

**LİPOİK ASİT VE FERULİK ASİTİN
İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ**

Gökçe TANER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2007
ANKARA**

Gökçe TANER tarafından hazırlanan LİPOİK ASİT VE FERULİK ASİTİN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ARSLAN

.....

Biyoloji Eğitimi, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma ÜNAL

.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Eşref YÜKSEL

.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cafer Sırrı SEVİMAY

.....

Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Yusuf KALENDER

.....

Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tarih: 18/10/2007

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gökçe TANER

LİPOİK ASİT VE FERULİK ASİTİN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Gökçe TANER

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ekim 2007

ÖZET

Bu çalışmada, MMC'nin insan lenfositlerinde meydana getirdiği kromozomal anormallikler (KA), kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve mikronükleus (MN) oluşumlarına karşı, lipoik asit (LA) ve ferulik asitin (FA) antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, MMC'nin mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerindeki etkilerine karşı, lipoik asit ve ferulik asitin antioksidan aktivitesine bağlı iyileştirici bir etkisinin olup olmadığı da incelenmiştir. LA ile yapılan çalışmada her bir kültüre 48 saat süre ile 0,2 µg/ml MMC uygulanmıştır. Lipoik asit uygulaması, MMC'den 1 saat önce, eş zamanlı ve 1 saat sonra olmak üzere üç farklı şekilde, üç farklı konsantrasyon kullanılarak (0,5, 1, 2 µg/ml) yapılmıştır. FA uygulaması ise 24 saat süreyle MMC ile eş zamanlı olarak beş farklı konsantrasyon (0,25, 0,50, 1, 2, 4 µg/ml) kullanılarak yapılmıştır. Deneylerde, bir negatif kontrol, bir pozitif kontrol (0,2 µg/ml MMC) ve bir de çözücü kontrol (10µg/ml etanol) bulundurulmuştur. MMC ile lipoik asit ve ferulik asidin kombine uygulandığı kültürlerin hepsinde, hem KA/hücre hem de anormal hücre frekanslarında, pozitif kontrole göre bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma LA uygulamasında istatistiksel olarak anlamlıdır. LA ve FA eklenmiş tüm kültürlerde, MMC tarafından oluşturulan KKD/hücre ve MN/hücre frekanslarında da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar lipoik asit ve ferulik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasar

üzerine antiklastojenik ve antimutajenik etkisinin olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, LA ve FA tüm dozlarda mitotik indeksde istatistiksel olarak önemli bir azalmaya yol açmıştır. Bu da bu iki antioksidanın antimitotik etkili olduğunu göstermektedir.

Bilim Kodu : 203.1.048
Anahtar Kelimeler : Lipoik asit, Ferulik asit, MMC, antigenotoksik etki, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mitotik indeks (MI), mikronükleus (MN)
Sayfa Adedi : 93
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

**ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF LIPOIC ACID AND FERULIC ACID
AGAINST MYTOMYCINE-C ON HUMAN LYMPHOCYTE CULTURES**

(M.Sc. Thesis)

Gökçe TANER

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

October 2007

ABSTRACT

In this study, antigenotoxic effects of lipoic acid and ferulic acid on MMC induced chromosomal aberrations, sister kromatid exchanges and micronucleus in human lymphocytes was investigated. Preventive efficacy of LA and FA due to their antioxidant properties against the effect of MMC on the mitotic index and replication index was also investigated. In the LA study, all cultures were treated with 0,2 µg/ml MMC for 48 hours. Three different consantrations (0,5, 1, 2 µg/ml) of LA was added to the MMC induced cultures for three different times; 1 hour pre-teratment, simultaneous treatment and 1 hour post-treatment. In the FA study, the MMC induced cultures were simultaneously treated with five different concentrations (0,25, 0,5, 1, 2, 4 µg/ml) for 24 hours. A negative control, a positive control and a vehicle treated control (ethanol) was also included. In all the cultures treated with MMC+LA and MMC+FA, the frequency of abnormal cells and CA/cell were reduced compared with MMC treated cells. This reduction was significant in LA treatment. Statistically significant reduction was also observed in SCE/cell and MN frequencies in both LA and FA treatments. These results show anticlastogenic and antimutagenic effects of LA and FA against MMC induced genetic damage. On the other hand, LA and FA treatments induced significant reduction in the mitotic index in all

treatments. These results indicate that these these two antioxidants have antimitotic effects in human culture cells.

Science Code : 203.1.048

**Key Words : Lipoic acid, Ferulic acid, MMC, antigenotoxic effect,
chromosomal effects (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs),
mitotic index (MI), micronucleus (MN)**

Page Number: 93

Adviser : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında; konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, büyük yardımlarını gördüğüm Sayın hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; laboratuvar çalışmalarında bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, benden yardımlarını ve dostluklarını hiç esirgemeyen değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, Yard. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a, Araş. Gör. Serkan YILMAZ'a ve laboratuvarda çalışan yüksek lisans öğrencisi tüm arkadaşlarıma saygılarımla teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	.xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	6
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	8
2.4. Oksidatif Stres.....	11
2.5. Genetik Hasara Yol Açan Radikal Etkileşimleri.....	11
2.6. Antigenotoksisite Çalışmaları ve Önemi.....	15
2.7. Lipoik Asit	23
2.8. Ferulik Asit.....	29
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	31
3.1.2. Test materyali	31

Sayfa

3.2. Metot	32
3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi	32
3.2.2. Preparatların hazırlanması.....	33
3.2.3. Preparatların boyanması.....	36
3.2.4. Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanması	37
3.2.5. Kardeş kromatid değişiminin (KKD) saptanması	37
3.2.6. Mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksinin (RI) saptanması	38
3.2.7. Mikronukleüslerin (MN) saptanması.....	38
3.2.8. Nükleer Bölünme İndeksinin (NBİ) saptanması.....	39
3.2.8. İstatistiksel analizler.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1. Lipoik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkileri	40
4.2. Ferulik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkileri	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ.....	93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin çeşitli serbest radikalleri süpürücü özellikleri.....	26
Çizelge 4.1. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, KA/ Hücre sayısı ve anormal hücre frekansı	41
Çizelge 4.2. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks	44
Çizelge 4.3. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde gözlenen mikronukleus değerleri	46
Çizelge 4.4 MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, KA/ Hücre sayısı ve anormal hücre frekansı	49
Çizelge 4.5. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks	50
Çizelge 4.6. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferall lenfositlerinde gözlenen mikronukleus değerleri	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hidroksil radikalının DNA'ya etkileri.....	12
Şekil 3.1. Lipoik asidin yapısal formülü.....	31
Şekil 3.2. Ferulik asidin yapısal formülü.....	32
Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri.....	38
Şekil 4.1. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan lenfosit kültürlerinde mitotik indeks değişimi.....	44
Şekil 4.2. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan lenfosit kültürlerinde mitotik indeks değişimi.....	50

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler	42
Resim 4.2. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri	45
Resim 4.3. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler	46
Resim 4.4. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler	48
Resim 4.5. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri	51
Resim 4.6. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
°C	Santigrat derece
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/ Mililitre
μL	Mikrolitre
LD₅₀	Letal doz
rpm	Devir sayısı
Kısaltmalar	Açıklama
ADR	Adriamisin
CAs	Chromosomal aberretions
CP	Siklofosfamid
Cyt-B	Sitokalsin-B
DHLA	Dihidrolipoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dxr	Doksorubisin
FA	Ferulik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
KA	Kromozoamal anormallikler
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LA	Lipoik asit

Kısaltmalar**Açıklama****MDA**

Malondialdehit

MI

Mitotik indeks

MMC

Mitomycin-C

MMS

Metilmetansulfonat

MN

Mikronükleus

NBİ

Nükleer bölünme indeksi

NDGA

Nordihidroguaiaretic asit

RI

Replikasyon indeksi

ROP

Reaktif oksijen partikülleri

ROT

Reaktif oksijen türleri

SCE

Sister chromatid exchange

SOD

Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında çok sayıda genotoksik ajanın mutajenik ve kanserojenik etkisi ile karşılaşmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile birlikte üretilen yeni kimyasallar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları, çevreye verilen atıklar canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma riski taşımaktadır. İşte bu riski nedeniyle, birçok çevresel kimyasal in vivo ve in vitro testler ile mutajenik ve kanserojenik etkileri bakımından araştırılmakta ve değerlendirilmektedir. Yapılan birçok araştırmada, kimyasalların mutajenik etkileri ile kanser oluşturma riski arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir [Stich ve Dunn, 1986; Kaderlik ve ark., 1992]. Bundan dolayı öncelikle bu zararlı ajanlara maruziyetin en aza indirilmesinin, bu hastalıklardan korunmak için en iyi yol olacağı öne sürülmektedir. Ancak modern yaşamda genotoksisitenin kaynağını tamamen elimine etmek mümkün değildir [Hernandez-Ceruelos ve ark., 2002]. Bu nedenle, iyi bilinen antimutajenlerin tanımlanması ve kullanılması, insan sağlığının iyileştirilmesinde, kanser ve genetik hastalıklardan korunmada çok önemli bir stratejidir [Garcia ve ark, 2006; Hernandez-Ceruelos ve ark., 2002; Anderson, 1996; Ferguson, 1994].

Antitümöral ajanlar birçok insan kanserlerine karşı ortak bir terapötik etki göstermekle birlikte, memeli hücrelerinde toksisiteye neden olan diğer kimyasal ajanlar gibi, spesifik biyomoleküllerle etkileşerek hasara neden oldukları, fizyolojik yan etkilere yol açtıkları ve tümör olmayan hücrelerde ikincil tümörlerin doğmasına neden olabilecek genotoksik etkileri indükleyebildikleri bilinmektedir [Weijl ve ark.,1997; Gentile ve ark., 1998]. Farklı kategorilerden antitümöral ilaçlar ile muamelenin hem in vitro çalışmalarda, hem de in vivo çalışmalarda hücrelerde serbest radikallerin oluşumuna yol açtığı bulunmuştur [Antunes et al, 2000].

Antitümöral ajanların yan etkilerini azaltmak için birçok hastada besin takviyesi ve/veya vitamin kombinasyonu terapisi uygulanmaktadır. Bu besin ve vitamin kombinasyonlarının birçoğu önemli miktarlarda antioksidanları, serbest radikal süpürücü ajanları ve/veya genel bloklayıcı ajanları içermektedir [Mitscher ve ark.,

1996]. Bu tür ajanlar antitümör ilaç uygulamalarının fizyolojik yan etkilerini azaltma potansiyeline sahip olmakla kalmayıp, aynı zamanda genotoksik etkileri sınırlandırmak için büyük bir potansiyele sahiptirler [Waters ve ark., 1996].

Son yıllarda birçok farklı maddenin, farklı test sistemleri ile antigenotoksik etkilerini ortaya koyan çalışmalar yapılmaktadır. Bu deneylerin dayandığı temel prensip, antimutajenik etkisi test edilecek maddenin, mutajen olduğu bilinen bir madde ile birlikte kullanılmasıdır. Deneylerin amacı; memelilerde test mutajeni tarafından oluşturulan sitogenetik hasarın, antioksidan maddenin etkisi ile azalıp azalmadığını kontrol etmek ve bunun hangi koşullar altında gerçekleştiğini belirlemektir [Renner, 1984].

Bu araştırmada, antioksidan maddelerden α -lipoik asit ve ferulik asitin, antitümöral bir ajan olan mitomisin-C (MMC) tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine, olası antigenotoksik etkileri incelenmiştir. MMC, DNA iplikleri arasında çapraz bağlanmalara yol açan alkilleyici bir ajan ve doğal bir antibiyotiktir [Krishna ve ark., 1986]. Ancak diğer antitümöral ilaçlar gibi, hem prokaryotlarda, hem de ökaryotlarda mutajen olduğu ve özellikle kromatid tipi aberasyonların, kardeş kromatid değişimlerinin ve mikronükleusların sayısını arttırdığı bilinmektedir [Vig, 1977]. Lipoik asit, insanlarda ve hayvanlarda organizmanın kendisi tarafından da sentezlenen, bilinen en güçlü antioksidanlardan biridir. Hem suda hem de yağda eriyebilen, bu nedenle de hücrenin hemen her yerinde görev üstlenebilen tek antioksidandır [Packer, 1995]. Bu avantajı ve düşük toksisitesi nedeniyle, serbest radikal hasarına karşı etkili terapötik bir ajan olarak, artan bir ilgi ile kullanılmaktadır. Ferulik asit ise, sebze ve meyvelerde bol bulunan, güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinen fenolik bir bileşiktir [Graf, 1992]. Lipoik asit ve ferulik asitin her ikisinin de antioksidan aktivitesi nedeniyle, çok çeşitli hastalıklarda etkili olduğu gösterilmiştir. Bu özellikleri göz önünde bulundurularak, bu çalışmada lipoik asit ve ferulik asidin, MMC tarafından oluşturulan kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimleri, mikronükleus ve mitotik indeks ile replikasyon indeksi değişimleri üzerinde, antioksidan aktivitelerine bağlı iyileştirici etkilerinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Serbest Radikaller

Son yıllarda sıklıkla duyduğumuz “serbest radikaller” hem vücudumuzun normal metabolik faaliyetleri sırasında oluşabilen, hem de pestisitler, gıda katkı maddeleri, ilaçlar, endüstriyel kimyasallar, radyasyon, alkol, sigara, stres, virüsler, ağır metaller gibi pek çok dış kaynaklı etkenlerle oluşabilen reaktif moleküllerdir [Saraç, 2005]. Serbest radikaller, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanırlar [Mercan, 2004]. Serbest radikallerin yüksek düzeyde reaktif bileşikler olmaları, en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşımalarından ve bu nedenle kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerinden kaynaklanmaktadır [Saraç, 2005]. Yani serbest radikaller, atomik ya da moleküler yapılarında çiftleşmemiş bir veya daha fazla elektron taşıyan ve başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren moleküllerdir [Halliwell, 1991a; Çavdar ve ark., 1997; Anderson, 1996, Akkuş, 1995]. Bu moleküllere “oksidan moleküller” veya “Reaktif Oksijen Partikülleri” (ROP) de denilmektedir.

Canlı hücrelerdeki serbest radikallerin kaynağı ve radikal reaksiyonlarının asıl başlatıcıları, dünya atmosferindeki oksijen molekülleridir. Atmosferde %20 civarında bulunan oksijen, bütün aerobik organizmalarda solunum ve diğer oksidatif reaksiyonlar için gerekli hayat kaynağıdır. Ancak aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak, moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında reaktif oksijen türleri oluşur [Anderson, 1996; Burçak ve Andican, 2004]. Bu nedenle biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir [Mercan, 2004]. Oksijenin elektronları öyle bir şekilde dağılmışlardır ki bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir diradikal olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği, onun diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Bu arada, kısmi redüksiyonla çok sayıda yüksek derecede reaktif ürünler de oluşabilir [Akkuş, 1995].

Organizmada çeşitli reaksiyonlarla pek çok türde reaktif oksijen partikülleri oluşabilir.

Reaktif Oksijen Partikülleri

1 - Radikaller:

Süperoksit radikal ($O_2^{\cdot -}$)

Hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$)

Alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$)

Peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$)

2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Lipid hidroperoksit ($LOOH$)

Hipoklorik asit ($HClO$)

3 - Singlet (tek) oksijen

Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler, ayrıca organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize etmelerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

Membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik etkilere sahip olabilen hidrojen peroksit ise çiftleşmemiş elektrona sahip olmadığından bir serbest radikal değildir. Bu nedenle reaktif oksijen partikülleri (ROP) terimi, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir.

Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikali. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile hidroksil radikali meydana gelir [Akkuş, 1995]. Bir proton ve bir elektron içeren hidrojen radikali ($H^{\cdot}$)

en basit serbest radikaldır. Diğer moleküllerden hidrojen radikalının taşınması ile genellikle zincir reaksiyon başlatılır, örneğin lipid peroksidasyonu sırasında [Anderson, 1996]. Böylece serbest radikaller en sık olarak lipid yapılarda oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları bu reaksiyonları hızlandırır ve lipid peroksidasyonu olarak bilinen bu reaksiyonlar zincir reaksiyon şeklinde sürekli devam eder. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehit grubundan malondialdehittir (MDA) [Çavdar ve ark., 1997]. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın azotlu bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve kanserojendir [Mercan, 2004].

Oksijen molekülü, orbitalinde çiftleşmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Nötrofilleri, monositleri, makrofajları ve eozinofilleri içeren aktif fagositler, yabancı maddeleri yok ederken, büyük miktarda süperoksit oluştururlar. Böylece organizmadaki normal koruyucu mekanizmanın kendisi de hasar verici olabilir. Diğer bir reaktif oksijen türü ise, normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan ve yapısında iki adet çiftleşmemiş elektron taşıyan singlet oksijendir. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar [Çavdar ve ark., 1997]. Bir başka fizyolojik serbest radikal nitrik oksittir ($\text{NO}\cdot$). Nitrik oksit aşırı miktarlarda oluştuğunda toksik olabilir. Süperoksit, hidroksil radikalleri oluşturmak üzere bakır ve demir iyonları ile reaksiyona girebilir veya nitrik oksit ile kombine olabilir. NO_2 , $\text{OH}\cdot$ veya $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ gibi reaktif radikaller, membranlarda veya lipoproteinlerde doymamış yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomu çıkarırlar. Bu işlem, karbon üzerinde eşleşmemiş elektron bırakır. Karbon radikali oksijen ile reaksiyona girer ve oluşan peroksil radikali bitişindeki yağ asidi zincirlerine saldırır ve yeni karbon radikalleri oluşturur; böylece zincirleme bir reaksiyon devam eder. Tek bir reaktif

serbest radikal atağı bütün yağ asidi zincirini okside edebilir ve membran proteinlerine zarar verebilir. Bu durum membranı hasarlı hale getirir ve membran parçalanmalarına yol açar.

2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller, iyonize radyasyonun etkisi gibi nadir durumlar dışında, hücrelerde genellikle elektron aktarımı reaksiyonlarıyla oluşurlar. Bu reaksiyonlar, ya enzimlerin etkisiyle ya da non-enzimatik olarak geçiş metalleri iyonlarının redoks kimyası aracılığı ile gerçekleşir [Akkuş, 1995]. Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, mitokondrilerdeki elektron taşıma zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman, mitokondriyal süperoksit radikali üretimi artar. Serbest radikal üretimi, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında, zara bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi, birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROP'lar oluşur.

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler 4 grupta toplanabilir. Birincisi toksinin kendisi bir serbest radikal olabilir. Kirli havanın koyu rengini veren azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) gazı böyle bir maddedir. İkinci durum, toksin bir serbest radikale metabolize olabilir. Örneğin toksik bir madde olan karbontetraklorür, karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüştürülür. Bu radikalin oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücrelerdeki membranların oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır. Üçüncü durum, toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelebilir. Bunun tipik bir örneği paraquat'dır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra, tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol

miktarda süperoksit üretilmiş olur. Diyabetik bir ajan olan alloksan da paraquat gibi etki eder. Yine antikanserojen bir madde olan doxorubicin, DNA replikasyonunu inhibe ederken, muhtemelen önemli miktarda süperoksit ve hidroksil radikali üretimine de sebep olur. Dördünü durumda toksin, antioksidan aktiviteyi düşürebilir. Örneğin, parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolize edilmesiyle, glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana gelmektedir [Akkuş, 1995].

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları [Carroll, 1987; Çavdar ve ark., 1997]

I - Normal biyolojik işlemler

1 - Oksijenli solunum

2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite -intoksikasyon

2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi

a-) İn hale edilenler

b-) Alışkanlık yapan maddeler

c-) İlaçlar

3 - Oksidan enzimler

a-) Ksantin oksidaz

b-) İndolamin dioksigenaz

c-) Triptofan dioksigenaz

d-) Galaktoz oksidaz

e-) Siklooksigenaz

f-) Lipooksigenaz

g-) Monoamino oksidaz

4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin seviyesini ve indükledikleri hasarı sınırlandırmak için vücutta antioksidan savunma sistemleri görev yapmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya azaltan maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denilmektedir [Çavdar ve ark., 1997]. Antioksidanlar, hem direkt hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, kanserojenlerin ve toksik radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri korurlar [Mercan, 2004].

Antioksidanların etkileri şöyle açıklanabilir; doğranmış bir elma açık havada bırakılırsa, kahverengiye dönüşür; üzerine biraz limon suyu damlatılırsa elma beyaz kalacaktır. Elmanın renginin değişmesinin sebebi oksidasyon sürecidir. Limon suyunda ise bir antioksidan olan C vitamini vardır, bu da elmanın oksidasyonunu engellemektedir. İşte antioksidanlar sadece elmada değil, insan hücrelerindeki oksidasyonun da zararlı etkilerini önlerler veya azaltırlar [Mindell, 2005].

Antioksidanlar serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluştururlar. Eğer serbest radikaller, istedikleri elektronu antioksidanlardan sağlarsa başka bir yapıya zarar vermezler. Böylece antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini nötralize ederek onların neden oldukları dejeneratif hastalıklar ve erken yaşlanma süreçlerini başlatan zincirleme reaksiyonlarını engellerler.

Antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren enzim sistemleri (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi) veya radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidan maddeler (melatonin, lipoik asit, vitamin A, E ve C gibi) olarak ayrılmaktadır. Antioksidanlar, doğal (endojen) kaynaklı ve dış (eksojen) kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi, serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olan ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar [Akkuş, 1995].

Antioksidanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini, çeşitli mekanizmalar ile gösterirler. Bunlar serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemi şeklinde “toplayıcı” veya “süpürücü” (scavenging) bir etki, serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen katarak aktivitelerini azaltan veya inaktif hale getiren “bastırıcı”, “giderici” (quencher) bir etki, serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinde kırarak “zincir kırıcı” (chain breaking) bir etki ya da “onarıcı”, “tamir edici” (repair) bir etki şeklinde gerçekleşebilmektedir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller toplayıcı etki gösterirken; vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bastırıcı etki gösterirler. Hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller ise zincir kırıcı etki göstermektedirler [Halliwell ve Gutteridge, 1989; Akkuş, 1995].

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD’un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx’de ise selenyum iyonu bulunduğu için bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılır. Hücre içi ortamın aksine, hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten sorumludur [Halliwell, 1991b; Çavdar ve ark., 1997].

Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. Bazı antioksidanlar yalnız hücre içinde görev yapar. Örneğin, tamir enzimleri serbest radikal hasarını DNA’da okside bazları çıkararak yapar [Breimer, 1991; Ames, 1989] ve membranlardan okside yağ asitlerini uzaklaştırır [Maiorino ve ark, 1991]. Bu reaksiyonlar intrasellülerdir [Anderson, 1996]. Bazı antioksidan savunmalar ise ekstrasellülerdir, örneğin plazma taşıma proteini transferrin ve demir bağlayıcı protein laktoferrin. Demir bu protein ile bağlandığında serbest radikal hasarını katalizleyemez [Halliwell ve Gutteridge, 1989]. Bu proteinler gözyaşı gibi vücut salgılarında bulunur [Anderson, 1996]. Albumin de bakır iyonlarını bağlar ve bu şekilde çeşitli radikal reaksiyonlarını engelleyebilir [Halliwell ve Gutteridge, 1989]. Antioksidan savunma sistemlerinden bazıları da hem intrasellüler hem de

ekstrasellüler olarak bulunur. α -Tokoferol membranlarda ve lipoproteinlerde meydana gelir. α -Tokoferol, ara peroksil radikalini yok ederek lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu engeller. C vitamini, komşu yağ asidi zincirlerine saldırımda daha az reaktif olan tokoferol radikalini, α -tokoferole çevirir. α -Tokoferol kardiovasküler hastalıklara ve nörodejenerasyona karşı korumada önemlidir [Muller ve Goss-Sampson, 1990]. İndirgenmiş glutatyon, ozon ve sigara dumanındaki serbest radikaller gibi oksidatif toksinleri ve nitrik oksidi yok ettiği solunum yolu haricinde vücutta çok az miktarlarda bulunur [Slade ve ark.,1993]. Ürat, pürin metabolizmasının son ürünüdür ve serbest radikalleri yok eder [Kaur ve Halliwell, 1990]. Askorbat, α -tokoferol, GSH ve su, serbest radikaller ile non-katalitik olarak doğrudan reaksiyona girerek onları uzaklaştırırlar [Anderson, 1996].

Bitkiler lipid peroksidasyonunu ve lipooksijenazları inhibe eden flavonoidler gibi birçok fenolik bileşikleri içerirler [Laughton, 1991]. Yağ alımının azaltıldığı, sebze, meyve, yemişler ve tohumlarca zengin bir diyet kardiovasküler hastalıklar ve kanseri de kapsayan birçok hastalığa karşı koruyucu olarak görülmektedir [Ames, 1983; Coglan, 1991; Caragay, 1992]. E vitamininin diyetle artan alımı miyokardial enfarktüstünlükten ölümleri azaltmaktadır [Byers, 1993]. Serum antioksidanları ve diyet üzerine epidemiyolojik çalışmalar, E vitamini ve β -karoten seviyesinin artmasının akciğer ve kolon kanserinden ölümleri azalttığını göstermektedir [Menkes ve ark., 1986].

Vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller, yine belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışını etkisiz hale getirebilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada, oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içinde kalmaktadır. Ancak oksidanlar belirli düzeyin üstünde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa, yani denge bozulursa, oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar ve söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan proteinleri, lipidleri, karbonhidratları, nükleik asitleri ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar [Halliwell, 1991b; Çavdar ve ark., 1997].

2.4. Oksidatif Stres

Toksisitenin olası bir mekanizması olarak özellikle son yıllarda pek çok araştırmanın odağı haline gelen “oksidatif stres” kısaca, serbest radikallerin hücrede aşırı miktarda oluşmaları şeklinde tanımlanmaktadır [Mercan,2004].

Oksidatif stres, temelde, normal biyolojik reaksiyonlarda dahi sürekli oluşum içinde olan serbest radikaller ile bu moleküllerin etkilerini ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkar [Boyunağa ve Çelik, 1996]. Oksidatif stres, tüm hücre bileşenleri (karbonhidratlar, proteinler, yağlar, nükleik asitler) üzerinde tahrip edici etkiye sahiptir ve çeşitli mekanizmalar ile bu biyomoleküllere hasar vermektedir [Cooke ve ark., 2003; Evans ve Cooke, 2004; Burçak ve Andican, 2004]. Oksidatif stres sonucu oluşan hidroksil radikali başta olmak üzere birçok serbest radikal, genetik materyalimiz olan DNA’daki bazların değişimine ve DNA zincirinde kırılmalara sebep olarak kanser oluşumu, hücresel yaşlanma ve hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatıp, ilerletebilmektedir [Boyunağa ve Çelik, 1996].

2.5. Genetik Hasara Yol Açan Radikal Etkileşimleri

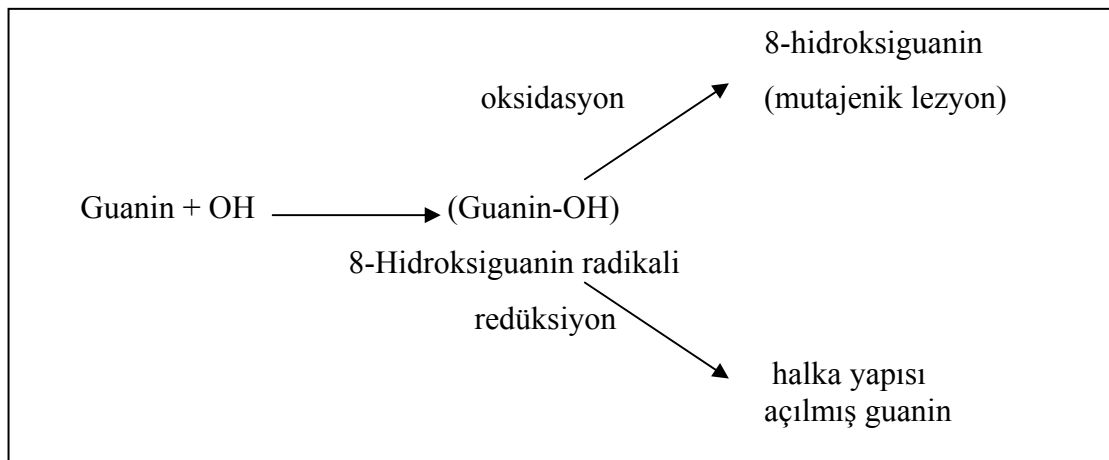
Oksidanların oluşumu ve savunma mekanizması tarafından yok edilmesi arasında geçen zaman, oksidan seviyesi düşük dahi olsa, hücresel makro moleküllerde hasar oluşturmak için yeterli olabilmektedir [Chance ve ark., 1979].

Memeli hücresi, çekirdek DNA’sı için, üç aşamalı savunmaya sahiptir [Ames, 1989]. Birincisi, çekirdek DNA’sı, oksidanların en çok üretildiği mitokondri ve peroksizomlardan bir zarla ayrılmıştır. İkincisi, replike olmayan çekirdek DNA’sı, oksidanlara karşı koruyucu olan histonlar ve poliaminler tarafından çevrelenmiştir. Üçüncüsü ise, çeşitli yollarla oluşan birçok DNA hasarı tipi, etkili enzim sistemleri tarafından tamir edilebilir [Breimer, 1991; Stillwell ve ark., 1989]. Tüm bu çok aşamalı savunmanın sonucunda çekirdek DNA’sı, çok iyi korunsa da, oksidanların etkisi yine de tam olarak engellenemez [Anderson, 1996].

İyonize edici radyasyon ve kimyasalların etkisi ile oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asitlerin bazlarındaki modifikasyon nedeniyle DNA'da oluşan bozulmalara ve kromozom hasarına bağlıdır [Akkuş, 1995].

Reaktif oksijen moleküllerinin oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarındaki hatalar, oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır [Burçak ve Andican, 2004]. Bu hasar genellikle tek zincir kırıkları şeklinde, bazen de çift zincir kırıkları, zayıf alkali alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı ve çeşitli tiplerde okside olmuş purin ve pirimidinler şeklinde veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar şeklinde oluşabilir [Garcia et al., 2006]. Hidroksil radikali DNA'ya yakın yerlerde oluştuğunda purin ve pirimidin bazlarına saldırır ve burada mutasyonlara neden olur [Dizdaroğlu, 1993].

Oksidatif stresten en çok etkilenen bazlar DNA'daki guanin ve sitozindir. Deoksiguanindeki 8 numaralı karbona bir oksijen atomunun bağlanması sonucunda 8-hidroksiguanin oluşur. Bu bileşik fizyolojik pH'da 8-oxoguanozine dönüşür ki bu da DNA'da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyonlara sebep olur. Aynı şekilde oksidatif şartlarda deoksisitozinden 5-hidroksisitozin meydana gelir [Anderson, 1996; Akkuş, 1995].



Şekil 2.1. Hidroksil radikalının DNA'ya etkileri [Akkuş, 1995]

Kanser ve yaşlanma ile ilgili somatik hasar teorisine göre, somatik dokuların tamir düzeyi, hayatta kalmak için gerekenden her zaman daha azdır. Bu nedenle, somatik hücrelerde endojen mutajenler tarafından oluşturulan bazı DNA hasarları zamanla birikir [Ames, 1989].

DNA hasarına yol açan dört önemli endojen işlem vardır. Bunlar;

1. Oksidasyon [Totter, 1980; Ames, 1983; Cutler, 1984]
2. Metilasyon
3. Deaminasyon
4. Depurinasyondur [Saul ve Ames, 1986].

Oksidatif, metillenmiş ve deamine olmuş bağlantılar (adduct) için spesifik DNA tamir glioksilazlarının ve kendiliğinden depurinasyon tarafından oluşturulan apurinik bölgeler için tamir sisteminin varlığı, DNA hasarına yol açan bu mekanizmaları desteklemektedir [Lindhal, 1982]. Ames (1989), oksidasyonun DNA hasarının temel tipi olduğunu göstermiştir.

Oksidatif endojen DNA hasarı, kanser ve yaşlanma, birçok sebebe bağlıdır. Buna göre, birinci sebep mutajenlerin nükleer DNA ile reaksiyona girmesi ve nokta mutasyonları ve delesyonlar gibi somatik mutasyonları oluşturmalarıdır. DNA'nın kendiliğinden metilasyonu, klastojenik etkilere yol açan apurinik bölgeler oluşturabilmekte ve nokta mutasyonlarına ve kırıklara neden olmaktadır. Somatik mutasyon, hücrelerin regülasyonunu veya gen üretimini değiştirerek hücreleri karışıklığa itebilir. Bir başka sebep; mitokondride meydana gelen yüksek orandaki oksidatif hasarın mitokondrial DNA'da yaşla birlikte mutasyonların birikmesine yol açması ve bu durumun yaşlı hücrelerde enerji eksikliği ile sonuçlanmasıdır [Anderson, 1996].

Mutasyon kanserle ilişkili genlerde de oluşabilir. Kanserle ilişkili en önemli genler ras-ailesi protoonkogenler ve p53 tümör baskılayıcı gendir. Solar radyasyon ile ilişkili olan deri kanserinde, mor ötesi ışık (290-380 nm) özellikle oksidatif mekanizmalar ile DNA'ya hasar verir. Non-melonoma deri tümörlerinde Ki-ras ve

H-ras genlerinde 12. kodonun orta pozisyonunda sıklıkla G→T transversiyonları gözlenir [Daya-Grosjean ve ark., 1993]. G→T transversiyonları aynı zamanda sigara ile ilişkili akciğer karsinomalarında birçok p53 kodonunda gözlenmektedir [Takahashi ve ark., 1989]. Bu mutasyon inflamatuvar lökositler tarafından oksiradikallerin doku içine salınmasıyla oluşturulmaktadır [Anderson, 1996].

Oksidasyon ve metilasyon epigenetik değişime neden olur. 5-metilsitozin, DNA'da bozulmaya, bu nedenle bazı genlerin kapatılmasına ve sonuçta, kanser ve yaşlanmaya neden olabilir [Wilson ve ark., 1987; Holliday, 1987].

Halliwell ve Gutteridge, oksidatif hasarın, doku hasarının nedeni olabileceği kadar sonucu olabileceği üzerinde de durmuştur [Halliwell ve Gutteridge, 1984] Doku hasarı oksidatif strese yol açar. Bu durum daha sonra doku hasarının kötüleşmesine katkıda bulunabilir. Yaşlanmanın, oksidatif metabolizmanın ürünleri olan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimine bağlı olarak hücresel seviyede ve doku seviyesinde DNA, lipid ve protein hasarına yol açan ve sonuçta organizma seviyesinde fenotipte de indüklenen bir birikim olduğuna inanılmaktadır [Finkel ve Holbrook, 2000]. Bununla birlikte diğer birçok hastalık durumlarında da serbest radikal hasarının önemli olduğuna dair birçok kanıt vardır. Bundan dolayı antioksidan savunmanın bu tarz hastalıklara karşı korumadaki faydasını anlamak oldukça önemlidir. Karsinogenezin çok aşamalı bir olay olduğu bilinmektedir. Antioksidanlar kanser oluşum sürecindeki değişimlere herhangi bir aşamada etki edebilir ancak her durumda antikanserojenik olmayabilirler.

Yüksek antioksidan kapasite DNA'daki oksidatif hasarı ve mutagenezi engeller, aynı zamanda daha önceden bununla karşılaşmış hücreleri aşırı oksidan toksisitesi ve apoptozisten korur ve tümör oluşumunda bu hücrelerin klonal ekspresyonunu etkiler [Cerutti ve Trump, 1991]. İnsan kanserleri üzerine antioksidanların tek başına rolü ile ilgili net bir cevap verilememektedir. Sonuç ise hedef dokunun oksidan ve antioksidan bileşenleri ile maruz kalınan özel karsinojenin çoklu etkileşimine bağlıdır [Cerutti, 1994; Anderson, 1996].

2.6. Antigenotoksisite Çalışmaları ve Önemi

Birçok mutajen ve kanserojen, çeşitli oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle etki eder. Bu radikallerin kendisi genotoksik olarak düşünülür, bunlar ayrıca diğer radikallerin oluşumuna da yol açabilir. Bundan dolayı serbest radikalleri etkisiz hale getiren antioksidan maddeler veya serbest radikal süpürücü etkiye sahip diyetel bileşikler çoğu zaman antimutajenik ve/veya antikanserojenik olarak adlandırılır [Wang ve ark., 1989].

İnsanlarda ve diğer hayvan türlerinde çevresel ajanların toksik etkilerine karşı koyma yeteneği, detoksifikasyon sistemi ve antioksidan savunma sistemlerine bağlıdır [Madrigal-Bujaidar ve ark.,1998]. Her ne kadar vücudumuzda çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları bulunmakta ise de, doğal antioksidan üretimi yaş ilerledikçe, özellikle 25 yaşından sonra, gittikçe yavaşlamaktadır. Günümüzde anti-aging olarak da adlandırılan ve yaşlanma etkilerinin geriye çevrilmesini hedefleyen uygulamalar dahilinde, pek çok insan dışardan antioksidan takviyesi almaktadır. Antioksidanların yararlı etkilerinin görülebilmesi için, vücut sıvılarında belli miktarlarda bulunmaları gerekmektedir [Saraç, 2005]. DNA ile etkileşerek gen ve kromozom mutasyonları oluşturan genotoksik kanserojenler ile baş edebilmek için antioksidanların varlığı çok önemlidir. Bunun için önerilen strateji, etkili antimutajenlerin ve antikanserojenlerin tanımlanması ve yaşam tarzı, yemek alışkanlıkları veya çalışma aktiviteleri ile ilişkili olabilen bir hastalık olan kanserin insidansını azaltmak için insanlarda bunların kullanımının arttırılmasıdır [Garcia ve ark., 2006; Madrigal-Bujaidar ve ark.,1998; Ferguson, 1994].

Kanserin ve mutasyonlarla ilişkili diğer hastalıkların yalnızca bilinen risk faktörlerine maruziyetten kaçınarak değil, aynı zamanda koruyucu faktörleri alarak ve organizmanın savunma mekanizmasının iyileştirilmesine yardım ederek engellenebileceğine dair kanıtlar artmaktadır. Bu strateji kimyasal engelleme (chemoprevention) olarak bilinir ve uygun farmakolojik ajanlar ve/veya diyetel faktörler tarafından sağlanır [Editorial, 2005].

Kimyasal koruyucu ajanlar, antimutajenik/antikarsinojenik etkilerini şu mekanizmalardan biri veya bunların kombinasyonu ile gösterebilirler:

1. Reaktif kanserojen metabolitlerin oluşumunu engelleyerek
2. Kanserojenleri detoksifiye eden enzimleri indükleyerek
3. Reaktif oksijen türlerini süpürerek
4. Apoptozisi etkileyerek
5. Hücre proliferasyonunu inhibe ederek [Premkumar ve ark., 2004].

Araştırma sonuçları günlük antioksidan tüketiminin artırılmasının kalp hastalığı, kanser ve diğer birçok ciddi hastalığın oluşma riskini ve yaşlanma etkilerini azalttığını göstermektedir. Denham Harman tarafından ortaya atılan serbest radikal teorisine göre, normal yaşlanma, aerobik metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesi sonucu oluşan hasar nedeniyle gerçekleşmektedir. O halde dengeli bir beslenme, serbest radikal reaksiyonlarını minimum düzeyde tutmalıdır.

Antioksidanlar açısından en zengin kaynaklar sebze ve meyvelerdir. Epidemiyolojik gözlemler, sebze ve meyve yiyen insanlarda çok daha düşük oranda kanser görüldüğünü göstermiştir. Diğer yandan, besin maddelerinin geçirdiği işlemlerin (ürünün ekiminden, toplanması, depolanması ve pişirme yöntemleri gibi pek çok etken sonucu oluşan kanserojen maddelerin alınmasının) kanserle çok yakından ilişkili olduğu da unutulmamalıdır. Ancak diyetteki kanserojen maddelerin etkisi yine diyetle bulunan antikanserojen maddeler tarafından engellenebilir.

Diyetsel antioksidan takviyesinin önemi birçok çalışma ile desteklenmektedir. Dusinska ve arkadaşları (2003), antioksidan takviyesinin kromozom hasarı üzerine etkilerini araştırmak için, tümü erkek 28 miyokardiyal enfarktüs hastası ve kırsal bölgelerde yaşayan bireylerden oluşan 57 kişilik kontrol grubu üzerinde 3 ay antioksidan takviyesi denemeleri yürütmüşlerdir. Bu takviye C vitamini (100 mg/gün), E vitamini (100 mg/gün), β -karoten (6 mg/gün) ve selenyum (500 mg/gün) içermektedir. Takviye periyodu sonunda plazmadaki diyetel antioksidanlar

ölçülmüştür, aynı şekilde plazmanın ferrik indirgeme kabiliyeti ve oksidatif stresin indikatörü olarak malondialdehit konsantrasyonları ölçülmüştür. Bu çalışmada ayrıca kromozom aberasyonlarını belirlemek üzere başlangıçta ve takviye periyodu sonunda toplanan lenfositler, proliferasyon için uyarılmış ve elde edilen metafazlarda anormal hücre yüzdesi, kromatit ve kromozom kırıkları gibi anormallikler açısından değerlendirilmiştir. Antioksidanlar ile yapılan takviye sonucunda kontrol gruplarındaki kromozom aberasyonlu hücrelerin yüzdesinde azalma gerçekleşmiştir (%0,63 önce, %0,27 takviyeden sonra). Takviyenin en büyük etkisi ise sigara içenlerde görülmüştür (%0,81, $p<0,001$). Bu çalışmadaki sonuçlar antioksidanların genetik hasarı azalttığını desteklemektedir [Dusinska ve ark., 2003].

Beta karoten, selenyum, E ve C vitaminleri bilinen en önemli antioksidanlardır. Bu maddeleri vücut kendi üretemediğinden dışarıdan alınmaları gerekir. Yeşil çay, keten tohumu, biberiye, alıç çiçeği ve meyvesi (*Cretaeus monogyna*), zerdeçal (*Curcuma longa*), ginko (*Ginkgo biloba*), çoban üzümü (*Vaccinium myrtillus*), üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera*) son yıllarda antioksidan etkileri ön plana çıkan doğal besinlerdir. Koenzim Q10, çinko, lipoik asit ve B vitaminleri karışımları ise hazır preparatlar şeklinde sıklıkla kullanılan antioksidanlardır [Saraç, 2005].

Gıdalarla alınan en önemli antioksidanlardan beta karoten, askorbik asit (C vitamini) ve alfa tokoferol (E vitamini) gibi antioksidanların serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu önlediği birçok in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. Vitamin C, E veya A'nın ön muamele şeklinde veya klastojenik ajan ile eş zamanlı olarak verilmesi gibi çeşitli muamele protokolleri oldukça iyi sonuçlar vermektedir [Aly ve Donya, 2002].

Vitamin C (askorbik asit) serbest radikalleri süpürücü etki gösteren ve DNA'yı da içeren hücresel makromolekülleri, farklı ajanlar tarafından indüklenen oksidatif hasardan koruyabilen bir antioksidandır [Nefic, 2001]. Vitamin C'nin pek çok antitümör ajanın klastojenik etkilerini başarılı bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Nefic (2001), cisplatinin neden olduğu, Anderson ve arkadaşları (1995) ise bleomycinin neden olduğu kromozomal hasarın C vitamini tarafından azaltıldığını bulmuşlardır.

Anderson ve arkadaşları, E ve C vitaminlerinin bleomisine karşı etkilerini test etmek için insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonu ve fare periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde mikronükleus yöntemini kullanmışlardır. C vitamini, insan periferik lenfositlerinde kromozomal hasarı ortadan kaldırmış ve yine her iki vitamin farede periferik kan lenfositlerindeki mikronükleus oluşumunu azaltmıştır. Bu sonuçlar, bu vitaminlerin in vitro ve in vivo olarak koruyucu rolü olabileceğini desteklemektedir [Anderson ve ark., 1995]. Bu konuda, Aly ve Donya (2002), en aktif tüberküloz ajanlarından biri olan rifampicinin genotoksik etkilerine karşı doğal antioksidanlardan vitamin C ve E'nin olası koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında elde edilen sonuçlar RMP tarafından indüklenen kromozom aberasyonlarının, C vitamini verilen farelerde anlamlı derece azaldığını göstermiştir. C vitamininin kullanılan dozları, kromozom aberasyonları yüzdesini anlamlı derecede ve doza bağlı olarak azaltırken, E vitaminin kullanılan dozları çok etkili olmamış, yalnızca en yüksek dozda anlamlı bir etki göstermiştir [Aly ve Donya, 2002].

Gülkaç ve arkadaşları (2004), Vitamin A'nın rat kemik iliği hücrelerinde doxorubicin tarafından indüklenen kromozomal hasar üzerine iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Wistar ratlara, doxorubicin (dxr) ile muamele edilmeden önce iki gün boyunca günde bir kere gavaj yoluyla vitamin A'nın (VA) çeşitli dozları (7,5, 15, 30 µg/kg bw) verilmiştir. VA'nın orta dozu ile birlikte tek doz dxr verilen hayvanlarda toplam CA sayısında ve anormal metafazların sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte kontrol ve dxr grupları ile mukayese edildiğinde düşük ve yüksek VA dozlarının analiz edilen parametrelere göre VA'nın orta dozundan daha az etkili olduğu bulunmuştur [Gülkaç ve ark., 2004].

Temel araştırmalar ve epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen kanıtlar, çok miktarda sebze ve meyve tüketiminin kanser oranlarını azalttığı hipotezini desteklemektedir. Birçok çalışma, karotenoidlerce zengin yeşil yapraklı sebzelerin kanser riskini azaltma yeteneğinde olduğuna işaret etmektedir. Bu konuda, özellikle β-karoten önemli bir koruyucu bileşen olarak bildirilmektedir [Glei ve ark., 2002;

Ferguson, 1994]. β -karoten, kanserogenezi çeşitli mekanizmalar yoluyla inhibe edebilir. Bunlar; serbest radikaller tarafından oluşturulan DNA hasarının önlenmesi, kanserojenlerin metabolik aktivasyonu sonucu oluşan maddelerin DNA ile etkileşiminin veya kanserojenlerin DNA'ya bağlanmasının önlenmesi şeklinde gerçekleşir. Sebzelerde ve baharatlarda çok çeşitli antioksidanlar bulunabilmektedir. Özellikle gallik asit, taninler, kurkumin, elajik asit gibi fenoller diyetset antioksidanlar olarak önem taşımaktadır [Glei ve ark., 2002].

Kurkumin, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda klastogeneze karşı koruyucu olduğu yayınlanmış diyetset bir antioksidandır. Antunes ve arkadaşları (2000), kurkuminin, Wistar rat kemik iliği hücrelerinde cisplatin tarafından indüklenen kromozomal hasara karşı iyileştirici etkilerini ve kurkumin ile vitamin C'nin birlikte kombinasyonunun bu etkileri arttırıp arttırmadığını araştırmışlardır. Belli sürelerde kurkumin ile muamele edilen hayvanlarda, toplam kromozomal hasar miktarında ve anormal metafaz sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Buradaki deneysel koşullar altında, kurkumin bir serbest radikal süpürücü olarak etki ederek cisplatin tarafından indüklenen klastogenezi engellemiştir. Ancak beklenenin aksine antioksidan kombinasyonunun cisplatinin neden olduğu kromozomal hasarı engellemede etkili olmadığı belirlenmiştir [Antunes ve ark., 2000].

Nordihydroguaiaretic asit (NDGA), antioksidan olarak işlev gören fenolik bir bileşiktir ve insanlar için yararlı pek çok özelliği vardır. Madrigal-Bujaidar ve arkadaşları (1998), NDGA'nın, insan lenfosit kültüründe metil metansulfonat (MMS) tarafından indüklenen kardeş kromatid değişimi oranını inhibe etme kapasitesini belirlemiştir. Bu çalışmada ayrıca kimyasalın inhibitör etkisini belirlemek için *in vivo* sistem olarak fare kemik iliği kullanılmıştır. MMS verilmesinden önce intraperitoneal olarak NDGA verilmiş ve NDGA'nın *in vitro* ve *in vivo* memeli hücrelerinde antigenotoksik etki oluşturduğu belirtilmiştir [Madrigal-Bujaidar ve ark., 1998].

Siddique ve arkadaşları (2006), norgestrel tarafından indüklenen genotoksik hasara karşı NDGA'nın etkisini kardeş kromatid değişimi, kromozomal aberasyon, mitotik

indeks ve replikasyon indeksi parametrelerini kullanarak araştırmışlardır. Norgestrel tek başına genotoksik etki gösterirken, NDGA ile birlikte yapılan uygulamalarda SCE ve CA'da azalma ve mitotik indeks ve aynı zamanda replikasyon indeksinde artış gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları da NDGA'nın in vitro olarak insan lenfositleri üzerinde koruyucu etkili olduğunu göstermiştir [Siddique ve ark., 2006].

Flavonoidlerin yüksek antioksidan aktivitelerinden ve diyetteki bolluklarından dolayı radyoprotektör olarak kullanımına olan ilgi de giderek artmaktadır. Bunun için Rithidech ve arkadaşları (2005), en yaygın flavonoidlerden biri olan apigeninin, insan lenfositlerinde radyasyon tarafından oluşturulan kromozom hasarı üzerine genotoksik ve koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Apigeninin etkilerini belirlemek üzere mikronükleus testi kullanılmıştır. Apigeninin çeşitli dozları genotoksisitesini belirlemek üzere test edilmiş, daha sonra koruyucu etkisini araştırmak üzere kültürle radyasyon verilmeden 30 dk. önce apigenin uygulanmıştır. Radyasyon uygulanan hücrelerde mikronükleus frekansı artarken, apigenin uygulanmış hücrelerde bu oranlarda anlamlı bir azalma gözlenmiştir [Rithidech ve ark., 2005].

Silva ve arkadaşları (2001), wistar ratlarda cisplatin tarafından oluşturulan oksidatif stres üzerine karotenoid biksinin rolünü araştırmışlardır. Bu çalışmada biksinin en yüksek dozu ile muamele, cisplatin indüklü anormal metafazlarda %33 civarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Biksinin ön muamelesi ise tüm uygulama dozlarında toplam kromozom aberasyonu sayısını azaltmıştır [Silva ve ark., 2001]. Antunes ve arkadaşları (2005), insan lenfosit kültürlerinde biksinin cisplatin tarafından oluşturulan serbest radikallerle etkileşerek antioksidan olarak etki gösterdiğini ve antiklastojenik olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler diyetset karotenoidlerin antitümör ajanların klastojenik etkilerine karşı koruyucu ajanlar olarak etki edebileceğini göstermektedir [Antunes ve ark., 2005].

Garcia ve arkadaşları (2006), oksidatif ajanlara maruz bırakılan insan periferik kan lenfosit kültüründe, L-carnitinin (LC) koruyucu etkisini araştırmışlardır. Literatür verileri uzun zincir grupları ve asetilin transmitokondriyel taşıyıcısı olan L-carnitinin, memeli hücrelerinde oksidatif strese karşı koruyucu etkiler gösteren bir

ajan olduğuna dikkat çekmektedir. Bununla birlikte koruyucu mekanizmasını sağlayan temel faktör bilinmemektedir. Bu çalışmada bu ajanın koruyucu aktivitesi periferik kan lenfositlerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve t-butylhydroperoksida muamelesi ile indüklenen reaktif oksijen türlerine karşı kromozom aberasyon analizleri ile çalışılmıştır. Sonuçlar LC ile muamele edilen hücrelerin tek zincir kırıkları ve kromozomal aberasyonları sayısında anlamlı bir azalma sergilediğini göstermektedir [Garcia ve ark., 2006].

Son yıllarda çevresel ve endojen mutajenlere karşı bitkiler ve diğer kaynaklarda bulunan çeşitli maddelerin koruyucu etkilerine olan ilgi de artmaktadır [Egel ve ark., 2002; Verschaeve, 2004]. Bitki kaynaklı birçok doğal bileşiğin in vitro ve in vivo test sistemlerinde mutagenezi ve karsinogenezi inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler her insanın diyetinin bir parçası olan yiyeceklerde dağılmıştır [Abraham ve ark., 1993]. Bitki kaynaklı izoflavonlar; fitoöstrojenik, antioksidan, antimutajenik ve antitümör aktivitelerinden dolayı önemlidir. Maurich ve arkadaşları (2004), *Bituminaria bituminosa*'dan saflaştırılan ve kimyasal olarak tanımlanmış erybraedin C ve bitucarpin A olarak adlandırılan izoflavonoid türevi yapısal olarak ilişkili iki pterokarpanın insan lenfositlerinde klastojenik ve antiklastojenik aktivitelerini araştırmışlardır. Bu iki bileşiğin test edilen konsantrasyon aralığında klastojen olmadığı, tersine bleomycin ve MMC tarafından indüklenen klastojenik etkileri anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür [Maurich ve ark., 2004].

Hernandez-Ceruelos ve arkadaşları (2002), fare kemik iliği hücrelerinde daunorubicin ve metilmetansulfonat tarafından oluşturulan kardeş kromatid değişimleri üzerine sarı papatya (*Matricaria chamomilla*) yağının inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçları, sarı papatya yağının, her iki mutajen tarafından oluşturulan kardeş kromatid değişimleri üzerine doza bağlı olarak engelleyici etki gösterdiğini ve antimutajenik olduğunu ortaya koymuştur [Hernandez-Ceruelos ve ark., 2002].

Sarımsak, antioksidan olarak rol oynayan pek çok sülfür bileşiği ve glutatyon öncüsü maddeleri içermekte ve antikanserojenik etki göstermektedir. Sarımsak ekstraktının,

asbest aracılı genotoksisite üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını incelemek amacıyla, insan periferik kan lenfositlerinde, mikronükleus testi, kardeş kromatit değişimi ve kromozomal aberasyon testleri uygulanmıştır. Sarımsak ekstraktı lenfosit hücre kültürüne krisotil ile birlikte eş zamanlı olarak eklendiğinde, kromozomal aberasyonları, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus oluşum oranlarını, önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Buna göre, sarımsak ekstraktının, asbest aracılı genotoksisitenin etkili ve fizyolojik olarak tolere edilebilir bir gidericisi olduğu sonucuna varılmıştır. Çevresel kanserojenlerden biri olan asbest tarafından indüklenen mutajenite, biyolojik sistemlerdeki hasarın oluşumuna aracılık etmektedir. Birçok radikal süpürücü ve antioksidanın asbest tarafından indüklenen serbest radikal üretimini azalttığı bilinmektedir. [Bhattacharya ve ark., 2004].

Greyfurt suyunun, farelerde daunorubicin tarafından oluşturulan mikronükleuslu polikromatik eritrositleri (MNPE) engelleme kapasitesi ve fare hepatik mikrozomlarında antioksidan potansiyeli ve ayrıca in vitroda serbest radikal tutucu olarak kapasitesi araştırılmıştır. Greyfurt suyu birçok ülkede yaygın olarak tüketilmektedir. Bileşenlerinin birçoğu besinsel değer taşımakta, aynı şekilde antigenotoksik ve antioksidan etkiler göstermektedir. Greyfurt suyu hiçbir toksik veya genotoksik hasara yol açmamış, tersine daunorubisin tarafından oluşturulan MNPE'lerin oluşumunda önemli bir azalmaya neden olmuştur. Sonuçlar, greyfurt suyunun antioksidan kapasitesi ile ilişkili etkili bir antiklastojenik etkisinin olduğunu göstermiştir [Alvarez-Gonzalez ve ark., 2004].

İnsan periferik lenfositlerinde ölçülen DNA hasarı, potansiyel kanserojenlere maruziyette bir göstergedir. Aslında DNA'da oluşan hasar önemli oranda hızlı bir şekilde onarılır, onarılamayan hasar hücre DNA'sını replike ettiğinde, son etki olarak ortaya çıkar. Onarım oranlarındaki bireysel varyasyonlar veya onarım aktivitesini değiştiren iç ve dış faktörler bu hasarın düzeyini belirler [Hagmer ve ark., 1994; Bonassi ve ark., 1995]. İnsanlarda diyetle antioksidanların ilave edilmesi veya antioksidanlarca zengin meyve veya sebzelerin alımının arttırılmasının, insan periferik lenfositlerinde ölçülen oksidatif hasarın seviyesini azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir [Duthie ve ark., 1996; Pool-Zobel ve ark., 1997; Collins ve

ark., 2001)]. DNA hasarı karsinogenezde başlatıcı olay olduğundan sonuçlar, meyve ve sebzelerin içerdiği antioksidanların DNA üzerine serbest radikal ataklarını önleyerek kansere karşı koruyucu olduğu fikrini desteklemektedir.

İşte bu tez çalışmasında da amaç, güçlü antioksidanlar oldukları bilinen lipoik asit ve ferulik asidin, insan lenfosit kültüründe MMC tarafından oluşturulan genotoksik hasar üzerine koruyucu etkili olup olmadıklarını, kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri ile değerlendirmektir.

2.7. Lipoik Asit

Oktonoik asidin disülfid türevi olan (6,8-dithio-octanoic acid) α -lipoik asit (ALA), aynı zamanda tioktik asit olarak da bilinen ve tam kimyasal adı 1,2-dithiolan-3-pentonoik asit ($C_8H_{14}O_2S_2$) olan doğal bir bileşiktir [Smith ve ark., 2004; Valko ve ark., 2006]. α -Lipoik asit ilk olarak 1937’de Snell ve arkadaşları tarafından patates ekstraktında bulunmuş ve çeşitli bakterilerin büyümesi için gerekli “patates büyüme faktörü” olarak adlandırılmıştır [Snell ve ark., 1937]. 1951 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir [Reed ve ark., 1951]. Orijinalinde vitamin olarak sınıflandırılmıştır; ancak daha sonra hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlendiği bulunmuştur [Carreau, 1979].

Lipoik asit oral yolla alındığında kolaylıkla absorbe edilir ve vücutta pek çok dokuda indirgenmiş formu olan dihidrolipoik aside (DHHLA) dönüşür. Endojen lipoik asit genellikle bazı multienzim komplekslerinde (piruvat dehidrojenaz kompleksi, α -ketoglutarat dehidrojenaz kompleksi) proteine bağlı kısım olarak bulunur. Memeli dokuları 5-25 nmol/g lipoik asit içerir fakat pratik olarak hemen hemen tamamı proteine bağlı formda bulunmaktadır. Hücrede çok az miktarda serbest lipoik asit bulunur [Alvarez ve Boveris, 1995].

Fiziksel ve kimyasal özellikleri

α -Lipoik asit iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu içeren 5 üyeli halka yapısındadır. Lipoik asidin (LA) halkasal yapısında okside dithiolan üzerinde bükülme gerilimi, çevresel şartlar altında molekülde indirgenme için büyük bir eğilime neden olur. LA ve DHLA'nın kimyasal reaktivitesi temel olarak dithiolan halkasında merkezlenmiştir. Bu yapı LA'yı diğer tiyol içeren biyomoleküller arasında yegane yapan özelliktir. Diğer yandan düşük negatif redoks potansiyeli LA ve DHLA'yı güçlü indirgeyiciler yapmaktadır. LA iki izomerik konfigürasyonda olabilir; doğal olarak oluşan R formu ve S sentetik formu. Heterosiklik 1,2-dithiolan halkası -S-S- grubu içerir ve α -pozisyonundaki C atomu S atomlarından birine asimetriktir; bundan dolayı molekülün iki olası R ve iki olası S enantiomeri vardır. Ökaryotik hücreler tarafından alındığında her iki enantiomer tüm hücrelerde DHLA formuna dönüştürülür [Biewenga ve Bast, 1995].

α -LA suda tamamen çözünmez, fakat metanol (metil alkol), etanol (etil alkol) ve eter gibi bazı organik çözücülerde çözünür. DHLA'nın tiyol grupları için yüksek pKa değeri bu molekülün pKa değeri 9,45 olan GSH'dan daha güçlü bir nükleofil olduğunu göstermektedir [Packer ve Witt, 1996].

Lipoik asidin kaynakları

Alfa lipoik asit hem hayvanlar hem de bitkiler tarafından sentezlenebilir. Alfa lipoik asitin biyosentez yolağı hala tam olarak açıklanamamışsa da, 8 karbonlu bir yağ asidi ve elementel sülfürün mitokondride birleşmesiyle sentezlendiği düşünülmektedir [Packer ve ark.,2001]. Ancak, alfa lipoik asitin biyosentezi sonucunda, antioksidan aktivite gösterebilecek kadar serbest alfa lipoik asit dolaşıma katılamamaktadır [Biewenga ve ark., 1997]. Doğal olarak meydana gelen LA'nın R enantiomeri α -ketoasit dehidrojenaz komplekslerinde ve glisin ayrılma sisteminde temel kofaktördür [Reed, 1979]. Sebzeler ve hayvan dokuları az miktarlarda lipoillizin formunda belirlenen R-LA içerir. R-LA'nın en yaygın bitki kaynakları ıspanak, brokoli ve domatestir. Hayvan dokularında en yüksek lipoillizin konsantrasyonu

böbrek, kalp ve karaciğerdedir [Lodge ve ark., 1997]. 1:1 R ve S enantiomerlerin karışımından oluşan sentetik rasemik LA, diyabetik nöropatinin tedavisinde uzun zamandır kullanılan bir terapötik ajandır [Packer ve ark., 2001] ve batı ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletlerinde kullanılan besinsel bir takviyedir.

Antioksidan Özellikleri

Mitokondriyal dehidrojenaz reaksiyonlarında temel rol oynayan alfa lipoik asit, son yıllarda antioksidan olarak büyük önem kazanmıştır. α -Lipoik asit okside ve redükte formunda hem suda hem de yağda çözünerek hücrenin her yerinde görev yapma kabiliyetindeki yegane antioksidandır [Nichols, 1997]. Bir maddenin potansiyel bir antioksidan olarak kabul edilebilmesi için önemli olan çeşitli kriterler vardır. Bunlar;

- ❖ Radikal temizleme kapasitesi
- ❖ Metal şelasyonu yapabilme özelliği
- ❖ Amfifilik karakteri
- ❖ Biyoyararlanım ve güvenliği
- ❖ Gen ekspresyonu üzerine etkisi
- ❖ Diğer antioksidanlar ile etkileşimi ve
- ❖ Metabolik rejenerasyon yeteneğidir [Pfaffly, 2001].

Lipoik asit (LA) ve bunun redükte formu dihidrolipoik asit (DHHLA) tüm bu kriterleri karşıladıkları için ideal antioksidanlar olarak kabul edilebilir [Packer ve ark., 1995].

LA ve DHHLA reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini temizleyebilmektedir (Çizelge 2.1). Esas etkin form DHHLA'dır. Ancak lipoik asitin de reaktif oksijen türevlerini temizleme yeteneği yüksektir. Lipoik asit veya dihidrolipoik asit, hidroksil radikali, hipokloröz asit, singlet oksijen, peroksil radikali ve süperoksit radikali gibi reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girer. Uzmanlar lipoik asitin hidroksil radikallerini, hipokloröz asiti ve singlet oksijeni süpürücü etkili olduğunda hem fıkirdir; hidrojen peroksit, peroksil ve süperoksit ise DHHLA tarafından temizlenmektedir. DHHLA hidroksil radikallerinin meydana geldiği çalışmalarda hem antioksidan hem de prooksidandır. Singlet oksijen tarafından indüklenen DNA tek zincir kırıklarına karşı

koruyucu etkilidir. Bununla birlikte bu işlem direkt olarak yapılmayıp birkaç basamağı içermektedir.

Lipoik asidin diğer antioksidanlar ile etkileşimi de söz konusudur. α -LA'nın en önemli özelliklerinden birisi vitamin C, GSH ve indirekt olarak vitamin E'yi yeniden oluşturma yeteneğidir. LA, bu suretle vitamin C ve vitamin E yetersizliği semptomlarını önleyebilmektedir. LA suda ve lipit tabakada çözünülebilirliği nedeniyle lipit-su ara yüzeyinde okside antioksidan redüksiyon işlevlerini yerine getirebilir. Vitamin E'nin yeniden oluştuğu siklusta vitamin C ve glutatyon ile etkileşerek membranları korur. [Packer, 1994; Pfaffly,2001].

Çizelge 2.1. Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin çeşitli serbest radikalleri süpürücü özellikleri [Biewenga ve ark, 1997; Packer ve Witt, 1996].

Oksidan/Radikal	α -LA tarafından yakalanma	DHLA tarafından yakalanma
$O_2^{\cdot-}$	Hayır	Evet
H_2O_2	Hayır	Hayır
$OH^{\cdot}$	Evet	Evet
$HOCl$	Evet	Evet
$CCl_3O_2^{\cdot}$	Evet	Evet
$ONOO^-$	Evet	Evet
$LOO^{\cdot}$	Hayır	Evet
O_2	Evet	Evet

α -Lipoik asitin antioksidan fonksiyonu 1959 yılında, hem gine domuzlarında vitamin C eksikliğinde iskorbüt semptomlarını hem de diyetlerinde α -tokoferol eksikliği olan ratlarda vitamin E eksikliğini engellediğini yayınlayan Rosenberg ve Culik [1959] tarafından keşfedilmiştir. Podda ve arkadaşları lipoik asitin E vitamininden noksan bir diyet ile beslenen farelerde vitamin E eksikliğinin semptomlarını engellediğini yayınlamışlardır. Bununla birlikte, vitamin E'nin dokulardaki konsantrasyonun korunması üzerine direkt bir etkisi yoktur [Podda ve ark, 1994]. Deneysel kanıtlar pürivat, α -lipoik asit ve ATP'nin varlığında dehidroaskorbik asidin askorbik aside indirgenmesinin gerçekleştiğini göstermektedir [Xu ve Wells, 1996].

Moini ve arkadaşları, lipoik asit ve dihidrolipoik asidin antioksidan ve prooksidan etkilerini bir yayında derlemişlerdir. Buna göre çeşitli deneysel modellerin kullanıldığı birçok çalışma; LA takviyesinin in vivoda çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında oksidatif stresi azalttığına ve diğer antioksidanların seviyesini iyileştirdiğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır. [Moini ve ark., 2002] Sağlıklı insanlarda LA takviyesi (600 mg/gün, 2 ay), lipid peroksidasyonunun bir biyomarkırı olan üriner F2-isoprostan seviyesini düşürmüştür ve ex vivo olarak bunların LDL oksidasyonunun zaman farkını yükseltmiştir [Marangon ve ark., 1999]. Fiziksel egzersizin oksidatif stresi arttırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [Witt ve ark., 1992, Ji, 1995]. Ratlarda intragastrik olarak LA verilmesi (150 mg/kg bw/gün, 8 hafta) kalp, karaciğer ve iskelet kaslarını egzersiz tarafından indüklenen oksidatif yağ hasarına karşı korumuştur; karaciğer ve kanda toplam glutatyon seviyesini artırmış ve kalpte glutatyon S-transferaz aktivitesinde egzersiz ile indüklenen azalmayı engellemiştir [Khanna ve ark., 1999].

İki hafta boyunca LA'nın diyetset takviyesi yaşa bağı oksidan üretimindeki artışı belirgin şekilde azaltmıştır, miyokardiyal askorbik asit seviyesinde azalmayı iyileştirmiş ve yaşlı ratların kalp dokusundaki oksidatif DNA hasarını azaltmıştır [Suh ve ark., 2001]. Benzer şekilde LA'nın intraperitoneal muamelesi (100 mg/kg bw/gün; 2 hafta) serebral lipid peroksidasyonunu azaltmış, yaşlı ratların beyinde vitamin E ve GSH seviyesinin azalmasını engellemiştir [Arivazhagan ve Panneerselvam, 2000]. Mitokondri seviyesinde GSH, askorbik asit ve E vitaminine ilave olarak LA muamelesi (100 mg/kg bw/gün; 2 hafta) rat karaciğer veya böbreklerinden izole edilen mitokondrilerdeki izositrat dehidrojenaz, α -ketogluterat dehidrojenaz ve süksinat dehidrojenaz gibi enzimlerin azalan aktivitesini artırmıştır [Arivazhagan ve ark., 2001]. LA'nın 2 hafta süre ile diyetset takviyesi aynı zamanda hepatosellüler GSH seviyesinde yaşa bağı olarak ortaya çıkan azalmayı değiştirmiştir [Hagen ve ark., 2000].

Çeşitli hayvan modellerinde iskemi-reperfüzyon, hepatik hastalıklar ve diyabet durumlarında doku hasarına karşı LA takviyesinin koruyucu etkilerine dair kanıtlar başka çalışmalarda da gösterilmiştir [Packer, 1994, Bustamante ve ark., 1998, Packer

ve ark., 2001]. Lipoik asit uzun zamandır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır: alkole bağlı karaciğer hasarı, mantar zehirlenmesi, diyabet, glukom, radyasyon hasarı, Chagas hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, iskemi ve reperfüzyon hasarı, ağır metal zehirlenmesi ve HIV gibi. Lipoik asitin etkilerinin çoğu, antioksidan özelliklerine ve diğer antioksidanlar üzerindeki etkilerine bağlıdır α -LA, ksantin oksidazı inhibe eder, fakat aynı zamanda NF-kappa B aktivitesini artırır. NF-kappa B, inflamatuvar cevaptan sorumlu proteinlerin gen ekspresyonunu düzenleyen ayrıca HIV gen replikasyonunu da kapsadığı bilinen transkripsiyon faktörüdür. NF-kappa B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesi DHLA tarafından artırılır ancak α -LA tarafından azaltılır [Biewenga ve ark, 1997; Packer ve Witt, 1996; Pfaffly, 2001].

İntrasellüler tiyol seviyesinin düşük olması, çeşitli lenfosit hastalıklarıyla ve AIDS ve kanser gibi patolojilerle ilişkilendirilmektedir [Eck ve ark., 1989; Staal ve ark., 1992a,b; Pack ve ark., 2001]. Bundan dolayı antioksidanlar ve lenfositlerde hücrel tiyol seviyesini artıran bileşikler sağlıklı bir immün fonksiyon için terapötik ajan olarak da önerilmektedir. Böyle bileşiklerden biri de α -lipoik asittir. LA, in vitro olarak hücre kültürüne ilave edildiğinde kolaylıkla hücrelere girer ve mitokondriyal ve sitozolik enzimler tarafından DHLA'ya indirgenir ve çoğunluğu hücreden kolayca kültür ortamına sızar [Han ve ark., 1995; Handelman ve ark., 1994]. LA'nın mikromolar konsantrasyonlarının in vitroda insan periferik kan lenfositlerinde ve Jurkat lösemik T hücrelerinde intrasellüler GSH'da artışa neden olduğu gösterilmiştir [Han ve ark., 1995; Handelman ve ark., 1994; Sen ve ark., 1997]. Ayrıca LA'nın 1 μ M gibi düşük konsantrasyonlarının, kanser hastalarından izole edilen periferik kan hücrelerinde fonksiyonel hasarları onardığı gösterilmiştir [Mantovani ve ark., 2000].

Lipoik asit hem membranda hem de sıvı fazda fonksiyon görebilen, birçok tıbbi problemin tedavisi için büyük umut vaat eden çok önemli bir antioksidandır. Almanya'da 1966'da karaciğer sirozunun tedavisi ve ağır metal zehirlenmesinin tedavisi için uygun bulunmuştur ve günümüzde daha çok diyabetik nöropati için kullanılmaktadır. Bu güne kadar bilinen bir yan etkisi yoktur [Pfaffly, 2001].

LA'nın terapötik etkileri ile ilgili pek çok yayın olmakla birlikte ökaryotik hücrelerde LA metabolizması hakkında çok az şey bilinmektedir. Della Croce ve arkadaşları (2003), LA'nın muhtemel koruyucu etkisini kısa süreli analiz yoluyla *Saccharomyces cerevisiae* mayasının 5 suşunda araştırmışlardır. Özellikle oksidatif stres koşulları içinde LA'nın davranışını belirlemek amacıyla oksidan olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır. LA hidrojen peroksit'e karşı antimutajenik etki göstermiş ve sitokrom p450'yi önemli derecede azaltmıştır. LA'nın etkisini en iyi şekilde açıklamak için süperoksit dismutaz genlerinde delesyonlar taşıyan maya suşları kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, LA mitotik bölünmelerin sayısını ve büyüyen hücrelerde yaşama yüzdesini artırmıştır. Kullanılan çeşitli maya suşlarında pozitif etki bellidir ve bu durum lipoik asidin antioksidan aktivitesi yoluyla maya hücrelerinde oksidanlara karşı koruyucu ve antimutajenik olduğunu göstermektedir.

2.8. Ferulik asit

Ferulik asit (FA, 3-methoxy, 4-hydroxy cinnamic acid), sebze ve meyvelerde sıklıkla bulunan, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklan, fenolik bir bileşiktir [Graf, 1992; Paganga, 1999]. Kimyasal yapısı zerdaçale sarı rengini veren ve önemli bir antioksidan olan kurkumine benzemektedir. Özellikle tohumlarda ve yapraklarda hem serbest formunda hem de lignin ve diğer biyopolimerlere bağlı olarak bulunur [Andersons ve ark.,1980]. Mısırdan, buğday, pirinç, yulaf, çavdar gibi tahılların kepeklerinde, kavrulmuş kahve, domates ve turuncgillerde bulunmaktadır [Graf, 1992]. Undaki toplam fenolik asitler içinde % 90'ını ferulik asit oluşturmaktadır [Manach ve ark, 2004].

Ferulik asit, fenoksiradikal yapısına bağlı olarak yüksek antioksidan potansiyele sahiptir. Etkili bir serbest radikal süpürücüdür ve bazı ülkelerde lipit peroksidasyonunu engellemek amacıyla gıda katkıları olarak da kullanılmaktadır [Adam ve ark., 2002]. Ferulik asitin insanlarda, güçlü bir membran antioksidanı olarak etki ettiği ve deri kanseri, yaşlanma, yorgunluk, soğuk algınlığı, grip ve influenzaya karşı koruyucu etkili olduğu bilinmektedir [Rukkumani ve ark., 2004a]. Ferulik asit hidroksil radikali, hipokloröz asit ve peroksil radikali gibi reaktif oksijen

türlerini süpürücü etkilidir; serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı ispatlanmıştır [Kanski ve ark., 2002]. FA'nın ratlarda pankreatik hücrelerde insülin salınımını arttırdığı bildirilmiştir [Nomura ve ark.,2003]. Antioksidan özellikleri ratlarda kimyasallar aracılığıyla oluşturulan karsinogenezde ve farelerde deri tümörü oluşumunda da görülmüştür [Huang ve ark., 1998].

Çalışmalar, ferulik asidin fotoprotektif [Saija ve ark., 2000], hepatoprotektif [Srinivasan ve ark., 2005], antiaterojenik [Rukkumani ve ark, 2004b] ve antimutajenik [Murakami ve ark., 2002] özellikleri olduğunu göstermiştir. Prasad ve arkadaşları, ferulik asidin insan lenfositlerinde radyasyonun yol açtığı sitogenetik ve biyokimyasal hasara karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu koruyucu etkinin FA varlığında gerçekleştiği ve FA'nın hücreler tarafından alındığı ileri sürülmüştür. Buna göre ferulik asit radyoprotektif özellik göstermiştir [Prasad ve ark., 2006].

Tüm bu veriler doğrultusunda, bu tez çalışmasında amaç, antitümoral bir ajan olan ve hücrelerde kromozomal hasara yol açtığı bilinen MMC'ye karşı lipoik asit ve ferulik asidin antioksidan özelliklerine bağlı olarak antigenotoksik bir etki gösterip göstermeyeceklerini tespit etmektir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

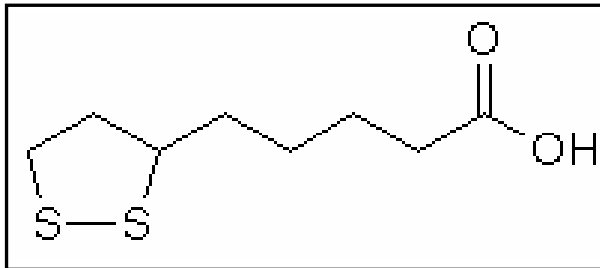
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

Bu araştırmada lipoik asit ve ferulik asitin mitomisin-C tarafından oluşturulan genetik hasara karşı olası antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferik kanından elde edilen lenfositler kullanılmıştır. Kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 25 yaşında bir bayan ve 24 yaşında iki ayrı erkek donörden temin edilmiştir.

3.1.2. Test Materyali

Lipoik Asit

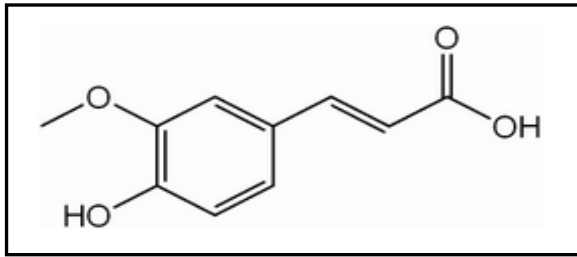
Bu araştırmada kullanılan antioksidan maddelerden biri α -lipoik asittir ve tam kimyasal adı: 1,2-dithiolan-3-pentonoik asittir. Lipoik asit çok çeşitli adlar ile bilinmektedir: thioktik asit, 1,2-dithiolan-3-valerik asit ve 6,8-thioktik asit, 6,8-dithio-oktanoik asit gibi [Packer ve Witt, 1996]. CAS NO: 1077-28-7, kimyasal formülü: $C_8H_{14}O_2S_2$, molekül ağırlığı: 206,33 gr'dır. Yapısal formülü Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Lipoik asidin yapısal formülü

Ferulik Asit

Bu araştırmada kullanılan diğeri antioksidan madde ferulik asittir. Sinonimleri 4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit, koniferik asit, 3-(4-Hidroksi-3-metoksifenil)-2 propenoik asit, 3-metoksi-4-hidroksi-sinnamik asit, 3-metoksi-4-hidroksi-trans-sinamat, trans-ferulik asittir. CAS NO: 1135-24-6, kimyasal formülü: $C_{10}H_{10}O_4$ moleköl ağırlığı: 194,19 gr'dır. Yapısal formülü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Ferulik asitin yapısal formülü

3.2. Metot

3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

Lipoik asit ile daha önce yapılan çalışmalara göre akut toksisitesinin düşük olduğu bilinmektedir. Ratlarda LD_{50} değeri 400-500 mg/kg olarak belirtilmiştir. Bunun dışında farede oral olarak verildiğinde LD_{50} : 1130 mg/kg, intraperitoneal olarak verildiğinde LD_{50} : 235 mg/kg'dır; köpeklerde oral olarak verildiğinde ise LD_{50} değeri 400-500 mg/kg'dır. Son yapılan çalışmalarda ratlarda LD_{50} değeri >2000 mg/kg bw olarak belirtilmektedir. Çalışma sırasında LD_{50} değerlerinden yola çıkarak lipoik asit için çeşitli dozlar denenmiştir. Bu tez çalışması sırasında 120, 60, 30, 15 ve 7,5 μ g/ml lipoik asit uygulanan kültürler incelenmiş, ancak bu dozlarda insan periferik lenfosit kültüründe hücre çoğalmasını engelleyici etkisi belirlendiğinden uygulama dozları 0,5, 1 ve 2 μ g/ml olarak seçilmiştir. Bu çalışmada, ferulik asidin uygulama dozları ise 0,25, 0,5, 1, 2, 4 μ g/ml olarak seçilmiştir. Bu dozların belirlenmesinde hem lipoik asit ile kıyaslama yapabilmek için benzer dozları içermesi dikkate alınmış hem de Prasad ve arkadaşlarının insan lenfosit kültüründe

yapmış oldukları benzer bir çalışmadan [Prasad ve ark., 2006] yola çıkılmıştır. 8 µg/ml ferulik asit de kültürlerde denenmiş ancak yüksek dozların lipoik asit gibi insan periferik lenfosit kültüründe hücre çoğalmasını engelleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir.

3.2.2. Preparatların Hazırlanması

Kromozom anormallikleri (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için preparatların hazırlanması

Her iki antioksidan ile yapılan çalışmalarda, hücre kültürlerinin hazırlanması amacıyla, sağlıklı, sigara içmeyen, herhangi bir sağlık sorunu olmayan bir bayan ve bir erkekten ayrı ayrı alınan periferik kanın 0,2 ml'si (6 damla) steril şartlarda 2,5 ml'lik kromozom ortamı (Chromosome Medium B) içeren tüplere ekilmiştir. Daha önce sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde toplam 50 µl ilave edilmiş ve tüpler alt üst edilerek karışmaları sağlanmıştır. Ardından kültür tüpleri ışık almaması amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak, eğik pozisyonda, 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir.

Lipoik asitin (LA) antigenotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla 3 ayrı muamele grubu oluşturulmuştur. Birinci grupta, lipoik asit 23. saatte kültürlerle eklenirken pozitif kontrol MMC, 24. saatte ortama eklenmiş ve lipoik asitin mutajenden 1 saat önce verilmesiyle bu mutajene karşı herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. İkinci grupta, lipoik asit ve MCC 24. saatte eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Üçüncü grupta ise, MMC 24. saatte, lipoik asit bundan 1 saat sonra 25. saatte kültür ortamına eklenmiştir. Ayrıca çalışmalarda hiçbir muamele yapılmayan bir negatif kontrol grubu, lipoik asidin çözücüsü olarak kullanılan etanolün (etil alkol) tek başına uygulandığı bir çözücü kontrol grubu ve mitomisin C'nin (MMC) tek başına uygulandığı bir pozitif kontrol grubu da kullanılmıştır.

Bütün uygulama gruplarında, MMC (0,2 µg/ml) 24. saatte kültürlerle eklenmiş ve 48 saat süreyle kültür ortamında kalması sağlanmıştır. Lipoik asit ise, üç grup için

sırasıyla 49, 48 ve 47 saat süreyle kültür ortamında kalmıştır. Kültürün 24. saatinde çözücü kontrol grubu olan tüpe 10 µl etanol eklenmiş, pozitif kontrol grubu olan tüpe son konsantrasyonu 0,2 µg/ml olacak şekilde MMC tek başına eklenmiştir. Tüpler tekrar inkübatöre alınarak 72 saatlik toplam kültür süresinin dolması beklenmiştir.

Ferulik asidin (FA) antigenotoksik etkisini belirlemek için insan lenfosit kültürlerine eklenmesi MMC ile eş zamanlı olarak yapılmıştır. Ferulik asit ve MMC'nin 24. saatte uygulandığı kültürlerde, sayımlar için yeterli hücre ve metafaz elde edilemediğinden, lipoik asit ile yapılan çalışmadan farklı bir yöntem takip edilmiştir. FA ve MMC kültür başlangıcından 48 saat sonra ilave edilmiş, kültür ortamında 24 saat süre ile kalmaları ve kültürün toplam süresinin yine 72 saat olması sağlanmıştır. Böylece eş zamanlı olarak her bir tüpe, 0,2 µg/ml MMC ile birlikte ferulik asitin 0,25, 0,5, 1, 2, 4 µg/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyonu eklenmiştir. Ferulik asit ile yapılan çalışmada da hiçbir muamele yapılmayan bir negatif kontrol grubu, 24. saatte 0,2 µg/ml MMC'nin tek başına eklendiği bir pozitif kontrol grubu ve 10 µg/ml etanol içeren bir çözücü kontrol grubu da oluşturulmuştur.

Kültür süresi bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe steril saf su içinde hazırlanmış kolkisin çözeltisinden (kullanılan kültürün her ml'sinde 0,06 µg olacak şekilde) eklenmiş ve tüpler hafifçe sallanıp karışmaları sağlanmıştır. Bu şekilde hücreler 2 saat boyunca 37°C'deki inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

Kültür süresi bitiminde tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibindeki lenfositleri içeren 0,5-0,7 ml'lik kısım vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak, hücrelerin kalan sıvı içinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Ardından bu tüplere, önceden 37°C'ye getirilmiş 0,075M KCl hipotonik çözeltisinden, otomatik karıştırıcıda damla damla (5'er ml) ilave edilerek karışmaları sağlanmış, daha sonra tüpler tekrar kapatılarak, 37°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere buzdolabında soğutulmuş 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften 5'er ml yavaş yavaş eklenmiştir.

İlk fiksatifin eklenmesinden sonra tüpler 1 saat süreyle +4°C’de buzdolabında bekletilmiştir. Fiksatifle yıkama işlemi iki kez daha tekrarlanarak tüpte kalan sıvının tamamen berraklaşması sağlanmıştır. Tüpler her yıkama işleminden sonra santrifüj edilmiş, son fiksatifle muamele sonunda dipte 0,5-0,7 ml kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan sıvı, pipetaj yapılarak içindeki hücreler homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu süspansiyon, önceden 1N HNO₃’te bekletilerek temizlenmiş ve buzdolabında etil alkol içerisinde bekletilen lamalar üzerine, 15-20 cm yükseklikten, farklı alanlara birer damla damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir [Jonasson, 1986].

Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması

Mikronükleus testi için, insan periferik lenfosit kültürlerinin hazırlanması amacıyla, sağlıklı, sigara içmeyen bir erkek ve bir dişi donörden alınan periferik kanın 0,2 ml’si (6 damla), içerisinde 2,5 ml’lik kromozom ortamı bulunan (Chromosome Medium B) tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37°C’deki etüve 45° eğik şekilde yerleştirilmiştir. Kültürdeki hücreler, lipoik asit ve MMC’nin yukarıda verilen konsantrasyonları ile MN metoduna uygun olarak 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Burada da yine 3 ayrı muamele grubu oluşturulmuştur. LA birinci gruba 23. saatte, ikinci gruba 24. saatte ve üçüncü gruba da 25. saatte, yine 0,5, 1 ve 2 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Genotoksik ajan olan MMC, her üç gruba da 24. saatte ilave edilmiştir. Yine 24. saatte kültürlerden birisine çözücü kontrol olarak 10 µl etanol, bir başka kültüre pozitif kontrol için tek başına 0,2 µg/ml MMC ilavesi yapılmıştır. Muamele yapılmayan negatif kontrol grubu da bulundurulmuştur. Sitokinezi engellemek için tüm kültürlerle 44. saatte 7 µl Cytochalasin-B eklenmiştir. Kültür süresi dolduğunda tüpler, 10 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj edilmiş, ardından üstte kalan süpernatant atılmıştır. Geriye kalan 0,5-0,7 ml’lik kısım vorteks yardımıyla homojenize edildikten sonra, tüplere 4°C’deki 0,075 M KCl çözeltisinden 5ml damla damla vorteks üzerinde karıştırılarak ilave edilmiş ve sonra buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler etüvden çıkarılarak, 1000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra, tüplere, 5’er ml 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk

fiksatiften ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 kez uygulanmış ve tüpler her fiksatiften sonra 5 dk buzdolabında bekletilmiştir. 3. fiksatife son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Son santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatant atılmış, geriye kalan hücre süspansiyonu pipetle yavaşça homojenize edilmiştir. Önceden 1N HNO₃'de temizlenmiş ve buzdolabında etil alkolde bekletilmiş ve sonrasında kurulanmış lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla damlatılarak süspansiyonun yayılması sağlanmıştır. Preparatlar, kuruması için 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Ferulik asit için standart MN metodu ile yapılan denemelerde, değerlendirme için yeterli binükleat hücre elde edilemediğinden Kaya ve Topaktaş'ın metoduna uygun olarak 24 saatlik etkinin incelendiği bir mikronükleus testi uygulanmıştır [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Buna göre toplam 68 saat olan kültür süresinin 44. saatinde ferulik asitin uygulama konsantrasyonları (0,25, 0,5, 1, 2, 4 µg/ml) ve 0,2 µg/ml MMC eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Aynı zamanda 0,2 µg/ml MMC içeren pozitif kontrol grubu ve 10µl etanol içeren çözücü kontrol grubu ve muamele yapılmayan bir negatif kontrol grubu oluşturulmuştur. Sitokinezi bloke etmek için, yine kültürün 44. saatinde tüm kültür tüplerine 7 µl Cytochalasin-B eklenmiştir. Böylece etkisi test edilen maddelerin kültür ortamında 24 saat süre ile kalmaları sağlanmıştır. 72 saat süre ile yapılan kültürlerde, 24 saatlik etkiyi test etmek için kimyasalların 48. saatte uygulanması gerekmektedir. Bu durumda kültür ortamındaki hücrelerin sitokinezi bloke edilmiş olacağından, uygulamaların 44. saatte yapılması ve kültür süresinin 68 saat olması tercih edilmiştir.

3.2.3. Preparatların boyanması

Mitotik indeks, kromozomal anormallikler ve mikronükleusların gözlenmesi amacıyla hazırlanmış olan preparatlar % 5'lik giemsa boyasında 20-25 dakika homojen olarak boyanmıştır. Bir kromozomdaki kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak için floresan+giemsa boyama yapılmış, bu amaçla Speit ve Haupter'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır [Speit ve Haupter,

1985]. Bu uygulamaya göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6.8) ile kapatılmıştır. Preparatlar, 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile karanlık ortamda 13 dakika ışınlanmıştır. Işınlama bitiminin ardından preparatlar, önceden 60°C sıcaklığa getirilen 2xSSC solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak preparatlar, fosfat tamponu ile hazırlanan % 5'lik giemsa ile (pH 6.8) 20-25 dakika boyanmıştır. Her iki yöntemde de boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın akması için üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek yıkanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün preparatlara DPX damlatılıp lamelle kapatılarak daimi hale getirilmiş ve bir gün kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskopik incelemeye alınmıştır.

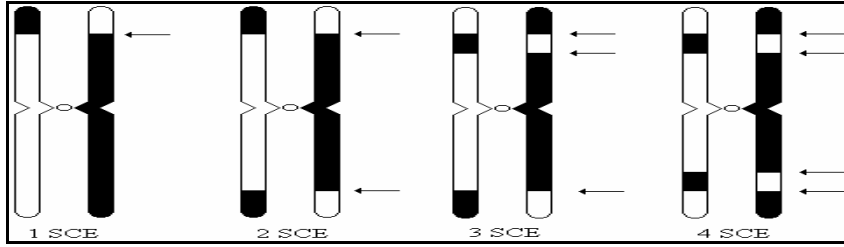
3.2.4. Kromozom anormalliklerinin (KA) saptanması

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz incelenmiştir. İncelenen toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir. Antioksidanın etkisiyle mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinde oluşan değişimlerin pozitif kontrole göre önemli olup olmadıklarının belirlenmesi için z-testi uygulanmış ve her bir grubun regresyon denklemi ile korelasyon katsayısı (r) bulunup, regresyon eğrisi çizilerek doz etki ilişkisi saptanmıştır.

3.2.5. Kardeş kromatid değişiminin (KKD) saptanması

Kardeş kromatid değişimi sayısı, her uygulama için, kadın ve erkek bireylere ait preparatların her birisinden, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünmeyi geçiren 25 hücrede saptanmıştır. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili, üçlü ve dörtlü değişimler olarak değerlendirilmiştir. Uygulama gruplarının her birinde oluşan KKD'nin pozitif kontrole göre anlamlı olup olmadığı t-testi ile

analiz edilmiştir. Tek yönlü varyans analizi metodu ile hücre başına düşen KKD oranı için her bir grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı saptanmıştır. Yine her bir grubun regresyon denklemi ile korelasyon katsayısı (r) bulunup regresyon eğrisi çizilerek doz etki ilişkisi saptanmıştır.



Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri

3.2.6. Mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksinin (RI) saptanması

Mitotik indeksin tespit edilmesi amacıyla bütün uygulamalar için kadın ve erkek bireye ait preparatların her birinden 1000'er hücre olmak üzere 2000 hücre incelenmiş ve bu hücreler içinde metafaz evresindeki hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı, yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Replikasyon indeksini hesaplamak amacıyla erkek ve dişi için hazırlanan KKD preparatlarının her birinden 100'er hücre, toplamda 200 hücre incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M1), ikinci (M2) ve üçüncü (M3) metafaz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi $RI = 1x(M1) + 2x(M2) + 3x(M3)/N$ (N =incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır [Gomez-Arroya ve ark, 2000].

3.2.7. Mikronükleusların (MN) saptanması

Sitokinezi-blok (cytokinesis-blocked) metodu ile mikronükleus testinde, mitoz geçiren hücrelerde; sitokalsin B ile sitokinez durdurulur. Böylece çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak ayırt edilebilir. MN incelemesi sırasında sitoplazma bölünmesini tamamlayamamış, çift çekirdekli hücreler esas alınır, çünkü bu hücreler, test edilen materyalin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Dolayısıyla

MN oluşumu test maddesinden kaynaklanıyor olabilir. Tek çekirdekli hücrelerdeki MN'ler ise test materyali ilavesinden kaynaklanmayan, başlangıçta lenfosit hücrelerinde mevcut olan veya spontan oluşan MN'lerdir. Bu çalışmada erkek ve dişi bireye ait her bir preparattan 1000 tane, toplam 2000 tane iki çekirdekli hücre, mikronükleus içerip içermediği yönünden incelenmiştir. Heddle ve Countryman'ın kriterlerine göre; MN boyutu nükleusun %20'sinden fazla, %5'inden az olmamalıdır, MN boya alma yoğunluğu esas çekirdek ile aynı olmalıdır, sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'ler sayılmalıdır. Bu çalışmada mikronükleus içeren hücreler 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu olmak üzere sayılmış ve $1 \times (1MN) + 2 \times (2MN) + 3 \times (3MN + 4MN) / N$ (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) belirlenmiştir.

3.2.8. Nükleer Bölünme İndeksinin (NBİ) Saptanması

Her bir uygulama grubunda (her bir bayan ve erkekte 500 adet) toplam 1000 hücre nükleer bölünme indeksini hesaplamak üzere değerlendirilmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) hücreler şeklinde sayılmış nükleer bölünme indeksi $1 \times (1N) + 2 \times (2N) + 3 \times (3N + 4N) / n$ (n incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır [Holland ve ark., 2002; Fimognari ve ark., 2005].

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada, mitotik indeks, replikasyon indeksi, KKD/Hücre sayısı, anormal hücre frekansı, KA/Hücre sayısı, MN/Hücre sayısı ve nükleer bölünme indeksi için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır. Deney gruplarındaki mitotik indeks, replikasyon indeksi, nükleer bölünme indeksi, kromozomal anormallikler ve mikronükleusların kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z-testi kullanılırken, kardeş kromatid değişimlerinin değerlendirilmesinde t-testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Lipoik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkileri

Lipoik asit ile yapılan antigenotoksik çalışmada, her bir kültüre 24. saatte MMC eklenmiş ve MMC ile toplam 48 saatlik bir uygulama yapılmıştır. Kültürlerden biri yalnızca MMC eklenmiş pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiş, diğer kültürlere lipoik asidin uygulama konsantrasyonları (0,5, 1, 2 µg/ml), MMC uygulamasından bir saat önce, eş zamanlı ve bir saat sonra olmak üzere üç farklı şekilde eklenmiştir. Ayrıca etanol (10 µg/ml) içeren bir çözücü kontrol grubu ve hiçbir muamelenin yapılmadığı bir negatif kontrol grubu da değerlendirilmeye alınmıştır.

Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

MMC ile lipoik asidin birlikte uygulandığı kültürlerde, insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı ve anormal hücre frekansı Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir. Pozitif kontrol grubu MMC (0,2 µg/ml), negatif kontrol ile kıyaslandığında, kromozomal anormallik frekansında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur ($p < 0.001$). Tüm uygulama gruplarında MMC'nin kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid değişimlerine neden olduğu gözlenmiştir. Kromatid kırıkları ve triradyal ve quadriradyal şekilde gözlenen kromatid değişimleri en baskın anormallik tipleridir. MMC ve lipoik asidin kombine şekilde muamele edildiği kültürlerin hepsinde, yalnızca MMC uygulanmış pozitif kontrol ile kıyaslandığında, hem anormal hücre frekanslarında hem de hücre başına düşen toplam kromozom anormalliği sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma ($p < 0,001$) gözlenmiştir. Bu iyileştirici etkinin lipoik asitin bir saat önce ve eş zamanlı olarak eklendiği gruplarda daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte lipoik asidin MMC muamelesinden 1 saat sonra uygulandığı grupta doz arttıkça yüzde anormallik artarken ($r=0,756$); diğer iki uygulama grubu olan eş zamanlı muamele grubu ve lipoik asidin 1 saat önce eklendiği grupta, doza bağlı bir değişim

yoktur ($r=0,143$, $r=0,371$). İncelenen metafaz hücrelerinde yaygın olarak hücre başına bir anormallik görülmekle birlikte, bazı hücrelerde birden fazla anormallik gözlenmiştir. Buna bağlı olarak KA/hücre sayısı hesaplanmıştır. Lipoik asidin MMC'den 1 saat sonra eklendiği grupta anormal hücre frekansı için doza bağlı bir artış gözlenmiştir ($r=0,992$). LA ve MMC'nin eş zamanlı uygulandığı grupta anormal hücre frekansı doza bağlı olarak azalmıştır ($r=0,882$). Lipoik asidin 1 saat önce eklendiği grupta ise etkinin doza bağlı olmadığı belirlenmiştir ($r=0,327$).

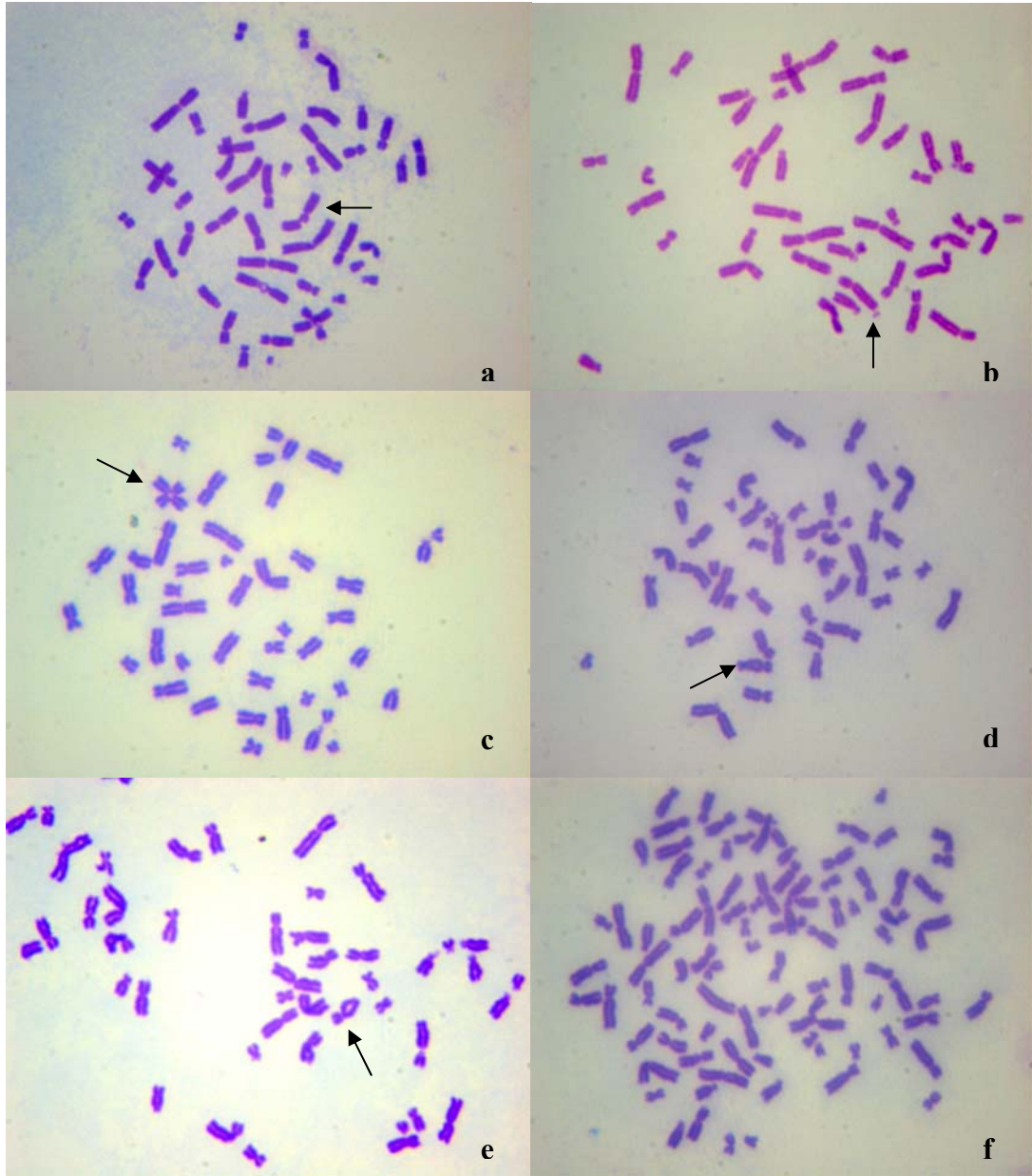
Çizelge 4.1. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısı

Test maddesi	Uygulama			Anormallikler								Anormal hücre±SH (%)	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)		Ktk	Kzk	F	Kkb	Dk	Kd	P	Toplam		
		MMC	LA										
Kontrol	48	-	-	5	-	-	1	-	-	-	6	3,0±0,012	0,030±0,012
10µl Etanol	48	-	-	4	-	-	2	1	-	-	7	3,5±0,013	0,035±0,013
MMC	48	0,2	-	54	9	10	15	26	41	-	155	56,5±0,035	0,775±0,030
LA+MMC (1saat önce)	47	0,2	0,5	32	-	4	7	12	38	-	93	38,0±0,034**	0,470±0,035**
		0,2	1	23	4	9	9	9	23	2	78	32,0±0,033**	0,390±0,034**
		0,2	2	43	1	2	2	9	41	-	98	35,0±0,035**	0,490±0,035**
LA+MMC (eşzamanlı)	48	0,2	0,5	32	2	9	9	18	20	-	90	37,0±0,034**	0,450±0,035**
		0,2	1	31	3	9	7	15	31	-	96	37,5±0,034**	0,480±0,035**
		0,2	2	31	3	2	4	11	41	-	92	34,5±0,034**	0,460±0,035**
LA+MMC (1saat sonra)	49	0,2	0,5	37	4	11	7	12	30	1	102	38,5±0,034**	0,510±0,035**
		0,2	1	37	2	4	6	17	39	-	105	40,5±0,035*	0,525±0,035**
		0,2	2	29	4	2	6	12	51	-	105	43,0±0,035*	0,525±0,035**

Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Dk: Disentrik kromozom, Kd: Kromatid değişimi, P : Poliploidi

* pozitif kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı (z test)

** pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z test)



Resim 4.1. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri: a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı, c) kromatid değişimi, d) disentrik kromozom, e) kardeş kromatidlerde birleşme, f) poliploidi

Kardeş kromatid değişimi (KKD), mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) üzerine etkisi

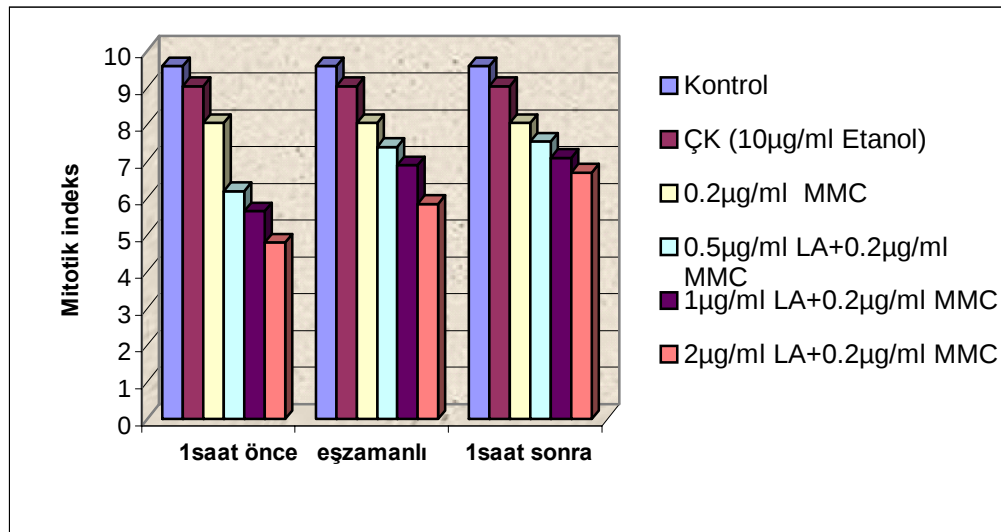
Çizelge 4.2’de lipoik asidin, MMC ile birlikte uygulandığı kültürlerde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkileri gösterilmektedir. Kardeş kromatid değişimi/hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları negatif kontrole göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Pozitif kontrol ile kıyaslandığında lipoik asit eklenmiş tüm kültürlerde MMC tarafından oluşturulan KKD sayısında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir ($p<0,05$, t-test). Bu etkinin lipoik asitin MMC’den bir saat önce eklendiği kültürlerde 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ ’lik dozlarda en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bir saat önce ve eş zamanlı LA muamele edilen gruplardaki KKD/hücre sayısındaki azalma doza bağlıdır (sırasıyla $r=0,842$ ve $r=0,946$) ancak bir saat sonra LA muamele edilen grupta bu etki çok daha düşüktür ($r=0,516$). Bir saat sonra LA ilave edilen grupta, pozitif kontrole göre azalma olmakla birlikte, dozlar kendi içinde değerlendirildiğinde 2 $\mu\text{g/ml}$ ’lik en yüksek dozda KKD/hücre sayısı en düşük düzeye ulaşmıştır. Replikasyon indeksi tüm uygulamalarda negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı iken, LA ve MMC’nin kombine olarak uygulandığı kültürler pozitif kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Replikasyon indeksi tüm uygulamalarda doza bağlı (sırasıyla $r=0,817$; $r=0,756$ ve $r=0,789$) fakat önemli olmayan bir azalma göstermektedir. MMC’nin uygulandığı tüm gruplar kontrol grupları ile kıyaslandığında, insan lenfosit kültürlerinde mitotik indeksde önemli bir azalmaya yol açmıştır. MMC ile birlikte lipoik asit içeren gruplar, yalnızca MMC içeren pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, mitotik indeks istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır. Mitotik indeksteki bu düşüşün, lipoik asidin hem muamele süresine, hem de konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Her üç muamele grubunda da konsantrasyon arttıkça, mitotik indeks azalmaktadır (sırasıyla $r=0,998$, $r=1,00$ ve $r=0,975$).

Çizelge 4.2. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks

Test maddesi	Uygulama			Min-max KKD	KKD/hücre± SH	M1	M2	M3	RI ± SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)								
		MMC	LA							
Kontrol	48	-	-	2-8	4,46±0,22	5	82	113	2,54±0,039	9,60±0,20
ÇK (10µl Etanol)	48	-	-	1-9	4,60± 0,29	4	87	109	2,53± 0,038	9,05± 0,19
MMC	48	0,2	-	38-78	51,16± 1,32	82	105	13	1,66± 0,039	8,05± 0,18
LA+MMC (1 saat önce)	47	0,2	0,5	25-65	37,26± 1,05 ^a	99	93	8	1,55± 0,040	6,20± 0,13**
		0,2	1	19-48	31,36± 0,98 ^a	92	102	6	1,57± 0,039	5,65± 0,12**
		0,2	2	21-45	30,28± 0,87 ^a	106	89	5	1,50± 0,039	4,80± 0,10**
LA+MMC (eş zamanlı)	48	0,2	0,5	24-53	37,78± 0,86 ^a	90	103	7	1,59± 0,039	7,40± 0,15**
		0,2	1	23-58	35,30± 1,32 ^a	105	87	8	1,52± 0,040	6,90± 0,14**
		0,2	2	17-72	33,08± 1,89 ^a	103	90	7	1,52± 0,040	5,85± 0,12**
LA+MMC (1 saat sonra)	49	0,2	0,5	23-62	37,80± 1,23 ^a	85	103	12	1,64± 0,040	7,55± 0,16**
		0,2	1	18-74	41,70± 1,78 ^a	114	76	10	1,48± 0,040	7,10± 0,15**
		0,2	2	19-62	35,70± 1,66 ^a	116	75	9	1,47± 0,040	6,70± 0,14**

^a pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

** pozitif kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.1. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan lenfosit kültürlerinde mitotik indeks değişimi



Resim 4.2. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Bu çalışmada antioksidan lipoik asidin antigenotoksik etkileri mikronükleus yöntemi ile de belirlenmiştir. MMC içeren tüm gruplarda MN/hücre sayısı kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır ($p < 0,001$). Sitokinezi bloke edilen binukleat hücrelerde sıklıkla 1MN bulunduğu, fakat 2 MN ve hatta 3 MN taşıyan hücrelerin de bulunduğu gözlenmiştir. MMC ile birlikte LA içeren tüm uygulamalarda ve tüm uygulama dozlarında pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir ($p < 0,001$) (Çizelge 3.3). Bu azalmanın lipoik asidin MMC'den bir saat önce muamele edildiği kültürde en fazla olduğu belirlenmiştir. Bu uygulama grubu kendi içinde değerlendirildiğinde doza bağlı bir artış olduğu ($r = 0,995$) gözlenmiştir. Bu grupta 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda en etkili koruma gerçekleşmiştir. Lipoik asitin eşzamanlı ve bir saat sonra eklendiği gruplarda ise sırasıyla 1 ve 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda en etkili korumanın gerçekleştiği belirlenmiştir. Lipoik asitin eşzamanlı ve bir saat sonra eklendiği gruplarda doz artışı ve MN/hücre sayısındaki artış arasında belirlenen r değerleri sırasıyla 0,629 ve 0,683'tür. Nükleer bölünme indeksinde lipoik asidin 1 saat önce, eş zamanlı ve 1 saat sonra eklendiği her üç muamele grubunda da sadece MMC uygulanan pozitif kontrole göre 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarında önemli bir düşüş gözlenmiştir. Her bir uygulamada

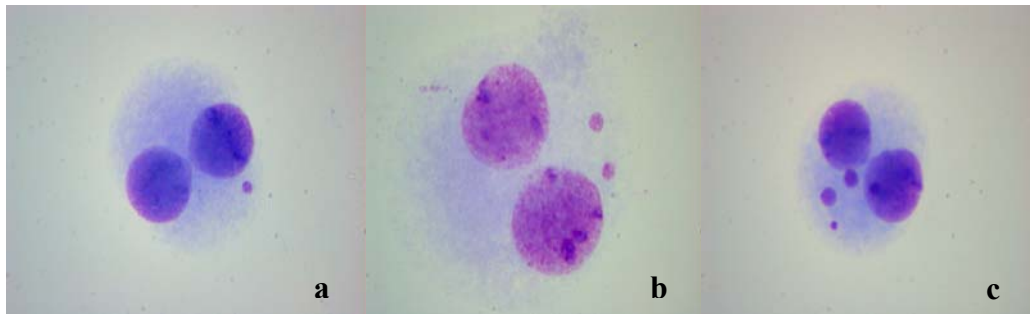
üç farklı konsantrasyon birlikte değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça, NBI’de bir azalma olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $r=0,971$; $r=0,982$; $r=0,982$).

Çizelge 4.3. MMC ile birlikte lipoik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde gözlenen mikronükleus değerleri

Test Maddesi	Uygulama			BN Hücre sayısı	MN'un sayısına göre BN hücrelerin tanımlanması			MN/Hücre	Nükleer bölünme İndeksi
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)			(1)	(2)	(3)		
		MMC	LA						
Kontrol	48	-	-	2000	4	-	-	0,20± 0,009	1,95± 0,043
ÇK (10µl Etanol)	48	-	-	2000	9	1	-	0,55± 0,011	1,93± 0,042
MMC	48	0,2	-	2000	153	9	-	8,55± 0,18	1,86± 0,40
LA+ MMC (1 saat önce)	47	0,2	0,5	2000	98	2	-	5,10± 0,10 **	1,87± 0,040
		0,2	1	2000	100	8	-	5,80± 0,12 **	1,68± 0,034**
		0,2	2	2000	99	15	2	6,75± 0,14 **	1,52± 0,028**
LA +MMC (eş zamanlı)	48	0,2	0,5	2000	130	8	-	7,30± 0,15 **	1,90± 0,041
		0,2	1	2000	123	8	-	6,95± 0,14 **	1,74± 0,036*
		0,2	2	2000	118	12	4	7,70± 0,16 **	1,58± 0,030**
LA+MMC (1 saat sonra)	49	0,2	0,5	2000	122	8	-	6,90± 0,14 **	1,78± 0,037
		0,2	1	2000	126	14	-	7,70± 0,16 **	1,68± 0,034**
		0,2	2	2000	133	9	-	7,55± 0,16 **	1,58± 0,030**

* pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z test)

** pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z test)



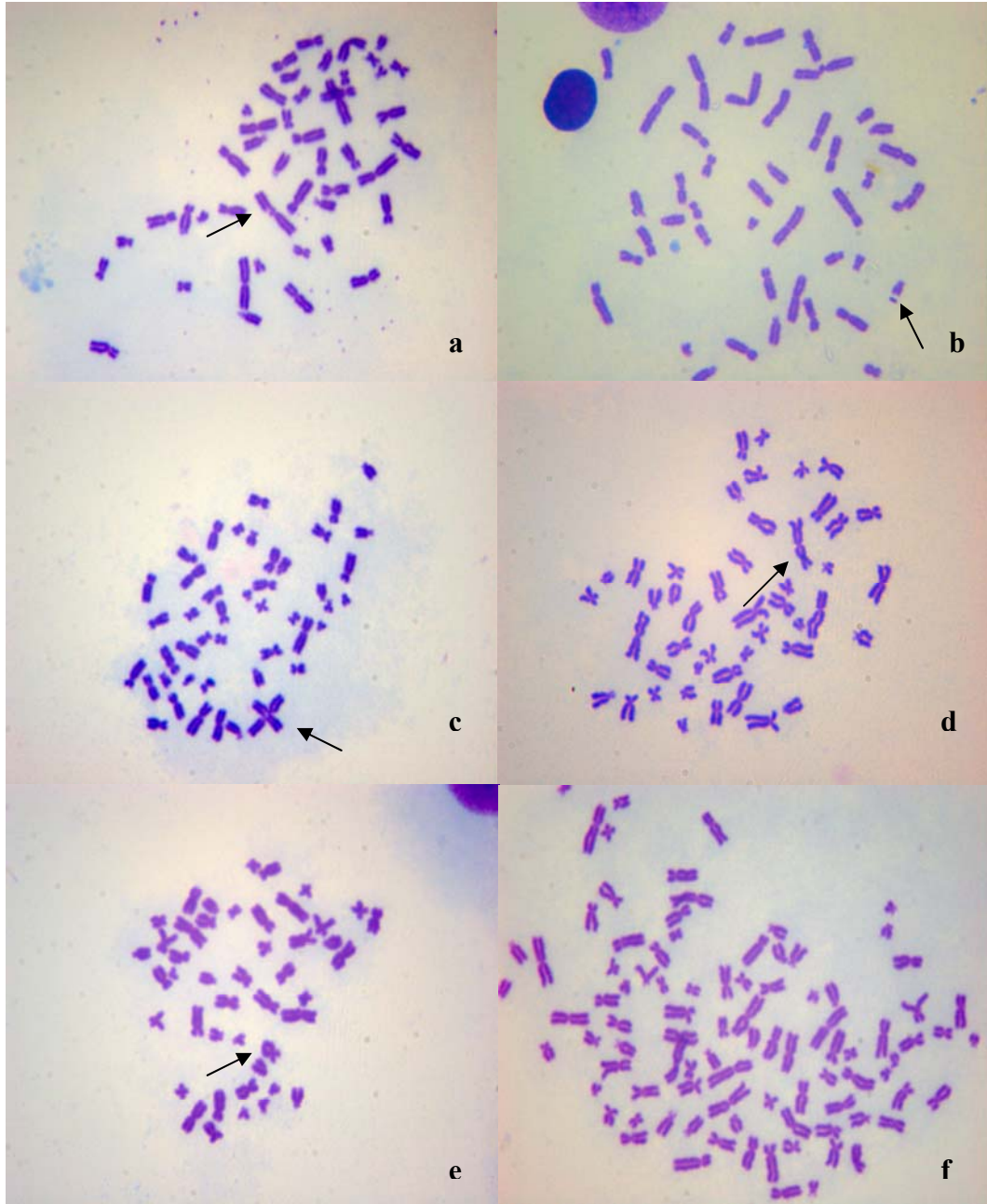
Resim 4.3. MMC ve lipoik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler a) bir mikronükleus, b) iki mikronükleus c) üç mikronükleus (100x)

4.2. Ferulik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkileri

Ferulik asitin MMC tarafından oluşturulan genotoksik hasar üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada da, lipoik asit için uygulanan aynı metod kullanılmıştır. Ancak burada, 48 saatlik etkinin incelendiği denemelerde, analizler için yeterli sayıda hücre ve metafaz elde edilememiştir. Bu nedenle ferulik asit ve MMC'nin 24 saat süreyle uygulandığı kültürler değerlendirmeye alınmıştır. Ferulik asitin uygulama dozları (0,25, 0,5, 1, 2, 4 µg/ml) ve 0,2 µg/ml MMC eş zamanlı olarak kültür süresi başlangıcından 48 saat sonra ortama eklenmiştir. 48. saatte pozitif kontrol grubu için 0,2 µg/ml MMC ve çözücü kontrol grubu için 10 µl etanol kültür tüplerine eklenmiştir. Çalışmada hiçbir muamelenin yapılmadığı bir negatif kontrol grubu da bulundurularak değerlendirmeye alınmıştır.

Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

MMC ile ferulik asidin birlikte uygulandığı kültürlerde, insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı ve anormal hücre frekansı Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, MMC eklenmiş olan tüm kültürlerde hem anormal hücre frekansı hem de hücre başına düşen anormallik sayısında (KA/Hücre) istatistiksel olarak önemli bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,001$). Tüm uygulama gruplarında MMC'nin insan lenfositlerinde 6 tip yapısal kromozom anormalliğine (kromatid kırığı, kromozom kırığı, kromatid değişimi, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme ve fragment) neden olduğu gözlenmiştir. Kromatid kırıkları en yaygın gözlenen anormallik tipidir. MMC ile birlikte ferulik asitin eş zamanlı olarak uygulandığı kültürler, yalnızca MMC uygulanan kültürle kıyaslandığında ise hücre başına düşen anormallik sayısında ve anormal hücre frekansında bir azalma olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve aynı zamanda doza bağlı olmadığı belirlenmiştir (r değerleri sırasıyla $r=0,196$, $r=0,475$).



Resim 4.4. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri: a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı, c) kromatid değişimi, d) disentrik kromozom, e) kardeş kromatidlerde birleşme, f) poliploidi

Çizelge 4.4 MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısı

Uygulama grubu	Uygulama			Anormallikler								Anormal hücre±SH (%)	KA/ Hücre± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		Ktk	Kzk	F	Kkb	Dk	Kd	P	Toplam		
		MMC	FA										
Kontrol	24	-	-	5	1	1	-	-	-	1	8	4,0±0,014	0,040±0,014
10µl Etanol	24	-	-	2	-	-	2	5	-	-	9	4,5±0,015	0,045±0,015
MMC	24	0,2	-	34	6	3	5	5	6	-	59	27,0±0,031	0,295±0,032
FA+MMC	24	0,2	0,25	39	3	3	1	3	9	-	53	23,0±0,030	0,265±0,031
		0,2	0,5	34	2	4	5	3	5	-	53	22,5±0,029	0,265±0,031
		0,2	1	33	2	7	3	1	5	-	51	23,5±0,030	0,255±0,031
		0,2	2	36	3	3	2	7	5	-	56	24,5±0,031	0,280±0,032
		0,2	4	30	4	3	6	4	4	-	51	23,0±0,030	0,255±0,031

Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Dk: Disentrik kromozom, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Kd: Kromatid değişimi, P: Poliploidi

Kardeş kromatid değişimi (KKD), mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) üzerine etkisi

Çizelge 4.5’de ferulik asitin MMC ile birlikte uygulandığı kültürlerde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks değerleri gösterilmektedir. 0,2 µg/ml MMC içeren tüm muamele gruplarında hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi sayısı kontrole göre önemli derece artmıştır. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan kültürler, yalnızca MMC uygulanan kültür ile kıyaslandığında kardeş kromatid değişimi sayısında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$, t-test) ve doza bağlı ($r=0,506$) bir azalma gözlenmiştir. Replikasyon indeksi değerlendirmesinde, MMC içeren tüm gruplarda negatif kontrole göre azalma belirlenmiştir. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan gruplar pozitif kontrol ile kıyaslandığında, replikasyon indeksinde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Mitotik indeks değerlerinde MMC ve MMC+ferulik asit uygulanan tüm gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu görülmüştür

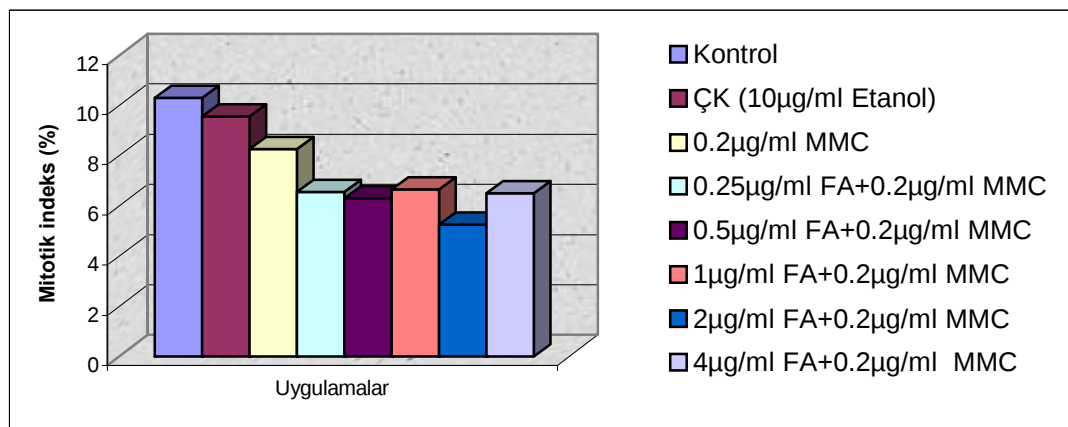
($p<0,001$). MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan gruplar yalnızca MMC uygulanan pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında da yine istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$). Mitotik indeksteki bu düşüşün doza bağlı olmadığı belirlenmiştir ($r=0,143$). Mitotik indeksteki en yüksek azalma MMC+2 $\mu\text{g/ml}$ FA dozunda gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.5 MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks

Uygulama grubu	Süre (saat)	Dozlar ($\mu\text{g/mL}$)		Min-max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M1	M2	M3	RI $\pm$ SH	MI $\pm$ SH
		MMC	FA							
Kontrol	24	-	-	2-8	4,46 $\pm$ 0,22	9	51	140	2,655 $\pm$ 0,040	10,3 $\pm$ 0,22
10 μl Etanol	24	-	-	2-10	5,16 $\pm$ 0,28	14	57	129	2,575 $\pm$ 0,044	9,55 $\pm$ 0,20
MMC	24	0,2	-	16-38	28,06 $\pm$ 0,72	43	83	74	1,905 $\pm$ 0,056	8,25 $\pm$ 0,17
FA+MMC	24	0,2	0,25	5-28	13,42 $\pm$ 0,57a	40	101	59	2,095 $\pm$ 0,049	6,55 $\pm$ 0,13**
		0,2	0,5	7-28	15,24 $\pm$ 0,65a	46	110	44	1,990 $\pm$ 0,049	6,30 $\pm$ 0,13**
		0,2	1	7-18	11,80 $\pm$ 0,45a	35	107	58	2,115 $\pm$ 0,047	6,65 $\pm$ 0,14**
		0,2	2	6-25	13,30 $\pm$ 0,57a	33	112	55	2,110 $\pm$ 0,047	5,25 $\pm$ 0,11**
		0,2	4	4-23	12,16 $\pm$ 0,55a	44	120	36	1,960 $\pm$ 0,045	6,50 $\pm$ 0,13**

^a pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t-test)

** pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.2. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan lenfosit kültürlerinde mitotik indeks değişimi



Resim 4.5. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

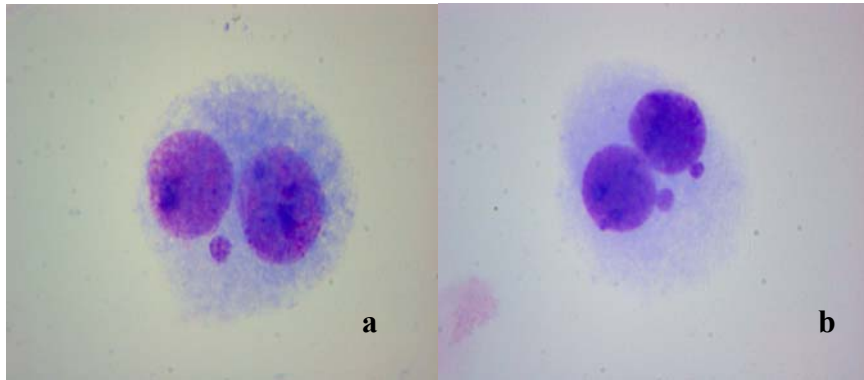
Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Ferulik asitin antigenotoksik etkilerini belirlemek için mikronükleus yöntemi de uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. MMC içeren tüm gruplar, negatif kontrol ile kıyaslandığında, hücre başına düşen mikronükleus miktarında istatistiksel olarak önemli bir artış olmuştur ($p < 0,001$). MN testinde genellikle bir mikronükleuslu, nadiren 2 mikronükleuslu hücreler tespit edilmiştir. MMC ile birlikte ferulik asitin uygulandığı kültürler yalnızca MMC içeren pozitif kontrol ile kıyaslandığında, mikronükleus sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,001$). Mikronükleus miktarındaki bu azalma, doza bağlıdır ($r = 0,973$). Nükleer bölünme indeksi değerlendirmesinde, yalnızca MMC uygulanan pozitif kontrol grubunda ve MMC ile birlikte ferulik asidin üç dozunun (0,25, 0,5, 1 $\mu\text{g/ml}$) uygulandığı gruplarda kontrole göre azalma belirlenirken, MMC ile birlikte ferulik asidin daha yüksek iki dozunun (2 ve 4 $\mu\text{g/ml}$) uygulandığı gruplarda kontrole göre bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu artış negatif kontrol ve pozitif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 4.6. MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan insan periferik lenfositlerinde gözlenen mikronükleus değerleri

Test Maddesi	Uygulama			BN Hücre sayısı	Mikronükleus sayısı		MN/Hücre	Nükleer Bölünme İndeksi
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)			(1)	(2)		
		MMC	FA					
Kontrol	24	-	-	2000	3	-	0,15±0,008	1,713±0,035
10µl Etanol	24	-	-	2000	3	1	0,25±0,010	1,701±0,035
MMC	24	0,2	-	2000	19	-	0,95±0,005	1,697±0,034
FA+MMC	24	0,2	0,25	2000	16	1	0,90±0,007**	1,678±0,034
		0,2	0,5	2000	14	1	0,80±0,009**	1,606±0,031
		0,2	1	2000	11	2	0,75±0,010**	1,692±0,034
		0,2	2	2000	13	-	0,65±0,011**	1,718±0,045
		0,2	4	2000	10	-	0,50±0,011**	1,741±0,036

** pozitif kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-test)



Resim 4.6. MMC ve ferulik asit ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler a) bir mikronükleus, b) iki mikronükleus (100x)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

DNA’da hasar olarak tanımlanan genotoksik etki, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bu nedenle geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA’daki hasarın saptanması kanser riskinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir [Salama ve ark., 1999]. Antimutajen ve antikanserojenlerin kullanımı ile genotoksik mekanizmaların engellenebileceği, böylece insan kanser ve genetik hastalıklarının önlenebileceği öne sürülmektedir. İlaç halinde ya da diyet içerisinde doğal orijinli bileşikler halinde bir ya da daha fazla sayıda kimyasal bileşiğin verilmesiyle kanser gelişiminin engellenmesi “chemoprevention” (kimyasal engelleme) olarak tanımlanmakta ve kanser kontrol yöntemi olarak giderek artan biçimde önem kazanmaktadır [Morse ve Stoner, 1993; Kelloff ve ark., 1994]. Kanser gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılan kimyasal bileşikler, sentetik olarak veya yiyeceklerde doğal bileşikler olarak bulunmaktadır [Morse ve Stoner, 1993]. Bu bileşiklerden sentetik antioksidanlar, bu yüzyılın başından beri yaygın olarak kullanılmaya başlanmış fakat toksik etkileri yüzünden sınırlama getirilmiş, bu nedenle doğal antioksidanlar daha büyük önem kazanmaya başlamıştır. Günümüzde güvenilir ve ekonomik antioksidanların bulunmasına ve bunların antigenotoksik etkilerinin araştırılmasına büyük gereksinim vardır [Osawa ve ark., 1992; Gürbüz, 2006]. Bu tez çalışmasında, son yıllarda hazır preparatlar olarak kullanımları ve önemleri artan antioksidanlardan α -lipoik asit ve ferulik asitin insan periferik lenfositlerinde, MMC tarafından oluşturulan genetik hasara karşı antigenotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Lipoik asit (LA), tüm hücre tiplerinde bulunan güçlü bir antioksidandır. Tıpta çeşitli amaçlarla ve diyetel takviye şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Değişik fizyolojik fonksiyonları gerçekleştirdiği yıllardır bilinmektedir. LA’nın terapötik etkileri ile ilgili pek çok yayın olmasına rağmen, ökaryotik hücrelerde LA metabolizması hakkında çok az şey bilinmektedir [Della Croce ve ark., 2003].

Ferulik asit (FA), birçok bitkinin tohum ve yapraklarında bulunan fenolik bir bileşiktir [Graf, 1992]. Fenolik bileşikler, fenoller, fenolik asitleri, hidrosinamik

asit ve türevlerini ve flavonoidleri içerirler. Bu bileşikler, kanserojenleri yada serbest radikalleri temizleyerek veya bloke ederek çeşitli mekanizmalar ile kanserogeneze karşı etkili olabilirler [Kohlmeier ve ark., 1995]. Birçok fenolik bileşik, özellikle vanilya, sinnamaldehit, koumarin ve tannik asidi içeren basit yapıdakiler mutajenler tarafından oluşturulan DNA hasarının ardından DNA replikasyonu ve/veya DNA tamiri üzerine etki ederek antimutajenik rol oynamaktadır [Ohta, 1993]. Diğer birçok diyetel bileşik gibi ferulik asit de bir antioksidandır ve güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Özellikle süperoksit radikali, hidroksil radikali ve nitrik oksidi nötralize etmede başarılı olması ve diğer antioksidanlarla sinerjistik olarak etki ederek potansiyellerini artırması nedeniyle çok geniş bir kullanım alanına sahiptir [Graf, 1992; Ogiwara ve ark., 2002].

Çevremizdeki çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlerin meydana getirdiği genetik hasarın düzeyi ve insan sağlığı üzerine etkileri, bakteri, in vivo ve in vitro memeli hücreleri veya bitkilerin kullanıldığı çeşitli test sistemleriyle belirlenebilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri, insan lenfosit kültürleridir [Krishnaja ve ark., 2003; Maurich ve ark., 2004; Bhattacharya ve ark., 2004]. İnsan lenfositlerinde, kromozomal anormallikler, kardeş kromatit değişimi analizleri ve mikronükleus testi, en sık kullanılan mutajenite testleridir. Kromozomal aberasyonlar, insanların genotoksik ajanlara maruziyetinin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir [Obe ve ark., 2002]. Genotoksisite çalışmaları, kromozomal anormalliklerin kanser oluşumunun erken ve dikkat çekici bir habercisi olabileceğini göstermektedir [Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark. 1998]. Kardeş kromatit değişimi analizleri de hızlı ve hassas bir test olması bakımından tercih edilmektedir. Kardeş kromatit değişim frekansında artış olması, kalıcı DNA hasarının göstergesi olarak düşünülmektedir [Palitti ve ark., 1982]. Mikronükleus testi de genotoksik ya da genotoksik olmayan (aneujenik-turbojenik) kimyasalları saptamada kullanılan metotlardandır. Mikronükleuslar hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kaybını göstermektedir. Bu nedenle in vitro mikronükleus testi, mutajenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir [Fenech 2000].

Kimyasal maddelerin hücre kültürü ortamında kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus yöntemleri ile test edilmeleri genotoksisite testleri olarak bilinmektedir. Son yıllarda bu testler aracılığıyla birçok farklı maddenin, farklı türlerde ve hücre hatlarında antigenotoksik etkilerini ortaya koyan çalışmalar yapılmaktadır [Renner, 1984; Aly ve Donya, 2002; Antunes ve ark., 2000, 2005; Maurich ve ark., 2004; Garcia ve ark, 2006; Ferrara ve ark.,2006].

Antigenotoksisite çalışmaları da genotoksisite araştırmalarındaki gibi hem in vivo hem de in vitro koşullarda yapılmaktadır. Antiklastojenik ve antimutajenik etkileri belirlemek için yapılan bu tip çalışmalarda çoğunlukla lenfosit veya lökosit kültürleri ve kemik iliği hücreleri kullanılmaktadır. Bu hücrelerde kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri gibi metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan hücrelerinde oksidatif olayların neden olduğu genetik hasarı ve antioksidanlar tarafından oluşturulan iyileştirici cevapları belirlemek üzere son yıllarda comet testi gibi daha yeni ve daha basit metotlar da kullanılmaktadır [Anderson, 1996].

İnsanlarda genotoksik ajanlara maruziyetin önemli bir neticesi olan kromozomal anormallikler, kromozomal DNA'ya hasar veren çeşitli ajanlar tarafından oluşturulabilmektedir [Antunes ve ark., 2005]. Bunlar arasında en yaygın kullanılan maddeler antitümoral ajanlardır. Antitümöral ajanların spesifik biyomoleküllerle etkileştiği bilinmektedir; farklı kategorilerden antitümör ilaçlar ile muamelenin hem in vitroda hem de in vivo da tümör olmayan hücrelerde serbest radikallerin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir [Weijl ve ark., 1997; Antunes et al, 2000].

Bu çalışmada DNA hasarını oluşturmak için antitümoral ajanlardan mitomycin-C (MMC) kullanılmıştır. MMC alkile edici bir antibiyotik olup, klinikte özellikle gastrointestinal kanserler ve akciğer kanserleri için kullanılmaktadır [Chapner ve Myers, 1993]. Hücredeki birincil hedefi DNA'dır. Diğer alkile edici ajanlar gibi hücrede pek çok kimyasal tepkime oluşturur [Bianchi ve ark., 1979; Raj ve Katz, 1985]. Bu çalışmada DNA hasarı düzeyini ve bu hasara karşı antioksidan maddenin etkisini net bir şekilde görebilmek amacıyla MMC konsantrasyonu 0,2 µg/ml olarak

seçilmiştir. Bu konsantrasyonda MMC, kontrol grubu ile kıyaslandığında oldukça yüksek düzeylerde DNA hasarına yol açmaktadır. MMC'nin diğer antitümoral ajanlar gibi, insan lenfosit kültürlerinde kromozom aberasyonlarında, kardeş kromatid değişimi sayılarında önemli bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir [Vig, 1977]. MMC, mikronükleus testinde de pozitif kontrol olarak önemli düzeyde artışa neden olmaktadır [Ferrara ve ark., 2006].

Antigenotoksisite çalışmalarında, bu çalışmada olduğu gibi, referans mutajen olarak MMC'nin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur [Maurich ve ark., 2004; Ferrara ve ark., 2006; Roza ve ark., 2003; Soysal, 1999]. Bunun dışında siklofosfamid, cisplatin, bleomycin, doxorubicin tüm dünyada birçok farklı kanser türü için kullanılan potansiyel antitümör ajanlar olup [Gentile ve ark., 1998], in vivo ve in vitro çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Antigenotoksisite çalışmalarında genetik hasarın indüklenmesi amacıyla gama radyasyonu da sıklıkla kullanılmaktadır [Rithidech ve ark, 2005; Konopacka ve ark., 2001, Vijayalaxmi ve ark., 1995]. Bu çalışmada lipoik asit ve ferulik asidin çözücüsü olarak etil alkol (etanol) kullanılmış ve etanolün etkisini görmek üzere, her bir çalışma için yalnızca etanol ilaveli bir çözücü kontrol grubu da oluşturulmuştur. Etanol içeren grupların tüm testlerde muamelesiz kontrol grubu ile benzer sonuçlar verdiği ve kromozom aberasyonları, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Etanolün çözücü kontrol olarak kullanıldığı çalışmalardan elde edilen kanıtlar, in vitro şartlarda mutajenik veya klastojenik olmadığını desteklemektedir [Philips and Jenkison, 2001]. Etanol ile yapılan kromozom aberasyon testlerinin birçoğu negatiftir. İnsan lenfosit kültürlerinde kromozom aberasyonları gözlenmemiştir [Obe ve Ristow, 1977; Konigstein ve ark., 1984; Banduhn ve Obe, 1985]. MMC ile indüklenmiş lenfosit hücre kültürlerinde melatonin ve β -karotenin kardeş kromatid değişimi oranları ve mitotik indeks değerleri üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada antioksidanların çözücüsü olarak etil alkol kullanılmış ve KKD değerleri ve mitotik indeks üzerine etkisi olmadığı belirlenmiştir [Soysal, 1999].

Bu çalışmada antioksidan lipoik asidin DNA hasarını azaltıcı etkisinin incelenmesi için mutajen ile eş zamanlı, mutajenden önce ve sonra olmak üzere 3 ayrı muamele yapılmıştır. Diğer antioksidan ferulik asit ise MMC ile eş zamanlı olarak muamele edilmiştir. Antigenotoksisite çalışmalarında bu uygulamalar farklı prosedürler dahilinde kullanılmaktadır. Nefic (2001), insan lenfosit kültüründe cisplatin tarafından oluşturulan kromozomal hasar üzerine vitamin C'nin antiklastojenik etkisini araştırdığı çalışmada, C vitaminin cisplatinden önce, cisplatin ile eş zamanlı ve cisplatinin sonra ortama eklendiği üç uygulama yapılmıştır [Nefic, 2001]. Garcia ve arkadaşları, oksidatif ajan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve t-bütilhidroperoksitin (t-bütil-OOH) uygulandığı insan periferik lenfositlerinde L-carnitinin koruyucu etkisini belirlemek için, farklı muamele sürelerini uygulamakla birlikte, yine bu 3 ayrı uygulama şeklini kullanmışlardır [Garcia ve ark., 2006] .

Maurich ve arkadaşları (2004), *Bituminaria bituminosa*'dan elde edilen iki ayrı pterokarpanın mitomycin-C ve bleomycine karşı antiklastojenik aktivitesinin belirlenmesi için 48 saatlik eş zamanlı etkiyi ve antioksidanın bir saat önce uygulandığı koruyucu etkiyi test etmişlerdir [Maurich ve ark., 2004].

Ferrara ve arkadaşları (2006) ise, mikronükleus yöntemini kullandıkları çalışmada, humik asidi MMC ile eş zamanlı olarak ve MMC'nin ön muamelesinden sonra 2 saat süreyle uygulamışlardır. Konopacka ve Wolny (2001), antioksidan vitaminlerden vitamin C, vitamin E ve β -karoteni DNA hasarına yol açan bir etken olan gama radyasyondan (2 Gy) bir saat önce ve bir saat sonra uygulamayı tercih etmişlerdir [Ferrara ve ark., 2006].

Egel ve arkadaşları (2002), askorbik asit ve folinik asitin, in vitro olarak pyrimethamine tarafından oluşturulan kromozom aberasyonlarına karşı etkisini belirlemek üzere, 72 saatlik hücre kültürünün başlangıcından 24 saat sonra askorbik asit ve folinik asidi uygulamışlar, daha sonra pyrimetamini 48. saatte uygulamışlardır. Böylece antioksidanların hücre kültüründe genotoksik ajandan bir hücre döngüsü süreyle daha fazla kalmasını sağlamışlardır [Egel ve ark., 2002].

Farklı uygulamalar olmakla birlikte, çalışmalarda genellikle tercih edilen uygulama mutajenin ve antioksidanın eş zamanlı olarak kombine şekilde muamele edilmesidir [Bhattacharya ve ark., 2004; Maurich ve ark., 2004; Antunes ve ark., 2005; Siddique ve ark., 2006].

Antioksidan maddenin mutajen ile birlikte eş zamanlı olarak test edilmesi antimutajenik test, antioksidanın mutajenden önce verilerek test edilmesi ise desmutajenik test olarak bilinmektedir [Ferrara ve ark., 2006]. Antimutajenler mutagenezi doğrudan hücre içinde bloke ederken, desmutajenler ise mutajeni farklı mekanizmalar aracılığıyla hücre dışında bloke etmektedirler [Sato ve ark., 1986; Shimoi ve ark., 1985; Shankel ve ark., 1993].

Antiklastojenler klastojen ile birlikte uygulandıklarında, antimutajenik açıdan daha etkili oldukları bildirilmiştir [Gebhart ve ark., 1985]. Bu tez çalışmasında lipoik asidin MMC'den bir saat önce ve MMC ile eşzamanlı eklendiği kültürlerdeki antimutajenik etkinin daha fazla olduğu görülmüştür. Ferulik asit ile yapılan çalışmada da eş zamanlı muamele tercih edilmiştir. Antunes ve arkadaşları (2005), insan lenfosit kültürlerini biksin ve cisplatin ile eş zamanlı olarak muamele ettiklerinde, cisplatinle muamele edilmiş kültürlerle kıyasla toplam kromozomal anormallik ve anormal metafazların sayısında istatistiksel olarak azalma olduğunu gözlemişlerdir. Bununla birlikte, biksin bu oranları muamelesiz kontrol ile aynı değere düşürmede etkisiz kalmıştır [Antunes ve ark., 2005].

Antigenotoksisite çalışmalarında yapılan uygulama şekli ve süresi kadar, uygulama dozlarının da önemli olduğu bilinmektedir. Tıpkı genotoksik etki gibi, bir kimyasalın antigenotoksik etkisi de doza bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte birçok antioksidan maddenin yüksek dozlarda prooksidan olarak etki ettiği de bilinmektedir. Bu çalışmada, antioksidanların hücre kültürlerine uygulanması aşamasında hem lipoik asit hem de ferulik asit için birçok doz denemesi yapılmıştır. 120, 90, 60, 30, 15 ve 7,5 µg/ml lipoik asit uygulanan kültürler incelenmiş, ancak bu dozlarda insan periferik lenfosit kültüründe hücre çoğalmasını engelleyici etkisi belirlendiğinden, uygulama dozları 0,5, 1 ve 2 µg/ml olarak seçilmiştir. Ferulik asit için de, lipoik

asitten elde edilen veriler doğrultusunda daha düşük dozlar denenmiş, 8 µg/ml dozda dahi mitotik indeksin çok azaldığı gözlenmiştir. Hem bu antimitotik etkisi nedeniyle hem de LA ile karşılaştırılabilir olması açısından, sonuçta ferulik asidin 0,25, 0,5, 1, 2 ve 4 µg/ml'lik konsantrasyonları denenmiştir.

Bu çalışmada lipoik asit ve ferulik asitin seçilen uygulama dozlarının, MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkisinin araştırıldığı metodlardan biri kromozom anormallikleri testidir. Kromozom anormallikleri testi, kimyasalların hem genotoksik hem de antigenotoksik potansiyelinin belirlenmesinde uzun yıllardır sıkça kullanılan oldukça hassas bir methoddur. Kromozomal aberasyon tekniğinde hücreler kolkisin eklenmesi sonucunda metafaz aşamasında tutulur ve böylece kromozomların kolayca gözlenebilmeleri sağlanır. Kromozomlardaki kırılma ve yeniden düzenlenmeler metafaz aşamasında belirlenir.

Bu çalışmada 0,2 µg/ml MMC eklenen tüm gruplarda negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, kromozomal anormallik frekansında istatistiksel olarak önemli derecede artış olmuştur ($p<0,001$). Tüm uygulama gruplarında MMC tarafından oluşturulan hasar sonucunda kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid değişimleri şeklinde gözlenen anormallikler tespit edilmiştir. En yaygın gözlenen anormallikler, kromatid kırıkları ve triradyal ve quadriradyal şekilde gözlenen kromatid değişimleridir. Vig (1977), MMC'nin özellikle kromatid tipi aberasyonların sayısını arttırdığını, tekrarlayan DNA bölgelerindeki analog nükleotidleri etkileyerek yüksek frekansda quadriradyal konfigürasyonlara yol açtığını bildirmiştir. Bununla birlikte MMC serbest fragmentlerin oluşumuna da yol açmaktadır [Vig, 1977]. Kimyasalların birçoğu tarafından indüklenen yapısal aberasyonlar kromatid tipidir ve bunlar genellikle kimyasal muamelenin ardından, DNA sentezinden sonraki ilk metafazda belirlenir. Kromatid tipi aberasyonlar genel olarak iki gruba ayrılır. Birincisi kırık tipi ve ikincisi değişim (exchange) tipidir. Bunlardan ikincisinde quadriradyal ve triradyal kromozomlar tipik olarak kromozom içi değişimler (inter chromosome exchange) olarak gözlenir [Satoh ve ark., 2002]. DNA çapraz bağlanmalarına yol açan MMC'nin hem çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO), hem de insan

hücrelerinde bu tip değişimlere yol açtığı iyi bilinmektedir [Natarajan ve Schmid 1971; Brogger, 1972].

MMC ile birlikte lipoik asitin eklendiği tüm muamele grupları yalnızca MMC içeren pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında, anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma ($p < 0,001$) olduğu belirlenmiştir. Bu azalmanın lipoik asitin MMC'den bir saat önce ve eş zamanlı olarak eklendiği gruplarda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre LA, MMC'nin oluşturduğu DNA hasarlarına karşı antiklastojenik etki göstermiştir. Bu sonuçlar, LA'nın antioksidan aktivitesine bağlı olarak, kimyasal koruyucu olarak muamelesinin, çeşitli insan neoplazmalarına karşı yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlarının (cisplatin gibi) toksik yan etkilerini engellediği daha önceki çalışmaları destekler yöndedir [Rybak ve ark., 1999]. Selvakumar ve arkadaşları (2006), α -lipoik asidin ratların kemik iliğinde siklofosamid (CP) tarafından indüklenen kromozomal aberasyonlar ve apoptozis üzerine koruyucu etkisini belirlemek için dişi Wistar ratlara intraperitoneal olarak 40 mg/kg bw CP vermişlerdir. Gruplara ayrılan ratlara, CP muamelesinden 30 veya 60 dk. öncesinde 100 veya 200 mg/kg bw tek doz LA verilmiştir. CP muamelesinden 24 saat sonra kemik iliği hücrelerinde kromozomal anormallik frekansı kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır. CP tarafından indüklenen kromozomal anormallikler kemik iliğinde artan tek zincir kırıkları ile gösterilen artan DNA hasarı ile ilişkilidir. CP ile birlikte LA ile muamele edilen ratlarda, kromozomal anormallik frekansı ve tek zincir kırıkları, tek başına CP verilen gruba kıyasla anlamlı derecede azalma göstermiştir. CP muamelesi ayrıca, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü tetiklemiş, LA ön muamelesi apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayısını azaltarak hücre ölümünü engellemiştir. LA'nın koruyucu etkisinin 200 mg/kg bw dozda, 100 mg/kg bw doza göre daha güçlü olduğu bulunmuştur, bu LA'nın koruyucu etkisinin doza bağlı olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte LA tarafından oluşturulan koruma LA ve CP arasındaki zaman aralıklarına bağlı değildir. Bu çalışmanın sonuçları LA'nın ratların eritropoietik sisteminde CP tarafından indüklenen kromozomal anormallik ve apoptozis üzerinde koruyucu etkisini göstermiştir [Selvakumar ve ark., 2006a].

Prahalathan ve arkadaşları (2006), ratların kemik iliğinde adriamisin tarafından oluşturulan klastojenite üzerine DL- α -lipoik asitin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Adriamisin (ADR) de çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik bir ilaçtır ve eritropoetik sistemde genotoksisiteyi indüklediği gösterilmiştir. LA muamelesi rat kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberasyonların, DNA zincir kırıklarının ve apoptozisin frekansında anlamlı bir iyileşme göstermiştir. Bu çalışmada LA'nın koruyucu etkisinin doza bağlı olduğu bulunmuştur, bununla birlikte LA tarafından oluşturulan koruyucu etkinin LA ve ADR muamelesi arasındaki zaman aralıklarına bağlı olmadığı görülmüştür. Sonuçlar LA'nın ratların eritropoetik sisteminde klastojenite ve apoptozis üzerine koruyucu etkisini desteklemektedir [Prahalathan ve ark., 2006].

Bu çalışmada, diğer bir antioksidan olan ferulik asidin MMC ile birlikte uygulandığı tüm gruplarda, yalnızca MMC uygulanan pozitif kontrole kıyasla anormal hücre frekansında ve hücre başına düşen anormallik sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu düşüşün, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Anormal hücre frekansı ve KA/Hücre sayısındaki değişim doza bağlı değildir (r değerleri sırasıyla $r=0,196$, $r=0,475$). Sonuçlar birbirine çok yakın olmakla birlikte, anormal hücre frekansı için en iyi etki $0,5 \mu\text{g/ml}$ 'de gerçekleşirken, hücre başına düşen anormallik sayısındaki en fazla azalma $1 \mu\text{g/ml}$ 'de ve en yüksek doz olan $4 \mu\text{g/ml}$ 'de gözlenmiştir. Roza ve arkadaşları (2003), in vitroda insan lenfosit kültürlerinde ferulik asit gibi fenolik bir bileşik olan hidroquinon ile ön muameleye bırakılan hücrelerde, H_2O_2 tarafından oluşturulan yapısal kromozom aberasyonlarının engellendiğini gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar fenolik antioksidanların nasıl antimutajenik aktivite gösterdiklerinin halen tam olarak bilinmediğini ancak özellikle iki temel yoldan bahsedilebileceğini vurgulamışlardır [Roza ve ark., 2003] Birincisi, fenolik antioksidanlar mutajenlerin oluşumunu engelleyebilirler veya mutajene karşı süpürücü ajanlar olarak etki edebilirler. İkincisi, fenolik antioksidanlar aktif mutajen türlerini süpürücü etkisi olan faz II detoksifikasyon enzimlerini indükleyebilirler [Talalay ve ark., 1995].

Antunes ve arkadaşlarının, insan lenfosit kültürlerinde biksinin klastojenitesini ve antiklastojenitesini araştırdıkları çalışmalarında, karotenoid biksinin cisplatin ile birlikte uygulandığı kültürlerde, cisplatinin indüklediği toplam kromozomal anormalliklerini önemli derecede düşürdüğü ancak bu etkinin konsantrasyonla ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Biksinin 1, 2,5, 5 ve 10 µg/ml dozları tek başına ve cisplatin ile birlikte test edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında biksin sitotoksik etkili veya klastojenik değildir. Cisplatin ile muamele edilen tüm kültürlerde, anormal metafaz yüzdesinde kontrole göre artış görülmüştür. Biksin ve cisplatin ile eş zamanlı olarak muamele edilen kültürlerde ise, toplam kromozomal anormalliklerde ve anormal metafazlarda istatistiksel olarak daha fazla bir azalma görülmüştür. 2,5 µg/ml'lik doz, kromozomal aberasyonların en etkili engelleyicisi olmuştur [Antunes ve ark., 2005]. Biksinin cisplatin tarafından oluşturulan kromozom aberasyonlarını azalttığı in vivo koşullarda da gösterilmiştir [Silva ve ark, 2001].

Nefic (2001), C vitamininin cisplatinin neden olduğu kromozom aberasyonları üzerine koruyucu etkisini in vitro insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyon testi ile araştırmıştır. Bu çalışmada C vitamini ile muamelenin hücreleri hasardan tamamen koruyamamakla birlikte, cisplatinin neden olduğu kromozom aberasyonlarının sayısını ve aberasyonlu metafazların sayısını istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. Vitamin C'nin test konsantrasyonları (10 ve 100 µg/ml) cisplatinin (0,5 µg/ml) serbest radikal mekanizması vasıtasıyla etki ettiği genetik hasar üzerine limitli bir antimutajen etkiye sahiptir [Nefic, 2001].

Vijayalaxmi ve arkadaşları (1995), insan lenfosit kültüründe radyasyon tarafından oluşturulan kromozom hasarının önceden melatonin ile muamele edilmiş olan kültürlerde konsantrasyona bağlı ve istatistiksel olarak önemli bir azalma gösterdiğini belirlemişlerdir [Vijayalaxmi ve ark., 1995]. Antunes ve arkadaşları (1995), belli sürelerde kurkumin ile muamele edilen hayvanlarda, toplam kromozomal anormallik miktarında ve anormal metafaz sayısında istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğunu gözlemişlerdir [Antunes ve ark., 1995]. Literatürde, daha birçok diyetel antioksidanın, vitaminin ve bitki ekstraktının antigenotoksik etkilerinin kromozom anormallikleri testi kullanılarak gösterildiği in vitro ve in vivo

alışmalar mevcuttur [Garcia ve ark, 2006; Siddique ve ark, 2006; Bhattacharya ve ark, 2004; Gülkaç ve ark, 2004; Aly ve Donya, 2002, Egel ve ark., 2002, Mukhopadhyay ve ark, 1998]

Bu çalışmada, lipoik asit ve ferulik asitin MMC tarafından oluşturulan genetik hasara karşı hücreleri tam olarak koruyamasalar da, kromozomal anormallikleri azalttıkları belirlenmiştir. Bu azalma FA uygulamasında önemli değilken, LA uygulamasında önemli düzeyde gerçekleşmiştir. Sonuçlar lipoik asidin ferulik aside göre daha güçlü bir antiklastojenik etkisi olduğunu göstermektedir. Bu durum öncelikle LA'nın çok daha güçlü antioksidan özelliklere sahip olması ile açıklanabilir. Ancak bu çalışmada FA için LA ile benzer şekilde denenen 48 saatlik uygulamalarda yeterli hücre elde edilememiş ve değerlendirmelerin yapılamamış olması tam bir karşılaştırma yapmamızı da engellemektedir. MMC'nin 24 saat süreyle hücre kültüründe kalması 48 saatlik etkisine göre daha az kromozomal hasar ile sonuçlanmaktadır. Bu da antioksidanın iyileştirici etkisinin net bir şekilde görülmesine engel olmuş olabilir. Yine bu süreç içerisinde antioksidanlarca aktive edildiği düşünülen tamir sistemlerinin hücrelerde yeterince etkili olmadığını dşndrebilir.

Antioksidanlar kimyasal maruziyet veya radyasyon sonucu olarak ya da i kaynaklı olarak oluşan stabil olmayan oksijen türlerine elektron vererek etkilerini gösterirler. Bu zellikleri ile kromozomal anormalliklere karşı koruyucu olabilirler [Cerutti ve ark., 1992]. Bu çalışmada etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu antioksidanların antimutajenik etkileri öncelikle serbest radikal süpürücü özelliklerine bağlanabilir. Böylece MMC tarafından oluşturulan serbest radikallerle etkileşerek kromozom hasarına karşı doğrudan bir etki göstermiş olabilirler. İkincisi DNA tamir enzimlerini aktive ederek toplam kromozomal hasar üzerine dolaylı olarak etki etmiş olabilirler. Diğer yandan mitotik indeksteki aşırı düşüşler, hasarlı hücrelerin ortamdan elimine edilmiş olabileceğini, gözlenen anormal hücre ve hücre başına düşen toplam anormallik sayısındaki azalmaların bu durumdan kaynaklanabileceğini de düşündürmektedir.

Bu çalışmada kullanılan metotlardan ikincisi kardeş kromatid değişimi (KKD=SCE) testidir. KKD mutajenite ve karsinojenitenin saptanmasında kullanılan en etkili metotlardan biridir. Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinde kromatidlerin kırılan parçaları yer değiştirdikten sonra yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır [Carrono ve Natarajan, 1988]. Bir kimyasalın KKD frekansında artışa neden olması, onun replikasyon mekanizmasını etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir. Klastojenlerin ve klastojenik aktivitenin belirlenmesinde KKD testi hassas bir metoddur. KKD sıklığı sadece test edilen genotoksik ajandan değil, aynı zamanda DNA replikasyonunu etkileyebilen enzimler gibi endojen ajanlar, oksidatif stres ve bireyler arasındaki genetik çeşitlilik gibi faktörlerden de kaynaklanabilir [Stanimirovic ve ark., 2005]. KKD metodu, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemenin yanı sıra, mutajenler tarafından oluşturulan kromozom hasarının, antioksidan etkisi olduğu bilinen veya araştırılan maddeler tarafından ne oranda tamir edildiği hakkında da bilgi vermektedir [Soysal, 1999].

KKD'nin saptanması için bu çalışmada erkek ve dişi bireylere ait preparatların her birinden 2. mitoz (M2) bölünmeyi geçiren 25, böylece toplam 50 hücre incelenmiştir. Kùltürler, kardeş kromatid değişimi/hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde tüm MMC uygulamaları negatif kontrole göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Lipoik asit eklenmiş tüm kùltürler pozitif kontrol ile kıyaslandığında, MMC tarafından oluşturulan KKD frekansında istatistiksel olarak önemli derecede azalma gözlenmiştir ($p<0,05$, t-test). Bu etkinin en fazla lipoik asitin MMC'den bir saat önce eklendiği kùltürlerde 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda olduğu belirlenmiştir. Eş zamanlı ve bir saat önce LA muamele edilen gruplardaki azalma doza bağlıdır ($r=0,946$; $r=0,842$) ancak bir saat sonra LA muamele edilen grupta bu etki doza bağlı değildir ($r=0,516$). MMC ile birlikte ferulik asit uygulanan kùltürlerde de, yalnızca MMC uygulaması ile kıyaslandığında, kardeş kromatid değişimi oranlarında istatistiksel olarak önemli ($p<0,05$, t-test) bir azalma gözlenmiştir. Doz-etki ilişkisi açısından değerlendirildiğinde ise, doz arttıkça düzenli bir azalma olmadığı, r değerinin 0,506 olduğu belirlenmiştir. Hücre başına düşen KKD frekansında en önemli azalma 1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik orta dozda gerçekleşmiştir. Lipoik asit ve ferulik asitin, MMC tarafından

oluşturulan kardeş kromatid değişimi oranlarında istatistiksel olarak önemli derecede azalma sağlamış olmaları, antioksidan aktivitelerine bağlı olarak antimutajenik olduklarını göstermektedir. MMC'nin hücrelerde serbest radikalleri oluşturduğu bilindiğine göre, bu iki antioksidanın bu serbest radikalleri süpürücü etkisi nedeniyle antimutajenik olduğu söylenebilir. Ferulik asitin kromozomal anormallik testinde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileştirici etki sağlayamadığı ancak KKD testinde oldukça yüksek ve istatistiksel olarak önemli bir iyileşme sağladığı göz önüne alındığında da, DNA tamir sistemlerini aktive edici etki göstermiş olabileceği söylenebilir.

Antioksidanların antimutajenik etkilerinin KKD analiz metodu ile belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Madrigal-Bujaidar ve arkadaşları (1998), metilmetan sülfonat (MMS) tarafından indüklenen KKD'lere karşı fenolik bir bileşik olan nordihidroguairesik asitin (NDGA) antigenotoksik etkisini göstermişlerdir. Hem in vitro olarak insan lenfosit kültürlerinde hem de in vivo şartlarda fare kemik iliği hücrelerinde NDGA'nın uygulama dozları (0,25, 0,5, 1, 2 μ M) MMS'nin (55 μ M) KKD oluşumu üzerine etkisini istatistiksel olarak önemli derecede azaltmıştır [Madrigal-Bujaidar ve ark., 1998]. Siddique ve arkadaşları (2006), NDGA'nın norgesterol tarafından oluşturulan genotoksik hasar üzerine etkilerini KKD metodu ile araştırmışlardır. Bu çalışmada da NDGA'nın (0,5, 1 μ M), norgesterol (10, 20 μ M) tarafından oluşturulan KKD frekansında önemli bir azalma sağladığı belirlenmiştir. NDGA'nın uygulama dozlarında (0,25, 0,5, 1, ve 2 μ M) iyileştirici etkide en iyi sonuç 1 μ M'da gözlenmiştir, bu doz ile her iki donorü içeren inhibitör indeks %68,2'ye ulaşmıştır [Siddique ve ark., 2006].

Bitki ekstraktları ile yapılan çalışmalarda da antioksidan özelliklere bağlı olarak KKD değerlerinde azalma gözlenmiştir. Bhattacharya ve arkadaşları, 2 μ g/ml taze sarımsak ekstraktının, asbest fiberleri tarafından oluşturulan KKD'leri etkili şekilde azalttığını belirtmişlerdir [Bhattacharya ve ark., 2004]. Hernandez- Cerulos ve arkadaşları ise fare kemik iliği hücrelerinde hem daunorubisin hem de MMS

tarafından oluşturulan KKD'lerin papatya yağının tüm uygulama dozlarında ve doza bağlı olarak azaldığını yayınlamışlardır [Hernandez- Cerulos ve ark., 2002].

Krishnaja ve Sharma ise tüm bu çalışmalardan farklı olarak insan lenfosit kültüründe, MMC (0,1 ve 0,2 µg/ml) tarafından indüklenen kardeş kromatid değişimlerinin 200 µg/ml C vitamini uyguladıklarında artış gösterdiğini, böylece MMC'nin genotoksik potansiyelini artırdığını belirtmişlerdir [Krishnaja ve Sharma 2003].

Bu çalışmada her bir kültür için sitotoksitenin bir göstergesi olan mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) değerleri de hesaplanmıştır. Genetik etkilerin saptanmasında yararlanılan kriterlerden biri olan replikasyon indeksi, hücre siklusu kinetiklerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Replikasyon indeksinin belirlenmesinde, her bir birey için 1. mitoz (M1), 2. mitoz (M2) ve 3. mitoz (M3) bölünmeyi geçiren toplam 100 hücre incelenmiştir. Buna göre LA ve MMC'nin kombine olarak uygulandığı kültürler, yalnızca MMC içeren pozitif kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte replikasyon indeksindeki azalma tüm uygulamalarda doza bağlıdır ($r=0,817$; $r=0,756$; $r=0,789$). Ferulik asit uygulanan kültürlerde ise, lipoik asitten farklı olarak replikasyon indeksinin, MMC içeren pozitif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte az da olsa arttığı belirlenmiştir. Ancak replikasyon indeksi değerleri küçük artışlarla birlikte pozitif kontrol ile benzer seviyede kalmış, kontrol değerleri seviyesinde bir iyileşme olmamıştır.

Mitotik indeks değerlendirmesine göre, MMC ile birlikte lipoik asit ve ferulik asit uygulanan tüm gruplarda, negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında mitotik indekste istatistiksel olarak önemli azalma olduğu belirlenmiştir. Lipoik asit ve ferulik asitin MMC ile birlikte uygulandığı kültürler, yalnızca MMC uygulanan pozitif kontrol ile kıyaslandığında, mitotik indekste önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Lipoik asit uygulanan kültürlerde mitotik indeksteki azalma, tüm muamele gruplarında doza ve muamele süresine bağlı iken ($r=0,998$, $r=1,00$ ve $r=0,975$), ferulik asit uygulamasındaki düşüşün doza bağlı olmadığı belirlenmiştir ($r=0,143$).

Mitotik indeksteki azalma, hücrelerin mitotik girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesine ya da ATP seviyesinde azalma ve enerji üretim merkezindeki bozukluğa bağlanmaktadır. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iş oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması ve G2 periyodunun uzaması da gösterilmektedir [Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Rajas ve arkadaşları, MMC'ye maruz bırakılan lenfosit kültürlerinde hücrelerin hücre döngüsünün S fazında biriktiklerini belirtmişlerdir [Rajas ve ark., 1992]. Bunun sonucunda hücreler mitotik girememe ve mitotik aktivite azalmaktadır. Böylece MMC ilave edilen kültürlerde mitotik indeks azalmaktadır [Vijayalaxmi ve ark., 1996]. Bu çalışmada da tüm muamele grupları 0,2 µg/ml MMC içerdiğinden, negatif kontrole kıyasla mitotik aktivitedeki azalma bu mekanizmaların ortak etkisi ile açıklanabilir.

Lipoik asit ve ferulik asidin antioksidan aktivitelerinden dolayı, MMC tarafından oluşturulan mitotik indeksteki düşüş üzerine iyileştirici etkileri olmamıştır. Oysa Nefic, cisplatin tarafından indüklenen hasara karşı C vitaminin etkilerini araştırdığı çalışmada cisplatinin insan lenfositlerinde mitotik aktiviteyi baskılayıcı etkisinin C vitamininin eş zamanlı muamelesi ile istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını göstermiştir [Nefic, 2001]. Yine Antunes ve arkadaşları (2005), insan lenfosit kültüründe cisplatinin neden olduğu mitotik indeksteki düşüşün karotenoid biksin tarafından doza bağlı olarak arttığını belirtmişlerdir [Antunes ve ark., 2005]. Antitümöral ajanların etkilerine karşı antioksidanların kullanıldığı diğer bazı çalışmalarda mitotik indekste kontrol grubu ile aynı düzeye ulaşamamakla birlikte artışların olduğu da bilinmektedir [Egel ve ark., 2002; Siddique ve ark., 2006]. Bazı çalışmalarda ise antioksidan muamelesi ardından mitotik indeksde istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı belirtilmektedir [Madrigal-Bujaidar ve ark., 1998; Soysal, 1999]. Vijayalaxmi ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada 0,2 mM konsantrasyondan fazla melatonin varlığında kültüre edilen lenfositlerde mitotik indeksde doza bağlı ve önemli bir oranda düşüş olduğunu göstermişlerdir [Vijayalaxmi ve ark., 1996].

Her ne kadar mitotik indeksteki azalma sitotoksitenin bir göstergesi olarak kabul edilse de, bu çalışmada mitotik indeksteki azalmanın antioksidan maddeler olan lipoik asit ve ferulik asidin lenfosit çoğalmasını engelleyici özelliklerine bağlı olarak gerçekleştiği sonucuna varılabilir. Mitotik indeksteki azalma, MMC etkisiyle meydana gelen kromozom anormallikleri nedeniyle, hücrelerin yaşamını yitirmesinden de kaynaklanabilir. Bunun dışında, birçok çalışma, serbest radikal süpürücülerini, iyon şelatörlerini ve elektron yakalayıcılarını içeren çok çeşitli antioksidan bileşiklerin, lenfosit çoğalmasını engelleyebileceğini göstermiştir [Chaudri ve ark., 1986, 1988; Dornand ve Gerber, 1989; Hunt ve ark., 1991; Novogrodsky ve ark., 1982; Sekkat ve ark., 1988]. Pack ve arkadaşları (2001), bu mekanizmaları, mitojen ile uyarılmış insan periferik kan lenfositleri ve lösemik T hücreleri üzerine lipoik asidin etkilerini belirledikleri çalışmada açıklamışlardır. Buna göre, T lenfositlerinin aktivasyonu ve çoğalması, hücrenin intrasellüler redoks durumu ile bağlantılıdır. T lenfosit aktivasyonu süresince oluşan reaktif oksijen türleri, ikinci mesajcı sinyal iletim molekülü olarak rol oynadığından sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli oldukları düşünülmektedir [Chaudhri ve ark., 1986; Fidelus, 1988; Sekkat ve ark., 1988]. Ancak, T lenfositlerinin optimal immun fonksiyonu ve çoğalmaları, özellikle DNA sentezi için glutatyon (GSH) ve diğer indirgeyici yapılara ihtiyaç duymaktadır [Iwata ve ark., 1994; Kavanagh ve ark., 1990; Staal ve ark., 1994; Suthanthiran ve ark., 1990]. Bundan dolayı, geçici prooksidan durum T hücrelerinin iletişimde erken safhalarda önemlidir. Bununla birlikte reaktif oksijen türleri yüksek konsantrasyonlarda oksidatif strese ve hücrel antioksidan mekanizmalarının etkisizleşmesine yol açarlar. Böylece hücre ölümüne neden olurlar [Pahl ve Baeuerle, 1994].

Mitotik aktivitenin engellenmesi, diğer yandan lipoik asit ve ferulik asitin hidroksil radikali süpürücü etkili antioksidanlar olmalarına da dayandırılabilir. Hidroksil radikali süpürücü bileşiklerin diğer yüksek reaktif özellikteki oksiradikaller ile etkileştikleri bilinmektedir [Pryor ve Tang, 1978]. Birçok çalışma, serbest radikallerin hücrel hasarı indükleyebileceğine ve bu hasarın serbest radikal süpürücüleri ile engellenebileceğine ancak bu etki sırasında serbest radikal süpürücü antioksidanların hücreler üzerine başka etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir

[Cohen, 1978]. Elde edilen veriler, hidroksil radikallerinin ($\text{OH}\cdot$) mitojenik sinyalin transdüksiyonu için zorunlu araçlar olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, hidroksil radikalini temizleme yeteneğinde olan çok çeşitli bileşiklerin, lenfosit mitogenezini engelleme yeteneğinde olduğu düşünülmektedir [Novogrodsky ve ark., 1982].

Bu çalışmada kullanılan bir diğer analiz metodu mikronükleus testidir. Mikronükleus testi, hassas ve güvenilir bir metod olup kromozom kayıplarının ve kırıklarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [Fenech, 2000]. Mikronükleuslar, asentrik kromozomal fragmentlerin veya bütün kromozomların hücre bölünmesi sırasında yavru çekirdek şeklinde ana çekirdek dışında kalması ile oluşur ve genotoksik hasarın belirlenmesinde kullanılır. Mikronükleus, hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir [Kirsch-Volders ve ark., 1997].

Bu çalışmada, hücre başına düşen mikronükleus frekansının MMC içeren tüm gruplarda negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttığı belirlenmiştir. MMC ile birlikte lipoik asit ve ferulik asit eklenen gruplar pozitif kontrol ile kıyaslandığında, mikronükleuslu hücrelerin oranında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın lipoik asidin MMC'den bir saat önce muamele edildiği kültürde en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu grupta 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda en etkili koruma gerçekleşmiştir. Lipoik asitin eşzamanlı ve bir saat sonra eklendiği gruplarda ise sırasıyla 1 ve 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda en etkili koruma gerçekleşmiştir. Ferulik asit ile yapılan çalışmada ise, mikronükleus/hücre sayısının doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu etkiler, lipoik asit ve ferulik asitin antiklastojenik olduklarını ve MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine koruyucu etkili olabileceklerini göstermektedir. Her ne kadar uygulamadaki farklılıklardan dolayı net bir kıyaslama yapılamasa da, kromozomal anormallik testinde olduğu gibi mikronükleus testi sonuçlarına göre de lipoik asitin MMC'nin neden olduğu genotoksik hasara karşı daha etkili bir antiklastojen olduğu sonucuna varılabilir.

Mikronükleus testi için hazırlanan preparatlarda, her bir uygulama grubu için (erkek ve dişi için 500 adet) toplam 1000 hücre nükleer bölünme indeksini hesaplamak üzere değerlendirilmiştir. Mikronükleus testinde kullanılan sitokalsin-B hücre bölünmesini dururken nükleer bölünme üzerine etki etmediği bilinmektedir. Böylece sitokinezi bloke edilmiş olan hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) hücreler şeklinde sayılarak nükleer bölünme indeksi hesaplanabilmektedir. Bir kez bölünen hücreler iki çekirdeğe, iki kez bölünen hücreler ise üç veya dört çekirdeğe sahiptir. Fitohemaglütinin (PHA) uyarısına cevap veren ancak bölünmesini tamamlamamış olan hücrelerde ise yalnızca bir çekirdek bulunmaktadır [Fimognari ve ark., 2005]. Lipoik asidin 1 saat önce, eş zamanlı ve 1 saat sonra eklendiği her üç muamele grubunda, nükleer bölünme indeksi doza bağlı olarak azalmıştır. Bu etki tüm gruplarda negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Lipoik asit içeren gruplar, yalnızca MMC içeren grupla kıyaslandığında ise tüm uygulama gruplarında 1 ve 2 µg/ml'lik dozlardaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Ferulik asit uygulamasında, yalnızca MMC uygulanan pozitif kontrol grubunda ve MMC ile birlikte ferulik asidin üç dozunun (0,25, 0,5, 1 µg/ml) uygulandığı gruplarda, negatif kontrole göre azalma belirlenirken, MMC ile birlikte ferulik asidin daha yüksek iki dozunun (2 ve 4 µg/ml) uygulandığı gruplarda, negatif kontrole göre artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu azalma ve artışlar, negatif kontrol ve pozitif kontrol ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Siklofosamid tarafından indüklenen klastojenite üzerine DL- α -lipoik asitin koruyucu etkisini in vivo mikronükleus testi kullanılarak incelendiğinde, lipoik asit ve siklofosamid ile muamele edilen ratlarda, mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin sayısının tek başına siklofosamid verilenlere kıyasla anlamlı derecede ve doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Burada, lipoik asit tarafından sağlanan koruma lipoik asit ve siklofosamid muamelesinin arasındaki zaman aralıklarına bağlı değildir [Selvakumar ve ark., 2006b].

Prasad ve arkadaşları (2006), gama radyasyon tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine ferulik asidin koruyucu etkisini mikronükleus yöntemi ile göstermişlerdir.

Çalışmalarında en etkili koruyucu etkiyi belirlemek üzere ferulik asidin üç ayrı konsantrasyonu (1, 5, 10 µg/ml) ve üç farklı dozda gama radyasyonu (1, 2, 4 Gy) kullanılmıştır. Lenfositlerin ferulik asit (10 µg/ml) ile tek başına muamelesi, mikronükleus sayılarında anlamlı bir değişime yol açmamıştır. Fakat 1, 2 ve 4 Gy radyasyon, mikronükleus frekansını doza bağlı olarak artırmıştır. Ferulik asit radyasyon maruziyetinden 30 dk önce uygulandığında, ferulik asit konsantrasyonu arttıkça mikronükleus frekansında azalmaya neden olmuştur. 1 µg/ml ferulik asit, mikronükleus frekansını %75 azaltmıştır. 4Gy radyasyon ile 10 µg/ml FA uygulandığında mikronükleus frekansı %45 azalmıştır. Bu bulgular ferulik asidin radyasyon hasarına karşı koruyucu etkili olarak potansiyel kullanımı ve yararını desteklemektedir [Prasad ve ark., 2006].

Antioksidanların etkilerini belirlemek üzere mikronükleus tekniğinin kullanıldığı birçok antigenotoksisite çalışması bulunmaktadır. Rithidech ve arkadaşları (2005), en yaygın flavonoidlerden biri olan apigeninin olası genotoksik etkilerini ve radyasyon tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine koruyucu etkilerini mikronükleus test metodu ile araştırmışlardır. Bu çalışmada radyasyon uygulanmış hücrelerde MN frekansı artarken, radyasyon verilmeden 30 dk. önce apigeninin çeşitli dozlarının (2,5, 5, 10 ve 25 µg/ml) uygulandığı hücrelerde bu oranlarda anlamlı bir azalma olduğu belirtilmiştir [Rithidech ve ark., 2005].

Konopacka ve arkadaşları (2001), in vitro insan lenfosit kültüründe gama radyasyon tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı vitamin C, E ve β-karotenin koruyucu etkisini mikronükleus metodunu kullanarak araştırmışlardır. Antioksidan vitaminleri, kültür ortamına radyasyondan önce ve sonra ekledikleri her iki muamele metodunda koruyucu etkiyi gözlemişlerdir. C vitamini en düşük konsantrasyonda (1 µg/ml), E vitamini 2 µg/ml konsantrasyon üzerinde (5, 10 µg/ml) ve β-karoten tüm uygulama dozlarında (1, 5, 10 µg/ml) mikronükleus frekansını azaltmıştır. Vitaminlerin nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi olmamıştır [Konopacka ve ark., 2001].

Abraham ve arkadaşları (1993), diyetel bileşiklerden klorojenik asit, kurkumin ve beta karotenin γ-radyasyon tarafından indüklenen in vivo kromozomal hasara karşı

iyileştirici etkisini belirlemek üzere fare kemik iliği mikronükleus testini uygulamışlardır. Bu maddelerle birlikte, fareleri γ -radyasyonuna maruz bıraktıklarında indüklenen mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin frekansının anlamlı olarak azaldığını gözlemişlerdir [Abraham ve ark., 1993]

Alvarez-Gonzalez ve arkadaşları (2004), greyfurt suyunun antitümoral ajan daunorubisine karşı antiklastojenik etkisini in vivo MN metodu ile araştırmışlardır. Greyfurt suyu, antioksidan aktivitesine bağlı olarak mikronükleus oluşumunu önemli derecede azaltmaktadır [Alvarez-Gonzalez ve ark., 2004]. Verschave ve arkadaşları (2004) ise, çeşitli Güney Afrika tıbbi bitki ekstraktlarının MMC'ye karşı antigenotoksik etkisini in vitro insan lenfosit kültüründe mikronükleus testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, bazı bitki ekstraktları MMC'nin genotoksik etkisini önemli derece azaltırken, bazılarının arttırdığı belirtilmektedir [Verschave ve ark., 2004] .

Krishnaja ve Sharma (2003) ise, insan lenfosit kültüründe, MMC (0,1 ve 0,2 $\mu\text{g/ml}$) tarafından indüklenen mikronükleusların 200 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulandığında artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Hatta 0,1 $\mu\text{g/ml}$ MMC ile birlikte uygulanan C vitaminin 0,2 $\mu\text{g/ml}$ MMC'nin tek başına uygulamasından bile daha fazla mikronükleus oluşumuna neden olduğunu belirtmişleridir. C vitamini kendisi aktif bir mutajen değildir hatta bu dozda tek başına herhangi bir hasara neden olmamaktadır [Krishnaja ve Sharma, 2003]. Ancak buradaki durum C vitaminin güçlü bir serbest radikal süpürücü antioksidan olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda otooksidasyona uğrayarak hasarı engellemek yerine daha da arttırması ile açıklanmaktadır [Wayner ve ark., 1986]. Yüksek konsantrasyonlarda C vitamini fenton reaksiyonu aracılığıyla hidrojen peroksitten hidroksil radikali üretimini arttırır ve böylece konsantrasyonuna ve uygulama periyoduna bağlı olarak genetik hasara karşı koruyucu veya hasarı arttırıcı olarak etki eder [Halliwell, 2001]. Bu gibi çalışmalar antioksidanların etki mekanizmasındaki hassas dengeleri net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Son yıllarda pek çok antioksidan maddenin, prooksidan etkileri de olduğu belirlenmiştir. Pro-oksidan aktivite, bir antioksidanın ortamda bulunmadığı zamandan daha fazla oksidatif stres oluşturduğu durumdaki aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Bir bileşiğin oksidan moleküle elektron verme yeteneği bu bileşiği antioksidan yapar. Ancak farklı koşullar altında bu özellik, bileşiği bir pro-oksidana da dönüştürebilir. Bu durum daha çok tiyollerde görülmektedir. Tiyol terimi, sülfür içeren bileşikler ifade eder. Sülfür, aminoasit, protein, enzim, vitamin ve diğer biyomoleküllerin biyolojik yapıtaşları için gerekli olan önemli bir inorganik elementtir [Parcell, 2002]. Sistein, metionin, taurin, glutatyon (GSH), lipoik asit (LA), N-asetilsistein (NAC), merkaptopropionilglisin (MPG) ve sarımsak yağında bulunan dialilsülfid (DAS), dialildisülfid (DADS) ve dialiltrisülfid (DATS) gibi tiyol içeren bileşikler çeşitli oksidanları indirgeyerek ve temizleyerek biyolojik sistemleri oksidatif strese karşı korurlar [Atmaca, 2004]. Tiyoller genellikle antioksidanlar olarak bilinir. Ancak tiyoller O_2 ile doğrudan reaksiyona girerek $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit radikali) oluşumunu teşvik eder. Genel olarak geçiş metalleri $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu ve diğer reaktif oksijen türlerini üreten reaksiyonları katalizler. Örneğin Fe^{+3} DHLA tarafından oksijen tüketimi oranını artırır [Kawabata ve ark., 1995]. DHLA Fe^{+3} 'yi indirgemesi takiben O_2 'yi indirger. Ayrıca bu geçiş metalinin bir elektron indirgenmesi durumu vitamin C'nin yeniden oluşumunda da dolaylı olarak gerçekleşebilir. Artan Fe^{+3} indirgenmesi prooksidan aktivite ile sonuçlanır.

Prooksidan aktivitenin bir diğer yolu ise şöyle açıklanmaktadır; antioksidan serbest radikal süpürücü ile reaksiyona girer ve temizlenecek olan serbest radikalden daha zararlı bir ürün oluşur. Bu durum, örneğin sigara dumanı aracılığıyla oluşan reaktif oksijen türleri ve hidroksil radikallerinde gözlenmiştir. Sigara dumanında kreatin kinazı inaktive eden reaktif oksijen türleri mevcuttur. DHLA bu reaktif oksijen türlerini temizler ancak oluşan ürün, kreatin kinazı orijinal ROT'dan daha etkin bir şekilde inaktif hale getirir [Scott ve ark., 1994]. Düşük konsantrasyonlardaki LA ve DHLA bu inaktivasyonu hızlandırır. Bu durum radikallerin temizlenmesinin ardından tiyol ve oksisülfür radikallerinin oluşumu ile açıklanır. Çok ilginçtir ki, yüksek konsantrasyonlarda hem lipoik asit hem de DHLA antioksidan olarak etki eder [Scott ve ark., 1994].

Fenolik bileşiklerden olan flavonoidler gibi bazı antioksidanların da yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde genotoksisite ve sitotoksisiteyi indükleyebileceği bildirilmiştir [Duthie ve ark., 1997]. Düşük konsantrasyonlarda sarımsağa antioksidatif özellikler kazandıran allisinin yüksek konsantrasyonlarda bir prooksidan gibi davranabileceği bildirilmiştir [Amagase ve ark., 2001; Nuutila ve ark., 2003]. Lynch ve arkadaşlarına göre (2000), plazma tiyollerinin fizyolojik şartlara bağlı olarak prooksidan ve antioksidan etkileri olabilir ancak genel olarak antioksidan olarak bilinirler [Lynch ve ark., 2000].

LA ve DHLA'nın prooksidan potansiyelini kapsayan çalışmalar son birkaç yıldır yapılmaktadır. LA ve/veya DHLA'nın antioksidan veya prooksidan olarak etkileri, oksidan stresin tipine ve fizyolojik şartlara bağlı olarak belirlenir. Prooksidan etkisi, LA ve DHLA'nın henüz tam olarak anlaşılamamış çoklu mekanizmalarla etki ettiğini göstermektedir. LA'nın serbest oksijen radikalleri ile ilişkili hastalıkların engellenmesinde ve tedavisinde birçok yararlı etkileri olduğu bilindiğinden, bu hastalıklardaki kullanımında uygun farmakolojik dozunun seçilmesi kritik bir konudur [Çakatay, 2006].

Bu çalışmada hem lipoik asidin hem de ferulik asidin hücre kültürü ortamında çeşitli dozları denenmiş ve prooksidan rolleri dikkate alınarak düşük dozları tercih edilmiştir. İnsan lenfosit kültüründe uygulanan dozlarında lipoik asitin MMC tarafından oluşturulan kromozomal anormallikleri, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu, yine ferulik asitin de kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Buna göre lipoik asit ve ferulik asit MMC tarafından oluşturulan hasara karşı hücreleri tam olarak koruyamasa da limitli olarak antiklastojenik ve antimutajenik etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler güçlü antioksidanlar olan lipoik asit ve ferulik asitin antitümör ajanların genotoksik etkilerine karşı koruyucu ve antigenotoksik olduklarını göstermektedir. Antiklastojenik ve antimutajenik ajanların antikanserojenik olduğu ifade edildiğine göre [Gebhart, 1992], bu iki antioksidan kanser tedavisinde büyük avantaj sağlayabilir. Lipoik asit ve ferulik asit mitotik indeks değerlerini de istatistiksel olarak önemli derecede

düşürmüş ve antimitotik etkili oldukları sonucuna varılmıştır. Buna göre de kanserin tedavisinde tümör gelişiminin baskılanması açısından önemli olabilirler.

Burada unutulmaması gereken, antioksidanların birçoğunun genotoksik etkili olmadıkları ve hatta antigenotoksik etkili oldukları düşünülse de, bunların farklı hücre kültürü ortamlarında denenmeleri gerekmektedir. Her kimyasal gibi antioksidan maddeler de doza ve uygulama süresine bağlı olarak farklı etkilere sahip olabilirler. Bunun yanında, kimyasalların kültür ortamına tek başına eklenmeleri ile başka bir kimyasal ile birlikte uygulanması yine farklı sonuçlara neden olabilir.

İster dışardan gelsin, ister vücut içinde oluşsun, serbest radikaller sağlığa zarar verir, bu nedenle bunların vücutta nötralize edilmeleri gerekir [Walji, 1999]. Oksidanların nötralize edilmeleri antioksidanlarca gerçekleştirilir. Eğer antioksidanlar insanlar tarafından gıdalarla birlikte alınırsa, kan dolaşımına geçerek kan hücrelerine ulaşırlar, böylece organizma içinde ya da in vitro koşullarda reaktif oksijen kaynağı ile karşılaştıklarında oksidatif atağa karşı direnç sağlarlar [Collins, 2005]. Günümüzde sıkça üzerinde durulan “anti-ageing”, serbest radikal oluşumunun engellenerek yaşlanmanın etkilerinin azaltılmasını ve böylece sağlıklı yaşlanmayı hedeflemektedir. Bu nedenle antioksidan kullanımı son yıllarda oldukça önem taşıyan konuların başında gelmektedir. Antioksidan maddeler ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Besinlerin dışında dışarıdan takviyelerin yapılması ise doz tespit çalışmalarının yaygınlaştırılmasını gerektirmektedir. İnsan sağlığının, vücuttaki hassas dengelere bağlı olduğu düşünülerek, sağlıklı beslenmeye önem verilmeli, dışardan alınan takviyelerde aşırıya kaçılmamalıdır.

KAYNAKLAR

Abraham, S.K., Sarma, L., Kesevan, P.C., “Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and β -carotene against γ -radiation-induced in vivo chromosomal damage”, *Mutation Research*, 303:109-112 (1993).

Adam, A., Crespy, V., Levrat-vermy, M.A., “The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats”, *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 132: 1962-1968 (2002).

Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, *Mimoza Yayınevi*, Sağlık dizisi 5, Konya, 1-19, 39-40 (1995).

Alvarez, S., Boveris, A., “Lipoic acid and prevention of oxidative damage”, *Ciencia e Cultura*, 47: 358-361 (1995).

Alvarez-Gonzalez, I., Madrigal-Bujaidar, E., Martino-Roaro, L., Espinosa-Aguirre, J.J., “Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin”, *Toxicology Letters*, 152: 203-211 (2004).

Aly, F.A.E., Donya, S.M., “In vivo antimutagenic effect of vitamins C and E against rifampicin-induced chromosome aberrations in mouse bone-marrow cells”, *Mutation Research*, 518: 1-7 (2002).

Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y., “Intake of garlic and its bioactive components”, *J. Nutr.*, 131: 955-962 (2001).

Ames, B.N., “Dietary carcinogens and anticarcinogenes. Oxygen radical and degenerative diseases”, *Science*, 221: 1256-1246 (1983).

Ames, B.N., “Endogenous DNA damage as related to cancer and aging”, *Mutation Research*, 214: 41-46 (1989).

Anderson, D., “Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage”, *Mutation Research*, 350: 103-108 (1996).

Anderson, D., Basaran, N., Blowers, S.D., Edwards, A.J., “The effect of antioxidant on bleomycin treatment in in vitro and in vivo genotoxicity assays”, *Mutation Research*, 329: 37-47 (1995).

Andersons, B., Gravitis, J., Erins, P., “Study of macromolecular models of lignin obtained from ferulic acid”, *Khim. Priir. Soedin.*, 2: 239-245 (1980).

Antunes, L.M.G., Araujo, M.C.P., Darin, J.D.C., Bianchi, M.L.P., “Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells”, *Mutation Research*, 465: 131-137 (2000).

Antunes, L.M.G., Pascoal, L.M., Bianchi, M.L.P., Dias, F.L., “Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures”, *Mutation Research*, 585: 113-119 (2005).

Arivazhagan, P., Panneerselvam, C., “Effect of DL-alpha-lipoic acid on neural antioxidants in aged rats”, *Pharmacol. Res.*, 42: 219–222 (2000).

Arivazhagan, P., Ramanathan, K., Panneerselvam, C., “Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats”, *Chem–Biol. Interact.*, 138: 189-198 (2001).

Atmaca, G., “Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids”, *Yonsei Medical Journal*, 45 (5): 776-788 (2004).

Banduhn, N., Obe, G., “Mutagenicity of methy 2-benzimidazolecarbamate, diethylsilboestrol and estradiol. Structural chromosome aberrations, SCE's, C-mitoses, polyploidies and micronuclei”, *Mutation Research*, 156: 199-218 (1985).

Bhattacharya, K., Yadava, S., Papp, T., Schiffmann, D., Rahman, Q., “Reduction of chrysotile asbestos-induced genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes by garlic extract”, *Toxicology Letters*, 153: 327-332 (2004).

Bianchi, N.O., Bianchi M.S., Larramendy, M., “Kinetics of Human Lymphocyte Division and Chromosomal Radiosensitivity”, *Mutation Research.*, 63: 317-324 (1979).

Biewenga, G.P., and Bast, A., “Reaction of lipoic acid with ebselen and hypochlorous acid”, *Methods Enzymol.*, 251: 303-314 (1995).

Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., “The Pharmacology of the Antioxidant Lipoic Acid”, *Gen. Pharmacol.*, 29(3): 315-331 (1997).

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrossi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., Puntoni, R., “Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans?”, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 79 (2): 133-135 (1995).

Boyunağa, H., Çelik, C., “Serbest Radikaller ve Hücre Denge”, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 347: 98-100 (1996).

Breimer, L., “Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species”, *Free Radical Res. Commun.*, 14: 159-171 (1991).

Brogger, A., Johnsen, J., “A model for the production of chromosome damage by mitomycin-C”, *Chromosoma*, 38: 95–104 (1972).

Burçak, G., Andican, G., “Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma”, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (4):159-169 (2004).

Bustamante, J., Lodge, J.K., Marcocci, L., Tritschler, H.J., Packer, L., Rihn, B.H., “Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease”, *Free Radical Biol. Med.*, 24: 1023–1039 (1998).

Byers, T., “Vitamin E supplements and coronary heart disease”, *Nutr. Rev.*, 51: 333-345 (1993).

Caragay, A.B., “Cancer preventive foods and ingredients”, *Food Technol.*, 46: 65-68 (1992).

Carreau, J.P., “Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids”, *Meth Enzymol*, 62: 152-158 (1979).

Carroll, E., “Oxygen radicals and human disease”, *Ann. Intern. Med.*, 107: 526-545 (1987).

Carrono, A.V., Natarajan, A.T., “Considerations for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques”, *Mutation Research*, 204: 379-406 (1988).

Cerutti, P.A., “Oxy-radicals and cancer”, *Lancet*, 344: 862-863 (1994).

Cerutti, P., Trump, B., “Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis”, *Cancer cells*, 3: 1-7 (1991).

Cerutti, P., Shah, G., Peksin, A., Amstad, P., “Oxidant Carcinogenesis and Antioxidant Defense”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 663: 158-166 (1992).

Chance, B., Siers, H., Boveris, A., “Hydroperoxide metabolism in mammalian organs”, *Phys. Rev.* 59: 527-605 (1979).

Chapner, B.A., Myers, C.E., “Antitumor Antibiotics, Cancer: Principles and Practice of Oncology”, De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., *J.B. Lippincott Company*, Philadelphia, 2.cilt: 381-383 (1993).

Chaudhri, G., Clark, I.A., Hunt, N.H., Cowden, W.B., Ceredig, R., “Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation”, *J. Immunol.*, 137: 2646–2652 (1986).

Chaudhri, G., Hunt, N.H., Clark, I.A., Ceredig, R., “Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin”, *Cell. Immunol.*, 115: 204–213 (1988).

Coglan, A., “Europes search for the winning diet”, *New Scientist*, 29-33 (1991).

Cohen G., “The generation of hydroxyl radicals in biologic systems: toxicological aspects”, *Photochem Photobiol.*, 28 (4-5): 669–675 (1978).

Colins, A.R., “Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 2615-2675 (2005).

Collins, B.H., Horska, A., Hotten, P.M., Riddoch, C. and Collins, A.R., “Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro”, *Nutr. Cancer*, 39: 148–153 (2001).

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J., “Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation and disease”, *FASEB J.*, 17: 1195-1214 (2003).

Cutler, R.G., “Antioxidants, aging and longevity”, in: W.A. Pryor (Ed.) *Free Radicals in Biology*, Academic Press, New York, 371-428 (1984).

Çakatay, U., “Pro-oxidant actions of α-lipoic acid and dihydrolipoic acid”, *Medical Hypotheses*, 66: 110–117 (2006).

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., “Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma”, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95 (1997).

Daya-Grosjean, L., Robert, C., Drougard, H., Suarez, A., Sarasin, H., “High mutation frequency in ras genes of skin tumours isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients”, *Cancer Res.*, 53: 1625-1629 (1993).

Della Croce, C., Bronzetti, G., Cini, M., Caltavuturo, L., Poi, G., “Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells”, *Toxicology in Vitro*, 17: 753–759 (2003).

Dizdaroğlu, M., “Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins”, in: B. Halliwell and O.I. Auroma (Eds.), *DNA and Free Radicals*, Chichester, Ellis Harwood, 19-39 (1993).

Dornand, J., Gerber, M., “Inhibition of murine T cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors”, *Immunology*, 68: 384–391 (1989).

Dusinska, M., Kazimirova, Barancokova, M., Beno, M., Smolkova, B., Horska, A., Raslova, K., Wsolova, L., Collins, A.R., “Nutritional supplementation with antioxidants decreases chromosomal damage in humans”, *Mutagenesis*, 18(4): 371-376 (2003).

Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R., “Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes”, *Cancer Res.*, 56:1291-1295 (1996).

Duthie, S.J., Johnson, W., Dobson, V.L., “The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells”, *Mutation Research*, 390: 141-151 (1997).

Eck, H.P., Gmunder, H., Hartmann, M., Petzoldt, D., Daniel, V., Droge, W., “Low concentrations of acid-soluble thiol (cysteine) in the blood plasma of HIV-1-infected patients” *Biol. Chem.*, 370: 101–108 (1989).

Editorial, “Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer”, *Mutation Research*, 591: 3-7 (2005).

Egel, Ç., Bilaloğlu, R., Aydemir, N., “Inhibitory Effects of Ascorbic Acid and Folinic Acid on Chromosome Aberrations Induced by Pyrimethamine In Vitro”, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 22: 353-362 (2002).

Evans, M.D., Cooke, M.S., “Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids”, *BioEssays*, 26: 533-542 (2004).

Fenech, M., “The in vitro micronucleus technique”, *Mutation Research*, 455 (1-2): 81-95 (2000).

Ferguson, L.R., “Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet”, *Mutation Research*, 307: 395-410 (1994).

Ferrara, G., Loffredo, E., Senesi, N., Marcos, R., “Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6”, *Mutation Research*, 603: 27-32 (2006).

Fidelus, R.K., “The generation of oxygen radicals: a positive signal for lymphocyte activation”, *Cell. Immunol.*, 113: 175–182 (1988).

Finkel, T., and Holbrook, N. J., “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing”, *Nature*, 408: 239–247 (2000).

Fimognari, C., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., “Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures”, *Mutation Research*, 582: 1-10 (2005).

Garcia, C.L., Filippi, S., Mosesso, P., Calvani, M., Nicolai, R., Mosconi, L., Palitti, F., “The protective effect of L-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents”, *Mutagenesis*, 21 (1): 21-27 (2006).

Gebhart, E., “Anticlastogenicity in cultured mammalian cells”, *Mutation Research*, 267: 211-220 (1992).

Gebhart, E., Wagner, H., Grziwok, K., Behnsen, H., “The action of anticlastojens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver S9 mix”, *Mutation Research*, 149: 83-94 (1985).

Gentile, J.M., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, G.J., Ferguson, L.R., “Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents”, *Mutation Research*, 402: 289-298 (1998).

Glei, M., Liegibel, U.M., Ebert, M.N., Böhm, V., Pool-Zobel, B.L., “ β -Carotene Reduces Bleomycin-Induced Genetic Damage in Human Lymphocytes”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179: 65-73 (2002).

Gomez-Arroya, S., “Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides”, *Mutation Research*, 466:117-124 (2000).

Graf, E., “Antioxidant potential of ferulic acid”, *Free Radic. Biol. Med.*, 13(4): 435–448 (1992).

Gülkaç, M.D., Akpınar, G., Üstün, H., Kanlı, A., “Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats”, *Mutagenesis*, 19 (3): 231-236 (2004).

Gürbüz, N., “Antimutagenler ve Antikarsinojenler (Kanser Gelişiminin Kimyasal Bileşiklerle Önlenmesi)”, *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 26: 312-318 (2006).

Hagen, T. M., Vinarsky, V., Wehr, C. M., and Ames, B. N., “(R)-Alphalipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both in vitro and in vivo”, *Antioxidant Redox Signal.*, 2: 473–483 (2000).

Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L. *et al.* , “Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage”, *Cancer Res.*, 54: 2919–2922 (1994).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., “Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)”, *Cancer Res.*, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Halliwell, B., “Drug antioxidant effects”, *Drugs*, 42 (4): 569-605 (1991a).

Halliwell, B., “Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease”, *Am.J. Med.*, 91: 14-21 (1991b).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., “Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy”, *Lancet*, 1396-1398 (1984).

Halliwell, B., "Vitamin C and genomic stability", *Mutation Research*, 475: 29-35 (2001).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., "Free Radicals in Biology and Medicine", 2nd Ed. Oxford, *Clarendon Press.*, 86-133 (1989).

Han, D., Tritschler, H.J., Packer, L., "α-Lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T lymphocyte Jurkat cell line", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207: 258–264 (1995).

Handelman, G.J., Han, D., Tritschler, H., Packer, L., "α-Lipoic acid reduction by mammalian cells to the dithiol form, and release into the culture medium, and release into the culture medium", *Biochem. Pharmacol.*, 47: 1725–1730 (1994).

Hernandez-Ceruelos, A., Madrigal-Bujaidar, E., Cruz, C., "Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methylmethanesulfonate in mouse bone marrow", *Toxicology Letters*, 135: 103-110 (2002).

Holland, N.T., Duramad, P., Rothman, N., Figgs, L.W., Blair, A., Hubbard, A., Smith, M.T., "Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-diclorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo", *Mutation Research*, 521: 165-178 (2002).

Holliday, R., "The inheritance of epigenetic defects", *Science*, 238: 163-169 (1987).

Huang, M.T., Smart, R.C., Wong, C.Q., Conney, A.H., "Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate", *Cancer Res.*, 48: 5941–5946 (1988).

Hunt, N.H., Cook, E.P., Fragonas, J.C., "Interference with oxidative processes inhibits proliferation of human peripheral blood lymphocytes and murine B lymphocytes", *Int. J. Immunopharmacol.*, 13 :1019–1026 (1991).

Iwata, S., Hori, T., Sato, N., Ueda-Taniguchi, Y., Yamabe, T., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., "Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation: possible involvement of adult T cell leukaemia-derived factor and glutathione in transferrin receptor expression.", *J. Immunol.*, 152: 5633–5642 (1994).

Ji, L.L., "Oxidative stress during exercise: Implication of antioxidant nutrients", *Free Radical Biol. Med.*, 18: 1079–1086 (1995).

Jonasson, J.A., "Analysis and Interpretation of Human Chromosome Preparations., Rooney", D.E., Czepulkowski, B.H., (Ed), *Human Cytogenetics Oilpress*, Oxford-Washington DC , 55-71 (1986).

Kaderlik, R.K., Lin, D.X., Long, N.P., “Advantages and Limitation of Laboratory Methods for Measurement of Carcinogen DNA Adducts for Epidemiological Studies”, *Toxicology Letters*, 64: 469-475 (1992).

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., Butterfield, D.A., “Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure activity studies”, *J. Nutr. Biochem.*, 13: 273-281 (2002).

Kaur, H., Halliwell, B., “Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid: identification of uric acid oxidation products”, *Chem. Biol. Interact.*, 73: 235-247 (1990).

Kavanagh, T.J., Grossmann, A., Jaecks, E.P., Jinneman, J.C., Eaton, D.L., Martin, G.M., Rabinovitch, P.S., “Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content”, *J. Cell. Physiol.*, 145: 472-480 (1990).

Kawabata, T., Tritschler, H.J., Packer, L., “Reaction of (R,S)-dihydrolipoic acid and homologs with iron”, *Methods Enzymol.*, 251: 325-332 (1995).

Kaya, F.F., Topaktaş, M., “Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro”, *Mutation Research*, 626: 48-52 (2007).

Kelloff, G.J., Boone, C.W., Steele, V.E., Fay, J.R., Lubet, R.A., Crowell, J.A., Sigman, C.C., “Mechanistic considerations in chemopreventive drug development”, *J. Cell Biochem. Suppl.*, 20: 1-24 (1994).

Khanna, S., Atalay, M., Laaksonen, D. E., Gul, M., Roy, S., and Sen, C. K., “Alpha-lipoic acid supplementation: Tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise”, *J. Appl. Physiol.*, 86: 1191-1196 (1999).

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., van Hummelen, P., “The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction”, *Mutation Research*, 392: 19-30 (1997).

Kohlmeier, L., Simonsen, N., Mottus, K., “Dietary modifiers of carcinogenesis” *Environ. Health Perspect.*, 103 (8): 117-184 (1995).

Königstein, M., Larisch, M., Obe, G., “Mutagenicity of antiepileptic drugs I Carbamazepine and some of its metabolites”, *Mutation Research*, 139: 83-86 (1984).

Konopacka, M., Rzeszowska-Wolny, J., “Antioxidant vitamins C, E and β -carotene reduce DNA damage before as well as after γ -ray irradiation of human lymphocytes in vitro”, *Mutation Research*, 491: 1-7 (2001).

Krishna, G., Nath, J., Ong, T., "Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C", *Cancer Res.*, 46, 2670-2676 (1986).

Krishnaja, A.P., Sharma, N.K., "Ascorbic Acid Potentiates MitomycinC-induced Micronuclei and Sister Chromatid Exchanges in Human Peripheral Blood Lymphocytes In Vitro", *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*, 1: 99-122 (2003).

Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Hoult, J.R.S., Halliwell, B., "Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability", *Biochem. Pharmacol.*, 42: 1673-1681 (1991).

Lindhal, T., "DNA repair enzymes", *Annu.Rev.Biochem.*, 51: 61-87 (1982).

Lodge, L., Handelman, G.J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V.V., Packer, L., "Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating detection", *J. Appl. Nutr.*, 49: 3-11 (1997).

Lynch, S.M., Compine, A.L., Moore, M.K., "Plasma thiols inhibit hemin-dependent-oxidation of human low-density", *Biochim Biophys Acta*, 1485: 11-12 (2000).

Madrigal-Bujaidar, E., Barriga, S.D., Cassani, M., Marquez, P., Revuelta, P., "In vivo and in vitro antigenotoxic effect of norhydroguaiaretic acid against SCEs induced by methyl methanesulfonate", *Mutation Research*, 419: 163-168 (1998).

Maiorino, M., Chu, F.F., Ursini, F., Doroshov, K., Davies, H.J., Esworthy, R.S., "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines", *J. Biol. Chem*, 266: 7728-7732 (1991).

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., "Polyphenols: food sources and bioavailability", *Am. J Clin. Nutr.*, 79 (5): 727-747 (2004).

Mantovani, G., Maccio, A., Melis, G., Mura, L., Massa, E., Mudu, M.C., "Restoration of functional defects in peripheral blood mononuclear cells isolated from cancer patients by thiol antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine", *Int. J. Cancer*, 86: 842-847 (2000).

Marangon, K., Deveraj, S., Triosh, O., Packer, L., Jialal, I., "Comparision of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress", *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 1114-1121 (1999).

Maurich, T., Pistelli, L., Turchi, G., "Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes", *Mutation Research*, 561: 75-81 (2004).

Menkes, M., Comstock, G., Vuilleumier, J., Helsing, K., Rider, A., Broomeyer, R., "Serum β -carotene, vitamins A and E, selenium and the risk of lung cancer", *N. Engl. J. Med.*, 1250-1254 (1986).

Mercan, U., "Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi", *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2):91-96 (2004).

Mindell, E., İlaç Yiyecekler (Food as medicine)", Çeviren: Şule Gülmen, *Prestij Yayınları*, İstanbul, 33-35 (2005).

Mitscher, L.A., Telikepalli, H., McGhee, E., Shankel, D.M., "Natural antimutagenic agents", *Mutation Research*, 350: 143-152 (1996).

Moini, H., Packer, L., Saris, N.L., "Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic acid and Dihydrolipoic Acid", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182: 84-90 (2002).

Morse, M.A., Stoner, G.D., "Cancer Chemoprevention Principles and Prospects", *Carcinogenesis*, 14 (9): 1737-1746 (1993).

Mukhopadhyay, M.J., Saha, A., Mukherjee, A., "Studies on the Anticlastogenic Effect of Turmeric and Curcumin on Cyclophosphamide and Mitomycin C In Vivo", *Food and Chemical Toxicology*, 36: 73-76 (1998).

Muller, D.P., Gross-Sampson, M.A., "Neurochemical, neurophysiological and neuropathological studies in vitamin E deficiency", *Crit. Rev. Neurobiol.*, 5: 239-263 (1990).

Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Takahashi, D., Matsumoto, K., Haihara, K., Taniguchi, H., Nomura, E., Hosoda, A., Tsuno, T., Maruta, Y., H.W. Kim, H.W., Kawabata, K., Ohigashi, H., "FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid", *Cancer Letters*, 180: 121-129 (2002).

Natarajan, A.T., Schmid, W., "Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of mitomycin induced chromosome aberrations in Chinese hamster cells in vitro", *Chromosoma*, 33: 48-62 (1971).

Nefic, H., "Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures", *Mutation Research*, 498: 89-98 (2001).

Nichols, T.W., " α -Lipoic acid: Biological Effects and Clinical Implications", *Alternative Medicine Review*, 2(3): 177-183 (1997).

Nomura, E., Kashiwada, A., Hosoda, A., Nakamura, K., Morishita, H., Tsuno, T., Taniguchi, H., "Synthesis of amide compounds of ferulic acid and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro", *Bioorg. Med. Chem.*, 11: 3807-3813 (2003).

Novogrodsky, A., Ravid, A., Rubin, A.L., Stenzel, K.H., "Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 1171–1174 (1982).

Nuutila, A.M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., Oksman-Caldentey, K.M., "Comparision of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity", *Food Chemistry*, 81: 485-493 (2003).

Obe, G. and Ristow, H., "Acetaldehyde, but not ethanol, induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vitro", *Mutation Research*, 56: 211-213 (1977).

Obe, G., Preiffer, P., Savage, K.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folle, G.A., Drets, M.E., "Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution", *Mutation Research*, 504: 17-36 (2002).

Ogiwara, T., Satoh, K., Kadoma, Y., Murakami, Y., Unten, S., Atsumi, T., Sakagami, H., Fujisawa, S., "Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid", *Anticancer Res.*, 22(5): 11-17 (2002).

Ohta, T., "Modification of genotoxicity by naturally occuring flavorings and derivatives", *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 127-146 (1993).

Osawa, T., Katsuzaki, H., Hagiwara, Y., Hagiwara, H., Shibamoto, T., "A novel antioxidant isolated from young green barley leaves", *J. Agric. Food Chem.*, 40:1135-1138 (1992).

Pack, R.A., Hardy, K., Madigan, M.C., Hunt, N.H., "Differential effects of the antioxidant α -lipoic acid on the proliferation of mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes and leukaemic T cells", *Molecular Immunology*, 38: 733–745 (2001).

Packer, L., "Antioxidant propertis of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 738: 257-264 (1994).

Packer, L., Kraemer, K., Riimbach, G., "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications", *Nutrition*, 17: 888-895 (2001).

Packer, L., Witt, E.H., "Antioxidant properties and clinical applications of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. In: Cadenas, E., Packer, L., ed. *Handbook of Antioxidants*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 545-593, (1996).

Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., "Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant", *Free Radical Biology and Medicine*, 19: 227-250 (1995).

Paganga, G., "The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?" *Free Radic. Res.*, 30: 153–162 (1999).

Pahl, H.L., Baeuerle, P.A., "Oxygen and the control of gene expression", *Bioessays*, 16: 497–502 (1994).

Palitti, F. C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., "Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice", *Mutation Research*, 103: 191-195 (1982).

Parcell, S., "Sulfur in human nutrition and applications in medicine", *Altern. Med. Rew.*, 7: 22-44 (2002).

Pfaffly, J.R., "Lipoic acid: The Antioxidant Chameleon", Free Radicals in Biology and Medicine, Biosciences Department, *The University of Iowa*, 77: 222 (2001).

Philips, B.J., Jenkison, P., "Is ethanol genotoxic? A review of the published data", *Mutagenesis*, 16(2): 91-101 (2001).

Podda, M., Tritschler, H.J., Ulrich, H., Packer, L., "Alpha-lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency", *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 98-104 (1994).

Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Muller, H., Wollowski, I. and Rechkemmer, G., "Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods", *Carcinogenesis*, 18: 1847–1850 (1997).

Prahalathan, C., Selvakumar, E., Varalakshmi, P., Kumarasamy, P., Saravanan, R., "Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells", *Toxicology*, 222: 225-232 (2006).

Prasad, N.R., Srinivasan, M., Pugalendi, K.V., Menon, V.P., "Protective effect of ferulic acid on γ -radiation induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes", *Mutation Research*, 603: 129-134 (2006).

Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., Ramesh, A., "Protective effect of *Spirulina fusiformis* on chemical-induced genotoxicity in mice", *Fitoterapia*, 75: 24-31 (2004).

Pryor, W.A., Tang, R.H., "Ethylene formation from methional", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81 (2): 498–503 (1978).

Raj, A.S., Katz, M., "Beta-carotene as an inhibitor of benzo(a)pyrene and Mitomycin-C induced chromosomal Breaks in the Bone Marrow of Mice", *Can. J. Genet. Cytol.*, 27 (5): 598-602 (1985).

Rajas, E., Montero, R., Herrera, L.A., Sardo, M., Gonsebatt, M.E., Radrigues, R., Ostrosky-Wegman, P., "Are Mitotic Index and Lymphocyte Proliferation Kinetics Reproducible Endpoints in Genetic Toxicology Testing?", *Mutation Research*, 282: 283-286 (1992).

Reed, L.J., "Multienzyme complex", *Acc. Chem. Res.*, 7: 40-46 (1974).

Reed, L.J., Debusk, B.G., Gunsalus, I.C., et al., "Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase", *Science*, 114: 93-94 (1951).

Renner, H.W., "Antimutagenic effect of an antioxidant in mammals", *Mutation Research*, 135: 125-129 (1984).

Rithidech, K.N., Tungjai, M., Whorton, E.B., "Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes", *Mutation Research*, 585: 96-104 (2005).

Rosenburg, H.R., Culik, R., "Effects of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies", *Arch Biochem Biophys*, 80:86-93 (1959).

Roza, L., Vogel, N., Delft, J.H.M., "Lack of clastogenic effects in cultured human lymphocytes treated with hydroquinone", *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1299-1305 (2003).

Rukkumani, R., Aruna, K., Suresh Varma, P., Menon, V.P., "Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose dependent study", *J. Med. Food*, 7 (4): 456-461 (2004a).

Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P.S., Menon, V.P., "Ferulic acid, a natural phenolic antioxidant modulates altered lipid profiles during alcohol and thermally oxidized sunflower oil induced toxicity", *Neutraceutical. Funct. Med. Foods*, 4: 119-132 (2004b).

Rybak, L.P., Husain, K., Whitworth, C., Somani, S.M., "Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system", *Toxicol. Sci.*, 47: 195-202 (1999).

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pasquale, A.D., Uccella, N., Barbuzzi, T., Donatella, P., Bonina, F., "In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents", *Int.J. Pharm.*, 199: 39-47 (2000).

Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., "Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment", *Mutation Research*, 436:99-112 (1999).

Saraç, E., "Doğanın Şifalı Eli", *Doğan Kitapçılık*, İstanbul, 25-26 (2005).

Sarafian, T.A., Bredesen, D.E., "Is apoptosis mediated by reactive oxygen species?", *Free Radical Res.*, 126: 265-271 (1994).

Sato, T., Ose, Y., Nagase, H., “Desmutagenic effect of humic acid”, *Mutation Research*, 162: 173–178 (1986).

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., Sofuni, T., “Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes”, *Mutation Research*, 504: 57-65 (2002).

Saul, R.L., Ames, B.N., “Background levels of DNA damage in the population”, in: M.G. Simic, L. Grossman and a.c. Upton (Eds.), Mechanisms of DNA damage and Repair: Implications for Carcinogenesis and Risk Assesment, *Plenum Press*, New York, 529-536 (1986).

Scott B. C., Aruoma O. I., Evans P. J., O'Neill C., van der Vliet A., Cross, C. E., Tritschler H. and Halliwell B., “Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: a critical evaluation”, *Free Radical Res.*, 20: 119-133 (1994).

Sekkat, C., Dornand, J., Gerber, M., “Oxidative phenomena are implicated in human T cell stimulation”, *Immunology*, 63: 431–437 (1988).

Selvakumar , E., Prahalathan, C., Varalakshmi, P., Kumarasamy, P., Saravanan, R., “Modification of cyclophosphamide-induced clastogenesis and apoptosis in rats by α -lipoic acid”, *Mutation Research*, 606: 85-91 (2006a).

Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P.T., Varalakshmi, P., “Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide”, *Arch. Toxicol*, 80: 115-119 (2006b).

Sen, C.K., Roy, S., Han, D., Packer, L., “Regulation of cellular thiols in human lymphocytes by α -lipoic acid: a flow cytometric analysis”, *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 1241–1257 (1997).

Shankel, D.M., Kuo, S., Haines, C., Mitscher, L.A., “Extracellular interception of mutagens”, *Basic Life Sci.*, 61: 65–74 (1993).

Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Kada, T., “Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r”, *Mutation Research*, 149: 17–23 (1985).

Siddique, Y.S., Beg, T., Afzal, M., “Protective effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) against norgestrel induced genotoxic damage”, *Toxicology in Vitro*, 20: 227-233 (2006).

Silva, C.R., Antunes, L.M.G., De Lourdes, M., “Antioxidant Action of Bixin Against Cisplatin-induced Chromosome Aberrations and Lipid Peroxidation in Rats”, *Pharmacological Research*, 43 (6): 561-566 (2001).

Slade, R., Grissman, K., Norwood, J., Hatch, G., “Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guine pigs and rats”, *Exp. Lung Res.*, 19: 469-484 (1993).

Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M., “Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress”, *Curr. Med. Chem.*, 11: 1135-1146 (2004).

Snell, E.E., Strong, F.M., Peterson, W.H., “Growth factors for bacteria”, *Biochem J.*, 31: 1789–1799 (1937).

Soysal, Y., “Mitomisin C ile indüklenmiş lenfosit hücre kültürlerinde melatonin ve β -Karotenin in vitro sistemde kardeş kromatid değişimi oranları ve mitotik indeks değerleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 47-56 (1999).

Speit, G. and Houptner, S., “On the mechanism of differential giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted Chromosomi, II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns, *Human Genetics* , 70: 126-129 (1985).

Srinivasan, M., Rukkumani, R., Ram Sudheer, A., Menon, V.P., “Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity”, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 19: 491–496 (2005).

Staal, F.J., Ela, S.W., Roederer, M., Anderson, M.T., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., “Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection”, *Lancet* 339: 909–912 (1992a)

Staal, F.J., Roederer, M., Israelski, D.M., Bubp, J., Mole, L.A., McShane, D., Deresinski, S.C., Ross, W., Sussman, H., Raju, P.A., et al., “Intracellular glutathione levels in T cell subsets decrease in HIV-infected individuals”, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8: 305–311 (1992b).

Staal, F.J., Anderson, M.T., Staal, G.E., Herzenberg, L.A., Gitler, C., Herzenberg, L.A., “Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 3619–3622 (1994).

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M., “ Evaluation of genetic effects of Apitol in vitro by measurement of sister chromatid exchange”, , *Mutation Research*, 588: 52–157 (2005).

Stich, H.F., Dunn, B.P., “Relationship Between Cellular Levels of Beta-Carotene and Sensitivity to Genotoxic Agents”, *Int. J. Cancer*, 38: 713-717 (1986).

Stillwell, L.M.G., Hu, H.X., Adkins, J.A., Wisknock, J.S., Tannenbaum, S.R., "Analysis of methylated and oxidized purines in urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry", *Chem. Res. Toxicol.*, 2: 94-99 (1989).

Suh, J. H., Shigeno, E. T., Morrow, J. D., Cox, B., Rocha, A. E., Frei, B., Hagen, T.M., "Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-(α)-lipoic acid", *FASEB J.*, 15: 700–706 (2001).

Suthanthiran, M., Anderson, M.E., Sharma, V.K., Meister, A., "Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 3343–3347 (1990).

Takahashi, T., Nav, M., Chiba, I., "p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer", *Science*, 246: 491-494 (1989).

Talalay, P., Fahey, J.W., Holtzclaw, W.D., Prester, T., Zhang, Y., "Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction", *Toxicology Letters*, 82/83: 173-179 (1995).

Totter, J.R., "Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 77: 1763-1767 (1980).

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40 (2006).

Verschaeve, L., Kestens V., Taylor, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Van Staden, J., "Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts", *Toxicology in Vitro*, 18: 29-35 (2004).

Vig, B.K., "Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin", *Mutation Research*, 39(2): 189-238 (1977).

Vijayalaxmi, Reiter, R.J., Meltz, M.L., "Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage", *Mutation Research*, 346: 23-31 (1995).

Vijayalaxmi, Reiter, R.J., Leal, B.Z., Meltz, M., "Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes", *Mutation Research*, 351: 187-192 (1996).

Walji, H., "Vitaminler: Sağlıklı yaşam için gerekli besinler", *Dost Kitabevi Yayınları*, Ankara, 31-33 (1999).

Wang, Z.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R., Mukhtar, H., “Antimutagenic activity of green tea polyphenols”, *Mutation Research*, 223: 273-285 (1989).

Waters, M.D., Stack, H.F., Jackson, M.A., Brockman, H.E., Flora, S., “Activity profiles of antimutagens: in vivo and in vitro data”, *Mutation Research*, 350: 109-129 (1996).

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., “The antioxidant efficiency of Vitamin C is concentration dependent”, *Biochem. Biophys. Acta.*, 884: 119-123 (1986).

Weijl, N.I., Cleton, F.J., Osanto, S., “Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity”, *Cancer Treat. Rev.*, 23: 209-240 (1997).

Wilson, V.L., Smith, R.A., Ma, S., Cutler, R.G., “Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age”, *J. Biol. Chem.*, 261: 9948-9951 (1987).

Witt, E.H., Reznick, A.Z., Viguie, C.A., Starke-Reed, P., Packer, L., “Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation”, *J. Nutr.*, 122: 766-773 (1992).

Xu, D.P., Wells, W.W., “ α -Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria”, *J. Bioenerg Biomembr*, 28: 77-85 (1996).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research*, 604:53-59 (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TANER, Gökçe
 Uyruğu : T.C.
 Doğum yeri ve tarihi : Kayseri, 25.08.1981
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 202 12 03
 Fax : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : gtaner@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. (Genetik)	2007
	G.Ü. Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği	2006
Lisans	Gazi Ünv./ Biyoloji Bölümü	2004
Lise	Ankara Atatürk Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Görev
2005–2007	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. **Taner, G.**, Çömez, Ö, Özkan, D., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “In vitro Cytogenetic Studies on the Effect of Fungicide Hexaconazole”, (Poster) II. International Enviromental Protection Symposium, 8-10 September, Kütahya, (2005).