

**VANİLLİK ASİDİN İN VİTRO OLARAK
GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve GÜLER ERDEM



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VANİLLİK ASİDİN İN VİTRO OLARAK GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Merve GÜLER ERDEM

Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2011

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Merve GÜLER ERDEM tarafından hazırlanan “Vanillik Asidin İn Vitro Olarak Genotoksik/Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

Başkan : Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Genel Biyoloji Anabilim Dalı
İmza

Üye : Prof. Dr. Berrin TUNCA
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
İmza

Üye : Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Genel Biyoloji Anabilim Dalı
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü
../../....(Tarih)

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak sunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.././....

Merve Güler Erdem

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

VANİLLİK ASİDİN İN VİTRO OLARAK GENOTOKSİK/ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Merve GÜLER ERDEM

Uludağ Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

İnsan organizmasında bulunan serbest radikaller; yağlar, proteinler ve nükleik asitler gibi farklı moleküllerin oksidatif olarak bozulmasına neden olmaktadır. Antioksidan bileşikler ise bu serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir ve aynı zamanda; kanser, katarakt, kalp damar hastalıkları, beyin rahatsızlıkları ve romatizmanın önlenmesinde temel bir rol oynayabilirler. Buradan yola çıkarak çalışmamızda hücrede oksidatif hasar olduğu iyi bilinen alkilleyici bir kimyasal ajan olan ve antineoplastik ajan olarak da kullanım alanına sahip mitomisin C (MMC) 'nin oksidatif etkisine karşı vanillinin okside formu vanillik asidin antioksidan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla sağlıklı donörlerden alınan insan kan lenfosit kültürleri kullanılmıştır. Deoksiribonükleik asit (DNA) ve kromozom düzeyindeki oksidatif hasarı ve antioksidan etkiyi belirlemek amacıyla in vitro Mikronükleus (MN) ve COMET testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada mitomisin'in 0,25 µg/ml dozu, vanillik asidin ise 1 ve 2 µg/ml' lik dozları kullanılmıştır. Vanillik asit ve mitomisin C' nin çözülmesinde kullanılan Dimetilsülfoksit (DMSO) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Vanillik asidin 2 µg/ml dozu Mikronükleus ve COMET testlerinde anlamlı MN ve hasarlı DNA oluşturmuştur. Mitomisin C' de tek başına mikronükleuslu hücre ve hasarlı DNA oranını anlamlı arttırmıştır. 1 µg/ml'lik vanillik asit ise her iki test sisteminde mitomisin C'nin oluşturduğu mikronükleuslu DNA hasarlı hücre oranını anlamlı azaltmıştır. Hatta vanillik asidin bu dozu mitomisin C ile oluşturulan mikronükleuslu hücre ve COMET testindeki genetik hasar indeksi oranını DMSO kontrol düzeyine indirmiştir. 2 µg/ml vanillik ise kendi başına da mikronükleus ve DNA hasar oranını arttırdığı için mitomisin C' nin oluşturduğu hasarı yeterli seviyede azaltamamıştır. Sonuç olarak antioksidan bir bitkisel fenolik bileşik olan vanillik asidin uygun düşük dozlarda kullanıldığında oksidatif DNA hasarı ve kromozomlardaki hasarları engelleyebileceği öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Vanillik asit, MMC, mikronükleus, COMET, genotoksisite, fenolik bileşikler, antioksidan, oksidatif stres, ROS

2011, xi + 110 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

THE INVESTIGATION OF GENOTOXIC/ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF VANILLIC ACID IN VITRO

Merve GÜLER ERDEM

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU

The free radicals that present in the human organism damages the molecules like lipids, proteins and nucleic acids. On the other hand, antioxidant compounds have the ability to neutralize these free radicals and also they can have a major role in prevention of cancer, cataract, heart and brain disease and rheumatism. Thus, in our study, it is tried to identify the antioxidant effect of the Vanillic acid, which is the oxidized form of vanillin, against the oxidative effect of a well known alkylating chemical and antineoplastic agent mitomycin C (MMC). For this purpose, human blood lymphocyte cultures that are taken from healthy donors are used. In vitro micronucleus (MN) and COMET tests are used in order to determine the oxidative damage and antioxidant effect in the level of DNA and chromosome. In this study, 0,25 µg/ml mitomycin and 1 and 2 µg/ml dosage of vanillic acid was used. The DMSO was used in the solution of vanillic acid and mitomycin C was used as a negative control. 2 µg/ml dosage of vanillic acid formed substantive MN and damaged DNA in the micronucleus and COMET tests. Mitomycin C has significantly increased the rate of damaged DNA and cells with micronucleus. On the other hand 1 µg/ml dosage of vanillic acid has significantly decreased the rate of DNA damaged cells and the frequency of micronucleated cells. In fact, this dosage of vanillic acid has reduced the rate of cells with micronucleus that are formed with mitomycin C and the genetic damage index rate in COMET assay to DMSO control level. However because of 2 µg/ml vanillic acid itself increased the rate of micronucleus and DNA damage, it couldn't decrease the damage that is caused by mitomycin C. In conclusion, it is proved that vanillic acid which is an vegetative phenolic compound could prevent the oxidative DNA damage and damages in chromosomes when used in proper low dosages.

Key words: Vanillic acid, MMC, micronucleus, COMET, genotoxicity, fenolic compounds, antioxidant, oxidative stress, ROS

2011, xi + 110 pages.

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aşamasında yardımına baŐvurduđum danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU'na, deney ve yazım aşamasında tezle ilgili birçok konuda yardımına baŐvurduđum ve beni her konuda destekleyen Sayın Doç. Dr. Nilüfer İNKİLİ'a, deney ve laboratuvar çalıŐmalarımda yardımlarını esirgemeyen ve deneyimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Tolga ÇAVAŐ, AraŐ. Gör. Özgür VATAN, AraŐ. Gör. Dilek YILMAZ'a, tezime destek ve yardımlarından ötürü birlikte alıŐtıđım Sayın Doç. Dr. Ferah BUDAK ve U. Ü. Tıp Fakóltesi İmmunoloji ABD alıŐma arkadaşlarıma ve beni destekleyen aileme teŐekkürlerimi sunarım.

Merve Güler Erdem

./.../....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Oksidatif Stres	5
2.2. Serbest Radikaller	8
2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	10
2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	11
2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	12
2.3.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD).....	13
2.3.4. Hidroksil radikali ($\cdot OH$).....	13
2.3.4.1. Fenton tepkimesi	14
2.3.5. Singlet Oksijen (1O_2)	15
2.3.6. Nitrik Oksit ($NO\cdot$).....	16
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	16
2.4.1. Lipitlere Etkileri	16
2.4.2. Proteinlere Etkileri	17
2.4.3. Karbohidratlara Etkileri	17
2.4.4. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri	18
2.5. Antineoplastik İlaçlar	19
2.6. Mitomycin C (MMC).....	21
2.6.1. Mitomisin C yapısı ve genel özellikleri	22
2.6.2. Mitomisin C'nin Etki mekanizması	23
2.6.3. Mitomisin C (MMC)'nin Kullanım Alanları	24
2.6.4. Mitomisin C (MMC) ile Yapılan Bazı Çalışmalar	26
2.7. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma.....	28
2.8. Antioksidanlar	28
2.8.1. Endojen antioksidanlar.....	29
2.8.2. Eksojen antioksidanlar	29
2.8.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	30
2.8.2.2. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):.....	30
2.8.2.3. Glutasyon redüktaz (GSH-Rd)	31
2.8.2.4. Glutasyon S transferaz (GST).....	32
2.8.2.5. Katalaz.....	32

2.8.2.6. Sitokrom oksidaz.....	33
2.8.2.7. A Vitamini	33
2.8.2.8. C Vitamini	34
2.8.2.9. E Vitamini	34
2.9. Fenolik Bileşikler	35
2.9.1. Flavonoidler	36
2.9.2. Fenolik asitler.....	38
2.10. Vanillin	39
2.11. Vanillik Asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit)	42
2.11.1. Vanillik Asit yapısı ve genel özellikleri.....	42
2.11.2. Vanillik asit ile ilgili bazı çalışmalar:	45
2.12. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Araştırmalarında Kullanılan Yöntemler	46
2.12.1. Ames Testi	46
2.12.2. İn Vitro CA Yöntemi	47
2.12.3. İn Vitro SCE yöntemi.....	47
2.13. Mikronükleus (MN)	47
2.13.1. İn Vitro Mikronükleus Testi Tekniğinin Gelişimi	49
2.13.2. İn Vitro Mikronükleus Testi (CBMN-Cytokalsin-B mikronükleus testi).....	50
2.13.3. İn Vitro MN testinin avantajları	52
2.13.4. İn Vitro MN testinin dezavantajları.....	52
2.13.5. MN ve kanser ilişkisi	53
2.14. İn Vitro Comet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi).....	53
2.14.1. COMET Yöntemi Basamakları.....	54
2.14.2. COMET Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi	56
2.14.3. COMET Yöntemi Avantajları	57
2.14.4. COMET Yöntemi Dezavantajları.....	58
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	59
3.1. Materyal	59
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı	59
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	61
3.2 Yöntem	64
3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi.....	64
3.2.2. Mikronükleus Testi Prosedürü	66
3.2.3. COMET Testi Prosedürü	69
4. BULGULAR.....	72
4.1. Trypan Blue ile Canlı Hücre Sayım Bulguları	72
4.2. Mikronukleus Testinden Elde Edilen Bulgular	73
4.3. COMET Testinden Elde Edilen Bulgular.....	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	91
KAYNAKLAR.....	96
EKLER	109
EK 1	109
EK 2	110
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
mg	Miligram
°C	Santigrat derece
ng	Nanogram
µM	Mikrometre
gr	Gram
dk	Dakika
V	Volt
cm	Santimetre
cc	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
lt	Litre
rpm	Dakikada devir sayısı
sn	Saniye
mA	Miliamper
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
AO	Antioksidanlar
BN	Binükleuslu
BrdUrd	5'-Bromo- 2'-deoxyuridine
C6-C3-C6	Difenilpropan
CpG	Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri
CuZnSOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
CBMN	Sitokinezi-blok Mikronukleus
Cyt-B	Sitokalazin B
Cu ⁺²	+2 Değerlikli Bakır
Cu ⁺¹	+1 Değerlikli Bakır
CH ₃ COOH	Asetik asit
CH ₃ OH	Metanol
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DAPI	Diamidino- 2 -fenilindol
EtBr	Etidium Bromid
EMS	Etil methansulfonat

FA	Fanconi anemi
Fe ⁺²	Ferrik formda demir
Fe ⁺³	Ferröz forma demir
GSSG	Okside glutasyonun
GF	Griseofulvin
GSH	Redükte glutasyon
GST	Glutasyon S transferaz
GHİ	Genetik hasar indeksi
GSH-Rd	Glutasyon redüktaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferazlar
HH	Hasarlı hücre
HCL	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ⁺	Hidrojen atomu
H ₂ O	Su
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
KA	Kromozom aberasyonlarını
KCL	Potasyum Klorür
KKD	Kardeş kromotid değişimini
KH ₂ PO ₄	Di Potasyum Fosfat
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MMC	Mitomisin C
MN	Mikronükleus
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NO [•]	Nitrik Oksit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksil
Na ₂ HPO ₄	Di Sodyum Fosfat
NBI	Nükleus Bölünme İndeksi
OH ⁻	Hidroksil atomu
[•] OH	Hidroksil radikali
O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit
¹ O ₂	Singlet Oksijen
ONOOH	Peroksinitröz asit
ONOO ⁻	Peroksinitrit
[•] OH	Hidroksil radikalleri
8-OHdG	8-Hidroksi Deoksiguanozin

PCB	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen türevleri
ROOH	Hidroperoksit
RNA	Ribonükleik asit
sit c Fe	Ferrisitokrom c
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
SOD	Süperoksit Dismutaz
SCE	Kardeş kromatid değişimi
VA	Vanillik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Vücuttaki serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları.....	9
Şekil 2.2. Moleküler oksijenin indirgenme tepkimesi.....	10
Şekil 2.3. Süperoksit radikali oluşum tepkimesi.....	11
Şekil 2.4. Süperoksit ile ferrisitokrom c reaksiyonu.....	11
Şekil 2.5. Hidrojen peroksit oluşum tepkimesi	12
Şekil 2.6. Bakırlı Süperoksit dismutaz enzimi aracılığında süperoksit molekülünün hidrojen peroksit ve oksijene dönüşme tepkimesi	13
Şekil 2.7. Suyun iyonizasyon tepkimesi	13
Şekil 2.8. Hidroksil radikalının oluşum tepkimesi.....	13
Şekil 2.9. Haber-Weiss tepkimesi	14
Şekil 2.10. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları	14
Şekil 2.11. Nitrik Oksit oluşum tepkimesi	16
Şekil 2.12. Mitomisin C kimyasal yapısı	22
Şekil 2.13. Mitomisin C'nin ticari formu	22
Şekil 2.14. Mitomisin C'nin kimyasal reaksiyonları	24
Şekil 2.15. Süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla süperoksit radikalının indirgenmesi...30	
Şekil 2.16. Glutatyon peroksidaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesi tepkimesi	31
Şekil 2.17. Glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla okside glutatyonun indirgenmesi.....	31
Şekil 2.18. Glutatyon transferaz enzimi aracılığıyla çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunun katalizlenmesi tepkimesi	32

Şekil 2.19. Katalaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksidin, oksijen ve suya parçalanması.	32
Şekil 2.20. Sitokrom oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit radikalının suya dönüşmesi.	33
Şekil 2.21. Fenolik bileşiklerin kararlı rezonans gösterme tepkimesi.	35
Şekil 2.22. Flavonoidlerin Genel Yapısı	36
Şekil 2.23. Fenolik asitlerin genel yapısı	39
Şekil 2.24. Pycnopus cinnabarinus kullanılarak ferulik asitten vanillin üretimi	40
Şekil 2.25. Vanillik asit ve Vanillin'nin kimyasal yapısı	41
Şekil 2.26. Vanillik Asit kimyasal yapısı	43
Şekil 2.27. Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	48
Şekil 2.28. Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu.	49
Şekil 2.29. Sitokalazin-B (Cyt- B)'nin binükleer evrede hücre bölünmesini bloke etmesi	51
Şekil 2.30. COMET yöntemi basamakları	55
Şekil 2.31. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile elde edilen farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.	56
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait MN frekansı ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.	74
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait Nükleer Bölünme İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel dağılımı.	76
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait Genetik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı.	82
Şekil 4.4. Süperoksit radikali oluşum	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar	7
Çizelge 2.2. Vanillik asit içeren antioksidan özellikli bitkiler.....	44
Çizelge 4.1. Trypan Blue testi ile tüm donörlere ait canlı hücre sayımları.....	72
Çizelge 4.2. MN testi sonucunda 1. Donör ve 2. Donör için elde edilen veriler.....	77
Çizelge 4.3. MN testi sonucunda 3. Donör ve 4. Donör için elde edilen veriler.....	78
Çizelge 4.4. MN testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları.....	79
Çizelge 4.5. MN testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları.....	80
Çizelge 4.6. COMET testi sonucunda 1. Donör için elde edilen veriler.....	85
Çizelge 4.7. COMET testi sonucunda 2. Donör için elde edilen veriler.....	86
Çizelge 4.8. COMET testi sonucunda 3. Donör için elde edilen veriler.....	87
Çizelge 4.9. COMET testi sonucunda 4. Donör için elde edilen veriler.....	88
Çizelge 4.10. COMET testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları.....	89
Çizelge 4.11. COMET testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları.....	90

1. GİRİŞ

İnsan organizmasında bulunan serbest radikaller; yağlar, proteinler ve nükleik asitler gibi farklı moleküllerin oksidatif olarak bozulmasına neden olmaktadır. Antioksidan bileşikler ise, bu serbest radikalleri etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir ve aynı zamanda; kanser, katarakt, beyin hastalıkları ve romatizma gibi hastalıkların önlenmesinde temel bir rol oynayabilirler (Clifford 1998).

Antioksidanlar hücrede reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasara karşı koruyucu mekanizmalardır (Halliwell ve Whiteman 2004). Antioksidanlar, oksitlenebilir maddelerin oksidasyon başlangıcını geciktiren veya oksidasyon hızını azaltan maddelerdir. Gerek doğal gerekse sentetik yüzlerce bileşiğin antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Nawar 1985). Ancak antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel toksisiteleri nedeni ile son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Vareltzis ve ark. 1997). Son yıllarda çoğunluğu bitkisel kaynaklı olan yüzlerce madde gıdalarda antioksidan olarak kullanılabilirlik açısından test edilmektedir. Bunların antioksidan aktiviteleri C vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini gibi bileşiklerde kaynaklanmaktadır (Hall 2001).

En aktif antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidant aktivitesi; serbest radikalleri temizlemesi ve hidrojen atomlarını (H^+) veya elektronlarını vermesinden ileri gelir (Balasundram ve ark. 2005). Farmakolojik çalışmalara göre; yüksek fenolik içerikli meyve ve sebzelerin tüketimi kalp, beyin hastalıkları ve kanser oranını azaltmaktadır (Hertog ve ark. 1997).

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde yaygın ikincil metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturup, hidroksil (OH^-) gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre değişik gruplara ayrılırlar (Podsdek 2007).

Antioksidan aktiviteye sahip olan tipik fenolik bileşikler temel olarak flavonoidler ve fenolik asitler olarak bilinirler. Fenolik asitler, meyve, sebze ve diğer bitkilerde sürekli olarak doğal antioksidan şeklinde bulunur. Örneğin, bitki aleminde vanillik asit, kafeik asit çok geniş oranda dağılmıştır (Zheng ve Wang 2001).

Ceviz bitkisinin yeşil kabuk ve yaprakları yüksek antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı oldukça önemlidir. Yeşil kabuk ve yapraklarındaki klorogenik asit, kafeik asit, ferulik asit, kateşin, juglon ve vanillik asit gibi fenolik maddeler antioksidan aktivite gösterir (Pereira ve ark. 2007).

Vanillinin okside formu vanillik asit, tatlandırıcı ajan olarak kullanılan bir benzoik asit türevidir. Vanillik asit, kafeik asit ve ferulik asit hidrojen atomu verip, demir iyon çelatörü olarak işlev görerek antioksidan olarak rol alırlar (Atnip 2010).

Katalaz oksidaz aktivitesini baskılayıcı etkiye sahip vanillik asit, epigallokateşin-3-gallat, ferulik asit, indol-3-karboksialdehid, indol-3-karbonil gibi birçok diyet bitki mikronütrientleri karsinogenezi inhibe edici özelliğe sahiptir (Vetrano ve ark. 2005).

Antioksidanlar ile yapılan diyet ilavesi, kemoterapiye olan tepkiye ve antineoplastik ajanlar ile yapılan tedavi sonrası oluşan ters yan etkilere karşı etki etmektedir. Antineoplastik ajanların kullanımı oksidatif strese yol açar. Örnek olarak, serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi verilebilir. Bu nedenle hangi maddelerin antioksidan etkisinin olduğunun bilinmesi oldukça önemlidir.

Quercitinin transformasyon ürünleri ile alakalı çeşitli fenolik asitler (vanillik asit gibi) antioksidan özellik gösterir (Duenas ve ark. 2010).

Oliveira ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan periferik kan lenfositlerinde (in vitro) aynı zamanda iyi bir genotoksisite biomarkırı olan mikronükleuslu hücrelerin MMC ile indüklenen frekansında quercitin tarafından oluşturulan ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir (Oliveira ve ark.2000).

Özellikle meyve ve sebzelerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerinde etkili olan fenolik maddeler, antioksidan özelliğine bağlı olarak antikanserojen, antimutajen ve antimikrobiyal aktivite göstermeleri bakımından insan sağlığı ile yakından ilişkilidir.

Son yıllarda fenolik maddelerin elde edilmesi ve bunların antioksidan özellikleri nedeniyle gıda sanayinde kullanılabilme olanaklarının araştırılması üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmektedir.

Mitomisinler, *Streptomyces caespitosus* veya *Streptomyces lavandulae*'den izole edilmiş doğal ürünler taşıyan bir aziridin ailesidir. Bu bileşiklerden birisi olan mitomisin C antitümör, antibiyotik aktivitesinden dolayı kemoterapotik ajan olarak kullanılır. Üst gastrointestinal, anal ve meme kanserini tedavi etmek amacıyla damar yolu ile verilir (Danshiitsoodol ve ark. 2006).

Önemli bir antitümör (kanser) ilacı ve antibiyotik olan mitomisin C, CpG (sitozin-fosfat-guanin bölgeleri) dizisi için, DNA'yı yüksek etkinlikte ve mutlak özgüllükte crosslink etme (çapraz bağlama) yeteneği vardır. En son çalışmalar mitomisin C'nin DNA'ya nasıl crosslink yaptığını ve dizi özgüllüğünün neden bu kadar tam olduğunu göstermiştir (Tomasz 1995).

Mitomisin C, DNA'da çapraz bağ yaparak DNA'yı alkiler, en çok Guanin ve Sitozin bazlarına etkili olan bir antibiyotiktir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri, meme kolorektal, pankreas, yemek borusu, mesane, serviks kanserlerinde tedavi amaçlı kullanılır (Diler 2006).

Mitomisin C bir kez aktive olduğunda DNA'yı Adenin N6 atomundan, Guaninin O6, N7, N2 atomlarından alkile eder ve çapraz bağlanır. Bu çapraz bağlanmalar DNA sentezinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olur (Chapner ve Myers 1993).

Mitomisin C kinon ve azidrin fonksiyonel gruplarını içerir, aynı zamanda serbest radikaller ve alkilleyici türlerin oluşumuna neden olur. (Dusre ve ark. 1990) Bazı araştırmacılar MMC'nin redüktif aktivasyonunun in vitro'da ve tümör hücrelerinde OH⁻ radikallerinin oluşumuna sebep olduğunu bulmuştur (Doroshov 1986).

MMC topikal kullanımda genellikle moleküler oksijen ile etkileşerek serbest radikaller üretir ve lipid peroksidasyonu, DNA ve protein sentezine bozarak hücrelere toksik etki göstermektedir (Reddy ve Randerath 1987).

Kanser kontrol dışı hücre bölünmesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Başlangıçta etkilenen hücrenin türüne göre sınıflandırılır. Kanser tedavi yöntemleri, genel olarak, kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immunoterapi olup kanser hastalarının bireysel özellik ve hastalık durumuna göre bu yöntemlerden bir ya da birkaçı tedavide kullanılmaktadır (Özkan 2007).

Kanser hastalarında kemoterapi, tedavi protokolünün önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ancak bilinen tüm kemoterapik ajanların toksik etkileri bunların yararlarının yanında birçok sorunu da beraberinde getirmiştir.

Antineoplastik ilaçların, kanser hücrelerine karşı seçicilikleri azdır. Bunun nedeni, malign (kötücül) hücreler ile sağlıklı hücrelerin arasında büyük yapısal farkların olmamasıdır (Gacar 2009). Kanser hücrelerini yok ettikleri gibi hızlı bir biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok edebilirler. Bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri de vardır. Kanserli hastalar için ilaç olarak tedavide kullanılan sentetik maddelerin (antibiyotikler; daunomisin, adriamisin, bileomisin, mitomisin C) etkileri daha önce yapılan çalışmalar ile az çok belirlenmiş, bu tür maddelerin yan etkilerinin de olabileceği farkedilerek, konunun bu yönde de incelenmesi gerektiği tartışmaya açılmıştır (Baldev 1979).

Günümüzde kanserli hastaların tedavisinde kullanılan kimyasal ilaçların ve radyoterapi uygulamalarının insan kromozomları üzerindeki etkileri çeşitli teknikler kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmektedir (Bauman ve ark. 2000). Fiziksel ve kimyasal maddelerin DNA üzerindeki etkilerini görmek için in vivo ve in vitro testler kullanılır. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) COMET Assay olarak da bilinir, oksidasyona neden olan alkilleyici özellikteki kimyasalların neden olduğu DNA hasarını belirlemek için kullanılan bir genotoksisite testidir (Başaran 2002). COMET yöntemi insan ve hayvan hücrelerindeki kimyasalların mutagenik ve karsinogenik aktivitelerin iyi bir belirleyicisi olduğu düşünülür (Fairbairn ve ark. 1995). Aydın ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, mitomisin C varlığında ve yokluğunda lenfositler, feniletanoit glikozitlerin farklı konsantrasyonları ile inkübe edilmiş ve DNA zincir kırıkları COMET yöntemi ile ölçülmüştür. Çalışmada feniletanoit glikozitleri lenfositleri doza bağımlı bir şekilde MMC'nin mutagenik etkilerinden korumuştur. Düşük konsantrasyonlarda DNA hasarında ciddi anlamda bir düşüş görülmüş fakat yüksek konsantrasyonlarda herhangi bir koruyucu etki gözlemlenmemiştir (Aydın ve ark.2004).

Mikronükleus testi mutajenler ve karsinojenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede hem in vivo hem de in vitro olarak kullanılan sitogenetik bir testtir. MN analiz yöntemi, kimyasal maddelerin mutagenik etkilerini belirlemek için kullanılır (Eroğlu ve ark. 2004). Mikronükleus sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Ford ve ark. 1988). Fare kemik iliği hücrelerindeki MMC tarafından indüklenen mikronükleuslar vanillin ile muamele sonrası baskılanmıştır. Vanillin in vivo'da antiklastojenik rol oynar (Inouye ve ark. 1988).

Antioksidan maddelerin kullanım miktarları son derece önemlidir. Fazla alındıkları takdirde bazı antioksidanların kendisinin de oksidan özellik gösterebileceği bilinmektedir (Childs ve ark. 2001).

Bu çalışmada MMC'nin genotoksik etkileri, buna karşın vanilik asitin antigenotoksik etkisinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Oksidatif Stres

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir.

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır (Dündar ve Aslan 1999). Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme, dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.

Oksidatif stres, toksisitenin olası bir mekanizması olarak son on yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (Çavdar ve Sifil 1997).

Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri tesirsiz hale getirmeye çalışır. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlık bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığından, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışardan alınacak antioksidanlardır (Örn: Vitamin E,C, Melatonin) (Tekcan 2009).

Antioksidanlar; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücrenel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (Young ve Woodside 2001).

Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir.

Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar Çizelge 2.1.’de gösterilmiştir. (Clarkson ve Thompson 2000).

Çizelge 2.1. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar (Clarkson ve Thompson 2000).

Astım
Ateroskleroz
Serebral vasküler hastalıklar
Kronik obstruktif pulmoner hastalık
Konjestif kalp yetmezliği
Diyabet
Hipertansiyon
Grip
Miyokard enfaktüs
Pnömoni
Hepatit
Kanser
İnflamasyon hastalıklar

Dejeneratif hastalıkların gelişiminde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Nöronlar, yani sinir ya da beyin hücrelerindeki oksidatif stres kendini nöro-dejeneratif hastalıklar olarak göstermektedir (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, vb.). Damar iç yüzeyindeki hücrelerde (endotelde) oksidatif hasar damar sertliği (ateroskleroz) gelişiminde rol oynamakta, dolayısıyla kalp-damar, beyin-damar ve diğer damar hastalıklarına neden olmaktadır. Hücre DNA'sında oluşan oksidatif hasar kanser gelişimine yol açabilmektedir (Burçak ve Andican 2004).

Oksidatif DNA modifikasyonları memeli DNA'sında siktir. Bu modifikasyonların karsinogenez, diyabet ve yaşlanmanın mekanizmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır.

Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Pitkanen ve ark.1992).

Diyabet oluşturulan sıçan deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG (8-hidroksi deoksiguanozin) düzeylerinde de artış gözlenmiştir (Ihara ve ark. 1999).

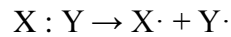
Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik aşırı derecede reaktif oksijen türlerinin yapılmasına ve oksidatif hasara neden olur. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), DNA protein arasında çapraz bağlanma gibi bir takım lezyonlar veya şeker hasarı meydana gelebilir (Cooke ve ark. 2003).

2.2. Serbest Radikaller

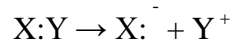
Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir tanımlama ile serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Özellikleri, dengesiz ve tek olan elektronu çiftlemek için diğer moleküller ile tepkimeye girmeye yatkın olmalarıdır. Anyonik, katyonik veya nötral konumda olabilirler (Halliwell 2006).

Serbest radikaller hücrede metabolik dengenin bir parçası olarak devamlı oluşurlar. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler (Halliwell ve Gutteridge 1989).

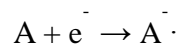
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Bir molekülün heterolitik bölünmesinde kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.

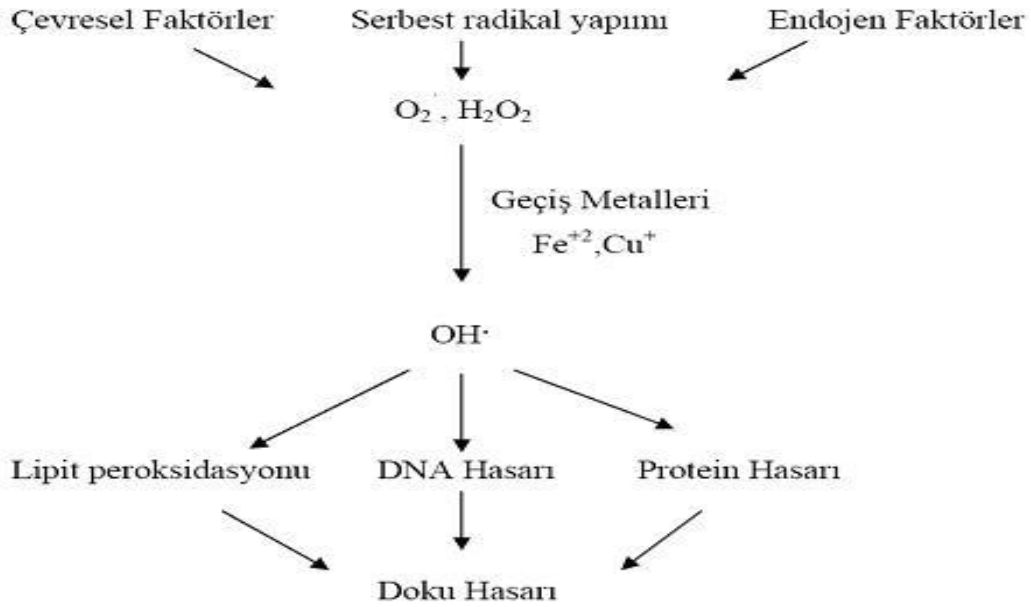


3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi veya normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı



Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler, hiperbarik oksijen, trisiklik antidepresanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 ve PCB (poliklorlubifenil)'ler sayılabilir (Mercan 2004, Atmaca ve Aksoy 2009).

Endojen faktörler mitokondriyal sızıntı, solunum, enzim reaksiyonları, otooksidasyon tepkimeleridir (Young ve Woodside 2001).



Şekil 2.1. Vücuttaki serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları (Young ve Woodside 2001).

Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (Zwart ve ark. 1999).

Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri veya oksijen metabolitleri olarak da adlandırılabilen bir kısım maddelerin ortaya çıkması ile hücre ölümü, doku hasarı ve nekroz sonucunda, organ veya sistemlerde işlev yetersizliği meydana gelmektedir (Dilek 2003).

2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS) mitokondriden, ksantin ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazları içeren çeşitli enzimlerden ve ayrıca sitokrom P450'lerden oluşabilir. Bu enzimler ROS'un oluşumunda özelleşmiştir ya da bu toksik metabolitleri kendi biyokimyasal aktivitelerinin istenmeyen bir sonucu olarak üretmektedir (Zini ve Schlegel 1996).

Moleküler oksijen (O₂) elektron transferiyle suya (H₂O) kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit (O₂^{•-}), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalleridir (•OH). Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır.

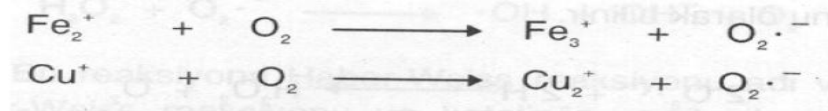
ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (Clarkson ve Thompson 2000).

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\bullet} \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet}$	Süperoksit radikali
$O_2^{\bullet} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \bullet OH$	Hidroksil radikali
$\bullet OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

Şekil 2.2. Moleküler oksijenin indirgenme tepkimesi (Clarkson ve Thompson 2000).

2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

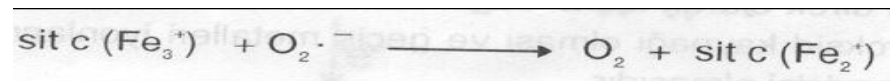
Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.



Şekil 2.3. Süperoksit radikali oluşum tepkimesi (Altınışık 2000).

Süperoksit radikali serbest radikal olmasına karşın reaktifliği yüksek değildir. Kendiliğinden, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir (Zimmerman ve Granger 1994, Kontos ve ark.1985, McIntyre ve ark.1999).

Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c (sit c Fe) ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.

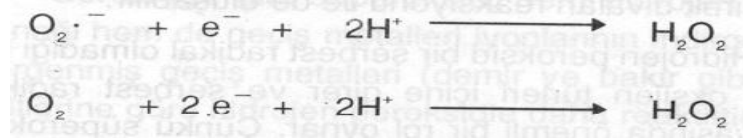


Şekil 2.4. Süperoksit ile ferrisitokrom c reaksiyonu (Altınışık 2000).

Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin otooksidasyonunda ve fagositozda oluşur (Özcan 1998).

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki hidrojen (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.



Şekil 2.5. Hidrojen peroksit oluşum tepkimesi (Altınışık 2000).

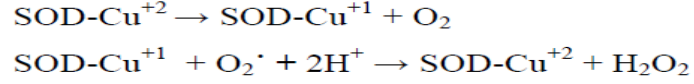
Hidrojen peroksit, serbest radikal olmamasına karşın biyolojik zarlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında aldığı rolden dolayı önemlidir. Diğer bir önemli işlevi ise hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (Nordberg ve Arner 2001).

Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinin dismutasyon tepkimesi sonucu oluşur. Süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, d-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektron transfer ederek direk hidrojen peroksit oluşturabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1984).

Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmasına karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır. (Gutteridge 1995).

2.3.3. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesi tepkimesini katalizler.



Şekil 2.6. Bakırlı Süperoksit dismutaz enzimi aracılığında süperoksit molekülünün hidrojen peroksit ve oksijene dönüşme tepkimesi (Altınışık 2000).

Tepkimede süperoksit anyonu Cu^{+2} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu şekilde süperoksitten bir elektron Cu^{+2} 'a transfer olurken Cu^{+1} ve moleküler oksijen oluşur. İkinci süperoksit anyonu Cu^{+1} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki elektron alarak hidrojen peroksiti oluşturur (Young ve Woodside 2001, Akkuş 1995).

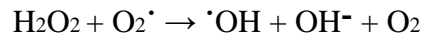
2.3.4. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikalinin major oluşumu suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



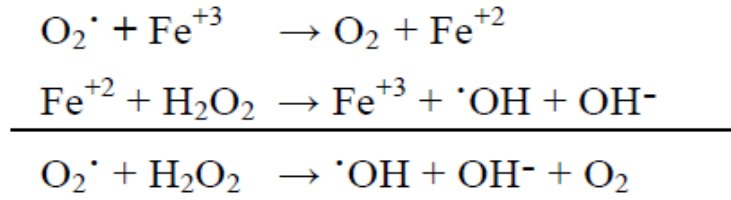
Şekil 2.7. Suyun iyonizasyon tepkimesi (Buxton ve ark. 1988).

Hidrojen peroksit ise süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Şekil 2.8. Hidroksil radikalinin oluşum tepkimesi (Halliwell 1978).

Bu tepkimeye **Haber-Weiss** tepkimesi denir ve tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır.

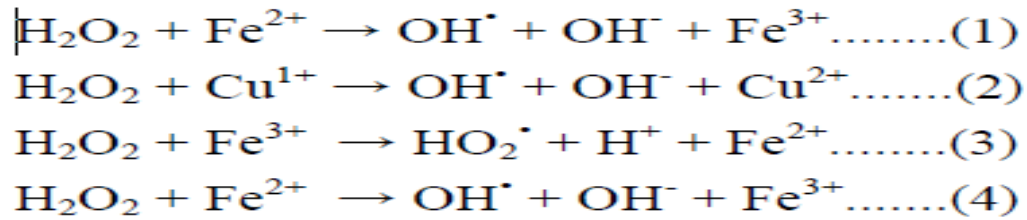


Şekil 2.9. Haber-Weiss tepkimesi (Akkuş 1995, Gutteridge 1995, Halliwell ve Gutteridge 1990).

Katalizörlü tepkimede demir önce ferrik formdan (Fe^{+3}) süperoksit ile ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenir. Ferröz form Fenton tepkimesi ile ferrik forma tekrar yükseltgenirken $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir (Akkuş 1995, Gutteridge 1995, Halliwell and Gutteridge 1990).

2.3.4.1. Fenton tepkimesi

“Fenton Kimyası” hipotezinde $\cdot\text{OH}$ radikalleri DNA’ya saldırarak hasar oluşturur. $\cdot\text{OH}$ radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA’da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan $\cdot\text{OH}$ radikalinin hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma ise membranı kolayca geçebilen H_2O_2 ’in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.



Şekil 2.10. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları (Burçak ve Andican 2004).

1 ve 2 numaralı reaksiyonlar demir/bakır katalizli Haber-Weiss reaksiyonları; 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar ise Fenton reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır.

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{2+ / 3+}$ ve $Cu^{1+ / 2+}$ iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transiyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan $\cdot OH$ radikalleri, $\cdot OH$ radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, $\cdot OH$ radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir.

DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir çelatörleri ve radikal temizleyicilerinin birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidandır, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür (Halliwell ve Gutteridge 1989).

2.3.5. Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur. Singlet oksijen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikal tepkimeleri oluşturması bunun sonucunda da DNA hasarı ve mutajenik etkiler yapabilmesi nedeniyle radikal ailesinden sayılır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalın, oluşturur ve OH kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

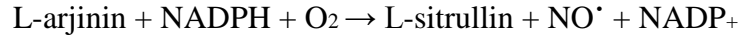
Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla
- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- c) Süperoksit anyon radikalının kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında (Gutteridge 1995).

2.3.6. Nitrik Oksit (NO[•])

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Nitrik oksit (NO[•]) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynar.

NO[•]enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



Şekil 2.11. Nitrik Oksit oluşum tepkimesi (Nordberg ve Arner 2001).

Yüksek miktarlarda O₂[•] yapımı NO[•] ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek [•]OH ve [•]NO₂ oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO⁻) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur (Nordberg ve Arner 2001).

Serbest radikaller etkilerini protein, lipit, karbohidrat ve DNA oksidasyonu yaparak; hücre zarında, hücre organellerinde ve DNA'da patolojik değişiklikler oluştururarak gösterirler. Bunların sonucunda işlev bozukluğu veya hücre ölümü olmakta ya da mutant özellikler kazandırarak tümör oluşturabilmektedirler (Dilek 2003).

2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

2.4.1. Lipitlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır, lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür. Bu reaksiyonun özellikle aterosklerozun gelişiminde çok önemli olduğu bilinmektedir. (Gutteridge 1995).

2.4.2 Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmungulobin G ve albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozular normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Akkuş 1995).

2.4.3. Karbohidratlara Etkileri

Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler

Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler (Meram ve Aktaran 2002).

2.4.4. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Özkan ve Fışkın 2004).

DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülen ve mutasyon, kanser, yaşlanma ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen bir olaydır. DNA, yaşam boyunca hücrenel metabolitler (ROS) ve ekzojen ajanlar tarafından sürekli olarak değişimlere maruz kalır (Sancar ve ark. 2004, Rupp 2006).

Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açar. Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir (Kasai 1997).

Çeşitli nedenlere bağlı olarak çekirdek DNA'sının yanı sıra mitokondriyal DNA (mtDNA)'da da oksidatif hasar şekillendiği belirtilmektedir. Memeli hücrelerindeki en önemli ROS kaynaklarından biri mitokondriyal elektron taşıma zinciridir.

Çekirdek DNA'sının aksine mtDNA mitokondride serbest radikal oluşturan bölgelere çok yakın yerleşim gösterir ve histonlar tarafından korunmaz. Çekirdek DNA'sına göre mitokondriyal DNA'da oksidatif baz hasarının fazla şekillenmesinin olası nedenleri, mtDNA'nın en önemli hücre içi ROS kaynağı olması, DNA hasarı onarım sisteminin çekirdek DNA'sına göre yetersiz olması ve yaşa bağlı olarak mtDNA'da mutasyonlarda artış görülmesi olarak bildirilmektedir (Lim ve ark. 2005).

2.5. Antineoplastik İlaçlar

İnsan hücrelerindeki DNA hem endojen hem de eksojen ajanlara maruz kalmanın sonucu devamlı olarak hasara uğramaktadır. Mutajen olduğu bilinen ya da tahmin edilen ajanlara bilerek ya da bilmeyerek maruz kalabiliriz.

İyonize veya ultraviyole radyasyon, 4000 kadar kimyasal madde karışımını içeren tütün veya tütün ürünleri, çevre kirliliği ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar insanların temas halinde olabileceği mutajen ajanlara verilen örnekler arasındadırlar. Endojen metabolik süreçlerle oluşan reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonu, deaminasyon, depürinasyon gibi süreçler de mutajen etkiye sahip olup mutasyonları meydana getirirler.

Eksojen kaynaklı kimyasallar insandaki DNA hasarının en önemli kaynağıdır. Çok çeşitli olan bu çevresel ajanlar mutasyon oluşturarak kanser gelişiminde önemli rol oynarlar. Mutasyonlar tümörlerde kritik genlerde bulunurlar. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolü bozulmuş, hücre bölünmesi çoğalmış ve hızlanmıştır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar etkilerini bölünme hızı yüksek olan hücrelerde gösterdiklerinden kanserli hücreler bu ilaçlardan etkilenmektedirler. Ancak bu sırada vücudun yüksek bölünme hızına sahip sağlıklı hücreleri de hasara uğramaktadır (Sevim 2006).

Kemoterapötik ilaç hem kemoterapi uygulanan bireyde hem de bu ilaçla temas eden sağlık görevlilerinde DNA hasarları oluşturması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle de antitümör tedavisinde kullanılacak olan yeni antineoplastik maddelerin seçilen in vitro ya da in vivo test sistemleriyle genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir (Auer ve ark.1997).

Antineoplastik ajanların kullanımı oksidatif strese yol açar. Örnek olarak, serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi verilebilir.

Antineoplastik ilaçların etkinliğini kısıtlayan durum, ilaç etkisinin hücre siklusuna özgü olup olmamasıdır.

- Hücre siklusuna özgü ilaçlar, uygulandıkları anda, sadece belirli dönemde olan veya ilacın vücutta bulunduğu sırada o döneme giren belirli sayıdaki hücreleri öldürürler.

- Diğer ilaçlar ise, hücre ister dinlenme halinde olsun, isterse bölünme dönemlerinden geçiyor olsun, her zaman etkilidir. Bunlara döneme-özgü olmayan veya döneme bağımsız ilaçlar adı verilir. Bu gruptaki ilaçların genel bir özelliği DNA yapısını direkt olarak bozmalarıdır.

Bu ilaçların mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileride vardır.

- **Teratojenik Etki**

Antineoplastik ilaçların hemen hepsi güçlü teratojenik ilaçlardır. Deformiteli bebek doğmasına ya da düşüklere neden olur.

- **Karsinojenik Etki**

Özellikle alkilleyici ilaçlar ile prokarbazin güçlü karsinojenik etkiye sahiptir. Kullanımlarını izleyen birkaç yıl içinde sekonder kanserlere neden oldukları gösterilmiştir.

- **Mutajenik Etki**

Özellikle alkilleyici ilaçlarla görülür. Bu ilaçların uygulandığı hastalarla sağlık personelinde kromozom bozuklukları saptanmıştır (Gacar 2009).

Antineoplastik ilaçlar değişik etki şekilleri gösterirler, örnek olarak animetabolitler, bitki alkaloidleri, alkilleyici ilaçlar verilebilir.

Antimetabolitler, DNA, RNA ve proteinlerin sentez zincirlerinde değişik basamaklarda substrat veya koenzim olan çeşitli metabolitlerin analoglarıdır. Bu şekilde enzim bağlanmalarını inhibe ederek işlev görürler (Salmon ve Apple 1974). Bu antimetabolit bileşiklerden methotrexate, merkaptopurin, thioguanin, fluorourasil ve cytarabine'i kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara örnek olarak verebiliriz.

Bitki alkaloidleri, mitoz sırasında hücre döngüsünün metafaz safhasında iğ ipliklerini bozar, mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek etkilerini gösteren gruptur. Mitozun metafaz dönemine özgü ilaçlardır. Bu gruptaki ilaçlara vincristin, vinblastin, etoposide, taxol örnek verilebilir (Lazo ve Larner 1998).

Alkilleyici ajanlar, hücre siklusuna özgü olmayan tipte ilaçlardır. Hücreleri hangi dönemde olurlarsa olsunlar etkileyebilirler. DNA ile çapraz bağlanarak alkil grupları eklerler. Replikasyon ve transkripsiyonu engelleyebilirler. Bu yüzden alkilleyici ajanların çoğu antitümör ilaç olarak kullanılmaktadır (Frenzilli ve ark. 2000). Halen en fazla kullanılan antineoplastik ilaçlardır.

Bu grupta çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden elde edilen antibiyotik niteliğinde antineoplastik ilaçlar bulunur. İnterkalasyon yapan ajanlar, bazlar arasına girerek okuma kalıbının değişimine sebep olurlar. Bu tip antibiyotik kökenli bileşiklere, daunorubicin, doxorubicin, actinomycin D, bleomycin ve mitomycin C örnek verilebilir (Lazo ve Larner 1998).

2.6. Mitomycin C (MMC)

Radyoterapi ve çeşitli kanser ilaçlarıyla tedavi yaklaşımlarında kanserli hücrelerde oksidatif stresin sonucu olarak oksidatif hasar artabilmekte ve kanser hücrelerinin ölümü hızlanabilmektedir. Doxorubisin, bleomycin, mitomycin-C gibi ilaçların etki mekanizmaları içerisinde oksidatif hasarın olduğu gösterilmiştir (Kinnula ve Crapo 2003).

Test maddesi olarak kullanılan Mitomisin C, bazı kanser türlerinde tedavi edici ilaç olarak kullanılmaktadır.

Baldev (1979), kimyasalların karsinojenik ve mutajenik özellikleri arasındaki güçlü korelasyonu inceleyerek, antineoplastik ajanların belirli kanser tiplerini tedavi ederken, diğer bazı kanser tiplerini başlatabileceğini ileri sürmüştü ve Daunomisin (daunorubisin), adriamisin, bleomisin, aktinomisin D ve mitomisin C gibi bazı antibiyotik antikanserojen ajanların genetik etkilerini yeniden incelemiştir. Bunlardan MMC'nin DNA ile kovalent bağlar oluşturduğu ve tek iplik kırıklarına neden olduğunu saptamıştır.

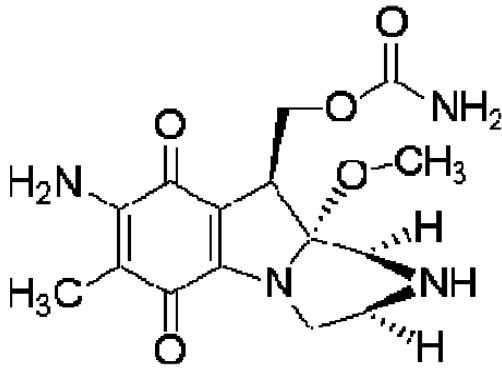
2.6.1. Mitomisin C yapısı ve genel özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan, Mitomisin C (MMC) mavi menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilen bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ışıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini korumaktadır.

Mitomisin C 2 mg ve 10 mg'lık şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC antineoplastik ve geniş spektrumlu bir sitostatik ajandır (Diler 2006).

MMC, Hata ve arkadaşları tarafından 1955 de Kitasato araştırma laboratuvarında *Streptomyces caespitosus*'dan elde edilmiş olan 334 dalton ağırlığında olup su ve organik çözücülerde çözünen bir antrasiklin antibiyotiktir.

Klinik deneylere 1960 sonlarında ABD'de başlanmıştır. Mitomisin C ilk olarak 1963'te Kunitumo ve Mori tarafından pterjium tedavisinde 0.4 mg/ml'lik konsantrasyonda 1-2 hafta boyunca 4x1 damla şeklinde kullanılmıştır. MMC üç tane fonksiyonel grup içerir. Her biri ilacın etkinliğini sağlayan kuinon, karbamat ve aziridin gruplarıdır (Abraham ve ark. 2006, Lee ve ark. 2004).



Şekil 2.12. Mitomisin C kimyasal yapısı

Şekil 2.13. Mitomisin C'nin ticari formu

Kapalı formülü : C₁₅H₁₈N₄O₅

2.6.2. Mitomisin C'nin Etki mekanizması

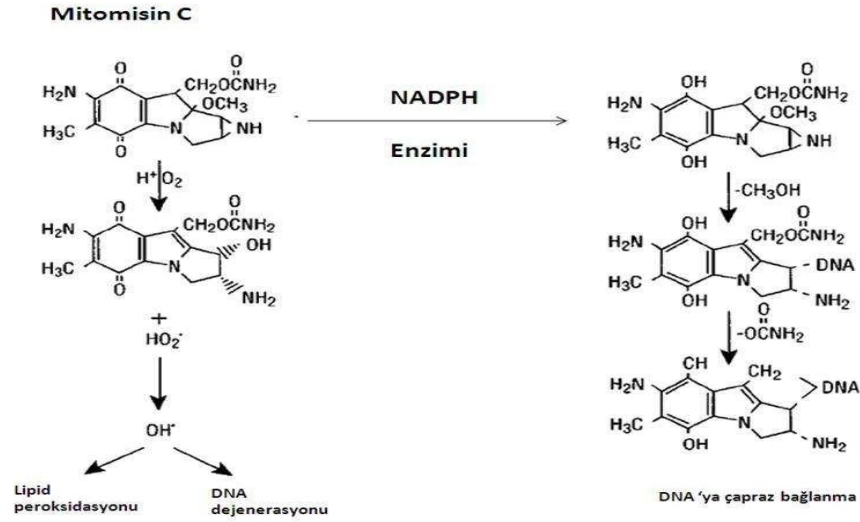
Mitomisin C (MMC), antimitotik etki gösteren ve kardeş kromatid değişimini arttıran alkile edici bir antibiyotik ajandır ve hücredeki birincil hedefi DNA' dır. Diğer alkile edici ajanlar gibi pek çok kimyasal tepkime yaratır (Emre 1989).

MMC üç tane fonksiyonel grup içerir. Her biri ilacın etkinliğini sağlayan kuinon, karbamat ve aziridin gruplarıdır. Tüm alkilleyici ajanlar gibi elektrofiliktir ve etkin hale dönüşmesi için hücre içinde kuinon kısmından indirgenmesi gerekmektedir. Bu işlem sitokromlarda oksidoredüktaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Sitokrom P-450 direkt MMC'ye etki etmez ancak oluşan metabolitleri üzerine düzenleyici etkiler göstermektedir.

İndirgenmiş olan MMC metabolitleri alkilleyici özellik kazanarak DNA sarmalında N2 pozisyonundaki guanine çapraz bağlanır ve DNA sentezini engellerler. Her aşamadaki DNA' ya bağlanabilmektedirler ancak sentez aşamasında özellikle de geç G1 ve erken S fazında affiniteleri daha yüksektir.

MMC için bir diğer bir etki yolu ise konak aktivasyonuna ihtiyaç duymadan (indirgenmeden) oksijenli ortamlarda süperoksit, hidrojen peroksit radikalleri oluşturmalarıdır. Oluşan bu radikaller de hücre membranlarındaki yağlar ile etkileşerek hasara neden olmaktadır (Mark ve ark.1994, Dorr 1988).

Selektif olarak DNA replikasyonunu bozar ve mitozu inhibe ederek hücre ölümüne neden olur. Yüksek dozlarda ise bunlara ek olarak Ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezini de inhibe etmektedir (Verweij ve Pinedo 1990).



Şekil 2.14. Mitomisin C'nin kimyasal reaksiyonları (Mark ve ark. 1994).

2.6.3. Mitomisin C (MMC)'nin Kullanım Alanları

MMC kanser kemoterapisinde intravenöz veya intraperitoneal olarak kullanılabilen bir ajandır (Chen ve ark. 2005).

Skleral erime ve nekroz gibi yan etkiler Mitomisin C uygulamasından kaynaklanan uzamış yara iyileşmesine ve muhtemelen kapiller endotelde yaptığı mitoz inhibisyonuna bağlanmıştır (Alsagoff ve ark. 2000).

MMC, seçici olarak DNA sentezini bozan, mitozu ve protein sentezini inhibe eden bir alkilleyici ajandır.

Mitomisin C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna girmektedir. Bu grupta cyclophosphamide, daunamycin, mitomycin C, streptozotocin ve uracil mustard bulunmaktadır. Bu ilaçlar Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından kanserojenik özelliklerine göre iki gruba ayrılmışlardır.

Grup 1; İnsan için kanserojenik olanlar. Örneğin siklofosamid.

Grup 2B; MMC'nin de içinde bulunduğu insan için muhtemel kanserojenik olanlar. Örneğin urasil mustard (Diler 2006).

Mitomisin C (MMC) çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır. MMC mide, meme, barsak gibi kanser türlerinde kullanılabilir.

MMC'nin günümüzde belirlenmiş olan yaygın yan etkileri aşağıda belirtilmiştir.

- Myelosuppression (kan hücrelerin sayısının düşmesi)
- Şiddetli enfeksiyon riskinin artması
- Anemi
- Saç dökülmesi
- Bulantı ve kusma
- İştahın azalması
- Yorgunluk

MMC'nin sistemik kullanımında kardiyotoksisite, kemik iliği depresyonu, venookluzif karaciğer hastalığı, interstisyel pnömoni, nefrotoksisite, alopesi ve cilt döküntüleri gibi yan etkileri mevcuttur ancak herhangi bir oküler yan etki bildirilmemiştir (Verweij ve Stoter 1987).

MMC için bir diğer yol ise konak aktivasyonuna ihtiyaç duymadan (indirgenmeden) oksijenli ortamlarda süperoksit, hidrojen peroksit radikalleri oluşturmasıdır. Oluşan bu radikaller de hücre membranlarındaki yağlar ile etkileşerek hasara neden olmaktadır (Door 1988, Mark ve ark. 1994).

MMC topikal kullanımda genellikle moleküler oksijen ile etkileşerek serbest radikaller üretir ve lipid peroksidasyonu, DNA ve protein sentezine bozarak hücrelere toksik etki göstermektedir. Ayrıca normalde mitotik aktivite göstermeyen kornea hücrelerinde DNA'da meydana gelen hasarın tamir edilmesini de engelleyerek hücre hasarına neden olmaktadır (Reddy ve Randerath 1987).

2.6.4. Mitomisin C (MMC) ile Yapılan Bazı Çalışmalar

Shiraishi ve ark. (1979), Mitomisin C (MMC)'nin normal ve anormal insan lenfosit hücre hatlarındaki etkisini incelemişler ve MMC'nin normal hücre hatlarında kromozom aberasyonlarını (KA) indüklediğini, kardeş kromotid değişimini (KKD) artırdığını gözlemişlerdir.

Kusakabe ve ark. (1999), klastojenik ajanlar tarafından indüklenen, olası kromozom aberasyonlarını belirlemek için kromozom 9'un aberasyonlarını incelemişlerdir. Kültüre edilmiş insan kan lenfositleri G₀ fazında MMC'ye maruz bırakıldıktan sonra, 9p veya 9q'nun diğer kromozomlara transloke olduğunu fluoresens in situ hibridizasyon tekniği ile boyayarak tespit etmişlerdir.

Fauth ve ark. (2000), insan lenfosit kültüründe klastojen MMC (500 ng/ml) ile anöjen dietilstilboestrol (DES)'ün (80 µm) MN indüksiyonu ile metafaz kromozomlarındaki sayısal ve yapısal değişimlerini incelemişlerdir. Bu maddeleri kültür yapmadan 23 saat önce kültüre ilave etmişlerdir. MMC ile muameleden sonra MN oluşumunun 18 kat arttığı ve metafaz kromozomlarında yapısal kromozomal anormallikleri ile hipodiploidiye neden olduğunu göstermişlerdir.

Zhang ve ark (2003), insan lenfosit DNA'sı üzerine MMC (DNA çapraz bağları oluşturur), bleomisin (radyomimetrik ajan), MMS (alkilleyici ajan) ve düşük şiddette (2,450 MHz) mikrodalganın kombine etkisini incelemişlerdir. Mikrodalganın DNA hasarlarını direkt olarak indüklediğini, fakat MMC'nin oluşturduğu DNA hasarlarının etkisini artırdığını tespit etmişlerdir. Mikrodalga ile diğer iki kimyasalın ise böyle bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Nesti ve ark (2000), Griseofulvin (GF) ve MMC'ye maruz bırakılan insan karaciğer fibroblastlarını sitokinez bloklama yoluyla mikronükleus oluşum ve FISH metotlarını kullanarak incelemişlerdir. MMC'nin doz ve zamana bağlı olarak mikronükleus (MN) oluşumunu indüklediğini, GF'nin ise MMC'ye göre daha az etkili olduğunu bulmuşlardır.

Diler (2006), Etil methansulfonat (EMS) ve çeşitli kanserlerin (mide kanseri, anüs ve kalın barsak kanserleri, göğüs kanseri, büyük hücreli akciğer kanseri, baş ve boyun kanserleri, küçük mesane papillomaları, pankreas kanseri ve rahim kanseri) tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajan olan Mitomisin C (MMC)'nin insan periferal lenfositlerinde oluşturduğu kromozom anormallikleri, özellikle de kromozom kırıklarının hangi kromozomlarda daha sık meydana geldiği (kromozomların kırılmaya yatkınlığı) saptamıştır. MMC'nin yüksek dozunda kromatid değişimi gözlenmiş ve özellikle quadriradyal figüre sahip kromozomlara sıklıkla rastlanmıştır. Kromozomlardaki bu tip kromatid değişimlerin ilerde translokasyonlu kromozomların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Bu da bize MMC'nin yüksek dozunda çoğunlukla translokasyonlu kromozomların oluşacağını göstermektedir. Bu çalışmada EMS ve MMC'nin sitogenetik olarak belirlenen kromozom kırıklarının haricinde, gen düzeyinde yaptığı hasarların da, hücrelerde kanser oluşumuna yol açabileceğini gösterilmiştir.

Prasad ve ark (2002), MMC uygulanan farelerin kemik iliği hücrelerinde MN oranında artış olduğunu bildirmektedirler. Propolis ve MMC'nin mutagenik aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada propolis ve mitomisin- C'nin hücrelerdeki mikronükleus oranını arttırdığı saptanmıştır.

Krishnaja ve ark. , MMC'nin periferal kan lenfosit kültürlerinde MN oranını artırdığını, Fauth ve ark. yaptıkları çalışmada, insan kan lenfosit kültürlerinde MMC'nin MN üzerine arttırıcı etkisini göstermişlerdir (Eroğlu ve ark. 2004).

2.7. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "**antioksidan savunma sistemleri**" veya kısaca "**antioksidanlar**" olarak bilinirler. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidanlar olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar.

2.8. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (Mercan 2004).

Vücutta bulunan serbest radikal ve peroksit denilen oksijen taşıyan zararlı molekülleri nötralize eden maddelerdir. Antioksidanlar oksijeni tutarak, oksijen etkisi ile oluşabilecek istenmeyen etkilerin önüne geçerler. Antioksidanlar serbest radikalleri hücre zarına, DNA'ya ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çekerler ve bağlarlar. Antioksidanlar sadece hastalıklardan korunmamızı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda erken yaşlanmamızı da önlerler (Miguel ve Fleming 1982).Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme, toplayıcı etkidir.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, bastırıcı etkidir.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir, kırıcı etkidir.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması, onarıcı etkidir.

Antioksidan hareket mekanizmasının görevleri;

- 1) Serbest radikal oluşumunda yer alan enzimleri inhibe ederek reaktif oksijen tür oluşumunu baskılamak,
- 2) Reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırarak antioksidan savunma mekanizmalarını korumak (Pietta 2000).

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

2.8.1. Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Süperoksit dismutaz (SOD) 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST). 4) Katalaz (CAT) 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz.

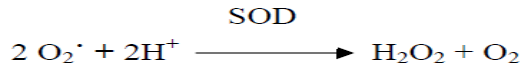
Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Melatonin 2) Seruloplazmin 3) Transferrin. 4) Miyogloblin 5) Hemogloblin 6) Ferritin 7) Bilirubin 8) Glutatyon 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Albümin (Valko ve ark. 2007, Şehirli 2001).

2.8.2. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

2.8.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Bu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Hidrojen peroksit ise sonradan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından ortamdaki uzaklaştırılır. Böylece hücre içindeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini azaltır. Süperoksit dismutazın fizyolojik görevi, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır.



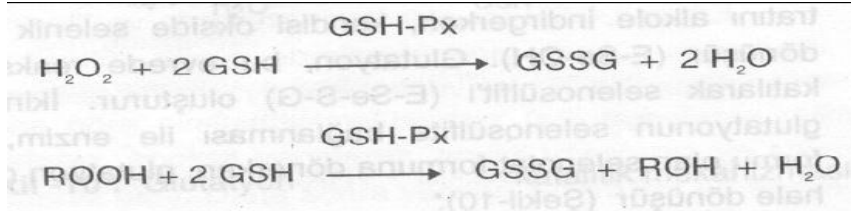
Şekil 2.15. Süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla süperoksit radikalının indirgenmesi (Altınışik 2000).

Süperoksit dismutaz memeli dokularında 3 farklı formda bulunur. Bunlardan Bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD) sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Manganez süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. Ekstraselüler SOD ise fibroblast ve endotel hücrelerini de içeren bazı hücre tipleri tarafından sentezlenir.

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır (Young ve Woodside 2001, Halliwell 2006).

2.8.2.2. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px):

Sitozolde yerleşik bir enzim olan GSH-Px tetramer yapıdadır. Dört selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar.

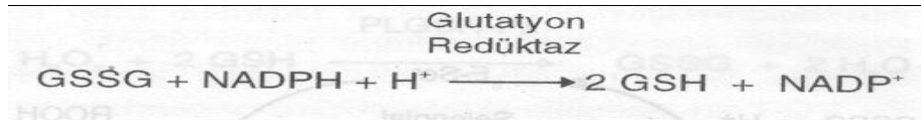


Şekil 2.16. Glutatyon peroksidaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesi tepkimesi (Altınışik 2000).

GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarlarına yol açar. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşük bulunmuştur (Masella ve ark. 2005).

2.8.2.3. Glutatyon redüktaz (GSH-Rd)

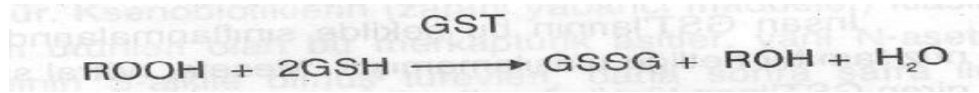
Glutatyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder (Akkuş 1995).



Şekil 2.17. Glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla okside glutatyonun indirgenmesi tepkimesi (Altınışik 2000).

2.8.2.4. Glutatyon S transferaz (GST)

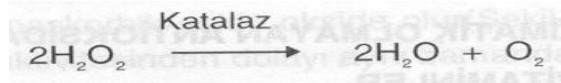
Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik veya katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Esas olarak sitozolde bulunur. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GSH 'lar çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunu katalizler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler (Altınışik 2000).



Şekil 2.18. Glutatyon transferaz enzimi aracılığıyla çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutatyon ile konjugasyonunun katalizlenmesi (Altınışik 2000).

2.8.2.5. Katalaz:

Katalaz enzimi H₂O₂'yi, oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizleyen antioksidan enzimdir.

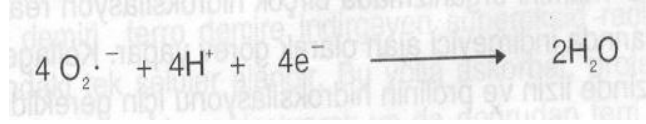


Şekil 2.19. Katalaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksidin, oksijen ve suya parçalanma tepkimesi (Altınışik 2000).

Enzim peroksizomlarda yerleşmiştir. Yapısında her biri hem grubu ve NADPH molekülü içeren dört tane protein altüniteleri bulunur. Peroksidaz aktivitesi de vardır ve hidrojen peroksit, metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki eder (Young ve Woodside 2001).

2.8.2.6. Sitokrom oksidaz:

Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan, bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken, süperoksit radikalının suya dönüşümünü de sağlar (Altınışık 2000).



Şekil 2.20. Sitokrom oksidaz enzimi aracılığıyla süperoksit radikalının suya dönüşmesi tepkimesi (Altınışık 2000).

Vücutta antioksidan savunmada öncelik hücrel antioksidan enzimlere aittir. Bunlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve glutatyon redüktazdır. Ancak bu enzimler vücudumuzun serbest radikallere karşı savaşında yeterli değildir. Bu nedenle antioksidan savunma sistemimizi güçlendirmeli ve antioksidan maddeleri içeren besinleri bol miktarda tüketmeliyiz (Hernandez 2004).

Gıdalarla alınan en önemli antioksidanlar A, C, E vitaminleri, çinko ve selenyum, mineralleri ve fenolik bileşiklerdir.

2.8.2.7. A Vitamini

A vitamininin iki şekli vardır; hayvansal kaynaklı retinol ve bitkisel kaynaklı betakaroten. Karotenoidler, bir çok meyve ve sebze de bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renk veren pigmentlerdir. Çoklu doymamış yapıları bu pigmentlere kolay okside olabilen ve stabil olmayan bir yapı kazandırmaktadır. Karotenoidler, hidrokarbonlar (α , β , γ karoten ve likopen) ve ksantofiller (lutein ve kapsantin) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Konjuge çift bağlarından dolayı hem serbest radikal toplayıcı ve hem de singlet oksijen bastırıcılar olarak fonksiyon gösterirler. Kırmızı, sarı ve turuncu meyveler, kök bitkileri ve sebzeler en önemli karotenoid kaynaklarıdır.

2.8.2.8. C Vitamini

C vitamini, önemli bir besin ögesi olması yanında, antioksidan özellikleri nedeniyle de önem taşımaktadır. Antioksidan özellikleri çok yönlü olup, lipid oksidasyonunu farklı mekanizmalarla önlemektedir. Bu mekanizmalar serbest radikal ve oksijen yokedicisi olarak indirgen etkileriyle okside olabilir bileşiklerini korumak, daha az reaktif olan semidehidroaskorbat ve dehidroaskorbik asit radikaline dönüşmek suretiyle oksijen ve karbon merkezli radikalleri indirgemek ve bazı antioksidanları rejenere etmek olmak üzere 3 grupta toplanabilir. Turunçgil meyveleri, biber, kabak, çilek, lifli yeşil sebzeler ve lahanagiller en önemli C vitamini kaynaklarıdır (Koca ve Karadeniz 2005, Podsedek 2005).

2.8.2.9. E Vitamini

Tokoferoller, fenolik hidroksil gruplarından hidrojen veya elektron vererek başlangıçtaki serbest yağ asidi radikali oluşumunu engelleyerek lipid oksidasyonunu inhibe ederler. Tokoferoller, gerek hayvansal ve gerekse bitkisel dokularda yaygın olarak bulunurlar. Doğada bulunan sekiz veya daha fazla sayıdaki tokoferol formundan alfa-, beta-, gamma- ve delta- en yaygın olanlardır ve tamamen antioksidan etki gösterirler. Antioksidan etkinlik sırası $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ şeklindedir (Üstün ve Turhan 1999, Sherwin 1990).

Kanser, kalp hastalıkları ve beyin damarlarına bağlı hastalıklarda ölüm oranı ve tümör oluşumunun diyetdeki meyve ve sebzelerin miktarıyla ters orantılı olduğu belirtilmiştir. Bol miktarda meyve ve sebze tüketenlerde kan basıncının da düştüğü, meyve ve sebzelerin bu etkiyi yapılarında bulunan antioksidanlarla sağladıkları, bu antioksidan etkinin ise C ve E vitamini ile α -karotenden çok fenolik maddelerden kaynaklandığı kaydedilmiştir (Hertog, 1993, Wang ve ark. 1996, Wetherilt, 1996).

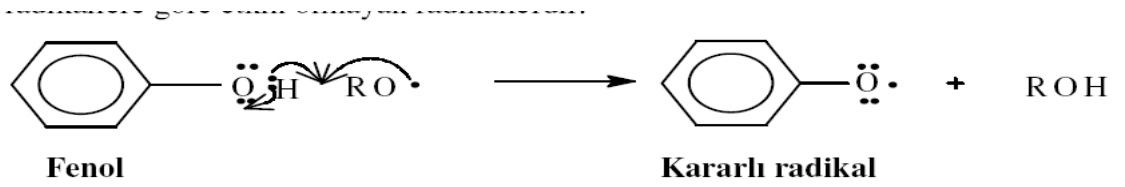
En aktif antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidant aktivitesi; serbest radikalleri temizlemesi ve hidrojen atomlarını veya elektronlarını vermesinden ileri gelir (Balasundram ve ark. 2005).

2.9. Fenolik Bileşikler

Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır.

Fenolik antioksidanlar (AO) serbest radikal sonlandırıcı ve metal çelatör gibi fonksiyon görürler. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Fenolik bileşikler bazı mekanizmalar ile karsinojenlere karşı etkili olabilirler. Bu bileşikler karsinojenleri ya da serbest radikalleri temizleyebilirler, reaktif oksijen türlerini de bloke edebilirler (Feredioon ve ark. 1992).

Aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren fenoller etkili antioksidanlardır. Çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir.



Şekil 2.21 Fenolik bileşiklerin kararlı rezonans gösterme tepkimesi

Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri lipid köklerini kararlı bileşikler haline dönüştürerek zincir tepkimesini kırmaktır ve birincil antioksidan olarak görev yaparlar (Altan 1989).

Fenol içeren bileşikler eşsiz antioksidan özellik gösterirler. Fenolik bileşikler genellikle tüm bitkilerde bulunan antioksidan özellikleriyle biyoaktif maddelerdir. Yapılan araştırmalarla; sebze, meyve ve diğer bitkilerin böceklerden korunmak için fenolik bileşikleri oluşturdukları belirlenmiştir (Hernandez 2004).

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler. Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyoflavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda kılcal dolaşım sisteminde geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncını düşürücü etkisi göz önüne alınarak P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı 2007, Cemeroğlu 2004).

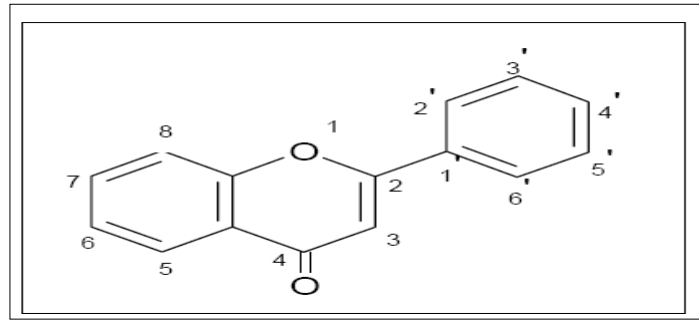
Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddeler ise polifenoller olarak bilinirler. Tüm fenolik bileşikler, basit fenollerdeki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanması ile oluşmuşlardır (Evrenesoğlu 2002, Karaçalı 2002).

Fenolik maddelerin aşırı alınması durumunda toksik etki gösterdiği ve gırtlak kanserine neden olduğu da öne sürülmekte, ancak düzenli olarak alındığında vücudun koruma mekanizmasını geliştirerek kanser riskini azalttığı ve toksisitesinin de düştüğü belirtilmiştir (Shahidi ve Nacz 1995).

Polifenoller; flavanoidler ve fenolik asitler şeklinde ikiye ayrılmaktadır.

2.9.1. Flavanoidler

Flavanoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadır.



Şekil 2.22. Flavanoidlerin Genel Yapısı (Shahidi ve Nacz 1995).

Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir. Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar;

1- Antosiyanidinler

Doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar ve antosiyanin adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir.

2- Flavonlar ve flavonollar

Orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır. Antosiyanidinler gibi bunlarda şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar .

3- Flavanonlar

Flavonlardan farklı olarak ortadaki halkada çift bağ bulunmaz. Bu glikozitler özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunurlar. En önemlileri naringin, hesperidin ve naringenindir.

4- Kateşinler ve löykoantosiyandinler

Kateşinler üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içerirler. Kateşinler gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyandinleri oluştururlar.

5- Proantosiyandinler

Kateşinlerden veya löykoantosiyandinlerden oluşan polimerik yapılara proantosiyandinler denir. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyandinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir (Saldamlı 2007, Cemeroğlu 2004).

Bu bileşikler bitkinin büyüme ve gelişmesini etkiledikleri gibi, hastalık etmenlerine karşı savunma sisteminin de bir parçasını oluştururlar. Ayrıca farmakolojik, antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojen özelliklerinin olduğu da bilinmektedir (Havsteen 2002).

Flavonoidlerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin bir çoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavanoid radikallerinin stabilitesini ve böylece antioksidan kapasitesini arttırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El 1997).

2.9.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal antioksidan maddelerdir. Fenolik asitler, bitkilerin rengi, kokusu ve tadlarından sorumludurlar. Sadece küçük bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Bu tip bileşiklerin gıdalarda bulunması besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini belirgin olarak etkilemektedir (Robbins 2003).

Fenolik asitlerin antioksidan etkileri yapılarıyla ilgilidir. Bu etki aromatik halkada taşıdıkları hidroksil gruplarının sayısına, bağlanma yerine ve pozisyonlarına bağlıdır. Hidroksi grubunun sayısının artmasıyla antioksidan etkinin arttığı gözlenmiştir. Metoksi grubu taşıyan fenolik asit türevinin taşımayana göre daha etkin olduğu saptanmıştır (Akkan 2008).

Fenolik asitler de kendi içinde sinnamik asitler ve benzoik asitler olmak üzere iki grupta toplanırlar. Bunlardan sinnamik asitler C6-C3 karbon yapısına sahip olup, bitkilerde en fazla bulunan sinnamik asitlere örnek olarak *p*-kumarik asit, 5-hidroksiferulik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit verilebilir.

Benzoik asitler ise, C6-C1 karbon yapısına sahip olup en yaygın olanları *p*-hidroksi benzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit, siringik asit ve gallik asittir. Renksiz bileşikler olan benzoik asit türevleri, sinnamik asit türevlerine oranla daha nadir bulunmaktadır. En yaygın olanlar *p*-hidroksi benzoik asit ve gallik asittir (Demirci 2001).

Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler.

Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokateşik	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H	Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Siringik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH				

Şekil 2.23. Fenolik asitlerin genel yapısı a) Benzoik asit türevleri b) Sinnamik asit türevleri (Shahidi ve Nacz 1995).

Fenolik asitlerin kronik hastalıkları (kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser çeşitleri) önlediği bilinmektedir. Fenolik asitler çok iyi antioksidantlardır. Bunlar ayrıca kötü huylu LDL kolesterolün oksidasyona uğramasına mani olurlar veya geciktirirler (Alaşalvar 2004).

2.10. Vanillin

Birçok problemimizin ve hastalıkların temel sebebi oksidasyondur, oksidasyon serbest radikallerin yaşayan dokuları ölünceye kadar yakması sonucu oluşur. Vanilya esaslı yağlar bu serbest radikalleri nötralize eder ve vücudu yara, enfeksiyon ve hastalıklardan korur. Vanillin güçlü antioksidan aktivite gösteren bir polifenoldür.

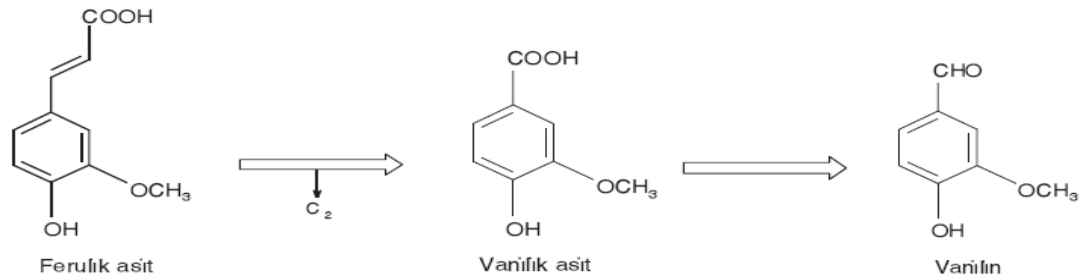
Kristalin bileşimi olan vanillin ilk olarak 1858'de Goble tarafından izole edilmiştir.

Birçok düşük molekül ağırlığına sahip fenolik bileşiklerle ortak olarak vanillin antioksidan, antimikrobiyel özellik gösterir ve bu nedenle potansiyel olarak yiyecekleri koruyucu özelliğe sahiptir (Parthasarathy ve ark. 2008).

Vanillin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit), tüm dünyada özellikle gıda endüstrisinde kullanılan en önemli aroma bileşiklerinden biridir. Esas olarak tropik vanilya orkidelerinin (*Vanilla planifolia*) çekirdeklerinden veya fermente edilmiş kabuklarından ekstrakte edilmektedir (Walton ve ark. 2003).

Dünyadaki vanilya üretimi talebi karşılamak için çok küçüktür. Bundan dolayı vanillin kimyasal olarak da üretilebilmektedir ve bu yöntem saf doğal vanilya üretiminden daha ucuzdur. Vanilyanın özütünde birçok bileşik bulunmasına karşın tat ve koku özelliğinden baskın olarak sorumlu olan bileşik vanillin olarak bilinir.

Doğal vanilin üretiminde alternatif yollardan biri mikrobiyal biyodönüşüm yoluyla üretimdir. Thibault ve ark. tarafından yapılan bir araştırmada, Basidiomycetes grubundan olan *Pycnoporus cinnabarinus*'un farklı kültürleri kullanılarak ferulik asit vanilline dönüştürülmüştür.



Şekil 2.24. *Pycnoporus cinnabarinus* kullanılarak ferulik asitten vanillin üretimi (Thibault ve ark. 1998).

Vanillin doğal olarak oluşan tatlandırıcı bir bileşiktir. Vanillinin ajanlarca oluşturulan mutasyonlar ve ökaryotik sistemlerdeki klastojeniteyi ortadan kaldırmaya yönelik çalışmaları karışık sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

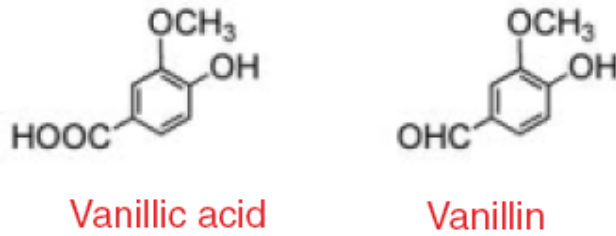
Diğer çalışmalar göstermiştir ki vanillin X ışını ve fare kemik iliği hücrelerindeki MMC indüklü MN oluşumunu baskılamaya yönelik olarak in vivo'da antiklastojen etki gösterebilmektedir (Sasaki ve ark. 1990, Inouye ve ark 1988).

Vanillinin polidoymamış yağ asitleri taşıyan kompleks yiyeceklerde antioksidan olarak etki gösterdiği görülmüştür (Parthasarathy ve ark. 2008).

Kanserin genomik mutasyon ile başlayan bir hastalık olmasından dolayı vanillin gibi efektif bir antimutajen antikarsinojenik potansiyele sahiptir. Lirdprapamongko ve ark. vanillinin fare meme kanser hücrelerinde in vitro yayılımı ve in vivo metastazını önlediğini bulmuştur. King ve ark. ise vanillinin aynı zamanda kolon kanser hücre hattı HCT116'daki mutasyonu onardığını bulmuştur (Lirdprapamongkol ve ark. 2005, King ve ark. 2007).

Vanillinin hasarlı hücrelerdeki antimutajenik aktivitesini, rekombinasyon ilerletme ve homolog bölgelerde DNA birleştirmesi yoluyla gösterdiği öne sürülmüştür (Tamai ve ark. 1992).

Yüksek konsantrasyonlarda vanillin memeli hücrelerine sitotoksiktir. Memeli hücrelerinde in vitro'da mutajenite testi vanillinin genotoksisite potansiyelini gösterir. Buna rağmen bu çalışmalardan bazıları hatalı sonuçlara sebebiyet verebilen yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.25. Vanillic asit ve Vanillin'nin kimyasal yapısı (Keshava ve ark. 1998).

Farelerdeki metabolizma çalışmaları göstermiştir ki, vanillin hem serbest hem de konjugat formda vanillik asit ilk olmak üzere belli sayıda üriner ürüne metabolize olur (Keshava ve ark. 1998).

Ultraviole absorbe çalışmaları sonucu, vanillinin seyreltik solüsyonu hava ile temasında yavaşça vanillik aside okside olur.

Chouth ve ark.'ları *Origanum vulgare*'den izole edilen vanillin ve vanillik asidin antioksidan aktivitesini araştırmış ve vanillik asitin vanillinden serbest radikal temizleme aktivitesi, güç azaltma ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu açısından daha kuvvetli antioksidant olduğunu bulmuşlardır. Bu durum vanillik asidin karboksil gruplarının yapısal varlığından ileri gelir (Chouth ve ark. 2010).

2.11. Vanillik Asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit)

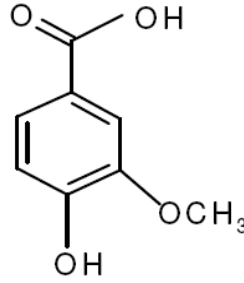
Son yıllarda vanillik asit yiyeceklere koruyucu madde olarak katılmasının yanı sıra, gıda, eczacılık, kozmetik gibi endüstri alanlarında antiseptik madde olarak da kullanılmaktadır. Geniş kullanım alanına karşılık vanillik asitin insan sağlığı üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır.

Vanillik asit fenolik OH grubu içermesinden dolayı antioksidan bir bileşiktir. Halkadaki metoksi gruplarının antioksidan özellikleri arttırdığı belirlenmiştir.

2.11.1. Vanillik Asit yapısı ve genel özellikleri

Vanillik Asit molekül formülü (3-metoksi 4-hidroksi benzoik asit) $C_8H_8O_4$, molekül ağırlığı 168.14 gr mol⁻¹'dür. Alkoldeki çözünürlüğü çok iyidir. Erime noktası 210–230 °C'dir.

Vanillik asit (VA)



Şekil 2.26. Vanillik Asit kimyasal yapısı (Duke 2000).

Kafeik, ferulik ve vanillik asit gibi fenolik asitler meyve, sebze ve diğer bitkilerdeki doğal antioksidanlar grubuna dahil olur (Hegab ve Ghareib 2009).

Vanillik asit (4-hidroksil-3-metoksi benzoik asit) yenilebilir bitki ve meyvelerde bulunan antimikrobiyal ve antifilarial aktivite gösteren fenolik bir türevidir. Vanilya bitkisinin temel bir bileşenidir. Vanillik asitin türevleri Avrupa’da analeptik bir ilaç olarak kullanılır. Vanillik asit farklı modellerde kimyasal ve fiziksel mutajenler tarafından indüklenen mutajeneze engel olmaktadır. Aynı zamanda farelerde karsinogenez modellerinde kimyasal önleyici etki göstermektedir. Vanillik asitin orak hücre anemisinin tedavisinde ajan olarak potansiyele sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yakın tarihteki raporlar vanillik asitin DNA bağımlı protein kinazı engellediğini ve kanser hücrelerinin cisplatine karşı duyarlılıklarını artırdığını ortaya koymuştur (Boobalan ve Mol 2010).

Bitkilerde şimdiye kadar bilinen en yüksek vanillik asit değeri *Angelicalica sinensis*’in köklerinde bulunmuştur. Vanillik asit içeren antioksidan özellikli bitkiler Çizelge 2.2.’ de gösterilmiştir (Duke 2000).

Çizelge 2.2. Vanillik asit içeren antioksidan özellikli bitkiler (Duke 2000).

<u>Tohumunda bulunanlar</u> Adaçayı (<i>Salvia sp.</i>) Bezelye (<i>Pisum sativum L.</i>) Biberiye (<i>Schoenocaulon officinale</i>) Bugday (<i>Triticum aestivum L.</i>) Kakao (<i>Teobroma cacao L.</i>) Kara hardal (<i>Brassica nigra L.</i>) Soya (<i>Glycine max</i>) Yerfıstığı (<i>Arachis hypogaea L.</i>) Yulaf (<i>Avena sativa L.</i>)	<u>Mevvesinde bulunanlar</u> Arpa (<i>Hordeum vulgare L.</i>) Bahçe rezenesi (<i>Foeniculum vulgare</i>) Çilek (<i>Fragaria spp</i>) Kisnis (<i>Coriandrum sativum L.</i>) Meksika çayırotu (<i>Chenopodium album L.</i>) Sirken (<i>Chenopodium ambrosioides L.</i>) Vanilya (<i>Vanilla planifolia</i>)
<u>Bitkisinde bulunanlar</u> Atkuyruğu otu (<i>Equisetum arvense L.</i>) Pirinç (<i>Oryza sativa L.</i>) Ginseng (<i>Panax quinquefolius</i>) Kantaron (<i>Centaurium erythraea</i>) Karnabahar (<i>Brassica oleracea var. Botrytis L.</i>) Kekik (<i>Thymus vulgaris L.</i>) Lavanta (<i>Santolina chamaecyparissus L.</i>) Muz (<i>Musa x paradisiaca L.</i>) Visne (<i>Prunus cerasus L.</i>) Yaban mersini (<i>Vaccinium corymbosum L.</i>) Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)	<u>Yapraklarında bulununlar</u> Hatmi çiçeği (<i>Althae officinalis L.</i>) Hindistan cevizi (<i>Cocos nucifera L.</i>) Keklik üzümü (<i>Gaultheria procumbens L.</i>) Seker pancarı (<i>Beta vulgaris</i>) Tarhun (<i>Artemisia dracunculus L.</i>) Yabani hindiba (<i>Cichorium intybus L.</i>) Zerdaçal, Hint safranı (<i>Curcuma longa L.</i>)
<u>Fidelerinde bulunanlar</u> Mısır (<i>Zea mays L.</i>) <u>Ciceğinde bulunanlar</u> Sogan (<i>Allium cepa L.</i>) Tıbbi nergis (<i>Calendula officinalis L.</i>)	<u>Ağac kabuğunda bulunanlar</u> Sarıçam (<i>Pinus sylvestris L.</i>) Tesbih ağacı (<i>Melia azedarach L.</i>) Palmiye (<i>Serenoa repens</i>)

2.11.2. Vanillik asit ile ilgili bazı çalışmalar:

Hegab ve Ghareib yaptıkları çalışmada, elde ettikleri sonuçlarda düşük konsantrasyonda vanillik asit ve aktif asetonun antioksidatif etkilerini kanıtlamış ve domates bitkisinin çimlendirilmesi ve gelişimindeki güçlü uyarıcı etkisini ortaya çıkarmışlardır (Hegab ve Ghareib 2009).

Szwajgier ve ark'larının yaptıkları çalışmada, vanillik asit ve protokateşik gibi benzoik asitlerin bazı ölçüm sistemlerinde sinnamik türevleri olan kafeik ve feruik aside oranla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saptamışlardır (Szwajgier ve ark. 2005).

Rooibos çayındaki fenolik asitler protokateşik asit, kafeik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanillik asit, p-komalik asit, ferolik asit ve şiringik asit içerir. Aynı zamanda bu bileşikler antioksidan aktiviteye sahiptir. Rooibos, MMC ve benzopyrene indüklü chinese hamster over hücrelerindeki kromozom aberasyonlarının sayısını önemli bir şekilde baskılamıştır (Sasaki ve ark.1993).

Tahıllar (bugday, mısır, pirinç, arpa, yulaf, darı ve çavdar) üzerinde yapılan araştırmalarda; tahıl tanelerinin fenolik asitler (vanillik, salisilik, ferulik, p-kumarik, protokateşik, syringik, p-hidroksibenzoik asitler) açısından zengin oldukları belirlenmiştir. Vanillik, ferulik ve p-kumarik asitlerinin bütün tahıllarda ana fonksiyonel antioksidan madde oldukları belirlenmiştir (Hernandez 2004).

Lipid oksidasyonun yiyeceklerin lezzet kararlılığı, yaşlanma, mutajenez, karsinojenez ve diğer kalp hastalıkları üzerinde negatif etkileri vardır. Kafeik asit, feruik asit, kaempferol, salisilik asit ve vanillik asit akuatik sistemlerdeki linoleik asit oksidasyonunda iyi birer antioksidandırlar.

Fotosensitize oksidasyonda kafeik asitin, kaempferolün, salisilik asitin ve vanilik asitin antioksidan etkisi singlet oksijen giderici olmasından ve serbest radikallere hidrojen atomu vermesinden dolayıdır (Atnip 2010).

2.12. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Araştırmalarında Kullanılan Yöntemler

Fiziksel ve kimyasal maddelerin DNA üzerindeki etkilerini görmek için in vivo ve in vitro testler kullanılır.

Bir maddenin mutajenik veya genotoksik etkili olup olmadığını saptamak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bir maddenin potansiyel bir mutajen olup olmadığını belirlenmesi için kromozom anormalliklerine neden olup olmadığına bakılmaktadır. Kromozom anormalliklerinin genotoksik maddeler için indikatör olduğu, ayrıca insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri ile kanser oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmektedir.

DNA hasarlarının incelenmesinde en çok kullanılan yöntemler; mikronükleus (MN) ve kromozomal aberasyon (KA) testi ile kardeş kromatid değişimi (SCE) metodudur.

Ayrıca, tek hücre jel elektroforezi (SCGE), “Comet Assay” olarak da bilinir, oksidasyona neden olan, alkilleyici özellikteki kimyasalların neden olduğu DNA hasarlarını incelemek için kullanılan bir genotoksisite testidir. Bunun yanında *Salmonella typhimurium* mutant suslarının kullanıldığı, bakteriyel Ames testi de genotoksisite testlerinde önemli bir yere sahiptir (Taner 2004).

2.12.1. Ames Testi

İlk defa 1973 yılında Dr. Bruce N. Ames tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Ames testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa süreli bakteriyel test sistemlerinden birisidir. Tanımlandığı yıldan bu yana 5000’den fazla kimyasal maddenin mutajenik ve karsinojenik etkileri bu test ile araştırılmıştır. Ames yönteminde genellikle *Salmonella typhimurium* mutant susları (TA98 ve TA100) kullanılmaktadır. Her test susu histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA’daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames ve ark 1973, Mortelmans ve Zeiger 2000).

2.12.2. İn Vitro CA Yöntemi

Bu yöntemle kromozomların sayısal ve yapısal anormallikleri incelenmektedir. Mutajen ve karsinojenlerin kromozom aberasyonlarını indüklediği saptanmış ve aberasyon frekansının kanser riski taşıyan grupların tanımlanmasında önemli olduğu görülmüştür. Yöntemde genellikle kolsemid ve kolşisin gibi tubilin polimerizasyon inhibitörü kullanılmakta böylece hücre bölünmesinde metafaz safhasında kalmış kromozomlar sayı ve aberasyon yönünden değerlendirilmektedir. Bu yöntemle incelenebilen yapısal aberasyonlar; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerin birleşmesi, traslokasyon, izokromozom ve endoreduplikasyondur (Hagmar ve ark 1994, Bonassi ve ark 1995).

2.12.3. İn Vitro SCE yöntemi

Perry ve Evans tarafından 1975 yılında tanımlanan SCE analizi, günümüzde genotoksisite analizlerinde kullanılan geleneksel yöntemlerden birisi haline gelmiştir. SCE, bir kromozomun kardeş kromatidleri arasında meydana gelen resiprokal parça değişimi olayıdır. Karsinojenik ve mutajenik maddelerin, SCE düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Çok sayıda farklı SCE yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte, yöntemin temel prensibi DNA replikasyonunun iki hücre siklusu boyunca BrdUrd'li (5'-Bromo- 2'-deoxyuridine) ortamda gerçekleştirilmesidir. Uygun bir boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlarda değerlendirme ikinci bölünmedeki metafaz hücrelerinde yapılmaktadır (Perry ve Evans 1975, Tice ve Hollaender 1984).

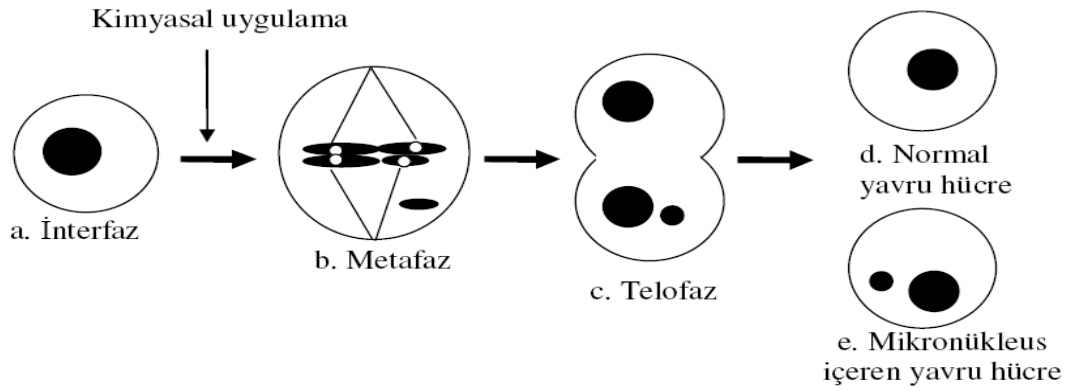
2.13. Mikronükleus (MN)

Mikronükleus ana kromozomdan kopmuş olan parçacıklardan ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nükleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nükleusa ilaveten görülebilen ana çekirdeğin 1/3- 1/16'sı arasında değişebilen oluşumlardır.

Genel olarak bir hücre içinde bir MN oluşmasına karşın, genotoksinin etkisine bağlı olarak bazen bu sayı iki ya da daha fazla olabilir. Mikronükleus, hücre döngüsü boyunca meydana gelir ve hasar nerede olursa olsun (DNA hasarı veya mitotik hedeflerdeki hasar), hücre bölünmesi süresince oluşur.

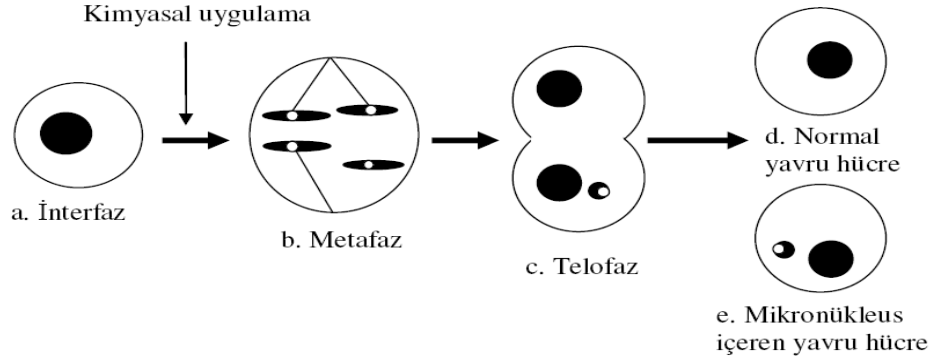
MN interfazda kolayca görülebilir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'lar ya klastojenlerin neden olduğu kromozom kırığı sonucu asentrik kromozom fragmentlerinden (Şekil 2.27.) ya da anöjenlerin (anöploidiyi uyaran ajanlar) neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşurlar (Şekil 2.28.).

Elhajouji vd. 1995 yılı çalışmalarına göre; MN testi ile çeşitli pestisitlerin ve ilaçların genotoksisite testlerinde klastojenik ve anöjenik etkili olabilecek seviyeleri tespit edilebilmektedir (Fenech ve Morley 1985).



Şekil 2.27. Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu

Yapısal kromozom hasarının uyarılması, kromozomlar mitozun metafaz evresinde (b) yoğunlaştığı zaman gözlenebilir. Kromatid parçasının etrafında çekirdek zarının yeniden oluşması ile hücrenin bölünmesinden (e) sonra ortaya çıkan yavru hücrelerde bir mikronükleus (c) gözlenir (Mukherjee 1988).



Şekil 2.28. Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu

(b)Hücre bölündüğü zaman, bu kromozom anafaz sırasında geri kalacaktır ve yavru hücre çekirdeğine düzgün bir şekilde ayrılamayacaktır. Bu geri kalan kromozomun etrafında çekirdek zarının da oluşması ile yavru hücrelerden birinde ortaya çıkacak olan (e) mikronükleus meydana gelir (c) (Mukherjee 1988).

2.13.1. İn Vitro Mikronükleus Testi Tekniğinin Gelişimi

Mikronükleus testi terimi, ilk kez 1970'li yıllarda Boller ve Schmidt ile Heddle tarafından önerilmiştir. Bu test, genotoksik etkiyi belirlemede en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bazı kromozom anormalliklerinin tespit edilmesinin zor olduğu diğer metotlara göre daha uygun olması, daha çok sayıda hücrenin incelenebilmesi ve istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajlar sağlaması nedeni ile hem in vivo hem de in vitro olarak farklı ajanların mutajenik etkilerini değerlendirmek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

MN testi ile genotoksik ajanların mutajenik etkileri tespit edilirken, kullanılan test gruplarındaki MN oranı kontrol gruplarından daha fazla çıkar ise test edilen maddenin mutajenik olduğuna, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir farklılık meydana gelmemişse mutajenik olmadığına karar verilir. Eğer uygulanan madde mevcut MN oranında azalmaya sebep oluyorsa maddenin anti-mutajenik olduğu anlaşılır (Heddle ve ark. 1991).

Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir.

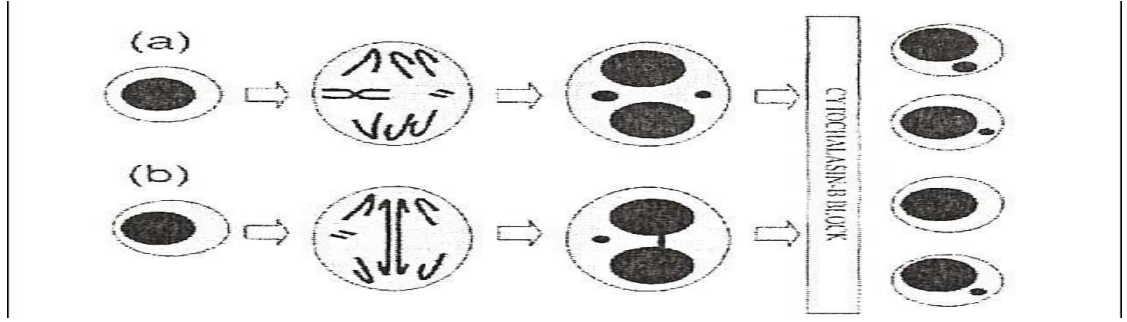
Eastmond ve Tucker aynı amaçla antikinokor antikokorları kullanarak kinokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyarıcı ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır.

Daha sonraları Fenech ve Morley tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır (Fenech ve Morley 1985).

Sitokinezi-blok Mikronükleus (CBMN) tekniği in vitro genotoksisite testleri, insan populasyon taramasında kolayca uygulanabilecek bir tekniktir (Fenech ve ark. 1999). MN tekniği, en çok çeşitli kimyasallara ve fiziksel ajanlara maruz kalmış bireylerin taraması amacı ile, bireyler arasında genetik hasarın temel seviyesini anlamak (Fenech ve ark. 1999) ve çeşitli ajanların klastojenik ve aneujenik potansiyellerini değerlendirmek amacı ile insan lenfositlerini de içeren farklı tip hücrelerde geniş çapta kullanılmaktadır (Fenech ve Morley 1985).

2.13.2. İn Vitro Mikronükleus Testi (CBMN-Cytokalsin-B mikronükleus testi)

1985 tarihinde, Fenech ve Morley kültür ortamındaki hücrelere sitokalsin B (Cyt-B) ekleyerek bölünen hücreleri tanımlamak üzere bir yöntem geliştirdiler. Sitokalsin B *Helminthosporium dematioideum*'un bir metabolitidir; Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkasının oluşması için gerekli olan aktin polimerazasyonunun bir inhibitörüdür, sitokinezi bloklar, fakat çekirdek bölünür ve çekirdek bölünmesi geçiren hücrelerden iki çekirdekli hücreler oluşur ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronükleuslar değerlendirilir (Fenech ve Morley 1985).



Şekil 2.29. Sitokalazin-B (Cyt- B)'nin binükleer evrede hücre bölünmesini bloke etmesi (Fenech ve Morley 1985).

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır.

Heddle ve Countryman'ın kriterlerine göre: (Heddle ve Countryman 1976).

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması
4. Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtması
5. MN'lerin feulgen pozitif veya diğer DNA'ya özel reaksiyonlarda pozitif reaksiyon göstermesi
6. MN'ların sitoplazması iyi gözlenen hücrelerde sayılması esas alınmaktadır.

Mikronukleuslar sayılırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar bulunmaktadır:

- Ana nukleuslar ayrı olabilir ama eşit büyüklükte olmalıdır,
- Ana nukleuslar birbirlerine değebilir ya da kısmen üst üste binmiş olabilirler,
- Ana nukleuslar nuklear bağlarla bağlı olabilirler.

Bu hücreler sayılırken aşağıdaki hücreler sayılmazlar;

- Üç, dört yada daha fazla nukleusa sahip olanlar,
- Ana nukleusları eşit boyda olmayanlar,
- Apoptozis durumundaki hücreler (Fenech ve ark. 2003).

2.13.3. İn Vitro MN testinin avantajları

MN test yöntemini sitogenetik anormallikleri belirlemede etkili bir metod yapan; farklı hücre tiplerinde in vitro şartlarda yaygın uygulanabilirliği ve sayım kolaylığıdır. Kromozom ve genom mutasyonları tek işlemde tanımlanabilir. Klastojenler ve anojenler arasındaki ayrımlar yapılabilir.

Hızlıdır, ucuzdur, rutin uygulama için uygundur ayrıca elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar.

2.13.4. İn Vitro MN testinin dezavantajları

MN' nin tanımlanması için hücrenin bölünmesi gerekir. Kullanılan test kimyasalı ile sitokalasin-B etkileşime girebilir (bu etkiyi artırabilir ya da azaltabilir).

Kromozom aberasyonlarının özel tiplerinin tanımlanabildiği ve ekstra kromozomların (örneğin poliploidi) varlığının kolaylıkla görülebildiği metafazda, mikronükleusun kromozom içeriği doğrudan gözlenemez. Çünkü, çekirdek membranı birçok kromozom veya kromozom parçasının etrafında yeniden oluşabilir; bu nedenle bir MN'de birçok kromozom parçası bulunabilir. MN sayıları ile kromozom aberasyonunun derecesi her zaman eşit olmayacağı için, bir hücredeki kromozom hasarının miktarı tam olarak ölçülmek isteniyorsa MN testi bu noktada yetersiz kalır.

Ayrıca, tüm kromozom aberasyonlarının MN oluşturması beklenemez. Asentrik kromatin parçaları oluşturan kromozom aberasyonlarının MN oluşturma olasılığı daha yüksektir, çünkü asentrik parçaların mitotik iğ bağlanması ve düzgün bir şekilde ayrılması söz konusu değildir (Fenech ve ark. 1999).

2.13.5. MN ve kanser ilişkisi

Mikronükleuslar kromatin kaybı sonucunda oluştuğu için, özellikle kayıp kromatin, tümör baskılayıcı genler gibi kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili bir gen ya da genleri yapısında bulunduruyorsa, bu bir risk göstergesi olabilir.

MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki direk ilişki birçok bulgu ile desteklenmektedir. Cheng ve ark. 1996'da, Duffaud ve ark. 1997'de yaptıkları çalışmalara göre; kanser hastalarında periferik lenfositlerde olduğu gibi hedef dokuda da MN frekansı artmaktadır (Fenech ve ark. 1999). Sorsa ve ark. 1992 yılında yaptıkları araştırmaya göre; bazı ajanlar insan ve hayvanlarda MN frekansını arttırabilmekte, kanserojenite ve genotoksisite arasında bir ilişki bulunmaktadır. Bu bulgular açıkça MN ve kanser arasında bağ olduğunu göstermektedir.

2.14. İn Vitro Comet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektrofrez)

DNA hasarı oluşturan kimyasal ajanların başında alkilleyici maddeler, nitroz asid, platinyum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler (aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aflatoksinler ve fenitoin, warfarin, rifampin gibi ilaçlar) gelmektedir. Bu kimyasallar bazıları alkilleyerek, oksitleyerek, bazılar arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına neden olarak DNA hasarı oluştururlar (Dinçer ve Akçay 2000).

İzole edilmiş hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttırmak için Ostling ve Johanson mikro jel elektrofrez tekniğini geliştirdiler. Bu teknikte mikroskop lamalarının üzerine agaroz jel içinde hücreler gömülür yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilerek membranlar parçalanır. Nötr pH ortamında kısa bir süre elektrofrez uygulanır. Yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA, sağlam DNA'ya göre daha hızlı bir şekilde anoda doğru göçer. DNA göçünün miktarı preparatların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir. Ancak burada elektrofrezin nötral koşullarda uygulanması yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilemez.

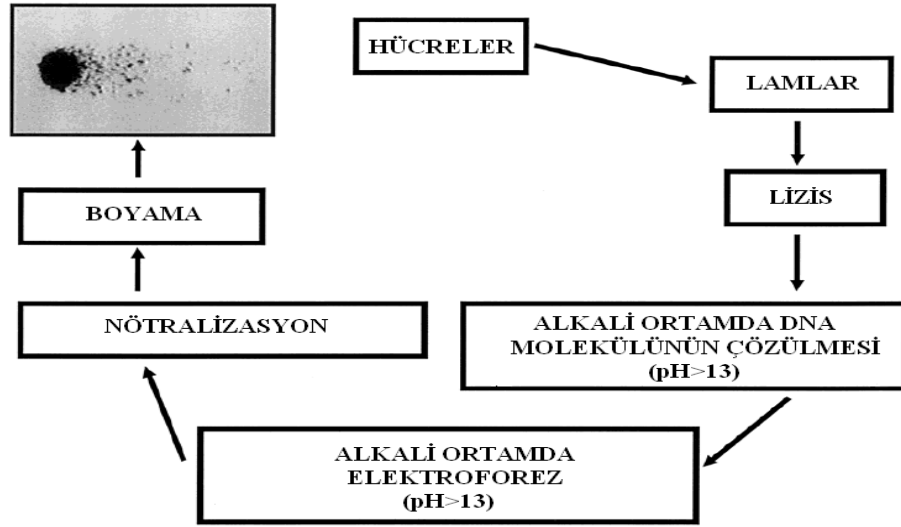
1988'de Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir. Günümüzde uygulanan “COMET Assay” Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıkların tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojidir (Ostling ve Johanson 1984, Singh ve ark. 1988).

In vitro ve in vivo genetik toksikoloji alanında önemli uygulama alanına sahip “COMET Assay” son yıllarda giderek artan bir sıklıkla apoptosiz, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında yer almıştır.

COMET Assay basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süpersarmal DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süpersarmal yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforezde kırılmış DNA zincirleri anoda doğru geçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Kuyruk uzunluğu DNA hasarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Collins 2004).

2.14.1. COMET Yöntemi Basamakları

1. Hücresel materyalin hazırlanması
2. Mikroskop lamalarının hazırlanması
3. Lizis
4. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması (Alkali unwinding)
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. DNA'nın boyanması ve “comet”lerin görüntülenmesi
8. COMET sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi



Şekil 2.30. COMET yöntemi basamakları (Tice ve ark. 2000).

Lamların hazırlaması sırasında her lama üzerine 1-3 bağımsız jel yayılır. En alt tabaka ya tam buzlu mikroskop lamından veya yüksek konsantrasyonda normal erime noktası bulunan agaroz jelinden oluşur. Bunların üzerine hücrelerin düşük erime noktalı agaroz ile oluşan süspansiyonu yayılır. Bundan sonra lizis işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde deterjanlar ve yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltilerinden yararlanır. Üzerinde hücreler bulunan lamlar en az 1 saat en çok 1 gece olmak üzere, lizis solüsyonlarında bekletilir. Elektroforez öncesi alkali yürütme tamponu içinde lamlar 20-25 dk arası bekletilir. Bu işlem DNA molekülünün çözülmesi için gereklidir.

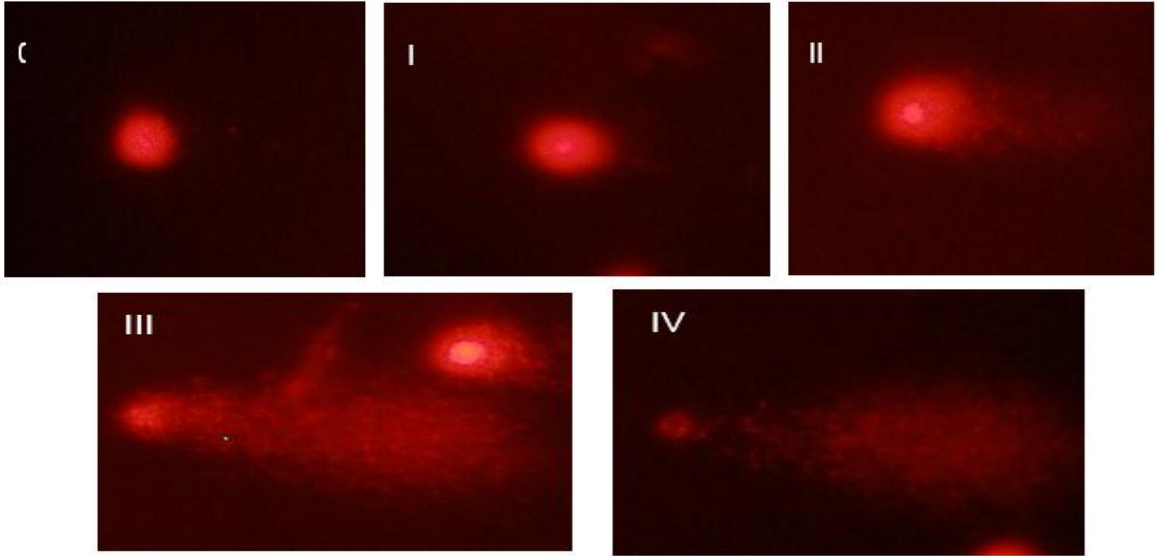
Bu işlemden sonra elektroforez işlemi uygulanır bu işlemde Standard voltaj 0.7-1 V/cm' dir. Elektroforez sonrası alkali lamlar nötralizasyon bufferi ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra lamlar etidyum bromit, DAPI (diamidino-2-fenilindol), propiyum iyot veya SYBR Green1 gibi floresan özellikli boya larla veya gümüş nitrat gibi floresan olamayan boya larla boyanırlar. COMET sayımı için metrik ve metrik olmayan teknikler vardır. Ayrıca comet sayımı için bilgisayar sistemli programlarda geliştirilmiştir. En basit yöntemlerden biri cometleri büyüklüklerine göre katagorilere göre bölüp değerlendirmektir (Tice ve ark. 2000, Olive ve ark. 1991, Cotelle ve Ferard 1999).

2.14.2. COMET Sayımı ve DNA Hasarının Belirlenmesi

a) Görsel analiz: Farklı derecelerdeki hasarı gösteren “COMET”leri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel değerlendirmeye göre “COMET”ler DNA göç uzunluğuna ve hasar derecesine göre 5 kategoride tanımlanır (0-4).

Dairesel şeklide hiç kuyruk oluşturmamış DNA görüntülerinden hiç hasarlanmamış DNA lar “O”, çok az hasarlanmış DNA lar “I”, az hasarlı DNA lar “II”, hasarlı DNA lar “III” ve çok hasarlı DNA lar “IV.” derece hasar olarak değerlendirilir.

Şekil 2.31.’ de Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA’ların görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA.



Şekil 2.31. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile elde edilen farklı seviyelerde hasara uğramış DNA’ların görüntüleri (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

b) Bilgisayarlı görüntü analizi: Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik “comet”lerin görüntüleri analiz edilir (Collins 2004, McKelvey-Martin ve ark. 1993).

2.14.3. COMET Yöntemi Avantajları

Genotoksisite araştırmalarında kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında ‘‘COMET Assay’’in bazı avantajları vardır. DNA hasarı analizi için kullanılan hassas, hızlı, maliyeti düşük, basit ve DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesine olanak sağlayan bir tekniktir. Comet yöntemi sadece sarmal kırıklarının değil, alkali koşullarda ortaya konulabilen hasarların (alkali labilesites) ve DNA çapraz bağlarının saptanmasına olanak sağlamıştır. Comet yöntemi duyarlılığı, DNA hasarını tek hücre seviyesinde ölçmeye olanak sağlaması ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği nedeni ile genotoksik etkisi merak edilen bileşiklerin toksisitelerini hızlı olarak belirlemede kullanılan bir yöntemdir.

Deney hayvanlarının hemen her bir dokusunda ve hatta insan biyopsi örneklerinde sadece az miktarda hücreye ihtiyaç duyarak DNA kırıklıklarını belirleme imkânı verir.

Bütün prosedür birkaç saatte tamamlanabilir ve bir görüntü analizörü varsa anında değerlendirilebilir.

Ayrıca ihtiyaç duyulan donanımın büyüklüğü ve maliyeti genetik toksikolojide kullanılan diğer kısa zamanlı testlerden daha fazla değerdir.

Oksidatif stresin kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin temelinde yer aldığının belirlenmesinden sonra araştırmalar antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır, yeni bir takım bitkisel moleküllerin antioksidan özellikleri olup olmadığı araştırılmaktadır. ‘‘COMET Assay’’, sayıları büyük bir hızla artmakta olan in vivo ve in vitro antioksidan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (McKelvey-Martin ve ark. 1993, Silva ve ark. 2009).

2.14.4. COMET Yöntemi Dezavantajları:

“COMET Assay” basit, hızlı, ucuz, duyarlı bir yöntem olması, çok küçük hacimde örnek gerektirmesi ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği nedeniyle sıklıkla kullanıldığı halde, bazı dezavantajlara sahiptir.

Tekniğin uygulama aşamalarındaki bazı farklılıklar (agaroz konsantrasyonu, uygulanan hücre miktarı, elektroforez süresi, vb) farklı sonuçlara yol açsa da, aynı protokolü uygulayan farklı laboratuvarların sonuçlarında da farklılık olabilmektedir. Bu farklılıklar büyük oranda “COMET” sayımı yapan kişiden kaynaklanmaktadır.

Biyolojik izleme çalışmalarında istenilen miktarda kolayca elde edilebildiğinden tam kan lökositleri sıklıkla kullanılmaktadır. Oysa yapılan çalışmalar taze izole edilen lenfositlerde hasar oluşturuvcu bir ajanla işlem sonrasında, DNA onarımının çok yavaş ilerlediğini göstermiştir. Dolayısıyla DNA onarım çalışmaları için lenfositler iyi bir tercih değildir.

Tam kan lökositlerinde belirlenen DNA hasarı organizmanın genel durumunu ortaya koyar, fakat spesifik bir dokuya ait hasarı göstermez. Bunlar “COMET Assay” çalışmalarında araştırmacıyı yönlendirecek bilgilerdir.

Ancak sonuçların yorumlanması bazı durumlarda güç olmaktadır. Zira deneyde görülen güçlü etkiler mutlaka genotoksik bir tehlikenin varlığına işaret etmemektedir. Bu nedenle elde edilen veriler bir başka deney ile mutlaka karşılaştırılmalıdır (Forchhammer ve ark. 2008, Collins ve ark. 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanı

Ekipman	Marka-Model
Hassas Terazı	Shimadzu AUW220D
Güç Kaynağı	EC 250-90
Elektroforez Tankı	Cleaver Scientific CSL COM-40
Su Banyosu	Nüve BM-302
Santrifüj	Nüve CN-180
İnkübatör	Leec
Işık Mikroskobu	Olympus
Flüoresan Mikroskop	BAB
Buzdolabı	VESTEL
Derin Dondurucu	VESTEL
Mikropipet	EPPENDORF
Petri Kapları	TPP
pH metre	NELL
Vortex	VELP
Lineer Akselatör	SIEMENS MD2 (6 MV FOTON)
Besiyeri tüpleri	BD Falcon
Cam malzemeler	
Isıtıcı Karıştırıcı	CHILTERN
Flowkabin	
Enjektör	
Eppendorf tüpleri	
Hemasitometre	Webber S.I.
Cam Pastör Pipetleri	
Falcon Tüp	BD
Lam, Lamel	LAMTEK

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma	Katalog No:
NaCl (Sodyum Klorür)	MERCK	106404
NaOH(SodyumHidroksil)	MERCK	106482
Agaroz	MERCK	101236
HCL (Hidroklorik asit)	MERCK	100314
Trisma Base	SİGMA	T1503
Triton X-100	SİGMA	T8787
DMSO	SİGMA	D5879
Agaroz,Low Melting	SİGMA	A9414
Sitokalsin B	SİGMA	C6762
Histopaque 1077	SİGMA	H8889
Tyrpan Blue	SİGMA	T8154
EtBr (Etidium Bromid)	SİGMA	E8751
Nevparin	MUSTAFA NEVZAT	
RPMI Medium	SİGMA	R8758
Penicilin-Streptomycin	SİGMA	P0781
Fetal Calf Serum	SİGMA	F9665
Phytohemagglutinin-A	SİGMA	L8754
L-Glutamine	SİGMA	G7513
Dulbecco's PBS	SİGMA	D5652
Na ₂ EDTA	SİGMA	E5134
Mutlak Etanol	GURUP DELTALAR	
Mitomycin C	SİGMA	M0503
Vanillik Asit	ALDRİCH	H3600
KCL(Potasyum Klorür)	MERCK	104936
CH ₃ OH (Metanol)	MERCK	106008
CH ₃ COOH (Asetik asit)	MERCK	100063
Giemsa	MERCK	109204
Na ₂ HPO ₄ (DiSodyumfosfat)	MERCK	106586
KH ₂ PO ₄ (DiPotasyumfosfat)	MERCK	104871

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Besiyerinin Hazırlanışı:

15cc Fetal calf serum

2cc L-Glutamin

0,5cc Penicilin, streptomycin

2,5cc Phytohemagglutinin

Karışım, RPMI-1640 ile 100cc'ye tamamlanır. Karışım steril Flow'da hazırlanır ve steril besiyeri tüplerine 5cc dağıtılır.

Fizyolojik serum hazırlanışı:

0.9 gr NaCl tartılır ve 100ml distile su da çözülür.

PBS çözeltisi hazırlanışı:

0.48 gr Dulbecco Phosphate Buffer Saline tartılır, 50 ml distile suda çözülür.

Boya Tamponu hazırlanışı:

56 ml Na₂HPO₄

44 ml KH₂PO₄ 100 ml tampon karışımı hazırlanıp, 5 ml'lik Giemsa üzerine total hacim 100 ml olacak şekilde eklenir.

Lizis Tamponu hazırlanışı:

2.5 M NaCl: 29.22gr NaCl tartılır.

100 mM Na₂EDTA: 7.4448 gr Na₂EDTA tartılır.

10 mM Tris: 0.2422 gr Trisma Base tartılır.

Tartılan kimyasallar ısıtmadan 178 ml distile su da çözülür. pH NaOH veya HCL kullanılarak 10' a ayarlanır. Lizis işleminden yarım saat önce bu çözeltiye 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO eklenir.

Yürütme tamponu hazırlanışı:

0.747 gr Na₂EDTA ve 24gr NaOH tartılır ve 2 lt distile su ile çözülür. pH>13 olacak şekilde tampon hazırlanır. Buzdolabında + 4°C de saklanır.

Nötralizasyon tamponu hazırlanışı:

4.8456 gr Trisma Base tartılır ve 100 ml distile suda çözülür. Çözeltinin pH=7.5 olacak şekilde HCL veya NaOH kullanılarak pH ayarlanır. Bu çözelti yürütme işlemi sonrası taze hazırlanır.

Fiksasyon tamponu hazırlanışı:

100 ml absöü etanol kullanılır.

Boyama solüsyonu:

20 gr/ml EtBr ile hazırlanır.

Lamlar için Agaroj jel hazırlanışı:

0.65 gr agaroj tartılır ve 100ml distile suda ısıtılarak çözülür.

Hücreler için Low Melting Agaroj jel hazırlanışı:

0.065 gr Agaroj Low Melting (LMA) tartılır ve ısıtılarak 10 ml distile suda çözülür.

%5 DMSO çözeltisinin hazırlanışı:

0.5 ml DMSO ile 10 ml distile su karıştırılır.

Vanillik Asit çözeltisinin hazırlanışı:

0.00036 gr vanillik asit tartılır ve 1.5 ml %5'lik DMSO çözeltisinde çözülerek stok hazırlanır.

Değişik konsantrasyonlardaki vanillik asit dozları şöyle belirlenir:

1 µg/ml vanillik asit dozu için, 25 µl vanillik asit ile 6 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

2 µg/ml vanillik asit dozu için, 50µl vanillik asit ile 6 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır.

Mitomisin C çözeltilisinin hazırlanışı:

0,001 gr mitomisin C tartılır ve 4 ml DMSO çözeltilisi ile çözülerek stok hazırlanır.

Stok çözeltiliden 0.1 ml alınarak 5 ml' lik DMSO çözeltilisinde çözülür. Bu karışımdan 0.3 ml mitomisin C alınarak 6 ml lenfosit solüsyonu karıştırılır. Böylece 0.25 µg/ml konsantrasyonda mitomisin C dozu elde edilmiştir.

MN testi için Fiksatif hazırlanışı :

60 ml metanol (CH₃OH) buzdolabında difrizde saklanır.

20 ml asetik asit (CH₃COOH) ise dışarda saklanır, karıştırılarak 1:3 oranında fiksatif hazırlanır.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması:

56 ml Na₂HPO₄, 44 ml KH₂PO₄ ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır. Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kağıtları ile süzölmüştür. Kurduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak buya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 15 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyanın içinden çıkarılmış, saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra praparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kurduktan sonra mikroskopik inceleme yapılmıştır.

3.2. Yöntem

İn vitro COMET ve İn vitro mikronükleus testi kullanılmıştır.

3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi:

Her donör için 6 tane çalışma grubu belirlenmiştir. Deneyler duplike yapılmıştır. Gruplar şu şekildedir:

Çalışmamızda, DMSO kontrol, oksidatif hasar oluşturduğu bilinen kimyasal ajan olarak mitomycin-C ve oksidan özelliği tam olarak bilinmeyen vanillik asit seçilmiştir. Literatürde mitomycin-C nin hasar oluşturduğu ve toksik olmayan dozu 0,25 µg/ml olarak belirlendiğinden çalışmada bu doz kullanılmıştır.

Vanillik asidin, toksik olmayan ve MMC'nin hasarını azaltan dozları kullanılmıştır. Bunun için, vanillik asidin 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml ve 4 µg/ml'lik dozları ile çalışılmıştır. Vanillik asidin 0.5 µg/ml'lik dozu MMC' nin hasarını azaltmadığı, 4 µg/ml' lik dozu ise toksik etki yaptığı için çalışmaya bu dozlar ile devam edilmemiştir. Çalışmamızda vanillik asidin 1 ve 2 µg/ml'lik dozları kullanılmıştır.

Kontrol grupları :

DMSO Kontrol

Tek başına Maddelerin Dozları :

1 µg/ml vanillik asit

2 µg/ml vanillik asit

0.25 µg/ml mitomisin C

Mitomisin C ve Fenolik Kombine Dozları :

0.25 µg/ml mitomisin C + 1 µg/ml vanillik asit

0.25 µg/ml mitomisin C + 2 µg/ml vanillik asit

Bireylerin Seçimi:

Araştırma grubu gönörleri, 22-31 yaş arasında değişen, hiç sigara kullanmayan, son 1 ay içinde antibiyotik kullanmamış ve radyasyona maruz kalmamış, kalıtsal hastalığı bulunmayan 2 erkek 2 bayan bireyden oluşmaktadır. Deney grubunun yaş ortalaması 25.75 ± 4.5 tir.

Kan Örneklerinin Alınması:

Kan örnekleri bireylerden heparinize olarak, vakumlu kuru tüplere alınmıştır. Her bireyden 6 ml kan alınmıştır.

3.2.2. Mikronükleus Testi Prosedürü

1. Kan Lenfosit Kültürlerinin Hazırlanışı

15cc Fetal calf serum, 2cc L-Glutamin, 0,5cc Penicilin, Streptomycin, 2,5cc Phytohemagglutin karışımı RPMI-1640 ile 100cc'ye tamamlanır. Karışım steril Flow'da hazırlanır ve steril besiyeri tüplerine 5cc dağıtılır.

Her muamele için, 1 ml heparinli kan, hazırlanan 5cc lik kültür ortamına aktarılır. Hazırlanan kültürler 37 derecede 72 saat süreyle inkube edileceklerdir.

Mikronükleus oluşumu:

Çeşitli yollarla ortaya çıkan genotoksik etkiler sonucunda hücre bölünmesinin metafaz evresinde gözlenebilen kromozomlardaki kırık parçalar ya da tam iğ ipliğine bağlanamayan tam kromozomlar, anafaz evresinde kutuplara çekilemezler.

Bu nedenle ortada kalan tam kromozom ve kromozom parçaları hücre bölünmesinin son safhalarında yani telofaz evresinde ana nükleus içerisine dahil olamazlar.

İşte bu yapılar hücre bölünmesi sonunda ana nükleusu oluşturacak diğer kromozomlar ile tekrar kromatin hale döndüklerinde, sitokinez (sitoplazma bölünmesi) ile birlikte oluşan kardeş hücrelerden birinde ana nükleus yanında ikinci bir küçük nükleus (mikronükleus) halinde kendilerini gösterirler.

İnsanlarda mikronükleus testi temel olarak çekirdekli kan hücreleri olan lenfositler üzerinde uygulanır. Genel mikronükleus sayım kriterleri geçerli olmakla birlikte, insan kan dokusunun in vitro olarak kültüre edilmesi ile yürütülen MN testindeki metodolojik yaklaşımda önemli bir farklılık vardır. Bu metodolojik farklılık, küf mantarlarının metabolitlerinden bir olan Sitokalazin-B (Cyt - B) ile mitoz geçiren hücreleri sitokinez aşamasında durdurma esasına dayanmaktadır.

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, ilk nükleus bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş olan binükleuslu (BN) hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve bunlar arasında MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (Sitokinez bloke MN testi).

2. Mikronükleus (MN) Sayısını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması:

Sağlıklı insanlardan alınan periferik kandan 1 ml, 5 ml kromozom medyumuna ekilir ve hücreler 37 °C'de 72 saat süresince inkübe edilirler.

İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilir ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenir.

48. saatte kimyasalların farklı konsantrasyonları ve kontrollerinin yazılı olduğu her tüpe ilgili maddelerin miktarları ilave edilir. % 5' lik DMSO kontrol, 1 µg/ml ve 2 µg/ml dozlarda vanillik asit, 0.25 µg/ml dozda Mitomisin C, 6 ml' lik kendi tüplerine ilave edilir.

İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. Santrifüj edilerek süpernatant atılır ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (0,075 M lık KCl) ilave edildikten sonra tüpler direkt olarak santrifüje alınırlar.

Kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir ve süpernatant atılarak ilk fiksatif (3:1 Metanol, Asetik Asit) ilave edilir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında belli aralıklarla vorteks yapılarak, 15 dakika bekletildikten sonra 1200 rpm'de 10 dk. daha santrifüj edilen tüplere iki kez asetik asit/ metanol (1/3) ilavesi yapıp 20 dakika daha oda sıcaklığında bekletilir.

Daha sonra tekrar santrifüj yapıp, dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilir. Daha sonra, bu hücre süspansiyonu temizlenmiş ve buzdolabında saklana lamın üzerine farklı alanlara yaklaşık olarak 10 cm yükseklikten 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanır.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere bekletilmiştir.

2. Preparatların Boyanması:

Hazırlanan preparatlar tampon karışımı ile hazırlanmış % 5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır.

3. Mikroskopik İnceleme:

Hazırlanmış olan daimi preparatlar ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 iki nukleuslu hücre sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır.

Toplam mikronukleus sayısının incelenen iki nukleuslu hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen mikronukleus sayısı (MN/hücre) hesaplanır. Bunradan da % MN oranı belirlenir.

Ayrıca kimyasalların nukleus bölünmesi üzerindeki etkisini saptamak için Nukleus Bölünme İndeksi saptanmıştır. Nukleus Bölünme İndeksini (NBI) bulmak için 2000 hücre incelenmiş, bu hücreler içerisinde 1, 2, 3 ve 4 nukleuslu hücreler saptanmıştır.

$NBI = \frac{1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4}{N}$ formülüne göre NBI bulunmuştur.

N1 : 1 nukleuslu hücre sayısı

N2 : 2 nukleuslu hücre sayısı

N3 : 3 nukleuslu hücre sayısı

N4 : 4 nukleuslu hücre sayısı

3.2.3. COMET Testi Prosedürü

Lenfosit İzolasyonu

1. Heparinize olarak alınan kan, 5 er ml olarak steril tüplere bölüştürülür.
2. Kan, taze hazırlanan serum fizyolojik tamponu ile 1:1 oranına sulandırılır ve karıştırılır.
3. Ayrı steril tüplere 2 ml Histopaque 1077 alınır. Daha sonra kan ve serum fizyolojik tamponu içinde Histopaque 1077 bulunan tüplere yavaşça aktarılır.
4. Aktarımdan sonra tüpler hemen 15dk 1500 rpm de santrifüj edilir.
5. Santrifüj ardından tüplerde oluşan tabakalardan, lenfosit içerenler tabaka pipet yardımıyla boş tüplere aktarılır.
6. Aktarılan lenfosit süspansiyonu serum fizyolojik tamponu ile 5 ml ye tamamlanır ve 1500 rpm de 10 dk çevrilir. Bu yıkama işlemidir bu işlemle ortamdaki lenfosit dışındaki maddeler uzaklaştırılır. Bu işlem ortamda sadece lenfositler kalana kadar tekrarlanır.
7. En sonuncu yıkama işleminden sonra serum fizyolojik tamponu ortamdan uzaklaştırılır.
8. Lenfositler besiyerlerine ekilmek için RPMI-1640 ile sulandırılır. Her tüpe 5 er ml RPMI-1640 eklenir. Daha sonra karıştırma işlemi yapılır ve daha önceden lenfositler hazırlanan besiyerlerine ekilir. Ayrı bir eppendorf tüpüne 100µl lenfosit alınır ve Tyrpan Blue testi yapılır.

Trypan Blue ile canlılık testi: Bu teste çekilen süspansiyon 1:1 oranında tyrpan blue boyası ile seyreltilir ve bu seyreltilen sıvıdan 100 µl alınıp hemasitometreye yayılır ve ışık mikroskopu altında yaşayan hücreler sayılır.

9. Bu aşamaya kadar ki tüm işlemler (Tyrpan Blue ve santrifüj işlemi hariç) steril flow kabin içerisinde yapılır. Tüpler daha sonra 37°C de 48 saat inkübe edilir.
10. 48. saatte kimyasalların farklı konsantrasyonları ve kontrollerinin yazılı olduğu her tüpe ilgili maddelerin miktarları ilave edilir. % 5' lik DMSO kontrol, 1 µg/ml ve 2 µg/ml dozlarda Vanilik asit, 0.25 µg/ml dozda Mitomisin C, 6 ml' lik kendi tüplerine ilave edilir.

Lamların Agaroz Jel ile Kaplanması:

Mikroskop lamları, kendileri için hazırlanan agaroz jel içine daldırılıp 30 sn bekletilir. Daha sonra da çıkarılıp altları temizlenip kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra hangi bireye ait oldukları ve hangi çalışma grubuna dâhil oldukları üzerlerine yazılır.

1. Bu aşamada kullanılan bütün solüsyonlar soğuktur. Bu prosedür loş ışıkta gerçekleştirilmiştir. Pellet olarak kalan lenfositler 1 ml PBS ile seyreltilir ve iyice karıştırılır.
2. Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktası olan agaroz (LMA) kullanılarak jel hazırlanır. 0.065 gr LMA tartılır ve 10 ml distile su içinde ısıtarak jel haline getirilir.
3. Daha sonra 10 ml lik jelden, eppendorf tüplerine 250 şer µl aktarılır. Bu eppendorf tüpleri 37°C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilir.
4. Seyreltilen lenfosit pelletlerinden 80 µl çekilir, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılır. Jel ve lenfosit süspansiyonu iyice pipet yoluyla karıştırılır.
5. Karıştırılan jel ve lenfosit karışımından 100 µl çekilir ve lam üzerine yayılır. Her çalışma grubu kendi lamının üzerine yayılır.
6. Üzerine karışım koyulan lamlar hemen lamelle kapatılır ve buz üzerine kaldırılır.
7. Yayma işlemi bittikten sonra lamlar 15 dakika +4°C de bekletilir.
8. 15 dakika sonra lamlar alınır ve lameller çıkarılır.
9. Lizis işlemi başlatılır. Lamelleri çıkmış olan lamlar şalelere dizilir ve lizis solüsyonuna daldırılır. Lamlar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4°C de bekletilir.
10. Ertesi gün lamlar lizis solüsyonundan çıkarılır ve komet tankına dizilir.
11. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulur ve lamlar 20 dk yürütme tamponu içinde bekletilir. Bu aşamada DNA sarmalları açılır.
12. 20 dakika sonunda yürütme işlemi başlar. Yürütme işlemi buz üzerinde gerçekleştirilir. Yürütme işlemi 300mA, 25V, yarım saat boyunca yürütülür.

13. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanklardan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna daldırılır ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde bekletilir. Nötralizasyon işlemi karanlıkta gerçekleşir.
14. Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp distile suya daldırılıp yıkanır ve kuruması beklenir.
15. Kuruduktan sonra lamalar absöü etanol içinde 5 dakika fikse edilir.

Boyama İşlemi

EtBr ile hazırlanan boya solüsyonundan enjektör ile 0.2 ml çekilir ve lamlara damlatılır. Boya damlatıldıktan sonra lamalar lamellerle kapatılıp, mikroskopik inceleme için hazırlanır.

Mikrosobik İnceleme

Sayım ve değerlendirme safhalarında flüoresan mikroskop kullanılır. Boyanılan lamlara mikroskopta bakılır ve her lamdan 100 tane hücre sayılır. Değerlendirme yöntemi olarak görsel sayım yöntemi uygulanır. Hücreler hasarlarına göre komet tiplerine ayrılır. Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3, Tip 4 olarak kometler, DNA göçü oranlarına göre ayrılırlar. Tip 0 hasarsız hücre olarak kabul edilirken, Tip 4 ise en fazla kasar görmüş ve en büyük kuyruklu yıldızı oluşturan hücrelerdir. Ayrılan gruplardan genetik hasar indeksi (GHİ) ve % hasarlı hücre oranı hesaplanır.

$$GHİ = \frac{(1 * \sum Tip1) + (2 * \sum Tip2) + (3 * \sum Tip3) + (4 * \sum Tip4)}{(\sum Tip0 + \sum Tip1 + \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4)}$$

$$\% \text{ Hasarlı Hücre} = \frac{\sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4}{\sum Tip0 + \sum Tip1 + \sum Tip2 + \sum Tip3 + \sum Tip4}$$

İstatiksel Hesaplamalar:

Tüm istatistiksel analizler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey HSD testleri kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm analizler SPSS 11.5 bilgisayar programı ile yapıldı ve anlamlılık seviyesi $\alpha = 0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

COMET testini gerçekleştirebilmek için izole edilen lenfositlerin en az % 80 oranında canlı olmaları gerekmektedir. Bu sebeple trypan blue ile canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Bu testin sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

4.1. Trypan Blue ile Canlı Hücre Sayım Bulguları

Çizelge 4.1. Trypan Blue testi ile tüm donörlere ait canlı hücre sayımları sonuçları

	Canlı hücre	Ölü hücre	% Canlılık
DONOR1			
DMSO kontrol	436	34	92,8%
1 µg / ml Vanilikasit	248	12	95,4%
2 µg / ml Vanilikasit	328	38	89,6%
Mitomycin C	165	30	84,6%
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	360	40	90,0%
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	336	59	85,1%
DONOR2			
DMSO kontrol	135	24	84,9%
1 µg / ml Vanilikasit	86	7	92,5%
2 µg / ml Vanilikasit	88	17	83,8%
Mitomycin C	66	16	80,5%
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	95	18	84,1%
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	78	18	81,3%
DONOR3			
DMSO kontrol	596	79	88,3%
1 µg / ml Vanilikasit	564	69	89,1%
2 µg / ml Vanilikasit	346	49	87,5%
Mitomycin C	524	100	83,9%
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	524	72	87,9%
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	370	57	86,6%
DONOR4			
DMSO kontrol	65	10	86,7%
1 µg / ml Vanilikasit	105	12	89,7%
2 µg / ml Vanilikasit	115	23	83,3 %
Mitomycin C	198	49	80,2%
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	120	25	82,8%
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	178	40	81,7%

$$\% \text{Canlı Hücre} = \frac{(\text{toplam hücre sayısı} - \text{ölü hücre sayısı}) \times 100}{\text{toplam hücre sayısı}}$$

$$1 \text{ ml hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times 10 \text{ (mm}^3 \text{ cevirmek içindir)} \times 100 \times 10 \text{ml}$$

$$1 \text{ ml hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times 10.000$$

4.2. Mikronukleus Testinden Elde Edilen Bulgular

Negatif kontrol olarak kullandığımız DMSO dozu ile (%5'lik) 1 ve 2 µg/ml' lik vanillik asit dozlarının oluşturduğu MN sonuçları tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$).

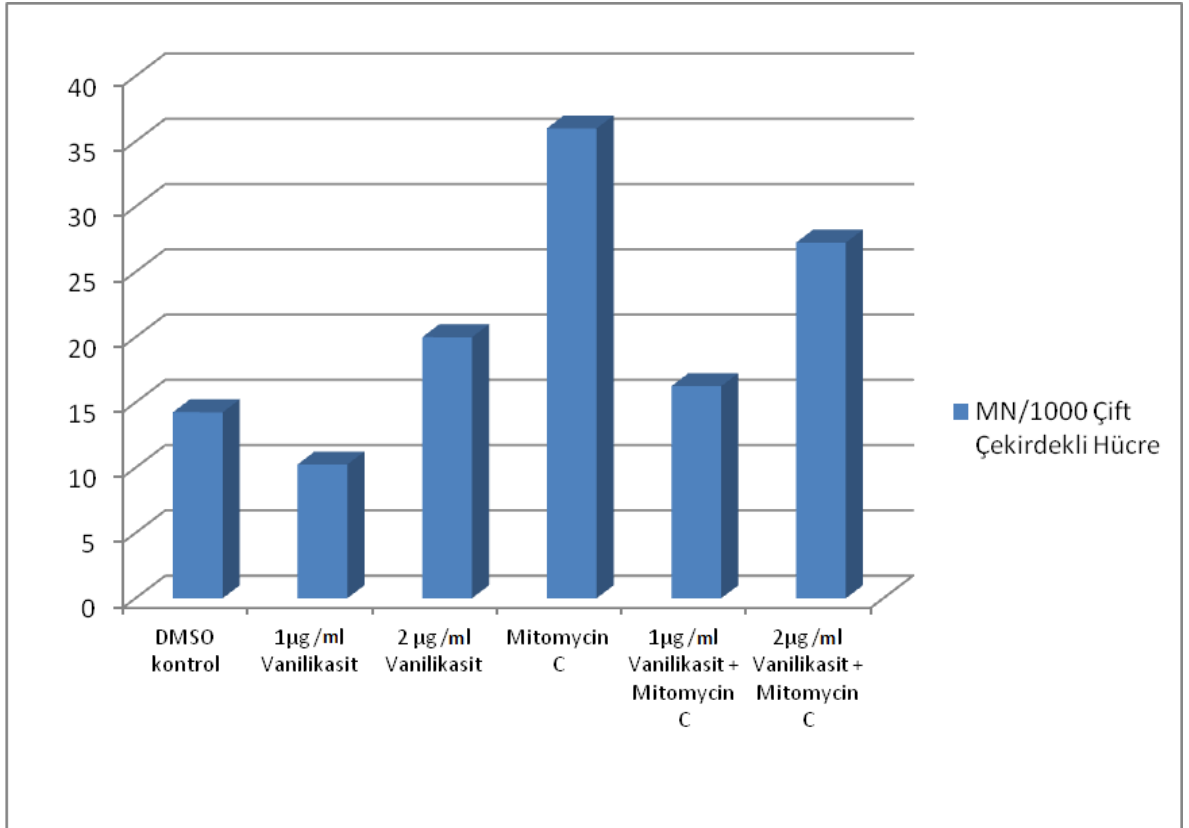
İkili karşılaştırmalar için Tukey HSD testi uygulandığında 1 µg/ml dozda vanillik asit DMSO ile karşılaştırıldığında MN frekansında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık oluşturmamıştır ($p>0,05$). 2 µg/ml vanillik asit ise DMSO' ya oranla MN frekansını istatistiksel anlamlı arttırmıştır ($p<0,05$). Vanillik asidin 2 µg/ml'lik dozu 1 µg/ml Vanillik asitin oluşturduğu MN frekansını da anlamlı arttırmıştır ($p<0,005$).

Negatif kontrol DMSO, tek başına MMC ile MMC + 1 µg/ml vanillik asit ve MMC + 2 µg/ml vanillik asidin kombine dozları kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında MN frekansı açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p<0,001$).

Tukey HSD testi ile bu gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Buna göre DMSO ile oluşturulan MN frekansına göre MMC muamelesi sonucu oluşan MN frekansının istatistiksel anlamda yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). DMSO ile MMC + 1 µg/ml vanillik asit muamelesiyle oluşturulan MN frekansları karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). MMC + 2 µg/ml lik vanillik asit dozu DMSO ya oranla MN frekansını anlamlı arttırmıştır ($p<0,005$).

Tukey HSD testine göre MMC + 1 µg/ml vanillik asit kombine dozuyla muamele sonucu oluşan MN frekansının MMC'nin tek başına oluşturduğu MN frekansından anlamlı düşük olduğu gözlenmiştir (p< 0,001).

MMC + 2 µg/ml vanillik asit kombine dozunun ise MMC'nin oluşturduğu MN frekansını daha düşük anlamlılık seviyesinde azalttığı belirlenmiştir (p<0,05). MMC ile kombine edilen 2 µg/ml lik vanillik asit MMC + 1 µg/ml vanillik asit dozuna göre daha yüksek oranda MN oluşturmuştur ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,005). Tüm donörlere ait MN frekansı ortalama değerleri, şekil 4.1'de gösterilmiştir.



MN; Mikronükleus, DMSO; Dimetil sülfoksit

Şekil 4.1. Tüm gruplara ait MN frekansı ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

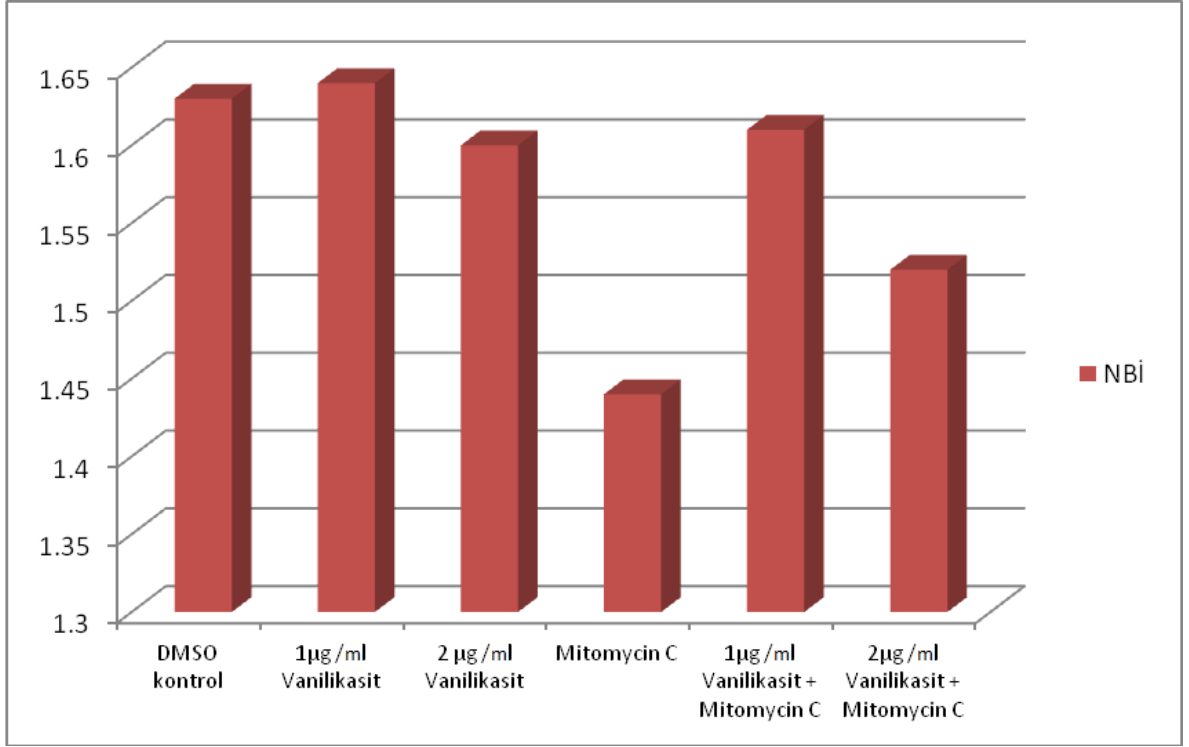
DMSO, 1 µg/ml ve 2 µg/ml dozlarda vanillik asidin oluşturdukları Nükleer Bölünme İndeksi oranlarının kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırması sonucunda tüm gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

DMSO, MMC, MMC + 1 µg/ml vanillik asit ve MMC + 2 µg/ml vanillik asidin oluşturdukları Nükleer Bölünme İndeksi oranlarını yine tek yönlü varyans analizi ile kendi aralarında karşılaştırdığımızda tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmıştır ($p< 0,001$).

Tukey HSD testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldığında, DMSO ile muamele sonucunda oluşan Nükleer Bölünme İndeksi oranının MMC ile oluşandan anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). MMC + 1 µg/ml vanillik asit Nükleer Bölünme İndeksi oranını DMSO kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak değiştirmezken ($p>0,05$), MMC + 2 µg/ml vanillik asit kombine muamelesi sonucunda Nükleer Bölünme İndeksi oranı DMSO kontrolden istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

Tek başına MMC' nin oluşturduğu Nükleer Bölünme İndeksi ile karşılaştırıldığında MMC + 1 µg/ml vanillik asit ile muamele sonucunda oluşan Nükleer Bölünme İndeksi istatistiksel olarak anlamlı yüksek gözlenmiştir ($p<0,001$). Aynı zamanda tek başına MMC'nin oluşturduğu Nükleer Bölünme İndeksinin oranına göre MMC + 2 µg/ml vanillik asit ile oluşturulan Nükleer Bölünme İndeksi oranının istatistiksel anlamda yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). İki kombine doz Nükleer Bölünme indeksi bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında MMC + 2 µg/ml vanillik asit dozunun Nükleer Bölünme İndeksini MMC + 1 µg/ml vanillik asit dozuyla oluşan Nükleer Bölüne İndeksine göre istatistiksel anlamda düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0,005$).

Tüm donörlere ait Nükleer Bölünme İndeksi ortalama değerleri şekil 4.2.' de gösterilmiştir.



NBI; Nükleer Bölünme İndeksi, DMSO; Dimetil sülfoksit

Şekil 4.2. Tüm gruplara ait Nükleer Bölünme İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

Tüm dozların neden olduğu MN frekansı ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) değerleri donör 1 ve 2 ile donör 3 ve 4 için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.2, 4.3' de gösterilmiştir. MN testi ile elde edilen tüm donörlere ait verilerin özet bulguları ise çizelge 4.4' de belirtilmiştir. Tüm donörlere ait MN frekansı ve Nükleer Bölünme İndekslerinin istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları çizelge 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. MN testi sonucunda 1. Donör ve 2. Donör için elde edilen veriler

	NBİ	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	İki Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Çok Çekirdekli Hücre
DONÖR 1						
DMSO kontrol	1.647	11	796	1006	96	102
1 µg / ml Vanilikasit	1.685	7	828	961	91	120
2 µg / ml Vanilikasit	1.632	18	785	1024	94	97
Mitomycin C	1.4675	32	580	1280	65	75
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.6420	14	790	1013	97	100
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.550	22	668	1160	84	88
DONÖR 2						
DMSO kontrol	1.6295	13	788	1024	93	95
1 µg / ml Vanilikasit	1.649	10	800	1004	90	106
2 µg / ml Vanilikasit	1.619	19	779	1038	90	93
Mitomycin C	1.4605	34	563	1295	68	74
1 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.6255	16	782	1032	89	97
2 µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.5395	25	658	1175	80	87

DMSO; Dimetil sülfoksit, NBİ; Nükleer bölünme indeksi

Çizelge 4.3. MN testi sonucunda 3. Donör ve 4. Donör için elde edilen veriler

	NBI	Mikronukleus / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	İki Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Çok Çekirdekli Hücre
DONÖR 3						
DMSO kontrol	1.607	16	773	1051	87	89
1µg / ml Vanilikasit	1.6305	11	791	1024	85	100
2 µg / ml Vanilikasit	1.5975	20	762	1064	89	85
Mitomycin C	1.4265	38	548	1332	55	65
1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.6025	16	768	1057	88	87
2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.5145	30	640	1207	70	83
DONÖR 4						
DMSO kontrol	1.593	17	770	1064	82	84
1µg / ml Vanilikasit	1.6135	13	785	1041	80	94
2 µg /ml Vanilikasit	1.575	23	754	1088	78	80
Mitomycin C	1.407	40	526	1360	54	60
1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.5855	19	765	1072	83	80
2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	1.4845	32	629	1236	65	70

DMSO; Dimetil sülfoksit, NBI; Nükleer bölünme indeksi

Çizelge 4.4. MN testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları

Çalışma Grupları	Değerlendirilen Hücre Sayısı	İki Çekirdekli Hücre	Tek Çekirdekli Hücre	Üç Çekirdekli Hücre	Çok Çekirdekli Hücre	MN / 1000 Çift Çekirdekli Hücre	NBİ
DMSO kontrol	8000	781.75 ± 12.33	1036.25 ± 26.16	89.50 ± 6.24	92.50 ± 7.77	14.25 ± 2.75	1.63 ± 0.24
1µg / ml Vanilikasit	8000	801.00 ± 19.03	1007.50 ± 34.49	86.50 ± 5.07	105.00 ± 11.13	10.25 ± 2.50	1.64 ± 0.31
2 µg / ml Vanilikasit	8000	770.00 ± 14.44	1053.50 ± 28.35	87.75 ± 6.85	88.75 ± 7.77	20.00 ± 2.16	1.60 ± 0.25
Mitomycin C	8000	554.25 ± 22.93	1316.75 ± 36.18	60.50 ± 7.05	68.50 ± 7.23	36.00 ± 3.65	1.44 ± 0.29
1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	8000	776.25 ± 11.79	1043.50 ± 26.18	89.25 ± 5.79	91.00 ± 9.20	16.25 ± 2.06	1.61 ± 0.25
2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	8000	648.75 ± 17.54	1194.50 ± 33.91	74.75 ± 8.77	82.00 ± 8.29	27.25 ± 4.57	1.52 ± 0.29

DMSO; Dimetil sülfoksit, NBİ; Nükleer bölünme indeksi, MN; Mikronükleus

Çizelge 4.5. MN testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	P Değeri	Farkların istatistiksel anlamlılığı
MN		
DMSO - 1 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO - 2 µg / ml V.A	P<0.05	Anlamlı
1 µg / ml V.A - 2 µg / ml V.A	P<0.005	Anlamlı
DMSO – MMC	P<0.001	Anlamlı
DMSO - MMC + 1 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.005	Anlamlı
MMC - MMC + 1 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.05	Anlamlı
MMC + 1 µg / ml V.A - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.005	Anlamlı
NBI		
DMSO - 1 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO - 2 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
1 µg / ml V.A - 2 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO – MMC	P<0.001	Anlamlı
DMSO - MMC + 1 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC - MMC + 1 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.01	Anlamlı
MMC + 1 µg / ml V.A - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.005	Anlamlı

DMSO; Dimetil sülfoksit, NBI; Nükleer bölünme indeksi, MN; Mikronükleus, MMC; Mitomisin C, V.A; Vanillik asit

4.3. COMET Testinden Elde Edilen Bulgular

DMSO kontrol, 1 µg/ml vanillik asit ve 2 µg/ml vanillik asit dozlarında belirlenen Genetik Hasar İndeksi oranı kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$).

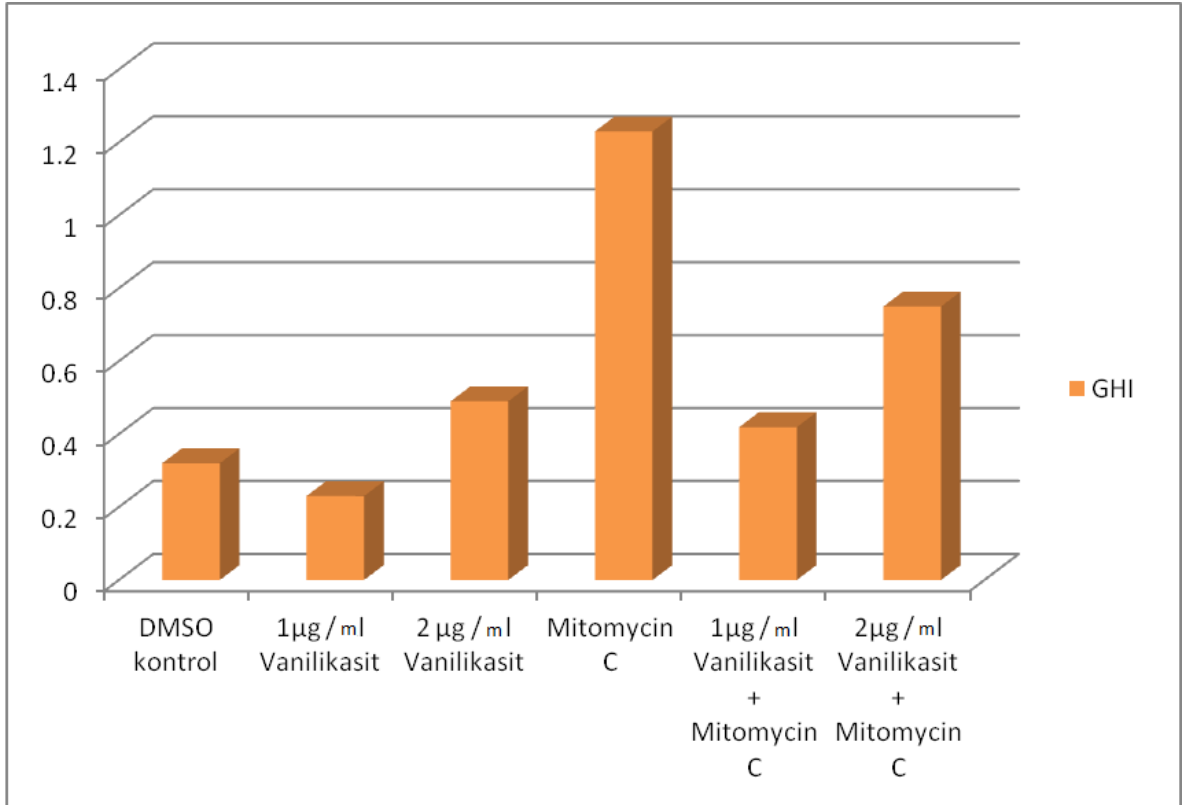
Tukey HSD testi kullanarak ikili karşılaştırmalar yaptığımızda DMSO ile indüklenen Genetik Hasar İndeksinin 1 µg/ml vanillik asitle indüklenenden anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 2 µg/ml vanillik asitle belirlenen Genetik Hasar İndeksi oranının DMSO ile karşılaştırıldığında anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,001$). 2 µg/ml vanillik asitle indüklenen Genetik Hasar İndeksinin de yine 1 µg/ml'lik vanillik asit muamelesiyle belirlenen Genetik Hasar İndeksinden anlamlı yüksek olduğu ortaya konmuştur ($p<0,001$).

Negatif kontrol DMSO, tek başına MMC ile MMC + 1 µg/ml vanillik asit ve MMC + 2 µg/ml vanillik asidin kombine dozları kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında Genetik Hasar İndeksi bakımından istatistiksel anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p<0,001$).

Bu gruplar arasında Tukey HSD testi ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda DMSO ile karşılaştırıldığında MMC'nin Genetik Hasar İndeksini istatistiksel anlamı düzeyde arttırdığı gözlenmiştir ($p< 0,001$). MMC + 1 µg/ml vanillik asit Genetik Hasar İndeksi oranını DMSO kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak değiştirmezken ($p>0,05$), MMC + 2 µg/ml vanillik asit kombine muamelesi sonucunda Genetik Hasar İndeksi oranı DMSO kontrolden istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Tek başına MMC' nin oluşturduğu Genetik Hasar İndeksi ile karşılaştırıldığında MMC + 1 µg/ml vanillik asit ile muamele sonucunda oluşan Genetik Hasar İndeksinin istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu gözlenmiştir (p<0,001). Aynı zamanda tek başına MMC' nin oluşturduğu Genetik Hasar İndeksinin oranının MMC + 2 µg/ml vanillik asit ile oluşturulan Genetik Hasar İndeksi oranından istatistiksel anlamda yüksek olduğu bulunmuştur (p<0,001). İki kombine doz Genetik Hasar İndeksi bakımından kendi aralarında karşılaştırıldığında MMC + 2 µg/ml vanillik asit dozunun oluşturduğu Genetik Hasar İndeksinin MMC + 1 µg/ml vanillik asit dozuyla oluşan Genetik Hasar İndeksine göre istatistiksel anlamda yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeksi ortalama değerleri, şekil 4.3' de gösterilmiştir.



GHI; Genetik Hasar İndeksi, DMSO; Dimetil sülfoksit

Şekil 4.3. Tüm gruplara ait Genetik Hasar İndeksi ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

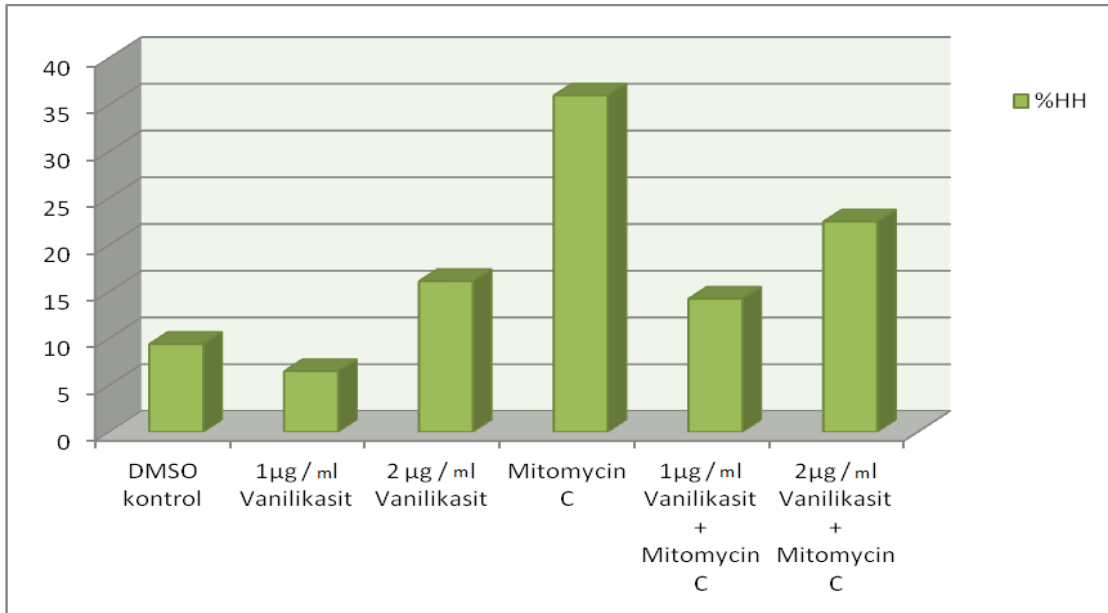
COMET testinden elde edilen bulgulardan % Hasarlı Hücre oranlarını, DMSO kontrol, 1 µg/ml ve 2 µg/ml vanillik asit muamele gruplarında kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0,0001$). Tukey HSD testi ile yapılan ikili karşılaştırmalarda ise DMSO ya göre 1 µg/ml vanillik asit dozunun % Hasarlı Hücre oranını istatistiksel anlamda azalttığı, 2 µg/ml vanillik asit dozunun ise DMSO ya göre istatistiksel anlamlı oranda % Hasarlı Hücre oranını arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,001$). 2 µg/ml vanillik asidin % Hasarlı Hücre oranı, 1 µg/ml'lik vanillik asit muamelesine göre belirlenen % Hasarlı Hücre oranından istatistiksel anlamlı yüksek olduğu ortaya konmuştur ($p<0,001$). % Hasarlı Hücre oranları bakımından DMSO kontrol, MMC, MMC + 1 µg/ml vanillik asit ve MMC + 2 µg/ml vanillik asit doz grupları kendi aralarında tek yönlü varyans analizi bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bakımdan anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0,001$).

Tukey HSD testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmalarda % Hasarlı Hücre oranının DMSO kontrole göre MMC ile muamelede anlamlı arttığı belirlenmiştir ($p<0,001$). DMSO kontrol ile MMC + 1 µg/ml vanillik asit karşılaştırıldığında % Hasarlı Hücre oranının DMSO kontrolden anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,005$). DMSO kontrole göre MMC + 2 µg/ml vanillik asit muamelesiyle % Hasarlı Hücre oranının istatistiksel anlamda daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Tek başına MMC ile MMC + 1 µg/ml vanillik asit dozları % Hasarlı Hücre oranı bakımından karşılaştırıldığında MMC + 1 µg/ml vanillik asidin % Hasarlı Hücre oranını oldukça anlamlı düzeyde azalttığı saptanmıştır ($p<0,001$).

MMC muamelesi ile elde edilen % Hasarlı Hücre oranının MMC + 2 µg/ml doz muamelesi ile de anlamlı azaldığı görülmüştür (p<0,001). MMC + 1 µg/ml vanillik asit muamelesi sonucunda gözlenen % Hasarlı Hücre oranı, MMC + 2 µg/ml vanillik asit muamelesi sonucunda elde edilen % Hasarlı Hücre oranına göre anlamlı düşük bulunmuştur (p<0,001).

Tüm donörlere ait % Hasarlı Hücre oranı ortalama değerleri, şekil 4.4’de gösterilmiştir.



%HH; % Hasarlı Hücre, DMSO; Dimetil sülfoksit

Şekil 4.4. Tüm gruplara ait % Hasarlı hücre ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

Tüm dozların neden olduğu Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve % Hasarlı Hücre (%HH) değerleri her donör için ayrı ayrı olmak üzere çizelge 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9’ de gösterilmiştir.

Tüm donörlere ait Genetik Hasar İndeksi ve % Hasarlı Hücre ortalama değerleri çizelge 4.10’ da gösterilmiştir. Genetik Hasar İndeksi (GHI) ve % hasarlı hücre (%HH)’ lerinin istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları çizelge 4.11’ da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. COMET testi sonucunda 1. Donör için elde edilen veriler

Donör	ÇALIŞMA GRUBU	Tekrar	DEĞERLENDİRİLEN HÜCRE SAYISI	HASARSIZ (NORMAL) HÜCRE SAYISI	TİP1	TİP2	TİP3	TİP4	GHI	%HH
1	DMSO Kontrol	A	100	88	5	3	2	2	0.25	7
		B	100	89	4	4	1	2	0.23	7
	1µ / ml Vanilikasit	A	100	91	5	2	1	1	0.16	4
		B	100	92	3	2	2	1	0.17	5
	2 µg / ml Vanilikasit	A	100	80	7	7	3	3	0.42	13
		B	100	79	9	7	2	3	0.41	12
	Mitomycin C	A	100	63	3	8	10	16	1.13	34
		B	100	64	3	5	10	18	1.15	33
	1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	82	6	8	1	3	0.37	12
		B	100	83	4	7	3	3	0.39	13
	2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	74	5	9	5	7	0.66	21
		B	100	75	6	7	6	6	0.62	19

DMSO; Dimetil sülfoksit, GHI; Genetik hasar indeksi, %HH; % Hasarlı hücre

Çizelge 4.7. COMET testi sonucunda 2. Donör için elde edilen veriler

Donör	ÇALIŞMA GRUBU	Tekrar	DEĞERLENDİRİLEN HÜCRE SAYISI	HASARSIZ (NORMAL) HÜCRE SAYISI	TİP1	TİP2	TİP3	TİP4	GHI	%HH
2	DMSO Kontrol	A	100	86	5	5	2	2	0.29	9
		B	100	85	7	3	3	2	0.30	8
	1µ / ml Vanilikasit	A	100	89	5	3	1	2	0.22	6
		B	100	90	3	4	2	1	0.21	7
	2 µg / ml Vanilikasit	A	100	80	4	9	3	4	0.47	16
		B	100	79	6	9	3	3	0.45	15
	Mitomycin C	A	100	62	4	5	12	17	1.18	34
		B	100	61	3	7	10	19	1.23	36
	1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	81	5	8	3	3	0.42	14
		B	100	80	6	9	2	3	0.39	14
	2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	74	6	6	8	6	0.66	20
		B	100	73	4	10	4	9	0.72	23

DMSO; Dimetil sülfoksit, GHI; Genetik hasar indeksi, %HH; % Hasarlı hücre

Çizelge 4.8. COMET testi sonucunda 3. Donör için elde edilen veriler

Donör	ÇALIŞMA GRUBU	Tekrar	DEĞERLENDİRİLEN HÜCRE SAYISI	HASARSIZ (NORMAL) HÜCRE SAYISI	TİP1	TİP2	TİP3	TİP4	GHI	%HH
3	DMSO Kontrol	A	100	84	7	2	4	3	0.35	9
		B	100	83	8	5	3	1	0.31	9
	1µ / ml Vanilikasit	A	100	88	5	3	3	1	0.24	7
		B	100	89	4	4	1	2	0.23	7
	2 µg / ml Vanilikasit	A	100	80	3	10	3	4	0.48	17
		B	100	78	5	9	6	2	0.49	17
	Mitomycin C	A	100	58	3	7	13	19	1.32	39
		B	100	59	6	9	8	18	1.20	35
	1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	83	2	10	1	4	0.41	15
		B	100	82	5	6	4	3	0.41	13
	2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	70	6	4	12	8	0.82	24
		B	100	72	7	5	6	10	0.75	21

DMSO; Dimetil sülfoksit, GHI; Genetik hasar indeksi, %HH; % Hasarlı hücre

Çizelge 4.9. COMET testi sonucunda 4. Donör için elde edilen veriler

Donör	ÇALIŞMA GRUBU	Tekrar	DEĞERLENDİRİLEN HÜCRE SAYISI	HASARSIZ (NORMAL) HÜCRE SAYISI	TİP1	TİP2	TİP3	TİP4	GHI	%HH
4	DMSO Kontrol	A	100	85	2	7	2	4	0.38	13
		B	100	82	5	6	2	5	0.43	13
	1µ / ml Vanilikasit	A	100	84	8	5	1	2	0.29	8
		B	100	86	6	4	2	2	0.28	8
	2 µg / ml Vanilikasit	A	100	79	2	9	5	5	0.55	19
		B	100	74	6	11	4	5	0.60	20
	Mitomycin C	A	100	57	3	9	10	21	1.35	40
		B	100	58	5	10	5	22	1.28	37
	1µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	78	6	8	4	4	0.50	16
		B	100	82	1	9	5	3	0.46	17
	2µg / ml Vanilikasit + Mitomycin C	A	100	68	5	7	6	14	0.93	27
		B	100	70	7	4	7	12	0.84	23

DMSO; Dimetil sülfoksit, GHI; Genetik hasar indeksi, %HH; % Hasarlı hücre

Çizelge 4.10. COMET testi ile elde edilen tüm Donörlere ait verilerin özet bulguları

Çalışma Grupları	Tekrar	Değerlendirilen Hücre Sayısı	Hasarsız (Normal) Hücre Sayısı	TİP 1	TİP 2	TİP 3	TİP 4	GHI	% HH
DMSO kontrol	A	400	85.75 ± 1.71	4.75 ± 2.06	4.25 ± 2.21	2.5 ± 1.00	2.75 ± 0.96	0.32 ± 0.06	9.50 ± 2.52
	B	400	84.75 ± 3.09	6.00 ± 1.82	4.50 ± 1.29	2.25 ± 0.96	2.50 ± 1.73	0.32 ± 0.08	9.25 ± 2.63
1µg / ml Vanilik asit	A	400	88.00 ± 2.94	5.75 ± 1.50	3.25 ± 1.26	1.5 ± 1	1.50 ± 0.60	0.23 ± 0.05	6.25 ± 1.71
	B	400	89.25 ± 2.50	4.00 ± 1.41	3.50 ± 1.00	1.75 ± 0.5	1.50 ± 0.60	0.22 ± 0.04	6.75 ± 1.26
2 µg / ml Vanilik asit	A	400	79.75 ± 0.50	4.00 ± 2.16	8.75 ± 1.26	3 ± 1.63	4.00 ± 0.82	0.48 ± 0.05	16.25 ± 2.50
	B	400	77.50 ± 2.38	6.50 ± 1.73	9.00 ± 1.63	3 ± 0.82	3.25 ± 1.26	0.49 ± 0.08	16.00 ± 3.37
Mitomyc in C	A	400	60.00 ± 2.94	3.25 ± 0.50	7.25 ± 1.71	11.25 ± 1.5	18.25 ± 2.22	1.24 ± 0.11	36.75 ± 3.20
	B	400	60.50 ± 2.64	4.25 ± 1.50	7.75 ± 2.22	8.25 ± 2.36	19.25 ± 1.89	1.21 ± 0.05	35.25 ± 1.71
1µg / ml Vanilik asit + Mitomyc in C	A	400	81.00 ± 2.16	4.75 ± 1.89	8.50 ± 1.00	2.25 ± 1.5	3.50 ± 0.58	0.425 ± 0.05	14.25 ± 1.71
	B	400	81.75 ± 1.26	4.00 ± 2.16	7.75 ± 1.50	3.5 ± 1.29	3.00 ± 0.00	0.41 ± 0.03	14.25 ± 1.89
2µg / ml Vanilik asit + Mitomyc in C	A	400	71.50 ± 3.00	5.50 ± 0.58	6.50 ± 2.08	7.75 ± 3.09	8.75 ± 3.60	0.77 ± 0.13	23.00 ± 3.16
	B	400	72.50 ± 2.08	6.00 ± 1.41	6.50 ± 2.64	5.75 ± 1.26	9.25 ± 2.50	0.73 ± 0.09	21.50 ± 1.91

Çizelge 4.11. COMET testinin İstatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırma sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	P Değeri	Farkların istatistiksel anlamlılığı
GHI		
DMSO - 1 µg / ml V.A	P<0.05	Anlamlı
DMSO - 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
1 µg / ml V.A - 2µ / µl V.A	P<0.001	Anlamlı
DMSO – MMC	P<0.001	Anlamlı
DMSO - MMC + 1 µg / ml V.A	P>0.05	Anlamsız
DMSO - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC – MMC + 1 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC – MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC + 1 µg / ml V.A - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
% HH		
DMSO - 1 µg / ml V.A	P<0.05	Anlamlı
DMSO - 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
1 µg / ml V.A - 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
DMSO – MMC	P<0.001	Anlamlı
DMSO - MMC + 1 µg / ml V.A	P<0.005	Anlamlı
DMSO - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC - MMC + 1 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC - MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı
MMC + 1 µg / ml V.A – MMC + 2 µg / ml V.A	P<0.001	Anlamlı

DMSO; Dimetil sülfoksit, GHI; Genetik hasar indeksi, %HH; % Hasarlı hücre, MN; Mikronükleus, MMC; Mitomisin C, V.A; Vanillik asit

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında bilerek veya bilmeyerek genotoksik ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerine maruz kalmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile birlikte üretilen yeni kimyasal ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları ve çevreye verilen atıklar canlıların genetik yapısında değişiklikler oluşturabilmektedir.

İnsan hücrelerinde DNA hem endojen hem eksojen ajanların saldırısına açık bir makromoleküldür ve bunun sonucunda sürekli olarak hasara uğramaktadır. Endojen metabolik süreçlerle oluşan reaktif oksijen türevleri, lipid peroksidasyonu, deaminasyon, depürinasyon gibi süreçler mutasyona sebep olabilirler (Lim ve ark. 2005).

Eksojen kaynaklı kimyasallar DNA hasarının en önemli kaynağıdır. İyonize veya UV radyasyon, sigara ve türevleri, çevre kirliliği ve kemoterapötik ilaçlar insanın maruz kalabileceği mutajen ajanlar içinde sayılabilir. Bunlar içinde endojen ve eksojen ajanların tetiklediği metabolik süreçler sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türevleri önemli bir yer tutmaktadır (Gutteridge 1995).

Kısaca serbest radikaller olarak adlandırılan bu moleküllerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir. Bu denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur (Tekcan 2009). Bu sebeplerle insanlarda oksidatif hasar oluşturabilecek endojen ve eksojen ajanların etkilerinin ve bunları engelleyebileceği düşünülen antioksidan maddelerin etkilerinin araştırılması günümüzde oldukça önem kazanmıştır.

Çalışmada alkilleyici bir ajan olarak bilinen mutajen, klastojen ve aynı zamanda oksidatif hasar oluşturan mitomisin C (MMC) ile muamele edilmiş insan kan lenfositlerinde iki farklı yöntemle genotoksik etki belirlenmeye çalışılmıştır. 0.25 µg/ml Mitomisin C ile muamele edilen insan kan lenfositleri ile gerçekleştirilen in vitro mikronükleus ve COMET çalışmalarında kontrole oranla gözlenen yüksek oranda mikronükleuslu hücre, düşük nükleer bölünme indeksi, artmış genetik hasar indeksi ve % hasarlı hücre oranı literatürle uyumlu olarak mitomisin C nin güçlü genotoksik bir ajan olduğunu göstermektedir.

Mitomisin C esas olarak DNA alkilleyici ajanlar grubundan bir ilaçtır. DNA ile çarpaz bağlanarak alkil grubu ekleme özelliğine sahip bu ilacın aynı zamanda hücrede oksidatif hasar oluşturduğu da bilinmektedir (Mark ve ark.1994)

Mitomisin C'nin insan kan lenfositlerinde kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi oranını arttırdığı (Shiraishi ve ark. 1979), MN oranını anlamlı oranda yükselttiği (Fauth ve ark. 2000) insan karaciğer fibroblastlarında MN oluşumunu yüksek anlamlılıkta indüklediği (Nesti ve ark. 2000) çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Yine çalışmamızda antioksidan özellikli bir bitkisel fenolik bileşik olan vanilik asidin belirlenen doz sınırları içinde insan kan lenfositlerinde herhangi bir sitotoksik ve genotoksik etkisinin olmadığını da mikronukleus ve COMET testi yardımı ile gözlemledik. Vanilik asit fenolik OH grubu içermesi sebebi ile antioksidan bir bileşiktir. Yenebilir bitki ve meyvelerde bulunur ve antimikrobiyal, antimutajenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Boobalan ve Mol 2010). Vanilik asit ve protokateşik asitin yüksek antioksidan aktivitesi Szwajgier ve ark.(2005) tarafından gösterilmiştir.

Literatürde ağırlıklı olarak vanillin ile gerçekleştirilmiş antimutajenite, antioksidan etki ve antikarsinojenite çalışmaları bulunmaktadır (Parthasathy ve ark. 2008, Sasaki ve ark. 1990, King ve ark. 2007).

Vanilik asit, vanillinin oksidize formudur ve vanilline kıyasla serbest radikal temizleme aktivitesi bakımından daha güçlü etki gösterdiği bildirilmiştir (Chouth ve ark. 2010).

Çalışmamızda kullandığımız vanilik asidin 1 µg/ml dozu mikronukleus testinde anlamlı bir hasar oluşturmazken, 2 µg/ml dozda vanilik asit MN düzeyini kontrole göre anlamlı arttırmıştır. Vanilik asit ile ilgili bu yönde bir bilgi bulunmamakla birlikte vanilinin yüksek konsantrasyonlarda memeli hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu bilinmektedir (Keshava ve ark. 1998). Çalışmamızda sitotoksik etkiyi belirleme amaçlı gerçekleştirdiğimiz Nükleer Bölünme İndeksi testinde vanilik asitin her iki dozunun da sitotoksik etki göstermediği gözlemlenmiştir. Chiang ve ark.(2003) vanilik asitin insan lenfosit bölünme aktivitesini teşvik ettiğini göstermişlerdir. Bulgularımız bu çalışma ile uyum göstermektedir.

Vanilik asitin okside olmamış formu olan vanillin ile ökaryotik sistemlerde yapılan çeşitli antimitozite ve antikarsinojenite çalışmalarında elde edilen sonuçlar belirsizlik göstermektedir. İn vitro Çin hamsteri V79 hücrelerinde UV ve X ışını rasyasyonunun oluşturduğu sitotoksik etki 7 gün boyunca vanillin ile muamele sonucundan anlamlı oranda azalmıştır (Imanishi ve ark. 1990).

Vanillik asit ile MMC'nin kombine kullanıldığı çalışmamızda da vanillik asit MMC'nin azalttığı Nükleer Bölünme İndeksi'ni artırarak MMC'nin sitotoksik etkisini indirgeme eğilimi göstermiştir. Vanillik asit ile çalışmamızdaki COMET testi sonuçlarında 1 µg/ml dozda genetik hasar indeksi ve % hasarlı hücre oranları kontrolün üzerine çıkmazken 2 µg/ml dozda vanillik asidin hem kontrolden hem de 1 µg/ml dozdan yüksek genetik hasar indeksi ve anlamlı oranda % hasarlı hücre oluşturduğu gözlenmiştir. Vanillin ile yapılan in vitro bir çalışmada da hem MMC muamelesinden önce hem de sonra vanillinin Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (SCE) oranını arttırdığı belirlenmiştir. Vanillinin bu etkisi ise pek çok alkilleyici ajan ile in vitro Çin hamsteri ovaryum hücrelerinin muamelesi sonrasında gözlemlenmiştir (Sasaki ve ark.1990).

Çalışmamızda vanillik asit ile birlikte MMC uyguladığımızda MMC ile oluşan yüksek MN oranının özellikle 1 µg/ml dozda kontrol düzeyine kadar gerilediği gözlemlenmiştir. Benzer olarak aynı doz kombinasyonu COMET testinde Genetik Hasar İndeksi'ni kontrole yakın düzeye indirgemıştır. Vanillik asitin antimitozitik etkisi Salmonella TA104 suşu ile gerçekleştirilen AMES testi ile gösterilmiştir (Shaughnesy DT ve ark. 2001). Vanilik asitin okside olmamış formu olan vanillinin in vivo fare kemik iliği hücrelerinde MMC'nin indüklediği mikronükleus oranını azaltıcı etki gösterdiği Inouye ve ark.(1988) tarafından bildirilmiştir. Çeşitli bitkisel fenolik bileşiklerle gerçekleştirilmiş antimitozite, antigenotoksisite ve antioksidatif etkiye dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. β karoten gibi antioksidan özelliği ile tanınan bitkisel bir karotenoidin in vitro sağlıklı insan lenfosit kültürlerinde MMC'nin indüklediği kardeş kromatid değişimi oranını anlamlı azalttığı belirtilmiştir.

Vanillik asidin antimutajenik ve antioksidan etkilerinin fenolik OH grubu içermesinden kaynaklandığı bilinmektedir. Ayrıca tekli oksijen radikallerini yakalaması ve serbest radikallere hidrojen atomu vermesi de antioksidan özelliğini arttırmaktadır (Atnip 2010). Vanillinin antimutajenik etkisi de yine benzer mekanizmalar üzerinden gerçekleşmektedir (Kumar ve ark. 2000).

Vanillinin in vitro V79 hücrelerinde H_2O_2 tarafından oluşturulmuş DNA hasarını indirdiği gösterilmiştir (Tamai ve ark. 1992). Ancak vanillinin N-metil-N-nitroguanidin, MMC ve H_2O_2 tarafından oluşturulan toksisiteyi arttırdığı, insan hamster hibrid hücresi olan A1 hücrelerinde ortaya konmuştur (Gustafson ve ark. 2000).

Çalışmamızda da vanillik asidin 2 µg/ml dozu ile MMC'yi kombinlediğimizde 1 µg/ml vanilik asit + MMC doz grubuna göre MN'li hücre oranında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca Nükleer Bölünme İndeksi'nde de bir azalma ortaya çıkmıştır. COMET testinde de benzer şekilde Genetik Hasar İndeksi'nde anlamlı artma ve % hasarlı hücre oranında anlamlı bir artışın ortaya çıkması vanilik asidin 2 µg/ml dozunun toksik etkisini göstermektedir. Bu dozda vanillik asitin MMC ile sinerjistik bir etkisi gözlenmemiştir. Çünkü MMC tek başına verildiğinde oluşan toksik etkiye göre 2 µg/ml'lik vanillik asit ile birlikte uygulandığında genetik hasar indeksinde ve % hasarlı hücre oranında anlamlı azalma meydana gelmiştir.

Bitkisel fenolik bileşikler geniş bir bitki grubundan elde edilen ve 8000'in üzerinde sayıda bir bileşik grubudur. Bunlar bitkilerde antioksidan, antimikrobiyal, fotoreseptör etkiler göstermektedir. Bununla birlikte özellikle antioksidan özellikleri nedeni ile insan diyetinde önemli bileşikler olarak rol oynamaktadırlar. Antioksidanlar direk ve dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik serbest radikallerin istenmeyen etkilerine karşı hücreyi koruyan maddelerdir. Reaktif oksijen türevleri normal aerobik metabolizma esnasında düzenli olarak üretilir ve çeşitli antioksidanlar tarafından güvenli bir şekilde uzaklaştırılır. Çalışmamızda kullandığımız vanillik asit, antioksidan özellikleri olduğu bilinen bir fenolik bileşiktir ve özellikle son yıllarda yiyeceklerde koruyucu madde olarak da kullanılmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda vanillik asidin belirli dozlarda kullanıldığında, serbest radikal oluşturarak mutajenik etki gösteren ve hücrede oksidatif stres oluşturan MMC nin genotoksik etkisini anlamlı oranda azalttığı ortaya konmuştur. Besinlerle kolayca alınabilen bir bileşik olması insanlardaki oksidatif stresten korunmada kullanılabilme imkanı vermesine rağmen yüksek dozlarda tüketimde çalışmamızda gözlemlendiği gibi toksik etki gösterebileceği de göz önüne alınmalıdır. Bu sebeple bu bileşikle gerçekleştirilen in vitro ve in vivo genotoksisite/antigenotoksisite çalışmalarının azlığına da dayanarak vanillik asitle diğer in vitro ve in vivo kısa zamanlı genotoksisite testlerinin de gerçekleştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abraham, L.M., Selva, D., Casson, R., Leibovitch, I. 2006. Mitomycin Clinical Applications in Ophthalmic Practice. *Drugs*, 66(3): 321-40. Review.

Akkan, A.C. 2008. Bazı Fenolik Asit Bileşiklerinin Kapiler Elektroferez Yöntemi İle Tayini. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 39s.

Akkuş, İ. 1995. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya, 1-15.

Alaşalvar, C. 2004. Fındık ve Fındık Yan Ürünlerinde Fitokimyasal Maddeler ve Biyoaktif Bileşikler. Faculty of Health and Life Sciences, Food Research Centre, University of Lincoln, Brayford Pool, Lincoln, LN6 7TS, United Kingdom.

Alsagoff, Z., Tan, D.T.H., Chee, S.P. 2000. Necrotizing scleritis after bare sclera excision of pterygium. *Br J Ophthalmol*, 84:1050-1052.

Altan, A. 1989. Yemeklik Yağ Teknolojisi Ders Notları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Adana.

Altınışık, M. 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>

Ames, B., Lee, F., Durston, W. 1973. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 782-786.

Atmaca, E., Aksoy, A. 2009. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 79 – 83.

Atnip, A.A. 2010. Oxidative Stabilities of Docosahexaenoic Acid Oil and Linoleic Acid in an Aqueous System. The Ohio State University.

Auer, H., Oehler, R., Lindner, R., Kowalski, H., Sliuz, G., Orel, L., Kucera, E., Simon, M.M. ve Glossl, J. 1997. Characterisation of genotoxic properties of 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mut. Res*, 393: 165-173.

Aydın, S., Başaran, A.A., Başaran, N. 2004. The Protective Effects of Some Phenylethanoid Glycosides on the MMC Induced DNA Strand Breakage. Hacettepe University, *Journal of Faculty of Pharmacy*, 24(1): 1-11.

Balasundram, N., Sundram ve Samman, S. 2005. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products:Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses.Food Chemistry , Article in Press.

Baldev, K.V. 1979. Mutagenic Effects of Some Anticancer Antibiotics. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 3(3): 143-160.

Başaran, A.A. 2002. Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları, 14. Bitkisel İlaç Hammeddeleri Toplantısı, Eskişehir.

Bauman, G.S., İno, Y., Ueki, K., Zlatesku, M.C., Fisher, B.J., Macdonald, D.R., Stitt, L., Louis, D.N. ve Cairncross, J.G. 2000. Allelic Loss of Chromosome 1p and Radiotherapy Plus Chemotherapy in Patients With Oligodendrogliomas.Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys ., 1; 48(3): 825-830.

Bonassi, S., Abbondandola, L., Camurri, L., De Ferrarii, M., Degrassi, F. 1995. Are Chromosome Aberrations in Circulating Lymphocytes Predictive of A Future Cancer Onset in Humans ? Preliminary Results of An Italian Cohort Study. Cancer Genetics and Cytogenetics, 79:133-135.

Boobalan, R., Mol, S.P. 2010.The protective role of vanillic acid against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats.Journal of Pharmacy Research 2010, 3(7): 1480-1484

Burçak, G., Andican, G. 2004. Oxidative DNA damage and aging. Cerrahpaşa J Med., 35: 159-169

Buxton, V.G., Greenstock, L.C., Helman, P.W., Ross, B.A. 1988.Critical review of rate constants for reactions of hydrate electrons , hydrogen atoms and hydroxyl radical with inorganic and organic compounds in aqueous solution, Journal of Physical and Chemical Reference Data, 17: 513-886.

Cemeroğlu, B. 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88.

Chapner, B.A., Myers, C.E. 1993. Antitumor Antibiotics, Cancer.In: De Vita, V.T., Helmann, S., Rosenberg, S.A.Pricinples and Practice of Oncology, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Vol 2, 381.

Chen, P.L., Chen, W.Y., Lu, D.W. 2005.Evulation of mitomycin C in reducing postoperative adhesions in strabismus surgery.J Ocul Pharmacol Ther, 21(5): 406-410.

- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C. 2003.** Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.*, 69: 600-604.
- Chouth, T., Ding, H.Y., Hung, W.J., Liang, C.H. 2010.** Antioxidative characteristics and inhibition of alfa-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*, *Experimental Dermatology*, 19(8): 742-750.
- Clarkson, P.M., Thompson, H.S. 2000.** Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, 72: 637-46.
- Clifford, M.N. 1998.** Understanding The Biological Effects of Dietary Complex Phenols and Tamins and Their Implications for the Consumer's Health and Well Being. VTT Symposium (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), 187: 47-49.
- Collins, A.R. 2004.** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 6(3): 249-61.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A. 2008.** Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143-51.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. 2003.** Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17: 1195-1214.
- Cotelle, S., Féraud, J. F. 1999.** Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255.
- Çavdar, C., Sifil, A. 1997.** Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association*, 3-4: 92-95.
- Danshütsoodol, N., De Pinho, C. A., Matoba, Y., Kumagai, T., ve Sugiyama, M. 2006.** The mitomycin C (MMC)-binding protein from MMC-producing microorganisms protects from the lethal effect of bleomycin: crystallographic analysis to elucidate the binding mode of the antibiotic to the protein. *Journal of Molecular Biology*, 360(2): 398-408. Elsevier. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756991>
- Demirci, 2001.** Gıda Kimyası. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, s.61–78, Tekirdağ.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010.** Analysis of DNA damage in organisms via “single cell gel electrophoresis” *J.A. Sgric. Fac. H.R.U*, 14(2): 77-89.

Dilek, O.N. 2003. Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III.Ulusal Kongresi. Afyon, 23-30 Mart 2003:6.

Diler, S.B. 2006. Etil metansulfonyat ve Mitomisin C' ye İnsan Kromozomlarının Hassasiyeti.

Dinçer, Y., Akçay, T. 2000. [DNA damage]. Türk Biyokimya Dergisi, 25(2): 73-9.

Doroshov, J.M. 1986. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones.Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83 : 4514-4518.

Dorr, R.T. 1988. Pharmacokinetic, metabolic and drug-resistance aspects of mitomycin C. Semin Oncol.,15: 32-41.

Duenas, M., Surco-Laos, F., Gonzalez-Manzano, S.,Gonzalez-Paramas, A.M., Satos-Buelga, C. 2010. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin.Eur. Food Res. Technol.

Duke, J.A. 2000. Plant parts with antioxidant activity from the chemicalvanillic acid. Phytochemical Database, USDA-ARS-NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland.

Dusre, L., Sankaran, R., Eliot, H.M., Covey, J.M. ve Sinha, B.K. 1990. DNA İnterstrand Cross-Link and Free Radical Formation in a Human Multidrug-resistant Cell Line from Mitomycin C and Its Analogues.Cancer Research, 50: 648-652.

Dündar, Y., Aslan, R. 1999. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü,Hayvancılık Araştırma Dergisi, 9(1-2): 32-39.

Emre, S. 1989. Antikanser ilaçların ve karsinojen maddelerin insan kromozomları üzerine etkilerinin in vitro sistemde kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange, SCE) analiz yöntemi ile belirlenmesi. Doktora, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara..

Eroğlu, H.E.,Tathisen, A.,Ozkul, Y. 2004. Effects of Propolis and Mitomycin C on Micronucleus in Tissue Cultures of Bladder Cancer.E.Ü.Journal of Health Sciences, 13(2): 15-20.

Evrenesoğlu, Y. 2002. Ateş Yanıklığına Duyarlı ve Dayanıklı Bazı Armutların Fenolik ve Mineral Madde İçeriklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 188s, İzmir.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'neill K.L. 1995. The comet assay : a comprehensive review, Mutat., Res., 339: 37-59.

Fauth, E., Scherthan, H. and Zankl, H. 2000. Chromosome Painting Reveals Specific Patterns of Chromosome Occurrence in Mitomycin C- and Diethylstilboestrol-Induced Micronuclei. *Mutagenesis*, 15(6): 459-467.

Fenech, M., Morley, A.A. 1985, Measurement of Micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147: 29-36.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. Ve Zeiger, E. 2003. 'Human Micronucleus project. "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures', *Mutat Res.*, 534(1-2): 65-75.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428: 271-283.

Feredioon, S., Janitha, P.K. 1992. Wanasundara PD. Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1): 67-103.

Forchhammer, L., Bräuner, E.V., Folkmann, J.K., Danielsen, P.H., Nielsen, C., Jensen, A. 2008. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis.*, 23(3): 223-31.

Ford, J.H., Schultz, C.J., Correl, A.T. 1988.Chromosome elimination in micronuclei: A common of hypoploidy.*Am.J.Hum. Genet.*, 43: 733-40.

Frenzilli, G., Bosco, E., Barrale, R. 2000. Validation of Single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mut. Res.*, 468: 137-163.

Gacar, M.N. 2009. Antineoplastik İlaçlar ve Kanser Kemoterapisi.
www.mnejatgacar.com/imx/ANTİNEOPLASTİK%20İLAÇLAR.ppt

Gutteridge, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*, 41: 1819-1828.

Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heims., Högstedt, B., Knudsen , L.E., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman , F., Norderson I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsam. 1994. Cancer Risk in Humans Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosomal Damage. *Cancer Research*, 54: 2919-2922.

Hall III, C. 2001. Source of natural antioxidants:oilseeds, nuts cereals, legumes, animal products and microbial sources.Antioxidants in Food, Practical Applications, J.Pokorny, N.Yanishhilieva and M.Gordon (eds), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp:169-219.

Halliwell, B. 1978. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, *Febbs Letters*, 333: 151-153.

Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore,

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.*Biochem J.*, 219:1-14.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1989. Free radicals in biology and medicine. 3th Ed. Oxford University Press. Inc., London.

Halliwell B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease:An overview. *Methods Enzymol*, 49(3): 577-58.

Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and incell culture.*Br. J. Pharmacol.*, 142: 231-255.

Havsteen, B.T. 2002. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67–202.

Heddle, J.A., et al. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, Present, and, future, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18: 277-291.

Heddle, J.A., Countryman, R.I. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41: 321-32.

Hegab, M.M., Ghareib, H.R. 2009. Antioxidative Effects of Acetone Fraction and Vanillic Acid from *Chenopodium murale* L. on Tomato Plant.(Poster) and Oral presentation MARCO Symposium 2009 organized by the National Institute for Agro-Environmental Sciences (NIAES), Japan.

Hernandez- Borges, J., Gonzalez-Hernandez, G., Borges-Miquel, T., Rodriguez-Delgado, M.A. 2004. Determination of antioksidants in edible grain derivatives from the Canary Islands by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*.

Hertog, M.G.L. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2379-2383.

Hertog, M.G.L., Sweetnam, P.W., Fehily, A.M., Elwood, P.C. ve Kromhout, D. 1997. Antioxidant Flavanols and Ischaemic Heart Disease in a Welsh Population of Men. The Claerphilly Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1489-1494.

Ihara, Y., Toyokuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiani, H., Seino, Y., Yamada, Y. 1999. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(4): 927-932.

Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Matsumoto, K., Watanabe, M., Ohta, T., Shirasu, Y. ve Tutikawa K. 1990. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin. *Mutat. Res.*, 243 (2): 151-158.

Inouye, T., Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Watanabe, M., Ohta, T. ve Shirasu, Y. 1988. Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin. *Mutat. Res.*, 202: 93-95.

Karakaya, S., El, S.N. 1997. Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 26(2): 54-60.

Karaçalı, İ., 2002. Bahçe Ürünlerinin Muhafazası ve Pazarlanması. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları No:494*, İzmir.

Kasai, E. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2X-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*, 387 : 147–163.

Keshava, C., Keshava, N., Ong, T., Nath, J. 1998. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberrations in V79 cells. *Mut. Res.*, 397(2): 149-159.

King, A.A., Shaughnessy, D.T., Mure, K., Leszczynska, J., Ward, W.O., Umbach, D.M., et al. 2007. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells, global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutat Res.*, 616 : 60-9.

Kinnula, V.L., Crapo, J.D. 2003. Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 167: 1600-1619.

Koca, N., Karadeniz, F. 2005. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda*, 30(4): 229-236.

- Kumar S.S., Ghosh, A., Devasagayam, T.P. ve Chauhan, P.S. 2000.** Effect of vanillin on methylene blue plus light-induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA. *Mut. Res.*, 469 (2): 207-14.
- Kontos, H. A., Wei, E.P., Ellis, E.F., Jenkins, L.W., Povlishock, J.T., Rowe, G.T., Hess, M.L. 1985.** Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.*, 57: 142–151.
- Kusakabe, H., Takahashi, T. ve Tanaka, N. 1999.** Chromosome-type Aberrations Induced in Chromosome 9 After Treatment of Human Peripheral Blood Lymphocytes With Mitomycin C at the G0 Phase. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 85: 212-216.
- Lazo, J. S. ve Larner, J.M. 1998.** Individual antineoplastic drugs. *Human Pharmacology*, p 599-613, Mosby St. Louis MO.
- Lee, J.Y., Stenzel, W., Ebel, H., Wedekind, C., Ernestus, R.I., Klug, N. 2004.** Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats., 100(1) : 52-55.
- Lim, K.S., Jeyaseelan, K., Whiteman, M., Jenner, A., Halliwell, B. 2005.** Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Ann N Y Acad Sci*, 1042: 210-20.
- Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Kawasaki, N., Choo, M.K., Saitoh, Y., Aozuka, Y. et al. 2005.** Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *J Pharmaceut Sci*, 25: 57–65.
- Mark, L. M., Jiming, W., Dong, H. S. 1994.** Mitomycin and human corneal endothelium. *Arc Ophthalmol.*, 112: 533-537.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. 2005.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.*, 16: 577-586.
- McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F. 1999.** Endothelial function in hypertension. *Hypertension*, 34: 539–545.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A. 1993.** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.*, 288(1): 47-63.
- Mercan, U. 2004.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi *YYU Vet Fak Derg.*, 15 (1-2): 91-96.
- Meram, İ., Aktaran, Ş. 2002.** Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv*, 11:299.

- Miguel, J., Fleming, J. 1982.** Antioksidation, metabolic rate and aging in *Drosophila*. *Arch Geron Geriatr*, 1: 159.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000.** The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.
- Mukherjee, A. 1988.** Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo in mice, *Toxicol Lett*, 42: 47-53.
- Nawar, W.W. 1985.** Lipids. *Food Chemistry*, OR Fennema (ed), Marcel Dekker Inc., New York, 139-244.
- Nesti, C., Trippi, F., Scarpato, R., Migliore, L. ve Turchi, G. 2000.** Cytokinesis-block Micronucleus Assay in Primary Human Liver Fibroblasts Exposed to Griseofulvin and Mitomycin C. *Mutagenesis*, 15(2): 143-147.
- Nordberg, J., Arner, E.S.J. 2001.** Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287-1317.
- Olive, P. L., Wlodek, D., ve Banáth, J. P. 1991.** DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, 51: 4671-4676.
- Oliveira, N.G., Neves, M., Rodrigues, A.S., Monterio Gil, O., Chaveca, T., Rueff, J. 2000.** Assment of the adaptive response induced by quercetin using MNCB peripheral blood humsn lymphocytes assay, *Mutagenesis*, 15: 77-83.
- Ostling, O., Johanson, K.J. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 123(1): 291-8.
- Özcan, O. E. 1998.** 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin *Tilapia Nilotica*'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Özkan, S. 2007.** Psikonkoloji Kanser Tedavileri, İstanbul, 43-47.
- Özkan, A., Fışkın, K. 2004.** Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14: 52-60.
- Parthasarathy, V.A.,Chempakam, B., Zachariah, T.J. 2008.**Chemistry of Spices, 287-311.

- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., et al. 2007.** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol*, 45: 2287-95.
- Perry, P., Evans, H.J. 1975.** Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258: 121-135.
- Pietta, P.G. 2000.** Flavonoids as Antioxidants, *J.Nat.Prod.*, 63(7): 1035-1042
- Pitkanen, O.M., Martin, J.M., Hallman, J., Akerblom, H.K., Sariola, H., Andersson, S.M. 1992.** Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science*, 50(5): 335-339.
- Podsedeck, A. 2005.** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Sci and Techn*, (in press).
- Podsedeck, A. 2007.** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT- Food Science and Technology*, 40(1): 1-11.
- Prasad, S., Naik, P. 2002.** Vijayalaxmi KK. Efficiency of *Coleus aromaticus* extract in modifying cyclophosphamide and mitomycin-C induced clastogenicity in mouse bone marrow cells. *Indian J Exp Biol*, 40: 1020-1025.
- Reddy, M.V., Randerath, K. 1987.** 32P-analysis of DNA adducts in somatic and reproductive tissues of rats treated with the anti- cancer antibiotic, mitomycin C. *Mutat Res*, 179 (1): 75-88.
- Robbins, R.J. 2003.** Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA, 10: 2866-2887.
- Rupp, D.W. 2006.** Molecular mechanism of DNA damage, October 2006, Web erişim: http://radonc.yale.edu/training/pdf/molecular_mechanisms.pdf Erişim Tarihi: 10 Mart 2008
- Saldamlı, İ. 2007.** Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Salmon, S. E. ve Apple, M. 1974.** Chemotherapeutic agents cancer chemotherapy. *Review of Medical Pharmacology*, 4. Edition, 470-503. Los Altos, California.
- Sancar A., Lindsey-Boltz, L.A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S. 2004.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73: 39-85.
- Sasaki, Y.F., Ohta, T., Imanishi, H., Watanabe, M., Mastumoto, K., Kato, T. and**

Shirasu, Y. 1990. Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice. *Mutat,Res.*, 243: 299-302.

Sasaki, Y., Yamada, H., Shimoi K., Kator K. Ve Kinae K. 1993. The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and roibos tea in CHO cells and mice. *Mut. Res.*, 286(2) : 221-232.

Sevim, N. 2006. Değişik Kimyasalların Drosophila Somatik Mutasyon Ve Rekombinasyon Testinde (Smart) Amfositine İle Etkileşimleri *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

Shahidi, F., Nacz, M. 1995. Food Phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 199-225.

Shaughnessy, D.T., Setzer, R. W., ve DeMarini, D.M. 2001. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mut. Res.*, 480-481 (1) : 55-69.

Sherwin, E.R. 1990. Antioxidants. Food Additives, AL Branen, PM Davidson and S Salminen (eds), 139-191, Marcel Dekker Inc., New York.

Shiraishi, Y., Minowada, J. ve Sandberg, A.A. 1979. Differential Response of Sister Chromatid Exchange and Chromosome Aberrations to Mitomycin C of Normal and Abnormal Human Lymphocytic Cell Lines. *Oncology*, 36(2): 76-83.

Silva, J.P., Gomes, A.C., Proença, F., Coutinho, O.P. 2009. Novel nitrogen compounds enhance protection and repair of oxidative DNA damage in a neuronal cell model: comparison with quercetin. *Chem Biol Interact.*, 181(3): 328-37.

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. *Exp Cell Res*, 175(1): 184-91.

Szwajgier, D., Pielecki, J., Targanski, Z. 2005. Antioxidant activities of cinnamic acid and benzoic acid derivatives. *Acta Sci.Pol., Technol.Aliment.*, 4(2): 129-142.

Şehirli, A.O. 2001. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Tamai, K., Tezuka, H., Kuroda, Y. 1992. Direct modifications by vanillin in cytotoxicity and genetic changes induced by EMS and H₂O₂ in culture chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 268: 231-237.

Taner, G. 2004. Genotoksikoloji, (Danışman: Prof. Dr. Fatma Ünal), Bilim ve Teknik.

Tekcan, M. 2009. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD.

Thibault , J. F., Asther, M., Ceccaldi, B. C., Couteau, D., Delattre, M., Duarte, J. C., Faulds, C., Heldt-Hansen, H. P., Kroon, P., Lesage-Meessen, L., Micard, V. M.G. C., Renard, C., Tuohy, M., Van Hulle, S., Williamson, G. 1998. Fungal Bioconversion of Agricultural By-Products to Vanillin. *Lebensm.-Wiss. und Technol.*, 31: 530-536.

Tice, R.R., Hollaender, A. 1984. Sister Chromatid Exchanges: Twenty-five Years of Experimental Research vol. A, The Nature of Sister Chromatid Exchanges, Plenum, 491 pp.

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

Tomasz, M. 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective) *Chemistry and Biology*, 2(9): 575-579.

Üstün, N.S., Turhan, S. 1999. Yağ Oksidasyonu ve Antioksidanlar. OMÜ Ziraat Fak. Yardımcı Ders Notu No: 11, 81 s, Samsun.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44-84.

Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E., Vasiliadou, S. 1997. Effectiveness of natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205: 93-96.

Verweij, J., Stoter, G. 1987. Severe side effects of the cytotoxic drug mitomycin C. *Neth J Med.*, 30: 43-50.

Verweij, J., Pinedo, H.M. 1990. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs*, 1(1): 5-13. Review.

Vetrano, A.M., Heck, D.E., Mariano, T.M., Mistin, V., Laskin N.L. ve Laskin, J.D. 2005. Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 35372-35381.

Walton, N. J., Mayer, M. J., Narbad, A. 2003. Vanillin. *Phytochemistry*, 63 (5): 505-515.

Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44 : 701-705.

Wetherilt, H. 1996. Beslenme ve cilt sağlığı. *Gıda Teknolojisi*, 1(6): 84-88.

Young, I.S., Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*, 54: 176-186.

Zheng, W., Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J.Agric.Food Chem.*, 49(11): 5165-5170.

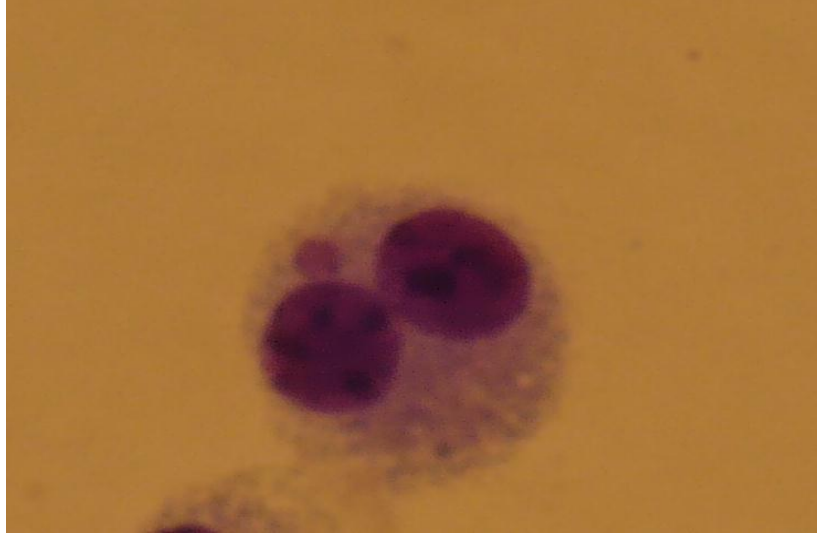
Zimmerman, B. J., Granger, D.N. 1994. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sc*, 307: 284–292.

Zini, A., Schlegel, P.N. 1996. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl*, 17: 473-480.

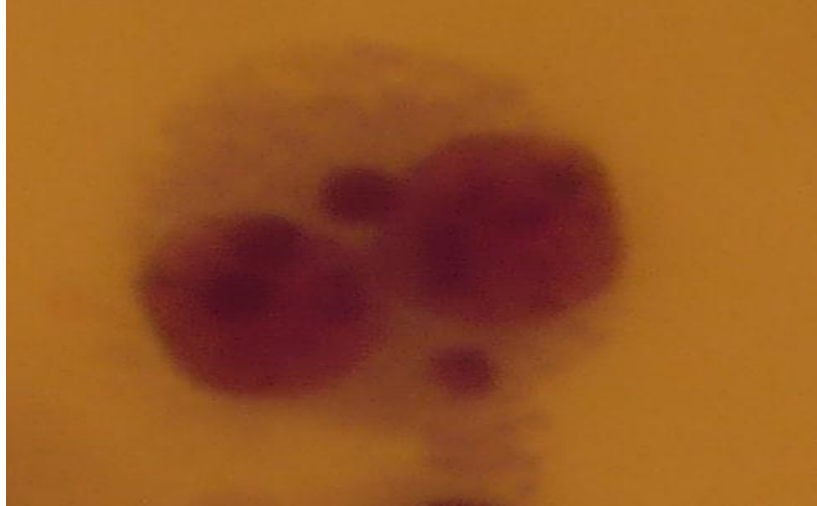
Zwart De, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.H.M., Vermeulen, N.P.E. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *FreeRadical Biology and Medicin*, 26: 202-226.

EKLER

EK 1 MN Testine Göre Mikronükleus İçeren İki Çekirdekli Hücreler



Tek Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücre



İki Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücre

EK 2 COMET Testine G6re Tip 0,1,2,3,4, Olarak Değerlendirilen H6creler



COMET testine g6re Tip 0 olarak değerlendirilen h6cre



COMET testine g6re Tip 1 olarak değerlendirilen h6cre



COMET testine göre Tip 2 olarak değerlendirilen h¼cre



COMET testine göre Tip 3 olarak değerlendirilen h¼cre



COMET testine göre Tip 4 olarak değerlendirilen hücre

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve GÜLER ERDEM

Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir 13.10.1985

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Turhan Tayan Anadolu Lisesi

Lisans : U. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : U. Ü. Mikrobiyoloji A.B.D. İmmunoloji Lab. 2008

İletişim (e-posta) : megy_ender@hotmail.com