

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

ALOE VERA JEL'İN GENOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Raşit GÜLER

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. İsmet Çok**

Ankara-Şubat 2010

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek lisans
tezi olarak kabul edilmiştir**

Tez Savunma Tarihi : .../.../2010

Jüri Başkanı

Üye

Üye

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan Sayın Prof. Dr. İsmet Çok'a

Tezimin hazırlanmasında bana her türlü olanağı sağlayan, bilgisi ve görüşleri ile bana yol veren, yetişmemi sağlayan, değerli hocalarım Doç. Dr. İlhan Gürbüz'e Sayın Dr. Ecz. Emre Durmaz'a ve Sayın Uzm Ecz. Onur Kenan Ulutaş'a

İlgi ve Destekleri için Sayın Prof. Dr. Bensus Karahalil, Sayın Prof. Dr. Sema Burgaz, Sayın Prof. Dr. Ali Esat Karakaya, Sayın Yrd. Doç. Gonca Çakmak Demircigil, Sayın Dr. Ela Kadioğlu, Sayın Uzm. Ecz. Erdem Çoşkun, Sayın Uzm Ecz. Esra Emerce Tufan, Sayın Uzm. Ecz. Başak Engin'e

TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay

İçindekiler

Tablolar

Şekiller

1. GİRİŞ

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aloe vera bitkisi

2.1.1 Aloe vera Jel

2.1.2. Aloe vera kullanımına bağlı olarak gelişen toksisite

2.2. Moleküler Biyogöstergeler

2.2.1. Genotoksite Testlerinin Kullanım Alanları

2.2.2. Comet Yöntemi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Farelere Aloe Vera Jelin Uygulanışı

3.1.1. Farelerden kan alma işlemi

3.2. COMET YÖNTEMİ

3.2.1. Test İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.2. Test İçin Kullanılan Alet ve Malzemeler

3.2.3. Teknik İçin Kullanılan Çözeltiler

3.2.4. Tekniğin Uygulanışı

4. BULGULAR

4.1 Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.1 Önerilen dozun yarısı uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi.

4.1.2 Önerilen doz uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.3. Önerilen dozun iki katı uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.4. Kontrol grubu ile yapılan çalışmalar

4.1.2. Önerilen doz, yarısı ve iki katı doz uygulanan deney hayvanlarında ve kontrol grubu hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.2.1. 1.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

4.1.2.1. 7.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

4.1.2.1. 14.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

6. ÖZET

7. SUMMARY

8. KAYNAKLAR

9. TEŞEKKÜR

10. ÖZGEÇMİŞ

TABLÖLAR

Tablo 1: Aloe barbadensis den elde edilen aloe ürünleri	7
Tablo 2: <i>Aloe Vera</i> bitkisinin içerdığı bileşikler	7
Tablo 3: Aloe vera yaprağı ve jel bazının fiziksel ve kimyasal özellikleri	8
Tablo 4: Çalışmadaki deney hayvanları dağılımı ve doz grupları	19
Tablo 5: Çalışmada yer alan deney hayvanları ağırlıkları	20
Tablo 6: : Kontrol grubu deney hayvanlarında 1, 7 ve 14. gün %kuyruk yoğunluğu sonuçları	26
Tablo 7: Önerilen dozun yarısı “Doz/2” verilen farelerde 1,7 ve 14. Günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları	28
Tablo 8: Önerilen dozun yarısı verilen grupta Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları	29
Tablo 9: Önerilen Doz “Doz” verilen farelerde 1,7 ve 14. günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.	29
Tablo 10 : Önerilen doz grubunda Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları	30
Tablo 11: Önerilen Dozun İki katı “Doz _{x2} ” verilen farelerde 1,7 ve 14. günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.	31
Tablo 12: Önerilen dozun iki katı doz verilen grupta çoklu karşılaştırma testi sonuçları	32
Tablo 13: 1. Gün Kontrol ve doz gruplarının % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları	33
Tablo 14: 7.Gün Kontrol ve Doz gruplarında % kuyruk yoğunluğu ortalamaları.	34
Tablo 15: : 7. Günde elde edilen sonuçların Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılması	35
Tablo 16: 14.Gün Kontrol ve Doz gruplarında % kuyruk yoğunluğu ortalamaları..	35
Tablo 17: 14. Günde elde edilen sonuçların Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılması..	36
Tablo 18: <i>Aloe barbadensis</i> , <i>Aloe ferox</i> ve Aloe'nin çeşitli komponentleri ile bakteri ve memeli hücreleri kullanılarak yapılan genotoksikite yöntemleri sonuçları	40

ŞEKİLLER

Şekil 1: <i>Aloe vera</i> bitkisi	6
Şekil 2: Aloe türlerindeki ana antrakinon bileşikleri	13
Şekil 3: Kontrol grubunun 1,7 ve 14. günlerdeki % kuyruk yoğunluğu değerlerinin karşılaştırılması ($p>0.05$: her 3 günün karşılaştırılması)	27
Şekil 4: Önerilen doz/2 grubunda 7 ve 14. Günlerde comet testi ile ölçülen, % kuyruk yoğunluğu sonuçları ($p<0.05$ 1.gün-14.gün karşılaştırılması)	28
Şekil 5: Önerilen doz grubunda 7 ve 14. Günlerde comet testi ile ölçülen, % kuyruk yoğunluğu sonuçları ($p<0,01$;1.gün 7. gün ve 1.gün-14 gün karşılaştırılması)	30
Şekil 6: Önerilen Dozun İki Katı Verilen Deney Hayvanlarında 1,7 ve 14. Günlerde ki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları. ($p<0,01$;1.gün 7. gün ve 1.gün-14 gün karşılaştırılması)	31
Şekil 7: Doz gruplarında elde edilen % Kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.	32
Şekil 8: 1.Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları	33
Şekil 9: 7.Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları ($p<0.01$ kontrol-Doz 2 grubu değerlendirildiğinde).	34
Şekil 10: 14.Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları ($p<0.01$ Kontrol-D/2, $p<0.05$ Kontrol-Doz; $p<0.01$ Kontrol-Doz $\times$ 2)	35

1.GİRİŞ

Son yıllarda çeşitli nedenlerden dolayı alternatif tıbbı olan ilginin dünya yüzeyinde artış göstermesi, özellikle bitkisel kaynaklı tıbbi ürünlerin çeşitliliğinde ve ticaretinde oldukça önemli miktarda artışların yaşanmasına neden olmuştur. Çoğunluğu piyasada bulunduğu ülkelerde ruhsatlandırma problemi yaşayan bu ürünlerin güvenilirlik problemleri bu ürünleri tartışılır halde olmasının temel etkenlerindendir. Bitkisel tıbbi ürünlerin ilaç olarak değerlendirilmesi ancak klasik ilaçların sahip olduğu kalite, güvenilirlik ve etkinlik kriterlerini sağlamaları ile mümkün görülmektedir¹.

Bitkisel ilaçların güvenilirliği bileşiminde bulunan bitkisel drog veya drog preparatına ait toksisite özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Ortaya çıkan toksik etkiler bitkisel ilaçların kimyasal bileşimindeki maddelerin toksisitesinden kaynaklanabileceği gibi bu ürünün üretimi sırasında oluşabilecek kontaminasyonlardan (mikrobiyal, pestisitler, çeşitli toksik kimyasallar, radyoaktivite vb) veya drogun yanlış kullanımından kaynaklanabilmektedir. Bundan dolayı geleneksel kullanımın geçerli olmadığı durumlarda bitkisel ilaçlarla pek çok toksikolojik ve farmakolojik testlerin ve klinik dökümantasyonun yapılması gerekmektedir.

Modern ilaç kavramında "birim dozu ile standart ve tekrarlanabilen fizyolojik yanıt alınması" önkoşuldur. Fitofarmasötik olarak adlandırılan ve "Modern ilaç kavramının gereklerini yerine getiren ve diğer farmasötik ilaçlar ile birlikte sıkı bir şekilde denetlenen bitkisel ilaçlar" olarak tanımlanan ürünlerin çeşitliliği ve kullanılan miktarı günümüzde giderek artmaktadır². Diğer taraftan aktardan edinilen ya da doğadan toplanan ham bitkisel materyalin (ham drog) kullanılması ile bu beklentinin karşılanma olasılığı bitkilerin kimyasal bileşimleri; iklim, toprak, mevsim, işlenme yöntemi, saklama koşulları vb. etmenlere bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebilmelerinden dolayı düşüktür. Bu durum da tekrarlanabilen fizyolojik yanıt alınabilme olasılığını azaltmaktadır. Ayrıca çoğu bitkide etki tek bir bileşene bağlı olarak değil, sinerjistik/antagonistik vb. etkileşmeler, Emilimi ve stabiliteyi artıran maddeler ve diğer çeşitli etmenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Fitoterapötik olarak adlandırılan "sağlık destek ve diyet ürünleri" arasında sınıflandırılan ürünlerin tablet, şurup, vb. farmasötik dozaj formları halinde sunulmasına

karşılık, denetim eksikliği önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu ürünlerde üretim sırasında ve sonrasında yeterli kontrol bulunmayışı ayrıca sağlık riskleri yaratması açısından ve özellikle bu ürünlerin güvenilirlik ve tekrarlanabilir tedavi yanıtı alınabilme olasılığı tartışmalıdır³.

Yeterli denetim bulunmaması nedeniyle fitoterapötiklerle ilgili pazardan daha büyük pay kapmak isteyen üreticiler "dolaylı reklam kampanyaları" ile giderek artan kitlelerin ilgisini çekmek istemekte hatta kendilerine bağlı fabrika ve dağıtım tesisleri ve sistemleri kurmaktadır. Bu ürünlerden biri de *Aloe Vera* Jel ürünüdür. *Aloe vera* jel yurdumuzda üretici çeşitli firmaların oluşturduğu satış ağı ile tüketiciye kapıda ulaşma yoluyla pazarlanmaktadır. Bu pazarlama sırasında ürünün geniş bir yelpazede” pek çok hastalığa iyi geldiği ve pek çok hastalıktan bireyleri koruduğu” yönünde satış elemanlarınca pazarlaması yapılmaktadır. Bu ürünler eczanelerde satılmamaktadır. Dolayısıyla bu pazarlama yöntemi ile bilinçsiz kullanıcılar için olası sağlık risklerinin ortaya çıkması söz konusu olabilmektedir. Nitekim Yurdumuzda Sağlık Bakanlığı *Aloe vera* jelin kullanımına bu nedenlerden dolayı kısıtlama getirmiş olup, ürünün şu an ilgili üretici firmalarca pazarlanmasını geçici olarak durdurmuş bulunmaktadır. Bu tarihe kadar yurdumuzda *Aloe vera* jel, yoğun formlarda oldukça fazla satılmıştır. Fakat yakın gelecekte ürünün tekrar bildirilen satış yöntemi ile satışının yapılması için gereken girişimler firmaca yapılmaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda ürünlerin içerisinde bulunan çeşitli maddelerinin güvenilir ve hatta kanserden koruyucu rol oynadığı iddia edilirken, bazılarında ise karsinogenik etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Son yıllarda FDA ürünün kullanımına bağlı olarak gelişebilecek sağlık riskleri konusunda uyarıcı bildiriler yayımlamaktadır. Özellikle *Aloe vera* jele yönelik olarak yapılan toksisite çalışmalarında , ürün kullanımına yönelik olarak başta karsinogenik etki olmak üzere gelişebilecek genotoksisite çalışmalarının yeterli olmaması dikkati çekmektedir. *Aloe vera* jelin yaratabileceği genotoksisitenin değerlendirilmesine yönelik çalışmaların sonuçları bu ürünün güvenliği konusunda aydınlatıcı bilgilerin oluşmasına neden olacaktır. Dolayısıyla bu konuda yeni ve geniş kapsamlı değerlendirmeye ihtiyaç vardır.

Çeşitli tıbbi amaçlar ileri sürülerek geniş bir halk kitlesine ulaşmış durumda olan ürüne yönelik olarak kullanıcıların büyük bir çoğunluğunun ürünün güvenilirliği

konusunda bilgi eksiklikleri mevcuttur. Bu derece yaygın kullanımı sonucu ortaya çıkabilecek olası genotoksik etkilerin önüne geçilebilmesi çalışmanın önemini ve etkisini ortaya koymaktadır. Ürünün genotoksik etkileri konusunda literatürde yetersiz olan bilgiye bu konuda katkıda bulunulması sadece yurdumuzda bu ürünü kullananlar için değil, yurt dışında da ürünü kullanan kişiler açısından önem taşımaktadır.

Diğer yandan comet yöntemi sonucunda elde edilen sonuçların genotoksik etkiyi destekleyecek şekilde saptanması, bu ürünün güvenilirliği konusunda ve ürünün satış ve kullanımına getirilen kısıtlamalara ciddi destek olacaktır. Bu yönde elde edilen sonuçlar çerçevesinde, sadece firma elemanlarınca tek yönlü bilgilendirilen halk kitlelerinin olası genotoksik etkilerden uzak kalmasının sağlanması en önemli yaygın etkiyi yaratacaktır. Diğer yandan, eksik kalmış veriler nedeniyle halk sağlığını tehdit etme olasılığı olan bir tıbbi amaçlı ürünün, bu çalışma sonucunda elde edilecek çıktılarla amacına uygun bir ürün olup olmadığı yönünde kanıtlar sağlanması, çalışmanın erişilen en önemli katma değeri olarak ortaya çıkacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

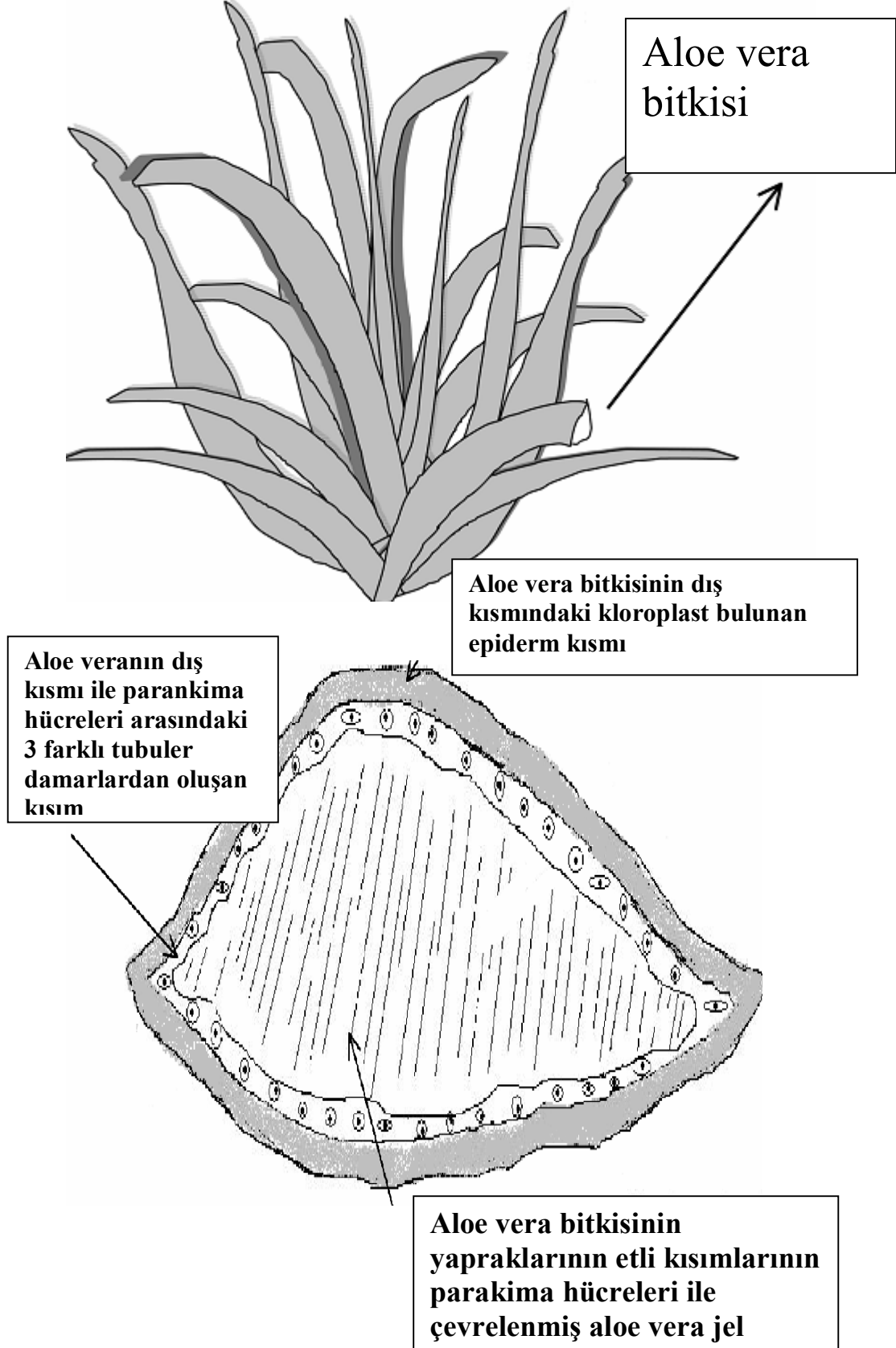
ABD’de yetişkin nüfusun %20 si diğer bir deyişle 38 milyon kişi çeşitli alternatif ilaçları daha çok da bitkisel ilaçlardan yararlanmaktadır ^{4,5}. Bu bitkisel ilaçlar içinde *Aloe vera* en popüler olanlarından ^{6,7}. *Aloe vera* halk- geleneksel tıbbında Çin, Hindistan, Japonya gibi ülkelerde *yararlanılan* 2000 yıldan fazla süredir bir bitkidir ⁸. Batı toplumlarında özellikle ABD’de ilaç endüstrisinde *Aloe veranın* lateks komponentleri (latex bitki boylamasına kesildiğinde merhem kıvamında çıkan kısımdır) kullanılmaktadır. Günümüzde *aloe vera* içeren sağlık ve kozmetik ürünlerin sayısı çok artmıştır. *Aloe vera* cilt nemlendirici, el ve yüz kremi, sabunları, güneş losyonları, şampuanlar, saç tonikleri bonyo ve makyaj malzemelerinde bulunmaktadır. Topikal preparatları donma, yanma , radyasyon dermatitleri, ülserler, psoriasis yaralanmalar ve deri enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte kozmetik endüstrisinde gençleştirici, sıkılaştırıcı ve nemlendirici etkisinden dolayı yararlanılmaktadır ⁹⁻¹². Son yıllarda bazı herbalistler profilaksi ve tedavide bilinmeyen sistemik rahatsızlıkları hafifletmede *aloe vera* bitkisinin lateks, jel ve yapraklarının oral olarak alınarak kullanılmasını önermekte olup bu yönde ticari preparatları batı toplumlarında piyasada yer almaktadır ¹³. Yapraklarından elde edilen formülasyonları büyük ölçüde sıvı, toz ve tablet formlarında destekleyici olarak kullanılmaktadır. Konstipaston ^{9,12,14,15} ve GIS rahatsızlıkları gidermek ve immün sistemi güçlendirmek amacıyla ^{9,12,16,17} oral yolla bitkinin çeşitli bölümlerinin kullanılması önerilmektedir. Bunun yanı sıra çeşitli raporlarla *aloe vera* ya yönelik anti-tümör ¹⁸, anti-artritik ¹⁹, anti-romatizmal ¹⁹, anti-kanser ^{18,20} ve anti-diyabetik ²¹ özellikleri rapor edilmiştir.

Bitkiye ait çeşitli türler, büyüme yeri, hasatlanma şartları, ekstraksiyon ve işleme metotları bitki içindeki çeşitli komponentlerin konsantrasyonunu ve etkinliğini etkilemektedir. Nitekim günümüzde de bitkiye yönelik özellikle toksisite verilerinin azlığından dolayı özellikle çocuk, kadın ve erkeklerin piyasadaki oral ²² ve topikal ürünlerinin kullanımı göz önünde bulundurularak 1998 yılında National Cancer Institute *Aloe Vera* bitkisini yüksek karışım içermesinden dolayı National Toxicology Programı altında tumor oluşturuvcu ve karsinogenetik etki yönünden aday olabileceğini bildirmiştir

2.1. Aloe vera bitkisi

Aloe vera yaygın olarak bilinen *Aloe Barbadosis* Miller (*Aloe vera* Linne)'dir. *Aloe vera* bitkisi Liliaceae familyasından olup 420 türü bulunmaktadır. Bitkinin anavatanı güney Afrika olup kuru sub-tropik ve tropik iklimlerde yetişebilmektedir (Şekil 1) ⁸. *Aloe veranın* ticari olarak önemsenen birkaç türü vardır. Ticari olarak en çok popüler olanları uzun ömürlü ve yaprakları etli ve sulu olan türleridir. Bu bitkiler crassulecean asit metabolizması yardımı ile dokularında yüksek miktarda su saklayarak az veya değişken sulu ortama uyum sağlayabilmektedirler. Crassulacean asit metabolizması sayesinde fotosentetik yol ile malik asit dönüşümünü yapılarak kuru iklimlere adaptasyon sağlanır. *Aloe vera* meyvaları %30 su bulundurmaktadır, yapraklarında bu oran %65-80 arasındadır. Yaprakları etli ve birden çok katmandan oluşur, bu katmanlara kloroplast hücreleri serpiştirilmiş haldedir. Kanal demetleri yaprakların etli kısımlarında bulunmakta olup üç tip tübüler yapıdan oluşmaktadır: ksilem-tübülleri su ve mineralleri köklerden taşırlar: phloem(soymuk) kanalları sentez edilen materyalleri köklere taşırlar ve perisiklik kanallar ise *Aloe vera* lateksinin yapraklara kadarki bölümde transport ve depolanmasından sorumludurlar. *Aloe vera* lateks ayrıca *aloe suyu*, *aloe özsu* veya basitce *aloe* olarak adlandırılır. Arap dünyasında 'alloeh' olarak adlandırılmış olup anlam olarak tadının acı olmasından kaynaklanarak *parlayan ve acı* anlamındadır. *Aloe vera* bitkisinin yapraklarının etli kısmının en içteki kısımları arasında ince çeperli parankima hücreleri *Aloe vera* jeli içermektedir. *Aloe vera* jel yapışkan sıvı olarak yaprakların etli kısımlarından ekstraksiyon ile elde edilir ^{9,22}. Fazla olan enerji ile karbonhidrat sentez edilerek phloem kanalları ile yaprakların etli kısımlarına taşınır. Su, mineraller ve malik asit küçük organik asitler, crassulacean asit metabolizması ile elde edilir ve yaprakların etli kısımlarına taşınır. *Aloe vera* jel bitkinin su ve enerji depolamasına yarayan kısmıdır. Bu yüzden *Aloe* türleri arasında *Aloe vera* ticari ve terapötik etkilerinden dolayı en çok kullanılanıdır ^{9,23}. *Aloe* ürünlerinin kimyasal özellikleri ve tanımları Carrinton laboratuvarlarında (2001) yapılan analizler ile tanımlanmıştır (Tablo 1). *Aloe vera* bitkisinin içeriğinde yer alan kimyasallar ise Tablo 2 de özetlenerek sunulmuştur ¹².

Şekil 1: Aloe vera bitkisi



Tablo 1: *Aloe barbadensis* den elde edilen aloe ürünleri

Ürün ismi	Görünüş	Koku	Tat	pH
Aloe vera tüm yaprağı 1:1	Açık kehribar rengi sıvı	Hafif ot kokulu	Hafif acı ot	3.0-4.0
Aloe vera jel 1:1 renksizleştirilmiş	Temiz saydam	Hafif ot kokulu	Hafif karakteristik ot	3.5-5.0
Aloe vera jel 10:1 renksizleştirilmiş	Yarı-viskoz ve hafif ve orta kehribar	Hafif ot kokulu	Hafif ot	3.5-5.0
Aloe vera jel dondurarak kurutulmuş	Beyaz, taba arası renkli toz	Saptanmamış	Saptanmamış	saptanmamış

Tablo 2: *Aloe Vera* bitkisinin içerdiği bileşikler ¹².

Antrakınonlar	Sakkaritler	Vitaminler	Nonesansiyel amino asitler	İnorganik bileşikler	Enzimler	Esansiyel amino asitler	Muhtelif
Aloin	sellüloz	B1	Histidin	Kalsiyum	Siklooksijenaz	Lizin	Kolesterol
Barbaloin	glukoz	B2	Arjinin	Sodyum	Oksidaz	Treonin	Trigliserit
Isobarbolin	mannoz	B6	Hidroksiprolin	Klor	Amilaz	Valin	Steroidler
Anthranol	L-ramnoz	Kolin	Aspartik asit	Manganez	Katalaz	Lösin	B-sitosirel
Aloetic asit	Aldopentoz	Folik asit	Glutamik asit	Çinko	Lipaz	Izolosin	Lignin
Sinnamik asit ester		C	Prolin	Krom	Alkalın fosfataz	Fenilalanın	Ürik-asit
Aloe-emodin		α -tokoferol	Glisin	Bakır	Karboksipeptidaz	Metionin	giberellin
Emodin		B-karoten	Alanin	Mg			Lektin benzeri bileşikler
Krizifonik asit			Trozin	Demir			Salisik asit
Resistannol							Araşidonik asit
Antrasen							Potasyum sorbat
Ethetal yağ							

2.1.1 Aloe Vera Jel.

Aloe vera nın ticari olarak yetiştirilmesine 1920 yılında Florida eyaletinde başlanmıştır. *Aloe vera* dan elde edilen *Aloe vera* jel, farklı *Aloe* türlerinin, uzun, etli, yeşil yapraklarından elde edilen, yüzyıllardır halk ilacı olarak kullanılan sulu özüttür. *Aloe* jelin; 75 besin ögesi ve 200 aktif bileşik (20 mineral, 18 amino asit, 12 vitamin gibi) içerdiği belirlenmiştir. *Aloe* lateks gastrointestinal sistemde iritan olan katartik etkilere sorumlu antrakinon ve emodin bileşiklerini içermektedir. Yaprığın ikinci kısmı yaprağın iç kısmındaki ince çeperli parankima hücrelerinden berrak, viskoz sıvıdan oluşan ve *aloe* jel olarak bilinen kısımdır. *Aloe* jel içerisinde genellikle asetillenmiş ya da kısmen asetilenmiş ya da asetillenmemiş halde yer alan polisakkaritler bulunur. Kozmetik ürünlerinde genellikle jel kısmının *Aloe* sıvısı kısmı nemlendirici krem ve yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. *Aloe vera* jel ve yaprak içerikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 3’de sunulmuştur .

Tablo 3: *Aloe vera* yaprağı ve Jelbazının fiziksel ve kimyasal özellikleri ⁹

Özellik	Jel	Tüm yaprak
Çözünebilen katılar	%0.62	%1.3-3.5
pH	4.5	4.2
Azot	12	6
Ca ⁺²	340	600
Mg ⁺²	60	100
K ⁺	390	750
Öziletkenlik	1200-2300μ	1900-2500μ
Tat	Yumuşak	Tuzlu
Metanolde çözülebilen katılar (MPS)	%0.12-0.16	%0.45-1.3
MPS çözünebilenlerin oranı	25-35	30-40
Etanolde çözülebilen katıların toplam oranı	6-10	1-10
UV absorpsiyon pik	224 nm	254 nm
Monosakkarit	Galaktan ve glukomannan	glukomannan

Aloe jel aloe yapraklarının mekanik olarak sıkılması ile elde edilen kıvamlı berrak sıvıdır. %99 oranında su içermekte olup müsilaajlı olmasının nedeni içeriğindeki lifli yapılardan kaynaklanmakta olup, pH'sı 4,4-4,7 arasındadır. Yüksek asidik yapısından dolayı malik asit gibi hücrelerde birikme gösterebilir. Bir çok araştırmacı Aloe vera jel içerisindeki aktif bileşikleri saptamaya çaba harcamaktadır. Jel'in kimyasal analizinde kuru ağırlığında yağlar, proteinler gibi minor yapılar bulunmaktadır, sırasıyla; çözünür şeker (%27.8 bulunmaktadır bu oran yaprak veya kabuktan daha fazladır. Aloe jel kuru ağırlığının %25'i mono- ve poli-sakkaritlerden oluşmaktadır. En çok bulunan monosakkarit manna-6-fosfattır. En çok bulunan polisakkarit ise glukomannandır (beta-(1,4) asetilat-mannan). Bu bileşikler(asemannan) antialerjik ve antienflematuvar etkilerinden dolayı izole edilmişlerdir. Aloe jel içinde binlerce poli ve mono sakkarit bulunmakta olup, bunların çok farklı kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Aloe jel aynı zamanda lignin , salisilik asit, saponinler, steroller ve triterpenoidler içerir. Nişasta olmayan polisakkaritler ve lignin jelin kuru kütlelerinin %35ini oluşturur. Taze olan aloe jel içinde proteolitik enzim olan karboksipeptidaz, glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz enziminin birkaç izoenzimi bulunmaktadır. Aloe jel içinde A, C, E, B12 tiamin, niasin ve folik asit gibi vitaminler ile Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cr ve Fe gibi mineraller içermektedir. Aloe bitkileri lizin, histidin, arjinin, sistein, alanin, metionin, lösin , izolosin aminoasitleri bulundurmaktadır ^{8,9,12,24}.

Aloe vera jel eldesi çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Örneğin, Aloe vera saplarından el ile kesilerek hasat edildikten sonra yaprakların dış tabakası ortadan kesilerek aloe jel ayrılır. İlk ayırma işleminden sonra hücre duvarları, ince fiber borular ve diğer kontaminantlar sıkma ve filtre ederek veya dekontaminasyon prosesi ile ayrılır. Yapraklardan jel ayrılırken yeşil tabakada kontaminasyon oluşmaz. Çünkü jel aktivitesi yapraklardan ayrıldıktan sonra stabil olmayan bir haldedir. prosten sonra stabil hale getirilebilir. Bir diğer yöntem ise; jel yüksek sıcaklıklara 3 dakika boyunca maruz bırakarak stabilize edilir. Ultraviyole stabilizasyon, kimyasal oksidasyon ve koruyucular eklenerek jel'in aktivitesinin korunması gibi işlemler diğer yöntemlerdir. Bu yöntemlerden biri McAnalley tarafından geliştirilmiş bu yöntemde *Aloe vera* jel yapraklardan izole edildikten sonra aktif bileşik carrisyn (asemannan) 'dan izole edilir. Bu yöntemlere ek olarak Aloe saplarından kesildikten sonra bakteriyel solüsyonla yıkanır ve bu yıkama işlemi ile antrakınonlar ile zengin özsu ayrılır. McAnalley

yönteminde yapraklar ezildikten sonra diyaliz yoluyla antrakinonlardan ayrılır. Aloe jel yapraklardan izole edildikten sonra homojenize edilerek Aloe suyu üretilir. Daha sonra Aloe suyu filtre edilerek lifli materyallerden ayrılır. Bu işlemde sonra suya koruyucular, tatlandırıcı, yardımcı maddeler ve/veya renklendiriciler eklenir. Bundan sonra alifatik polar solüsyon carrisyn izole etmek için eklenir. Daha sonra steril edilip liyofilizasyon ile kurutulur. Aloecorp tarafından geliştirilen bu proseste taze hasat edilmiş yapraklar 5C⁰ sıcaklıkta ve vakum altında mikrobiyal sayıcı ile gıda olarak ayrılırlar. Konsantre edilmiş jel dondurularak kurutulur^{9,12}. Agarwala(1997) tarafından geliştirilen yöntem ile; iç jelin yapraklardan ayrılması proseslerinden ayrı olarak, tüm yapraklardan manuel yada makine ile iç jel ayrılır. İki prosestede yapraklar kesildikten sonra hızlı şekilde işlem merkezine taşınır ve yapraklar yıkandıktan sonra ısıtma fişısına konulur. Isıtma iki yol ile yapılır; düşük sıcaklıkta uzun süre veya yüksek sıcaklığa kısa süre maruz bırakılır. Isıtma işleminden sonra elde edilen bulamaç üzerine basınç uygulanır. Daha sonra aktif kömür katılır. Berraklığı sağlamak için filtreden geçirilir^{9,12}.

Bugün, aloe jelinin besinlerde ve içeceklerde katkı maddesi olarak, nemlendirici olarak, kozmetikte ve ilaçlarda yara iyileştirici olarak ticari kullanımı vardır. Bu etkileri yüksek molekül ağırlıklı bileşenlere bağlanmaktadır. Pozitif etkilerin yanı sıra, negatif etkiler de söz konusudur. Ticari olarak hazırlanmış *Aloe vera* jelinin in vitro insan normal ve tümörlü hücrelerinin büyümesinde toksik etkileri saptanmıştır²⁵. Bu etkiden **antrakinonların** sorumlu olduğu bulunmuştur²⁶. Antrakinonların büyük bölümü, deri iritasyonu, eritem, yüksek hücre proliferasyonuna neden olabilmektedir ve oksidatif mutajenlere duyarlı Salmonella türlerinde mutajenik olarak bulunmuşlardır²⁷. Kinonlar bu etkilerini büyük olasılıkla proteinlerin tiyol gruplarına bağlanarak ya da aktive oksijen türlerinin üretilmesi yoluyla gösterirler. Çoğunlukla, mutajenik etki, hidroksi antrakinonlara metabolik olarak çevrilme ile açığa çıkar. *Aloe vera* jelinin toksik etkileri de yapraklardaki **düşük moleküler ağırlıklı, aloin** (aloe-emodin antrakinonuna ait glikoziti) gibi bileşenlerin oksidasyon ile oluşur. Aloin sıçanlarda oral uygulama sonrasında, kalın bağırsakta aloe emodine dönüşür, bu kinon yapısal özellikleri açısından karsinojendir. Aloin bugüne dek, aloe türlerinin purgatif etkinliğinin kaynağı olarak kabul edilmiştir. IASC (The International Aloe Science Council) piyasada satılan ve oral olarak kullanılan Aloe vera jel içeriğinde 5 ppm'den fazla aloin veya 50 ppm'den fazla total antrakinon bulunmaması istenmektedir⁹.

1,8-dihidroksiantrakinonlar, laksatifler gibi pek çok bitki kaynaklı ilaçların aktif bileşikleridir. Aloe'ler de antrakinon taşıyan bitkisel ilaçlar arasındadır. Laksatiflerin yaygın kullanımı ya da suistimali ile ilgili dihidroksi antrakinonların olası toksik ve tümörejenik etkinlikleri, 1,8-dihidroksiantrakinon dantron (kirazin)'nun sıçanlarda intestinal tümör insidansı ve farelerde karaciğer tümörlerini arttırması bu maddelere dikkat çekmiştir. İnsanlarda kolorektal kanser için artan risk 1,8 dihidroksiantrakinon içeren laksatif suistimali yapanlarda saptanmıştır, ancak diğer çalışmalar bu sonucu doğrulamamıştır.

Doğal olarak bulunan **1,8 dihidroksi antrakinonların** ve bazı metabolitlerinin mutajenik ve genotoksik etkinlikleri tartışılmaktadır. Hem pozitif hem de negatif sonuçlar bulunmaktadır. Antrakinonlar arasında bulunan **emodin** (1,3,8-trihidroksi 6-metil antrakinon), **dantron** ve **aloe-emodin** (1,8-dihidroksi 3-hidroksimetil antrakinon) ekzojen metabolik aktivasyon olmadan memelilerde genotoksik etkinliği saptanmıştır. 1,8-dihidroksi antrakinonların ağızdan alımı ile intestinal alım söz konusudur, konjugatların üriner atılımı vardır ve belirgin enterohepatik dolaşım gösterilmiştir. Dolayısıyla bu bileşiklerin karaciğerde sitokrom P450'ye bağlı biyotransformasyonu, toksik ara metabolitlerin oluştuğu biyoaktivasyon yolağının göstergesi kabul edilebilir ²⁸. Dolayısıyla genetik polimorfizm toksisitede önemli rol oynayabilir. Emodinin metabolitleri genotoksik iken, **krizofanolün** (1, 8-dihidroksi 3-metil antrakinon) biyotransformasyonu ile oluşan aloe-emodin, krizanofanolden daha genotoksiktir ²⁹.

Yapılan araştırmalarda, jelin yapısındaki bu düşük moleküler ağırlıklı antrakinonlar ayrıldıktan sonra, hücre kültürlerinde gözlenen toksisitenin de geriye döndüğü bulunmuştur. Dolayısıyla toksisiteden bu bileşikler sorumlu tutulmaktadır.

2.1.2. Aloe vera kullanımına bağlı olarak gelişen toksisite

Aloe vera, potansiyel olarak 75 aktif bileşik içermektedir: vitaminler, enzimler, mineraller, şekerler, lignin, lektin benzeri bileşikler, saponinler, salisilik asit, amino asitler içerir. Antrakinonlar arasında aloin, barbaloin, isobarbaloin, antranol, aloetik asit, sinnamik asit ester, aloe-emodin, emodin, krizofonik asit ve resistannol içermektedir ³⁰. Bu kadar çok çeşitlilikte madde içeren *Aloe vera*'nın farmakolojik ve toksikolojik etkileri yönünden incelenmesinde, hem bitkisel karışımından hem de tek tek içerik

maddeleri yönünden araştırılmaları yapılmaktadır.

Aloe vera'nın hayvanlara veya insanlara toksisitesinin belirlenmesine yönelik bir çok çalışma mevcuttur. Tek veya tekrarlayan dozlarda, *Aloe vera* içeriklerinden olan asemannanın farelere ve köpeklere intraperitoneal ve intravenöz uygulamaları, farelerde aktivitede azalmaya, anormal yürüyüş ve davranış bozukluklarına, sarkık vücut tonuna, piloereksiyona, titremeye sebep olurken, köpeklerde, kusma, abdominal disfonksiyon, aktivitede azalma, diyare olarak toksik etkiler göstermiştir ³¹. Ticari asemannan karışımlarının oral verilmesinin incelendiği diğer bir çalışmada ise, sıçanlarda, kanamalar, büyümüş böbrekler, piyelonefrit gözlenmiştir ³². *Aloe vera*'nın yaprak ekstraktlarının 500 mg/kg, 1 g/kg, 3 g/kg dozlarda oral gavaj yoluyla verildiği fare çalışmasında, 1 ve 3 g'lık dozlarda, 24 saatlik gözlem sonucunda santral sinir sistem aktivitesinde azalma göze çarpmıştır. 90 günlük 100 mg/kg'lık dozların içme suyu ile verildiği devam çalışmasında da, vücut ağırlığında ve hayati organ ağırlıklarında azalma, kırmızı hücre sayısında düşme, spermatogenik disfonksiyon ve kontrol grubuna göre %30'luk fazladan ölüm oranı saptanmıştır ³³. *Aloe vera* jelin sıçanlarda 110 mg/kg/günlük dozlar ve üstünde sindirim yoluyla tüketiminde ise diyare, büyüme geriliği, polidipsi ve poliüre oluşturduğu gözlemlenmiştir. Daha uzun süreli çalışmalar *Aloe vera* jel tüketiminin kalsiyum metabolizması ile etkileştiğini göstermektedir ^{34,35}.

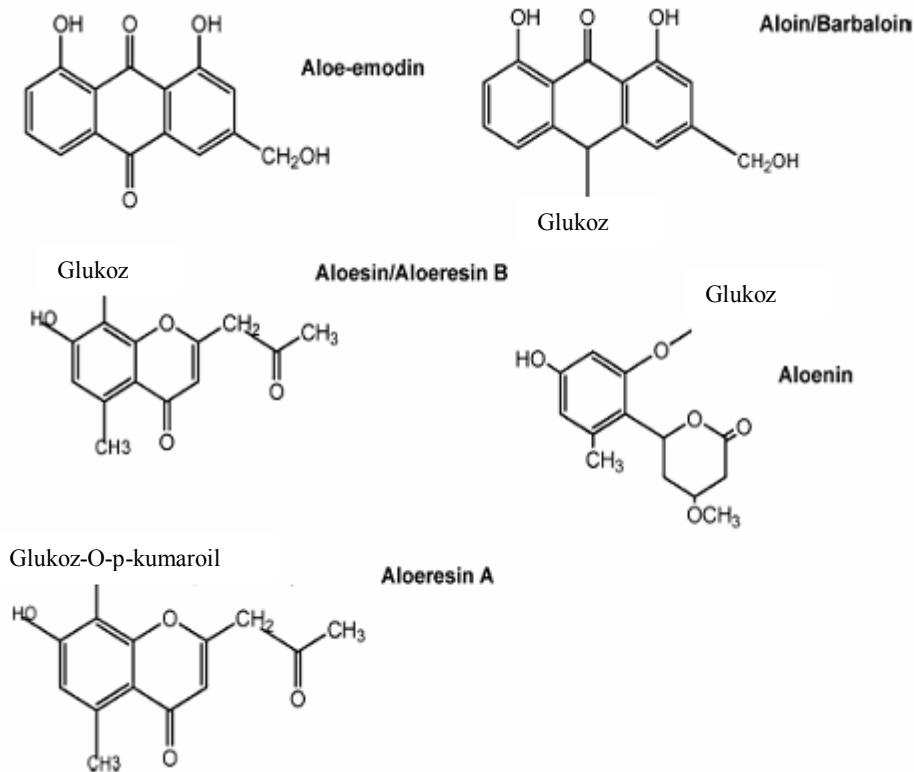
Bir kadın hastayı konu olan bir vaka kontrol çalışması da literatürde mevcuttur. Buna göre, *Aloe barbadensis* Miller ekstratlarını içeren 500 mg'lık tableti 4 hafta boyunca kullanan bir kadın hastada, ilerleyen sarılık, pruitus, akolik bağırsak hareketleri ve abdominal rahatsızlıklar rapor edilmiştir ³⁶. Karaciğer biopsisinde, lenfosit, plazma hücreleri, granulositlerin portal ve asinar infiltrasyonu ile birlikte ağır akut hepatit, nekroz ve bilirubinostasis saptanmış olup, tabletlerin alımının kesilmesinden bir hafta sonra şikayetler düzelmiştir.

Aloe vera ile ilaç etkileşimleri olabileceği de rapor edilmiş olup, *Aloe vera*'nın prostaglandin sentezini azaltarak, plateletlerin ikincil agregasyonunu inhibe edebileceği belirtilmektedir. Çalışmalar, *Aloe vera* jelin prostaglandin sentezini %48 oranında azalttığını, indometazin için bu değerin %63 olduğunu ortaya koymuştur ³⁷.

1,8-dihidroksiantrakinonlar farmakolojik olarak laksatif etkisi saptanmış bileşiklerden olup, karsinojenik etkileri hakkında da çeşitli yayınlar mevcuttur. 1,8-

dihidroksiantrakinon ve dantronun rodentlerde karsinojenik olduğu gösterilmişken^{38,39}, DNA ile interşelasyon yaptığına dair bilgiler de mevcuttur^{40,41}. 1,8-dihidroksiantrakinonlardan emodin, aloe-emodin ve dantronun topo II aktivitesini (topoisomerez II) inhibe ederek kromozomal DNA kırıklarına yol açtığı saptanmıştır^{26,42,43}.

Aloe vera jelin düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonunun (LMWF) sitotoksitesinin araştırıldığı bir yayında, tek tabaka tavuk fibroblastları LMWF'ye maruziyeti sonucunda, hücreiçi bağların bozulmasını ve yüzeylere hücre yapışkanlığının azalmasını indüklediği, hücre tabakasında ise hücre içermeyen boşluklar oluşturduğu görülmüştür. Araştırmacılar, *Aloe vera* jelin düşük moleküler ağırlıklı toksik bileşikler içerdiğini ve ticari preparatlarda bu moleküllerin uzaklaştırılması gerektiği sonucuna varmışlardır²⁵.



Şekil 2: Aloe türlerindeki ana antrakinon bileşikleri

Aloe vera ekstratlarının kullanımının UVA ışınına maruz kalanlarda genotoksisite yönünden araştırıldığı başka bir çalışmada da, DNA onarımının eksik olduğu mutant *Escherichia coli* ve plasmid DNA'dan faydalanılmıştır. Bakteriyel transformasyon, hayatta kalma süresi ve agaroz jel elektroforezinden elde edilen sonuçlar, *Aloe vera*'nın genotoksik etkileri olduğu hakkında görüşleri desteklemektedir⁴⁴.

Ticari *Aloe vera* jel preparatlarının normal insan hücresi ve tümör hücresi büyümesi üzerine in vitro toksik etkilerinin olduğu da rapor edilmiş olup^{45,46}, antrakinonların varlığı bu etkiden sorumlu tutulmuştur. Bir çok antrakinonun deri iritasyonu, eritem ve yüksek hücre proliferasyonuna yol açtığı, oksidatif mutajenlerin bir çok türüne duyarlı *Salmonella* türlerine mutajenik olduğu saptanmıştır^{47,48}. *Aloe vera* yapraklarında da bulunan aloin adlı maddenin sıçanlara oral olarak verilmesi durumunda, kalın bağırsakta aloe-emodine dönüştüğü ve tam karsinojenik etkisi olduğu görülmüştür^{49,50}.

Aloe vera bileşiklerinin hücre proliferasyonu üzerine stimulator etkilerinin bulunabileceğine dair çeşitli raporlar bulunmakla birlikte^{46,51} bu etkiden sorumlu kimyasalların tespiti henüz yapılabilmemiş değildir. *Aloe vera*'daki lektin benzeri bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerine hem stimulator hem de inhibitör etkileri olduğu belirtilmektedir. Lektinler, non-immun orijinli glikoproteinler olup, eritrositleri in vitro olarak aglutin etme kabiliyetine sahiptir. Baskılanmış büyüme, diyare ve besin maddelerinin emilimini bozma gibi etkiler bu sınıf toksikanlar ile ilişkilendirilmektedir. Bütün lektinler toksik olmamakla birlikte, her lektin türevinin toksisite şiddeti de farklı olmaktadır. Lektinler hücre membranı yapısında yer alan polisakkarit, glikoprotein, glikolipit, serbest ya da bağlı şekerlere bağlanabilmektedir. Deney hayvanlarına oral olarak verildiklerinde, gastrointestinal yolda yer alan mukoz membranlarla etkileşmekte ve akut gastrointestinal semptomlar, büyüme geriliği ve hatta ölüme yol açabilmektedir⁹.

Aloe vera jel preparatlarında da yüksek seviyelerde lektin benzeri bileşiklerin var olduğu çalışmalarca saptanmıştır⁴⁵. Taze yaprak fraksiyonlarının normal insan hücrelerinin büyümesini tetiklediği saptanmışken, ticari olarak bulunan *Aloe vera* jel

fraksiyonlarının normal insan ve tümör hücrelerine eşit seviyede sitotoksik olduğu görülmüştür. *Aloe vera* jel ekstraktlarının fibroblastlar ve nöron benzeri hücrelerde proliferasyonu indüklediği saptanmıştır ⁵². *Aloe vera* jel ekstratları ile yapılan laboratuvar çalışmaları hücrelerin matrikse bağlanmasını ve büyümesini tetiklediğini gösterirken, benzer etkiler ticari *Aloe vera* jel preparatları ile yapılan çalışmalarda elde edilememekte, hücre bağlanmasının büyümesini bozan etkilerin, üretim tekniğinden ya da üretim sırasında eklenen diğer kimyasallar nedeniyle olabileceğini ortaya koymaktadır ⁴⁶.

Bu muhtemel toksik etkilerin yanı sıra klinik bazı araştırmalarda *Aloe vera* ve *Aloe vera* jelin çeşitli düzeyde farmakolojik etkilerinin de olduğu ortaya konulmuştur. Hem geleneksel tedavide kullanılan hem de deneysel olarak belirlenen tıbbi farmakolojik etkiler, en çok yara iyileştirici özelliği ve diyabeti tedavi etme etkisi üzerinedir ⁵³⁻⁶⁴.

2.2. Moleküler Biyogöstergeler

Moleküler biyogöstergelerin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması ekonomik olmaları, hızlı ve kesinlikleri nedeniyle avantajlar sağlamaktadır. Epidemiyolojide hastalık insidansını kontrol eden faktörlerin çalışılması için çok sayıda birey ve uzun bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Biyogöstergeler, hastalığa neden olan maruziyeti göstermesi, hastalık gelişiminin erken dönemde belirlenmesi ya da bireysel duyarlılığın değerlendirilmesi için kullanılabilen ölçülebilir değişkenlerdir ⁶⁵.

Moleküler epidemiyoloji yaklaşımı, hastalığın sebep bilgisinin araştırılması, çevresel ve mesleki karsinojenlere maruz kalan bireylerin kanser riskinin belirlenmesi, kansere neden olan iç faktörlerin ya da koruyucu faktörlerin değerlendirilmesinde büyük bir güce sahiptir ⁶⁵.

Biyogöstergeler ile DNA ya da proteinlere kimyasal katım ürünleri doğrudan ölçülebildiği gibi, bir takım biyogöstergeler de karsinojenik bileşiğe maruziyeti özgül olmayan yolla yansıtırlar. Örnek olarak DNA kırıkları ve kromozom aberasyonları, birçok farklı hasar türünden meydana gelebilir, fakat genotoksik maruziyetin kullanışlı bir göstergesidir ⁶⁵.

Sitogenetik biyogöstergeler ise insan biyoizleme çalışmalarında ve çevresel, mesleki ve genomik kararlılık üzerindeki tıbbi faktörlerin etkilerini incelemek için en fazla kullanılan biyogöstergelerdir⁶⁶.

2.2.1. Genotoksisite Testlerinin Kullanım Alanları

Genotoksisite testleri, çevresel ve kimyasal maruziyetlerde DNA ya da kromozom hasarına neden olan bileşiklerin ve yaptıkları hasarın belirlenmesinde, etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır⁶⁷. Ayrıca genotoksisite testleri, ilaçların ve kimyasalların klinik öncesi güvenlik çalışmalarında kullanılmaktadır⁶⁸. Genotoksisite ve karsinogenezis verilerinin kapsamlı incelemeleri genotoksisite testlerinin karsinogenlerin tespitinde yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir⁶⁹.

2.2.2. Comet Yöntemi

DNA kırıkları DNA'ya hasar verici ajanların spesifik olmayan göstergesidir. Genetik materyal üzerinde kimyasal ya da fiziksel ajanların yarattığı etkiler iki şekilde ortaya koyulabilmektedir. Bunlardan ilki, gen frekansını etkileyerek popülasyonların genetik yapısı üzerinde seçici bir baskı oluşturabilmekte ya da mutasyon gibi DNA üzerinde etkisi oldukça büyük-köklü değişiklikler yapabilmektedir. DNA oluşmuş hasarının saptanmasında yararlanılan metotlar hedef büyüklüğüne göre 2 kategoriye ayrılırlar: a) kromozom seviyesinde görülebilir etkiler (makro ölçekli) ve b) gen seviyesinde etkili değişiklikler (moleküler veya DNA seviyesinde). Gen düzeyinde DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan single cell gel electrophoresis (SCGE(tek hücre jel elektrofoorezi)) veya diğer adıyla Comet yöntemi, pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyoizleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur^{70,71}. Başta memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan Comet tekniği günümüzde pek çok canlıda pek çok hücre türüne uygulanabilmektedir⁷².

Tekniğin temelinde, iyonize radyasyon ve bazı kimyasallar doğrudan kırıklara neden olurlar. Kırıklar aynı zamanda hasarlı baz ya da nükleotidin kesildiği hücresel onarım sırasında geçici ara ürünler olarak oluşabilir. Hasarlı bazın ayrılması sırasında geride apuridik/aprimidinik bölge kalır ya da AP bölge akabinde AP endonükleaz ile kırığa çevrilir. AP bölgeleri alkali-karasıdır. DNA kırıklarını ölçmede

kullanılan birçok metot yüksek pH' da inkübasyon içermektedir. Bu nedenle AP bölgelerini serbest kırıklardan ayırmak imkansızdır. Kırıkları (ve AP bölgelerini) ölçmede kullanılan en gözde metotlardan birisi comet yöntemidir. Bu yöntemde lenfosit gibi hücre süspansiyonu lam üzerindeki ince agaroz tabakaya gömülür. Membranlar, sitoplazma ve hücre çekirdeğinde bulunan çok miktarda proteinin uzaklaştırılması için deterjan ve yüksek tuz içeren çözelti ile muamele edilir. Bu DNA'nın nukleotid olarak bilinen supercoiled (helikslerin kendi içerisinde heliks olacak şekilde sıkışması) halka olarak sıkıca bağlı nükleozomlardan çözünmesini sağlar. pH 13' te çözülme periyodundan sonra aynı PH' da jele elektroforez uygulanır. DNA anoda çekilir fakat supercoiled DNA hareket etmez. Kırık içeren halka ise gevşemiştir ve nükleotid baştan çekilerek kuyruk oluşturur ve kuyruklu yıldız andıran görünüme kavuşur. Kuyrukta bulunan DNA miktarı DNA kırıklarının frekansını yansıtır ve ölçüme olanak sağlar⁷³.

Bu yöntem hızlı, basit, duyarlı ve ekonomik olma avantajına sahiptir. Comet testinin diğer avantajları farklı doku ve hücre tiplerinde uygulanabilmesi, düşük miktardaki DNA hasarını tespit etmede duyarlı olması ve örnek başına az miktarda hücre gerektirmesidir⁷⁴.

Comet yönteminin alkali şekliyle kol kırıkları, alkali-kararsız bölgeler, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları tespit edilebilir. Diğer DNA değişimlerinden farklı olarak çapraz bağlar kromozomal DNA' yı kararlı hale getirerek DNA göçünü engelleyebilir. Artmış DNA göçü DNA kol kırıklarının ve/veya alkali kararsız bölgelerin indüklenmesinin göstergesidir. Ayrıca kesip çıkarma onarımının aktivitesinin artması karmaşık bir şekilde DNA göçünün artmasına neden olabilir. DNA onarımı DNA lezyonlarını bertaraf ederek DNA göçünü azalttığında, devam eden kesip çıkarma onarımı kesim-ilintili DNA kol kırıklarına bağlı olarak DNA göçünün artmasına neden olabilir. Kesip çıkarma onarımının comet testine etkisi DNA hasarının tipine ve analiz zamanına bağlıdır⁷⁵.

Comet testinde etkiye neden olan DNA lezyonları sadece kromozom aberasyonlarına neden olan kırıklar değildir, bundan başka, abazik bölgeler (AP bölgeleri) gibi DNA değişiklikleri gen mutasyonlarının artması ile de ilişkilidir. Bununla birlikte comet testinde saptanabilen esas lezyonlar kalıcı genetik değişimlere neden olmadan doğru şekilde onarılabilir⁷⁶.

Uygulamaya bağlı olarak Comet yönteminin az sayıda kısıtlayıcısı bulunmaktadır. DNA tek sarmal kırıkları gibi hızla onarıma giden kısa ömürlü DNA lezyonları örnekleme zamanına bağlı olarak kaybedilebilmektedir. Bu lezyonların

yakalanabilmesi için 2-6 saat aralığında örnek hazırlamayı sağlayan çalışma tasarımı gerekmektedir. Comet yöntemi gibi DNA kol kırığı analizlerinde Sitotoksositeye bağlı dolaylı mekanizmalar artı yönde etkide bulunabilmektedir. Buna rağmen diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında ölü ya da ölmekte olan hücreler baş bölgesinin kaybolması ile tanımlanabilmektedir⁷⁶.

Comet yönteminde bakteriyel glikozilaz/endonükleaz enzimleri ile inkubasyon yaparak oksidatif DNA hasarı, alkilasyonlar ve ultraviyole ile indüklenmiş ürünler gibi geniş bir sınıfı ek DNA göçü olarak tespit etmek mümkündür⁷⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sunulan çalışmada, *Aloe vera* jelin ticari preparatının muhtemel genotoksik etkilerinin araştırılması, farelerde Comet yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla eşit sayıda yetişkin Balb/c tipi, dişi ve erkek farelerden faydalanılmıştır. Fareler deney ortamına alışmaları için en az 2 hafta önceden çalışmanın yapılacağı ortama alınmışlardır. Fareler tartılarak gruplar arası ağırlıkları homojen olacak şekilde biri kontrol olmak üzere dört gruba bölünmüştür. Her doz grubunda etik kurul tarafından kullanımı uygun görülen sayı olan 10 fare 5 erkek 5 dişi olacak şekilde 2 ayrı kafese ayrılmış, toplamda 8 kafes oluşturulmuştur. Kafesler sıcaklık kontrolünün sağlandığı 12 saat gece/gündüz ışık döngüsünün ayarlı olduğu ortamlarda tutulmuş olup, farelere yem ve su kısıtlamasında bulunulmamıştır. Kafeslere aynı yem verilmiş, içme suları günlük olarak yenilenmiştir. Kafesler haftada 2 defa temizlenmiştir.

Tablo 4: Çalışmadaki Deney hayvanları dağılımı ve doz grupları

	Kontrol	Grup 1 Önerilen dozun yarısı “doz/2”	Grup 2 Önerilen doz “Doz”	Grup 3 Önerilen dozun iki katı “Dozx2”
Sayı	5 Dişi 5 Erkek	5 Dişi 5 Erkek	5 Dişi 5 Erkek	5 Dişi 5 Erkek

Tablo 5: Çalışmada yer alan deney hayvanları ağırlıkları

Fare ağırlıkları	Gün	7.Gün	14.Gün	
Kontrol				
Erkek	37,6	37,6	38,6	p<0.05
Dişi	36,4	36,2	35,2	p<0.05
Doz/2				
Erkek	37,6	37,6	38,6	p<0.05
Dişi	35,4	35,2	35,4	p<0.05
Dozx1				
Erkek	38,6	39	39,4	p<0.05
Dişi	37,1	37,4	37,8	p<0.05
Dozx2				
Erkek	37,3	38,5	38,6	p<0.05
Dişi	36,6	36	38,4	p<0.05

3.1.Farelere *Aloe Vera* Jelin Uygulanışı

Deney grubundaki farelere *Aloe vera* jelin, üretici firma tarafından tavsiye edilen günlük insan dozu olan 90 ml, bu dozun yarısı ve 2 katı, hayvan ağırlıklarına göre yeniden hesaplanarak uygulanmıştır. Deney grubunda bulunan farelere 14 gün boyunca ve günde 1 kez olmak üzere *Aloe Vera* jel intragastrik gavaj ile oral yoldan uygulanmıştır, kontrol grubuna ise aynı hacimde yine intragastrik gavaj yoluyla distile su verilmiştir.

3.1.1.Farelerden kan alma işlemi

Farelerden kan alımı deney hayvanı sertifikasına sahip uygulayıcı tarafından gerçekleştirilmiştir. Kan alma işleminde 1ml' lik ince uçlu enjektör kullanılmıştır. Farelerden farklı günlerde (1, 7, 14) kan alımı gerçekleştirilmiştir.

Fareler, kan alımı işleminden önce tartılmış, kan alımı 10-12.00 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Fareler kuyruk veninden kan almak için özel hazırlanmış aparey içerisine konularak, kuyrukları ılık suya batırılmış ve damarların genişlemesi sağlanmıştır. Heparinle yıkanmış İnsülin enjektörü yardımı ile 0.1 ml kan alımı gerçekleştirilmiştir. Alınan kanlar kodlanarak, kan alımının bitimi sonrasında derhal laboratuvarımızda işleme sokulmuştur.

3.2.COMET YÖNTEMİ

3.2.1.Test İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Fosfat Tampon Tabletleri (PBS, Amresco E404)
- Fitoll Separating Solution
- Yüksek Kaynama Dereceli Agar (HMA, Amresco X174)
- Düşük kaynama Dereceli Agar (LMA, Amresco 0815)
- Sodyum Klorür (Amresco X190)
- Sodyum Hidroksit (Amresco 0583)
- Trizma Baz (Amresco 0826)
- EDTA (Amresco 0105)
- Dimetilsülfoksit (Amresco 0231)
- Triton X-100 (Amresco 0694)
- Etidyum Bromid (Amresco 0492)
- HCl (Merck 100317)

3.2.2.Test İçin Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Dijital üstten kefeli terazi (Sartorius)
- Hassas terazi (Shimadzu)

- pH metre (Sartorius)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich)
- Elektroforez tankı (Cleaver)
- Otomatik mikropipetler (Thermo)
- Çeşitli hacimlerde pipet uçları (Corning)
- Mikrodalga fırın (White-Westinghouse)
- Sıcak blok (Thermo)
- Buzdolabı (Regal)
- Traşlı lam (Menzel)
- Lamel (Superior)
- 1.5 ml ependorf tüpü (Corning)
- Plastik pastör pipeti (LP Italiana)
- Cam şale (Superior)
- Vorteks (Boeco)
- Kamera ve bilgisayar analiz sistemli, floresan ataçmanlı mikroskop

(Zeiss)

3.2.3. Teknik İçin Kullanılan Çözeltiler

- Fosfat Tamponu (PBS)
PBS tableti distile suda çözülür ve buzdolabında saklanır.
- Düşük kaynama dereceli agar (LMA)
0.65g LMA 100ml PBS içinde mikrodalgada çözülür. Hazırlandıktan sonra kullanılabileceği kadar 37°C’de bekletilmelidir.
- Yüksek kaynama dereceli agar (HMA)
% 0.65’lik HMA distile suda hazırlanır. Lamlar agara batırılır, arkası silinerek oda sıcaklığında kurutulur
- Stok lysing çözeltisi
2.5 M NaCl.....146.4 g
100mM EDTA.....37.2 g
10mM Tris.....1.2 g

Distile su ile 900 ml’ye tamamlanır. Çözeltinin pH’sı 10M’lık NaOH ile 10’a ayarlanır.

1000 ml'ye tamamlanır, +4 °C'de saklanır.

○ Lysing Çözeltisi

Stok Lysing çözeltisi89 ml

Triton X-100 (%1)1 ml

DMSO (%10)10 ml

Na Sarkosinat 1gr

Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

○ Elektroforez tamponu

10 M NaOH37.5 ml

5M EDTA 6.75 ml

Distile su ym 1250 ml

○ Nötralizasyon Tamponu

0.4 M tris HCL..... 97 g

Tartılıp distile su ile 2000 ml'ye tamamlanır. Çözeltinin pH'sı 1N HCl ile 7.5'e ayarlanır. Oda ısısında saklanır.

○ Stok Boyama Çözeltisi

10 mg Etidyum bromür 50 ml distile suda çözülür. Çözelti şişesi alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklanır.

○ Dilüe Boyama Çözeltisi

Stok boyama çözeltisi 1/6 oranında distile su ile seyreltilir. Çözelti şişesi alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklanır.

3.2.4.Tekniğin Uygulanışı

Lamların hazırlanması

Rodajlı lamlar, ısıtılarak sıvı hale getirilmiş %1'lik HMA (+80°C) ile kaplanarak oda ısısında bir gün kurumaya bırakılır.

Hücrelerin hazırlanması

Farelerden alınan yaklaşık 100 µl'lik kanın 20µl'lik kısmı iki ayrı ependorf tüpüne aktarılır ve PBS ile 100µl'ye seyreltilir. Geri kalan kan deney sonuna kadar, deney aşamasında herhangi bir hata olması durumunda deneyi yinlemek amacıyla +4°C' de buzdolabında saklanır. Hücrelerin üzerine ısıtılarak sıvı hale getirilen %0.5'lik LMA'dan (37°C) 100µl ilave edilip, agar katılaşmadan hemen pipetaj yapılarak hücrelerle karıştırılır. Bu karışımdan daha önceden HMA ile kaplanan lam üzerine ilave edilerek lamelle kapatılır. Tüm işlemler DNA'da ekstra hasar oluşmasını önlemek için özel olarak çok az miktarda sarı ışıkla aydınlatılmış ortamda gerçekleştirilir. Agar katılaşıp lama sabitleninceye kadar +4°C' de bekletilir. Buzdolabından çıkartılan lamların üzerindeki lameller kenarından dikkatlice çekilerek cam şaleye konulur. Lysing çözeltisi tüm lamları kaplayacak şekilde ilave edilerek kapağı kapatılır ve bir gece +4°C' de bekletilir.

Elektroforez ve Boyama

Lysing çözeltisinde en az 1-1.5 saat veya bir gece bekleyen lamlar çözeltiden alınır ve elektroforez çözeltisiyle doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilir. Lamlar bu çözelti içinde DNA çift sarmalının açılması amacıyla 20 dakika bekletilir. Bu işlem sonunda elektroforez tankı 25 V ve 300 mA'de 20 dakika bekletilir. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesi sağlanır.

Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan lamlar, kuru bir zemin üzerine alınır. Oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı

uzaklaştırmak amacıyla lamalar n6tralizasyon tamponuyla 3 kez 5'er dakika yıkanır. Bu işlem sonrasında her preparat 6zerine floresan renk vermesi i6in etidyum brom6r 66zeltisi damlatılarak lamelle kapatılır ve iyice boyanması i6in 15-20 dakika bekletilir. Bu işlemlerin t6m6 DNA'da fazladan hasar oluşmasını engellemek i6in sarı ışık ile aydınlatılmış ortamda ger6ekleştirilir.

Lamların Değerlendirilmesi

Lamlar boyandıktan sonra her birey i6in paralel olarak hazırlanan iki preparattan rastgele 100 h6cre se6ilerek x20 b6y6tmeli 515-560 nm eksitasyon filtreli, 100 W civa lambalı, Zeiss-Axioskop 2 marka floresan mikroskopla sonu6lar değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Piyasadan temin edilen *Aloe vera* jelin üretici firmasının önerdiği doz olan 90 ml/gün dozu için 70 kg insan değeri üzerinden hareket edilerek, fare ağırlıkları gözönünde bulundurularak doz hesaplamaları yapılmıştır. Üretici firmaca prospektüs üzerinde yazılı olarak önerilen dozun yarısı (doz/2), önerilen doz (doz) ve önerilen dozun iki katı doz (doz $\times$ 2) uygulanan deney hayvanlarından elde edilen comet testi sonuçları, kontrol grubu sonuçları ile birlikte bu bölümde sunulmaktadır.

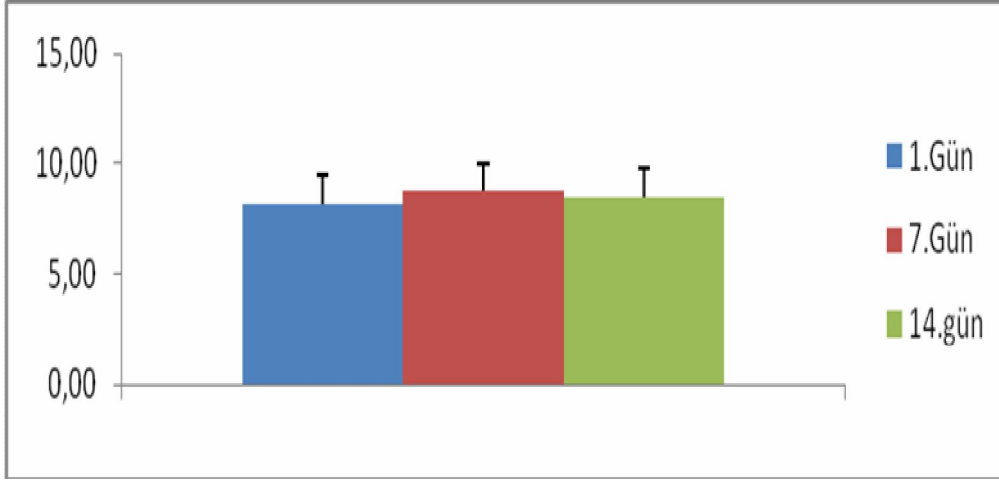
4.1 Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.1 Kontrol grubu ile yapılan çalışmalar

Çalışmamızda kontrol grubunu oluşturan 5 dişi 5 erkek fareye günlük beslenmeleri dışında sadece su verilerek bu farelerden de çalışmamızın 1.,7. ve 14. günlerinde kuyruk veninden kan alınarak % Kuyruk yoğunlukları saptanmış ve elde edilen değerler *Aloe vera* jel uygulanan farelerden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmaya çalışılmıştır. Kontrol grubu deney hayvanlarında 1,7 ve 14. gün de alınan kanlardan elde edilen %kuyruk yoğunluğu sonuçları Tablo 6 da sunulmuştur.

Tablo 6: Kontrol grubu deney hayvanlarında 1,7 ve 14. Gün %kuyruk yoğunluğu sonuçları

Kontrol Grubu	1.Gün	7.Gün	14.gün
% Kuyruk yoğunluğu ortalaması	8,19	8,74	8,52
$\pm$ SS	1,3	1,29	1,29



Şekil 3: Kontrol grubunun 1,7 ve 14. gündeki % kuyruk yoğunluğu değerlerinin karşılaştırılması ($p>0.05$: her 3 günün karşılaştırılması)

Kontrol grubunu oluşturan deney hayvanlarının Aloe vera jel grubunda olduğu gibi uygulamaya başladığımız günlerden 1. 7. ve 14. günlerde alınan kan örneklerinden elde edilen % Kuyruk yoğunluğu değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında günler arasında anlamlı bir artış veya azalış saptanamamıştır ($p>0.05$). Bu amaçla Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testinden yararlanılmıştır.

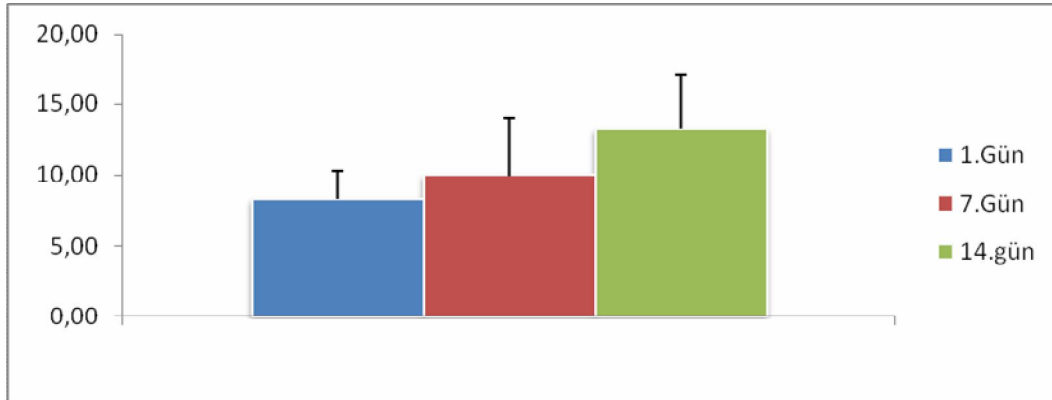
4.1.2 Aloe vera uygulanan gruplarda yapılan çalışmalar

4.1.2.1 Önerilen dozun yarısı uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi.

Üretici firmaca prospektüs üzerinde yazılı olarak önerilen dozun yarısı (doz/2) farelere gastrik gavajla ağırlıkları göz önüne alınarak verildiğinde 1., 7. ve 14. günlerde elde edilen % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları Tablo 7 de sunulmuştur.

Tablo 7: : Önerilen dozun yarısı “Doz/2” verilen farelerde 1,7 ve 14. Günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.

% kuyruk yoğunluğu			
Doz/2	1gün	7. gün	14. gün
1	8,08	12,24	6,59
2	9,78	19,03	10,83
3	6,30	9,19	13,08
4	12,82	13,47	13,12
5	8,49	8,31	9,48
6	6,51	6,66	13,75
7	8,71	7,08	19,66
8	9,11	7,33	13,07
9	6,27	5,73	17,93
10	7,09	10,76	15,27
Ortalama	8,32	9,98	13,28
±SS	2,01	4,05	3,83



Şekil 4: Önerilen doz/2 grubunda 7 ve 14. Günlerde comet testi ile ölçülen, % kuyruk yoğunluğu sonuçları ($p < 0.05$ 1.gün-14.gün karşılaştırılması).

Önerilen dozun yarısının uygulandığı çalışma bölümünde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında 1.gün ve 14. günlerde alınan sonuçlar arasında % kuyruk yoğunluğunda anlamlı olarak bir artış saptanmıştır ($p=0.0103$; $p < 0.05$) . 1. ve 7. günler karşılaştırıldığında ise bir farklılık saptanamamıştır (Tablo 8)

Tablo 8: Önerilen dozun yarısı verilen grupta Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları

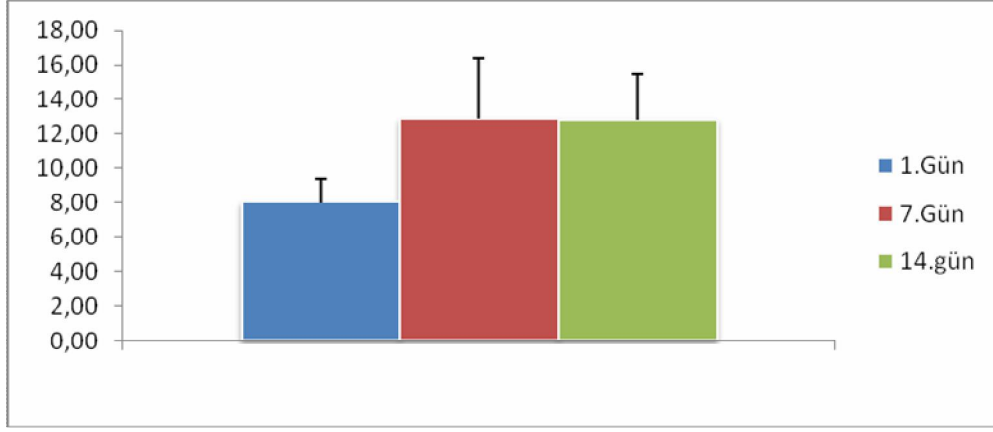
Doz	Ortalamalar arası fark	q	P
1.Güne göre 7.Gün	-1.664	1.538	P>0.05
1.Güne göre 14.Gün	-4.962	4.588	** P<0.05
7.Güne göre 14.Gün	-3.298	3.049	P>0.05

4.1.2.2 Önerilen doz uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Üretici firmaca prospektüs üzerinde yazılı olarak önerilen doz (doz) farelere gastrik gavajla ağırlıkları göz önüne alınarak verildiğinde 1., 7. ve 14. günlerde elde edilen % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları Tablo 9 de sunulmuştur.

Tablo 9: Önerilen Doz “Doz” verilen farelerde 1,7 ve 14. günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.

“Doz”	% kuyruk yoğunluğu		
	1	7	14
1	9,22	8,32	12,37
2	7,96	10,93	10,70
3	8,11	11,49	16,70
4	7,10	9,63	11,57
5	10,39	19,24	15,47
6	7,48	10,91	8,15
7	9,44	12,72	11,00
8	6,00	16,27	16,10
9	6,37	17,26	12,72
10	7,93	12,11	13,49
Ortalama	8,01	12,88	12,82
±SS	1,37	3,53	2,68



Şekil 5: Önerilen doz grubunda 7 ve 14. Günlerde comet testi ile ölçülen, % kuyruk yoğunluğu sonuçları ($p < 0,01$; 1.gün 7. gün ve 1.gün-14 gün karşılaştırılması)

Önerilen doz grubunun uygulandığı çalışma bölümünde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında 1.gün ve 14. günler ile 1. ve 7.günlerde alınan sonuçlar arasında % kuyruk yoğunluğunda anlamlı olarak bir artış saptanmıştır ($p < 0.01$) (Tablo 11). 7. ve 14 günlerde alınan kanlardaki comet değerlendirmesine göre bu 7. ve 14. günler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 10: Önerilen doz grubunda Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Doz	Ortalamalar arası fark	q	P
1.Güne göre 7.Gün	-4.879	5.752	** $P < 0.01$
1.Güne göre 14.Gün	-4.818	5.680	** $P < 0.01$
7.Güne göre 14.Gün	0.06100	0.07191	$P > 0.05$

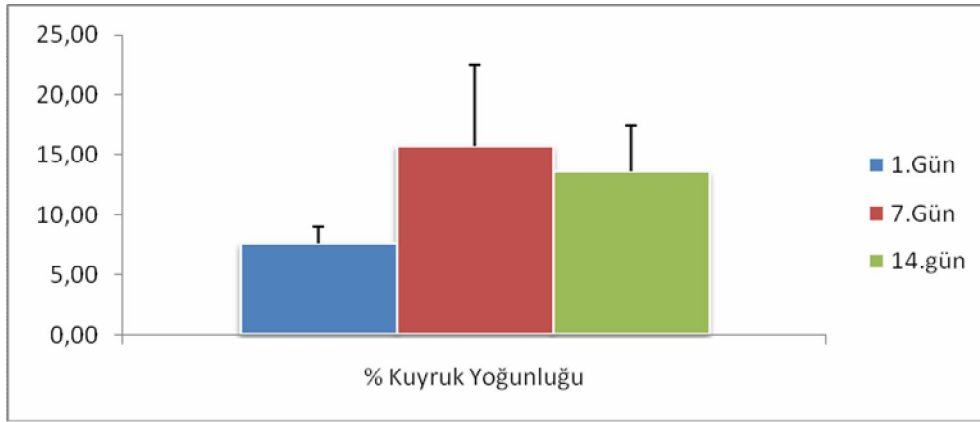
4.1.2.3. Önerilen dozun iki katı uygulanan deney hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

Üretici firmaca prospektüs üzerinde yazılı olarak önerilen dozun iki katı doz (doz $\times$ 2) farelere gastrik gavajla ağırlıkları göz önüne alınarak verildiğinde 1., 7. ve 14. günlerde elde edilen % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları Tablo 11 da sunulmuştur.

Tablo 11: Önerilen Dozun İki katı “Dozx2” verilen farelerde 1,7 ve 14. günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.

% kuyruk yoğunluğu			
DOZx2	1	7	14
1	9,15	19,84	15,02
2	8,40	10,44	10,55
3	8,41	14,43	10,21
4	8,25	8,66	17,79
5	8,23	6,11	17,41
6	6,89	18,78	13,56
7	5,60	13,11	8,92
8	7,20	17,18	11,57
9	6,03	19,60	10,38
10	7,65	29,28	20,35
Ortalama	7,58	15,74*	13,58**
±SS	±1,39	±6,72	±3,9

- *p<0,05 (1 ve 7. gün karşılaştırılması)
- **p<0,05 (1 ve 14. gün karşılaştırılması)



Şekil 6: Önerilen Dozun İki Katı Verilen Deney Hayvanlarında 1,7 ve 14. Günlerdeki % Kuyruk Yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları. (p< 0,01;1.gün 7. gün ve 1.gün-14 gün karşılaştırılması)

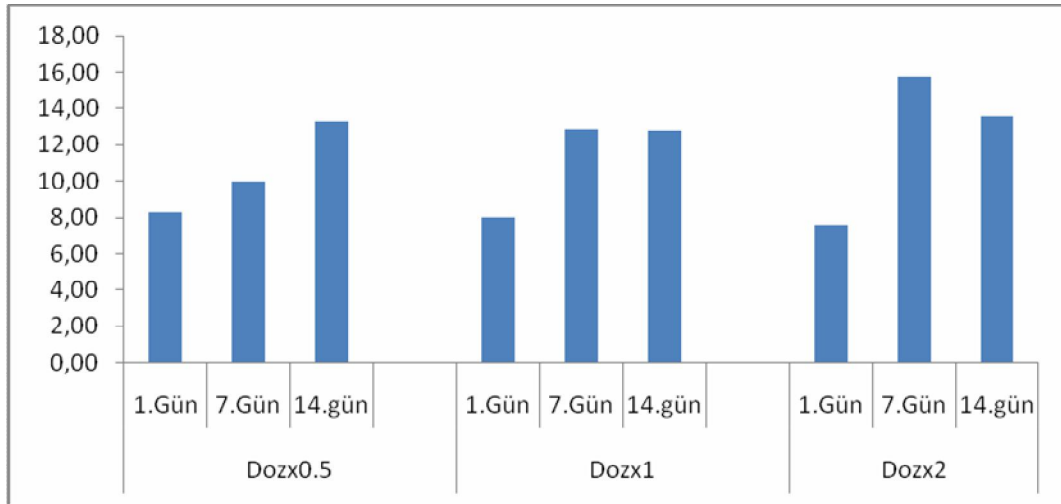
Önerilen doz grubunun iki katı doz uygulandığı çalışma bölümünde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında 1.gün ve 7.günlerde alınan sonuçlar arasında % kuyruk yoğunluğunda anlamlı olarak bir artış saptanmıştır (p=0.0012) (p<0.05) (Tablo 12)

Aynı istatistiksel anlamlılık 7. ve 14 günlerde alınan kanlardaki comet değerlendirmesinde de elde edilmiştir ($p<0.05$). Diğer yandan 7. ve 14. günler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 12: Önerilen dozun iki katı doz verilen grupta çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Doz	Ortalamalar arası fark	q	P
1.Güne göre 7.Gün	-8.162	5.696	** $P<0.01$
1.Güne göre 14.Gün	-5.995	4.184	* $P<0.05$
7.Güne göre 14.Gün	2.167	1.512	$P>0.05$

Çalışılan 3 doz grubundan elde edilen sonuçların özeti bir fikir oluşturması açısından grafikler halinde toplu olarak Şekil 7 da sunulmuştur.



Şekil 7: Doz gruplarında elde edilen % Kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.

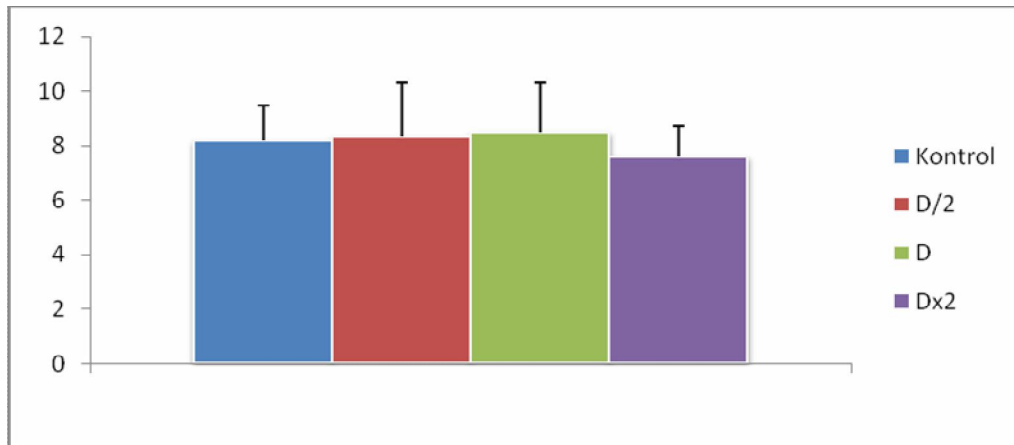
4.1.3. Önerilen doz, yarısı ve iki katı doz uygulanan deney hayvanlarında ve kontrol grubu hayvanlarında comet testi sonuçlarının değerlendirilmesi

4.1.3.1. 1.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

Kontrol grubunu oluşturan farelerden elde edilen 1. gün sonuçları ile “D/2” doz grubu, “Doz” doz grubu ve “Dozx2” doz grubundan elde edilen 1. gün sonuçları % Kuyruk yoğunluğu değerleri gerçekleştirilen Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir artış veya azalış saptanamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 13, Şekil 8).

Tablo 13: 1. Gün Kontrol ve doz gruplarının % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları.

1.gün				
% Kuyruk Yoğunluğu	Kontrol	D/2	D	Dx2
Ortalama	8,19	8,32	8,01	7,59
±SS	±1,29	±2,01	±1,37	±1,14



Şekil 8. 1.Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları

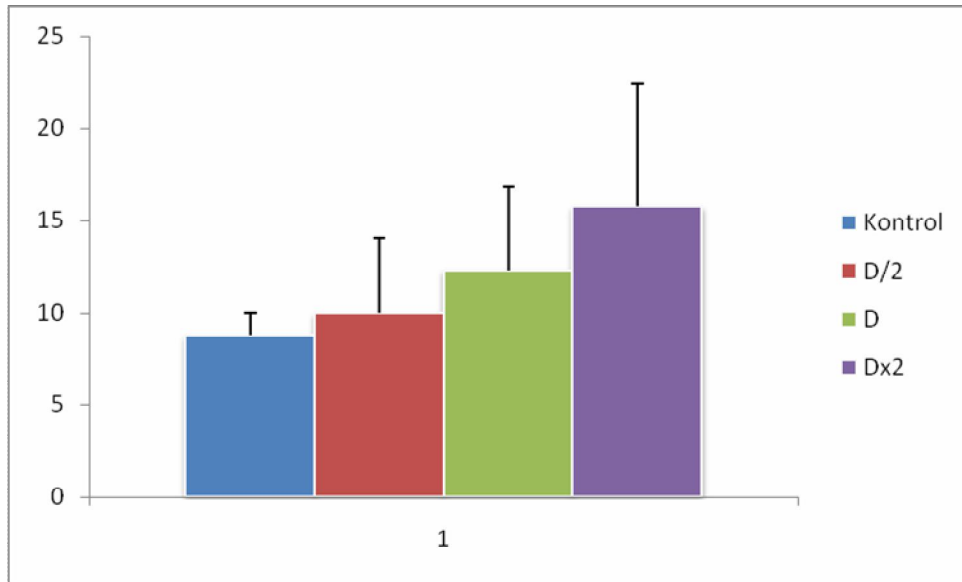
4.1.3.2. 7.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

Kontrol grubunu oluşturan farelerden elde edilen 7. gün sonuçları ile “D/2” doz grubu, “Doz” doz grubu ve “Dozx2” doz grubundan elde edilen 7. gün sonuçları % Kuyruk yoğunluğu değerleri (Tablo 14) gerçekleştirilen Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında kontrol grubundan elde edilen değerler ile “Dozx2” grubundan elde edilen değerler arasında anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0.01$) Kontrol grubu ile “Doz” grupları arasında anlamlı bir artış veya azalış saptanamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 15, Şekil 9).

Tablo 14: 7.Gün Kontrol ve Doz gruplarında % kuyruk yoğunluğu ortalamaları.

	7.gün			
	Kontrol	Doz/2	Doz	Dozx2
% kuyruk yoğunluğu ortalama $\pm$ SS	8,74 $\pm$ 1,29	9,98 $\pm$ 4,05	12,89 $\pm$ 3,54	15,74 $\pm$ 6,71*

* $p<0.01$



Şekil 9: 7.Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları ($p<0.01$ kontrol-Doz 2 grubu değerlendirildiğinde).

Çalışmamızda sonuçların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının yanısıra uygulanan 3 doz grubundan aynı gün alınan sonuçlarda kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırma yapılmıştır. Bu duruma göre Aloe vera jel uygulanan 3 doz grubundan elde edilen 7.gün sonuçları kendi içlerinde karşılaştırıldığında “d/2” doz grubu ile “Dozx2” grubu arasında $p<0.05$ düzeyinde artış yönünde anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 15)

Tablo 15: 7. Günde elde edilen sonuçların Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılması.

7.Gün	Ortalamalar arası fark	Q	P
kontrol ile d/2	-1.240	0.901	$P>0.05$
kontrol ile d	-4.148	3.015	$P>0.05$
kontrol ile dx2	-7.003	5.091	** $P<0.01$

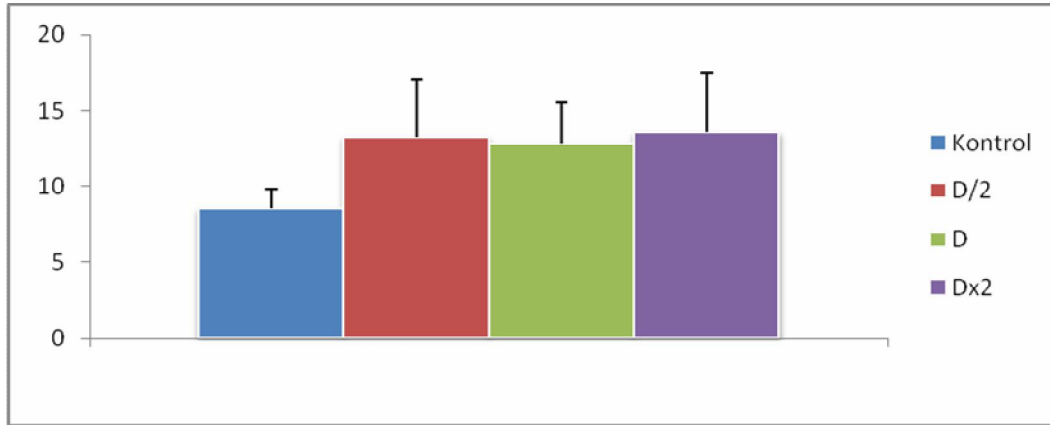
4.1.3.3. 14.Gün sonuçlarının karşılaştırılması

Kontrol grubunu oluşturan farelerden elde edilen 14. gün sonuçları ile “D/2” doz grubu, “Doz” doz grubu ve “Dozx2” doz grubundan elde edilen 14. gün sonuçları % Kuyruk yoğunluğu değerleri (Tablo 16) gerçekleştirilen Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldığında kontrol grubundan elde edilen değerler ile “Dozx2” ($p<0.01$) “Doz” ($p<0.05$) ve “Dozx2” ($p<0.01$) grubundan elde edilen değerler arasında anlamlı bir artışlar belirlenmiştir (Tablo 17, Şekil 10).

Tablo 16: 14.Gün Kontrol ve Doz gruplarında % kuyruk yoğunluğu ortalamaları.

14.gün				
%kuyruk yoğunluğu	Kontrol	D/2	D	Dx2
Ortalama	8,52	13,27*	12,83**	13,58*
±SS	±1,29	±3,83	±2,68	±3,9

* $p<0.01$ Kontrol-D/2, ** $p<0.05$ Kontrol-Doz; *** $p<0.01$ Kontrol-Dozx2



Şekil 10: 14. Gün alınan kanlardan elde edilen % kuyruk yoğunluğu cinsinden comet testi sonuçları ($p < 0.01$ Kontrol-D/2, $p < 0.05$ Kontrol-Doz; $p < 0.01$ Kontrol-Doz $\times$ 2)

Çalışmamızda sonuçların kontrol grubu ile karşılaştırılmasının yanısıra uygulanan 3 doz grubundan aynı gün alınan sonuçlarda kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırma yapılmıştır. Bu duruma göre Aloe vera jel uygulanan 3 doz grubundan elde edilen 14.gün sonuçları kendi içlerinde karşılaştırıldığında “3 doz grubu arasında artış veya azalış yönünde anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 17).

Tablo 17: 14. Günde elde edilen sonuçların Post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılması.

14.Gün	Ortalamalar arası fark	q	P
kontrol ile d/2	-4.757	4.836	** $P < 0.01$
kontrol ile d	-4.306	4.377	* $P < 0.05$
kontrol ile dx2	-5.055	5.139	** $P < 0.01$

V.TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, onlarca farklı rahatsızlığa karşı etkili olduğu iddia edilen ve karsinogenik etkileri olduğuna dair bulgular bulunan *Aloe vera* jelin, dahili kullanımının potansiyel genotoksik etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, *Aloe vera* jelin farelere intragastrik gavaj yoluyla belirli bir süre ve düzenli olarak uygulaması sonrasında “tek hücre jel elektroforezi” (Comet yöntemi) ile ortaya çıkabilecek potansiyel genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Diğer taraftan literatürde *Aloe vera* jelin neden olabileceği genotoksik hasarlara yönelik in vivo genotoksisite testleri kullanılarak yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olması, böyle bir çalışma yapılmasının gerekliliğini ve önemini ortaya koymaktadır

Aloe vera Tourn.Ex.L. (= *Aloe barbadensis* Mill., *A. vulgaris* Lamarck) çok yıllık, kısa bir gövdeden rozet şeklinde çıkan ve etli yapraklara sahip Liliaceae familyası bitkilerindendir. Bu etli yaprakların olgunlaşmasından sonra toplanılarak, ortasında bulunan renksiz müsilaj dokusunun alınmasıyla elde edilen ürün “*Aloe vera* jel” olarak adlandırılmaktadır. Bu işlem sırasında yaprak usaresinin jele karışmaması en önemli durumu oluşturmaktadır. Aksi taktirde antrasen türevleri de dahil olmak üzere jelde bulunmayan maddeler jele geçerek başta toksik etkiler olmak üzere pek çok farklı etkinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Doğal olarak oluşan antrasen türevleri arasında yer alan emodin, aloe-emodin ve dantron gibi 1,8-dihidroksiantrakinonlar¹², topoizomera II aktivitesini inhibe etmekte ve kromozomal DNA kırıklarına ve mutajenik DNA hasarına yol açabilmektedir^{26,42,43}. Nitekim ilgili ürünün piyasada bulunabilmesi için IASC (The International Aloe Science Council) içeriğinde 5 ppm den fazla aloin veya 50 ppm den fazla total antrakinon bulunmaması istenmektedir⁹.

Aloe vera jeli ticari olarak pazarlayan firmalar dünyada olduğu gibi yurdumuzda da, satış zincirleri kurarak “kapıdan satış” olarak da ifade edilen yöntemlerle birebir görüşmeler yoluyla ürünlerini genellikle bilgisiz kişilerce kullanıma sunmaktadırlar. Bu esnada ürünün başta mide-barsak problemleri olmak üzere kansere kadar uzanan bir yelpazede oral yoldan kullanımı olduğunu iddia etmektedirler. Yeterli bilgiye sahip olmayan veya çaresiz kalmış oldukça fazla kişi ise bu ürünü kullanmış veya kullanmaktadır. Nitekim Sağlık Bakanlığı 2007 yılında aldığı bir kararla bu ürünün

tüketiciye bu sunuş tarzı ile kullanımını yasaklamıştır; çünkü ürünün başta antrakinonlar olmak üzere pek çok toksik madde içerebileceği literatürde bildirilmektedir. Ayrıca *Aloe vera* jel içeren ürünlerin oral yolla uzun süreli kullanıma bağlı olarak karsinojenik etki gösterebileceğine, başta Dünya Sağlık Örgütü (WHO)⁷⁸ olmak üzere bir çok akademik kuruluş tarafından dikkat çekilirken, Amerikan Gıda ve İlaç kurumu (FDA) *Aloe vera* jele yönelik uyarıları sürekli yayımlamaktadır. Nitekim FDA OTC olarak satılan ilaçlardan stimulan laksatif olarak kullanılan Aloe (aloe ekstraktları ve aloe çiçeği ekstraktları dahil olmak üzere) ve cascara sagrada ürünlerinin “not generally recognized as safe and effective (GRASE) or misbranded” olarak değerlendirmektedir.

Aloe vera jelin uzun süreli kullanımına bağlı olarak başta karaciğer ve kolon kanseri riski olmak üzere istenmeyen bazı toksik etkilerin görülebileceği bildirilmektedir⁷⁹⁻⁸¹. Ticari *Aloe vera* jel preparatlarının normal insan hücresi ve tümör hücresi büyümesi üzerine in vitro toksik etkilerinin olduğu da rapor edilmiş olup^{45,46}, antrakinonların varlığı bu etkiden sorumlu tutulmuştur. Bir çok antrakinonun deri iritasyona, eriteme ve yüksek hücre proliferasyonuna yol açtığı, oksidatif mutajenlerin bir çok türüne duyarlı Salmonella türlerine mutajenik olduğu saptanmıştır^{47,48}. *Aloe vera* yapraklarında da bulunan aloin adlı maddenin sıçanlara oral olarak verilmesi durumunda, kalın bağırsakta aloe-emodine dönüştüğü ve tam karsinojenik etkisi olduğu görülmüştür^{49,50}.

Ticari olarak üretilmiş olan *Aloe vera* gel in in vitro olarak insan normal ve tümör hücrelerinin gelişimi için toksik olduğu gösterilmiştir. Azalmış olan hücre gelişiminden ise *Aloe vera* jel in içerebileceği antrakinonların sorumlu olacağı iddia edilmiştir^{45,46}. Kinonlar da proteinlerin tiyol gruplarıyla etkileşmelerinden veya aktif oksijen türlerinin oluşturmalarından dolayı benzer etkilere neden olabilmektedir^{47,48}.

Aloe vera jel in toksik etkilerinden antrakinonların sorumlu olabileceği ve bunların bitkinin yaprak kısmında bulunan aloin gibi daha düşük molekül ağırlıklı moleküllere oksidasyonu sonucunda ortaya çıktığı bildirilmektedir⁴⁹. Gerçekte aloin sıçanlara oral olarak verildiğinde kalın bağırsakta aloe-emodine dönüştüğü ve bu kinonun yapısal özelliklerinden dolayı karsinojeniteden sorumlu olduğu düşünülmektedir⁵⁰. Diğer yandan Winters ve arkadaşları (1981)⁴⁵ ticari aloe vera jelin sitotoksik olduğunu gösterirken, kendi laboratuvarlarında hazırladıkları *Aloe vera* jel in

herhangibir hücre hasarına neden olmadığını da bildirmektedirler. Avila ve arkadaşlarının (1997) ²⁵ tavuk fibroblastlarında gerçekleştirdikleri çalışmayla *Aloe vera* jel in sitotoksik etkisi ayrıca bildirilmiştir. Mutajenik hidroksiantrakinon derivelerinin pek çoğunun metabolizması göz önünde bulundurulduğunda bu bileşiklerin kendilerinin mutajenik olmadığı fakat hücreler ile invitro inkübasyonlarında mutajenik hidroksiantrakinonlara dönüştüğü ileri sürülmektedir⁸².

Yine antrasen türevlerinin literatürde tanımlanmış bir çok çalışmada toksik etkileri ortaya konulmuş olup, *Aloe vera* jel içeren ürünlerin oral yolla uzun süreli ve yanlış kullanıma bağlı olarak karsinojenik etki gösterebileceğine dair ciddi şüpheler bulunmaktadır.

Aloe barbadensis, *Aloe ferox* ve *Aloe*'nin çeşitli komponentleri ile bakteri ve memeli hücreleri kullanılarak yapılan genotoksisite yöntemlerinde hem negatif hem de pozitif sonuçlara ulaşılmıştır. Bugüne kadar yapılan bu çalışmalarda elde edilen veriler Tablo 18 de özetlenmiştir.

Aloe vera jel kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan genotoksik etkilerin değerlendirildiği çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu yönüyle sunulan çalışma *Aloe vera* hakkında yapılmış olan çalışmalardan farklılık göstermektedir. Çalışmalar genellikle bu ürün içinde yer alma potansiyeline sahip toksik maddelerin tek başlarına yarattıkları toksisiteye yönelik olarak ortaya konulmuştur. Literatürde *Aloe vera* jele yönelik genotoksisite çalışmalarının eksikliği göze çarpmaktadır. Halk tarafından gerek çeşitli hastalıklardan korunma amacıyla gerekse tedavi amacıyla doğrudan kullanılan bir ürünün genotoksisite çalışmalarının yapılmamış olması bu konuda önemli bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmanın amaçlarından biri de bu eksikliğin bir miktar da olsa giderilmesine yönelik olumlu yönde katkı yapmaktır.

Toksikolojide genotoksik maddelere maruziyetin etkilerinin ölçülmesinin bir çok nedeni olmakla birlikte, en önemli nedeni, en sonunda kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açan ve çoklu genetik değişimleri içeren karsinogenezin tanımlanmasının gerekliliği ve doğal olarak bu sürecin öngörülme isteğidir. Bu amaçla

Tablo 18: *Aloe barbadensis*, *Aloe ferox* ve Aloe'nin çeşitli komponentleri ile bakteri ve memeli hücreleri kullanılarak yapılan genotoksisite yöntemleri sonuçları ¹².

Test edilen materyal	Test türü	Test prosedürü	Sonuçlar
Bakteri Hücre Deneyleri			
Aloe-emodin	Salmonella TA1537	Hem aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 100 µg/kap	Kap başına 61 His değişimi (aloe emodin nmole başına 0.22 değişim), aktivasyonun bir etkisi yok
Aloe-emodin	Salmonella TA1537	Hem aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 50 µg/kap	Kap başına 330 His değişimi (aloe emodin nmole başına 0.42 değişim), aktivasyonun etkisi belirgin
Aloin	Salmonella/mi krosom TA1535, TA100, TA1537, TA1538, TA98	Hem S9 ile aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 50-250 µg/kap	Tüm sonuçlar negatif
<i>Aloe ferox</i> sulu ekstraktı	Bacillus subtilis rec-deneyi	Hem metabolik aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 5, 10, 50, 100 mg/ml konsantrasyonlarda	Pozitif
<i>Aloe ferox</i> etanol ekstraktı	Salmonella TA 98, TA100	Hem metabolik aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 5, 10, 50, 100 mg/ml konsantrasyonlarda	Negatif
Aloe-emodin	Salmonella TA1537, TA1538, TA98	Hem aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 1-1000 µg/ml	Hem aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz olarak tüm suşlarda mutajenik
Aloe-emodin	Salmonella TA1537, TA1538, TA98	Hem aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 10-5000 µg/kap	TA1537 ve TA98 S9 ile negatif S9 yoksa pozitif, TA1538 pozitif her durumda
Aloe-emodin	Mikroçekirdek yöntemi	NMRI fareler, 1500 mg/kg	Negatif
Aloe-emodin	Kromozomal aberasyon yöntemi	Wistar sıçanları, 2000 mg/kg	Negatif
<i>Aloe barbadensis</i> 'in ezilmiş yaprakları	Salmonella TA100, TA98	TA98 hem metabolik aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz, 6mg/ml	Tüm suşlar negatif

Memeli Hücre Deneyleri				
Aloe-emodin	C3H/M2 fibroblastları	1-30 µg/ml	Hücre transformasyonunda pozitif reaksiyonlar	
Aloe-emodin	V79-HGRPT deneyi	5-30 µg/ml	Zayıf mutajenik etki	
Aloe-emodin	Kromozomal aberasyon yöntemi	Hem S9 aktivasyonlu hem de aktivasyonsuz olarak CHO hücreleri ile, 18.75-75.00 µg/ml	S9 ile 37-75 µg/ml arası pozitif, S9'suz 18.75-75 µg/ml arası pozitif	
Aloe-emodin	Fare TFT-resistant L5178 Y tk deneyi	37-111 µM	Tk mutasyonları fare lenfoma deney hücrelerinde görülmüştür	
Hayvan Çalışmaları				
Aloe-emodin	Fare Spot deneyi	NMRI dişi fareler DBA erkek farelerle çiftleştirilmiş, hamilelik 9'ncu gününde 200 ve 2000 mg/kg doz verilmiş	Negatif	
Aloe-emodin	Mikroçekirdek deneyi	NMRI sıçanlar, 1500 mg/kg	Negatif	
Aloe-emodin	Kromozomal aberasyon deneyi	Wistar sıçanlar, 2000 mg/kg	Negatif	
In vitro Yöntemler				
Aloe-emodin	UDS deneyi		Negatif	

araştırmada ürünün olası genotoksik etkisi, pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyoizleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuş, DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan “tek hücre jel elektroforezi” (SCGE) veya diğer adıyla Comet tekniği kullanılarak farelerde belirlenmesi amaçlanmaktadır. DNA hasarının saptanmasında 1) Bireysel her bir hücredeki DNA'ya gelen hasarın ölçülebilmesi, 2) Az sayıda hücre (ya da örnek) ile yöntemin yürütülebilmesi, 3) Ökaryotik tüm hücre tiplerinde teorik olarak çalışılabilmeye olanak sağlaması, 4) DNA hasarına oldukça duyarlı bir yöntem olması nedeniyle planlanan projede kullanılması amaçlanmıştır.

Comet yönteminde, göz ya da bilgisayarlı görüntü analiz sistemleri ile hasar belirlenebilmektedir. Çalışmamızda bilgisayar destekli analiz sisteminden yararlanılmıştır. Bilgisayar destekli görüntü analiz sisteminde kuyruk uzunluğu, kuyruk

yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri kullanılmaktadır. Colins' e göre Comet yönteminde hasarın belirlenmesi için kuyruk uzunluğu ortalaması çok kullanışlı bir parametre değildir. Kuyruk uzunluğu düşük hasar seviyelerinde ilk olarak ortaya çıktığında artar. Daha sonrasında ise doza bağlı olarak yoğunluk artarken kuyruk uzunluğu artmayabilmektedir. Ayrıca kuyruk uzunluğu görüntülü analiz programının ayarlarına duyarlı bir parametredir, kuyruğun bitişi floresan fazlalığına göre saptanır. Kuyruk yoğunluğu ise en kullanışlı olanıdır ve kırık frekansı ile doğrusal ilişkiye sahiptir. Eşik ayarlardan etkilenmez ve teoride kuyrukta bulan yoğunluk % 0-100 aralığında yer aldığı için ayırma imkan verir. Üçüncü bir parametre olarak kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunun bir ürünü olarak kuyruk momenti ölçülmektedir. Colins'in değerlendirmesine göre kuyruk momenti parametresi doz ile doğrusal olarak ilgili değildir ve Cometin görünüşü ile ilgili herhangi bir izlenim vermemektedir⁸³. Çalışmamızda bu bilgiler değerlendirilerek % kuyruk yoğunluğu DNA hasarının göstergesi olarak kullanılmıştır.

Sunulan çalışmada ticari *Aloe vera* jel in farelere oral yoldan Comet yöntemi yardımıyla DNA da oluşabilecek hasarın belirlenmesinde % kuyruk yoğunluğu sonuçları göz önünde bulundurularak istatistiki pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu sonuçlar çalışmanın önemli çıktıları olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda üretici firmaca prospektüs üzerinde yazılı olarak önerilen dozun yarısı (doz/2), önerilen doz (doz) ve önerilen dozun iki katı doz (doz $\times$ 2) uygulanan deney hayvanlarından elde edilen comet testi sonuçları, kendi aralarında kontrol grubu sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu amaçla *Aloe vera* jel ürünün deney hayvanlarına uygulanmaya başlandığı günün hemen ertesinde (1.gün), 7. gün ve 14. gün de hem deney hayvanları hemde kontrol grubundan kan alınarak comet çalışması yapılmıştır. Böylelikle ürüne yönelik olası gelişebilecek DNA hasarının belirlenmesinde hem günler arasındaki farklılığın değerlendirilmesi hem de aynı günler arasında kontrol grubu ile farklılığın belirlenmesine çalışılmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda önerilen dozun yarısı uygulamasında 1.ve 14.günlerde $p<0.01$ düzeyinde, normal doz uygulamasında 1. ve 7. günlerin yanısıra 1. ve 14. günlerde $p<0.01$ düzeyinde, önerilen dozun iki katı uygulamasında 1.ve 7. günler arasında $p<0.01$ düzeyinde, 1. ve 14. günler arasında $p<0.05$ düzeyinde % kuyruk yoğunlukları arasında artış yönünde anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu durum ticari *Aloe vera* jel uygulamasının uygulamanın devam ettiği 14 gün boyunca DNA hasarına yol

açabileceği şeklinde yorumlanabilir. Nitekim kontrol grubu ile sonuçların değerlendirilmesinde 1. gün sonuçları göz önünde tutulduğunda doz grupları ile kontrol grubu arasında bir farklılık yokken ($p>0.05$), kontrol grubunun 7. gün sonuçları ile uygulanan dozun 2 katı olan doz grubu arasında anlamlı bir artış ($p<0.01$) saptanmıştır. 7. gün sonuçlarının kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırıldığında yarım doz ve normal doz uygulamalarında bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Öte yandan uygulamanın 14. gününde her 3 dozun uygulandığı doz gruplarından elde edilen değerler ile kontrol grubu değerleri arasında yarım doz uygulaması için $p<0.01$, normal doz uygulaması için $p<0.05$ ve iki kat doz uygulaması için $p<0.01$ düzeyinde % kuyruk yoğunluklarının artışı yönünde istatistiksel anlamlılık elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar dozların kendi içinde karşılaştırıldığında elde edilen sonuçları destekler biçimdedir ve test edilen ürünün kullanıma bağlı olarak DNA hasarına neden olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Kullanılan dozun DNA hasarı oluşturma durumu göz önüne alındığında 1. gün sonuçları için doz grupları arasında bir anlamlı farklılık söz konusu değilken, 7.gün de uygulanan yarım doz ile uygulanan dozun iki katı arasında $p<0.05$ düzeyinde bir anlamlılık elde edilmiştir.

Çok kısıtlı olsa da *Aloe vera* jel ile yapılmış bazı çalışmalarda *Aloe vera* jel in özellikle kimyasal karsinogenesiste koruyucu olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Kim ve Lee (1997) ⁸⁴ *Aloe barbadensis*'den elde ettikleri aloe jel ekstraktlarını in vitro ve in vivo kemopreventif kapasitelerini değerlendirmişlerdir. Benzo(a)piren ile muamele edilmiş sıçan hepatositlerini Aloe jel ekstraktlarının (0-250 µg/ml) varlığı ve yokluğu koşullarına göre incelediklerinde, benzo(a)piren katım bileşiği oluşumunun, Aloe jel ekstratı grubunda doza bağlı olarak inhibe olduğunu (%9.1'den %47.7'e varan) gözlemlemişlerdir. Yazarlar çalışmayı benzoapirendiolepoksit-DNA katım bileşiği oluşumunun önlenmesinde *Aloe vera* jelin kemopreventif etkisinin muhtemelen *Aloe vera* jel ekstraktının muhtemelen benzoapirenin emiliminin inhibisyonunu sağladığını bildirmektedirler. Diğer yandan Shamaan ve arkadaşları (1998) ⁸⁵ aloe türevlerinin etkilerini sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmayla dietilnitrozamin ve 2-asetilaminofloren ve *Aloe vera* jel ekstraktının çeşitli gruplarda uygulanmasında, *Aloe vera* jel ekstraktının destek olarak alınmasının kimyasal hepatokarsinogenesis şiddetini azaltabileceği şeklinde bir yoruma ulaşmışlardır (Shamaan et al. 1998). *Aloe vera* jel ekstraktının karaciğer koruyucu etkisinin gösterildiği son bir çalışma Nijerya'da Gbadegesin ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılmış olup ⁸⁶, bu çalışmada, *Aloe vera* jelin petrol içeren ürünlerden

(dizel, kerosen, hidrolik yağı) önce uygulanmasının ortalama karaciğer ve serum γ GT seviyelerini düşürdüğü ve yine yalnızca petrol ürünlerine maruz kalan gruplara kıyasla mikroçekirdek miktarını azaltabildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar ve sunulan çalışmada elde edilen comet sonuçları göz önünde bulundurularak Genotoksik etkilerinin belirlenmeye çalışılan *Aloe vera* jel ürününün muhtemelen içeriğinde istenmeyen antrakınonlar veya aloin gibi potent bileşikleri içerebileceği düşünülmektedir. Çünkü genel bilgi kısmında konu edinildiği gibi bu bileşiklerin mutajenik, karsinojenik ve diğer toksik etkileri çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Sunulan çalışmanın sonuçlarının test edilen ticari *Aloe vera* jel ürünün içeriğindeki antrakınon, aloin gibi maddelerin miktar tayinleri ile desteklenmesi elde edilen sonuçları çok daha anlaşılır ve tartışılır duruma getireceği açıktır.

6. ÖZET

Aloe vera Jel, *Aloe vera* bitkisinin ortasındaki musilajın alınması yoluyla elde edilmektedir. *Aloe vera* bitkisinin yaprağının dış kısmında bulunan usare ise, başta çeşitli antrakinonlar olmak üzere pek çok toksik bileşik içermektedir. Usarede bulunan bu toksik bileşiklerin üretim sırasında yanlışlıkla veya uygun olmayan tekniklerin kullanılması nedeniyle jele karışmasının, ciddi sağlık riski taşıyacağı belirtilmektedir. *Aloe vera* jel yurdumuzda üretici çeşitli firmaların oluşturduğu satış ağı ile tüketiciye kapıda ulaşma yoluyla pazarlanmaktadır. Bu pazarlama sırasında ürünün geniş bir yelpazede” pek çok hastalığa iyi geldiği ve pek çok hastalıktan bireyleri koruduğu” yönünde satış elemanlarınca pazarlaması yapılmaktadır. Bu ürünler eczanelerde satılmamaktadır. Dolayısıyla bu pazarlama yöntemi ile bilinçsiz kullanıcılar için olası sağlık risklerinin ortaya çıkması söz konusu olabilmektedir. Özellikle *Aloe vera* jele yönelik olarak yapılan toksisite çalışmalarında , ürün kullanımına yönelik olarak başta karsinogenik etki olmak üzere gelişebilecek genotoksisite çalışmalarının yeterli olmaması dikkati çekmektedir. *Aloe vera* jelin yaratabileceği genotoksitenin değerlendirilmesine yönelik çalışmaların sonuçları bu ürünün güvenliği konusunda aydınlatıcı bilgilerin oluşmasına neden olacaktır.

Sunulan çalışmada, piyasada satış elemanlarınca satılan *Aloe vera* jelin ticari preparatının muhtemel genotoksik etkilerinin farelerde Comet yöntemi ile araştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yetişkin, 30-45 g ağırlığında, her iki cinsten sağlıklı Swiss Albino tür fareler kullanılmıştır. Comet tekniği memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit ve duyarlı bir tekniktir. Bu amaçla sunulan çalışmada *Aloe vera* jel, tavsiye edilen toplam günlük insan dozunun ve bu dozun ½ ve 2 katı dozda doğrudan piyasadaki sıvı ürün üzerinden hazırlanarak deney hayvanlarına 14 gün boyunca intragastrik gavaj ile günde bir kez uygulanmıştır. Ayrıca bir kontrol grubu oluşturularak aynı hacimde yine oral yolla distile su verilmiştir. Çalışma sırasında farelerin kuyruk venlerinden 1, 7 ve 14. günlerde kan alınarak, Comet yöntemi ile genotoksisite parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, önerilen dozun yarısı uygulamasında 1.ve 14.günlerde $p<0.01$ düzeyinde, normal doz uygulamasında 1. ve 7. günlerin yanısıra 1. ve 14. günlerde $p<0.01$ düzeyinde, önerilen dozun iki katı uygulamasında 1.ve 7. günler arasında $p<0.01$ düzeyinde 1. ve 14. günler arasında $p<0.05$ düzeyinde % kuyruk yoğunlukları arasında artış yönünde anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Nitekim kontrol grubu ile sonuçların

değerlendirilmesinde 1. gün sonuçları göz önünde tutulduğunda doz grupları ile kontrol grubu arasında bir farklılık yokken ($p>0.05$), kontrol grubunun 7. gün sonuçları ile uygulanan dozun 2 katı olan doz grubu arasında anlamlı bir artış ($p<0.01$) saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Aloe vera* jel, genotoksisite, comet yöntemi

7. SUMMARY

Aloe vera gel is the clear jelly-like substance obtained from the *Aloe vera* leaf pulp. The latex part within the margins of leaf of *Aloe vera* is a source of many toxic substances including many kinds of anthraquinones. In production of *Aloe vera* gel, toxic substances in latex part can be transferred to the gel accidentally or by usage of improper methods of mechanical extrusion of the leaf; the contaminated gel was mentioned that it created serious health risk on public usage. In Turkey, *Aloe vera* gel has been sold to by door to door purchasing with a customer chain marketing services that were set by producer companies. Salesmen advertise the gel as a “remedy for a wide range of illnesses and protect from many illnesses”, although these products can not be found at pharmacies. As a result of this marketing management, misinformed users can face many adverse health risks. Especially the researches on toxicity of *Aloe vera* gel point out the scarcity of research on carcinogenic and genotoxic effects of short/long term usage of *Aloe vera*. The researches on evaluation of genotoxicity of *Aloe vera* gel, can provide very important information regarding the safety of product; new and extensive evaluations are needed about the issue.

In this study, genotoxic potential of commercial *Aloe Vera* gel sold by the salesmen with current marketing policy with mice using Comet (single cell gel electrophoresis) method have been evaluated. Swiss Albino, male and female mice that weight 30-45 gr were used. Comet assay is a fast, reliable and simple method, which allows the investigation of DNA damage at the individual cell level. One of the Commercial *Aloe vera* gel in the market given orally to experimental animals for 14 days with normal, half and double doses once per day that are suggested for human dose to mice. A control group were accompany the experiment groups. Tail venous blood of mice were taken at 1, 7 and 14th days of experiment and evaluated for genotoxicity parameters via comet assay. For the half dose, statistical significance have been found when the results of 1st and 14th days of experiments compared ($p < 0.01$). Similar significance have been observed when the results of 1st and 7th days of experiments compared ($p < 0.01$). In the double doses, statistical significance have been found when the results of 1st and 7th ($p < 0.01$) and 1st and 14th ($p < 0.05$) days of experiments compared as well. Obtained results also compared with the results of control group. We have not found any differences between the dose groups and control group as a consider of 1st day experimental results ($p > 0.01$). On the other hand significant differences have

been observed when in x2 dose-treated group compared with control group in 7th day (p<0.01)

Keywords: *Aloe vera* gel, genotoxicity, comet assay

8. KAYNAKLAR

1. Mosihuzzaman M, Choudhardy M.I. Protocols on safety, efficiency, standardization and documenation of herbal medicine. *Pure Appl. Chem.*, 2008; 80: 2195-2230.
2. Yeşilada E. Hekim ve Bitkisel İlaç; Bilmek ya da Bilmemek.TAF Prev Med Bull 2009; 8(3): 259-262
3. WHO Pharmaceuticals Newsletter, No 1, World Health Organization Pres, Genova, 2009
4. Tindle HA, Davis RB, Phillips RS, Eisenberg DM. Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997–2002. *Altern Ther Health Med* 2005;11:42–49.
5. Kaye AD, Clarke RC, Sabar R, Vig S, Dhawan KP, Hofbauer R, Kaye AM. Herbal medicines: current trends in anesthesiology practice—a hospital survey. *J Clin Anesth* 2000;12:468–471.
6. Klepser TB, Doucette WR, Horton MR, Buys LM, Ernst ME, Ford JK, Hoehns JD, Kautzman HA, LogemannCD, Swegle JM, Ritho M, Klepser ME. Assessment of patients’perceptions and beliefs regarding herbal therapies. *Pharmacotherapy* 2000;20:83–87.
7. Vogelzang JL. What you need to know about dietary supplements. *Home Healthcare Nurse* 2001;19:50–52.
8. Grindlay D, Reynolds T. The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol* 1986;16:117–151.
9. Boudreau MD., Beland FA. An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of Aloe Barbadensis (Miller), Aloe Vera. *J Environ Sci Health Part C*, 2006, 24:103–154.
10. Fisher J, Scott C, Stevens R, Marconi B, Champion L, Freedman GM, Asrari F, PilepichMV, Gagnon JD,Wong G. Randomized phase III study comparing best supportive care to Biafine as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity for women undergoing breast irradiation: Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 97-13. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1307–1310.
11. Gallagher J, Gray M. Is aloe vera effective for healing chronic wounds? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2003;30:68–71.
12. Andersen, F.A: Final Report on the Safety Assessment of Aloe Andongensis Extract, Aloe Andongensis Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Extract, Aloe

- Arborescens Leaf Juice, Aloe Arborescens Leaf Protoplasts, Aloe Barbadensis Flower Extract, Aloe Barbadensis Leaf, Aloe Barbadensis Leaf Extract, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Aloe Barbadensis Leaf Polysaccharides, Aloe Barbadensis Leaf Water, Aloe Ferox Leaf Extract, Aloe Ferox Leaf Juice, and Aloe Ferox Leaf Juice Extract. *International Journal of Toxicology*, 26(Suppl. 2):1–50, 2007
13. Marshall JM. Aloe vera gel: what is the evidence? *Pharm J* 1990;244:360–362.
 14. Atherton P. Aloe vera: magic or medicine? *Nurs Stand* 1998;12:49–54.
 15. Teradaira R, Shinzato M, Beppu H, Fujita H. Antigastric ulcer effects in rats of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* berger extract. *Phytother Res* 1993;7:S34-S36.
 16. Davis RH, Donato JJ, Hartman GM, Haas RC. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. *J Am Podiatr Med Assoc* 1994;84:77–81.
 17. Davis RH, Leitner MG, Russo JM. Topical anti-inflammatory activity of Aloe vera as measured by ear swelling. *J Am Podiatr Med Assoc* 1987;77:610–612.
 18. Kim HS, Kacew S, Lee BM. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* 1999;20:1637–1640.
 19. Davis RH, Agnew PS, Shapiro E. Antiarthritic activity of anthraquinones found in aloe for podiatric medicine. *J Am Podiatr Med Assoc* 1986;76:61–66.
 20. Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:2800–2804.
 21. Yongchaiyudha S, Rungpitarangsi V, Bunyapraphatsara N, Chokechaijaroenporn O. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. I. Clinical trial in new cases of Diabetes mellitus. *Phytomedicine* 1996;3:241–243.
 22. Yaron A. Characterization of Aloe vera gel before and after autodegradation, and stabilization of the natural fresh gel. *Phytother Res* 1993;7:11–13.
 23. Ni Y, Turner D, Yates KM, Tizard I. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1745–1755.
 24. Femenia A, Sanchez ES, Simal S, Rossello C. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers* 1999;39:109–117.

25. Avila H, Rivero J, Herrera F, Fraile G.; Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel. *Toxicon*. 1997, 35:1423-1430.
26. Mueller SO, Stopper H.; Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1428(2-3):406-414.
27. Muller SO, Eckert I, Lutz WK, Stopper H.; Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated? *Mutat Res*. 1996, 371:165-173.
28. Mueller SO, Stopper H, Dekant W.; Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metab Dispos*. 1998, 26:540-546.
29. Mueller SO, Lutz WK, Stopper H.; Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems. *Mutat Res*. 1998, 414:125-129.
30. Vogler BK, Ernst E. Aloe vera: A systematic review of its clinical effectiveness. *Br J Genl Pr* 1999;49: 823-28.
31. Fogleman RW, Chapdelaine JM, Carpenter RH, McAnalley BH. Toxicologic evaluation of injectable acemannan in the mouse, rat and dog. *Vet Hum Toxicol* 1992;34:201–205.
32. Fogleman RW, Shellenberger TE, Balmer MF, Carpenter RH, McAnalley BH. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. *Vet Hum Toxicol* 1992;34:144–147.
33. Shah AH, Quereshi S, Tariq M, Ageel AM. Toxicity studies on six plants used in the traditional arab system of medicine. *Phytother Res* 1989;3:25–28.
34. Herlihy JT, Bertrand HA, Kim JD, Ikeno Y, Yu BP. Effects of aloe vera ingestion in the rat I. Growth, food and fluid intake and serum chemistry. *Phytother Res* 1998;12:183–188.
35. Herlihy JT, Kim JD, Katu DN, Nelson JF, Ward WF, Ikeno Y, Yu BP. Effects of aloe vera ingestion in the rat. II. Hormonal and metabolic characteristics. *Phytother Res* 1998;12:355–360.
36. Rabe C, Musch A, Schirmacher P, Kruis W, Hoffmann R. Acute hepatitis induced by an Aloe vera preparation: a case report. *World J Gastroenterol* 2005;11:303–304.
37. Vazquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J Ethnopharmacol* 1996;55:69–75.

38. Mori H, Sugie S, Niwa K, Takahashi M. Induction of intestinal tumours in rats by chrysazin. *Br. J.Cancer* (abstract) 1985;52:781-783.
39. Mori H, Sugie S, Niwa K, Yishimi N. Carcinogenicity of chrysazin in large intestine and liver of mice. *Jpn. J. Cancer Res.*(abstract) 1986;77:871-876.
40. Swanbeck G. Interaction between deoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1966;123:630-633.
41. Breslin DT, Schuster GB. J. Structural modification changes the DNA binding mode of cation-substituted anthraquinone photonucleases: association by intercalation or minor groove binding determines the DNA cleavage efficiency. *Biochemistry*. 1997;36:10463-73.
42. Ferguson LR, Baguley BC. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutat. Res.* 1996;355:91-101.
43. Anderson RD, Berger NA. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat. Res.* 1994;309:109-142.
44. Paes-Leme AA, Motta ES. Assessment of Aloe vera (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid. *DNA Journal of Ethnopharmacology* 2005;102:197-201.
45. Winters WD, Benavides R, Clouse WJ. Effects of Aloe extracts on human normal and tumor cells in vitro. *Economic Botany* 1981;35:89–95.
46. Danhof IE, McAnally BH. Stabilized aloe vera: Effect on human skin cells. *Drug Cosmet Ind* 1983;133:52–54, 101–102..
47. Chapman, M. Excessively high cell proliferation in sigmoid colon after an oral purge with anthraquinoneglycosides. *Journal of the National Cancer Institute* 1995;87: 1086-1087.
48. O'Brien, PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-Biological interactions*. 1991;80:1-41.
49. Ishii H, Tanizawa H, Takino Y. Studies of Aloe. III. Mechanism of cathartic effect. (2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1990;38:197-200.
50. Wiilfle D, Schmutte C, Westendorf J, Marquardt H. Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. *Cancer Research* 1990;50:6540-6544.
51. Davis RH, Kabbani JM, Maro NP. Aloe vera and wound healing. *J Am Podiatr Med*

- Assoc 1987;77:165–169.
52. Bouthet CF, Schirf VR, Winters WD. Stimulation of neuron-like cell growth by aloe substances. *Phytother Res* 1995;9:185–188.
 53. Kaufman T, Kalderon N, Ullmann Y, Berger J. Aloe vera gel hindered wound healing of experimental second-degree burns: a quantitative controlled study. *J Burn Care Rehabil* 1988;9:156–159.
 54. Rodriguez-Bigas M, Cruz NI, Suarez A. Comparative evaluation of aloe vera in the management of burn wounds in guinea pigs. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:386–389.
 55. Watcher MA, Wheeland RG. The role of topical agents in the healing of fullthickness wounds. *J Dermatol Surg Oncol* 1989;15:1188–1195.
 56. Heggers JP, Kucukcelebi A, Stabenau CJ, Ko F, Broemeling LD, Robson MC. Wound healing effects of Aloe gel and other topical antibacterial agents on rat skin. *Phytother Res* 1995;9:455–457.
 57. Fulton JE, Jr. The stimulation of postdermabrasion wound healing with stabilized aloe vera gel-polyethylene oxide dressing. *J Dermatol Surg Oncol* 1990;16:460–467.
 58. Ajabnoor MA. Effect of aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 1990;28:215–220.
 59. Ghannam N, Kingston M, Al-Meshaal IA, Tariq M, Parman NS, Woodhouse N. The antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. *Horm Res* 1986;24:288–294.
 60. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Ravi K, Subramanian S. Hypoglycemic effect of Aloe vera gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. *J Med Food* 2004;7:61–66.
 61. Al-Awadi F, Fatania H, Shamte U. The effect of a plants mixture extract on liver gluconeogenesis in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Res* 1991;18:163–168.
 62. Parihar MS, Chaudhary M, Shetty R, Hemnani T. Susceptibility of hippocampus and cerebral cortex to oxidative damage in streptozotocin treated mice: prevention by extracts of *Withania somnifera* and *Aloe vera*. *J Clin Neurosci* 2004;11:397–402.
 63. Bolkent S, Akev N, Ozsoy N, Sengezer-Inceli M, Can A, Okyar A, Yanardag R. Effect of Aloe vera (L.) *Burm. fil.* leaf gel and pulp extracts on kidney in type-II diabetic rat models. *Indian Journal of Experimental Biology* 2004;42:48–52.
 64. Can A, Akev N, Ozsoy N, Bolkent S, Arda BP, Yanardag R, Okyar A. Effect of

- Aloe vera leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models. *Biol Pharm Bull* 2004;27:694–698.
65. Collins AR. Molecular epidemiology in cancer research. *Mol Aspects Med.* 1998;19(6):359-432.
 66. Battershill JM, Burnett K, Bull S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis.* 2008 ;23(6):423-37.
 67. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS.* 2009;99:87-110.
 68. Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat Res.* 1999;436(3):195-225.
 69. Kirkland D, Aardema M, Müller L, Makoto H. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mutat Res.* 2006 Sep 19;608(1):29-42.
 70. Sardas S, Izdes S, Ozcagli E. The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Inter Archives Of Occupa And Environ Health* 2006; 80: 154-159.
 71. Woo S, Kim S. Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Poll Bulletin* 2006; 52: 1768–1775.
 72. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1998; 175: 184–91.
 73. Collins AR. Molecular epidemiology in cancer research. *Mol Aspects Med.* 1998;19(6):359-432.
 74. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* 2005;20(4):245-254.
 75. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995;336(1): 69-77.
 76. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis.* 2005;20(4):245-254.

77. Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98(4):336-345.
78. WHO monographs on selected medicinal plants VOLUME 1 World Health Organization Geneva 1999
79. Siegers CP et al. Anthranoid laxative abuse—a risk for colorectal cancer. *Gut,* 1993,34:1099–1101.
80. Siegers CP. Anthranoid laxatives and colorectal cancer. *Trends in Pharm Sci,* 1992: 13:229–231.
81. Patel PM et al. Anthraquinone laxatives and human cancer. *Postgrade Med J,* 1989, 65:216–217.
82. Westendorf, J., Marquardt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J. And Marquardt, H. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. 1990, *Mut Res* 240, 1-12.
83. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249-261.
84. Kim HS, Lee BM. Inhibition of benzo [a] pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller. *Carcinogenesis* 1997;18:771–776.
85. Shamaan NA., Kadir KA, Rahmat A, Ngah WZ . Vitamin C and *Aloe vera* supplementation protects from chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Nutrition* 1998: 14:846–852.
86. Gbadegesin MA, Odunolaa OA, Akinwumia KA, Osifeso OO. Comparative hepatotoxicity and clastogenicity of sodium arsenite and three petroleum products in experimental Swiss Albino Mice: The modulatory effects of Aloe vera gel.) *Food Chem Tox,* 2009: 47:2454-2457

10. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad:

- Raşit Güler

Doğum Yeri ve Tarihi:

- Kırıkkale-10.09.1983

Eğitim Bilgileri:

- Yüksek Lisans (2006-)

Gazi Üniversitesi Farmasotik Toksikoloji ABD

- Lisans (2002-2006)

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Yabancı Dili:

- İngilizce