

T.C
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURKUMİN VE ELAJİK ASİTİN İNSAN PERİFERAL
LENFOSİTLERİNDE LUSİDİN İLE UYARILMIŞ DNA HASARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN COMET ASSAY İLE BELİRLENMESİ

Ümit HARURLUOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2022
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KURKUMİN VE ELAJİK ASİTİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE LUSİDİN İLE UYARILMIŞ DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN COMET ASSAY İLE BELİRLENMESİ

Ümit HARURLUOĞLU

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Lusidin, kökboya bitkisinden elde edilen ve boyarmadde olarak kullanılan antrokinon türevi bir metabolittir. Kurkumin ve elajik asit ise son yıllarda hızla popüleritesi artan polifenol grubu antioksidanlardandır. Bu çalışmada, insan periferel kan lenfositlerinde elajik asit ve kurkuminin olası lusidin genotoksitesine karşı antigenotoksik etkileri tek hücre jel elektroforez test yöntemi olarak adlandırılan comet assay ile araştırılmıştır. Çalışmada negatif kontrol (%10 DMSO), pozitif kontrol (EMS; 1 mM), lusidin (LUC; 200 µM), elajik asit (EA; 50 ve 100 µM), kurkumin (CUR; 0,1 ve 1 µM), LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR grupları kullanılmıştır. LUC, EA ve CUR ile ayrı ayrı ve kombine şekilde 24 saat muamele edilen hücreler alkali comet assay ile analiz edilmiştir. Floresan mikroskop altında hücreler sayılarak ortalama hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi, kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yoğunluğu (%) ve kuyruk momenti bulunmuştur. Elde edilen veriler SPSS paket programı kullanılarak negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Genetik hasar indeksi, hasarlı hücre yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri LUC grubunda kontrole göre önemli oranda artış göstermiştir. Bu değerlerin EA ve CUR'un tüm gruplarında kontrole göre düşüken LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR kombinasyon gruplarında kontrole yaklaştığı gözlenmiştir. Sonuç olarak insan periferel kan lenfositlerinde LUC'un DNA hasarı oluşturarak toksik etki gösterdiği ve EA ve CUR'a ait kombinasyon uygulamalarının antigenotoksik etkiyle LUC toksitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Böylece EA ve CUR'un DNA koruyucu özelliğe sahip olduğu şekilde bir değerlendirme yapılmıştır.

2022, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Comet assay, Elajik asit, Genotoksite, Kurkumin, Lusidin.

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF EFFECT OF CURCUMIN AND ELAGIC ACID ON LUCIDIN-INDUCED DNA DAMAGE ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES BY COMET ASSAY

Ümit HARURLUOĞLU

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Lucidin is an anthraquinone derivative metabolite obtained from the root dye plant and used as a dyestuff. Curcumin and ellagic acid are the polyphenol group antioxidants that have recently gained popularity. In this study, the antigenotoxic effects of ellagic acid and curcumin against possible genotoxicity of lucidin in human peripheral blood lymphocytes were investigated with the comet assay, which is called a single cell gel electrophoresis test method. In the study, negative control (10% DMSO), positive control (EMS; 1 mM), lucidine (LUC; 200 μ M), ellagic acid (EA; 50 and 100 μ M), curcumin (CUR; 0.1 and 1 μ M), LUC +EA, LUC+CUR, and LUC+EA+CUR groups were used. Cells treated with LUC, EA, and CUR separately and in combination for 24 hours were analyzed by alkaline comet assay. The mean percentage of damaged cells, genetic damage index, tail length, tail DNA density (%), and tail moment were found by counting cells under a fluorescent microscope. The data were compared with the negative control group using the SPSS package program. Genetic damage index, percentage of damaged cells, tail length, and tail moment parameters increased significantly in the LUC group compared to the control. While these values were lower in all EA and CUR groups compared to the control, it was observed that they approached the control in the LUC+EA, LUC+CUR, and LUC+EA+CUR combination groups. As a result, it has been observed that LUC has a toxic effect by creating DNA damage in human peripheral blood lymphocytes, and combination applications of EA and CUR reduce LUC toxicity with an antigenotoxic effect. Thus, an evaluation was made that EA and CUR have DNA protective properties.

2022, 56 pages

Keywords: Comet assay, Curcumin, Ellagic acid, Genotoxicity, Lucidine.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma, Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup FYL-2019-651 numaralı proje kapsamında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Yüksek lisans tezimin araştırma konusunun belirlenmesi ve planlanmasında, deneysel çalışmaların yürütülmesinde, verilerin değerlendirilmesi ve yazımı sırasında ki muazzam katkılarından, daimi olarak göstermiş olduğu hoşgörü, ilgi ve sabrından, ayrıca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek yolumu aydınlatmasından dolayı saygı değer danışmam hocam Sayın Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen doktora öğrencisi sevgili Bilge DOĞAN'a ise ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana sürekli olarak cesaret veren ve manevi desteklerini hiçbir koşulda benden esirgemeyen sevgili eşim Betül ve kızlarım Görkem ile Saadet Gökçen HARURLUOĞLU'na içten teşekkürlerimi sunarım.

Ümit HARURLUOĞLU

Ağustos, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Doğal Boyarmaddeler.....	3
2.1.1. Antrakınonlar	4
2.1.1.1. Lusidin	4
2.2. Antioksidanlar	5
2.2.1. Elajik asit	7
2.2.2. Kurkumin	8
2.3. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları.....	9
2.4. Genotoksisite Testleri	11
2.4.1. Comet assay (Alkali Tek Hücre Jel Elektroforezi)	12
2.4.2. Comet assay tekniğinin avantajları ve dezavantajları.....	16
2.4.3. Comet assay kullanım alanları	16
2.4.3.1. Genotoksisite ve sitotoksisite araştırmaları	16
2.4.3.2. DNA onarım araştırmaları	17
2.4.3.3. Apoptosis araştırmaları.....	17
2.4.3.4. Antioksidan araştırmaları.....	18
2.4.3.5. Biyoizleme araştırmaları.....	18
2.4.3.6. Klinik araştırmalar	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	19
3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler	19
3.1.3. Kan örneklerinin alınması.....	21

3.1.4. Kimyasal konsantrasyonların belirlenmesi	21
3.1.5. Comet analizinde kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanması	21
3.1.5.1. Fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4, 1000 mL)	21
3.1.5.2. Lizis çözeltisi (pH 10, 500 mL)	22
3.1.5.3. Elektroforez tamponu (pH 13,1, 1000 mL)	22
3.1.5.4. Nötralizasyon çözeltisi (pH 7,5, 250 mL).....	22
3.1.5.5. Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)	23
3.1.5.6. Normal kaynama dereceli agaroz (NMA)	23
3.1.5.7. Boyama çözeltileri	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Comet analizi basamakları	23
3.2.1.1. Hücresel materyalin hazırlanması	24
3.2.1.2. Mikroskop lamalarının hazırlanması	24
3.2.1.3. Lizis	25
3.2.1.4. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması ve elektroforez	25
3.2.1.5. Nötralizasyon	25
3.2.1.6. Lamaların boyanması	26
3.2.1.7. Lamaların değerlendirilmesi	26
3.2.2. İstatistiksel analiz	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1. Tripan mavisi boyası ile canlı hücre sayım bulguları.....	27
4.2. Alkali comet testi görsel analiz bulguları.....	30
4.3. Alkali comet testi bilgisayarlı görüntü analizi bulguları	36
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	43
EKLER	56
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Lusidinin kimyasal formülü	4
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması	6
Şekil 2.3. Elajik asidin kimyasal formülü	7
Şekil 2.4. Kurkuminin kimyasal formülü	8
Şekil 2.5. Genotoksin etkisi ve sonuçları	10
Şekil 2.6. Genotoksisite riski	11
Şekil 2.7. DNA görüntülerinin puanlandırılması	15
Şekil 4.1. Tripan mavisi testi ile belirlenen tüm uygulama gruplarına ait ortalama hücresel canlılık grafiği	29
Şekil 4.2. Alkali comet yöntemi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların floresan mikroskop görüntüleri	30
Şekil 4.3. Tüm gönüllülere ait genetik hasar indeksi (GHİ) ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı	34
Şekil 4.4. Tüm gönüllülere ait % hasarlı hücre (HHY) ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı	36
Şekil 4.5. İnsan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk uzunluğu	37
Şekil 4.6. İnsan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait % DNA kuyruk yoğunluğu	37
Şekil 4.7. İnsan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait kuyruk momenti	38

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Tripan mavisi testi ile gönüllü 1'e ait hücresel canlılık sonuçları	27
Tablo 4.2. Tripan mavisi testi ile gönüllü 2'ye ait hücresel canlılık sonuçları	28
Tablo 4.3. Tripan mavisi testi ile gönüllü 3'e ait hücresel canlılık sonuçları	28
Tablo 4.4. Tripan mavisi testi ile gönüllü 4'e ait hücresel canlılık sonuçları	29
Tablo 4.5. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 1'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri	31
Tablo 4.6. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 2'ye ait hasarlı kan hücreleri değerleri	32
Tablo 4.7. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 3'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri	33
Tablo 4.8. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 4'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri	34
Tablo 4.9. Alkali comet testi ile elde edilen tüm gönüllülere ait verilerin özet bulguları	35

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
mL	Mililitre
Rpm	Devir/dakika
V	Volt

Kısaltmalar

AMES	Bakteriyel gen mutasyon analizi
AP	Alkali labil bölgeler
COMET ASSAY/SCGH	Tek hücre jel elektroforezi
CUR	Kurkumin
DMSO	Dimetil sülfoksit
EA	Elajik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GHI	Genetik hasar indeksi
HA	Hidroksiantrokinon
HHY	Hasarlı hücre yüzdesi
HPRT	Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz gen mutasyon analizi
KA	Kromozomal aberasyon testi
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Mono potasyum fosfat
LMA	Düşük Kaynama Dereceli Agaroz
LUC	Lusidin

MN	Mikronükleus testi
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NMA	Normal Kaynama Dereceli Agaro�
PBS	Fosfat tamponlu salin
ROS	Reaktif oksijen türleri
T-DNA	Kuyruk DNA'sı
TL	Kuyruk uzunluğu
TM	Kuyruk momenti
XPRT	Ksantin guanin fosforibozil transferaz gen mutasyon analizi

1. GİRİŞ

Şifalı olarak nitelendirilen bitkiler güvenilirlikleri konusunda herhangi bir bilimsel çalışma olmaksızın geleneksel olarak dünyanın birçok bölgesinde yüzyıllardır kullanılmış ve bu bitkilerden gıda ve boyar maddeler olarak istifade edilmiştir. Bu bitkilerden sentezlenen doğal boyar maddeler günlük yaşantımızda genellikle kozmetik, tekstil, gıda, sanat ve ilaç sanayinde üretilen ürünlerle sık bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. Bu ürünlerin sentezlendikleri bitkilerin gıda veya farklı amaçlarla kullanıldıklarında insanları etkileyen bir takım toksik maddeler sentezledikleri bilinmektedir (Teixeria vd., 2003; Owolafe vd., 2020). Bitkinin türüne, mevsimsel ve çevresel faktörlere, hava, su ve toprakta bulunan metal miktarlarına bağlı olarak bu toksik etkilerin farklılık gösterebildiği de bildirilmiştir (Begoa ve Messaoudi, 2019).

Kimyasal kirlenmenin özellikle son yıllarda artması, teknolojinin hızla gelişmesinin bir sonucudur. Kimyasal kirlilik havuzu olarak adlandırılan ve kimyasal maddeler tarafından oluşturulan bu kirlenme yaşamımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. İçtiğimiz suyla, soluduğumuz havayla, kullandığımız toprakla, tedavi amacıyla aldığımız ilaçlarla her gün kimyasal kirlenmeye maruz kalmaktayız. Bu kimyasal kirlenme insan vücudunda önlenemez bir biçimde serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu radikaller ise hücrelerde hasara sebebiyet vererek kanser, kalp-damar hastalıkları, katarakt, diyabet, karaciğer hasarı gibi hastalıkların oluşmasını kaçınılmaz hale getirmektedir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Bitkilere ait kimyasal bileşenlerin aynı zamanda genotoksik ve karsinogenik özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilerek bu bileşenlerin terapötik kullanımlarının insanlar için potansiyel bir kanserojen tehlike olarak kabul görmesi ve kullanımından kaçınılması gerektiği vurgulanmıştır (Brown ve Brown, 1976; Brown ve Dietrich, 1979; Westendorf vd., 1988; Prinsloo vd., 2018). Karsinogen ajanların %90'ının insanlar için genotoksik olduğu ve kanser ile genotoksisite arasında kuvvetli bir bağ bulunduğunun tespit edilmesi sonucunda endüstriyel ve sağlık kuruluşları tarafından fiziksel ve kimyasal ajanların kanser potansiyellerini belirlemek amacıyla genotoksisite testleri tarama testleri olarak kullanılmaya başlanılmıştır (Kılıç, 2005; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

İnsan vücudunda kimyasal kirlenme sonucu oluşan bu serbest radikallerin uzaklaştırılmasından sorumlu sistemler antioksidan mekanizmaları olarak adlandırılmaktadır. Antioksidanlar vücudumuzda doğal olarak bulunduğu gibi aynı zamanda dışarıdan beslenme yoluyla da alınabilmektedir. Özellikle yapılan araştırmalarda dışarıdan vücudumuza alınan meyve, sebze ve bitkilerin, serbest radikal kaynaklı meydana gelen birçok hastalığın oluşma riskini azalttığı gösterilmiştir (Kumar vd., 2016; Kar ve Hacıoğlu, 2021; Ekici, 2022).

Günümüzde her türlü kimyasal kirlenmeye sebep olan doğal ya da sentetik maddelere maruziyetin artması nedeniyle bu maddelerin kullanılmadan önce toksisite çalışmalarının yapılması risk değerlendirmesi için oldukça önem arz etmektedir (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007; Şen vd., 2018). DNA hasarının ve hasarın tespiti açısından tehlikenin boyutlarının tanımlanması açısından geliştirilen bakteriyel geri mutasyon analizi, kromozomal aberasyon testi, mikronükleus testi, timidin kinaz geni *in vitro* gen mutasyon analizi, hipoksantin guanin fosforibozil transferaz ve ksantin guanin fosforibozil transferaz *in vitro* memeli gen mutasyon analizleri, rodent dominant letalite testi, memeli karaciğer hücrelerinde *in vivo* programlanmamış DNA sentezi testi ve tek hücre jel elektroforezi gibi genotoksisite testleri, doğrudan veya dolaylı olarak çeşitli mekanizmalar tarafından genetik materyalde hasara yol açan herhangi bir maddeyi veya bileşiği tanımlamak için tasarlanmış *in vitro* ve *in vivo* testlerdir (Cimino, 2006).

Bu çalışmada, doğal bir boyarmadde olan lusidin ile uyarılmış insan periferik kan lenfositlerinde olası DNA hasarına karşı doğal fenolik bileşikler olan elajik asit ve kurkuminin antigenotoksik etkileri duyarlı, hızlı, güvenilir, basit, ucuz ve çok hassas bir yöntem olan tek hücre jel elektroforezi (comet assay) yöntemiyle *in vitro* olarak belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Doğal Boyarmaddeler

Doğada böcek, bitki liken ve mantarlar tarafından sentezlenen, aynı zamanda çeşitli alanlarda boya veya pigment maddesi olarak faydalanılan flavonlar, flavonollar, antrakinonlar ve indigotin bileşikler doğal boyarmaddelerdir (Deveoğlu ve Karadağ, 2011). Doğal boyarmaddeler ile yapılan boyamacılığın tarihi tekstil tarihi kadar eskilere dayanmakla birlikte kullanımının Hindistan ve Mezopotamya'da M.Ö. 4000 yıllarında başladığı yönünde bilgiler bulunmaktadır (Karadağ, 2007; Pawlak vd., 2006). 19. yüzyıl sonlarında sentetik boyarmaddelerin üretilmeye başlanmasıyla birlikte böcek, bitki, liken ve mantarlar tarafından sentezlenen boyarmaddelerin kullanımı önemli ölçüde azalmış ancak zaman içerisinde sentetik boyarmaddelerin çevre kirliliğine neden olduğunun, toksik ve kanserojenik etkilerinin bulunduğu tespit edilmesi üzerine doğal boyarmaddeler yakın geçmişte tekrar tekstil boyama, ilaç, kozmetik ve gıda renklendirme alanlarında kullanılmaya başlanmıştır (Ali vd., 2007; Karadağ, 2007; Kato vd., 2004). Muhabbet çiçeği (*Reseda luteola* L.), Boyacı sumağı (*Cotinus coggyria* Scop.), Boyacı katırtırnağı (*Genista tinctoria* L.), *Serratula tinctoria* L. Gaud ve bazı cehri (*Rhamnus*) türlerinden elde edilen sarı renkli boyarmaddeler boyamacılık tarihinde sıklıkla kullanılmıştır (Colombini vd., 2007). Lak böceği (*Kerria lacca* Kerr), Amerikan koşinili (*Dactylopius coccus* Costa), Kermes (*Kermes vermilio* Planchon), Ekin koşinil (*Porphyrophora tritici* Bod.), Polonya kermesi (*Porphyrophora polonica* L.) türlerinden faydalanılarak kırmızı renkli doğal boyarmaddeler elde edilmiştir (Dölen, 1992).

Bitkiler (*Rhamnus petiolaris*-Cehri, *Rubia tinctorum*-Kökboya, *Reseda lutea*-Muhabbet Çiçeği, *Isatis tinctoria*-Çivit Otu vb.) direkt ya da kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinin kurutulmasıyla toz haline getirilerek doğal boyarmaddeler olarak kullanılırken, böcekler (*Dactylopius coccus*-Koşinil veya Kırmızı Böceği, *Laccifer lacca*-Lak Böceği vb.) dışı bireylerinin kurutulması ve toz haline getirilmesiyle doğal boyarmaddeler olarak kullanılmaktadır (Enez, 1987).

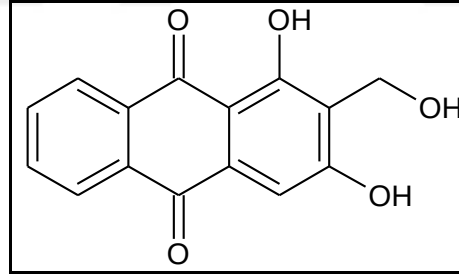
Doğal boyarmaddeler flavonoidler, indigoidler ve kinonlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılırken antrakinonlar, kinonlar grubu içerisinde yer almaktadır (Deveoğlu ve Karadağ, 2011)

2.1.1. Antrakinonlar

Doğal boyarmaddelerin sınıflandırılmasında kinonlar grubu içerisinde yer alan ve önemli bir üyesi olan antrakinonlar, antrasenedion veya dioksoantrasen olarak da adlandırılırlar. Kapalı formülleri $C_{14}H_8O_2$ şeklindedir. Antrokinonlar keto ve OH, CH_3 , OCH_3 , CH_2OH , CHO ve COOH gibi fonksiyonel gruplar ile yapısal olarak bir antrasen halkasından meydana gelmektedir. Birçok boyarmadde ve pigment sınıfının ana maddesidir. Sanayide, antrasenin yükseltgenmesiyle ya da benzen ile ftalik anhidritin yoğunlaşma ürününden su giderilmesiyle elde edilirler. Antrakinon yükseltgenmeye karşı son derece kararlıdır. Ancak kolayca indirgenerek çeşitli ürünlere dönüşebilir. Antrokinonlar gıda bileşenleri ile kovalent bağlar oluşturabildikleri için reaktif boyalar olarak kabul edilirler. Ayrıca çeşitli katyonlarla kompleks meydana getirebilen hidroksiantrakinon türevleri bulunmaktadır (Hunger, 2003).

2.1.1.1. Lusidin

Moleküler formülü $C_{15}H_{10}O_5$ olup kimyasal adı 1,3-dihidroksi-2-hidroksimetil-9,10-antrakinondur (Bkz. Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Lusidin kimyasal formülü

LUC'un mutajenik ve genotoksik etkili bir hidroksiantrakinon (HA) metaboliti olduğu bilinmektedir (Kawasaki vd., 1994). Bir antrakinon çeşidi olan LUC Kökboya (*Rubia tinctorum* L.) ve Yoğurt otu (*Galium verum* L.) bitkilerinin köklerinde bulunmaktadır. LUC ile birlikte alizarin, pseudopurpurin, purpurin, munjistin, rubiadin, xanthopurpurin, purpuroxanthin, chinizarin, christofin, anthragallol gibi antrakinonları içeren Kökboya (*Rubia tinctorum* L.) bitki köklerinin Mısırlılar, Antik Yunanlılar ve Romalılar tarafından kurutulup öğütülmesiyle kırmızı renk boyamada kullanıldığı anlaşılmıştır.

Benzer şekilde Yoğurt Otu (*Galium verum* L.) bitki köklerinin 19. Yüzyılda Avrupa'nın kuzey kesimleri ve İskoç dağlarında yaşayan insanlar tarafından ekose kumaşlarda kullanılan kırmızı renkli ipliklerin boyanmasında, ülkemizde ise bu bitki köklerinin kırmızı, çiçek ve yaprak saplarının da sarı renk boyamalarda kullanıldığı bilinmektedir (Karadağ, 2007).

2.2. Antioksidanlar

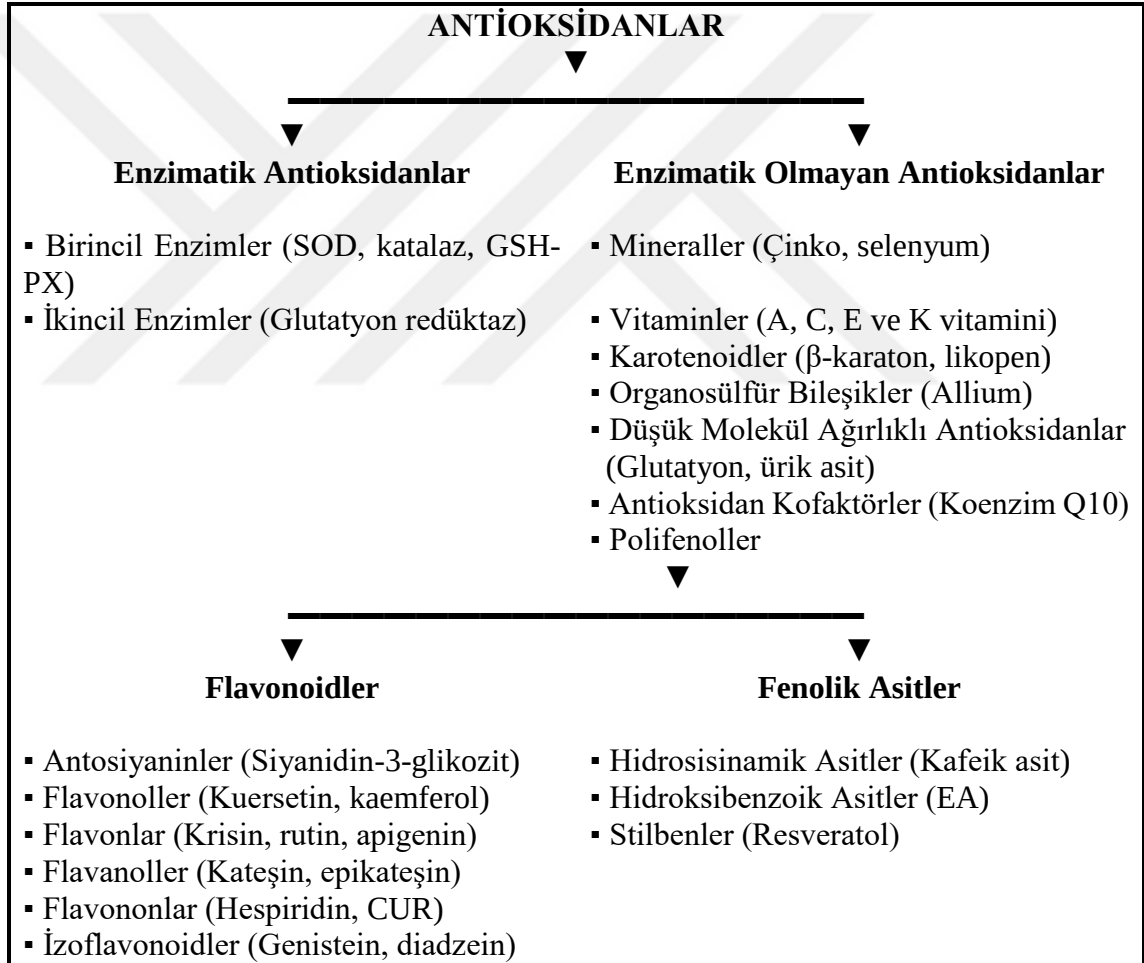
Teknolojik gelişmeler, çevre kirliliği, tarım ilaçları, radyasyon, kirli sular, ağır metaller ve hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi etkenler canlı organizmalarda önlenemez bir biçimde serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu radikaller ise hücrelerde hasara sebebiyet vererek kanser, kalp-damar hastalıkları, katarakt, diyabet, karaciğer hasarı gibi hastalıkların oluşmasını kaçınılmaz hale getirmektedir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Oksijenli solunum yapan organizmalarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu inhibe etmek, ROS kaynaklı hasarların oluşumunu önlemek ve toksik maddelerin uzaklaştırılması sağlamakla görevli sistemler “antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar” olarak adlandırılır (Şener ve Yeğen, 2009; Karabulut ve Gülay, 2016). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması durumunda ise hücre hasarı boyutunda birçok patolojik değişiklik meydana gelmektedir (Yalçın, 1998). Antioksidanlar, canlılarda hücre içi savunma sisteminin bir parçasıdır. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Reiter, 2000).

Metabolik reaksiyonlar esnasında oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikallerine dönüşebildiği için canlı organizmalar için toksiktir. Bu nedenle insan vücudunda antioksidanların varlığı serbest radikal kaynaklı hasarları önlemekte ve hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterip oksijenin, süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikallerine dönüşmesini azaltmaktadır. Yani antioksidanlar, insan vücudunda serbest radikal süpürücüsü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonunu engellemektedir (Başer, 2002).

Antioksidanlar serbest radikalleri, zayıf bir moleküle çevirerek etkisizleştirme olan süpürme (scavenging), genellikle flavonoidler tarafından serbest radikallere bir hidrojen atomu vererek etkisizleştirme olan söndürme (quencher), serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı ortadan kaldırma olan onarma (repair) ve hemoglobin ve E vitamini tarafından serbest radikalleri bağlayarak fonksiyonlarını engelleme olan zincir reaksiyonlarını koparma (chain breaking) olarak isimlendirilen mekanizmalar ile serbest radikalleri etkisiz hale getirmektedir (Memişoğulları, 2005).

Ratnam ve arkadaşları (2006) ile Vaisi-Raygani ve arkadaşları (2007) tarafından oluşturulan antioksidan sınıflandırılması (Bkz. Şekil 2.2) aşağıda gösterilmiştir.

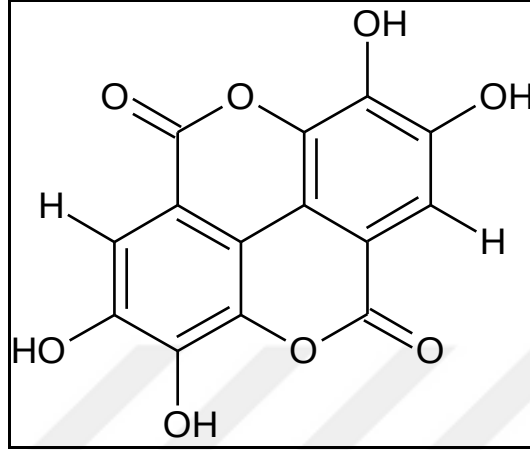


Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Son yıllarda hızla popüleritesi artan elajik asit ve kurkumin bu antioksidanlardan ikisidir.

2.2.1. Elajik Asit

Moleküler formülü $C_{14}H_6O_8$ olup kimyasal adı 2,3,7,8-Tetrahydroxy [1] benzopyrano [5,4,3-*cde*] [1] benzopyran-5,10-dione'dur (Bkz. Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Elajik asidin kimyasal formülü

EA, *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba), *Juglans regia* (Adi ceviz), *Terminalia chebula* (Kara halile), *Sanguisorba officinalis* (Çayır düğmesi), *Punica granatum* (Nar), *Rubus idaeus* (Ahududu), *Rubus caesius* (Böğürtlen) ve *Fragaria* L. (Çilek) gibi bitkilerden elde edilebilen bir non-enzimatik antioksidandır. Bu bitkilerin yaprak, meyve ve tohumlarında sekonder metabolit olarak oluşan elajitaninlerin hidrolizi sonucu meydana gelmekte olup antimutajenik, antigenotoksik, antiapoptotik, antikarsinojenik, antibakteriyal, antiviral, antimalaryal, antialerjik, antiinflamatuvar, antiaterojenik, antidiyabetik, antiepileptik, antidepresan, antianksiyetik, nöroprotektif, pnömoprotektif, nefroprotektif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antioksidan ve antifibroz özellikleri bulunan fenolik bir bileşiktir (Seeram vd., 2004; Edderkaoui vd., 2008; Çağlar vd., 2017; Erzurum, 2020).

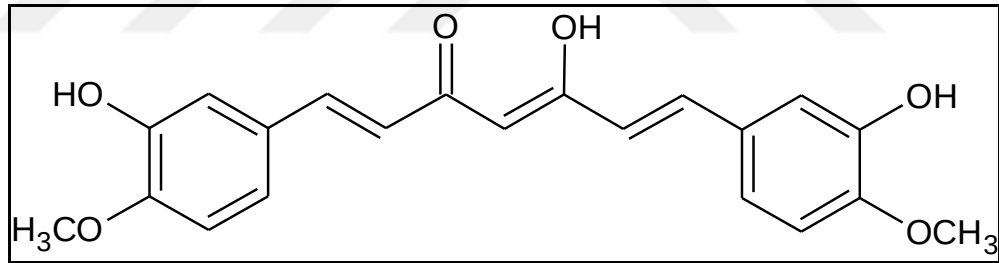
Elajitaninler, bitki hücrelerinde şeker molekülleri ile birleşmek suretiyle EA'ya dönüşerek veya asit ve bazlarla hidrolize olduklarında ester bağlarının parçalanması sonucu heksahidroksidifenik asite, sonrasında ise bu asitin kendiliğinden laktonize olmasıyla EA'ya dönüşerek dış ortama salgılanır. Dekarboksilasyon ve dehidroksilasyon reaksiyonları ile bağırsak mikroorganizmaları vasıtasıyla insan ve sıçanlarda hareket ve enerjiyi sağlamak amacıyla metabolize edilip ürolitin A ve metaboliti ürolitin B'ye dönüştürülür (Landete, 2011; Dördü, 2018; Eksen, 2020).

360°C'nin üzerinde erime noktasına sahip oldukça kararlı bir molekül olan EA, çoğunlukla doğada açık sarı renkte ve toz halinde bulunur. EA'nın, kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonları ile kompleks oluşturma (De Boer vd., 2004; Diop, 2013; Tıkırdık, 2019; Eksen, 2020), antioksidan aktiviteyi artırma, hücreleri oksidatif hasardan koruma özellikleri hidrofilik bölgesinden (Pari ve Siyasankari, 2008; Taşkın, 2017), ısıya dayanıklılık özelliği ise lipofilik bölgesinden kaynaklanmaktadır (Hurley, 1998; Çelik, 2012).

EA, metanol, etanol ve dimetil sülfoksitte daha iyi çözünürken (Aguilera-Carbo vd., 2008), suda daha az çözünmektedir (Bala vd., 2006). EA, emilmek suretiyle incebağırsak mukozasından genel dolaşıma geçtikten sonra irreversible olarak DNA ve proteinlere bağlanır (Whitley vd., 2003; Cerda vd., 2004).

2.2.2. Kurkumin

Kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$ olup kimyasal adı (1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-methoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion'dur (Bkz. Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kurkuminin kimyasal formülü

CUR, halk arasında “zerdeçal, zerdeçöp, sarı boya veya safran kökü” olarak bilinen Zingiberaceae familyasının önemli üyelerinden çok yıllık, büyük yapraklı ve sarı renkli *Curcuma longa* L.'nin en aktif bileşeni olan bir polivenoldür. DMSO (Dimetil sülfoksik), etanol ve asetonunda çözünebilirken suda çözünmeyen kimyasal bir yapıdan oluşmaktadır. Yaygın olarak Tayland, Çin, Hindistan, Bangladeş, Endonezya, Japonya, Tayvan, Burma gibi ülkelerde, Afrika, Karayipler, Güney Amerika'nın tropik iklimle sahip bölgelerinde ve ülkemizde Safranbolu ilçemizde yetişmektedir. Birçok ülkede yaklaşık olarak 6000 yıldır geleneksel tıp alanında kullanılmakta, gıda sanayinde baharat ve çay olarak tüketilmektedir (Ammon ve Wahl, 1991; Erarslan, 2021; Ekici, 2022).

Curcuma longa L.'nin, içeriğinde bulunan fenolik yapılarının antioksidan etkiler gösterdiğinin tespit edilmesi sağlık alanındaki önemini büyük ölçüde artırmıştır. Antioksidan enzimlerden süperoksit dizmutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazı tutarak lipid peroksidasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi lipid peroksidasyonunu tetikleyen serbest oksijen ve nitrojen dioksit radikallerinin CUR tarafından süpürüldüğü gösterilmiştir (Reddy ve Lokesh, 1992; Unnikrishnan ve Rao, 1992; Sreejayan ve Rao, 1994).

Yine yapılan çalışmalarda *Curcuma longa* L. bitkisinden elde edilen CUR'un, güçlü antioksidan, antibakteriyal, antikanserojen ve antitümör etki göstererek kanser ve kalp hastalıklarının sağaltımında kullanıldığı belirtilmiştir (Sharma, 1976; Toda vd., 1985; Ammon ve Wahl, 1991; Jitoe vd., 1992; Masuda vd., 1992; Khanna, 1999; Jayaprakasha vd., 2006; Kunnumakkara vd., 2007; Sandur vd., 2007; Sarvalkar vd., 2011).

2.3. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları

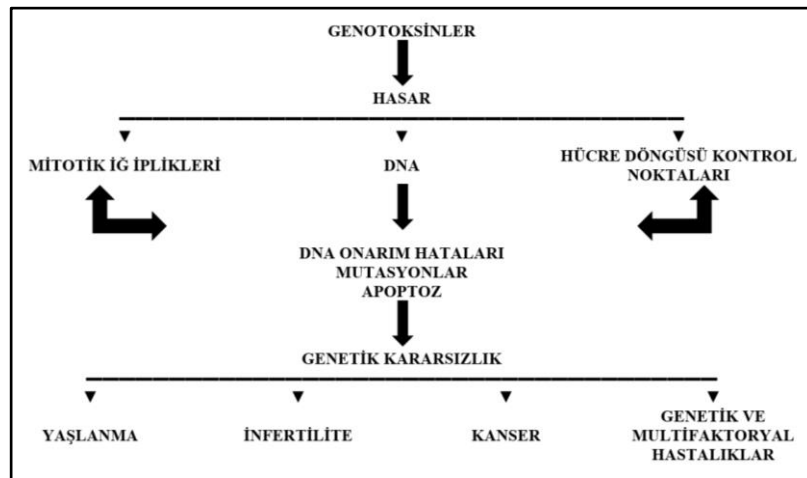
Kimyasal kirlenmenin özellikle son yıllarda artması, teknolojinin hızla gelişmesinin bir sonucudur. Kimyasal kirlilik havuzu olarak adlandırılan ve kimyasal maddeler tarafından oluşturulan bu kirlenme yaşamımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. İçtiğimiz suyla, soluduğumuz havayla, kullandığımız toprakla, tedavi amacıyla aldığımız ilaçlarla her gün kimyasal kirlenmeye maruz kalmaktayız.

Kimyasal maddelerin canlı organizmaların genetik yapısında meydana getirdiği hasarlar DNA onarım mekanizmalarıyla düzeltilmektedir. Ancak bu hasarların DNA onarım mekanizmalarıyla tamir edilemediği durumlarda germ ve somatik hücrelerde nokta ve genomik mutasyonlar veya kromozomal aberasyonlar meydana gelebilmektedir (Bostancı, 2014).

Hücrelerimiz, DNA mutasyonlarını kontrol etmeye veya etkisiz hale getirmeye çalıştıkları DNA onarım mekanizmalarına sahiptir. DNA onarımında meydana gelen hatalar, genomik kararsızlıkla karakterize sendromlara ve kanser insidansında artışa yol açtığından, DNA onarımının nasıl gerçekleştiğinin bilinmesi önem kazanmaktadır.

DNA onarım genleri iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımının düzenlenmesi ile ilgili genler ve hatalı eşleşme onarımı, baz ve nükleotid çıkarma onarımı ile ilgili genler olarak adlandırılmaktadırlar (Pfeifer vd., 1996; William ve Micheal, 2002; Gelbart vd., 2005). Bu genlerin yer aldığı onarım mekanizmaları ise direkt onarım veya hasarın geri döndürülmesi (fotoreaktivasyon, O-6-metilguanin onarımı ve basit tek zincir kırıklarının ligasyonu), ekzisyon veya kesip-çıkarma onarımı (baz ekzisyon onarımı, nükleotid ekzisyon onarımı ve yanlış eşleşme ekzisyon onarımı), rekombinasyonel onarım, SOS onarımı ve DNA çift zincir kırıklarının onarımı (serbest uçların homolog olmayan bağlanması ve homolog rekombinasyon) şeklindedir (Tuteja ve Tuteja, 2001; Carmichael vd., 2007; Bozyiğit vd., 2009).

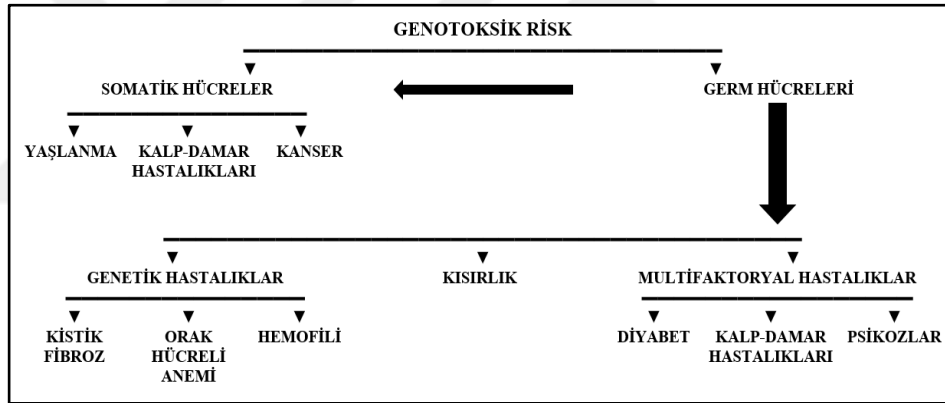
Genotoksik etkili olan fiziksel (UV radyasyon, iyonize radyasyon vb.) ve kimyasal (aflotoksin, vinil klorid, benzopren, ilaçlar, sigara, pestisitler, gıda katkı maddeleri, alkilleyici ajanlar, mustard gazları vb.) ajanlar DNA ile etkileşim kurarak genlerde veya kromozomlarda çeşitli hasarlara yol açmaktadırlar. DNA eklentileri veya zincir kırıkları, nokta ve genomik mutasyonlar veya kromozomal aberasyonlar gibi DNA, gen veya kromozomlarda meydana gelen hasarlar genotoksisite olarak adlandırılmaktadır (Şen vd., 2018). Şekil 2.5.'de gösterildiği gibi DNA'daki etkisini doğrudan veya genetik bilgiye dayanarak sentezlenen proteinlere bağlanmak suretiyle göstererek mutasyonlara sebebiyet veren kimyasal ve fiziksel ajanlar veya mutajenler, yaşlanmaya, infertiliteye, kansere, genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Kılıç, 2005; Bozyiğit vd., 2009; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).



Şekil 2.5. Genotoksin etkisi ve sonuçları

Genotoksinler, etkilerine bağılı olarak kanserojenler veya kansere neden olan ajanlar, mutajenler veya mutasyona neden olan ajanlar ve teratojenler veya doğum kusuruna neden olan ajanlar şeklinde kategorilere ayrılabilir (Natarajan, 1993).

Memeliler ve çok hücreli canlılarda somatik ve germ hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunur. Somatik hücreler memeli organizmalarının büyük bölümünü oluşturur ve genellikle genomları diploiddir. Bu hücrelerde gelişen genetik hasar mitoz sırasında yavru hücrelere aktarılabilir, ancak meydana gelen mutasyon gelecek nesilleri etkilemez. Şekil 2.6.'da görüleceği üzere somatik hücrelerde oluşan genetik hasar ökaryotik organizmalarda kansere sebep olabilir. Germ hücreleri ise çok hücreli organizmalardaki üreme hücreleridir. Bu hücreler mayoz sonucunda haploid kromozom taşır. Germ hücrelerinde gelişen genetik hasar sonraki nesillere aktararak yavrularda birçok kalıtsal genetik hasarın görülmesine yol açar (Rajendra vd., 2017).



Şekil 2.6. Genotoksisite riski

2.4. Genotoksisite Testleri

İnsanlar tarafından kullanılan kimyasal maddelerin sayısındaki artış ve genotoksik olanların ciddi sağlık sorunlarına yol açtıklarının anlaşılması, genotoksik ajanların test edilmesine olanak sağlayan genotoksite testlerinin geliştirilmesini sağlamıştır (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007; Şen vd., 2018).

Genotoksisite testleri, doğrudan veya dolaylı olarak çeşitli mekanizmalar tarafından genetik materyalde hasara yol açan herhangi bir maddeyi veya bileşiği tanımlamak için tasarlanmış *in vitro* ve *in-vivo* testler olarak açıklanabilir. Bu testler, DNA hasarı ve hasarın tespiti açısından tehlikenin boyutlarını tanımlamalıdır (Cimino, 2006).

Yine bu testler, genetik materyalde hasara yol açan herhangi bir maddeyi veya bileşiği test ederek genotoksisite ve karsinogeneze neden olma potansiyeline sahip olup olmadığını öngörmeye önemli bir rol oynamaktadır (Shah, 2012). Rutin olarak kullanılan ve tüm dünya otoriteleri tarafından geçerliliği kabul edilen genotoksisite testlerinin, farklı hücre tipleri üzerinde uygulanabilen 200'den fazla çeşidi bulunmaktadır (Bajpayee vd., 2005; Bostancı, 2014; Doğan vd., 2014).

Genotoksik etkilerin tek bir test yöntemiyle belirlenememesi, canlı hücrelerde farklı basamaklarda meydana gelmesi, uygulanan farklı yöntemler veya hücrelerde birbiri ile uyumsuz sonuçlar vermesi nedeniyle genotoksisite testlerinin birbirlerini tamamlayan birkaç testin birlikte kullanıldığı seri test yöntemleriyle değerlendirilmesi gerekmektedir (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007).

Ayrıca karsinogen ajanların %90'ının insanlar için genotoksik olduğu ve kanser ile genotoksisite arasında kuvvetli bir bağ bulunduğunun tespit edilmesi (Kılıç, 2005; Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011) sonucunda endüstriyel ve sağlık kuruluşları tarafından fiziksel ve kimyasal ajanların kanser potansiyellerini belirlemek amacıyla genotoksisite testlerini tarama testleri olarak kullanmaya başlamıştır. Genotoksisite testlerinden genotoksik etkili fiziksel ve kimyasal ajanların kanser riskinin belirlenmesi, ilaçların genetik etkilerinin ve güvenilirliklerinin araştırılması, DNA hasarlarının tespiti, DNA hasarı ile hastalık arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve kanserli hücrelerinin takibinin yapılmasında istifade edilmektedir.

Bu kapsamda, AMES testi, KA testi, MN testi, timidin kinaz geni *in vitro* gen mutasyon analizi, HPRT ve XPRT *in vitro* memeli gen mutasyon analizleri, rodent dominant letalite testi, memeli karaciğer hücrelerinde *in vivo* programlanmamış DNA sentezi testi ve comet analizi olmak üzere birçok genotoksisite testi mevcuttur.

2.4.1. Comet assay (alkali tek hücre jel elektroforezi)

Comet assay, mutajenik ve karsinogenik ajanlara maruz kalan canlı populasyonlarında ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını hücre bazında tespit etmek amacıyla kullanılan duyarlı, hızlı, güvenilir, basit, ucuz ve çok hassas bir yöntemdir.

Kullanım alanı oldukça geniş olan bu teknik Single Cell Gel Electrophoresis veya SCGE ve Microgel Electrophoretic Technique olarak da isimlendirilmektedir (Bilgici, 2005; Fidan, 2005; Durmaz vd., 2010).

DNA tek sarmal kırıklarının insan hücrelerinde ilk tespiti Rydenberg ve Johanson isimli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar tarafından agaroz gömülü hücreler hafif alkali ortamda lizise uğratarak parçalanmış ve DNA'nın açılması sağlanarak hücrelerden proteinler ayrıştırılmıştır. Sonrasında nötralizasyon işlemi uygulanarak DNA akrinin oranj ile boyanmış ve hasar fotometre aracılığıyla ölçülmüştür. Ölçüm çift zincirli DNA'yı temsil eden yeşil renkli floresansın, tek zincirli DNA'yı temsil eden kırmızı renkli floresansa oranı olarak yapılmıştır (Fairbairn vd., 1995).

Bu teknik 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından duyarlılığının artırılması amacıyla modifiye edilmiş ve DNA'da meydana gelen hasarın direkt olarak gösterilmesi sağlanarak Microgel Electrophoretic Technique veya Mikrojel Elektroforez olarak isimlendirilmiştir. Yüksek tuz ve deterjanlar kullanılarak lizis işlemine tabi tutulan agaroz jel içerisine gömüldükten sonra lam üzerine yayılan hücreler üzerinde nötral şartlarda elektroforez işlemi uygulanmış ve DNA akrinin oranj ve etidyum bromür ile boyanmıştır. DNA fragmanlarında meydana gelen kırıklar nedeniyle elektrik yük kazanan DNA'ların anoda doğru göç ederek baş ve kuyruktan oluşan kuyruklu yıldıza benzer görünüme sahip bir yapı oluşturmalarından dolayı tekniğin ismi Comet assay olarak adlandırılmıştır. DNA'da meydana gelen hasarın boyutu kuyruk uzunluğu ölçülerek saptanmıştır (Ostling ve Johanson, 1984; Tice vd., 2000; Ertürk, 2001).

Ancak nötral şartlarda DNA'nın çift sarmallı olması, tekniğin RNA'da hasara sebebiyet vermesi, kimyasal ve fiziksel ajanların genellikle tek sarmal kırıklarında meydana gelmesi, proteinlerin tam manasıyla DNA'dan uzaklaştırılamaması ve yalnızca çift sarmal kırıklarının tespit edilmesi gibi nedenlerden dolayı Singh ve diğer araştırmacılar tarafından 1988 yılında tek sarmal kırıklarını da tespit edebilen ($pH > 13$) Alkali Elektroforez Tekniği veya Alkalın Comet Yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem Single Cell Gel Electrophoresis veya SCGE olarak bilinmekte ve proteinlerin %100'e yakını uzaklaştırdığından DNA hasarlarının oranının direkt olarak tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 1988; Singh vd., 1990; Tice vd., 2000).

Elektroforez işleminde tekniğin duyarlılığı pH değerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yani nötral pH'da çift sarmal kırıkları, pH 12,3'de tek sarmal kırıkları ve tamir bölgeleri, pH>13'de alkali bölgeler, tek sarmal kırıkları ve tamir bölgelerinin tespiti mümkün olmaktadır (Rojas vd., 1999).

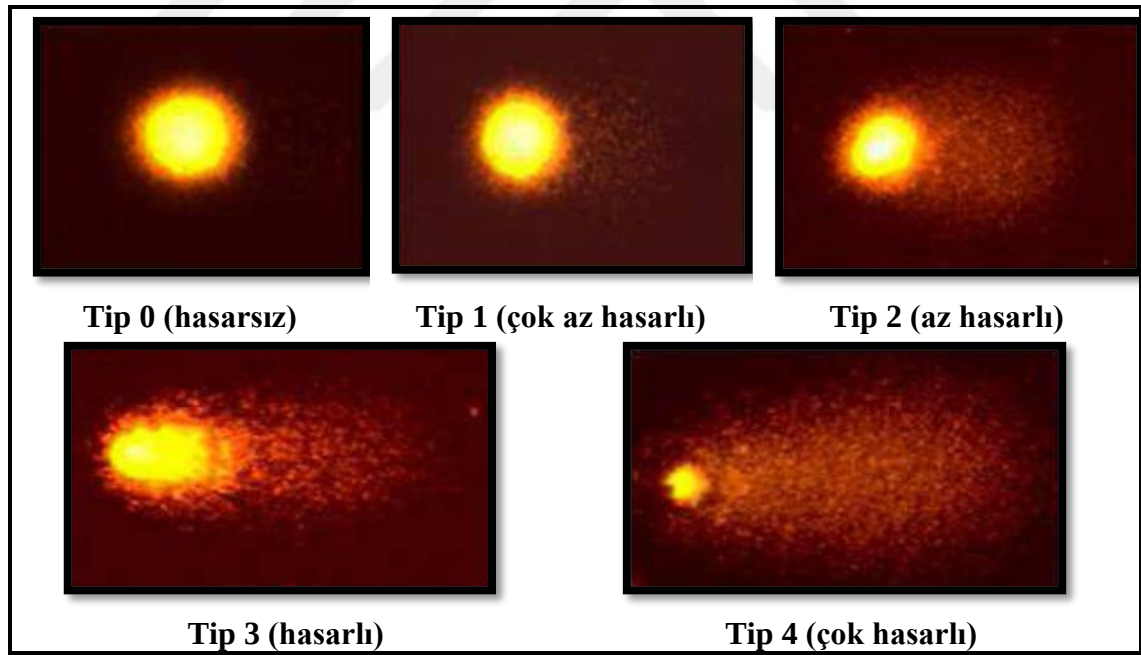
Ayrıca lezyon spesifik endonükleazlar kullanılarak DNA hasarını belirleyen ve klasik alkali comet yönteminden farklı olan yeniden düzenlenmiş farklı yöntemlerde bulunmaktadır. Hasara uğramış veya kaybolmuş bazlardan kaynaklı pH>13 şartlarında oluşan alkali labil bölgeler (AP) ve okside bazlar, baz ekzisyon tamiri (BER) esnasında meydana gelen ara ürünler olup kimyasal kararlılığın değişmesine sebebiyet vermektedirler. AP'lerin ve okside bazların varlığı lizis aşamasından sonra agaroz gömülü hücrelerin endonükleazlar ile muamele edilmesi yani endonükleazların kullanıldığı ek bir basamak ile comet yöntemiyle basitçe tespit edilebilmektedir (Collins vd., 2008).

Comet assay basamaklarından birisi olan lizis aşamasında nötral lizis solüsyonlarının kullanılması ile çift sarmal kırıkları tespit edilebilirken alkali lizis solüsyonlarının kullanılmasıyla da tek sarmal kırıkları tespit edilmektedir. Yine comet assay basamaklarından birisi olan elektroforez aşamasında 40 dk ve üzeri sürelerde comet oluşumunun fazlaştığı, sıcaklığın yükseltilmesi durumunda ise hücre duyarlılığının arttığı ve kontrol numunelerinde comet oluşumunun gözlemlendiği, maksimum ayırım ve duyarlılığın 15°C ve 40dk'lık sürede gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Rojas vd., 1999). Bu teknikte YOYO-1 ve gümüş yeşili boyalarının kullanılmasının hücre duyarlılığını artırdığı bildirilirken etidyum bromür, propidyum iyodür ve DAPI boyalarının en çok kullanılan boyalar olduğu bilinmektedir (Singh vd., 1994).

Comet assay boyama aşamasından sonra sonuçların değerlendirilmesinde non, low ve high migration terimlerinden yararlanılmaktadır. Non migration (göç olmayan) ile hasarsız, yuvarlak, ortası parlak ve kenarları düzgün hücreler, low migration (düşük göç) ile hasarın oluşmaya başlaması sonucu çekirdek dışına göç nedeniyle kenarları düzensizleşen ve uzayan hücreler, high migration (yüksek göç veya comet) ile hasarın artması neticesi kuyruklu yıldız şeklini alan hücreler belirtilmektedir. Son aşama ise hücrelerin apoptozise uğramasıdır (Grazeffe vd., 2008).

Çalışma sonucunda elde edilen DNA görüntüleri puanlandırılır (Bkz. Şekil 2.7). Hasar bulunmayan DNA'lar 0 ile puanlandırılırken hasarlı DNA'lar oluşan hasarın boyutuna göre 1 ve 4 arasında puanlandırılır (Collins 2004; Kumaravel vd., 2007).

Comet assay sonuçları birçok farklı parametre kullanılarak değerlendirilirken bu parametrelerden kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruklu hücrelerin yüzdesi en çok kullanılanlardır (Kobayashi vd., 1995). Bilgisayar destekli görüntüleme programlarında comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametrelerle analiz yapılabilir. Kuyruktaki % DNA yoğunluğu, DNA zincir kırığı sıklığıyla doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve göreceli kuyruk yoğunluğu içeren formüllerle hesaplanan bir parametredir. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve AP'lerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Collins vd. 2004).



Şekil 2.7. DNA görüntülerinin puanlandırılması

2.4.2. Comet assay tekniğinin avantajları ve dezavantajları

Comet yönteminin avantajları; analizlerin az sayıda hücre ile gerçekleştirilebilmesi, DNA hasarlarının kolaylıkla tespit edilebilmesi, uygulamasının kolay ve hassas olması, fazla donanım gerektirmemesi, değişik hücre ve dokular ile çalışılabilmesi, güvenli ve ekonomik olması ve hızlı bir şekilde sonuç verebilmesi şeklinde sıralanabilir.

Comet tekniğinin uygulama basamaklarında agaroz ve hücre miktarı, elektroforez süresi, kullanılan nötral ve alkali lizis solüsyonları gibi farklılıklar veya aynı tekniği uygulayan farklı laboratuvarlar arasındaki sonuçların birbirini tutmaması başta gelen dezavantajlardan biridir (Forchhammer vd., 2008). Sonuçların birbirini tutmaması comet sayımı yapan araştırmacılardan kaynaklanırken, bu farklılıkların ortadan kaldırılması için comet sayımı yapan kişinin tecrübeli ve tekniğin her aşamasında yani başından sonuna kadar araştırmanın başında bulunması gerekmektedir.

Son yıllarda tekniğin uygulanmasında genellikle biyoizleme çalışmalarında, lökositler kullanılmaktadır. Ancak özellikle yeni veya taze izole edilen lökositlerin test aşamasında hasar meydana getiren genotoksik ajanlarla muamelesi sonucu hasar onarımının çok yavaş gerçekleştiği anlaşılmıştır (Collins vd., 2008). Bu kapsamda her ne kadar literatürde teknikte uygulanacak hücreler ile ilgili DNA zincir kırıklarının oluşacağı ve hücrelerin canlılığını yitirmeyeceği konsantrasyon ve süre belirtilmiş olsa bile bu parametrelerin araştırmacı veya uygulayıcı tarafından belirlenmesi ve test edilmesi gerekmektedir. Ayrıca lökositler ile yapılan çalışmalarda tespit edilen hasarlar organizmanın genel durumunu gösterirken özel bir dokuda meydana gelen hasarları göstermemektedir (Dinçer ve Kankaya, 2010).

2.4.3. Comet assay kullanım alanları

2.4.3.1. Genotoksisite ve sitotoksisite araştırmaları

Genetik toksikolojide *in vitro* ve *in vivo* olarak önemli bir uygulama alanına sahip olan ve DNA sarmal kırıklarıyla özgülleşen comet tekniğiyle her türlü değişik hücre ve dokular üzerinde çalışılabilmektedir.

Genotoksik ve mutajenik ajanların değişik hücre ve dokular üzerinde meydana getirdiği bilinen DNA hasarları bu yöntemle tespit edilirken ayrıca yine bu yöntemle DNA üzerinde meydana getirdikleri hasarlar tam olarak bilinmeyen kimyasalların etkileri de (toksik etki veya doz-toksisite ilişkisi) belirlenebilmektedir.

Her türlü değişik hücre ve dokular üzerinde DNA tek ve çift sarmal kırıklarının belirlenmesinde az miktarda hücreye ihtiyaç duyulması, tekniğin sadece birkaç saat içerisinde tamamlanabilmesi ve uygun görüntüleme cihazlarının mevcut olması halinde sonuçların hemen değerlendirilebilmesi, fazla donanım gerektirmemesi ve ucuz olması gibi faktörler comet assay tekniğini diğer tekniklerden ayırmaktadır (Hartman vd., 2003; Tice vd., 2000; Collins, 2004).

2.4.3.2. DNA onarım araştırmaları

Comet assay tekniğinin elektroforez aşamasında, baz ekzisyon tamiri özel bir endonükleaz hasar bölgesine yakın bir noktada DNA sarmalını keserek kısa ömürlü sarmal kırıklarına neden olarak DNA göçünü artırır. Kırık uçların onarılması için elektroforez ortamına uygun sıcaklıkta deoksiribonukleozit trifosfatlar eklenerek inkübe edilmesi gerekmektedir ve bu onarım mekanizması comet assay ile belirlenebilmektedir (Collins vd., 1994; Collins vd., 1995; Collins, 2004).

2.4.3.3. Apoptozis araştırmaları

Comet assay tekniğinin elektroforez aşamasında baz ekzisyon tamiri esnasında olduğu gibi DNA çift sarmal zincir kırıklarının nekroz veya sitotoksisite (apoptoz aracılı) sebebiyle oluşarak DNA göçünü artırdığı ve uygun ortamda (nötral veya alkali) bu hücrelerin tespit edilebildiği gibi birbirlerinden de cometların görünümlerine bakılarak rahatlıkla ayırt edilebildiği bildirilmiştir. Genellikle başı küçük ve kuyruğu yelpaze şeklinde olan cometlar apoptotik hücreleri, başı geniş ve kuyruğu dar olan cometlar ise nekrotik hücreleri göstermektedir (Mark ve Fox, 1991; Olive vd., 1993; Elia vd., 1994; Fairbairn vd., 1996; Kizilian vd., 1999).

2.4.3.4. Antioksidan araştırmaları

Comet assay, oksidatif stresin neden olduğu hastalıklara karşı kullanılmak üzere antioksidan mekanizmaları araştırmalarında *in vitro* ve *in vivo* olarak kullanılan/başvurulan bir yöntemdir. Antikosidanların, oksidatif stresin neden olduğu hasarları önlediği ve sınırladığı bilindiğinden bu maddelerin klinik çalışmalarda kullanılması için günümüzde araştırmalar artarak devam etmektedir (Wu vd., 2007; Baumeister vd., 2009).

2.4.3.5. Biyoizleme araştırmaları

Comet assay, günümüzde özellikle insan populasyonlarında biyoizleme (human biomonitoring) alışmalarında yukarıda bahsedilen avantajlarından ötürü kullanılmaktadır.

Biyoizleme alışmaları sonucunda comet assay tekniği ile biyolojik süreçler (yaşlanma, beslenme vb.) takip edilebilir, canlı organizmalar üzerinde çevresel kirlilik ve değişimlerin etkisi anlaşılabilir, hipoksi, ozon ve kemoterapi etkileri değerlendirilebilir, sperm DNA'sının kalitesi belirlenebilir, oksidatif stres ve radyasyon duyarlılığı incelenebilir, çeşitli kimyasallara kaza sonucu veya mesleklerinden ötürü maruz kalan kişilerde DNA hasarının boyutu tespit edilebilir.

2.4.3.6. Klinik araştırmalar

Klinik alışmalar neticesinde comet assay tekniği ile bazı patolojik hastalıklardaki (diabetes mellitus, katarakt, romatoid artrit, lupus eritematozus, polikistik over sendromu, Alzheimer vb.) ve sigara içen bireylerdeki DNA hasarı tespit edilebilir, doğum öncesi kalıtsal hastalıkların, kanserin ve tedavisinin takibi yapılabilir (Dinçer ve Kankaya, 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

- | | |
|-----------------------------|---------------------------|
| -Hassas terazi | -Otomatik mikro pipetler |
| -pH metre | -Rodajlı lam |
| -Soğutmalı santrifüj | -Lamel |
| -Elektroforez tankı | -Ependorf tüpü |
| -Otoklav | -Serolojik cam pipet |
| -Floresan mikroskop | -Heparinli tüp |
| -Mikrodalga fırın | -Pastör pipeti |
| -Su banyosu | -Şale |
| -Termometre | -Mezür |
| -Buzdolabı | -Steril lateks eldiven |
| -CO ₂ inkübatörü | -Parafilm |
| -Vorteks | -Steril santrifüj tüpleri |
| -Laminar akışlı kabin | -Thoma lamı |

3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

- LUC (PhytoLab)
- CUR (Sigma)
- EA (Acros Organics)

- DMSO (Merck)
- Roswell Park Memorial Medium-RPMI-1640 (Sigma)
- Fosfat tamponlu salin-PBS (Biowest)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries)
- L-Glutamine Solution (Sartorius)
- NaCl-Sodyum klorür (Merck)
- KCl-Potasyum klorür (Merck)
- Ficoll (Sigma)
- Etidyum bromid (Sigma)
- Triton X-100 (Merck)
- Etilendiamin tetraasetik asit-EDTA (Sigma)
- Trisaminometan-Tris base (Merck)
- LMA-Düşük Kaynama Dereceli Agaroza (MP Biomedicals)
- NMA-Normal Kaynama Dereceli Agaroza (Sigma)
- KH₂PO₄-Mono potasyum fosfat (Carlo erba)
- Na₂HPO₄-Disodyum fosfat (Merck)
- NaOH-Sodyum hidroksit (Merck)
- Tripan Mavisi (Sigma)

3.1.3. Kan örneklerinin alınması

Sigara ve alkol gibi zararlı maddeler ve düzenli olarak ilaç kullanmayan, genetik bir hastalığı olmayan, sağlıklı, 20- 24 yaş aralığında, gönüllü iki kadın ve iki erkek olmak üzere toplam dört kişiden heparinli tüplere yaklaşık 5 mL intravenöz kan örneği alınarak iki saat içerisinde çalışılmıştır. Gönüllülere Bilgilendirilmiş Onam Formları imzalatılmıştır.

3.1.4. Kimyasal konsantrasyonlarının belirlenmesi

LUC, CUR ve EA'nın alkali tek hücre jel elektroforezi analizinde kullanılacak en uygun konsantrasyonunu belirlemek amacıyla doz belirleme çalışmaları ve literatür taraması yapılmıştır. CUR için 0,5 ve 1 μ M ile EA için 50 ve 100 μ M dozlar belirlenerek sitotoksik olmayan dozlar çalışılmıştır. LUC için ise 200 μ M seçilmiştir. Negatif kontrol olarak çalışmamızda etkisi belirlenecek olan tüm kimyasalların çözücüsü olan %10 DMSO, pozitif kontrol olarak ise 1 mM EMS kullanılmıştır. Deney grubu olarak LUC için 200 μ M, EA için 50 ve 100 μ M, CUR için 0,5 ve 1 μ M'lık dozlar 24 saatlik uygulamalarda kullanılmıştır. Ayrıca LUC ile ayrı ayrı EA ve CUR dozları ve LUC ile EA ve CUR'a ait en yüksek dozlardan oluşan kombine grupların uygulanmasıyla toplamda 12 grup oluşturularak çalışılmıştır.

3.1.5. Comet analizinde kullanılan çözelti ve tamponların hazırlanması

3.1.5.1. Fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4, 1000 mL)

Bir beher içerisine ayrı ayrı tartılmak suretiyle; 136 mM (7,937 g) NaCl, 2,7 mM (0,201 g) KCl, 10 mM (4196 g) Na₂HPO₄, 10 mM (1,3606 g) KH₂PO₄ konulduktan ve üzerlerine 600 mL distile su eklendikten sonra karıştırılmış ve ısıtılarak çözünmeleri sağlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu yapılarak çözelti pH'sı 7,4'e ayarlanmış ve cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 1L'e tamamlanmıştır. 2-8 °C'de buzdolabında kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.1.5.2. Lizis çözeltisi (pH 10, 500 mL)

Bir beher içerisinde ayrı ayrı tartılmak suretiyle; 136 mM (7,937 g) NaCl, 100 mM, (18,6 g) EDTA, 10 mM, (0,6 g) Tris tartıldıktan sonra üzerlerine 350 mL distile su eklenmiş ve karıştırıcı yardımıyla çözünmeleri sağlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu yapılarak çözelti pH'sı 10'a ayarlanmış ve cam şişeye aktararak son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. 2-8 °C'de buzdolabında kullanılmak üzere saklanmıştır.

Çözeltimiz kullanılmadan bir saat önce; 1mL %1'lik Triton-X100'den 1 mL, %10'luk DMSO'dan 10 mL alınmış ve son hacim 100 mL olacak şekilde lizis çözeltisi ile mezürde tamamlanmıştır. Sonrasında soğuk lizis için buzdolabında bekletilmiştir. DMSO kullanılmasının amacı hemoglobinlerde üretilen serbest demir radikallerinin temizlenmesidir.

3.1.5.3. Elektroforez tamponu (pH 13,1, 1000 mL)

Farklı beherler içerisinde ayrı ayrı tartılmak suretiyle;

Stok 1: 10 N (200 g) NaOH ile 500 mL distile su,

Stok 2: 200 mM (14,89 g) EDTA ile 200 mL distile su karıştırılmıştır.

Stoklar oda sıcaklığında saklanmıştır. Çözeltiler kullanılırken Stok 1'den 30 mL, Stok 2'den 5 mL bir mezüre konulmuş ve üzeri 1000 mL distile su ile tamamlanarak karıştırılmıştır. Çözeltinin pH 13'den büyük olması sağlanmış ve elektroforez tankının hacmine göre toplam hacim ayarlanmıştır.

3.1.5.4. Nötralizasyon çözeltisi (pH 7,5, 250 mL)

0,4 M, (15,76 g) Tris tartılarak bir beher içerisinde konulmuş, üzerine 150 mL distile su eklenerek magnet yardımıyla karıştırılmış, pH metrenin kalibrasyonu yapılarak çözeltinin pH'sı 7,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kapaklı cam bir şişeye aktararak distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılacağı zamana kadar 2- 8°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.5.5. Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA)

LMA'dan 0,75 g tartılarak üzerine 10 mL PBS (10 mM, pH 7,4) eklenmiş, ağzı parafilm ile kapatılmadan önce bir taşım kaynatılmış (400 Watt mikrodalga fırında) ve kullanılacağı zamana kadar 2- 8 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.5.6. Normal kaynama dereceli agaroz (NMA)

NMA'dan 1 g tartılarak üzerine 100 mL PBS (10 mM, pH 7,4) eklenmiş, ağzı parafilm ile kapatılmadan önce bir taşım kaynatılmış (400 Watt mikrodalga fırında) ve kullanılacağı zamana kadar 2- 8 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.5.7. Boyama çözeltileri

İzole edilen lenfositlerden 10 µL alınarak üzerine 20 µL tripan mavisi boyası eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra comet gözlenmesi için floresan bir boya olan sıvı etidyum bromid'den 20 µL alınmış ve üzerine 9,980 µL distile su eklenerek cam bir şişeye konulmuş, cam şişenin yüzeyi ışık almaması amacıyla alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Comet analizi basamakları

Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen metoda göre Comet assay uygulama aşamaları;

- 1- Hücresel materyalin hazırlanması,
- 2- Lamların hazırlanması,
- 3- Lizis,
- 4- Alkali ortamda DNA sarmalının çözülmesi/açılması,
- 5- Elektroforez,
- 6- Nötralizasyon,
- 7- Boyama,
- 8- Comet görüntüleme ve değerlendirme şeklinde sıralanmaktadır.

3.2.1.1. Hücresel materyalin hazırlanması

Lenfosit izolasyonu: İçerisinde 1 g'ı 10 mL distile suda çözülerek hazırlanmış 3 mL ficol içeren tüplere 3 mL periferel kan eklenmiştir. Ardından 25°C'de 2000 rpm 30 dk santrifüj edilmiş, en üstteki serum tabakası uzaklaştırılarak hemen altındaki bulutumsu görünümde olan tabaka dikkatli bir şekilde boş falkon tüpüne alınmış ve 3 mL PBS karıştırılmıştır. Tekrar oda sıcaklığında 2000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak tüpün altında kalan hücre peleti tüpün alt kısmına sertçe vurularak tekrar çözündürülüp içerisine 1 mL RPMI-1640 meduim eklenmiş ve stok lenfositler oluşturulmuştur.

Lenfosit sayımı: İzole edilen lenfositlerden 10 µL alınarak temiz Thoma lamına konulmuş ve üzerine 20 µL Trypan Blue eklenmiştir. İki dakikadan az olmamak şartıyla bekletildikten sonra thoma lamına yayılmış ve ışık mikroskopu altında hücreler sayılmıştır. Canlı hücre yüzdesi $\text{Canlı Hücre (\%)} = (\text{Canlı hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$ formülüyle hesaplanmıştır. Yaşayan hücrelerin renksiz ve parlak, ölü hücrelerin ise mavi renkli olduğu hususu göz önüne alınarak hücreler sayılmış ve canlı hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Yaşayabilirlik değerlendirmesinin yapılması için canlılık oranının %80'in üstünde olması gerekmektedir.

3.2.1.2. Mikroskop lamalarının hazırlanması

Lamlar, agaroz ile kaplanacak yüzeylerinin kullanım esnasında karışmaması amacıyla işaretlenmiştir. NMA, 70°C'de su banyosunda bekletilmiştir. İşaretlenen ve kullanıma hazır hale getirilen lamaların traşlı bölgeleri yarıya kadar NMA'ya batırılmış, işaretlenmemiş arka yüzeyleri temiz bir bez ile silinerek kurumaya bırakılmıştır.

Stok lenfosit kültüründen alınarak ependorf tüplerine konulan 300 µL'lik lenfositler üzerine her bir kimyasaldan belirlenen dozlarda hazırlanan deney gruplarına ait çözeltilerden ayrı ayrı 300 µL alınarak eklenmiş ve süspanse edilmiştir. Süspanse edilen çözelti 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasında 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan çözeltinin süpernatant kısmı atılarak üzerine 100 µL PBS eklenmiş ve tekrar süspanse edilmiştir. Süspanse edilen lenfositlerin üzerine 75 µL LMA eklenerek homojeniteyi sağlamak amacıyla pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

DNA'da ekstra hasar oluşmasına yol açmamak adına loş ışıktaki, önceden hazırlanan ve toz almayacak şekilde muhafaza edilen NMA ile kaplanmış lamalar üzerine bu karışımdan 150 µL alınarak yayılmış ve lamelle kapatılmıştır. Agarın katılarak lama sabitlenmesi için buz üzerinde 10-15 dk bekletildikten sonra lameller kenarlarından çekilmek suretiyle özenle alınmış ve lizis aşamasına hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.3. Lizis

Lamalar, içerisinde taze olarak hazırlanan ve buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisi bulunan cam şaleler içerisine yüzeyleri tamamen kaplanacak şekilde yerleştirilmiştir. Cam şalelerin yüzeyleri ışık almamaları amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve buzdolabında 3 saat (en az 1, en fazla 16 saat) bekletilmiştir. Bunun amacı yüksek oranda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisi ile muamele neticesinde hücre ve çekirdek zarlarının parçalanarak hücre içeriği çekirdekte uzaklaştırılması ve DNA'nın süperkoil yapısında kalmasıdır. Lizis aşaması sonucunda lamalar nötralizasyon tamponu ile yıkanarak hücre, tuz ve deterjan artıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.1.4. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması ve elektroforez

Lizis aşaması sonrası lamalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Önceden hazırlanan ve pH'ı 13'ten fazla olan elektroforez tamponu lamaların üzerini tamamen kapatacak şekilde yavaş yavaş tanka eklenmiştir. Elektroforez tankının çevresi ışık almayacak şekilde kapatılmış ve tanka yerleştirilen lamalar 20-25 dk bekletilerek alkali ortamda DNA yapısının açılması sağlanmıştır. Bekleme süresi sonunda elektrik akımıyla negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesini sağlamak amacıyla 25 V (volt), 300 mA'de 20 dk yürütülmüştür.

3.2.1.5. Nötralizasyon

Yürütme işlemi sonrasında DNA'da ekstra hasar oluşmasına yol açmamak adına loş ışıktaki tanktan alınan lamalar, elektroforez tamponunu uzaklaştırmak amacıyla 5 dk ve 3 kez nötralizasyon tamponuyla yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

3.2.1.6. Lamların boyanması

Floresan renk vermesi amacıyla her bir lama mikro pipet yardımıyla 50 µL etidyum bromür boyası damlatılarak lamelle kapatılmış ve boyama işleminin tamamen oluşması için 10-15 dk bekletilmiştir.

3.2.1.7. Lamların değerlendirilmesi

Boyama işleminden sonra hazırlanan preparatlar Leica marka floresan mikroskopunda 400X objektif kullanılarak bilgisayarlı görüntüleme sistemi yardımıyla aşırı kuyruk oluşturan veya üst üste binen hücreler göz ardı edilerek değerlendirilmiştir. Her bir uygulama grubu için DNA hasar derecesinde DNA kuyruk yoğunluğu ve DNA kuyruk göçü esas alınarak en az 50 adet hücre görüntüsü kaydedilmiştir. Her bir kategorideki DNA hasarı belirlenerek formüller ile tanımlanan GHİ ve HHY değerleri hesaplanmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi aşağıdaki formüller kullanılarak belirlenmiştir (Çelik vd., 2014).

Genetik hasar indeksi (GHİ): $[(\text{Tip0x0}) + (\text{Tip1x1}) + (\text{Tip2x2}) + (\text{Tip3x3}) + (\text{Tip4x4})]$

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY): $(\text{Tip2}) + (\text{Tip3}) + (\text{Tip4})$

Uygulama gruplarına ait görüntü analizi ve alkali comet sayımı için her bir gönüllüden 50'şer comet olmak üzere kuyruktaki % DNA yoğunluğu, % kuyruk uzunluğu ve % kuyruk momenti değerlendirilmiştir.

3.2.2. İstatistiksel analiz

Alkali comet analizinde Open Comet programı kullanılmıştır. Program vasıtasıyla DNA hasar dereceleri hücrelerin kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk momenti parametreleriyle tespit edilmiştir. Nicel veriler ortalama±standart hata ile özetlenmiştir. IBM SPSS Statistics software (SPSS v22) programıyla elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla uygulama grupları hem kendi aralarında hem pozitif kontrol değerleri hem de negatif kontrol değerleri ile kıyaslanmıştır. Değerlendirmeler yapılırken, p değeri (güven aralığı) 0,05 ve 0,001 olarak alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Genotoksisitenin belirlenmesi için negatif kontrol (%10 DMSO), genotoksik hasar oluşturduğu bilinen kimyasal ajan olarak pozitif kontrol (1 mM EMS), lusidin (LUC; 200 μ M), elajik asit (EA; 50 ve 100 μ M), kurkumin (CUR; 0,1 ve 1 μ M), LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR grupları olmak üzere toplam 12 çalışma grubu oluşturulmuş ve uygulamalar yapılmıştır. LUC, EA ve CUR dozları ile ayrı ayrı ve kombine şekilde 24 saat muamele edilen hücreler comet assay ile analiz edilmiştir. LUC+EA ve LUC+CUR kombinasyonları için EA ve CUR'un artan konsantrasyonları kullanılırken LUC+EA+CUR kombinasyon grubunda EA ve CUR konsantrasyonları sabit tutularak en yüksek konsantrasyonları uygulanmıştır.

4.1. Tripan Mavisi Boyası ile Canlı Hücre Sayım Bulguları

Comet testinde, bir ajanla muamele gören hücrelerde izole edilen hücrelerin canlılık oranının en az %80 değerinde olması gerekmektedir. Tripan mavi boyası ile canlılık testi gerçekleştirilmiş ve tüm gönüllülere ait sonuçlar Tablo 4.1-Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tripan mavisi testi ile gönüllü 1'e ait hücresel canlılık sonuçları

	Canlı hücre	Ölü hücre	% Canlılık
Gönüllü 1			
NK (DMSO)	524	39	93,07
PK (1 mM EMS)	195	48	80,24
200 μ M LUC	178	41	81,27
50 μ M EA	115	8	93,49
100 μ M EA	336	11	96,82
0,5 μ M CUR	370	34	91,58
1,0 μ M CUR	105	6	94,59
200 μ M LUC+50 μ M EA	156	27	85,24
200 μ M LUC+100 μ M EA	125	16	88,65
200 μ M LUC+0,5 μ M CUR	105	21	83,33
200 μ M LUC+1,0 μ M CUR	165	23	87,76
200 μ M LUC+100 μ M EA+1 μ M CUR	197	20	90,78

Tablo 4.2. Tripan mavisi testi ile gönüllü 2'ye ait hücresel canlılık sonuçları

	Canlı hücre	Ölü hücre	% Canlılık
Gönüllü 2			
NK (DMSO)	168	12	93,33
PK (1 mM EMS)	186	41	81,93
200µM LUC	165	40	80,48
50µM EA	360	32	91,83
100µM EA	105	12	89,74
0,5µM CUR	181	24	88,29
1,0µM CUR	105	10	91,30
200µM LUC+50µM EA	115	20	85,18
200µM LUC+100µM EA	188	26	87,85
200µM LUC+0,5µM CUR	137	21	86,70
200µM LUC+1,0µM CUR	448	60	88,18
200µM LUC+100µM EA+1µM CUR	521	58	89,98

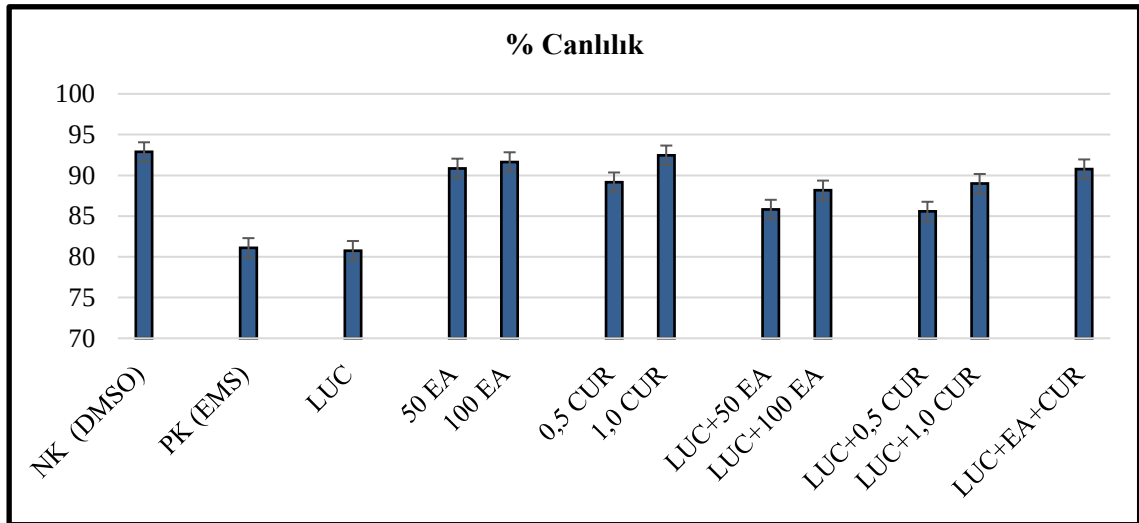
Tablo 4.3. Tripan mavisi testi ile gönüllü 3'e ait hücresel canlılık sonuçları

	Canlı hücre	Ölü hücre	% Canlılık
Gönüllü 3			
NK (DMSO)	370	29	92,73
PK (1 mM EMS)	523	120	81,33
200µM LUC	169	40	80,86
50µM EA	183	21	89,70
100µM EA	442	46	90,57
0,5µM CUR	239	33	87,86
1,0µM CUR	368	27	93,16
200µM LUC+50µM EA	281	46	85,93
200µM LUC+100µM EA	346	43	88,94
200µM LUC+0,5µM CUR	105	19	84,67
200µM LUC+1,0µM CUR	171	20	89,52
200µM LUC+100µM EA+1µM CUR	177	17	91,23

Tablo 4.4. Tripan mavisi testi ile gönüllü 4'e ait hücresel canlılık sonuçları

	Canlı hücre	Ölü hücre	% Canlılık
Gönüllü 4			
NK (DMSO)	531	44	92,34
PK (1 mM EMS)	178	42	80,90
200µM LUC	160	39	80,40
50µM EA	122	16	88,40
100µM EA	279	33	89,42
0,5µM CUR	417	52	88,91
1,0µM CUR	435	44	90,81
200µM LUC+50µM EA	391	59	86,88
200µM LUC+100µM EA	123	18	87,23
200µM LUC+0,5µM CUR	380	54	87,55
200µM LUC+1,0µM CUR	265	28	90,44
200µM LUC+100µM EA+1µM CUR	377	37	91,06

Tripan mavisi testi ile tüm gönüllülere ait hücresel canlılık değerlerinden elde edilen verilerle tüm uygulama gruplarının ortalama hücresel canlılık değerleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

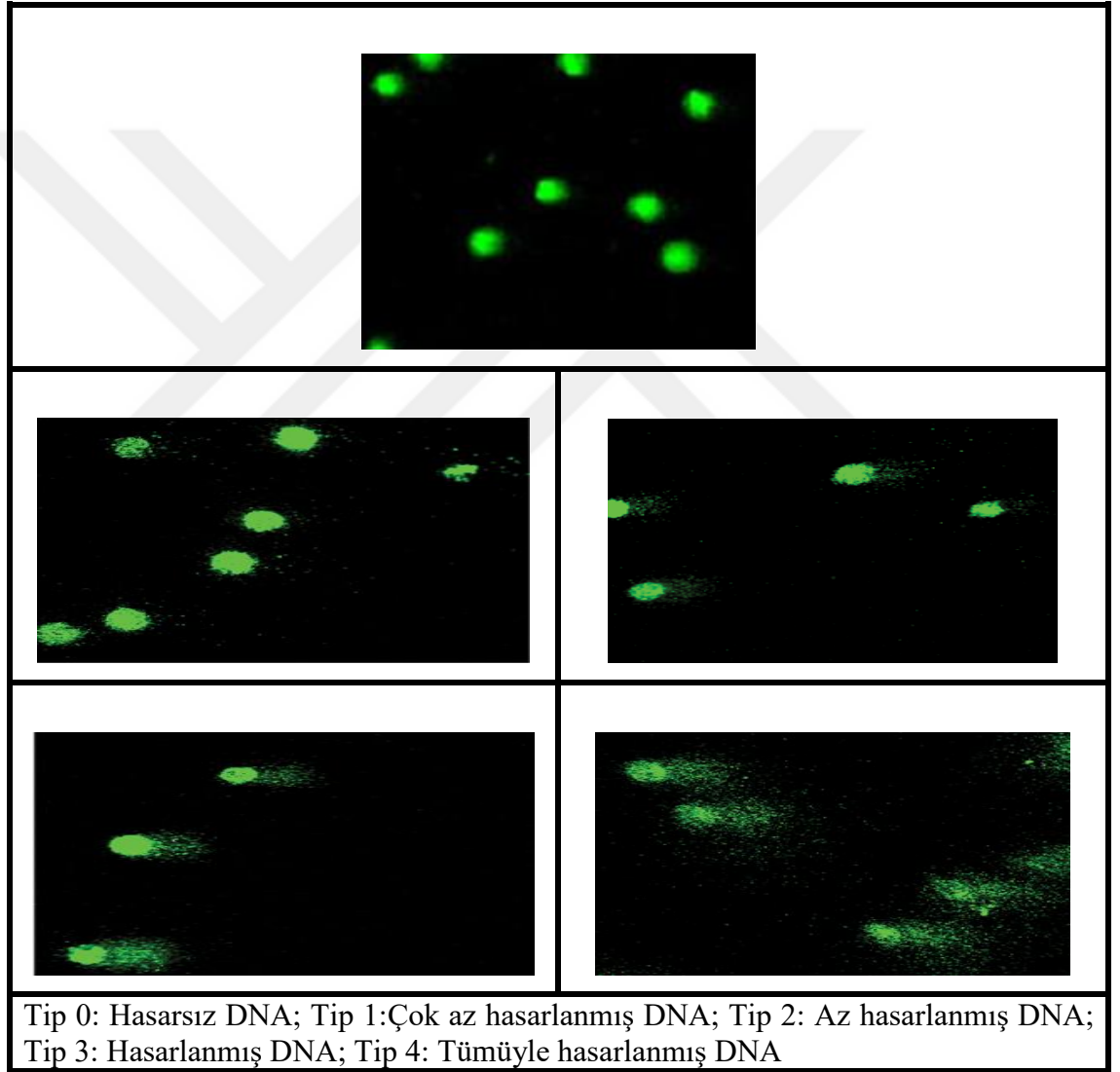


Şekil 4.1. Tripan mavisi testi ile belirlenen tüm uygulama gruplarına ait ortalama hücresel canlılık grafiği

% canlılık değerlerinin LUC grubunda DMSO kontrole göre düşerken EA ve CUR ile LUC+EA ve LUC+CUR kombinasyon gruplarında artarak kontrole yaklaştığı görülmektedir.

4.2. Alkali Comet Testi Görsel Analiz Bulguları

Alkali comet testi sonucunda gözlenen hücre tiplerinin fotoğrafları Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2. Alkali comet yöntemi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA’ların floresan mikroskop görüntüleri

Her bir gönüllüye ait uygulama gruplarından 100'er hücre sayılmış ve sayılan hücreler uğramış oldukları hasara göre tip 0, tip 1, tip 2 tip 3 ve tip 4 olmak üzere beş grupta sınıflandırılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda kimyasal ajanlara maruz bırakılmış insan periferel kan lenfositlerinde alkali comet test yöntemi ile genetik hasar indeksi (GHİ) ve hasarlı hücre yüzdesi (HHY) değerleri belirlenmiştir.

Genetik hasar indeksi (GHİ) sayılan 100 hücre içerisinde elde edilen tip 0, tip 1, tip 2 tip 3 ve tip 4 değerleri hesaba alınarak belirlenirken, hasarlı hücre yüzdesi (HHY) sayılan 100 hücre içerisindeki tip 2, tip 3 ve tip 4 düzeyinde hasar görmüş hücrelerin toplam sayısını göstermektedir. Tüm gönüllülere ait alkali comet sonuçları Tablo 4.5-Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 1'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri

Gruplar	N	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHİ	HHY
NK (%10 DMSO)	100	87	7	4	1	1	0,22	6
PK (1 mM EMS)	100	62	6	5	10	17	1,14	32
200µM LUC	100	69	0	1	9	21	1,13	31
50µM EA	100	91	4	4	1	0	0,15	5
100µM EA	100	94	4	2	0	0	0,08	2
0,5µM CUR	100	88	8	4	0	0	0,16	4
1,0µM CUR	100	92	5	3	0	0	0,11	3
200µM LUC+ 50µM EA	100	76	12	7	3	2	0,43	12
200µM LUC+ 100µM EA	100	84	9	5	1	1	0,26	7
200µM LUC+ 0,5µM CUR	100	74	7	9	7	3	0,58	19
200µM LUC+ 1,0µM CUR	100	81	10	6	1	2	0,33	9
200µM LUC+ 100µM EA+ 1µM CUR	100	85	6	4	4	1	0,3	9

Gönüllülere ait tüm DMSO negatif kontrol ile EMS pozitif kontrol gruplarında belirlenen GİH oranı kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,001$).

Tablo 4.6. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 2'ye ait hasarlı kan hücreleri değerleri

Gruplar	N	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	HHY
NK (%10 DMSO)	100	86	8	5	1	0	0,21	6
PK (1 mM EMS)	100	69	4	6	9	12	0,91	27
200µM LUC	100	71	1	3	8	17	0,99	28
50µM EA	100	88	6	3	3	0	0,21	6
100µM EA	100	93	5	1	1	0	0,1	2
0,5µM CUR	100	90	6	2	1	1	0,17	4
1,0µM CUR	100	91	6	2	1	0	0,13	3
200µM LUC+ 50µM EA	100	81	13	3	2	1	0,29	6
200µM LUC+ 100µM EA	100	84	11	4	0	1	0,23	5
200µM LUC+ 0,5µM CUR	100	82	10	5	2	1	0,3	8
200µM LUC+ 1,0µM CUR	100	85	11	2	1	1	0,22	4
200µM LUC+ 100µM EA+ 1µM CUR	100	83	6	6	4	1	0,34	11

Genel olarak LUC grubunda negatif kontrole göre GHI değerinin yüksek olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artışına bağlı olarak EA ve CUR grupları ile LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR kombinasyon gruplarında LUC grubuna göre daha düşük GHI değerleri gözlenirken bu değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Uygulama gruplarına ait preperat başına her tipteki DNA hasar yüzdesi hesaplanarak ve DNA hasar yüzdeleri toplanarak sonuçlar hasarlı hücre yüzdesi (HHY) olarak değerlendirilmiştir. Alkali comet testinden elde edilen bulgulardan HHY oranlarını, DMSO kontrol, LUC, EA ve CUR gruplarını tek başına ve kombine halde kendi aralarında tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$). Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda ise DMSO kontrol grubuna göre LUC grubuna ait HHY oranının istatistiksel anlamda yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$ ve $p<0,001$).

Tablo 4.7. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 3'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri

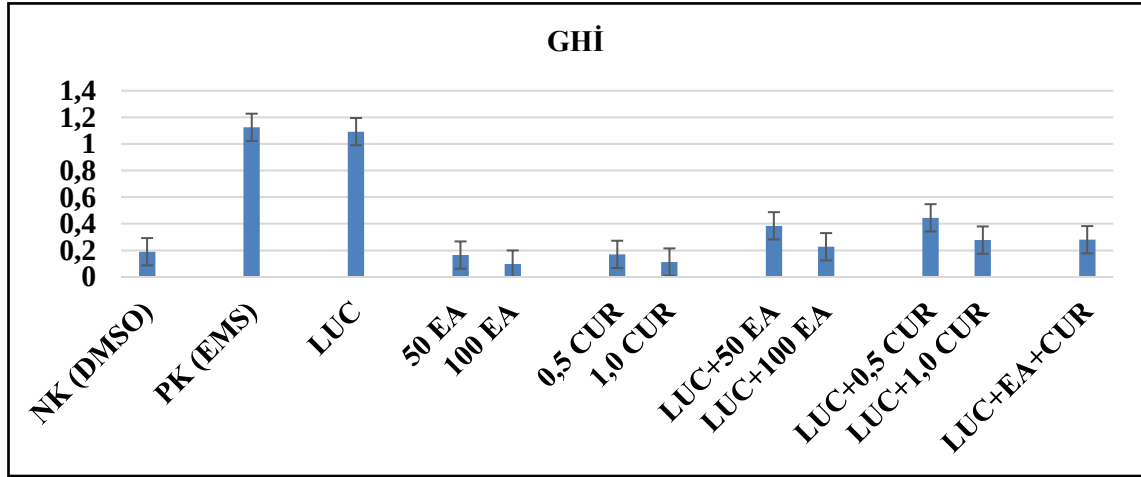
Gruplar	N	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHİ	HHY
NK (%10 DMSO)	100	92	4	2	1	1	0,15	4
PK (1 mM EMS)	100	58	2	9	10	21	1,34	40
200µM LUC	100	64	5	4	9	18	1,12	31
50µM EA	100	91	4	3	1	1	0,17	5
100µM EA	100	95	2	0	2	1	0,12	3
0,5µM CUR	100	89	5	4	1	1	0,2	6
1,0µM CUR	100	92	5	2	1	0	0,12	3
200µM LUC+ 50µM EA	100	77	13	6	3	1	0,38	10
200µM LUC+ 100µM EA	100	87	9	3	0	1	0,19	4
200µM LUC+ 0,5µM CUR	100	79	10	6	3	2	0,39	11
200µM LUC+ 1,0µM CUR	100	84	11	3	2	0	0,23	5
200µM LUC+ 100µM EA+ 1µM CUR	100	89	6	3	1	1	0,19	5

LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR kombinasyon gruplarında belirlenen HHY oranının LUC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe gösterdiği görülmüştür ($p<0,001$). Tüm uygulama gruplarında gözlenen HHY oranının istatistiksel bakımdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Tüm gönüllülere ait GHİ ve HHY ortalama değerleri Tablo 4.9 ile Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu değerlerden elde edilen istatistik sonuçlarına bakıldığında genel olarak sonucunda elde edilen LUC uygulama grubunda yüksek olan GHİ ve HHY değerlerinin kombinasyon gruplarında DMSO kontrole yaklaştığı görülmektedir. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p<0,001$).

Tablo 4.8. Alkali comet sonucu elde edilen gönüllü 4'e ait hasarlı kan hücreleri değerleri

Gruplar	N	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	HHY
NK (%10 DMSO)	100	90	5	3	1	1	0,18	5
PK (1 mM EMS)	100	63	6	5	9	17	1,11	31
200µM LUC	100	66	1	6	8	19	1,13	33
50µM EA	100	92	4	3	1	0	0,13	4
100µM EA	100	95	2	2	1	0	0,09	3
0,5µM CUR	100	88	9	3	0	0	0,15	3
1,0µM CUR	100	94	4	1	1	0	0,09	2
200µM LUC+ 50µM EA	100	77	10	7	4	2	0,44	13
200µM LUC+ 100µM EA	100	86	9	2	2	1	0,23	5
200µM LUC+ 0,5µM CUR	100	75	9	8	6	2	0,51	16
200µM LUC+ 1,0µM CUR	100	83	6	7	3	1	0,33	11
200µM LUC+ 100µM EA+ 1µM CUR	100	85	7	3	4	1	0,29	8

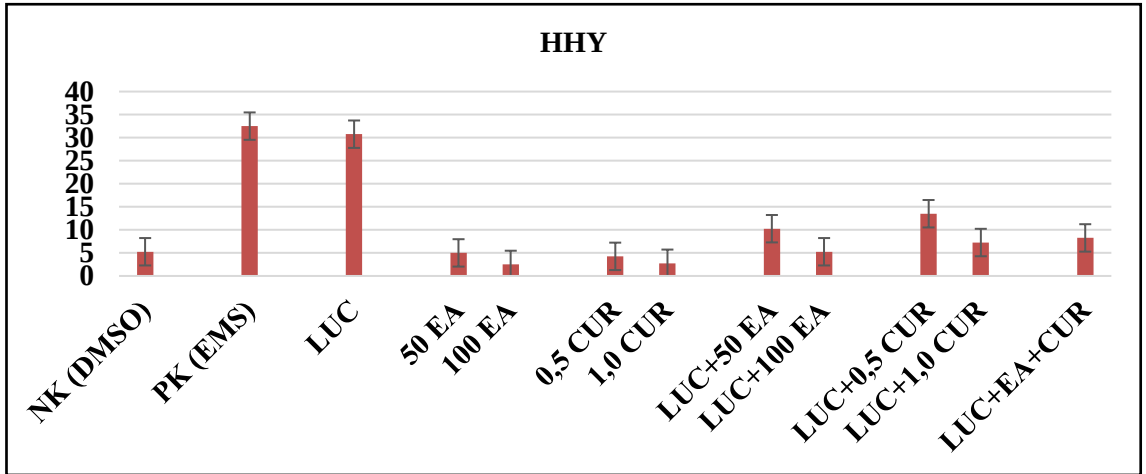


Şekil 4.3. Tüm gönüllülere ait genetik hasar indeksi (GHI) ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

Tablo 4.9. Alkali comet testi ile elde edilen tüm gönüllülere ait verilerin özet bulguları

Gruplar	N	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	HHY
NK (%10 DMSO)	400	88,75	6	3,5	1	0,75	0,19±0,01	5,25±1,41
PK (1 mM EMS)	400	63	4,5	6,25	9,5	16,75	1,12±0,42 ^a	32,50±3,03 ^a
200 µM LUC	400	67,5	1,75	3,5	8,5	18,75	1,09±0,02 ^a	30,75±2,17 ^a
50 µM EA	400	90,5	4,5	3,25	1,5	0,25	0,16±0,07 ^{a,b}	5,00±0,91 ^b
100 µM EA	400	94,25	3,25	1,25	1	0,25	0,09±0,01 ^{a,b}	2,50±0,78 ^{a,b}
0,5 µM CUR	400	88,75	7	3,25	0,5	0,5	0,17±0,05 ^b	4,25±1,04 ^{a,b}
1,0 µM CUR	400	92,25	5	2	0,75	0	0,11±0,02 ^{a,b}	2,75±1,70 ^{a,b}
200 µM LUC+ 50 µM EA	400	77,75	12	5,75	3	1,5	0,38±0,27 ^{a,b}	10,25±2,18 ^{a,b}
200 µM LUC+ 100 µM EA	400	85,25	9,5	3,5	0,75	1	0,22±0,09 ^{a,b}	5,25±1,12 ^b
200 µM LUC+ 0,5 µM CUR	400	77,5	9	7	4,5	2	0,44±0,15 ^{a,b}	13,50±3,21 ^{a,b}
200 µM LUC+ 1,0 µM CUR	400	83,25	9,5	4,5	1,75	1	0,27±0,19 ^{a,b}	7,25±0,23 ^{a,b}
200 µM LUC+ 100 µM EA+ 1 µM CUR	400	85,5	6,25	4	3,25	1	0,28±0,04 ^{a,b}	8,25±1,87 ^{a,b}

a: NK (%10 DMSO) ile karşılaştırıldığında, b: 200 µM LUC ile karşılaştırıldığında üstel harflerle gösterilen değerler arasındaki farklar p<0,001 düzeyinde önemlidir.

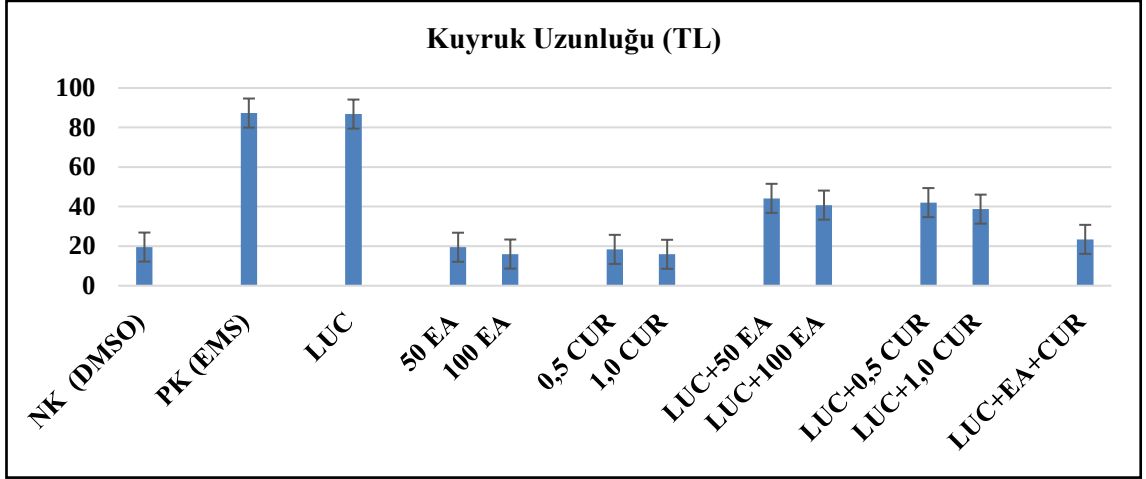


Şekil 4.4. Tüm gönüllülere ait % hasarlı hücre (HHY) ortalama değerlerinin grafiksel olarak dağılımı

4.3. Alkali Comet Testi Bilgisayarlı Görüntü Analizi Bulguları

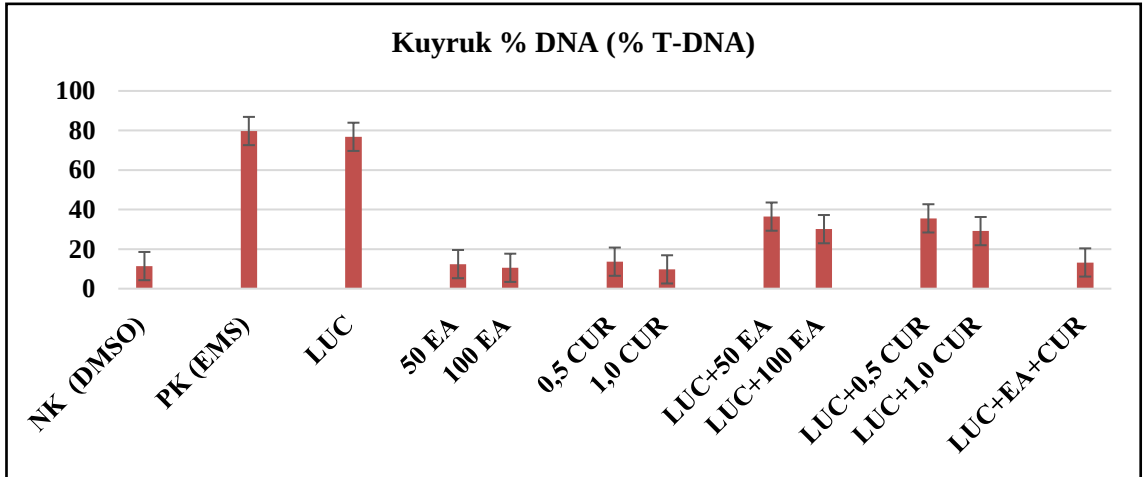
Comet analizi için farklı parametreleri içeren çok sayıda yazılım bulunmaktadır. En sık kullanılan parametreler kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk momentidir. İnsan periferik kan lenfosit hücrelerinin LUC, EA ve CUR'un farklı konsantrasyonlarına ayrı ayrı ve kombine şekilde 24 saat boyunca maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilen alkali comet testi ile kuyruk uzunluğu (TL), kuyruk % DNA (% T-DNA) ve kuyruk momenti (TM) bulguları belirlenmiştir. Uygulama gruplarına ait alkali comet sayımı için her bir gönüllüden 50'şer comet olmak üzere toplam 200 comet üzerinden değerlendirme yapılmıştır.

Kuyruk uzunluğu (TL) parametresi yalnızca düşük DNA hasarı seviyelerinde kullanılan bir parametredir. DMSO negatif kontrol grubuna ait TL değeri $19,54 \pm 2,32 \mu\text{m}$ iken EMS pozitif kontrol grubunda bu değer $87,31 \pm 13,29 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. LUC grubunda ise TL değerinin $86,79 \pm 11,09 \mu\text{m}$ olduğu görülmüştür. EA ve CUR'un artan konsantrasyonlarında TL değerinin negatif kontrole yakın olduğu gözlenmiştir. LUC, EA ve CUR kombinasyon gruplarında da benzer şekilde TL değerleri düşerek negatif kontrole yaklaşmıştır. TL değerleri açısından gözlenen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Şekil 4.5'de uygulama gruplarına ait kuyruk uzunluğu parametresine ait değerler gösterilmiştir.



Şekil 4.5. İnsan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait DNA kuyruk uzunluğu

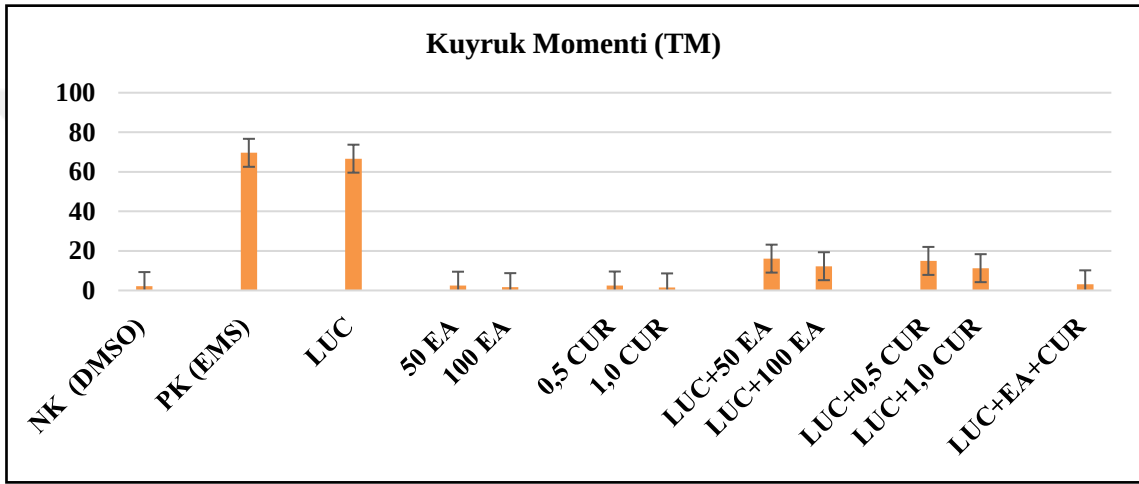
DNA hasarı arttıkça kuyruğun yoğunluğu da artar. Kuyruktaki DNA yüzdesi (%T-DNA), kırılma frekansı ile doğrusal olarak ilişkili olduğu için bir başka yararlı parametredir. DMSO negatif kontrol grubu % T-DNA değeri 11,43'dür. Pozitif kontrol grubunda bu değer 79,73 olduğu ve % T-DNA parametresi açısından negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstererek DNA hasarına neden olduğu görülmektedir ($p < 0,001$). TL değerlerine benzer şekilde LUC, EA ve CUR kombinasyon gruplarında % T-DNA parametresi değerlerinin LUC grubuna göre düştüğü Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İnsan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait % DNA kuyruk yoğunluğu

Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu tek bir değerde birleştirir, bu nedenle en kullanışlı ve sık kullanılan bir parametredir. Kuyruk momenti (TM), kuyruk

uzunluğu (TL) ve kuyruk DNA yüzdesinin (% T-DNA) çarpımının 100'e bölünmesiyle elde edilen bir değerdir. TM değerleri negatif kontrol ve pozitif kontrol gruplarında sırasıyla $2,23 \pm 0,19 \mu\text{m}$ ve $69,61 \pm 9,41 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. LUC uygulama grubunda $66,65 \pm 5,12 \mu\text{m}$ olduğu gözlenen TM değerinin LUC+EA+CUR grubunda $3,10 \pm 0,13 \mu\text{m}$ 'e düşerek negatif kontrole yaklaştığı görülmüştür. TM değerleri açısından gözlenen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). LUC, EA ve CUR ayrı ayrı ve kombinasyon gruplarına ait kuyruk momenti değerleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. İnsan periferik lenfositlerinde oluşan DNA hasarına ait kuyruk momenti

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, hayatımızın her alanında sıklıkla karşılaştığımız doğal boyarmaddelerden LUC ile uyarılmış insan periferik kan lenfositlerinde olası DNA hasarına karşı doğal fenolik bileşikler olan EA ve CUR'un *in vitro* antigenotoksik etkilerinin DNA'ların elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle son yıllarda popülaritesi ve kullanım alanı hızla artan Comet assay ya da SCGE olarak adlandırılan Tek Hücre Jel Elektroforez test yöntemi kullanılmıştır. Ekotoksikoloji klinik, biyoizlem ve kanser çalışmaları gibi pek çok alanda kimyasal ve fiziksel ajanların canlılar üzerinde meydana getirdiği genotoksik etkilerin DNA düzeyinde tespit edilebilmesine olanak sağlaması sebebiyle bu analiz yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genotoksitenin belirlenmesi için LUC'un 200 µM, EA'nın 50 ve 100 µM, CUR'un 0,1 ve 1 µM dozları ile ayrı ayrı ve kombine şekilde 24 saat muamele edilen hücreler alkali comet assay ile analiz edilmiş, genetik hasar indeksi, hasarlı hücre yüzdesi, kuyruk DNA yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentleri hesaplanarak elde edilen veriler literatürle karşılaştırılmıştır.

Doğal bir boyarmadde olan LUC mutajenitesi üzerine Yasui ve Takeda (1983) tarafından yapılan bir çalışmada *Salmonella typhimurium* suşlarında alizarin, purpurin ve LUC'un Ames Salmonella/mikrozom testi sonuçlarından elde edilen verilerde LUC'un mutajenik olduğu belirlenmiştir.

V79 (Çin hamster fibroblast), C3H/M2 (fare fibroblast ve karaciğer) hücre hatları üzerinde yapılan genotoksik testlerde LUC'un, DNA tek iplik kopmalarına sebep olarak ve DNA-protein çapraz bağlarının indüklenmesine yol açarak DNA'ya hasar verdiği tespit edilmiştir (Bachur vd., 1978; Westendorf vd., 1988).

Ayrıca doğal bir antrakinon olan LUC ve türevlerinin, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda transversiyon ve transisyonu indükleyerek DNA'da hasara neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Poginsky vd., 1991; Kawasaki vd., 1994; Ghodke vd., 2015; Yockey vd., 2017; Ishii vd., 2018; Ishii vd., 2022).

Çalışmamızdan elde edilen verilerle 200 µM LUC'un hücre canlılığını pozitif kontrol kadar düşürdüğü bulunmuştur. Görsel ve bilgisayar analiz sonuçları da LUC'un genetik hasar indeksi ve hücre hasarı yüzdesini negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını göstermektedir. Benzer şekilde kuyruk DNA frekansı (%), kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin LUC grubunda kontrole göre arttığı gözlenmiştir. LUC grubunda kontrole göre önemli oranda gözlenen farklılıklar LUC'un insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik miktarında artışa sebep olarak DNA hasarına yol açtığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar literatürü desteklemektedir.

Çalışmamızda kullanılan diğer doğal fenolik bileşikler olan EA ve CUR ile ilgili yapılan literatür çalışmalarında; EA'nın, kanser hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif aktivite göstererek apoptozu indüklediği gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Losso vd., 2004; Labrecque vd., 2005; Li vd., 2005; Seeram vd., 2005; Han vd., 2006; Larrosa vd., 2006; Edderkaoui vd., 2008; Kim vd., 2009; Hagiwara vd., 2010; Malik vd., 2011; Bozkurt vd., 2012; Erenoğlu, 2012; Chung vd., 2013; Umesalma vd., 2015; Guo vd., 2016; Cheng vd., 2017).

Rat periferik kan lenfositlerinde nikotinden kaynaklı oluşan toksisiteye karşı EA'nın koruyuculuğu comet ve MN ile analiz edilmiş, 100 µM EA'nın lipid peroksidaz enziminin aktivitesini azaltarak toksisiteyi önleyip maksimum koruma sağladığı belirtilmiştir (Sudheer vd., 2007).

Oksidatif stres sonucu oluşan hepatosit hasarına karşı EA'nın koruyucu etkisinin *in vivo* ve *in vitro* test edildiği başka bir çalışmada, EA'nın hepatosit hücrelerinde mitokondriyal depolarizasyonu önleyerek reaktif oksijen türlerinin üretimini azalttığı, apoptotik ve nekrotik hücre hasarlarını engellediği, ayrıca EA'nın hasarlı karaciğer hücrelerinin ölümüne yol açtığı, GSH (glutasyon), ALT (alanin transaminaz) ve AST (aspartat transaminazin) artışına karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Hwang vd., 2010). EA'nın fare kemik iliğindeki polikromatik eritrositlerinde mikronukleus oluşumuna karşı hücreleri koruduğu belirtilerek Comet assay ile DNA hasarını önlediğinin gösterildiği ifade edilmiştir (Gradecka-Meesters vd., 2011).

Mikronükleus testiyle siklofosfamid ile indüklenmiş İsviçre albino farelerinin böbrekleri üzerine EA'nın koruyuculuğu araştırılmış ve MN testi sonucunda EA'nın DNA iplik kopmalarını ve mikronükleus oluşumunu indirgeyerek böbrek hücrelerinde oksidatif stresi, DNA hasarlarını ve genotoksisiteyi ciddi oranda azalttığı tespit edilmiştir (Rehman vd., 2012).

Sprague-Dawley sıçanlarında oksidatif stres oluşumunu sağlayan sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı EA'nın kullanımı ile sisplatin nedeniyle yükselmiş olan plazma kreatin, üre ve kalsiyum değerlerinin önemli derecede azaldığı ve yine sisplatin kaynaklı oksidatif stresin önlediği tespit edilmiştir (Ateşşahin vd., 2006). Yine ratlar üzerinde kardiyotoksisiteye karşı EA'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada EA'nın antioksidan aktivite göstererek doku hasarını azalttığı tespit edilmiştir (Hemmati vd., 2018).

CUR'un, birçok bitkisel üründe olduğu gibi biyoyararlanımı yüksek, geniş biyolojik spektruma sahip ve toksik olmayan güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir (Topal ve Uğur, 2021). CUR'un antieflamatuar, antimikrobiyal, antidiyabetik, antibakteriyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı tedavi edici ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Ekici, 2022).

Fare ve ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda CUR'un antioksidan özeliğinden dolayı koruyucu etki göstererek beyin, mide ve karaciğer dokularında lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engellediği tespit edilmiştir (Inano ve Onoda, 2002; Manikandan vd., 2004; Swarnakar vd., 2005; Siddiqui vd., 2006; Sumanont vd., 2006). Yine CUR'un güçlü bir immünomodülatör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Jagetia ve Aggarwal, 2007; Türker, 2018). CUR'un antioksidan özellikleri sayesinde insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) proliferasyonunu artırmak suretiyle toksisiteyi azalttığı ifade edilmiştir (Kurt vd., 2020). Fenolik bir bileşik olan CUR'un Covid-19 proteazına karşı güçlü bir inhibitör aktiviteye sahip olduğu ve bunula birlikte CUR'un Covid-19 antiproteaz ilacı olarak kabul edilebileceği de belirtilmiştir (Mohammadi ve Shaghaghi, 2020). Beyin ve meme gibi kanserli hücre hatlarında farklı dozlarda uygulanan CUR'un hücre proliferasyonunu azaltarak oksidatif stresi ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Bektur Aykanat ve Kaçar, 2021; Kar ve Hacıoğlu, 2021).

Ayrıca EA ve CUR'un radyasyonuna maruz bırakılan farelerde, mikronükleus ve kromozomal anormalliklerin indüksiyonu ile DNA zincir kırılmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Thresiamma ve Kuttan, 1998). Fareler üzerinde yapılan farklı bir çalışmada radyasyon maruziyetiyle artan protein kinaz C aktivitesinin CUR ve EA tedavisi sonrasında enzim inhibisyonu sağlanmıştır (Varadkar vd., 2001). EA ve CUR'un karsinom hücrelerinde oluşmuş serbest radikalleri azalttığı ve DNA hasarını önleyerek antikanserojen etki gösterdiği de tespit edilmiştir (Kumar vd., 2016).

Çalışmamızda alkali comet assay ile GHİ, HHY, TL, % T-DNA ve TM parametrelerine ait değerlere bakıldığında bu değerlerin EA ve CUR'un tüm gruplarında kontrole göre düşükken LUC+EA, LUC+CUR ve LUC+EA+CUR kombinasyon gruplarında kontrole yaklaştığı gözlenmiştir. LUC'un neden olduğu toksisitenin LUC+EA ve LUC+CUR gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak azaldığı, en anlamlı düşüşün ise LUC+EA+CUR grubunda gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Yukarıda gösterilen tüm bu veriler ışığında LUC'un insan periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturarak toksik etki gösterdiği, EA ve CUR'un kullanılan dozlarının LUC toksikasyonu sonucu oluşan genotoksisiteyi azalttığı gözlemlenmiştir.

Ayrıca çalışmamızda kullanılan kimyasal ajanların genotoksisitesi ve mutajenitesi ile ilgili ya da antigenotoksik ve antioksidan özellikler sergilediklerini belirten çalışmalar bulunmasına rağmen insan periferik kan lenfosit hücrelerinde LUC tarafından meydana getirilen DNA hasarı üzerinde EA ve CUR fenolik bileşiklerinin kombine kullanımı üzerine literatüre rastlanılamamıştır. Bu nedenle çalışmamızın özgün olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde gerek gıdalarda kullanılan doğal boyarmaddeler ve antioksidanlar gibi katkı maddeleri ve gerekse kozmetik, tekstil, tarım gibi alanlarda yararlanılan kimyasal madde kullanımının hızla artması sonucunda bu kimyasal ve katkı maddelerinin canlıların genetik yapısında olumsuz etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi gıda güvenliği, insan sağlığı ve yaşam kalitesi açısından oldukça önemlidir. Bu maddelerin genotoksik potansiyellerinin araştırılması, olumsuz etkilerinin önlenmesi ve yasal çerçeve içerisinde belirtilen dozlarda kullanımlarının sağlanması için üreticilerin ve tüketicilerin bilinç düzeyinin artırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A., Faveal-Torres, E. ve Aguilar, C.N. (2008). "Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins", **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78, 189-199.
- Ali, S., Nisar, N. ve Hussain, T. (2007). "Dyeing properties of natural dyes extracted from eucalyptus", **TJTI**, 98(6), 559-562.
- Ammon, H.P. ve Wahl, M.A. (1991). "Pharmacology of *Curcuma longa*", **Planta Medica**, 57(1), 1-7.
- Ateşşahin, A., Çeribaşı, A.O., Yüce, A., Bulmuş, Ö. ve Çıkım, G. (2006). "Role of Ellagic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Rats", **Basic&Clinical Pharmacology&Toxicology**, 100(2), 121-126.
- Bachur, N.R., Gordon, S.L. ve Gee, M.V. (1978). "A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals", **Cancer Research**, 38, 1745.
- Begoa, S. ve Messaoudi, M. (2019). "Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region", **Biological Trace Element Research**, 187(1), 301-306.
- Bajpayee, M., Pandey A. K., Parmar, D. ve Dhawan, A. (2005). "Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs", **Toxicology Mechanisms and Methods**, 15(3), 155-180.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S. ve Kmura, M.N.V.R. (2006). "Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40(1), 206-210.
- Başer, H.C. (2002). "Fonksiyonel gıdalar ve nutrasotikler", **14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Baumeister, P., Huebner, T., Reiter, M., Schwenk-Zieger, S. ve Harreus, U. (2009), "Reduction of oxidative DNA fragmentation by ascorbic acid, zinc and N-acetylcysteine in nasal mucosa tissue cultures", **Anticancer Research**, 29(11), 4571-4574.
- Bektur Aykanat, N.E. ve Kaçar, S. (2021). "T-47D meme kanseri hücreleri üzerinde kurkuminin doza bağımlı etkisinin incelenmesi", **Journal of Uludağ University Medical Faculty**, 47(2), 241-245.
- Bilgici, B. (2005). "Behçet hastalığında genotoksosite", **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı**, Uzmanlık Tezi.

- Bostancı, Ş. Ö. (2014). “Bazı benzotiyazol türevi bileşiklerin mutajenik potansiyellerinin Ames test sistemi ile belirlenmesi”, *H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Bozkurt, Y., Fırat, U., Atar, M., Sancaktutar, A.A., Pembegül, N., Söylemez, H., Alp, H., Bodakcı, M.N., Hatipoğlu, N.K. ve Büyükbaş, S. (2012). “The protective effect of ellagic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats”, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi*, 18(5), 823-828.
- Bozyiğit, F., Onur, E. ve Tuğrul, B. (2009). “DNA hasarı ve onarım mekanizmaları”, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7(2), 61-70.
- Brown, J.P. ve Brown, R.J. (1976). “Mutagenesis by 9,10-Anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*”, *Mutation Res.*, 40, 203-224.
- Brown, J. ve Dietrich, P. (1979). “Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the Salmonella/microsome test: Activation of anthraquinone glycosides by enzymic extracts of rat cecal bacteria”, *Mutation Res.*, 66, 9-24.
- Carmichael, P. L., Scott, A. D., Tweats, D. J. ve Westmoreland, C. (2007). “Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity in-vitro-challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive” *Mutagenesis*, 22(1), 5-13.
- Caro, Y., Anamale, L., Fouillaud, M., Laurent, P., Petit, T. ve Dufosse, L. (2012). “Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: An overview”, *Nat. Prod. Bioprospect.* 2(5), 174-193.
- Cerda, B., Espín, J.C., Parra, S., Martinez, P. ve Tomás-Barberán, F.A. (2004). “The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6Hdibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora in healthy humans”, *European Journal of Nutrition*, 43, 205–220.
- Cheng, H., Lu, C., Tang, R., Pan, Y., Bao, S., Qiu, Y. ve Xie, M. (2017). “Ellagic acid inhibits the proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells *in vitro* and *in vivo*”, *Oncotarget*, 8(7), 12301-12310.
- Chung, Y.C., Lu, L.C., Tsai, M.H., Chen, Y.J., Chen, Y.Y., Yao, S.P. ve Hsu, C.P. (2013). “The inhibitory effect of ellagic acid on cell growth of ovarian carcinoma cells”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID:306705.
- Collins, A.R., Fleming, I.M. ve Gedik, C.M. (1994), “In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1219(3), 724-727.
- Collins, A.R., Ma, A.G. ve Duthie, S.J. (1995). “The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells”, *Mutation Research/DNA Repair*, 336(1), 69-77.

- Collins, A.R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations", **Molecular Biotechnology**, 26(3), 249-261.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Catherine, C.S., Stetina, R. (2008). "The Comet Assay: Topical issues", **Mutagenesis**, 23(3), 143-151.
- Colombini, M.P., Andreotti, A., Baraldi, C., Degano, I. ve Łucejko, J.J. (2007). "Colour fading in textiles: A model study on the decomposition of natural dyes", **Microchemical Journal**, 85, 174-182.
- Cimino, M. C. (2006). "Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes", **Environmental Molecular Mutagenesis**, 47(5), 362-390.
- Çağlar, H.O., Süslüer, S.Y., Kavaklı, Ş., Gündüz, C., Ertürk, B., Özkınay, F. ve Haydaroglu, A. (2017). "Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş miRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi", **Ege Tıp Dergisi**, 56(4), 183-192.
- Çelik. G. (2012). "Ellajik Asitin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Ve İlaç-Diyet Etkileşim Potansiyelinin Moleküler Yaklaşımlar İle Aydınlatılması", **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Çelik A., Ekinci S.Y., Güler G. ve Yıldırım, S. (2014). "In Vitro Genotoxicity Of Fipronil Sister Chromatid Exchange, Cytokinesis Block Micronucleus Test And Comet Assay", **DNA And Cell Biology**, 33(3), 148-154.
- De Boer, J.G., Yang, H., Holcroft, J. ve Skov, K. (2004). "Chemoprotection against Nnitrosomethylbenzylamine-induced mutation in the rat esophagus", **Nutrition and Cancer**, 50, 168-173.
- Deveoglu, O. ve Karadağ, R. (2011). "Genel Bir Bakış: Doğal Boyarmaddeler", **Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 23(1), 21-32.
- Dinçer, Y. ve Kankaya, S. (2010). "DNA hasarının belirlenmesinde Comet Assay", **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi**, 30(4), 1365-1373.
- Diop, A. (2013). "Ellajik asidin c6 hücrelerinde canlılık, DNA hasarı, apoptoz ve nekroz üzerine etkileri", **Anadolu Üniversitesi**, Yüksek Lisans Tezi.
- Doğan, T. S., Durusoy, M., Gökçe, M. ve Öztürk, K. (2014). "Genotoxicity of potent antiviral 1-[(2aminophenyl)thio]- 1-phenyl-2-nitrobutane derivatives designed as drug agents", **Turkish Journal of Biochemistry**, 39(3), 328-335.
- Dölen, E. (1992). "Tekstil tarihi: Dünyada ve Türkiye' de tekstil teknolojisinin ve sanayiinin tarihsel gelişimi", Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları No:92/1, **Matbaa Eğitimi Bölümü Yayın No:6**, İstanbul.

- Dördü, T. (2018). “Elajik asit (EA)’in insan periferel lenfositlerinde *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkileri”, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Doktora Tezi.
- Durmaz, A., Dikmen, N. ve Gündüz, C. (2010). “DNA hasar analizinde tek hücre jel elektroforezi”, **Dergi Park Akademik**, 19(4), 236-243.
- Edderkaoui, M., Odinkova, I., Ohno, I., Gukovsky, I., Go, V.L.W., Pandol, S.J. ve Gukovskaya, A.S. (2008). “Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor κ B in pancreatic cancer cells”, **World Journal of Gastroenterology**, 14(23), 3672-3680.
- Ekici, S. (2022). “Yüksek Glukoz Konsantrasyonuna Maruz Bırakılmış Ligamentum Periodontale Hücre Hattı Üzerine Curcumin’in Koruyucu Etkisi”, **Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Doktora Tezi.
- Eksen, T. (2020). “Ellajik Asidin Pullu Sazan (Cyprinus Carpio)’ Da Bazı Hematolojik Ve Antioksidan Parametrelere Etkisinin Araştırılması”, **Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Elia, M.C., Storer, R.D., McKelvey, T.W., Kraynak, A.R., Barnum, J.E., Harmon, L.S., Deluca, J.G. ve Nichols, W.W. (1994), “Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays”, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 24(3):181-191.
- Enez, N. (1987). “Doğal Boyamacılık”, **Marmara Üniversitesi Yayınları**, S:1.
- Erarslan, A.S. (2021). “Asetik Asitle Oluşturulmuş Deneysel Ülseratif Kolit Modelinde Curcumin Ve Vitamin D’nin Ayrı Ayrı Bağırsak Geçirgenliğinde Olası Koruyucu Ve Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması”, **Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Erenoğlu, N. (2012). “Farklı insan meme kanseri hücrelerinde ellajik asitin sitotoksik etkisi”, **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Ertürk Ş. (2001). “Sevofüloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Malign Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi”, **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı**, Uzmanlık Tezi.
- Erzurum, M. (2020). “Okrotoksin A Toksikasyonunda Folik Asit ve Ellajik Asidin Etkilerinin Araştırılması”, **Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Doktora Tezi.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. ve O’Neill, K.L. (1995). “The comet assay: a comprehensive review”, **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, 339(1), 37-59.
- Fairbairn, D.W., Walburger, D.K., Fairbairn, J.J. ve O’Neill, K.L. (1996), “Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis”, **Scanning**, 18(6), 407-416.

- Fidan, A.F. (2005). "DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi", *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
- Forchhammer, L., Brauner, E.V., Folkmann, J.K., Danielsen, P.H., Nielsen, C., Jensen, A., Loft, S. Friis, G. ve Moller, P. (2008). "Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring", *Mutagenesis*, 23(3), 223-231.
- Fouillaud, M., Caro, Y., Venkatachalam, M., Grondin, I. ve Dufosse L. "Anthraquinones", <http://hal.univ-reunion.fr/hal-01657104>
Son erişim tarihi: 07.08.2019.
- Gelbart, W., Griffiths, A., Lewontin, R., Miller, J., Suzuki, D. ve Wessler, S. (2005). "Introduction to genetic analysis", W. H. Freeman & Company 8th ed., *Mutation*, Chapter(14).
- Gessler, N. N., Egorova, A. S. Ve Belozerskaya, T. A. (2013). "Fungal anthraquinones", *Appl. Biochem. Microbiol*, 49(2), 85–99.
- Ghodke, P.P., Harikrishna, S. ve Pradeepkumar, P.I. (2015). "Synthesis and Polymerase-Mediated Bypass Studies of the N²-Deoxyguanosine DNA Damage Caused by a Lucidin Analogue", *The journal of Organic Chemistry*, 80(4), 2128-2138.
- Gradecka-Meesters, D., Palus, J., Prochazka, G., Segerback, D., Dziubaltowska, E., Kotova, N., Jenssen, D., Arkusz, J., Lundin, C., Vikström, E., Rydzynski, K., Nilsson, R. ve Stepnik, M. (2011). "Assessment of the protective effects of selected dietary anticarcinogens against DNA damage and cytogenetic effects induced by benzo[a]pyrene in C57BL/6J mice", *Food and Chemical Toxicology*, 49(8), 1674-1683.
- Grazeffe, V.S., Tallarico, L.F., Pinheiro, A.S., Kawano, T., Suzuki, M.F., Okazaki, K., Pereira, C.A.B. ve Nakano, E. (2008). "Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)", *Mutation Research/Genetic Toxicology and environmental Mutagenesis*, 654(1), 58-63.
- Guo, H., Zhang, D. ve Fu, Q. (2016). "Inhibition of cervical cancer by promoting IGFBP7 expression using ellagic acid from pomegranate peel", *Medical Science Monitor*, 22, 4881-4886.
- Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Kaneko, Y., Niitsu, N. ve Okabe-Kado, J. (2010). "Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells", *International Journal of Hematology*, 92, 136-143.
- Han, D.H., Lee, M.J. ve Kim, J.H. (2006). "Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid", *Anticancer Research*, 26(5A), 3601-3606.

- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. ve Tice, R.R. (2003), "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay", *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.
- Hemmati, A.A., Olapour, S., Najafzadeh Varzi, H., Khodayar, M.J., Dianat, M., Mohammadian, B. ve Yaghooti, H. (2018). "Ellagic acid protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in rat", *Human and Experimental Toxicology*, 37(4), 412-419.
- Hunger, K. (2003). "Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications", *Kelkheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
- Hurley, R.E. (1998) Interactions of N-methyl-N-nitrosourea and ellagic acid in developmental toxicology, *Doctor of Philosophy Thesis*, Colorado State University, 156.
- Hwang, J.M., Cho, J.S., Kim, T.H. ve Lee, Y.I. (2010). "Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen speies", *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 64(4), 264-270.
- Inano, H. ve Onoda, M. (2002). "Radioprotective action of curcumin extracted from *Curcuma longa* LINN: inhibitory effect on formation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, tumorigenesis, but not mortality, induced by γ -ray irradiation", *internaitonal Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 53(3), 735-743.
- Ishii, Y., Kijima, A. Tkasu, S., Ogawa, K. ve Umemura, T. (2018). "Effects of inhibition of hepatic sulfotransferase activity on renal genotoxicity induced by lucidin-3-O-primeveroside", *Journal of Applied Toxicology and Chemical Toxicology*, <https://doi.org/10.1002/jat.3755>.
- Ishii, Y., Nakamura, K., Mitsumoto, T., Takimoto, N. Namiki, M., Takasu, S. ve Ogawa, K. (2022). "Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging", *Food and Chemical Toxicology*, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112851>.
- Jagetia, G.C. ve Aggarwal, B.B. (2007). "Spicing up of the immune system by curcumin", *Journal of clinical Immunology*, 27, 19-35.
- Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J. ve Sakariah, K.K. (2006). "Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin", *Food Chemistry*, 98(4), 720-724.
- Jitoe, A., Masuda, T., Tengah, I.G.P., Suprpta, D.N., Gara, I.W., Nakatani, N. ve diğerleri. (1992). "Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1337-1340.

- Kar, F. ve Hacıoğlu, C. (2021). “Kurkumin’in U251 hücrelerinde antineoplastik potansiyellerinin mekanizması olarak anti-oksidatif ve apoptotik özellikleri”, **Biological Diversity and Corsevation**, 14(2), 258-268.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş. (2016). “Antioksidanlar”, **MAE Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 1(1), 65-76.
- Karadağ, R. (1997). “Türk halı, kilim ve kumaşlarında kullanılan doğal boyarmaddeler”, **Quarterly Magazine of Carpet, Weaving & Embroidery Arts**, 1(1), 38.
- Karadağ, R. (2007). “Doğal Boyamacılık”, **Geleneksel El Sanatları ve Mağazalar İşletme Müdürlüğü Yayınları**, Ankara.
- Kasnak, C. ve Palamutoğlu, R. (2015). “Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri”, **Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 3(5), 226-234.
- Kato, H., Hata, T. ve Tsukada, M. (2004). “Potentialities of natural dyestuffs as antifeedants against varied carpet beetle”, **Anthrenus verbasci, JARQ**, 38(4), 241-251.
- Kawasaki, Y., Goda, Y., Noguchi, H. ve Yamada, T. (1994). “Identification of adducts formed by reaction of purine bases with a mutagenic anthraquinone, Lucidin: mechanism of mutagenicity by anthraquinones occurring in Rubiaceae plants”, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 42(9), 1971-1973.
- Khanna, N. (1999). “Turmeric-nature’s precious gift”, **Current Science**, 76(10), 1351-1356.
- Kılıç, A. (2005). “Bitkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması”, **A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Kim, S., Gaber, M.W., Zawaski, J.A., Zhang, F., Richardson, M., Zhang, X.A. ve Yang, Y. (2009). “The inhibition of glioma growth *in vitro* an *in vivo* by a chitosan/ellagic acid composite biomaterial”, **Biomaterials**, 30(27), 4743-4751.
- Kizilian, N., Wilkins, R.C., Reinhardt, P., Ferrarotto, C., McLean, J.R. ve McNamee, J.P. (1999), “Silver-stained comet assay for detection of apoptosis”, **Biotechniques**, 27(5), 926-930.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikava, Y., Hayashi, M. ve Sofuni, T. (1995). “A Comparasion Between Manual Microscopic Analysis and Computerized Image Analysis In The Single Cell Gel Electrophoresis”, **MMS Communications**, 3(2), 103-115.
- Kunnumakkara, A.B., Guha, S., Krishnan, S., Diagaradjane, P., Gelovani, J. Ve Aggarwal, B.B. (2007). “Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products”, **Cancer Res**, 67(8), 3853-3861.

- Kumar, D., Basu, S., Parija, L., Rout, D., Manna, S., Dandapat, J. ve Debata, P.R. (2016). "CURcumin and ellagic acid synergistically induce ROS generatino, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells", ***Biomedicine&Pharmacotherapy***, 81, 31-37.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P. ve Awadhesh, N.J. (2007). "Comet assay measurements: A perspective", ***Cell Biology and Toxicology***, 25, 53-64.
- Kurt, B.Ö., Taşpınar, E., Şener, L.T. ve Özdemir, S. (2020). "The Possible Toxic Effect Of Chlorpyrifos On Cell Viability In Hek293 Cell Line And Antioxidant Efficacy Of Selenium And Curcumin", ***22nd International Conference on Antioxidants, Paris-Fransa***, ss.12.
- Labrecque, L., Lamy, S., Chapus, A., Mihoubi, S., Durocher, Y., Cass, B., Bojanowski, M.W., Gingras, D. ve Beliveau, R. (2005). "Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound", ***Carcinogenesis***, 26(4), 821-826.
- Landete, J.M. (2011). "Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health", ***Food Research International***, 44(5), 1150-1160.
- Larrosa, M., Tomas-Barberan, F.A. ve Espin, J.C. (2006). "The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway", ***The journal of Nutritional Biochemistry***, 17(9), 611-625.
- Li, T.M., Chen, G.W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C. ve Chung, J.G. (2005). "Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells", ***Anticancer Research***, 25(2A), 971-979.
- Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey II, A. Bawadi, H.A. ve Truax, R. (2004). "In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid", ***The Journal of Nutritional Biochemistry***, 15(11), 672-678.
- Malik, A., Afaq, S., Shahid, M., Akhtar, K. ve Assiri, A. (2011). "Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: a caspase dependent pathway", ***Asian Pacific journal of Tropical Medicine***, 4(7), 550-555.
- Manikahdah, P., Sumitra, M., Aishwarya, S., Manohar, B.M., Lokanadam, B. ve Puvanakrishnan, R. (2004). "Curcumin modulates free radical quenching in myocardical ischaemia in rats", ***The International Journal of Biochemistry&Cell Biology***, 36(10), 1967-1980.
- Marks, D.I. ve Fox, R.M. (1991), "DNA damage, poly (ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as a potential common pathway of cytotoxic drug action", ***Biochemical Pharmacology***, 42(10): 1859-1867.
- Masuda, T., Isobe, J., Jitoe, A. Ve Nakatani, N. (1992). "Antioxidative curcuminoids from rhizomes of *Curcuma cantorrhyza*", ***Phytochemistry***, 31, 3645-3647.

- Memişoğulları, R. (2005). “Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi”, **Dicle Tıp Fakültesi Dergisi**, 3, 30-39.
- Micheal, R. C. ve William, S. K. (2002). “Genetik Kavramlar”, Altıncı baskıdan Türkçe çeviri, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 477-481.
- Mohammadi, N. ve Shaghghi, N. (2020). “Inhibitory effect of eight Secondary Metabolites from conventional Medicinal Plants on COVID_19 Virus Protease by Molecular Docking Analysis”, **Cell and Molecular Biology Department**, Faculty Of Basic Science, University Of Maragheh.
- Natarajan, A. T. (1993). “Mechanism for induction of mutations and chromosomal alterations”, **Environ Health Perspect**, 101(3), 225-229.
- Olive, P.L., Frazer, G., ve Banath, J.P. (1993), “Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay”, **Radiation Research**, 136(1):130-136.
- Ostling, O. ve Johanson K.J. (1984). “Microelectrophoretic Study Of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells”, **Biochemical And Biophysical Research Communications**, 123, 291-298.
- Owolarafe, T. A., Salawu, K., Ihegboro, G. O., Ononamadu, C. J., Alhassan, A. J. ve Wudil, A. M. (2020). “Investigation of cytotoxicity potential of different extracts of Ziziphus mauritiana (Lam) leaf Allium cepa model”, **Toxicology Reports**, 7, 816-821.
- Pari, L. ve Siyasankari, R. (2008). “Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats”, **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 22(4), 395–401.
- Pawlak, K., Puchalska, M., Miszczak, A., Rosłonec, E. ve Jarosz, M. (2006). “Blue natural organic dyestuffs – from textile dyeing to mural painting separation and characterization of coloring matters present in elderberry, logwood and indigo”, **Journal of Mass Spectrometry**, 41, 613-622.
- Pfeifer, G. P., Tor Naletti, S. ve Tu, Y. (1996). “DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site”, **EMBO J**, 15, 675-683.
- Poginsky, B., Westendorf, J., Blömeke, B., Marquardt, H., Hewer, A., Grover, P.L. ve Phillips, D.H. (1991). “Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L.”, **Carcinogenesis**, 12(7), 1265-1271.
- Prinsloo, G., Nogemane, N. ve Street, R. (2018). “The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine”, **Food and Chemical Toxicology**, 116, 27-39.

- Rajendra, S. V., Raman, D., Saks, M. ve Upreti, S. (2017). "Genotoxicity: mechanism, testing guidelines and methods", **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science**, 1(5), 1-6.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K. ve Kumar, M.N.V.R (2006). "Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective", **Journal of Controlled Release**, 113(3), 189-207.
- Reddy, A.C. ve Lokesh, B.R. (1992). "Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes", **Mol Cell Biochem**, 111(1-2), 117-124.
- Rehman, M.U., Tahir, M., Ali, F., Qamar, W., Lateef, A., Khan, R., Quaiyoom, A., Hamiza, O.O. ve Sultana, S. (2012). "Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, gonotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of ellagic acid", **Molecular and Cellular Biochemistry**, 365, 119-127.
- Reiter, R.J. (2000). "Melatonin: Lowering the high price of free radicals", **Physiology**, 15, 246-250.
- Rojas, E., Lopez, M.C. ve Valverde, M. (1999). "Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications", **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 722(1-2), 225-254.
- Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sung, B., Ahn, K.S., Murakami, A., Sethi, G. ve diğerleri. (2007). "Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism", **Carcinogenesis**, 28(8), 1765-1773.
- Sarvarkar, P.P., Walvekar, M.V. ve Bhopale, L.P. (2011). "Antioxidative effect of curcumin (*Curcuma longa*) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in submandibular gland of D-galactose- induced aging male mice", **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(20), 5191-5193.
- Seeram, N.P., Lee, R. ve Heber, D. (2004). "Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica Gratanum* L.) juice", **Clinica Chimica Acta**, 348(1-2), 63-68.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Hennig, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G. ve Heber, D. (2005). "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice", **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 16(6), 360-367.
- Shah, S. U. (2012). "Importance of genotoxicity & S2a guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals", **Iosr Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, 1(2), 43-54.

- Sharma, O.P. (1976). "Antioxidant activity of curcumin and related compounds", **Biochem Pharmacol**, 25(15), 1811-1812.
- Siddiqui, A.M., Cui, X., Wu, R., Dong, W., Zhou, M. ve Hu, M. (2006). "The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ", **Critical Care Medicine**, 34(7), 1874-1882.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. (1988). "A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. Experimental Cell", **Research**, 175, 184-191.
- Singh, N.P., Danner, D.E., Tice, R.R., Brant, L. ve Schneider, E.L. (1990). "Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology" **Mutation Research**, 37, P:123.
- Singh, N.P., Stephens, R.E. ve Schneider, E.L. (1994). "Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage", **International Journal of Radiation Biology**, 66, 23-8.
- Sreejayan ve Rao, M.N. (1994). "Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation", **J Pharm Pharmacol**, 46(12), 1013-1016.
- Srimal, R.C. (1997). "Turmeric: A brief review of medicinal properties", **Fitoterapia**, LXVIII, 483-499.
- Sudheer, A.R., Muthukumar, S., Devipriya, N. ve Menon, V.P. (2007). "Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage *in vitro*: With the comparison of *N*-acetylcysteine", **Toxicology**, 230(1), 11-21.
- Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Watanabe, H. ve Matsumoto, K. (2006). "Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin", **Life Sciences**, 78(16), 1884-1891.
- Swarnakar, S., Ganguly, K., Kundu, P., Banerjee, A., Maity, P. ve Sharma, A.V. (2005). "Curcumin regulates expression activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer", **Journal of Biological Chemistry**, 280(10), 9409-9415.
- Şekeroğlu, V. ve Şekeroğlu, Z. A. (2011). "Genetik toksisite testleri", **TÜBAV Bilim Dergisi**, 4(3), 221-229.
- Şen, S., Beceren, A. ve Aksoy, H. (2018). "Genotoksikite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi", **International Journal of Human Sciences**, 15(3), 1634-1649.
- Şener, G. ve Yeğen, B.Ç. (2009). "İskemi reperfüzyon hasarı", **Klinik Gelişim Dergisi**, 22, 5-13.

- Tarhan, G. H. (2006). "Antidepresan olarak kullanılan Paxil ve Prozac ilaçlarının insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri", *G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Taşkın, E. (2017). "Ellajik Asitin Miyokart İnfarktüsü Oluşturulmuş Ratlarda Sialik Asit Düzeyleri Ve Lipit Profili Üzerine Etkisi", *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Teixeira, R. D. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S. ve Vicentini, V. E. P. (2003). "Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays", *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 551-555.
- Thresiamma, K.C. ve Kuttan, G.J. (1998). "Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity", *Journal of Experimental&Clinical Cancer Research*, 17(4), 431-434.
- Tıkırdık, M. (2019). "Ellajik Asit, Kafein ve Betainin Telomeraz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi", *Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000). "Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H. ve Takino, Y. (1985). "Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L.", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 33(4), 1725-1728.
- Topal, B.G. ve Uğur, S.G. (2021). "Diş hekimliğinde kurkumin kullanımı", *Diş ve Tıp Dergisi*, 3(3), 15-24.
- Tuteja, N. ve Tuteja, R. (2001). "Unravelling DNA repair in human: molecular mechanism and consequences of repair defect", *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(3), 261-290.
- Türker, C. (2018). "Erişkin Ratlarda Kurkumin Takviyesinin Karaciğer Dokusunun Oksidan/Antioksidan Durumu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi", *Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Umesalma, S., Nagendraprabhu, P. ve Sudhandiran, G. (2015). "Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399, 303-313.
- Unnikrishnan, M.K. ve Rao, M.N. (1992). "Curcumin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation", *FEBS Lett*, 301(2), 195-196.

- Vaisi-Raygani, A., Rahimi, Z., Zahraie, M., ve Pourmotabbed, M.N.A. (2007). "Enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense with alzheimer disease1", *Acta Medica Iranica*, 271-276.
- Varadkar, P., Dubey, P., Krishna, M. ve Verma, N.C. (2001). "Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics", *Journal of Radiological Protection*, 21(4), 361-370.
- Westendorf, J., Poginsky, B., Marquardt, H., Groth, G. ve Marquardt H. (1988). "The genotoxicity of Lucidin, a natural component of *Rubia tinctorum* L. and Lucidinethylether, a component of ethanolic *Rubia* extracts", *Cell Biology and Toxicology*, 4(2), 225-239.
- Whitley, A.C., Stoner, G.D., Darby, M.V. ve Vale, T. (2003). "Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic cidextensive binding to protein and DNA", *Biochemical Pharmacology*, 66, 907-15.
- Wu, T.C., Huang, Y.C., Hsu, S.Y., Wang, Y.C. ve Yeh, S.L. (2007), "Vitamin E and vitamin C supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease", *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 77(4), 272-279.
- Yalçın, A.S. (1998). "Antioksidanlar", *Klinik Gelişim*, 11, 342-334.
- Yasui, Y. ve Takeda, N. (1983). "Identification of a mutagenic substance, in *Rubia tinctorura* L. (madder) root, as lueidin", *Mutation Res.*, 121, 185-190.
- Yırtıcı, Ü. (2007). "Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin mikronükleus yöntemi ile araştırılması", *ERÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi.
- Yockey, O.P., Jha, V., Ghodke, P.P., Xu, T., Xu, W., Ling, H., Pradeepkumar, P.I. ve Zhao, L. (2017). "Mechanism of error-free DNA replication past Lucidin-derived DNA damage by human DNA Polymerase", *Chem. Res. Toxicol.*, 30,2023-2032.

EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Çetintaş, D., Çolak, D.A., Bayrak, N. ve **Harurluoğlu, Ü.** (2021) “Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using Momordica charantia extract: Evaluation of antioxidant activity and survival rate on fruit flies”, **3rd International Conference on Agricultural, Biological and Life Science**, Edirne, pp. 78-85.

