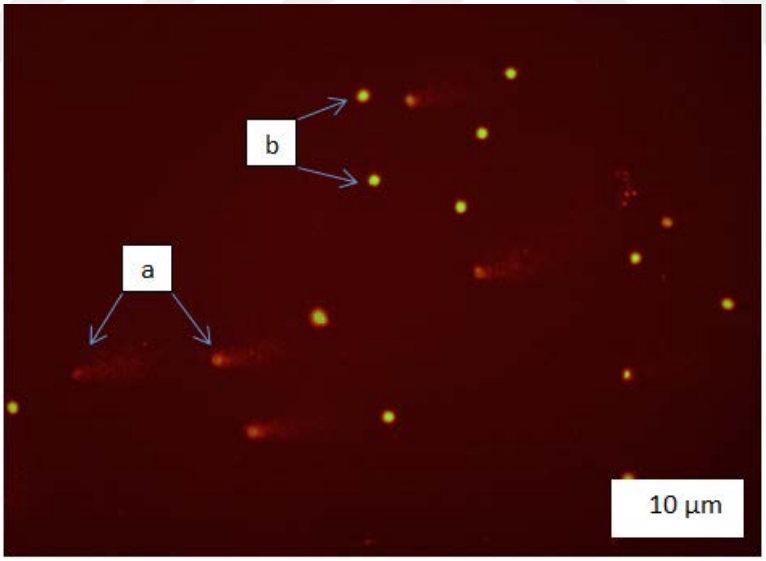
Şekil 4.25. Pozitif kontrol H_2O_2 ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) nükleuslar (%35'lik H_2O_2, 1 saatlik muamele, ♂). X1000.



Şekil 4.26. Pozitif kontrol H_2O_2+60 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz) nükleuslar (% 35'lik H_2O_2, 1 saatlik muamele,♀). X1000.

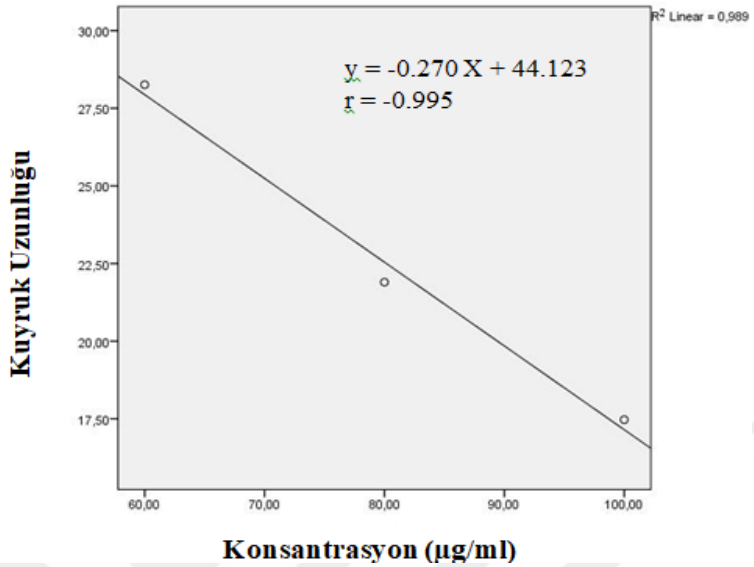


Şekil 4.27. Pozitif kontrol H_2O_2+80 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar (% 35'lik H_2O_2, 1 saatlik muamele, ♂). X1000.

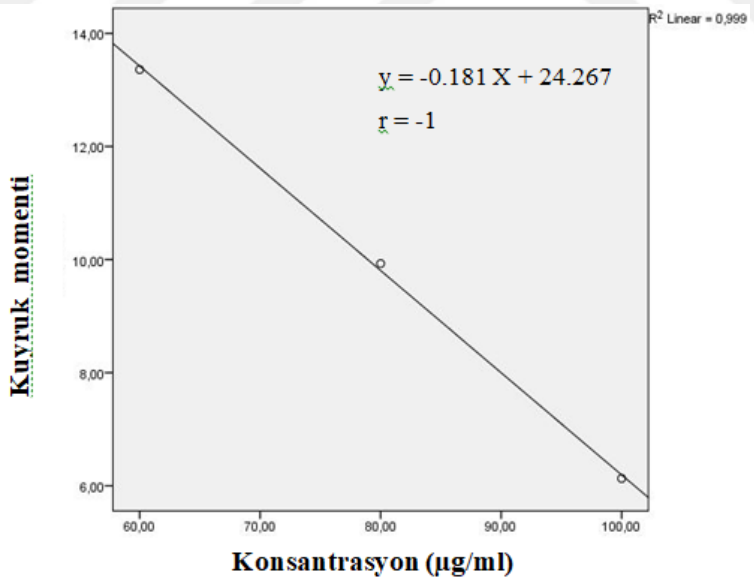


Şekil 4.18. Pozitif kontrol H_2O_2+100 µg/ml EA ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=a) ve DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=b) nükleuslar (% 35'lik H_2O_2, 1 saatlik muamele,♀). X1000.

Yine EA+H_2O_2 uygulamasında, EA H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti oranlarını pozitif kontrole oranla genel olarak düşürmüş ancak bu düşüşler kuyruk yoğunluğu için en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml), kuyruk momenti için ise en yüksek iki konsantrasyonda (80 ve 100 µg/ml) istatistiksel açıdan önemli olmuştur (Çizelge 4.9). Kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğundaki azalışlar konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.29 ve 4.30).



Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda EA+H_2O_2 ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunun EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.033).



Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda EA+H_2O_2 ile 1 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk momentinin EA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı (P<0.009).

4.2. Tartışma

Bu çalışma, doğal antioksidan grubunda yer alan ve aynı zamanda bitkisel kaynaklı fenolik bir bileşik olan EA'nın insan periferal lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik özelliğe sahip olup olmadığını KKD, KA, MN ve KOMET testleri ile, sitotoksik özelliğe sahip olup olmadığını ise PI, MI ve NBI'sını inceleyerek saptamak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, başka araştırıcıların antioksidan kullanarak yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri sunuçlar ile karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

Bu çalışmada, EA'nın insan periferal lenfositlerinde 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda KKD'yi uyarmadığı saptanmıştır. EA+EMS'nin birlikte uygulandığı deney grubunda ise EA'nın EMS kaynaklı artan KKD sayısını pozitif kontrolle kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda önemli ölçüde azaltarak antigenotoksik bir etki gösterdiği saptanmıştır. Şimdiye kadar EA'nın KKD oluşumu üzerine genotoksik ve antigenotoksik etkisini gösteren çalışmalar yapılmamıştır. Ancak aynı antioksidan grubunda yer alan ve KKD oluşumu üzerindeki etkileri araştırılan doğal antioksidanlarla yapılan çalışmaları şu şekilde özetleyebiliriz:

Šiviková ve ark. (2001) koyun periferal lenfositlerinde karbon tetraklorür (CCl_4)'ün genotoksisitesine karşı vitamin E ve selenyum'un antigenotoksik etkilerini belirlemek üzere yaptıkları in vitro KKD testinde vitamin E ve selenyum'un KKD sayısını kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Nefić (2008), vitamin C'nin çeşitli ajanlarla uyarılan KKD sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

Araştırıcıların elde ettikleri bu sonuçlar bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir.

4.2.2. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallikleri (KA) Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

Bu çalışmada, EA (EA)'in insan periferal lenfositlerinde 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda KA'yı uyarmadığı saptanmıştır. EA+EMS'nin birlikte uygulandığı deney grubunda ise EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı artan anormal hücre yüzdesini (AH) ve hücre başına düşen kromozom anormallik oranını (KA/Hücre) dolayısıyla KA oluşumunu pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede ve konsantrasyona bağlı olacak bir şekilde azalttığı saptanmıştır.

Thresiamma ve ark. (1998)'nın 1.5- 3.0 Gy radyasyona maruz bırakılan farelerin kemik iliği hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada 200 µM EA'nın kromozomal bozukluk gösteren kemik iliği hücrelerinin sayısını önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir.

Narayanan ve ark. (1999) sıçan periferal kan lenfositleriyle yaptıkları bir çalışmada EA'nın sıçan lenfositlerinde radyasyona bağlı oluşan DNA dizilim defektlerini önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir.

Adluri ve ark. (2007) ile Sudheer ve ark. (2007) daha önce yapılan Komet ve MN deneylerinde toksik konsantrasyonu belirlenen nikotin (3 mM) ile sıçan periferal kan lenfositlerini muamele etmişler ve DNA zararları artmış hücrelerin ortamına 10, 50, 100, 150 ve 300 µM ilave edilen EA'nın tüm konsantrasyonlarda hücrelerdeki DNA zararlarının oluşumunu önlediğini bildirmişlerdir.

Sharma ve Sharma (2012) karbofuran pestisidi ile genotoksisitesi indüklenmiş insan periferal lenfositlerini kullanarak yaptıkları in vitro çalışmada önce karbofuran ile muamele edilerek DNA zararlarının oluşması sağlanmış olan lenfosit hücrelerine sonradan 10 µM verilen vitamin C ve vitamin E antioksidanlarının hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyerek DNA zararlarını anlamlı bir şekilde azalttığını saptamışlardır.

Baluchnejadmojarad ve ark. (2017) parkinsonlu sıçanlara tedavi amaçlı verilen 6-hidroksidopamin (6-OHDA)'nin sıçan beyninde oluşturacağı

nörotoksisite üzerine EA'nın olası etkilerini incelemek üzere yaptıkları çalışmalarda 6-OHDA verilen hastalara daha sonra bir hafta boyunca günlük 50 mg/kg verilen EA'nın melondialdehit (MDA), reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA fragmentasyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Yukarıda açıklanan araştırıcıların yaptıkları deneylerden elde ettikleri sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler yöndedir.

4.2.3. Elajik Asit (EA)'nın İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

Bu çalışmada EA, 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda MN'li iki nukleuslu hücrelerin %'sini (% MNBN) ve MN %'sini genel olarak arttırmış olmasına rağmen, bu artış kontrole nazaran istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak EA+EMS uygulamasında, EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı artan MN'li iki nukleuslu hücrelerin %'sini pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşürmüştür.

Başka araştırcıların EA kullanarak yaptıkları mikronükleus testinden elde ettikleri sonuçları şu şekilde özetleyebiliriz:

Adluri ve ark. (2007) ile Sudheer ve ark. (2007) daha önce yapılan Komet ve MN deneylerinde toksik konsantrasyonu belirlenen nikotin (3 mM) ile sıçan periferal kan lenfositleri muamele edilmiş ve lipid proksidaz seviyesi, DNA zararları ve MN sayısı artmış hücrelerin ortamına 10, 50, 100, 150 ve 300 µM EA ilave etmişler ve sonuçta EA'nın tüm konsantrasyonlarda hücrelerdeki DNA zararlarının oluşumunu önleyerek MN sayısını önemli ölçüde azalttığını, ancak maksimum korumanın 100 µM konsantrasyondaki EA ile sağlandığını bildirmişlerdir.

Gradecka-Meesters ve ark. (2011), C57BL/6J fare hücre hattı kullanarak yaptıkları komet testinde EA'nın, farelere 30 mg/kg konsantrasyonlarda verilen benzopren (BP)'nin DNA'da oluşturacağı zararları büyük ölçüde önlediğini ve fare

kemik iliği hücrelerindeki polikromatik eritrositlerde BP kaynaklı MN oluşumuna karşı hücrede koruyucu bir etki oluşturduğunu bulmuşlardır.

Godevac ve ark. (2011)'nın insan periferal lenfositlerini kullanarak yaptıkları in vitro MN testinde böğürtlen tohumlarından elde edilen EA ve türevlerinin sitokalasin-B ile muamele edilen hücrelerde MN oluşum sıklığını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır.

EA'nın antigenotoksik ve antioksidatif bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek üzere erkek Swiss albino fareleri kullanılarak yapılan in vivo bir çalışmada siklofosfamid (CPM) ile birlikte 7 gün boyunca intraperitonal yoldan 50 ve 100 mg/kg v.a EA verilen farelerin kemik iliği hücrelerinde EA'nın MN oluşumunu kontrole oranla önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Muneeb ve ark., 2012).

Berni ve ark. (2012), EA'nın antigenotoksik bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla insan hepatoma hücreleri (HepG2) ile in vitro ve fare kemik iliği hücreleri ile ise in vivo yaptıkları MN testlerinde hücreleri kanserojen bir madde olan N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) ile muamele etmişler ve sonuçta EA'nın gerek in vivo gerekse in vitro yapılan çalışmalarda MN oluşum sıklığını kontrole oranla önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır.

Görüldüğü gibi araştırıcıların EA kullanarak yaptıkları MN testinden elde ettikleri sonuçlar bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir.

4.2.4. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Hücre Proliferasyonu, Mitoz Bölünme ve Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Sitotoksik ve Antisitotoksik Etkileri

Bu çalışmada EA'nın insan periferal lenfositleri üzerinde sitotik etkiye sahip olup olmadığı proliferasyon indeksi (PI), mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI) saptanması yoluyla belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde

ettiğimiz sonuçlara göre EA hücre proliferasyonunu, mitoz bölünmeyi ve nükleus bölünmesini önemli düzeyde etkilememiştir. Dolayısıyla test maddesi EA'nın DNA repliksayonu ve hücre bölünmesi üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur.

EA+EMS uygulamasında ise EA 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde ve tüm konsantrasyonlarda EMS kaynaklı azalan PI ve NBI'yı pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede arttırmıştır. Yine EA+EMS uygulamasında, EA EMS kaynaklı azalan MI'yı pozitif kontrole oranla konsantrasyona bağlı bir şekilde genel olarak arttırmış ancak bu artış sadece 24 veya 48 saatlik uygulamalarda ve en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) istitistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Çalışmamızın genotoksik ve antigenotoksik kısmından elde ettiğimiz bu sonuçlar EA'nın sitotoksik etkisiyle ilintili olan apoptotik, antikanser ve antitümör etkilerin araştırıldığı çalışmaların çoğundan elde edilen sitotoksite sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmalardan bazıları:

Bizim çalışmamızı destekler nitelikte olan Losso ve ark. (2004)'nın yaptıkları benzer bir çalışmada 1-100 µM konsantrasyonlardaki EA'nın seçici bir sitotoksisite ve antiproliferatif bir aktivite göstererek Caco-2 kolon kanseri, MCF-7 meme kanseri, Hs578T meme kanseri ve DU 145 prostat kanseri hücre soylarında apoptozise yol açtığı, buna karşılık HEL-299 normal insan akciğer fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmadığı saptanmıştır. Yine Larrosa ve ark. (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 1-30 µM konsantrasyonlardaki EA'nın Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azaltırken, normal kolon hücrelerinde herhangi bir apoptotik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Seeram ve ark. (2005) ile Fjaeraa ve Nanberg (2009)' nın KB, CAL27 insan oral, HT-29 kolon, RWEP-1 prostat ve SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleriyle yaptıkları bir çalışmada 10-100 µM arası konsantrasyonlardaki EA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör bir etki oluşturduğu, hücre canlılığını azalttığı ve apoptozisi uyardığı saptanmıştır.

Ekinci (2009), sıçan C6 glioma hücrelerinin iki ve üç boyutlu hücre kültür modellerini kullanarak yaptığı bir çalışmada 1-100 µM EA'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu ve canlılık oranını önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir.

Erenoğlu (2012), EA'nın meme kanseri hücre hatları olan SKBR-3 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak üzere yaptığı çalışmada EA'nın on bir farklı konsantrasyonunu (5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM ve 300 µM) 72 ve 96 saat süreyle uygulamıştır. Araştırıcı sonuçta EA'nın kanserli hücrelerde hücre proliferasyonunu uygulanan konsantrasyon ve zamana bağlı olarak kontrole oranla istatiksel açıdan anlamlı bir şekilde azalttığını ve hücreleri apoptoza sevk ettiğini ve dolayısıyla kanserli hücreler üzerinde sitotoksik bir etki gösterdiğini saptamıştır.

Ceci ve ark. (2016), EA'nın kanser hücreleri üzerindeki antitümör etkisini incelemek için T24, UM-UC-3, 5637 ve HT-1376 olmak üzere dört farklı insan mesane kanser hücre hattı kullanarak in vitro ve intraperitonal yoldan UM-UC-3 hücreleri ($5x10^6$) enjekte edilen fareler ile in vivo çalışmalar yapmışlardır. Araştırıcılar sonuçta EA'nın gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalarda konsantrasyona bağlı olacak şekilde tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu, VEGF-A'nın (vasküler endotel büyüme faktörü A) reseptörü olan VEGFR-2 geninin ekspresyonunu baskılayarak tümör hücrelerinin anjiyogenezini önlediğini ve PD-L1 genini (programlanmış hücre ölüm ligandı 1) aktive ederek tümör hücrelerini apoptozise sevk ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Guo ve ark. (2016), nar kabuğundan elde ettikleri EA'nın mesane kanseri üzerindeki antikanserojenik etkilerini belirlemek üzere HeLa hücrelerini kullanarak yaptıkları in vitro bir çalışmada EA'nın IGFBP7 geninin ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde arttırarak hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre yayılımı ve apoptoziste görev alan AKT/mTOR sinyal yolunu engellediğini ve böylece kanserli hücrelerin yayılımını önleyerek onları apoptoza sevk ettiğini bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi tüm bu sonuçlar bizim çalışmamızda EA'nın sitotoksisitesini belirlemek üzere yaptığımız testlerden elde ettiğimiz sonuçları destekler yöndedir.

4.2.5. Elajik Asit (EA)'in İnsan Periferal Lenfositlerinde Nükleustan Göç Eden DNA Parçalarının Oluşturduğu Nükleusa Bağlı Kuyruğun Uzunluğu, Kuyruktaki DNA Yoğunluğu ve Kuyruk Momenti Üzerindeki Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

EA, tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini konsantrasyona bağlı olacak şekilde genel olarak düşürmüş ancak bu düşüş kontrole nazaran istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır

EA+H_2O_2 uygulamasında, EA H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk uzunluğunu pozitif kontrole oranla genel olarak düşürmüş ancak bu düşüş 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan önemli seviyede olmuştur.

Yine EA+H_2O_2 uygulamasında, EA H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti oranlarını pozitif kontrole oranla genel olarak düşürmüş ancak bu düşüşler kuyruk yoğunluğu için en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml), kuyruk momenti için ise 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda istatistiksel açıdan önemli olmuştur.

Komet testinden elde ettiğimiz genotoksik ve antigenotoksik sonuçları birlikte değerlendirecek olursak EA'nın kuruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti üzerinde herhangi bir genotoksik etkisinin bulunmadığı, buna karşın H_2O_2 kaynaklı artan DNA hasarlarını özellikle yüksek iki konsantrasyonda önemli ölçüde telafi ettiği ve dolayısıyla antigenotoksik etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Cozzi ve ark. (1995), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve mitomisin-C ile uyarılan Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerini kullanarak yaptıkları in vitro bir

çalışmada EA'nın reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve dolayısıyla DNA'ya bağlanmasını engelleme yoluyla DNA hasarlarını önlediğini bildirmişlerdir.

Gradecka-Meesters ve ark. (2011), C57BL/6J fare hücre hattını kullanarak yaptıkları komet testinde EA'nın, farelere 30 mg/kg konsantrasyonlarda verilen benzopren (BP)'nin DNA'da oluşturacağı zararları büyük ölçüde önlediğini ve fare kemik iliği hücrelerindeki polikromatik eritrositlerde BP kaynaklı MN oluşumuna karşı hücrede koruyucu bir etki oluşturduğunu bulmuşlardır.

Kahl ve ark. (2012) vitamin C'nin antioksidan özelliğini belirlemek üzere nikotin ile toksik etkiler ve DNA zararları oluşturulmuş fareleri kullanarak yaptıkları in vitro komet testinde vitamin C'nin nikotin kaynaklı hücrelerde oluşan DNA zararlarını ve toksisiteyi büyük ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Vitamin C'nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile DNA zararlarının oluşumu uyarılan insan kolerektal adenokarsinoma hücre hattı (HT29) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı in vitro comet testinde 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda kullanılan vitamin C'nin H_2O_2'nin sebep olduğu DNA zararlarını pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan önemli derecede düşürdüğü rapor edilmiştir (Kontek ve ark., 2013).

Özetle çalışmamamızdan elde etiğimiz sonuçlar EA ve yine doğal antioksidanlar grubunda yer alan başka antioksidanlar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçları destekler yöndedir. Buna göre EA'nın sitotoksik ve genotoksik olmadığı, buna karşın bilinen bir mutajen olan EMS'nin sebep olduğu genotoksisite ve sitotoksiteyi büyük ölçüde engelleyerek antigenotoksik ve antisitotoksik bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmada bitkilerde bulunan bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda doğal antioksidan grubunda yer alan EA, insan periferal lenfositlerinde KKD sayısını arttımamış aksine bilinen bir mutajen olan EMS ile birlikte kullanıldığında EMS kayanklı artan KKD sayısını pozitif kontrole oranla önemli derecede azaltmıştır.

EA, kromozom anormalliği ve mikronukleus oluşumu gibi genotoksite parametreleri üzerinde belirgin bir etki göstermemiştir. Bu sonucun aksine bilinen klastojenik ajanın (EMS'nin) genotoksik etkilerini hemen hemen tüm konsantrasyonlarda minimize etmiştir.

Çalışmada genotoksisiteyi belirlemek için tamamlayıcı bir test sistemi olarak kullanılan Komet testinden elde edilen sonuçlara göre ise EA'nın genotoksik olmadığı aksine H_2O_2 ile birlikte muamele edildiği gruplarda H_2O_2 kaynaklı artan kuyruk yoğunluğunu en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml), kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti oranlarını ise yüksek iki konsantrasyonda (80 ve 100 µg/ml) istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaltarak antigenotoksik etki göstermiştir.

Test maddesinin sitotoksik potansiyeli hakkında fikir edinmek için belirlenen PI, MI ve NBİ'nin tüm muamele süreleri ve konsantrasyonlarda kontroldekinden farklı olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre EA'nın sağlıklı periferal lenfosit hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı kanaatine varılmıştır. Ayrıca EA, EMS kaynaklı azalan PI ve NBI'yı 24 veya 48 saatlik muamele süreleri ve tüm konsantrasyonlarda MI'yı ise sadece 24 veya 48 saatlik muamele sürelerinde en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) pozitif kontrole oranla istatistiksel açıdan anlamlı derecede arttırmıştır.

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde gerek test maddesi olan EA ile gerekse aynı grupta yer alan diğer doğal antioksidanlarla yapılan çalışmalardan elde edilen tüm sonuçlar bu çalışmadan elde edilen sonuçları destekler yöndedir. Dolayısıyla EA, sağlıklı hücrelerde genotoksik ve sitotoksik etkilere neden

olmamakta, aksine bilinen genotoksik ajanın etkilerini ise genel anlamda baskılamaktadır. Test maddesinin genotoksik ve sitotoksik etkisinin olmaması, ayrıca antigenotoksik ve antisitotoksik etki göstermesi onu mutajenlere karşı koruyucu olarak kullanılması konusunda gelecek vadeden moleküller kategorisine sokmaktadır. Bu çalışmaya ilaveten farklı test sistemleri ve/veya kanser hücre hatları gibi farklı hücre tipleri kullanılarak yapılacak olan in vitro ve özellikle in vivo deneylerden saptanacak bulgular EA'nın kesin olarak sitotoksik ve genotoksik olup olmadığını ve aynı zamanda antigenotoksik ve antikanserojen etkiye sahip olup olmadığını ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

Abdallah, H.M., Salama, M.S., Abdelrahman, E.H., El-Maraghy, S.A. 2011. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats: Phytochem. Lett., 4:337-341.

Adluri, R.S., Shanmugasvelu, M., Nagarajan, D., Venugopal, P.M. 2007. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotin-induced cellular and DNA damage in vitro: With the comparison of N-acetylcysteine. Toxicology, 230:11-21.

Ahad, A., Ganai, A.A., Mujeeb, M., Sıddıgui, W.A. 2014. Ellagic acid, an NF-kappaB inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. Chem Biol Interact., 219 (1): 64-75.

Ahn, D., Putt, D., Kresty, L., Stoner, G.D., Fromm, D and Hollenberg, P.F. 1996. The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase 11 enzymes. Carcinogenesis, 17, 821-28.

Aitken, P., Breese, G., Dedek, F., Edwards, F., Espanol, M., Larkman, P. 1995. Preparative methods for brain slices: a discussion, J. Neurosci Methods, 59:139–49.

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Res., 463:111–172.

Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, A., Tonogai, Y. 2000. Height-performance liquid chromatography determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. J Choromatogr B., 896: 87-93.

Anderson, D. 1988. Human Biomonitoring. Mutation Res., 204:353-541.

Anderson, K.C., Teuber, S.S. 2010. Ellagic acid and polyphenolics present in walnut kernels inhibit in vitro human peripheral blood mononuclear cell proliferation and alter cytokine production. Ann N Y Acad Sci., 1190:86-96.

Anitha, P., Priyadarsini, R.V., Kavitha, K., Thiyagarajan, P., Nagini, S. 2013. Ellagic acid coordinately attenuates Wnt/beta-catenin and NF-kappaB signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. Eur J Nutr., 52 (1): 75-84.

Antmen, E. 2005. Beta Talasemide Oksidatif Stres. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Adana, 82s.

Ateşşahin, A., Çeribaşı, A.O., Yüce, A., Bulmuş, O., Çikim, G. 2006. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity ve oxidative stres in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol., 100 (2): 121-126.

Ateşşahin, A., Türk, G., Yılmaz, S., Sönmez, M., Sakin, F., Çeribaşı, A.O. 2010. Modulatory Effects of Lycopene and Ellagic Acid on Reproductive Dysfunction Induced by Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254) in Male Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol., 106 (6): 479-89.

Auib, C.A.F., Pinto, L.F.R., Felzenszwalb, I. 2009. DNA-repair genes and vitamin E in the prevention of N-nitrosodiethylamine mutagenicity. Cell Biol Toxicol., 25:393-402.

Baeeri, M., Momtaz, S., Nigjeh, M.N., Niaz, K., Rahimifard, M., Ghasemi-Niri, S.F., Sanadgol, N., Hodjat, M., Sharifzadeh, M., Abdollahi, M. 2017. Molecular evidence on the protective effect of ellagic acid on phosalone-induced senescence in rat embryonic fibroblast cells. Food and Chemical Toxicology, 100:8-23.

Bala, I., Bhardwajd, V., Hariharan, S., Ravi-Kumar, M.N.V. 2005. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. J Pharm Biom Analys., 40:206-10.

Baluchnejadmojarad, T., Rabiee, N., Zabihnejad, S., Roghani, M. 2017. Ellagic acid exerts protective effect in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: possible involvement of Erbeta/Nfr2/HO-1 signaling. Brain Res., 1662:23-30.

Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D. and Chakraborty, A. 2008. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. European Journal of Pharmacology, 588 (2–3):151–157.

Barch, D.H., Raudhaugen, L.M. (1994). Ellagic acid induces NAD(P)H: quinone reductase through activation of the antioxidant responsive element of the rat NAD(P)H: quinone reductase gene. Carcinogenesis, 15 (9):2065-2068.

Berni, A., Grossi, M.R., Pepe, G., Filippi, S., Muthukumar, S., Papeschi, C., Natarajan, A.T., Palitti, F. 2012. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N- methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. Mutation Res., 746:60-65.

Boffetta, P., Van Der Hel, O., Norppa, H., Fabionova, E., Fucic, A., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Puskailerova, D., Znaor, A., Kelecsenyi, Z., Juozas, K., Rachtan, J., Forni, A., Vermeulan, R. and Bonassi, S., 2006. Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Result of a Cohort Study from Central Europe. American Journal of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, U. S. A., DOI: 10.1093/aje/kwj367. p 1-10.

Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A. H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkılä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I. L., Knudsen, L. E. and Norppa, H., 2000. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. Cancer Res., 60 :1619-1625.

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgia, M., Freguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W. U., Odagiri, Y., Scarfi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A., 2001. Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. Environ. and Mol. Mutagen., 37:31-45.

Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H. and Hagmar, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res., 104:376-382.*

Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Stromberg, U., Vermeulen, R. and Tucker, J. D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives. Environ. and Mol. Mutagen., 45:258-270.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H. and Fenech, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. Carcinogenesis, 28:625-631.

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. Mutagenesis, Jan; 26 (1):93-100.

Boussema, I.A., Abassi, H., Bouaziz, C., Hlima, W.B., Ayed, Y., Bacha, H. 2013. Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. Environ Toxicol., 28:299-306.

Bozkurt, Y., Fırat, U., Atar, M. 2002. The Protective Effect of Ellagic Acid Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Male Rats. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 18(5):823-8.

Camphausen, K., Sproull, M., Tantama, S., Sankineni, S. 2003. Evaluation of cooper chelation agents as anti- angiogenic therapy. Bioorg Med Chem., 11:4287-93.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, Free Radical Biology & Medicine, 22(5):749-760.

Cao, G., Prior, R.L. 1999. In vivo antioxidant capacity: comperison of different analytical methods. Free Radical Biology & Medicine, 27:1173-1181.

Carrano, A.V., Thompson, Lindl, P.A. and Minkler, J.L. 1978. Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis. Nature (London), 271:551-553.

Carrano, A.V., Natarajan, A.T. 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. Mutation Res., 204:379-406.

Ceci, C., Tentori, L., Atzori, M.G., Lacal, P.M., Bonanno, E., Scimeca, M., Cicconi, R., Mattei, M., De Martino, M.G., Vespasiani, G., Miano, R., Graziani, G. 2016. Ellagic acid inhibits bladder cancer invasiveness and in vivo tumor growth. Nutrients, 8:744-764.

Cerdá, B., Llorach, R., Céron, J.J., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. 2003. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin and antioxidant polyphenol from pomegranate juice. Eur. J. Nutr., 42:18–28.

Cerdá, B., Espín, J.C., Parra, S., Martinez, P., Tomás-Barberán, F.A., 2004. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora in healthy humans. Eur. J. Nutr., 43:205–220.

Chao, P.C., Hsu, C.C., Yin, M.C. 2009. Anti-inflammatory and anticoagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. Nutr Metab (Lond)., 6:33.

Chatterjee, A., Chatterjee, S., Das, S., Saha, A., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, S.K. 2012. Ellagic acid facilitates indomethacin-indeced gastric ulcer healing via COX-2 up-regulation. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)., 44(7):565-567.

Cheng, M., Conner, M.K. and Alaria, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. Cancer Res., 71:4508-4512.

Cheng, T. J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J. C., Wiencke, J. K. and Kelsey, K. T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. Mutation Res., 349:43-50.

Cheng, H., Lu, C., Tang, R., Pan, Y., Bao, S., Qui, Y., Xie, M. 2017. Ellagic acid inhibits the proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells in vitro and in vivo. Oncotarget, 8 (7):12301-12310.

Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B., Leeuwenburgh, C. 2001. Supplementation with vitamin c and n-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise, Free radical. Biology & Medicine, 31(6):745–753.

Choy, W.N. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker. New York. 29-187.

Chung, Y.C., Lu, L.C., Tsai, M.H., Chen, Y.J., Chen, Y.Y., Yao, S.P., Hsu, C.P. 2013. The inhibitory effect of ellagic acid on cell growth of ovarian carcinoma cells. Evid Based Complement Alternat Med., ID: 306705.

Constantinou, A., Stoner, G.D., Mehta, R., Rao, K., Runyan, C., Moon, R. 1995. The dietary anticancer agent ellagic acid is a potent inhibitor of DNA topoisomerases in vitro. Nutr Cance, 23(2):121–30.

Cos, P., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., & Vanden Berghe, D. 2000. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. Studies in Natural Products Chemistry, 22:307-341.

Cozzi, R., Ricordy, R., Bartolini, F., Ramadori, L., Perticone, P., De-Salvia, R. 1995. Taurine and ellagic acid: two differentlt,y acting natural antioxidants. Environ. Mol. Mutag., 26:248-254.

Çavaş, T. and Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheralerythrocytes of goldfish (Carassius auratus) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis, 22(4):263–268.

Çavaş, T. and Könen, S. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shell.sh poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. Aquatic Toxicology, 90:154-159.

De Boer, J.G., Yang, H., Holcroft, J., Skov, K. 2004. Chemoprotection against N-nitrosomethylbenzylamine-induced mutation in the rat esophagus. Nutr Cancer, 50:168-173.

Dellarco, V.L., Mavournin, K.H. and Tice, R.R., 1985. Aneuploidy and Health Risk Assessment: Current Status and Future Directions, Environ. Mutagen., 7:405-424.

Deming, D.M., Boileau, T.W.M., Heintz, K.H., Atkinson, C.H., Erdman, J.W. 2002. Carotenoids: Linking chemistry, absorption, and metabolism to potential roles in human health and disease. Process Biochemistry, 41:1773-1778.

Desmarchelier, C., Ciccia, G., Coussio, J. 2000. Recent advances in the search for antioxidant activity in South American plants. Stud. Nat. Prod. Chem., 22:343-367.

Dias, C.D., Araújo, B.C., Dutra, E.S., Nepomuceno, J.C. 2009. Protective effects of beta-carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of Drosophila melanogaster. Genet Mol Res., 8(4):1367-75.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi: comet analiz yöntemi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi. 2-14.

Ding, Y., Zhang, B., Zhou, K., Chen, M., Wang, M., Jia, Y., Song, Y., Li, Y., Wen, A. 2014. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation. Int J Cardiol., 175(3):508-514.

Doyle, B., Griffiths, L.A. 1980. The metabolism of ellaic acid in the rat. Xenobiotica, 10:247-56.

Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A. L., Volot, F., Favre, R. and Botta, A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocytes Rates Observed in Healthy Subject and Cancer Patients. Mutagenesis, 12:227-231.

Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesisblocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environ Mol Mutagen., 13:34–43.

Edderkaoui, M., Odinokova, I., Ohno, I., Gukovsky, I., Go, V.L.W., Pandol, S.J., Gukovskaya, A.S. 2008. Ellagic acid induces apoptosis throught inhibition of nuclear factor kB in pancreatic cells. World Journal of Gastroenterology, 14(23):3672-3680.

Ekinci, C. 2009. Elajik Asidin C6 Sıçan Glioma Hücre Kültürlerinde Sitotoksisite ve Proliferasyon Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. 47s.

Erenoğlu, N. 2012. Farklı insan meme kanseri hücrelerinde elajik asit'in sitotoksik etkisi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 42s.

Ergen, İ., Turgut, B., İlhan, N. 2017. Comparison of the impact of epigallo catechin gallate and ellagic acid in an experimental cataract model induced by sodium selenite. Int J Ophthalmol., 10(4): 499-506.

Espin, J.C., Gonzalez-Barrio, R., Cerda, B., Lopez-Bote, C., Rey, A.I., Tomas-Barberan, F.A. 2007. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. J. Agric. Food Chem. 55:10476-10485.

Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.

Falseperla, M., Morgia, G., Tatrarone, A., Ardito, R., Romano, G. 2005. Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate. Eur Urol., 47:449-55.

Farbood, Y., Sarkari, A., Dolatshani, M., Taqhi-Mansouri, S.M., Khodadadi, A. 2015a. Ellagic acid protects the brain against 6-hydroxydopamine induced neuroinflammation in a rat model of Parkinson's disease. Basic. Clin. Neurosci, 6:120-127.

Farbood, Y., Sarkari, A., Dianat, M., Khodadadi, A., Haddad, M.K., Mashhadizadeh, S., 2015b. Ellagic acid prevents cognitive and hippocampal long-term potentiation deficits and brain inflammation in rat with traumatic brain injury. Life Sci., 124:120-127.

Fenech, M. and Morley, A. A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. Mutation Res., 147:29-36.

Fenech, M. 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. Mutat Res. 392:11-18.

Fenech, M., 2000. The in vitro Micronucleus Technique. Mutat. Res., 455:81-95.

Fenech, M. 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. Toxicology, 181-182:411-416.

Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S. 2011. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. Mutagenesis, Jan., 26(1): 239-245.

Feng, Y., Yang, S.G., Du, X.T. Zhang, X., Sun, X.X., Zhao, M., Sun, G.Y., Liu, R.T. 2009. Ellagic acid promotes $A\beta_{42}$ fibrillization and inhibits $A\beta_{42}$-induced neurotoxicity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 390:1250-1254.

Fjaeraa, C., Nanberg, E. 2009. Effect of ellagic acid on proliferasyon, cell adhesion an apoptosis _n SH-SY5Y nuroblastoma cells, Biomedicine. 63:254-61.

Fidan, A.F. 2008. DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 8(1). 52s.

Gehan, S.G., Omar, W.M. 2017. Ellagic acid and rosmarinic acid attenuate dexorubicin-induced testicular injury in rats. J Biochem Mol Toxicol., DOI: 10.1002/jbt.21937.

Girish, C., Pradhan, S.C. 2012. Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbontetrachloride-induced liver toxicity in mice. J Pharmacol Pharmacother, 3(2):149–55.

Gođevac, D., Teševic, V., Vajs, V., Milosavljević, S., Stanković, M. 2011. Blackberry seed extracts and isolated polyhenolic compounds showing protective effect on human lymphocytes DNA. Journal of Food Science, Vol. 76 Nr. 7.

Gradecka-Meesters, D., Palus, J., Prochazka, G., Segerback, D., Dziubattowska, E., Kotova, N., Jenssen, D., Arkusz, J., Lundin, C., Vikström, E., Rydzynski, K., Milsson, R., Stepnik, M. 2011. Assessment of the protective effects of selected dieatary anticarcinogens against DNA damage and cytogenetic effects induced by benzo[a]pyrene in C57BL/6J mice. Food and Chemical Toxicology, 49:1674-1683.

Guerriero, E., Sorice, A., Capone, F., Napolitano, V., Colonna, G., Storti, G., Castello, G., Costantini, S. 2014. Vitamin C effect on mitoxantrone-induced cytotoxicity in human breast cancer cell lines. Plos One. DOI: 10.1371.

Guo, H., Zhang, D., Fu, Q. 2016. Inhibition of cervical cancer by promoting IGFBP7 expression using ellagic acid from pomegranate peel. Med Sci Monit., 22:4881-4886.

Gürbüz, N., Özkul, A., Burgaz, S. 2009. Effects of vitamin C and N-acetylcysteine against cyclophosphamide-induced genotoxicity in exfoliated bladder cells of mice in vivo. J Buon., 14 (4):647-52.

Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5):1887-1892.

Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Niitsu, N., Okabe-Kado, J. 2010. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic

acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. Int J Hematol., 92(1): 136-43.

Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Högstedt, B., Knudaen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving. S. and Sorsa, M. 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. Cancer Res., 54:2919-2922.

Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition Reviews. 70(5):257-265.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O. I., 1995. The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology, 33:601-617.

Han, D.H., Lee, M.J., Kim, J.H. 2006. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. Anticancer Res., 26(5A):3601-3606.

Hanif, S., Shamim, U., Ulah, M.F., Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hadia, S.M. 2008, The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. Toxicology, 249:19–25.

Hartman, R.E., Shah, A., Fagan, A.M., Schwetye, K. E., Parsadanian, M. 2006. Pomegranate Juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis., 24:506-15

Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, Ph. and MacGregor, J. T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. Environ. and Mol. Mutagen., 18:277-291.

Helleday, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. Mutation Res., 532:103-115.

Hemmati, A.A., Olapour, S., Varzi, H.N., Khodayar, M.J., Dianat, M., Mohammadian, B., Yaghooti, H. 2017. Ellagic acid protects against arsenic

trioxide-induced cardiotoxicity in rat. Human and Experimental Toxicology, 1-8.

Ho, C.C., Huang, A.C., Yu, C.S., Lien, J.C., Wu, S.H., Huang, Y.P., Huang, H.Y., Kuo, J.H., Liao, W.Y., Yang, J.S., Chen, P.Y., Chung, J.G. 2014. Ellagic acid induces apoptosis in TSGH8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondria-depented signaling pathways. Environ Toxicol., 29 (11):1262-1274.

Hudson, B.J. 1990. Food Antioxidant. Elsevier Science. USA.

Husain, N., Kumar, A. 2012. Reactive oxygen species and natural antioxidants: a review. Advances in Bioresearch, 3(4):164-175.

Hwang, J.M., Cho, J.S., Kim, T.H., Lee, Y.I. 2010. Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. Biomedicine&Pharmacotherapy, 64:264-270.

Ishii, Y., Bender, M.A. 1980. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. Mutation Res., Sep; 79 (1):19-32.

Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., Hatano, T. 2011. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. Bioorg. Med. Chem. Lett., 21:5901–5904.

Kahl, V.F.S., Reyes, J.M., Sarmento, M.S., Silva, J. 2012. Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine induction. Mutation Res., 744:140-144.

Kang, E.H., Kown, T.Y.,Oh, G.T., Park, W.F., Park, S., Park, S.K., Lee, Y.I. 2006. The flavonoid ellagic acid from a medicinal herb inhibits hot immune tolerance induce by the hepatitis B virus-e antigen. Antiviral Res., 72:100-106.

Karakaya, S. 2004. Bioavailability of phenolic compounds. Cri. Rev. Food. Sci. Nutr., 44:453-64.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94(4):550-557.

Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F. J. and Speit, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. Environ. and Mol. Mutagen., 18(1):28-34.

Keshtzar, E., Khodayar, M.J., Javadipour, M. ve ark. 2016. Ellagic acid protects against arsenic toxicity in isolated rat mitochondria possibly through the maintaining of complex II. Hum Exp Toxicol., 35:1060-1072.

Kim, S., Gaber, M.W., Zawaski, J.A., Zhang, F., Richardson, M., Zhang, X.A., Yang, Y. 2009. The inhibition of glioma growth in vitro and in vivo by chitoan/ellagic acid composite biomaterial. Biomaterials, 30:4743-51.

Kim, Y.S., Zerin, T., Song, H.Y. 2013. Antioxidant action of ellagic acid ameliorates paraquat-induced A549 cytotoxicity. Biol. Pharm. Bull., 36 (4):609-615.

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The In Vitro Micronucleus Test: A Multi-endpoint Assay to Detect Simultaneously Mitotic Delay, Apoptosis, Chromosome Breakage, Chromosome Loss and Non-disjunction. Mutation Res., 392(1-2):19-30.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation Res., 363:89-96.

Kong, K.W., Junit, S.M., Aminudin, N., Hassan, F.A., Ismail, A., Aziz, A.A. 2016. Protective effects of the extracts of Barringtonia racemosa shoots against oxidative damage in HepG2 cells. Peer J., 4:1628.

Kontek, R., Kontek, B., Grzegorczyk, K. 2013. Vitamin C modulates DNA damage induced by hydrogen peroxide in human colorectal adenocarcinoma cell lines (HT29) estimated by comet assay in vitro. Arch Med Sci., 9(6):1006-1012.

Kopani, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P., BIRO, C. 2006. Oxidative stress and electron spin resonance. Clinica Chimica Acta, 364:61-66.

Kozluca, O., 1993. Serbest radikaller ve kanser. Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri, Cilt IV: 422-425.

Kumar, D., Basu, S., Parija, L., Rout, D., Manna, S., Dandapat, J., Debata, P.R. 2016. Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. Biomedicine&Pharmacoterapy, 81:31-37.

Labieniec, M., Gabryelak, T. 2003. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. Mutation Res., 539:127-135.

Labrecgue, L., Lamy, S., Chapus, A., Mihoubi, S., Durocher, Y., Cass, B., Bojanowski, M.W. 2005. Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound. Carcinogenesis. 26:821-26.

Lako, J., Trenerry, V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., & Premier, R. 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. Food Chemistry. 101(4):1727-1741.

Landete, J.M. 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. Food Res. Int., 44:1150–1160.

Larrosa, M., Thomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. 2006. The dietary hydrolysable tannin punicalagin release ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarsinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. Journal of Nutritional Biochemistry, 17:611-625.

Lee, K.W., Lee, H.J., Surh, Y.J., Lee, C.Y. 2003. Vitamin C and cancer chemoprevention. Am J Clin Nutr., 78:1074-8.

Lee, W.J., Ou, H.C., Hsu, W.C., Chou, M.M., Tseng, J.J., Hsu, S.L. 2010. Ellagic acid inhibits oxidized LDL mediated LOX-1 expression, ROS generation and inflammation in human endothelial cells. J Vasc Surg., 52(5):1290–300.

Leskovac, A., Joksic, G., Jankovic, T., Savikin, K., Menkovic, N. 2007. Radioprotective Properties of the Phytochemically Characterized Extracts of Crataegus monogyna, Cornus mas and Gentianella austriaca on Human Lymphocytes in vitro. Planta Med., 73(11):1169-1175.

Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C., Chung, J.G. 2005. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. Anticancer Res., 25:971-980.

Lin, M., Yin, M. 2013. Preventive effects of ellagic acid against dexorubicin-indeced cardio-toxicity in mice. Cardiovas Toxicol., 13:185-193.

Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. The Journal of Nutrition, 134(12):3479-3485.

Liu, Q.S., Deng, R., Li, S., Li, X., Li, K., Kebaituli, G., Li, X., Liu, R. 2017a. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression. Appl Physiol Nutr Metab., 7:1-6.

Liu, Q.S., Li, S.R., Li, K., Li, X., Yin, X., Pang, Z. 2017b. Ellagic acid improves endogenous neural stem cells proliferation and neurorestoration through Wnt/β-catenin signaling in vivo and in vitro. Mol Nutr Food Res., 61 (3): DOI: 10.1002.

Löliger, J. 1991. The use of antioxidants in food. In Free Radicals and Food Additives; Aruoma, O. I., Halliwell, B., Eds.; Taylor and Francis: London. 129-150.

Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A., Bawadi, H.A., Truax, R. 2004. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. Journal of Nutritional Biochemistry, 15:672-678.

Mace, ML JR., Daskal, Y. and Wray, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. Mutation Res., 52:199-206.

Madle, S., Beek, B. und Nowak, C., 1993. Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen. Mutationsforschung und genetische Toxikologie (Ed. Rudolf Fahrig). Wissenchaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 224-242.

Majid, S., Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Kapur, S., Sharma, R.R. 1991. Influence of ellagic acid on antioxidant system and lipid per oxidation in mice. Biochem Pharm., 42:1441-45.

Malini, P., Kanchan, G., Rajadurai, M. 2011. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced Diabetes mellitus in albino Wistar rats. Asian J Pharm Clin Res., 4:124-8.

Malik, A., Afag, S., Shahid, M., Akhtar, K., Assiri, A. 2011. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: A caspase-dependent pathway. Asian Pac J Trop Med., 4(7):550-5.

Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., Satoh, K., Shimosegawa, T. 2005. Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. Biochem Pharmacol., 70:869-78.

McArt, D.G., Mckerr, G., Saetzler, K., Howard, C.V., Downes, C.N., Wasson, G.R. 2010. Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. Mutagenesis, 25(3):299-303.

Mitchell, R.E.J., Mccann, R. 1993. Vitamin E is a complete tumor promotor in mouse skin. Carcinogenesis, 14(4):659-662.

Müller, K., Marangoz, K.L., Challis, I.R., Skepper, J.N., Arends, M.J. 2002. Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1. Free Radic Res. 36 (7):791-802.

Muneeb, U.R., Mir, T., Farrah, A., Wajhul, Q., Abdul, L., Rehan, K., Abdul, Q., Oday, O.H., Sarwat, S. 2012. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. Mol Cell Bichem., 365:119-127.

Narayanan, B.A., Geoffroy, O., Willingham, M.C., Re, G.G., Nixon, D.W. 1999. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cell. Cancer Lett., 136:215-21.

Nefić, H. 2008. The genotoxicity of vitamin C in vitro. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 8(2):141-146.

Norppa, H. and Falck, G. C-M., 2003. What Do Human Micronuclei Contain? Mutagenesis, 18(3):221-233.

Norppa, H., 2004. Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphism. Toxicology Letters, 149:309-334.

Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R. J., Kunudsen, L. E., Barale, R. and Fucic, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. Mutation Res., 600(1-2):37-45.

Nutan, M.M., Goel, T., Das, T., Malik, S., Suri, S., Rawat, A.K.S., Srivastava, S.K., Tuli, R., Malhotra, S., Gupta, S.K. 2013. Ellagic acid&gallic acid from Lagerstroemia speciosa L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease&revers transcriptase activity. Indian J Med Res., 137:540-548.

Ostling, O., Johansan, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res., 123(1):291-298.

Pari, L., Siyasankari, R. 2008. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. Fundamental&Clinical Pharmacology, 22(4):395–401.

Pavlica, M., Klobucar, G.I.V., Mojas, N., Erben, R., Papes, D. 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutation Res., 490:209–214.

Pavlica, S., Gebhardt, R. 2005. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. Free Radical Res., 39(12):1377-1390.

Peng, H.C., Chen, J.R., Chen, Y.L., Yang, S.C., Yang, S.S. 2010. B-carotene exhibits antioxidant and antiapoptic properties to prevent ethanoll-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. Phytother Res., 2:183-9.

Perry, P. and Evans, H. J. 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. Nature, 258:121-125.

Perry, P. and Thomson, E.J., 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 459–529.

Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D., Spom, M.B. 1981. Can dietary beta-caratone materially reduce human cancer rates? Nature. 190-201.

Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod., 63(7):1035-1042.

Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: A brief history. Cell Biology and Toxicology, 25:1-3.

Priyadarsini, K.I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H. 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50:2200–6.

Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, Y., Qin, C., Xie, S., Zhu, F. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. Food Chem Toxicol., 59:428-37.

Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differantial Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi., (5):19-24.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in plant science, 2:152-159.

Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L., Spenkeiink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Zanden, J.J., Woude, H., Alnk, G.M., Koeman, J.H. 2002. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. Environmental Toxicology and Pharmacology, 11:321–333.

Rogerio, A.P., Fontanari, C., Borducchi, E., Keller, A.C., Russo, M., Soares, E.G. et al. 2008. Anti-inflammatory effects of Lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. Eur J Pharmacol., 580(1–2):262–70.

Rosillo, M.A., Sanchez-Hidalgo, M., Ca´rdeno, A., Dela-Lastra, C.A. 2011. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. Biochem Pharmacol., 82(7):737–45.

Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V. and Speit, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carries of a BRCA1 mutation in Breast cancer families. Cancer Res., 60:390-394.

Rydberg, G., Johanson, K.J. 1978. DNA Repair Mechanism. Academic Press. Newyork. 465-468.

Saba, Khan, S., Parvez, S., Chaudhari, B., Ahmad, F., Anjum, S., Raisuddin, S. 2013. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclosphosphamide-indeced pulmonary toxicity in Wistar rats. Food and Chemical Toxicology. 58: 210-219.

Salah, N., Miller, H.J., Paganga, G., Tijburg, L. Bolwell, P., Rice-Evans, C. 1995. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidant. Arch. Biochem. Biophys. 322:339-346.

Salem, A.M., Mohammaden, T.F., Ali, M.A.M., Mohamed, E.A., Hassan, H.F. 2016. Ellagic and ferulic acids alleviate gamma radiation and aluminium chloride-induced oxidative damage. Life Science, 160:2-11.

Salvadori, D.M., Riberiro, L.R., Oliveira, M.D., Pereira, C.A., Becak, W. 1992. The protective effect of beta-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. Mutat Res., 265(2):237-44.

Sartippour, M. R., Heber, D., Zhang, L., Beatty, P. 2002. Inhibition of fibroblast growth factors by green tea. Int J Oncol., 3:487-91.

Savage, J. R. K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. Env. and Mol. Mutagen., 22:198-207.

Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y, Zhang, Y., Nair, M.G. and Heber, D. 2005. In vitro antiproliferative apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem**.,** 6:360-3.

Sepand, M.R., Ghahremani, M.H., Razavi-Azarkhiavi, K., Aghsami, M., Rajabi, J., Keshavarz-Bahaghighat, H., Soodi, M. 2016. Ellagic acid confers protection against gentamicin-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction and apoptosis-related nephrotoxicity. J Pharm Pharmacol., 68(9):1222-32.

Seram, N.P., Lee, R., Heber, D. 2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma consumption of ellagitanins from pomegranate Juice. Clinica Chimica Acta, 348:63-68.

Sharma, G., Italia, J.L., Sonaje, K., Tikoo, K., Ravi-Kumar, M.N.V. 2007. Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: evaloation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. J Control Release, 118:27-37.

Sharma, R.K., Sharma, B. 2012. In-vitro carbofuran induced genotoxicity in human lymphocytes and its mitigation by vitamins C and E. Disease Markers, 32: 153-163.

Shen, Y.C., Juan, C.W., Lin, C.S., Chang, C.L. 2017. Neuroprotective effect of Terminalia chebula extracts and ellagic acid in PC12 cells. Afr J Tradit Complement Altern Med., 14(4):22-30.

Silfeler, I., Alp, H., Dorum, B.A., Nacar, E., Arslan, S., Uygur, V. 2017. Protective effect of ellagic acid on paraquat-induced kidney hazards in rats. Iran J Kidney Dis., 11 (1):23-28.

Simone, C.B. 1992. Free Radicals in Cancer and Nutrition. Simone Health Series New York : Elsevier Science Publishing Company Inc. 146-149.

Singh, M., Kaur, P., Sandhir, R., Kıran, R. 2008. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. Mutation Res., 654:145-149.

Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Res., 175:184-191.

Šiviková, K., Piešová, E., Dianovskỳ, J. 2001. The protection of vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-indeced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. Mutation Res., 494:135-142.

Smart, R.C., Huang, M.T., Chang, R.L., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H. 1986. Disposition of the naturally occuring antimutagenic plant phenol, ellagic acid and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3'-di-O-methylellagic acid in mice. Carcinogenesis, 7:1663-1667.

Soni, K.B., Lahiri, M., Chackradeo, P., Bhides, S.V., Kuttan, R. 1997. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenecity and hepatocarcinogenicity. Cancer Lett., 115:129-133.

Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. and Takeda, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. Molecular and Cellular Biology, 19(7):5166-5169.

Speit, G., 1984. Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. Hum Genet, 67:264-269.

Speit, G., Haupter, S., 1985. On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. Hum. Genet., 70:126-129.

Sudheer, A.R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., Menon, V.P. 2007. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: With the comparison of N-acetylcysteine. Toxicology, 230:11-21.

Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R., 1995. The Suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. Mutation Res., 342:43-59.

Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., & Sun, M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry, 102(3):938-953.

Talcott, S.T., Lee, J.H. 2002. Ellagic acid and flavinoid antioxidant content of muscadine wine and juice. J Agric Food Chemistry, 50:3186-92.

Tasaki, M., Umemura, T., Maeda, M, Ishii, Y., Okamura, T., Inoue, T., Kuroiwa, Y., Hirose, M., Nishikawa, A. 2008. Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a sub chronic toxicity study using F344 rats. Food Chem Toxicol., 46:1119-24.

Tell, R.W. 1986. Ellagic acid binding to DNA as a possible mechanism for its antimutagenic and anticarcinogenic action. Cancer Lett., 30 : 329-336.

Thresiamma, K.C., Kuttan, R. 1996. Inhibition of liver brosis by ellagic acid, Indian J. Physiol. Pharmacol., 40:363-366.

Thresiamma, K.C., George, J., Kuttan, R. 1998. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. J Exp Clin Cancer Res., 17(4):431–4.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Enviromental and Molecular Mutagenesis, 35:206-221.

Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay In Vitro and In Vivo: a Study of Malathion-Exposed Workers. Mutation Res., 388(1):85-95.

Topaktaş, M. ve Speit, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç. Ü. Sağlık Bil. Der., 5(1, 2, 3):73-84.

Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara, 176s.

Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., DearfieldEARFIELD, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R. and Carrano, A. V. 1993. Sister- Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. Mutation Res., 297:101-180.

Türk, G., Çeribaşı, A.O., Sahna, E., Ateşşahin, A. 2011. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. Phytomedicine, 18(5):356-361.

Umesalma, S., Nagendraprabhu, P., Sudhandıran, G. 2014. Antiproliferative and apoptotic-inducing potential of ellagic acid against 1,2-dimethyl hydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats. Mol. Cell. Biochem., DOI: 10.1007/s1 1010—013-1907-0.

Umesalma, S., Nagendraprabhu, P., Sudhandıran, G. 2015. Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. Mol. Cell. Biochem., 399(1-2):303-313.

Urquiaga, I., & Leighton, F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Res., 33(2):55-64.

Vattem, D.A., Shetty, K. 2005. Biological functionality of ellagic acid: A review. J Food Biochem., 29:234-66.

Vekiari, A., Gordon, M.H., Garcia-Macias, P., Labrinea, H. 2008. Extraction and determination of ellagic acid contenting chestnut bark and fruit. Food Chemistry, 110:1007-11.

Vrzoc, M. , Petras, M.L. 1997. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. Mutat Res., 381(1):31-40.

Wang, T., Chen, L.X., Long, Y., Wu, W.M., Wang, R. 2008. DNA damage induced by caffeic acid phenyl ester in the presence of Cu(II) ions: Potential mechanism of its anticancer properties, Cancer Letters, 263: 77–88.

Wang, D., Chen, Q., Tan, Y., Liu, B., Liu, C., 2017. Ellagic acid inhibits human glioblastoma growth in vitro and in vivo. Oncol Rep., 37(2):1084-1092.

Weisburg, J.H., Schuck, A.G., Reiss, S.E., Wolf, B.J., Fertel, S.R., Zuckerbraun, H.L., Babich, H. 2013. Ellagic acid a dietary polyphenol, selectively cytotoxic to HSC-2 oral carcinoma cells. Anticancer Res., 33:1829-1836.

Whitley, A.C., Stoner, G.D., Darby, M.V., Vale, T. 2003. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic cidextensive binding to protein and DNA. Biochem Pharmocol., 66:907-15.

Wood, A.W., Huang, M.T., Chang, R.L., Newmark, H.L., Lehr, R.E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H. 1982. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 79(18):5513-7.

Xu, Y., Deng, J.Z., Na, J., Chen, S.N., Marshall, R., Jones, S.H., Johnson, R.K., Hecht, S.M. 2003. DNA damaging activity of ellagic acid derivatives. Bioorg Med Chem., 11:1593-96.

Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphnolic compounds**.** Annu Rev Nut., 21:381-406.

Yılmaz, E.E., Bozdağ, Z., İbiloğlu, İ., Arıkanoğlu, Z., Yazgan, Ü.C., Kaplan, I., Gümüş, M., Atamanalp, S.S. 2016. Therapeutic effects of ellagic acid on L-arginin induced acute pancreatitis. Acta Cir Bras., 31(6):369-401.

Zhang, H., Guo, Z.J., Xu, W.M., You, X.J., Han, L., Han, Y.X., Dai, L.J. 2014. Antitumor effect and mechanism of an ellagic acid derivative on the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. Oncology Letters, 7:525-530.

ÖZGEÇMİŞ

22.08.1988 tarihinde Seyhan/Adana'da doğdu. Lise eğitimini Emine Nabi Menemencioğlu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandı. 2009 yılında buradaki eğitimini tamamladı ve aynı yıl aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında aynı bölümde yüksek lisansını bitirdi ve ardından aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı.