



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ARSENİĞİN
OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF HASARA KURKUMİNİN ETKİLERİ**

Mehmet Can PERKER

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Melike ERKAN**

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Melike ERKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Cenk SESAL
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25128 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde yapmış oldukları etkileri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Lisans ve lisansüstü öğrenimim süresince emeği geçen, çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Melike ERKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Yasemin AYDIN'a, Araş. Gör. Dr. Banu ORTA YILMAZ'a ve Uzman Biyolog Nebahat YILZDIZBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca destekleriyle yanımda olan ve çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz çalışma arkadaşım Biyolog Büşra DEMİRCİOĞLU'na teşekkür ederim. Yine tez çalışmalarım boyunca manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Burak TATLİDEDE'ye, Biyolog Selin SELVİ'ye ve Biyolog Tugay TOSUN'a teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da sonsuz teşvik ve emekleriyle bugüne gelmemi sağlayan, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli annem ve babam Güler ve Alper PERKER'e ve kardeşim Mertcan PERKER'e teşekkür ederim.

Aralık 2018

Mehmet Can PERKER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. FİBROBLAST HÜCRESİ	3
2.2. ARSENİK	5
2.2.1. Arseniğin Genel Özellikleri.....	5
2.2.2. Arseniğin Etkileri	7
2.3. OKSİDATİF HASAR	8
2.4. KURKUMİN	10
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	12
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	12
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	12
3.3. ARSENİK VE KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI	13
3.4. SİTOTOKSİSİTE.....	15
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi	15
3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi.....	15
3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	17
3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Tayini	17
3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler	17
3.5.1.2. Uygulama.....	18
3.5.2.3. Hesaplama	18
3.5.2. Hidroksil Radikalinin Tayini	19
3.5.2.1 Kullanılan Çözeltiler	19

3.5.2.2. Uygulama.....	19
3.5.2.3 Hesaplama.....	20
3.5.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Tayini.....	20
3.5.3.1. Kullanılan Çözeltiler.....	20
3.5.3.2. Uygulama.....	21
3.5.3.3. Hesaplama.....	21
3.5.4. Total Protein Tayini.....	22
3.5.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini.....	22
3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.5.5.2. Uygulama.....	23
3.5.5.3. Hesaplama.....	23
3.5.6. Katalaz Tayini.....	23
3.5.6.1. Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.5.6.2. Uygulama.....	24
3.5.6.3. Hesaplama.....	25
3.5.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Tayini.....	25
3.5.7.1. Kullanılan Çözeltiler.....	25
3.5.7.2. Uygulama.....	26
3.5.7.3. Hesaplama.....	26
3.5.8. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Tayini.....	27
3.5.8.1. Kullanılan Çözeltiler.....	27
3.5.8.2. Uygulama.....	27
3.5.8.3. Hesaplama.....	28
3.6. İSTATİSTİK ANALİZ.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI.....	30
4.1.1. MTT Bulguları.....	30
4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Bulguları.....	37
4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI.....	38
4.2.1. Lipit Peroksidasyonu.....	38
4.2.2. Total Protein Miktarı.....	39
4.2.3. Hidroksil Radikali.....	40
4.2.4. Hidrojen Peroksit.....	41
4.2.5. Katalaz Enzim Aktivitesi.....	42

4.2.6. GPx Enzim Aktivitesi.....	43
4.2.7. GST Enzim Aktivitesi	44
4.2.8. SOD Enzim Aktivitesi.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	66



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.1: Fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü.	3
Şekil 2.1.2: Fibroblast hücrelerinin olası kökenleri (Chang ve diğ., 2014).	4
Şekil 2.3.1: Antioksidan koruma mekanizması (Mirończuk-Chodakowska ve diğ., 2018).	9
Şekil 2.4.1: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (Pulido-Moran ve diğ., 2016).	11
Şekil 4.1.1.1: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri.	30
Şekil 4.1.1.2: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri.	31
Şekil 4.1.1.3: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (**p<0,001).	32
Şekil 4.1.1.4: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, ***p<0,001).	33
Şekil 4.1.1.5: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, ***p<0,001).	34
Şekil 4.1.1.6: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde % canlılık üzerine (konsantrasyona bağlı) etkileri (***p<0,001; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre).	36
Şekil 4.1.2.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (***p<0,001; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre).	37
Şekil 4.2.1.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki lipid peroksidasyonuna (konsantrasyona bağlı) etkileri (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre; #: kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).	38
Şekil 4.2.2.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki total protein miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri	39
Şekil 4.2.3.1: Arsenik ve kurkuminin oksidatif hasara bağlı olarak 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oluşan hidroksil radikali miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri (*p<0,05; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre; #: kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).	40

- Şekil 4.2.4.1:** Arsenik ve kurkuminin oksidatif hasara bağlı olarak 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oluşan hidrojen peroksit miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri (**p<0,01; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).....41
- Şekil 4.2.5.1:** Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde tüketilen H₂O₂ miktarına bağlı olarak değişen katalaz enzimi aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).....42
- Şekil 4.2.6.1:** Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki glutasyon peroksidaz aktiviteleri (konsantrasyona bağlı) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).....43
- Şekil 4.2.7.1:** Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki glutasyon S-transfereaz aktiviteleri (konsantrasyona bağlı) (*p<0,05; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).....44
- Şekil 4.2.8.1:** Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (*p<0,05; ***p<0,001; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).....45

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.2.1.1: Arseniğin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri (Adriano, 2001).....	5
Tablo 2.2.1.2: Bazı inorganik ve organik arsenik bileşikleri (IARC, 2012).....	6
Tablo 2.4.1: Kurkuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri (Aggarwal, 2003; Esatbeyoglu, 2012).....	10
Tablo 3.3.1: Kontrol, A1, A2, A3, A4 ve Kurkumin uygulanan deney grupları.....	14
Tablo 4.1.1.1: Arsenik maddesinin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri.....	35

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumini
CDNB	: 1,4-dikloronitrobenzen
DMSO	: Dimetilsülfoksit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
KUR	: Kurkumin
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDA	: Malondealdehit
MTT	: 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TCA	: Trikloroasetik asit

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

3T3 EMBRİYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ARSENİĞİN OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF HASARA KURKUMİNİN ETKİLERİ

Mehmet Can PERKER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışma, 3T3 fibroblast hücrelerinde arsenik kaynaklı oksidatif hasarı ve bu hasara karşı kurkuminin olası koruyucu rolünü belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Günümüzde artan kentleşme ve endüstrileşmeye bağlı olarak çevre kirliliği de artmaktadır. Doğrudan ve dolaylı yollardan oluşabilen çevre kirliliği besin zinciri yoluyla bütün organizmaları ve ekosistemi etkilemektedir. Çevre kirliliğine sebep olan faktörlerin en önemlilerinden biri ağır metallerdir. Bir ağır metal olan arsenik yer kabuğunda, toprakta, suda ve havada bulunmaktadır. Ayrıca cam, yarı iletken maddeler ve tarım ilaçlarının üretiminde kullanılmaktadır. Arsenik içme suyu, gıdalar ve solunum yoluyla vücuda alınmakta olup özellikle içme suyu vasıtasıyla arseniğe daha fazla maruz kalınmaktadır.

Arseniğin hücrede reaktif oksijen türlerinin oluşmasını uyararak oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stresin önlenmesi ve etkisinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir. Kurkumin, vitamin C ve vitamin E ile karşılaştırıldığında güçlü bir antioksidan aktivitesi göstermektedir. Kurkumin, süperoksit radikali ve hidroksil radikali de dahil olmak üzere, çeşitli reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek hücreden serbest radikalleri temizlemekte ve böylece hücreyi oksidatif hasardan korumaktadır.

Arsenik 24 saat süreyle 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda ve bu konsantrasyonlara ilave olarak kurkumin (2,5 μ M) 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine

uygulanmıştır. 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı, sitotoksisite, antioksidan enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz), lipit peroksidasyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit miktarı ölçülmüştür. Bulgular hücre canlılığı ve antioksidan enzimlerin azaldığını, lipit peroksidasyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve sitotoksisitenin arttığını göstermiştir. Bu bulgular, arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde antioksidan enzimleri inhibe ederek doğrudan etkilediğini ve hücrede hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve lipit peroksidasyon miktarını arttırarak oksidatif hasara teşvik ettiği göstermektedir. Ayrıca, kurkuminin arsenik tarafından oluşturulan toksisiteye karşı koruyucu bir etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Aralık 2018, 81 sayfa.

Anahtar kelimeler: Arsenik, kurkumin, 3T3 embriyonik fibroblast, oksidatif hasar.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECTS OF CURCUMIN ON ARSENIC INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN 3T3 EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS

Mehmet Can PERKER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN

This study was conducted to determine the oxidative damage caused by arsenic in 3T3 fibroblast cells and the possible protective role of curcumin against this damage.

Today, due to increasing urbanization and industrialization, environmental pollution is also increasing. Environmental pollution, which can be caused by direct and indirect routes, affects all organisms and ecosystems through the food chain. One of the most important factors that cause environmental pollution is heavy metals. Arsenic, a heavy metal, is found on earth, soil, water and air and is used in the production of glass, semiconducting materials and agrochemicals. Arsenic is taken by the body through drinking water, food and respiration, and human are exposed to arsenic, especially through drinking water.

Arsenic induces oxidative stress by stimulating the formation of reactive oxygen species in the cell. Antioxidants should be consumed in sufficient quantities to reduce oxidative stress caused by reactive oxygen species and minimize the effect. Curcumin shows a strong antioxidant activity when compared to vitamin C and vitamin E. Curcumin reacts with various reactive oxygen species, including superoxide radicals and hydroxyl radicals, to remove free radicals from the cell and thus protect the cell from oxidative damage.

Embryonic fibroblast cells were exposed to arsenic (0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM and 10 μM concentrations) in the presence and absence of curcumin (2,5 μM) for 24 hour. Cell viability, cytotoxicity, antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase), lipid peroxidation, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and amount of total protein were measured in 3T3 embryonic fibroblast cells. The result indicated that cell viability and antioxidant enzymes were decreased, while lipid peroxidation, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, cytotoxicity were increased. This findings is indicate that arsenic directly affects antioxidant enzymes in 3T3 embryonic fibroblast cells and induces oxidative damage by increasing the amount of hydrogen peroxide, hydroxyl radical and lipid peroxidation in the cell. Furthermore, curcumin has been shown to have a protective effect against the toxicity induced by arsenic.

December 2018, 81 pages.

Keywords: Arsenic, curcumin, 3T3 embryonic fibroblast, oxidative damage.

1. GİRİŞ

Ağır metaller, su ile karşılaştırıldığında yüksek bir yoğunluğa sahip olan metalik elementler olarak tanımlanmaktadır. Önemli çevresel kirletici olan ağır metaller, sahip oldukları toksisiteden dolayı ekolojik, evrimsel, beslenme ve çevresel olarak önemi artan bir sorundur (Tchounwou ve diğ., 2012). Ağır metaller, arsenikte olduğu gibi düşük konsantrasyonlarda bile toksisiteye neden olan, metallolid elementleri içermektedir (Özbolet, 2016).

Arsenik, yeryüzünde en çok bulunan yirminci element olup, arsenit (+3) ve arsenat (+5) gibi inorganik bileşikleri çevre ve canlılar için ölümcül etki göstermektedir. Üç değerlikli (trivalent) arsenik bileşikleri suda beş değerlikli (pentavalent) arsenik bileşiklerinden daha fazla çözünmektedir. Bu duruma bağlı olarak trivalent arsenik bileşikleri doğada daha toksik etki göstermektedir (Abdul ve diğ., 2015). İnsanlar, arseniğe doğal ve endüstriyel yollarla maruz kalmaktadır (Bhattacharya ve diğ., 2002). Başlıca arseniğe maruziyet, özellikle Hindistan, Bangladeş, Çin ve bazı Orta ve Güney Amerika ülkelerinde içme suyu yoluyla gerçekleşmektedir. Dünya Sağlık Örgütünün (10 ppb) izin verdiği içme suyu arsenik konsantrasyonunun Arjantin (200 ppb), Meksika (400 ppb), Tayvan (50-1980 ppb) ve Hint-Bangladeş bölgesinde (800 ppb) maksimum değerini çok üzerinde olduğu bildirilmiştir (Flora, 2011).

Arsenik cilt, karaciğer ve akciğer kanserlerine neden olan bir karsinojendir ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini uyarak, toksisiteye neden olmaktadır. Arseniğin ayrıca sitotoksik ve genotoksik olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sun ve diğ., 2014). Başlıca arsenik kaynaklı reaktif oksijen türleri süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, tekli oksijen ve peroksil radikalleridir. Yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda arseniğe maruz bırakılan çeşitli hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumu gözlenmiştir (Shi ve diğ., 2004).

Günümüzde, doğada var olan birçok bitkinin yapısında yer alan polifenolik antioksidan maddelerin çeşitli toksik maddelerden kaynaklanan serbest radikalleri süpürücü özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Nizamlioğlu ve diğ., 2010). Bir polifenol türevi olarak bilinen kurkumin, zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen yemeklere sarı renk veren bir baharat olarak kullanılmaktadır (Maheshwari ve diğ., 2006; Aggrawal ve diğ., 2003). *Curcuma longa*

geleneksel olarak Asya ülkelerinde antioksidan, antiinflamatuvar, antimutajenik, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri nedeniyle çeşitli patolojiler için tıbbi bir bitki olarak kullanılmaktadır (Pulido-Moran ve diğ., 2016).

Kurkumin yapısında bulunan β -diketon grubu nedeniyle antioksidan olduğu düşünülmektedir (Sandur ve diğ., 2007). Ayrıca kurkuminin, antioksidan ve hücre koruyucu çeşitli proteinleri düzenlemesi ve oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu doğrudan engellemesi sebebiyle iki fonksiyonlu antioksidan olarak bildirilmiştir (Dinkova-Kostova ve diğ., 2008; Ak ve diğ., 2008). Kurkumin, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini süpürücü etkisinin olduğu ve buna ek olarak antioksidan sistemde önemli rol oynayan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz gibi proteinlerin sentezlenmesi uyardığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Barzegar ve diğ., 2011; Trujillo ve diğ., 2013).

Bu çalışmada arseniğin ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde embriyonik fibroblast hücreleri, arsenik, oksidatif hasar ve kurkumin ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümünde belirtilmiştir.

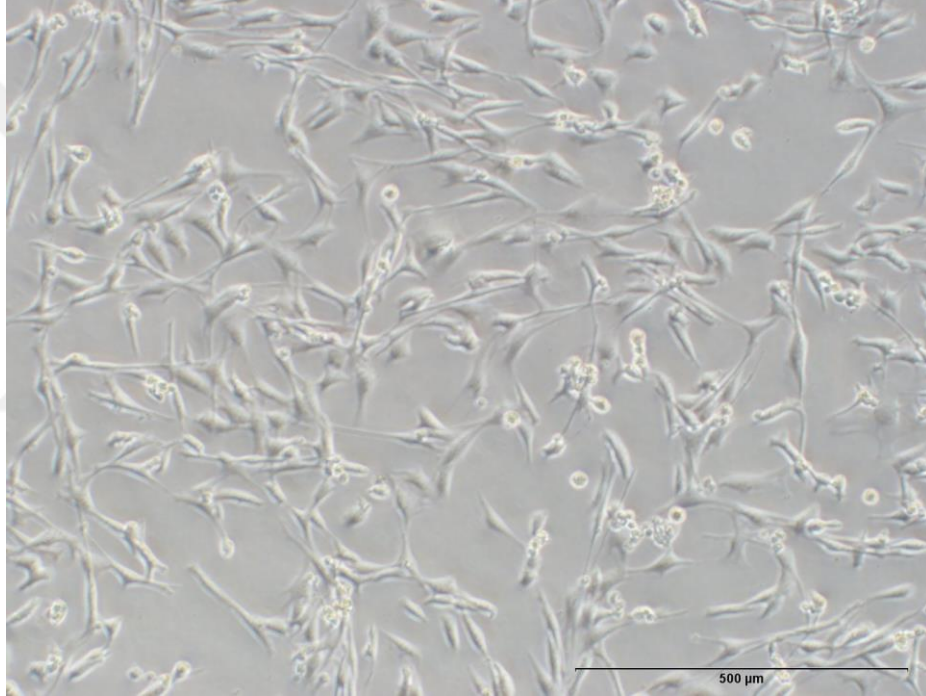
Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücresi üzerinde oluşturduğu oksidatif hasara ve bu oksidatif hasara karşı güçlü bir antioksidan olan kurkuminin koruyucu rolü, hücre canlılığı, enzimatik antioksidanlar, lipit peroksidasyonu ve reaktif oksijen türleri ölçülerek ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. FİBROBLAST HÜCRESİ

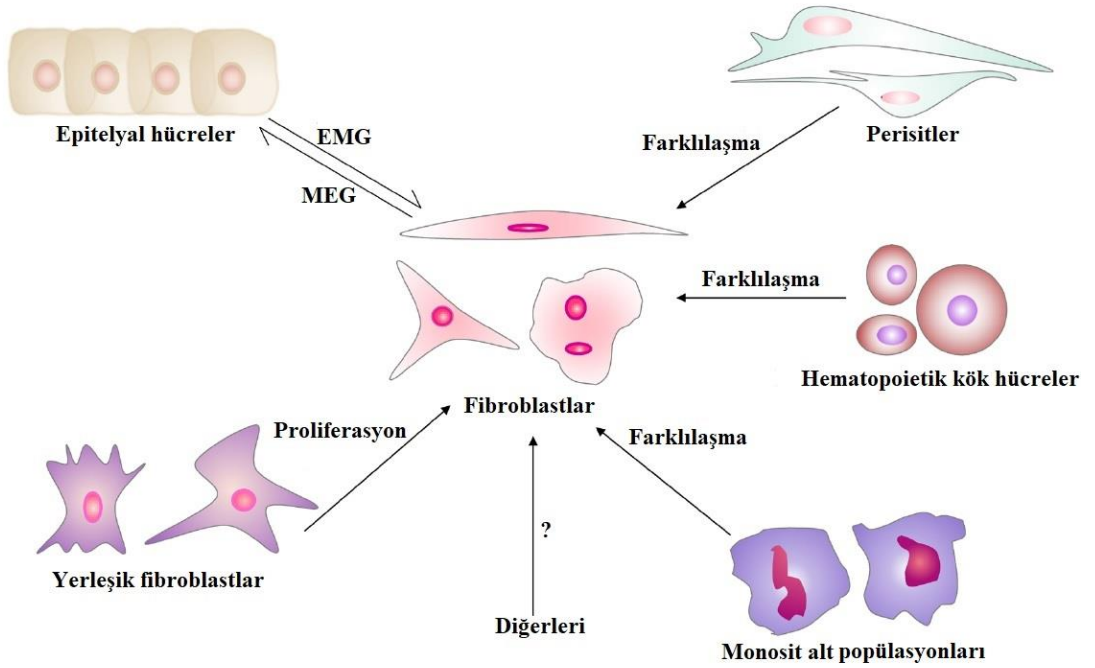
Bağ dokusunda yaygın olarak bulunan fibroblastlar, mikroskopik görünümüne ve konumlarına dayanılarak on dokuzuncu yüzyılın sonlarında tanımlanmıştır. Fibroblastlar tipik olarak, iğimsi ve basık morfolojiye ve kültür kaplarına yapışabilme yeteneğine sahip, genellikle bazal membrandan yoksun hücrelerdir (Kalluri ve diğ., 2006). Fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü şekil 2.1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1.1: Fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü.

Fibroblast hücreleri oval bir çekirdek (bir ya da iki belirgin nükleolus), geniş pürüzlü endoplazmik retikulum, belirgin bir Golgi aparatı ve bol miktarda sitoplazmik granüler materyal içermektedir (Camelliti ve diğ., 2005). Fibroblastlar tip I, tip III ve tip V kollajen, fibronektin, proteoglikanlar, glikoproteinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar dahil olmak üzere bağ dokunun ekstrasellüler matris bileşenlerinin çoğunu sentezlemektedir (Rodemann ve diğ., 1991; Corda ve diğ., 2000). Ayrıca tip IV kollajen ve laminin salımıyla bazal membranların oluşumuna da katkıda bulunmaktadırlar (Chang ve diğ., 2002).

Fibroblastlar, mezenşimal kökenli hücreler olarak tanımlanmaktadır. Fibroblast popülasyonunu oluşturan mezenşimal hücrelerin epitelyal-mezenşimal geçişten türettiği düşünülmektedir. Bu geçişte epitelyal hücreler E-kaderin veya zona okludens-1 gibi özel moleküler işaretleyicilerini kaybetmektedirler ve epitelyal mezenşimal geçiş süreci boyunca fibroblast proteinlerini eksprese etmektedirler (Chang ve diğ., 2014). Sonrasında ise doğum sonrası yaşamın ilk birkaç gününde fibroblastlar hızla çoğalmaya başlamaktadırlar. Ancak bazı araştırmalar, hematopoitik kök hücreler, perisitler gibi progenitör hücrelerin ve kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin fibroblast hücre popülasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (Lin ve diğ., 2008; Cossu ve diğ., 2003). Bu nedenle fibroblastların farklı gelişim aşamalarında çeşitli kaynaklardan oluştuğu düşünülmektedir. Fibroblastların olası kökenleri şekil 2.1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1.2: Fibroblast hücrelerinin olası kökenleri (Chang ve diğ., 2014).

2.2. ARSENİK

2.2.1. Arseniğin Genel Özellikleri

Arsenik, yaygın bir şekilde yer kabuğunda, doğal olarak bulunan bir elementtir. Kimyasal özelliklerine göre metalloid olarak sınıflandırılan arsenik elementi metal ve ametal özellikleri bir arada göstermektedir. Arsenik, atmosferde normal şartlar altında, opak gri-beyaz renkte bulunan katı bir maddedir (Henke, 2009). Arseniğin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri tablo 2.2.1.1’de verilmiştir.

Tablo 2.2.1.1: Arseniğin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri (Adriano, 2001).

Atomik Ağırlık	74,92
Element Simgesi	As
Yoğunluk	5,73 g cm ⁻³
Renk	Opak-gri beyaz
Fiziksel Durumu	Katı
Erime Noktası	817 °C
Süblimleşme Noktası	613 °C

Doğada genellikle arsenik diğer elementlerle oluşturduğu bileşikler halinde bulunmaktadır. Arseniğin oksijen, klor ve sülfür gibi elementlerle oluşturduğu bileşikler inorganik arsenikler olarak adlandırılırken, karbon ve hidrojen ile oluşturduğu bileşikler ise organik arsenikler olarak isimlendirilmektedir (ATSDR, 2007). Arseniğin yaptığı bileşiklerde arsenat (+5), arsenit (+3), elemental arsenik (0) ve arsin olmak üzere dört oksidasyon durumu vardır. İnorganik arsenikler, pentavalent (+5 değerlikli) ve trivalent (+3 değerlikli) arsenik bileşikleri şeklinde bulunmaktadır. Trivalent arsenik bileşikleri sudaki çözünürlükleri nedeniyle pentavalent arsenik bileşiklerine göre daha toksiktir (Hughes, 2002). Bazı inorganik ve organik arsenik bileşikleri tablo 2.2.1.2.’de verilmiştir.

Tablo 2.2.1.2: Bazı inorganik ve organik arsenik bileşikleri (IARC, 2012).

Cas No	Kimyasal İsim	Formül
Trivalent İnorganik Arsenik Bileşikleri		
1327-53-3	Arsenik trioksit	As ₂ O ₃
7784-34-1	Arsenik triklorit	As ₃ Cl ₃
7784-46-5	Sodyum arsenit	NaAsO ₂
Pentavalent İnorganik Arsenik Bileşikleri		
1303-28-2	Arsenik pentoksit	As ₂ O ₅
7784-40-9	Kurşun arsenat	PbHAS ₃ O ₄
7778-44-1	Kalsiyum arsenat	Ca ₃ (AsO ₄) ₂
Organik Arsenik Bileşikleri		
98-50-0	Arsanilik asit	C ₆ H ₈ AsNO ₃
75-60-5	Dimetilarsinik asit	C ₂ H ₇ AsO ₂
64436-13-1	Arsenobetain	C ₅ H ₁₁ AsO ₂

Arsenik, günümüzde cam endüstrisinde berraklaştırıcı, tarımda pestisit, herbisit ve insektisit, elektronik endüstrisinde yarı iletken madde olarak kullanılmaktadır (Gorby, 1988). Arsenik, beslenme, solunum ve deri yoluyla insan vücuduna alınmaktadır. Beslenme ve solunum yoluyla alınan arseniğin çoğu gastrointestinal kanal ve akciğerler yoluyla kan dolaşımına dahil edilmektedir. Alınan trivalent arseniklerin %95'i gastrointestinal sistemden absorbe edilmektedir. Absorbe edilen arsenik, akciğerler, karaciğer, böbrekler ve deri gibi vücudun diğer bölgelerine %95-99 oranında eritrositlerde bulunan hemoglobinin globinine bağlanarak taşınmaktadır ve yaklaşık %70'i esas olarak karaciğer tarafından daha az toksik metil formuna dönüştürülerek idrarla atılmaktadır (Saha, 1999).

2.2.2. Arseniğin Etkileri

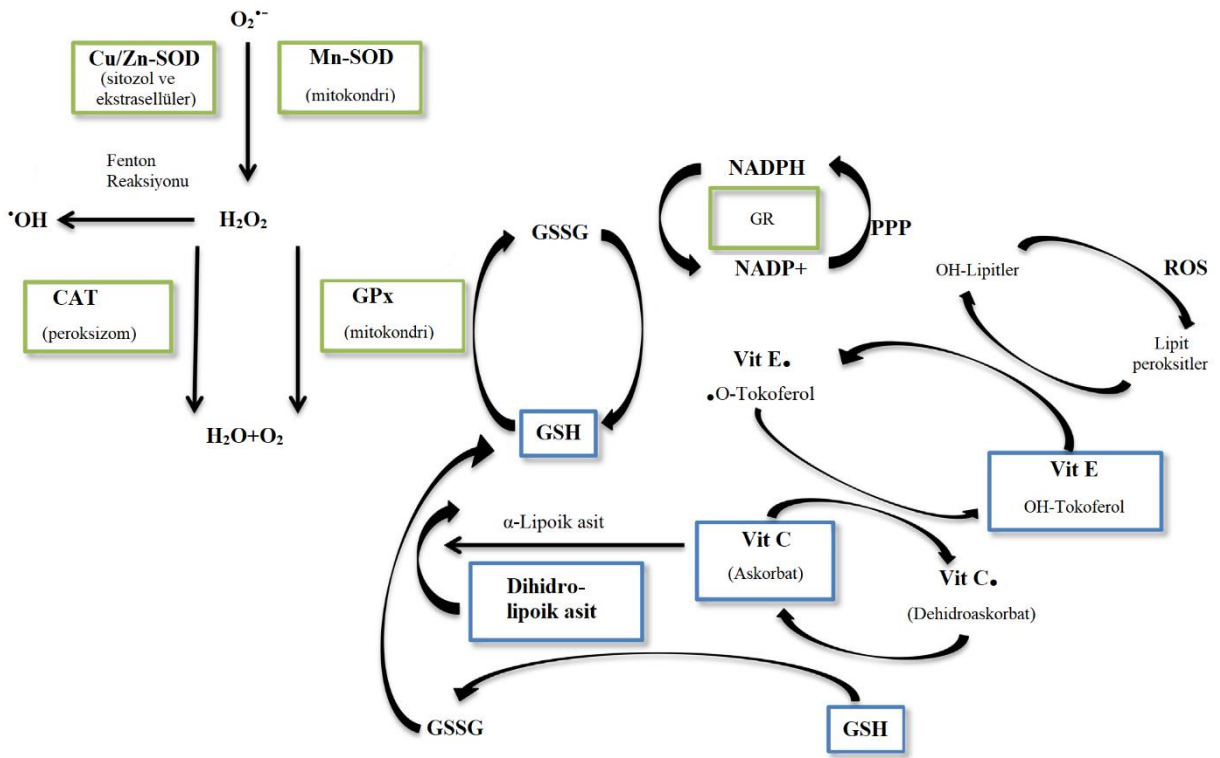
Solunum ve beslenme yoluyla vücuda alınan arseniğin, insan derisi, mesane ve akciğerler için kanserojen olduğu bilinmektedir. Ancak, çevresel olarak maruz kalınan arseniğin etki mekanizması tam olarak tespit edilememiştir. Çünkü arsenik çevrede birçok oksidasyon durumunda bulunmaktadır ve tiyol gruplarıyla etkileşime girmektedir. Buna bağlı olarak arsenik toksisitesinin oksidatif stres aracılığıyla sağlandığı düşünülmektedir (Hughes, 2002). *In vitro* da akut arsenik maruziyeti sonucunda reaktif oksijen radikallerinin üretildiği gösterilmiştir. Başlıca arsenik kaynaklı reaktif oksijen türleri süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, tekli oksijen ve peroksil radikalleridir (Jomova ve Valko, 2011). Yapılan çalışmalarda insan vasküler düz kas hücreleri, vasküler endotel hücreleri ve insan-hamster hibrid hücreleri gibi bazı hücre hatlarında arsenik maruziyetinden sonra süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca arsenik, insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde ve sıçan embriyonik miyoblast hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırdığı ve hücre içi antioksidanların miktarını azalttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Flora, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından arseniğin insan sağlığına olan etkileri, görülme sıklığı, uygun arıtma teknolojileri, analiz yöntemleri ve uzun dönemler kullanımı sonucu olası kanser risklerini göz önünde bulundurularak 1993 yılında sudaki arsenik konsantrasyonu ile ilgili düzenlemeler yapılmış ve arsenik limiti 10 µg/L belirlenmiştir (Alpaslan ve diğ., 2010). Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği 10 µg/L limit değeri AB ülkeleri, Japonya, Amerika Birleşik Devleti gibi ülkeler tarafından ulusal standart olarak kabul edilmiştir. Arjantin, Hindistan, Bangladeş, Tayvan, Filipinler gibi sağlıklı içme suyu arıtım sistemlerinden yoksun ülkelerde halen eski standart olan 50 µg/L limit değeri geçerlidir (Yamamura ve diğ., 2003). Ülkemizde ise 2005 yılına kadar sudaki arsenik ile ilgili uygulanan yasal düzenleme Türk Standartları Enstitüsü'nün İçme ve Kullanma Sularına İlişkin Standartları (TS 266)'dır. Bu standarda göre maksimum arsenik miktarı 50 µg/L'dir. Ancak WHO, EPA ve AB ülkelerinde arsenik standartları üzerinde yapılan düzenlemeler ülkemizde de uygulanmış ve kullanma suları hakkında geçerli olan 17 Şubat 2005 tarih ve 25730 sayılı "İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik" kapsamında sudaki arseniğin maksimum konsantrasyonu 10 µg/L olarak açıklanmıştır (Çalışkan ve Pala, 2009).

2.3. OKSİDATİF HASAR

Serbest radikaller, atomik veya moleküler yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır (Valko ve diğ., 2004). Canlı organizmaların normal hücrel metabolizmaları ve hava kirliliği, sigara dumanı gibi çevresel faktörler sonucu oluşan serbest radikaller, düşük ve orta konsantrasyonlarda fizyolojik hücre işlemlerinde görev almaktadırlar. Ancak yüksek konsantrasyonlarda oluşan serbest radikaller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenleri üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedirler (Birben ve diğ., 2012). Oksijenden oluşan serbest radikaller biyolojik sistemlerdeki en önemli radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilmektedir. Hidroksil radikali, peroksil radikali, nitrik oksit, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve tekli oksijen bilinen reaktif oksijen türleridir (Halliwell, 1991).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşmaktadır. Ozon, karbonmonoksit, hipoklorit gibi kirleticiler, ilaçlar, demir, bakır gibi metal iyonları ve ultraviyole ışık, x-ray gibi radyasyon kaynakları ekzojen serbest radikal kaynaklarını oluştururken, araşidonik asit metabolizması, mitokondrial elektron taşıma sistemi, otooksidasyon reaksiyonları ve oksidan enzimler ise endojen kaynakları oluşturmaktadır (Karabulut, 2016). Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin oksidan sistem lehine bozulması oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif strese bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türleri ve lipit peroksidasyonu sonucu organizmada hücrel hasar oluşmaktadır (Tabakoğlu ve diğ., 2013). Antioksidanlar, biyolojik sistemlerde serbest oksijen radikallerin hücrel yapılara vereceği hasarı engellenme yeteneğine sahip olan moleküllerdir. Endojen (enzimatik, enzimatik olmayan antioksidan enzimler) ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılır (Özcan ve diğ., 2015). Antioksidanların koruma mekanizması şekil 2.3.1'de gösterilmiştir. Eksojen kaynaklı antioksidanlar, vitamin E, vitamin C, karotenoidler, eser metaller (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Eksojen kaynaklı antioksidanların, ROS detoksifikasyonunda ve oksidatif stresin nötralizasyonunda endojen antioksidanlara yardımcı olduğu gösterilmiştir (Gupta ve diğ., 2014). Endojen kaynaklı antioksidanlar ise hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırılmıştır (Altınışık, 2000).



Şekil 2.3.1: Antioksidan koruma mekanizması (Mirończuk-Chodakowska ve diğ., 2018).

Reaktif oksijen türlerinin nötralizasyonunda doğrudan ilgili enzimatik antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalının hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden enzimdir. Oluşan hidrojen peroksit ise katalaz veya glutatyon peroksidaz tarafından suya dönüştürülmektedir (MatÉs ve diğ., 1999). Bir selenoprotein olan glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi indirgenmiş glutatyonu (GSH) okside glutatyon ($GSSG$) çevirerek hidrojen peroksiti uzaklaştırmaktadır. GPx, glutatyonu okside ederken aynı zamanda lipid hidroperoksitleri de azaltmaktadır (Usta, 2013). Glutatyon redüktaz enzimi $GSSG$ 'den GSH'yi yeniden üretir ve indirgenme reaksiyonunda sırasında enerji kaynağı olarak NADPH'yi kullanmaktadır (Kabel, 2014). Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi sisteinin sülfür atomu üzerinden çeşitli elektrofollere glutatyonu aktaran proteindir (Sherratt, 2002). Endojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlar ise, glutatyon, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, transferrin ve bilirubindir (Noori, 2012).

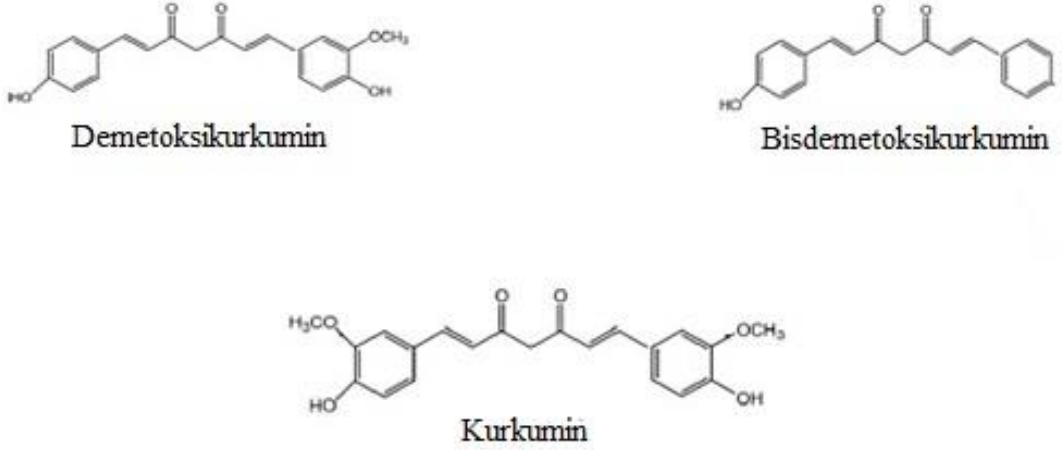
2.4. KURKUMİN

Kurkumin, zerdeçal olarak bilinen çok yıllık bir bitki olan *Curcuma longa*'nın rizomundan elde edilen polifenolik bir bileşiktir. İlk kez 1815 yılında Vogel ve Pelletier tarafından izole edilmiştir ve 1910 yılında kimyasal yapısı Lampe ve Milobedzka tarafından diferuloilmetan (1,7-bis(4-hidroksi-3-methoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion) olarak belirlenmiştir (Maheshwari, 2006; Lampe, 1918; Jurenka, 2009). Kurkuminin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri tablo 2.4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.4.1: Kurkuminin kimyasal ve fiziksel özellikleri (Aggarwal, 2003; Esatbeyoglu, 2012).

Moleküler Formül	$C_{21}H_{20}O_6$
Moleküler Ağırlık	368,39 g/mol ⁻¹
Kaynama Noktası	183 °C
Fiziksel Durum	Katı
Renk	Turuncu-sarı (nötr pH değerinde)
Koku	Kokusuz
Işığa Duyarlılık	Işığa duyarlı
Çözünürlük	Etanol, Asetik asit, Dimetilsülfoksit

Zerdeçalın sarı pigmentli kısmı kimyasal olarak kurkumin ile ilişkili olan kurkuminoidleri içermektedir. Kurkuminoidler, kurkumin (~%77), demetoksi-kurkumin (~%17) ve bisdemetoksi-kurkuminden (~%3) oluşmaktadır (Kiuchi, 1993; Ravindran, 2007). Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı şekil 2.4.1'de gösterilmiştir. Kurkumin, enolik ve β -diketonik formlarda bulunmaktadır. Çözeltide kurkumin öncelikle enol formunda bulunmaktadır ve bu durumun güçlü bir radikal süpürücü etkiye sahip olmasını sağlamaktadır (Shen, 2007).



Şekil 2.4.1: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (Pulido-Moran ve diğ., 2016).

Dünyada yaygın bir şekilde bulunan zerdeçal, özellikle Hindistan, Güneydoğu Asya, Çin ve diğer Asya ülkelerinde yetiştirilmektedir. Geleneksel olarak kurkumin, gıda maddesi, kozmetik, ilaç, peynir ve tereyağı gibi gıda maddelerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır (Aggrawal ve diğ., 2003). Zerdeçal ve doğal kurkuminoidler yüzyıllar boyunca dünyanın farklı bölgelerinde halk arasında tedavi amaçlı uygulanmaktadır. Geleneksel Hint tıbbında kurkumin astım, bronşiyal hiperaktivite gibi solunum ve karaciğer rahatsızlıkları, anoreksiya, romatizma, diyabetik yaralar, burun akıntısı, öksürük ve sinüzit tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan, antiinflamatuvar, antimitojenik, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri nedeniyle çeşitli patolojiler için tıbbi bir bitki olarak yararlanılmaktadır (Pulido-Moran ve diğ., 2016). Kurkumin, C ve E vitaminleri ile karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktivite göstermektedir. Süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen türlerini süpürücü etkiye sahip olduğu ve farklı hayvan modellerinde lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca kurkuminin katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz gibi birçok antioksidan enzim aktivitesini arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Chattopadhyay ve diğ., 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, arsenik ve kurkumin farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda 3T3 embriyonik fibroblast hücre soyuna uygulanmıştır. Arseniğin belirlenen dört farklı konsantrasyonu tek başına ve kurkumin ile birlikte uygulanarak hücre canlılığı, lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türleri, total protein tayini ve enzimatik antioksidanlar spektrofotometrik olarak araştırılmıştır.

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneyde kullanılan 3T3 embriyonik fibroblast hücre soyu 14-17 günlük gebe Balb/C farelerden elde edilmiş, tumorigenik olmayan bir hücre soyudur. Laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda haftada bir-iki kez düzenli pasajları yapılarak yetiştirilmektedir. Hücreler %10 buzağı serumu, 4,5 g/L glukoz, L-Glutamin, Sodyum Pirüvat ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş DMEM kültür medyumunda, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli ortamda, 37°C' de inkübe edilerek yetiştirilmektedir.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Deneylerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kaplarında içinde yeterli yoğunluğa ulaştıklarında haftada bir-iki defa düzenli olarak pasajları yapılmaktadır. Bu amaçla, hücreler tripsin ile 37°C'de 5 dakika muamele edildikten sonra pipetaj yapılarak toplanır ve santrifüj tüpüne aktarılır. 150 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılır. Dipte bulunan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumunu ilave edilerek, her deney için gerekli sayıda hücre kültürü kaplarına ekilir.

3.3. ARSENİK VE KURKUMİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Arseniğin 3T3 embriyonik hücre soyu üzerine uygulanan konsantrasyonları, canlıların arseniğe maruz kaldıkları konsantrasyonlar ele alınarak saptanmıştır. Arsenik, normal deney medyumunda, 0,001 μM , 0,01 μM , 0,02 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM ve 10 μM olacak şekilde 11 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır ve kontrol grubuna ise normal deney medyumunu uygulanarak konsantrasyon denemeleri yapılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanmak üzere arseniğin 0,01-0,1-1-10 μM konsantrasyonları normal deney medyumunda hazırlanmış ve kontrol gruplarına ise normal deney medyumunu uygulanmıştır (Aitio ve Becking, 2001; Petrusovski ve diğ., 2007) (Tablo 3.3.1.)

Deneilerde kurkuminin uygulanacak konsantrasyonu *in vitro* ortamdaki ortalama antioksidan konsantrasyonu olarak kullanılan 2,5 μM olarak belirlenmiştir (Cao ve diğ., 2008; Dai ve diğ., 2015). DMSO içinde çözünen kurkumin, önceden hazırlanıp -20°C derecede saklanmıştır. Hazırlanan arsenik ve arsenik+kurkumin solüsyonları 0,2 μm milipor filtre ile steril edilerek, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saat uygulanmıştır (Tablo 3.3.1.).

Tablo 3.3.1: Kontrol, A1, A2, A3, A4 ve Kurkumin uygulanan deney grupları.

Arsenik		Arsenik+Kurkumin	
Kontrol Grubu I (K)	Normal deney medyumu	Kontrol Grubu II (K+Kur)	2,5 μ M Kurkumin + Normal deney medyumu
A1	0,01 μ M As + Normal deney medyumu	A1+Kur	2,5 μ M Kurkumin + 0,01 μ M As + Normal deney medyumu
A2	0,1 μ M As + Normal deney medyumu	A2+Kur	2,5 μ M Kurkumin + 0,1 μ M As + Normal deney medyumu
A3	1 μ M As + Normal deney medyumu	A3+Kur	2,5 μ M Kurkumin + 1 μ M As + Normal deney medyumu
A4	10 μ M As + Normal deney medyumu	A4+Kur	2,5 μ M Kurkumin + 10 μ M As + Normal deney medyumu

3.4. SİTOTOKSİSİTE

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Hücreler Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlı testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Normal medyumda hazırlanmış arsenik ve arsenik+kurkuminin 4 farklı konsantrasyonu 24 saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, her kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristalleri çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mossman, 1983).

3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi

LDH hücre sitoplazmasından bulunan bir enzimdir. Hücre içi bir enzim olan LDH, hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçer. Kültürde hücrelerin ölümü ya da plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşümde NAD⁺, NADH/H⁺'ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör madde NADH/H⁺'dan H/H⁺ bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümü gerçekleştirir. Oluşan renk miktarı, hücre zarındaki hasarın derecesiyle orantılıdır. 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Normal medyumda hazırlanmış arsenik ve arsenik+kurkuminin 4 farklı konsantrasyonu 24 saat uygulanarak 37°C CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Deney süresinin tamamlanmasıyla boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan kit karışımı her kuyuya 100 µl olmak üzere eklendi. 30 dakikalık inkübasyonun ardından oluşan sitotoksositeye göre kırmızı formazan ürününün artan renginin 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede verdiği absorbansın

ölçülmesi ile sonuçlar elde edildi. Absorbans değerleri elde edildikten sonra oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edilmiştir.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH) salınımı}}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}} \times 100$$



3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Deneysel uygulamalar sonunda 6 kuyulu kültür kaplarına ekilen hücreler (5×10^5) kaldırılarak, Tris-HCl tamponuna (pH:7,2) alındı. Daha sonra ultrasonikatör ile sonike edilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanmış ve elde edilen hücre süspansiyonu 14000 g'de Nüve marka soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant alındı. Alınan süpernatantlar, lipit peroksidasyonunun, total protein miktarının, hidroksil radikalının, hidrojen peroksitin, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzimlerinin ölçülmesi için kullanıldı.

3.5.1. Membran Lipit Peroksidasyonunun Tayini

Lipit peroksidasyonunun miktarı Devasagayam ve Tarachand (1987)'in yönteminde olduğu gibi örnekteki malondialdehit içeriğine göre ölçülmüştür. Deneyin prensibi poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan malondealdehit (MDA)'in sıcak ortamda Tiyobarbütirik asit (TBA) ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

3.5.1.1. Kullanılan Çözeltiler

%10 Triklorasetik asit (TCA) ve %0.375 Tiyobarbütirik asit (TBA) 0,25 N Hidroklorik asit içinde hazırlanır.

Deney karışımı olarak 0,5 ml 0,15 M Tris-HCl tamponu (pH 7,4) ve 0,15 ml 10 mM KH_2PO_4 kullanılır.

3.5.1.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
Deney Karışımı	0,65 ml	0,65 ml
TCA	0,5 ml	0,5 ml
TBA	0,75 ml	0,75 ml

Örnek ve kör tüplerine deney karışımı konup 37°C çalkalayıcı su banyosunda 20 dk inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon TCA eklenerek durduruldu. Tüpler iyice çalkalanarak TBA eklendi ve 20 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra soğutulan tüpler 10 dakika 2000 g'de santrifüj edilip, süpernatantın absorbensı 532 nm'de köre karşı okundu.

3.5.2.3. Hesaplama

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = \frac{V_{\text{toplam}} \times A_{\text{örnek}} \times 10^6 \times df}{V_{\text{örnek}} \times \epsilon_{\text{mM}} \times LP}$$

TBARS için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{\text{mM}} = 1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbensı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.2. Hidroksil Radikalinin Tayini

Hidroksil radikali üretimi Puntarulo ve Cederbaum (1988)'un yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem demir komplekslerinin varlığında üretilen hidroksil radikalının NADPH ve DMSO varlığında formaldehit oluşturulması ve oluşan formaldehitin TCA ile reaksiyona girerek 570 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır.

3.5.2.1 Kullanılan Çözeltiler

1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7), 0,1 M MgCl₂, 10 mM Sodyum azid, 4 mM DMSO, 4 mM NADPH ve 0,25 N Hidroklorik asit içinde hazırlanan %10 Triklorasetik asit (TCA) çözelti olarak kullanılır.

3.5.2.2.Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,25 ml	—
Tris Tamponu	—	0,25 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,1 ml	0,1 ml
Sodyum Azid	0,05 ml	0,05 ml
DMSO	0,05 ml	0,05 ml
NADPH	0,05 ml	0,05 ml
MgCl₂	0,05 ml	0,05 ml
TCA	0,15 ml	0,15 ml

Örnek ve kör tüplerine sodyum fosfat tamponu, MgCl₂, sodyum azid, DMSO ve NADPH ve hücre süspansiyonu konduktan sonra tüpler hafifçe çalkalandı ve 10 dk 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra sonra reaksiyon TCA eklenerek durduruldu ve tüpler 30 dk kaynayan su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler soğutulularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.2.3 Hesaplama

$$\text{Dakikada oluşan } \mu\text{mol Hidroksil radikali} = \frac{A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df}{\epsilon m M \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

$\epsilon m M = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df : Sulandırma katsayısı

LP : Işık yolu

3.5.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Tayini

Hidrojen Peroksit tayini Holland ve Storey (1981)’in yöntemine göre yapıldı. Bu yöntem asitlenmiş ferrositokrom c’nin oksidasyonu sonucu artan sapmanın 550 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır.

3.5.3.1. Kullanılan Çözeltiler

Deney karışımı olarak 20 mM Tris-HCl, 113 mM KCl, 0,4 mM EDTA, 15 mM KH₂PO₄ ve 98 μ M ferrositokrom c kullanılır.

3.5.3.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,02 ml	—
Tris Tamponu	—	0,02 ml
Deney Karışımı	0,1 ml	0,1 ml

Örnek ve kör tüplerine Tris-HCl, KCl, EDTA, KH₂PO₄, Ferrositokrom c'den oluşan deney karışımı ve hücre süspansiyonu konduktan sonra hemen 550 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.3.3. Hesaplama

$$\mu\text{mol/ml H}_2\text{O}_2 = \frac{A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

$$\epsilon_{\text{mM}} = 19,1 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.4. Total Protein Tayini

Bu işlem için The SMART™ BCA protein assay kit kullanılmıştır. SMART™ BCA protein test kiti, total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktarının tayini için bikinkoninik asite (BCA) dayanan bir metottur. Bu testte, mor renkli reaksiyon ürünü, bir bakır iyonu ile iki BCA molekülünün bağlanmasıyla oluşur. Bu suda çözünür kompleks 562 nm'de geniş bir çalışma aralığında (20-2000 µg / ml) artan protein konsantrasyonları ile güçlü bir absorpsiyon sergilemektedir.

Proteinlerin makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve belirli dört amino asidin (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) varlığı BCA ile renk oluşumundan sorumludur. Buna göre, protein konsantrasyonları genellikle sığır serum albümini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartlarına referansla belirlenir. Bilinen konsantrasyondaki bir standart protein çözeltisinden seyreltilerek oluşturulan farklı konsantrasyonlardaki standartlar referans alınarak bir standart eğri çizilir ve bilinmeyen konsantrasyondaki örneğin protein içeriği hesaplanır. Protein örneklerinin konsantrasyonları kitin önerdiği protokole göre yapılmış ve örneklerin konsantrasyonunun belirlenmesinde 0 µg/ml (Blank) ile 2000 µg/ml konsantrasyonları arasında standartlar oluşturularak hesaplanmıştır.

3.5.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini

Süperoksit dismutaz enzimi gösterilmesi için Marklund ve Marklund (1974)'un yöntemi kullanıldı. Deneyin prensibi pyrogallolün otooksidasyonunun SOD enzimi tarafından inhibe edilmesi esasına dayanır.

3.5.5.1. Kullanılan Çözeltiler

0,05 M Tris Tamponu (pH 8,5) ve 29 mM pyrogallol çözelti olarak kullanılır.

3.5.5.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpler, aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,05 ml	—
Tris Tamponu	1,4 ml	1,45 ml
Pyrogallol	0,05 ml	0,05 ml

Örnek ve kör tüplerindeki absorbans değişimi çözeltiler konduktan sonra 3 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla 420 nm’de spektrofotometrede okunur.

3.5.5.3. Hesaplama

Körün absorbans değişimi: ΔA

Örneğin absorbans değişimi: ΔB

$$\Delta A = \frac{A_{\text{son}} - A_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}}$$

$$\Delta B = \frac{B_{\text{son}} - B_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}}$$

$$\text{SOD'un \%50 inhibisyon miktarı} = \frac{(\Delta A - \Delta B) \times 100}{\Delta A \times 50}$$

3.5.6. Katalaz Tayini

Katalaz gösterilmesi için Sinha (1972)’nin yöntemi kullanıldı. Katalaz enzimi hücre için çok zararlı olan hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve moleküler oksijene dönüştürür. Deney prensibi H_2O_2 'nin dikromat/asetik asit belirteci ile oluşturduğu koyu mavi-mor çökeltinin kaynatılarak açık yeşil renge dönüştürülmesi esasına dayanır. Bu açık yeşil renk 570 nm dalga boyunda absorbans verir.

3.5.6.1. Kullanılan Çözeltiler

0,01 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7), 2 M H₂O₂ ve dikromat/asetik asit belirteci çözelti olarak kullanılır.

Dikromat/asetik asit belirteci: 5 gr potasyum dikromat 100 ml ultra saf suda çözülür. Bu karışıma yavaşça 300 ml glasiyal asetik asit eklenir.

3.5.6.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,1 ml	—
Tris Tamponu	—	0,1 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,5 ml	0,5 ml
H₂O₂	0,4 ml	0,4 ml
Dikromat/Asetik Asit Belirteci	0,2 ml	0,2 ml

Örnek ve kör tüplerine sodyum fosfat tamponu, H₂O₂ ve hücre süspansiyonu konduktan sonra tüpler hafifçe çalkalandı. Daha sonra dikromat/asetik asit belirteci eklenir ve tüpler 10 dk kaynayan su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler soğutularak 570 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.6.3. Hesaplama

$$\text{Tüketilen H}_2\text{O}_2 = \frac{A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

H₂O₂ için molar ekstinksiyon katsayısı: $\epsilon_{\text{mM}} = 1.88 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

V_{toplam}: Toplam hacim

V_{örnek}: Kullanılan örnek hacmi

A_{örnek}: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.7. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Tayini

Glutasyon peroksidaz gösterilmesi için Hafeman ve diğerlerinin (1974) yöntemi kullanıldı. Bu deney prensibi GPx enzimi tarafından tüketilen glutasyonun 5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) belirteci ile 412 nm dalga boyunda ölçülebilir bir bileşik oluşturma esasına dayanır.

3.5.7.1. Kullanılan Çözeltiler

0,4 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH 7) (0,4 mM EDTA içerir), 2 mM Redükte glutasyon, 10 mM Sodyum azid, 1,25 mM H₂O₂, DTNB belirteci, 0,4 M Sodyum fosfat solüsyonu (Na₂HPO₄) ve 0,25 N Hidroklorik asit içinde hazırlanan %10 Triklorasetik asit (TCA) çözelti olarak kullanılır.

DTNB belirteci: 40 mg DTNB 100 ml %1 sodyum sitrat içinde çözülür. Bu belirteç ışıktan korunur.

3.5.7.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,15 ml	—
Tris Tamponu	—	0,15 ml
Sodyum Fosfat Tamponu	0,5 ml	0,5 ml
Redükte Glutasyon	0,5 ml	0,5 ml
Sodyum Azid	0,5 ml	0,5 ml
Ultrasaf Su	0,6 ml	0,6 ml

Örnek ve kör tüplerine deney karışımı konduktan sonra tüpler 5 dakika 37°C'de inkübe edilir. Daha sonra 0,5 ml H₂O₂ eklenir ve 3 dk 37°C'de inkübe edilir. Bunun ardından 1 ml TCA eklenerek 1500 g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatanttan 0,2 ml alınır ve buna 0,2 ml Na₂HPO₄ solüsyonu ve 0,1 ml DTNB eklenerek 412 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

3.5.7.3 Hesaplama

$$\text{Tüketilen glutasyon} = \frac{A_{\text{örnek}} \times V_{\text{toplam}} \times df}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

DTNB için molar ekstinksiyon katsayısı: ϵ_{mM} : 13600 M⁻¹cm⁻¹

V_{toplam} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df: Sulandırma katsayısı

LP: Işık yolu

3.5.8. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Tayini

Glutasyon-S-transferaz (GST) gösterilmesi için Habig ve diğerlerinin (1974) yöntemi kullanıldı. GST enzimi glutasyon ve 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) varlığında Glutasyon-DNB konjugatı oluşturur. Deney prensibi oluşan bu Glutasyon-DNB konjugatının 340 nm dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanır. Artan absorpsiyon oranı GST enzimi aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir.

3.5.8.1. Kullanılan Çözeltiler

0,1 M Potasyum Fosfat Tamponu (pH 6,5), 0,1 M CDNB, 0,2 M Redükte Glutasyon ve deney karışımı çözelti olarak kullanılır.

Deney Karışımı: 9,8 ml Potasyum Fosfat Tamponu, 0,1 ml Redükte Glutasyon ve 0,1 ml CDNB kullanılarak hazırlanır. Bu hazırlanan karışım 50 tüp içindir.

3.5.8.2. Uygulama

Örnek ve kör tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

	ÖRNEK(ml)	KÖR(ml)
Hücre Ekstresi	0,02 ml	—
Tris Tamponu	—	0,02 ml
Deney Karışımı	0,18 ml	0,18 ml

Örnek ve kör tüplerindeki absorbans değişimi çözeltiler konduktan sonra 5 dakika boyunca 60 saniye aralıklarla 340 nm'de spektrofotometrede okunur.

3.5.8.3. Hesaplama

Dakikadaki absorbans değişimi: ΔA

$\epsilon m M$: $5,3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

V_{toplaml} : Toplam hacim

$V_{\text{örnek}}$: Kullanılan örnek hacmi

$A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı

df : Sulandırma katsayısı

LP : Işık yolu

$$\Delta A = \frac{A_{\text{son}} - A_{\text{ilk}}}{T_{\text{son}} - T_{\text{ilk}}}$$

$$\text{GST spesifik aktivitesi} = \frac{(\Delta A_{\text{örnek}} - \Delta A_{\text{blank}}) \times V_{\text{toplaml}} \times df}{\epsilon m M \times V_{\text{örnek}} \times LP}$$

3.6. İSTATİSTİK ANALİZ

Deney gruplarında uygulanan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı, hücre sitotoksitesi, malondialdehit miktarı, total protein miktarı, hidroksil radikali miktarı, hidrojen peroksit miktarı, süperoksit dismutaz enzimi, katalaz enzimi, glutatyon peroksit enzimi ve glutatyon-S-transferaz enziminin konsantrasyona bağlı değişen verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

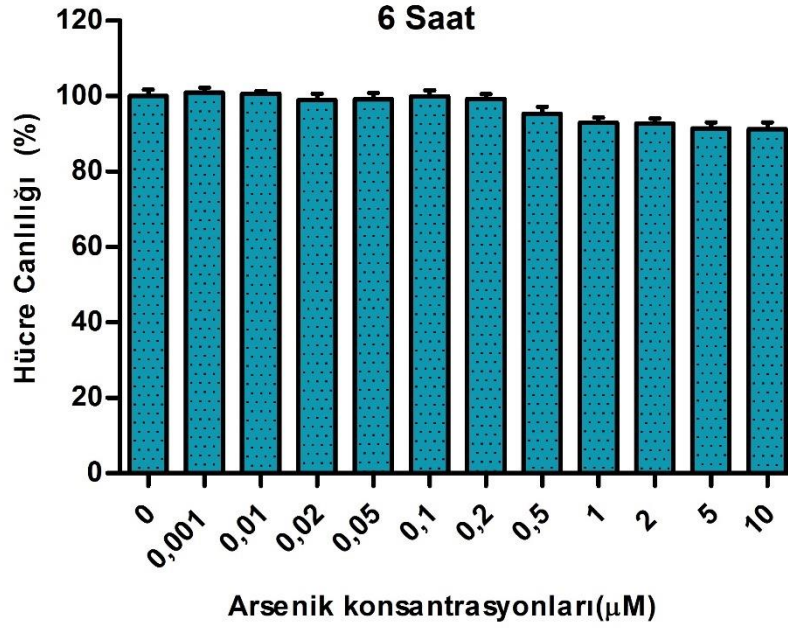


4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

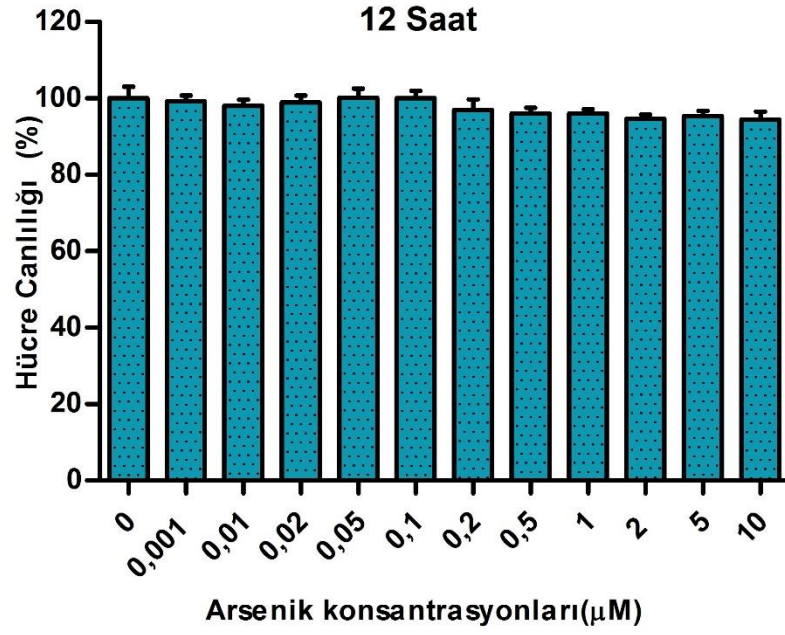
4.1.1. MTT Bulguları

Arseniğin on bir farklı konsantrasyonun (0,001 – 0,01 – 0,02 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 – 2 – 5 ve 10 μM) 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süresince uygulandı ve hücre canlılığına etkisi MTT testiyle spektrofotometrik olarak tespit edildi. Kontrol grubu ve arseniğin on bir farklı konsantrasyonu MTT değerleri bakımından 6 saat sonunda karşılaştırıldığında şekil 4.1.1.1’de görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.



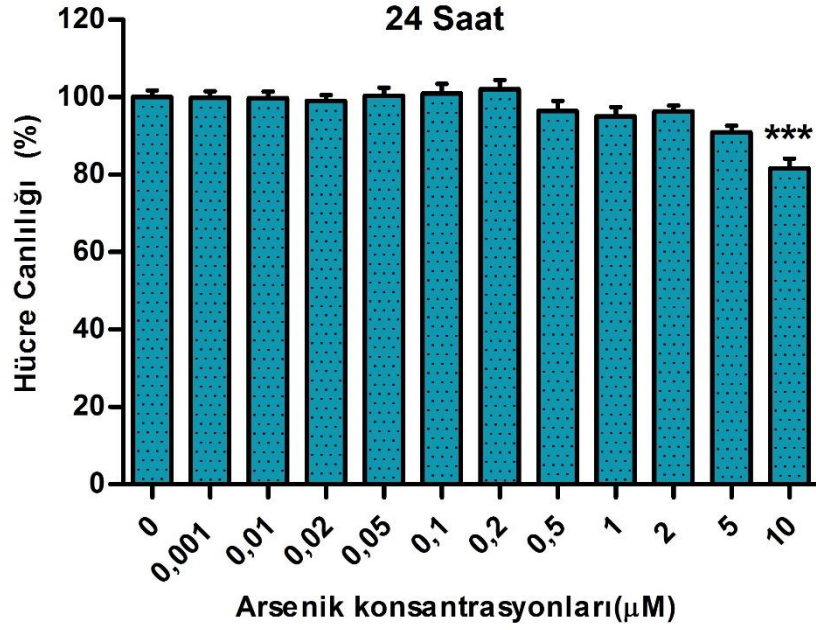
Şekil 4.1.1.1: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 6 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri.

Arseniğin on bir farklı konsantrasyonunun 12 saat boyunca 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında şekil 4.1.1.2’de görüldüğü gibi kontrole göre anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.



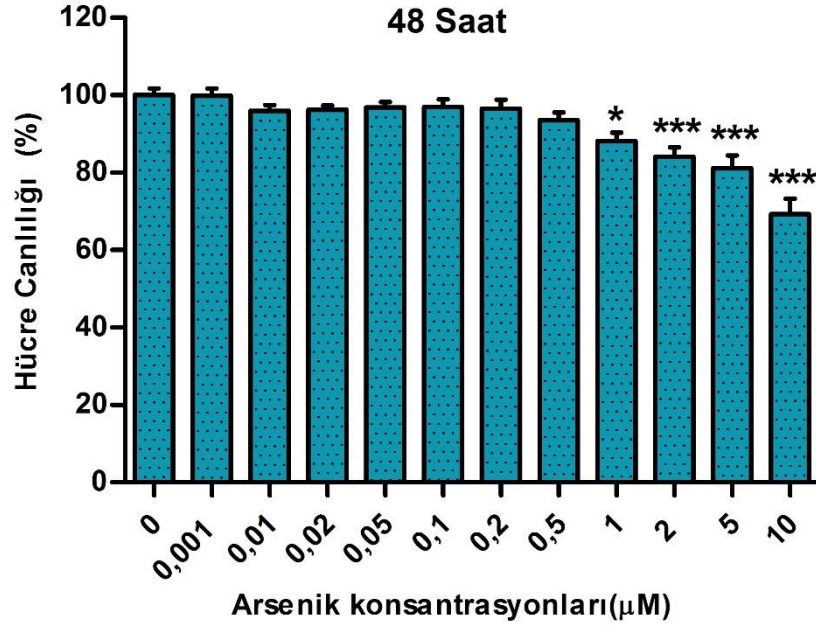
Şekil 4.1.1.2: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 12 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri.

Arseniğin on bir farklı konsantrasyonunun 24 saat boyunca 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında şekil 4.1.1.3’de görüldüğü gibi arseniğin 10 μM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür.



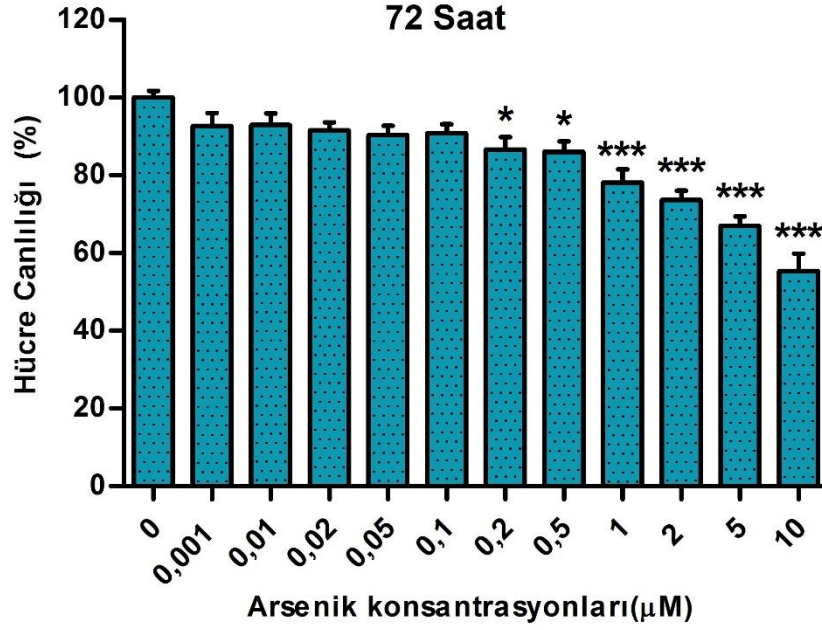
Şekil 4.1.1.3: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 24 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (***) $p < 0,001$).

Arseniğin on bir farklı konsantrasyonunun 48 saat boyunca 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında şekil 4.1.1.4’de görüldüğü gibi arseniğin 1 μM ve üzeri konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür.



Şekil 4.1.1.4: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 48 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Arseniğin on bir farklı konsantrasyonunun 72 saat boyunca 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında şekil 4.1.1.5’de görüldüğü gibi arseniğin 0,2 μM ve üzeri konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür.



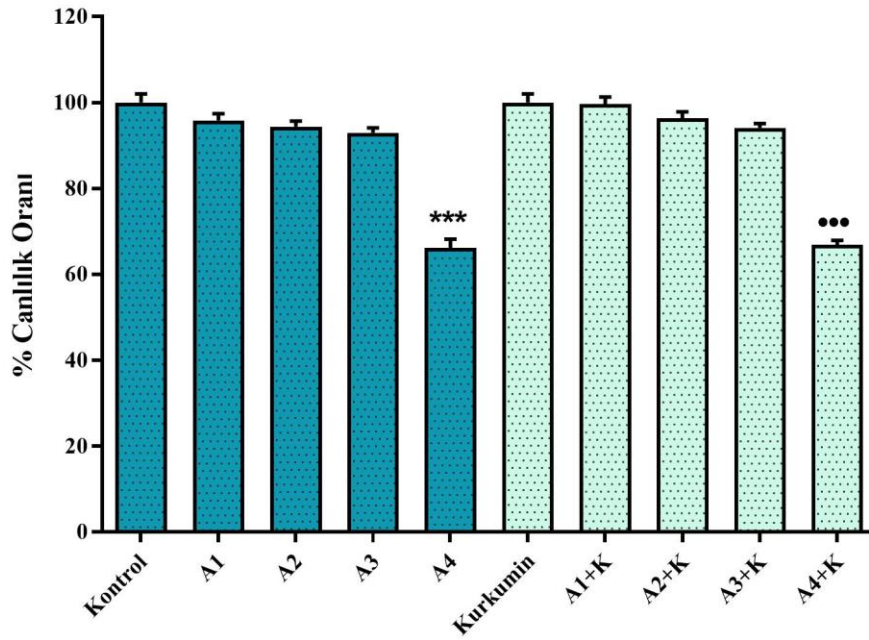
Şekil 4.1.1.5: Arseniğin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde 72 saat maruziyet sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Arseniğin 0,001 μM ile 10 μM aralığındaki on bir farklı konsantrasyonuyla yapılan konsantrasyon denemeleri sonucunda, MTT sonuçlarına dayanılarak 6, 12, 24, 48 ve 72 saat için %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerleri tablo 4.1.1.1’de verilmiştir. IC50, bir maddenin belirli bir biyolojik ya da biyokimyasal fonksiyonun yarısını inhibe edici konsantrasyon ölçüsüdür. Bu niceliksel ölçüm belirli bir biyolojik işlemi (örneğin bir enzim, hücre, hücre reseptörü veya mikroorganizma bileşenini) yarıya kadar inhibe etmek için belirli bir ilacın veya maddenin ne kadarının gerekli olduğunu gösterir. Bu çalışmada arsenik grupları ile kontrol grubunun absorbans değerleri kıyaslanarak % cinsinden ölen hücre sayısı (IC50 değeri) hesaplandı. Bu tez çalışmasından kullanılacak olan dört farklı (0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM) arsenik konsantrasyonuna, hücre canlılığı sonuçları temel alınarak karar verilmiştir.

Tablo 4.1.1.1: Arsenik maddesinin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri.

Arseniğin Uygulanma Süresi	IC50 Değeri
6 Saat	---
12 Saat	---
24 Saat	52,05 μM
48 Saat	55,53 μM
72 Saat	25,79 μM

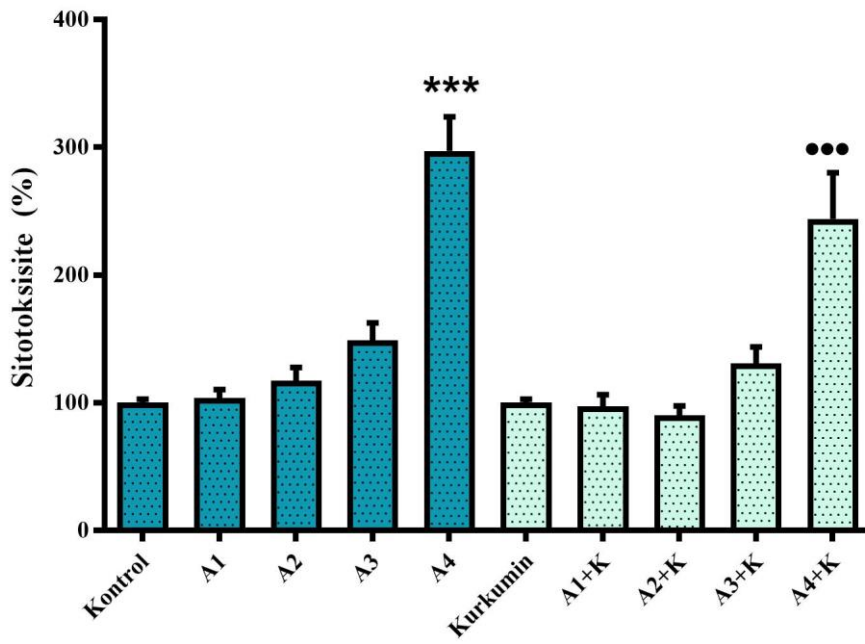
Arseniğin dört farklı konsantrasyonu ve kurkumin ile birlikte 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 24 saatte hücre canlılığına olan etkisi MTT testi yapılarak tespit edildi. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.1.1.6'da verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol ve dört farklı arsenik grubu MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre A1, A2 ve A3 gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken A4 grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu MTT değerleri bakımından karşılaştırıldığında, kurkumin grubuna göre A1+K, A2+K ve A3+K gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, A4+K grubunda anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,001$).



Şekil 4.1.1.6: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde % canlılık üzerine (konsantrasyona bağlı) etkileri (** $p<0,001$; *:kontrolle göre; ●: kurkumine göre).

4.1.2. Laktat Dehidrogenaz Bulguları

3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak NAPH^+ 'daki azalma hızı oranına bağlı olarak hesaplanan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı şekil 4.1.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre A1, A2 ve A3 gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken A4 grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında, kurkumin grubuna göre A1+K, A2+K ve A3+K gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, A4+K grubunda anlamlı bir artış görülmektedir ($p < 0,001$).

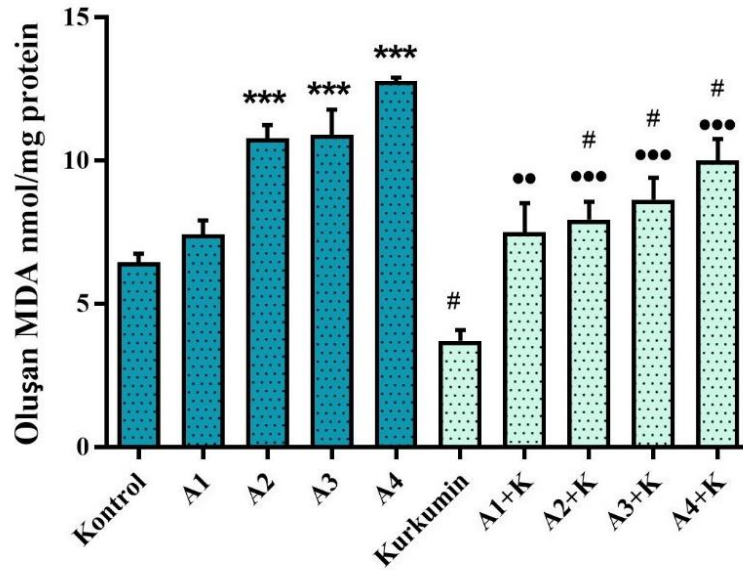


Şekil 4.1.2.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (*** $p < 0,001$; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre).

4.2. OKSİDATİF HASAR BULGULARI

4.2.1. Lipit Peroksidasyonu

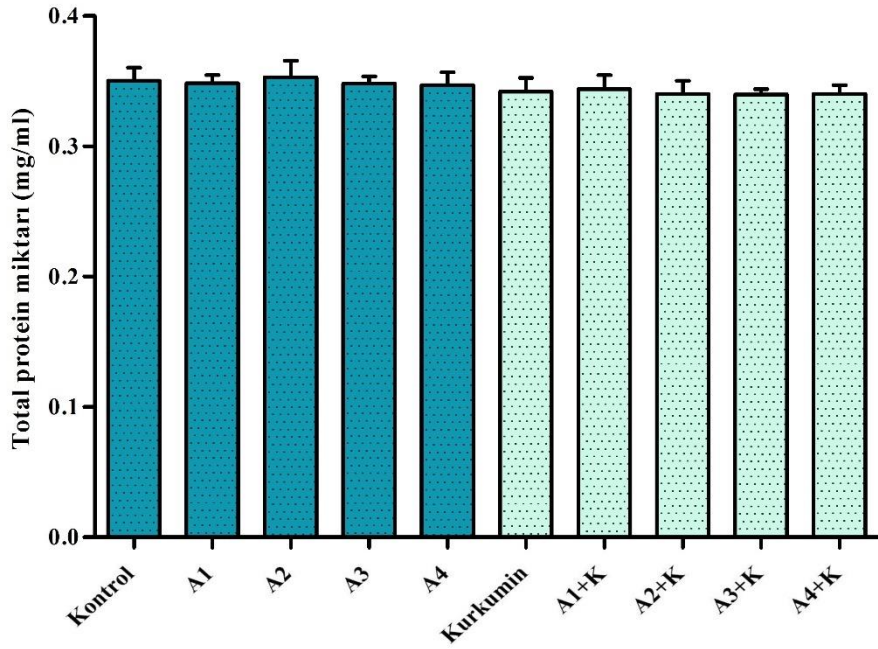
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan malondialdehit miktarları şekil 4.2.1.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu malondialdehit miktarları bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre A1 grubunda anlamlı bir fark bulunmazken, diğer tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu malondialdehit miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Kontrol grubu ile kurkumin grubu, A2 ile A2+K, A3 ile A3+K ve A4 ile A4+K grupları arasında malondialdehit miktarları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.2.1.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki lipit peroksidasyonuna (konsantrasyona bağlı) etkileri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; *:kontrolle göre; •: kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.2. Total Protein Miktarı

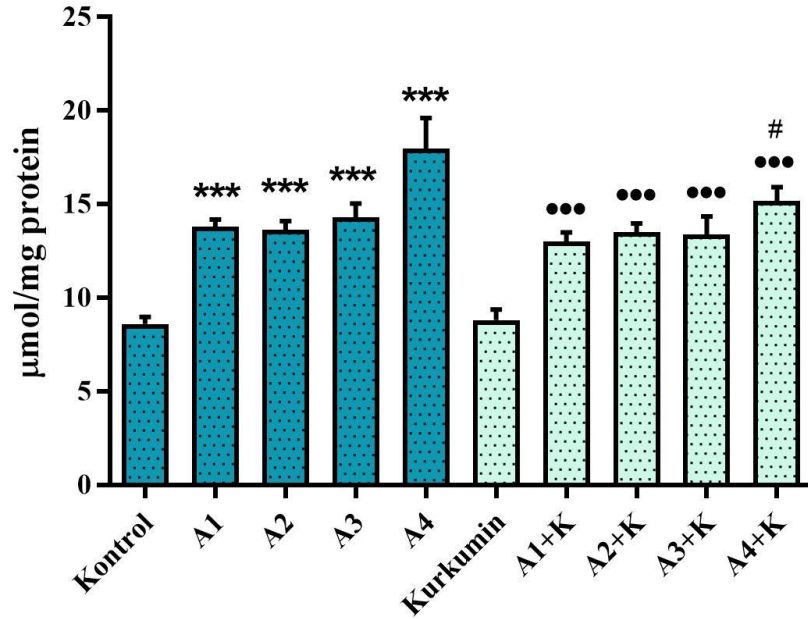
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan total protein miktarı şekil 4.2.2.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu total protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu total protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında kurkumin grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.2.2.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki total protein miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri

4.2.3. Hidroksil Radikali

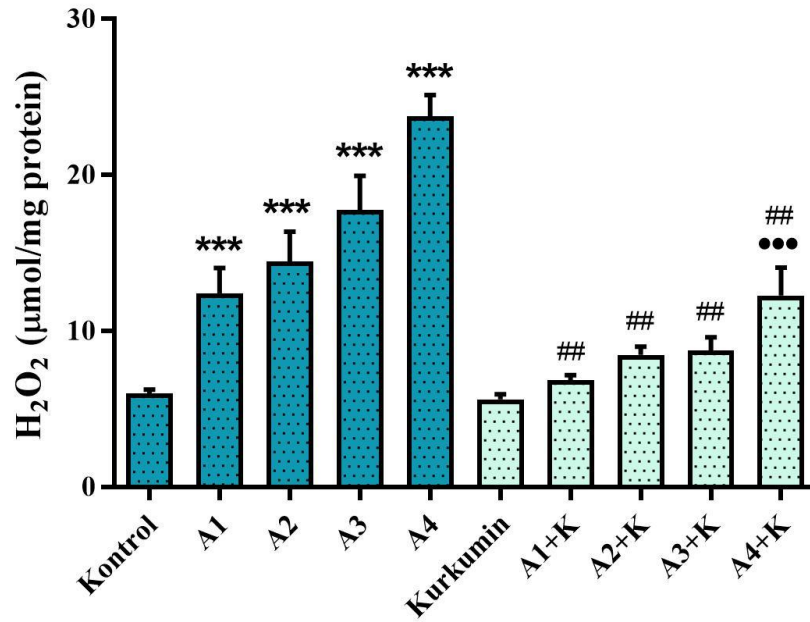
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan hidroksil radikali değerleri şekil 4.2.3.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu hidroksil radikali bakımından karşılaştırıldığında kontrole grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu hidroksil radikali bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). A4 ve A4+K grupları hidroksil radikali bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.2.3.1: Arsenik ve kurkuminin oksidatif hasara bağlı olarak 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oluşan hidroksil radikali miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri (* $p<0,05$; *** $p<0,001$; *:kontrolle göre; •: kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.4. Hidrojen Peroksit

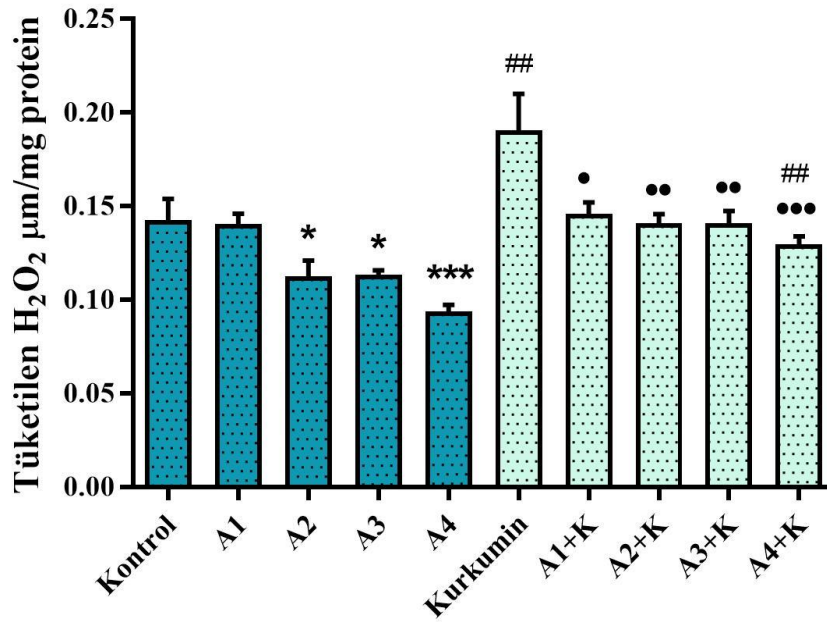
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan hidrojen peroksit değerleri şekil 4.2.4.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu hidrojen peroksit miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrole grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu hidrojen peroksit bakımından karşılaştırıldığında A1+K, A2+K ve A3+K gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, A4+K grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,001$). A1 ile A1+K, A2 ile A2+K, A3 ile A3+K ve A4 ile A4+K grupları hidrojen peroksit bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,01$).



Şekil 4.2.4.1: Arsenik ve kurkuminin oksidatif hasara bağlı olarak 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oluşan hidrojen peroksit miktarına (konsantrasyona bağlı) etkileri (** $p<0,01$; *** $p<0,001$; *:kontrole göre; •: kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.5. Katalaz Enzim Aktivitesi

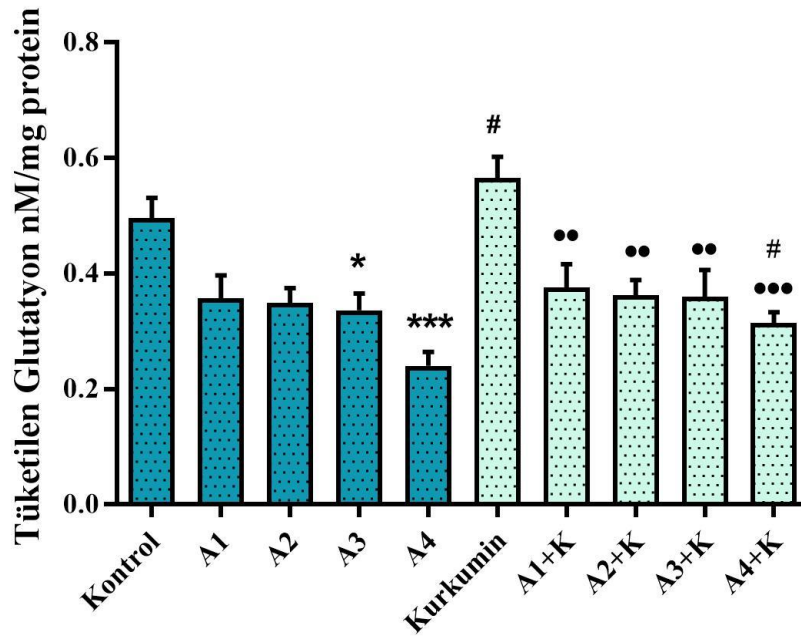
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak hesaplanan katalaz enzimi miktarı şekil 4.2.5.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu katalaz enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre A1 grubunda anlamlı bir fark bulunmazken diğer tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu katalaz enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$). Kontrol grubu ve kurkumin grubu ile A4 ve A4+K grupları katalaz enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0,01$).



Şekil 4.2.5.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde tüketilen H_2O_2 miktarına bağlı olarak değişen katalaz enzimi aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; *:kontrolle göre; •:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.6. GPx Enzim Aktivitesi

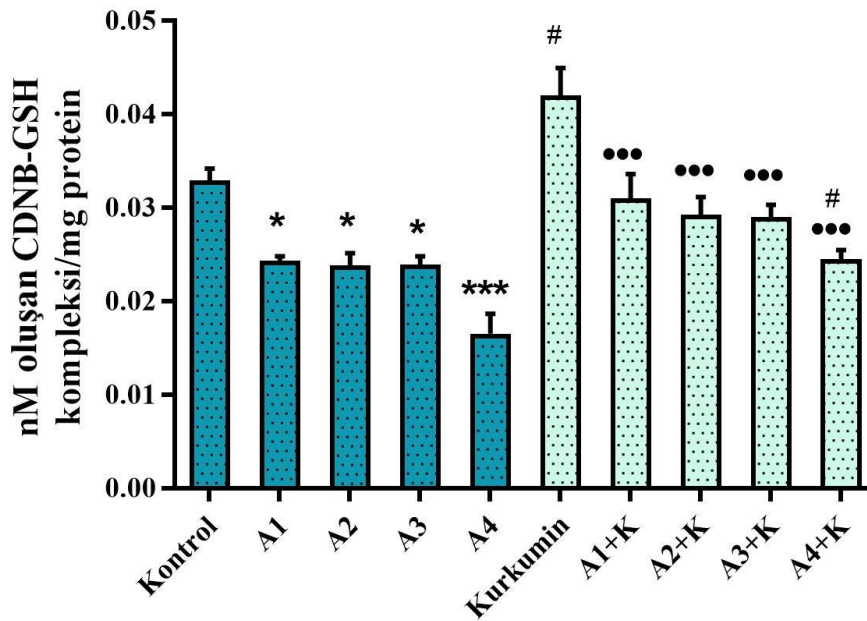
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak tüketilen glutasyon miktarına bağlı olarak hesaplanan GPx enzimi miktarı şekil 4.2.6.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu GPx enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrole grubuna göre A1 ve A2 gruplarında anlamlı bir fark bulunmazken, A3 ve A4 gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu GPx enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,01$, $p<0,001$). Kontrol grubu ve kurkumin grubu ile A4 ve A4+K grupları GPx enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.2.6.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki glutasyon peroksidaz aktiviteleri (konsantrasyona bağlı) (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; *:kontrolle göre; •:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.7. GST Enzim Aktivitesi

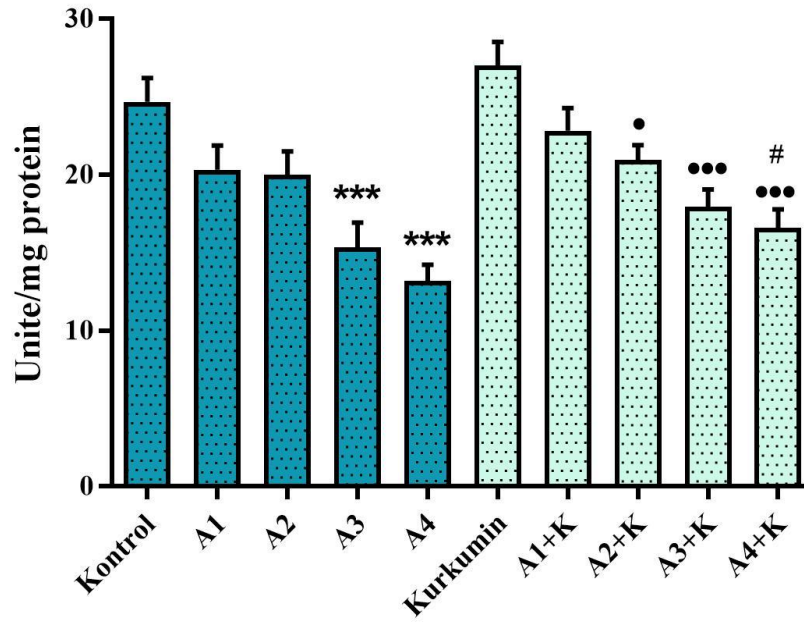
3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak dakikada oluşan CDNB-GSH kompleksinin miktarına bağlı olarak hesaplanan GST enzimi miktarı şekil 4.2.7.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu glutatyon-s-transferaz enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrole grubuna göre tüm arsenik gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu glutatyon-s-transferaz enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,001$). Kontrol grubu ve kurkumin grubu ile A4 ve A4+K grupları glutatyon-s-transferaz enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.2.7.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki glutatyon S-transferaz aktiviteleri (konsantrasyona bağlı) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; *:kontrolle göre; ●:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

4.2.8. SOD Enzim Aktivitesi

3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan SOD enzimi miktarı şekil 4.2.8.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve dört farklı arsenik grubu SOD enzimi miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre A1 ve A2 konsantrasyonunda anlamlı bir fark bulunmazken diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,001$). Kurkumin grubu ve dört farklı arsenik+kurkumin grubu SOD enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında kurkumin grubuna göre A1+K grubunda anlamlı bir fark bulunmazken, A2+K, A3+K ve A4+K gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$, $p<0,001$). Ayrıca A4 grubu ile A4+K grubu SOD enzim miktarı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.2.8.1: Arsenik ve kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerindeki süperoksit dismutaz aktivitesine (konsantrasyona bağlı) etkileri (* $p<0,05$; *** $p<0,001$; *:kontrolle göre; •:kurkumine göre; #:kurkumin+arsenik grupları yalnız arsenik gruplarına göre).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ağır metaller sahip oldukları toksisiteden dolayı önemli çevresel kirleticilerdir. Bir ağır metal olan arsenik ve bileşenlerine insanlar doğal veya antropojenik kaynaklar yoluyla maruz kalmaktadır (Mandal ve diğ., 2002). Arseniğin reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini uyararak toksisiteye neden olması, sitotoksik, genotoksik ve karsinojenik etkileri birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur (Yang ve diğ., 2007; El-Demerdash ve diğ., 2009; Bera ve diğ., 2010; Lii ve diğ., 2011; Khan ve diğ., 2012; Mathews ve diğ. 2012; Alarifi ve diğ., 2013; Chen ve diğ., 2013; Jiang ve diğ., 2013; Khan ve diğ., 2013; Zhu ve diğ., 2014; Momeni ve diğ., 2017; Orta Yılmaz ve diğ., 2018; Rahman ve diğ., 2018). Yapılan bu çalışmalar bu konudaki bilinmeyenleri tespit etmiştir. Ancak 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde arseniğin oluşturduğu hasara ve bu hasara kurkuminin etkilerini gösteren *in vitro* çalışma bulunmamaktadır.

Arseniğin hücre canlılığına etkisiyle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Yang ve diğ., 2007; Bera ve diğ., 2010; Lii ve diğ., 2011; Khan ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2013; Jiang ve diğ., 2013; Khan ve diğ., 2013; Zhu ve diğ., 2014; Orta Yılmaz ve diğ., 2018). Kültüre edilmiş insan akciğer adenokarsinoma hücrelerine (A549) 0,125-100 μM konsantrasyonlarında 24 saat süreyle sodyum arsenit uygulanmış ve 10 μM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (Jiang ve diğ., 2013). Bir diğer çalışmada insan embriyo akciğer fibroblast hücrelerine (HELFL) 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında sodyum arsenit 3, 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 3 ile 6 saat maruziyet sonucunda sodyum arsenitin hücre canlılığını etkilemediği, 12, 24 ve 48 saat sonucunda 0,5 μM konsantrasyon sodyum arsenitin hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlenmiştir. 12 saat sonucunda 10 μM konsantrasyon, 24 ve 48 saat sonucunda ise 5 μM ve 10 μM konsantrasyon sodyum arsenitin ise hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Yang ve diğ., 2007). Yapılan başka bir çalışmada ise kültüre edilmiş fare Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücrelerine 50 ppb ve 1000 ppb konsantrasyonda sodyum arsenit 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre 24, 48 ve 72 saat maruziyet sonucunda tüm konsantrasyonlardaki sodyum arsenitin Leydig ve Sertoli hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Orta Yılmaz ve diğ., 2018). Lii ve diğ. yaptıkları çalışmada insan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVECs) 0,5 μM , 5 μM ve 50 μM konsantrasyonlarda 30 dakika, 4, 8, ve 24 saat süreyle sodyum arsenit

uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 30 dakika ve 4 saat maruziyet sonucunda sodyum arsenitin hücre canlılığını etkilemediği bildirilmiştir. 8 ve 24 saat maruziyet sonucunda ise 50 μM konsantrasyon sodyum arsenitin ise hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Lii ve diğ., 2011). İnsan bronş epitel hücreleri (HBE) ile yapılmış bir çalışmada, 24 saat süreyle 30 μM konsantrasyonda sodyum arsenit maruziyeti sonucunda hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2013). Kültüre edilmiş sıçan insülinoma hücreleri (INS-1) ile yapılan bir çalışmada ise 24 saat süreyle 0-4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 2 μM ve 4 μM uygulanan konsantrasyonlarda sodyum arsenitin hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Zhu ve diğ., 2014).

Kültüre edilmiş yetişkin sıçan karaciğer hücreleriyle yapılan çalışmada 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit ve ek olarak 10 μM konsantrasyon vitamin C 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin uygulandığı gruplarda hücre canlılığı anlamlı olarak azaldığı bulunmuşken, vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda hücre canlılığının sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Bera ve diğ., 2010). Khan ve diğ. yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş fare dalak hücrelerine 5 μM konsantrasyon sodyum arsenit ve ek olarak 5 ile 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon kurkumin 12 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda hücre canlılığının sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Khan ve diğ., 2012). Bir diğer çalışmada kültüre edilmiş fare Sertoli hücrelerine 5 μM konsantrasyon sodyum arsenit ve ek olarak 5 ile 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon kurkumin 12 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda ise hücre canlılığının sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Khan ve diğ., 2013).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlarda sodyum arsenite maruziyet sonucunda anlamlı azalmalar görülürken, yapılan bu *in vitro* çalışmada, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde sodyum arsenitin 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyonları uygulanması sonucunda, sodyum arsenitin sadece 10 μM konsantrasyonunun 3T3 embriyonik

fibroblast hücrelerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur. Sodyum arsenitin bu dört farklı konsantrasyonuna antioksidan olarak 2,5 μM kurkumin ilave edilmesiyle oluşturulan gruplarda ise sadece 10 μM konsantrasyon sodyum arsenite ilave 2,5 μM kurkumin uygulanan grupta hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Elde edilen veriler Bera ve diğ. (2010) kültüre edilmiş yetişkin sıçan karaciğer hücrelerine sodyum arsenit ve sodyum arsenite ilave olarak uyguladıkları vitamin C çalışmasının, Khan ve diğ. (2012) kültüre edilmiş fare dalak hücrelerine sodyum arsenit ve sodyum arsenite ilave olarak uyguladıkları kurkumin çalışmasının ve Khan ve diğ. (2013) kültüre edilmiş fare Sertoli hücrelerine sodyum arsenit ve sodyum arsenite ilave olarak uyguladıkları kurkumin çalışmasının hücre canlılığını artırması sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Laktat dehidrogenaz (LDH), hücre sitoplazmasında bulunan ve plazma zarı hasar gördüğünde hücre içinden dış alana geçen bir enzimdir. *In vitro* çalışmalarda hücrelerin ölümü ya da plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır (Lappalainen ve diğ., 1994; Chan ve diğ., 2013). Arseniğin sebep olduğu süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri hücrelerin zar bütünlüğünün bozulmasına ya da hücre ölümüne yol açmaktadır. Hücre zarında oksidatif strese bağlı olarak oluşan hasar LDH seviyesinin artmasına neden olmaktadır (De Vizcaya-Ruiz ve diğ., 2009). Kültüre edilmiş insan karaciğer karsinoma hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 0,1, 0,5, 2,5, 5, 10, ve 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon arsenik trioksit uygulanmıştır. Çalışma sonucuna göre 48 saat maruziyet sonucunda 0,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon arsenik trioksitten itibaren laktat dehidrogenaz aktivitesi anlamlı olarak arttırdığı bildirilmiştir. 24 saat maruziyet sonucunda ise arsenik trioksitin 2,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundan itibaren laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir artış olduğu ortaya konmuştur (Alarifi ve diğ., 2013). 2018 yılında yapılan bir çalışmada kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 50 ppb ve 1000 ppb konsantrasyonda sodyum arsenit 24 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre Leydig ve Sertoli hücrelerine 24 saat maruziyet sonucunda 50 ppb sodyum arsenit konsantrasyonunda laktat dehidrogenaz aktivitesini etkilemediğini tespit etmişlerdir. 1000 ppb sodyum arsenit konsantrasyonunda ise laktat dehidrogenaz aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (Orta Yılmaz ve diğ., 2018). Rahman ve diğ. (2018) kültüre edilmiş sıçan böbrek üstü bezi hücreleri (PC12) ile yaptıkları çalışmada 48 saat süreyle 10 μM konsantrasyonda sodyum arsenit uygulanmıştır. Çalışma sonucunda laktat dehidrogenaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Rahman ve diğ., 2018). Yapılan bir başka çalışmada kültüre edilmiş sıçan kardiyomiyosit hücrelerine 24 süreyle 10 μM konsantrasyonda

arsenik trioksit ve arsenik trioksite ilave olarak 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyon resveratrol uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda arsenik trioksitin tek başına uygulandığı grupta laktat dehidrogenaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Resveratrol ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda ise laktat dehidrogenaz aktivitesinin arsenit trioksitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak azaldığı ortaya konmuştur (Zhao ve diğ., 2008).

Yapılan bu *in vitro* çalışmada 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerine 10 μM konsantrasyon sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta yukarıdaki benzer çalışmalarda görüldüğü gibi laktat dehidrogenaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Sodyum arsenitin 10 μM konsantrasyonuna antioksidan olarak kurkumin ilavesiyle oluşturulan grupta laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir azalma bulunması, Zhao ve diğ. (2008) yaptıkları çalışmada kullanılan resveratrol ile laktat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı yönündeki sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Oksidatif stresin oluşumunda rol oynayan reaktif oksijen türleri özellikle hücrede DNA, proteinler ve lipitler olmak üzere birçok biyolojik moleküle zarar vermektedir (Cai ve diğ., 1997). Hücre mebranındaki lipitlerin reaktif oksijen türleri tarafından okside edilmesi sonucu oluşan lipit peroksidasyon ürünleri membran bütünlüğünü bozmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Arseniğin lipit peroksidasyonuna etkilerini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (Ramanathan ve diğ., 2002; Yang ve diğ., 2007; El-Demerdash ve diğ., 2009; Bera ve diğ., 2010; Momeni ve diğ., 2017; Orta Yılmaz ve diğ., 2018; Rahman ve diğ., 2018). Kültüre edilmiş sıçan böbrek üstü bezi hücreleri ile yapılan çalışmada 48 saat süreyle 10 μM konsantrasyonda sodyum arsenit uygulanmıştır. Çalışma sonucunda lipit peroksidasyonun anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Rahman ve diğ., 2018). Orta Yılmaz ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 50 ppb ve 1000 ppb konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat süreyle sodyum arsenit uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda 24, 48 ve 72 saat maruziyet sonunda tüm sodyum arsenit konsantrasyonlarında Leydig ve Sertoli hücrelerinde lipit peroksidasyonu bakımından artış olduğu bildirilmiştir (Orta Yılmaz ve diğ., 2018). Kültüre edilmiş insan embriyo akciğer fibroblast hücrelerine 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında sodyum arsenit 3, 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 3 ve 6 saat maruziyet sonucunda sodyum arsenitin lipit peroksidasyonunu etkilemediği bildirilmiştir. 12 saat maruziyet sonucunda 10 μM konsantrasyon, 24 ve 48 saat maruziyet sonucunda ise 5 μM ve 10 μM konsantrasyon sodyum

arsenitin ise lipit peroksidasyonunu anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (Yang ve diğ., 2007). Kültüre edilmiş yetişkin sıçan karaciğer hücreleriyle yapılan çalışmada 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit ve ek olarak 10 μM konsantrasyon vitamin C 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin uygulandığı gruplarda lipit peroksidasyonu bakımından artış olduğu bildirilmiştir. Vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda ise lipit peroksidasyonunun sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak azaldığı ortaya konmuştur. (Bera ve diğ., 2010).

Momeni ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada farelere beş hafta süreyle 5 mg/kg dozunda sodyum arseniti tek başına ve 5 mg/kg sodyum arsenite ilave olarak 100 mg/kg dozunda kurkumin intraperitoneal olarak uygulamışlardır. Çalışma sonucunda serum, lipit peroksidasyonu bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta lipit peroksidasyonunun anlamlı olarak arttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş grupta lipit peroksidasyonunun sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Momeni ve diğ., 2017). Yapılan başka bir çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 5 mg/kg dozunda sodyum arsenit tek başına ve 5 mg/kg sodyum arsenite ilave olarak 15 mg/kg dozunda kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışma sonucunda plazma, karaciğer, testis, beyin, akciğer ve böbrek dokuları alınarak lipit peroksidasyonu bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruplarda anlamlı olarak arttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş grupta lipit peroksidasyonunun sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (El-Demerdash ve diğ., 2009). Ramanathan ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 100 ppm sodyum arsenit ve 100 ppm sodyum arsenite ek olarak 400 mg/kg vitamin E ve 200 mg/kg vitamin C uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda kan, karaciğer ve böbrek dokuları lipit peroksidasyonu bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta anlamlı olarak arttığı bildirilmişken, vitamin E ve vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda lipit peroksidasyonu sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Ramanathan ve diğ., 2002).

Yapılan bu çalışmada 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyon sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruplarda yukarıdaki benzer çalışmalarda görüldüğü gibi lipit peroksidasyonunu anlamlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Sodyum arsenit ve kurkuminin birlikte uygulandığı

gruplarda ise, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde lipit peroksidasyonunda anlamlı azalmalar görülmesi Bera ve diğ. (2010) ve Ramantahan ve diğ. (2002) yapmış oldukları çalışmalarda kullanılan vitamin C ile Momeni ve diğ. (2017) ve El-Demerdash ve diğ. (2009) yapmış oldukları çalışmalarda kullanılan kurkumin ile oksidatif stresin azaldığı yönündeki sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda sodyum arsenitin uygulanan 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında hücrelerde lipit peroksidasyonuna yol açtığı ve meydana gelen lipit peroksidasyonuna karşı kurkuminin koruyucu rolü olduğu bulunmuştur.

Reaktif oksijen türleri DNA hasarına, protein sentezinin inhibe olmasına, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalmasına ve sonunda hücre ölümüne neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Arseniğe maruziyet sonucunda süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, tekli oksijen ve peroksil radikalleri hücrede başlıca oluşan reaktif oksijen türleridir (Flora, 2011). Kültüre edilmiş insan embriyo akciğer fibroblast hücrelerine 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında sodyum arsenit 4 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda 0,5 μM konsantrasyon sodyum arsenit uygulanan gruptan itibaren hücre içi ROS üretiminde anlamlı bir artış bulunmuştur (Yang ve diğ., 2007). 2013 yılında yapılan bir çalışmada kültüre edilmiş insan akciğer adenokarsinoma hücrelerine 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında 24 saat süreyle sodyum arsenit uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda tüm sodyum arsenit konsantrasyonlarında hücre içi ROS üretiminde anlamlı bir artış olduğu ortaya konulmuştur (Jiang ve diğ., 2013). Yapılan diğer bir çalışmada ise, kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda Leydig hücrelerine 0,4 μM konsantrasyonda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda hidroksil radikali miktarına etkisi bulunmazken, 7,7 μM konsantrasyonda sodyum arsenitin tüm saatlerde hidroksil radikali miktarını anlamlı olarak arttırdığı ortaya konmuştur. Sertoli hücrelerinde 0,4 μM konsantrasyonda sodyum arsenitin sadece 72 saat maruziyeti sonunda hidroksil radikali miktarını anlamlı olarak arttırdığı bulunmuşken, 7,7 μM konsantrasyon sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda hidroksil radikali miktarını anlamlı olarak arttırdığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada Leydig ve Sertoli hücrelerine 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonucunda tüm saat ve konsantrasyonlarda hidrojen peroksit miktarını anlamlı olarak arttırdığı ortaya konmuştur. (Orta Yılmaz ve diğ., 2018).

2012 yılında Khan ve diğ., yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş fare dalak hücrelerine 5 μM konsantrasyon sodyum arsenit ve ek olarak 5 ile 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon kurkumin 12 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta hücre içi ROS üretiminin anlamlı olarak arttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda hücre içi ROS üretiminin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak azaldığı ortaya konmuştur (Khan ve diğ., 2012). Bir diğer çalışmada kültüre edilmiş fare Sertoli hücrelerine 5 μM konsantrasyon sodyum arsenit ve ek olarak 5 ile 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon kurkumin 12 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta hücre içi ROS üretiminin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda hücre içi ROS üretiminin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Khan ve diğ., 2013).

3T3 embriyonik fibroblast hücreleriyle yapılan bu çalışmada 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit uygulanan gruplarda hidrojen peroksit ve hidroksil radikal miktarının artması yukarıda reaktif oksijen türleriyle ilgili yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Sodyum arsenite ilave olarak kurkumin uygulanan gruplarda ise, hidroksil radikali ve oluşan hücre içi hidrojen peroksit miktarının tek başına sodyum arsenit uygulanmış gruplara göre anlamlı olarak azaldığının bulunması, Khan ve diğ. (2012) ve Khan ve diğ. (2013) yaptıkları sodyum arsenit gruplarına ilave kurkumin çalışmalarından da anlaşıldığı gibi kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerini hidroksil radikali ve hidrojen peroksit üretiminden koruduğunu göstermektedir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumundan kaynaklanan zararlı etkiler, büyük ölçüde antioksidan enzimler tarafından önlenmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene katalizlenmesinden sorumlu olan antioksidan enzimdir (Turrens, 2003). 2010 yılında kültüre edilmiş yetişkin sıçan karaciğer hücreleriyle yapılmış bir çalışmada 24, 48, 72 saat süreyle 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit ve ek olarak 10 μM konsantrasyon vitamin C uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 2 μM ve 4 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonucunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Vitamin C ilave edilmiş gruplarda ise sadece 72 saat maruziyet sonucunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur

(Bera ve diğ., 2010). Jiang ve diğ. (2013) tarafından kültüre edilmiş insan akciğer adenokarsinoma hücrelerine 5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında 24 saat süreyle sodyum arsenit uygulanmış ve 10 μM konsantrasyondan itibaren süperoksit dismutaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Jiang ve diğ., 2013). Yapılan diğer bir çalışmada ise, kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda Leydig hücrelerine 0,4 μM konsantrasyonda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesine etkisi bulunmazken, 7,7 μM konsantrasyonda sodyum arsenitin tüm saatlerde süperoksit dismutaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı ortaya konmuştur. Sertoli hücrelerinde ise 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda süperoksit dismutaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Orta Yılmaz ve diğ., 2018).

Ramanathan ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 100 ppm sodyum arsenit ve 100 ppm sodyum arsenite ek olarak 400 mg/kg vitamin E ve 200 mg/kg vitamin C uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda kan, karaciğer ve böbrek dokularında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak azalttığı bildirilmişken, vitamin E ve vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Ramanathan ve diğ., 2002). 2009 yılında yapılan bir çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 5 mg/kg sodyum arseniti tek başına ve 5 mg/kg sodyum arsenite ilave olarak 15 mg/kg kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışma sonucunda plazma, karaciğer, testis, beyin, akciğer ve böbrek dokuları alınarak süperoksit dismutaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta süperoksit dismutaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (El-Demerdash ve diğ., 2009).

Yapılan bu çalışma sonucunda sodyum arsenitin 1 μM ve 10 μM konsantrasyon uygulandığı gruplarda süperoksit dismutaz enzimi miktarında anlamlı bir azalma görülmüştür. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda da süperoksit dismutaz enzimi aktivitesinde anlamlı bir azalma görülmesi, 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde sodyum arsenitin uygulanması sonucunda

bulunan etkiyle benzerlik göstermektedir. Ayrıca sodyum arsenit uygulanmış gruplara vitamin C ilave ederek yapılan (Bera ve diğ., 2010), sodyum arsenit uygulanmış gruplara vitamin E ve vitamin C ilave edilerek yapılan (Ramanathan ve diğ., 2002) ve sodyum arsenit uygulanmış gruplara kurkumin ilave edilerek yapılan (El-Demerdash ve diğ., 2009) çalışmaların sonuçları ile de benzer sonuçlar göstererek süperoksit dismutaz enzim miktarını arttırması kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde sodyum arsenitin oluşturduğu toksisitede koruyucu rolü olduğunu göstermektedir.

Katalaz enzimi hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüşümünü katalize eden hücre içinde peroksizomlarda bulunan antioksidan bir enzimdir (Cederbaum ve diğ., 2009). Kültüre edilmiş yetişkin sıçan karaciğer hücreleriyle yapılmış bir çalışmada 24, 48, 72 saat süreyle 2 μ M ve 4 μ M konsantrasyonlarda sodyum arsenit ve ek olarak 10 μ M konsantrasyon vitamin C uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 2 μ M ve 4 μ M konsantrasyonlarda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonucunda katalaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Vitamin C ilave edilmiş tüm gruplarda ise katalaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruplara göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Bera ve diğ., 2010). Orta Yılmaz ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 50 ppb ve 1000 ppb konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat süreyle sodyum arsenit uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Leydig ve Sertoli hücrelerine 50 ppb konsantrasyon uygulanan sodyum arsenitin tüm saatler sonunda katalaz enzim aktivitesine herhangi bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur. Leydig hücrelerine 1000 ppb konsantrasyon uygulanan sodyum arsenitin 48 ve 72 saat maruziyet sonunda katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir azalma görülmüşken, Sertoli hücrelerinde 1000 ppb konsantrasyon uygulanan sodyum arsenitin sadece 72 saat maruziyet sonunda katalaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Orta Yılmaz ve diğ., 2018).

Ramanathan ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 100 ppm sodyum arsenit ve 100 ppm sodyum arsenite ek olarak 400 mg/kg vitamin E ve 200 mg/kg vitamin C uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda kan, karaciğer ve böbrek dokularında katalaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta katalaz enzim aktivitesinin anlamlı olarak azalttığı bildirilmişken, vitamin E ve vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda katalaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Ramanathan ve diğ., 2002). 2009 yılında

yapılan bir çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 5 mg/kg sodyum arseniti tek başına ve 5 mg/kg sodyum arsenite ilave olarak 15 mg/kg kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışma sonucunda plazma, karaciğer, testis, beyin, akciğer ve böbrek dokuları alınarak katalaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta katalaz enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda katalaz enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (El-Demerdash ve diğ., 2009).

Yapılan bu çalışma sonucunda sodyum arsenitin 0,1 µM, 1 µM ve 10 µM konsantrasyon uygulandığı gruplarda katalaz enzimi miktarında anlamlı bir azalma görülmüştür. Yukarıda bahsedilen Bera ve diğ., yaptıkları çalışmada katalaz enzimi aktivitesinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde sodyum arsenitin uygulanması sonucunda bulunan etkiyle benzerlik göstermektedir. Ancak Orta Yılmaz ve diğ., yaptıkları çalışma sonucuyla farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca sodyum arsenit uygulanmış gruplara vitamin C ilave ederek yapılan (Bera ve diğ., 2010), vitamin E ve vitamin C ilave edilerek yapılan (Ramanathan ve diğ., 2002) ve kurkumin ilave edilerek yapılan (El-Demerdash ve diğ., 2009) çalışmaların sonuçları ile de benzer sonuçlar göstererek katalaz enzim miktarını artırması kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde sodyum arsenitin oluşturduğu toksisitede koruyucu rolü olduğunu göstermektedir.

Glutasyon peroksidaz, (GPx) glutasyonu kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini katalize ederek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan selenyum bağımlı bir enzimdir (Mates ve diğ. 2000). Kültüre edilmiş insan embriyo akciğer fibroblast hücrelerine 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında sodyum arsenit 3, 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 3 ve 6 saat maruziyet sonucunda sodyum arsenitin GPx enzim aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir. 12 saat maruziyet sonucunda 10 µM konsantrasyon, 24 ve 48 saat maruziyet sonucunda ise 5 µM ve 10 µM konsantrasyon sodyum arsenitin ise GPx enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Yang ve diğ., 2007). 2018 yılında yapılmış bir çalışmada kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 0,4 µM ve 7,7 µM konsantrasyonlarda sodyum arsenit 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda Sertoli hücrelerine 0,4 µM konsantrasyonda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda GPx enzim aktivitesine etkisi bulunmazken, 7,7 µM konsantrasyonda sodyum arsenitin tüm saatlerde GPx enzim

miktarını anlamlı olarak azalttığı ortaya konmuştur. Leydig hücrelerinde ise 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenitin 24, 48 ve 72 saat maruziyeti sonunda GPx enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Orta Yılmaz ve diğ., 2018).

Ramanathan ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 100 ppm sodyum arsenit ve 100 ppm sodyum arsenite ek olarak 400 mg/kg vitamin E ve 200 mg/kg vitamin C uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda kan, karaciğer ve böbrek dokularında GPx enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta GPx enzim aktivitesinin anlamlı olarak azalttığı bildirilmişken, vitamin E ve vitamin C ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda GPx enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı ortaya konmuştur (Rmanathan ve diğ., 2002). 2012 yılında yapılan bir çalışmada sıçanlara 45 gün boyunca 4 mg/kg arsenit trioksit ve 4 mg/kg arsenit trioksite ek olarak 15 mg/kg kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda karaciğer dokusu alınarak GPx enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde arsenit trioksitin tek başına uygulandığı grupta GPx enzim miktarı anlamlı olarak azalttığı bulunmuşken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş grupta ise GPx enzim aktivitesinin arsenik trioksitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (Mathews ve diğ. 2012).

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, sodyum arsenitin tek başına uygulandığı 0,01 μM ve 0,1 μM konsantrasyonlarda GPx enzim aktivitesinde anlamlı bir fark görülmezken 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda anlamlı bir fark görülmesi yukarıda belirtilen çalışmalarda da olduğu gibi sodyum arsenitin GPx enzim aktivitesini azalttığını göstermektedir. Sodyum arsenite ek olarak kurkumin eklenen gruplara bakıldığında, Ramanathan ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada sodyum arsenitle birlikte uygulanan vitamin C ve vitamin E'nin ve Mathews ve diğ. (2012) arsenik trioksitle beraber uygulanan kurkuminin GPx enzim aktivitesi üzerinde gösterdiği koruyucu etki ile benzerlik göstermektedir.

Glutasyon-S-transferaz (GST) elektrofilik substratların glutatyona (GSH) konjugasyonunu katalizleyen sitozolde bulunan bir enzimdir (Sheehan ve diğ., 2001). Ayrıca oksidatif strese karşı koruyucu, endojen ve ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda ve reaktif oksijen türlerinin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır (Cnubben ve diğ., 2001). Kültüre edilmiş fare Leydig ve Sertoli hücrelerine 0,4 μM ve 7,7 μM konsantrasyonlarda sodyum arsenit 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda 24, 48 ve 72 saat maruziyet sonunda tüm sodyum arsenit konsantrasyonlarında Leydig ve Sertoli hücrelerinde GST enzim aktivitesinin

anlamli olarak azaldığı ortaya konmuştur (Orta Yılmaz ve diğ., 2018). 2009 yılında yapılan bir çalışmada sıçanlara 30 gün süreyle 5 mg/kg sodyum arseniti tek başına ve 5 mg/kg sodyum arsenite ilave olarak 15 mg/kg kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışma sonucunda plazma, karaciğer, testis, beyin, akciğer ve böbrek dokuları alınarak GST enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde sodyum arsenitin tek başına uygulandığı grupta GST enzim aktivitesini anlamli olarak azalttığı bildirilmişken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş gruplarda GST enzim aktivitesinin sodyum arsenitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamli olarak arttığı bildirilmiştir (El-Demerdash ve diğ., 2009). Mathews ve diğ. (2012) yaptıkları bir çalışmada sıçanlara 45 gün boyunca 4 mg/kg arsenit trioksit ve 4 mg/kg arsenit trioksite ek olarak 15 mg/kg kurkumin oral yolla uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda karaciğer dokusu alınarak GST enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde arsenit trioksitin tek başına uygulandığı grupta GST enzim aktivitesini anlamli olarak azalttığı bulunmuşken, kurkumin ilave edilerek oluşturulmuş grupta ise GST enzim aktivitesinin arsenik trioksitin tek başına uygulandığı gruba göre anlamli olarak arttığı bildirilmiştir (Mathews ve diğ. 2012).

Yapılan bu çalışma sonucunda sodyum arsenitin tek başına uygulandığı tüm konsantrasyonlarda, yukarıdaki benzer çalışmalarda görüldüğü gibi GST enzim aktivitesini anlamli olarak azalttığı bulunmuştur. Sodyum arsenit ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplarda ise 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde GST enzim aktivitesinde anlamli artışlar görülmesi El-Demerdash ve diğ., (2009) ve Mathews ve diğ. (2012) yapmış oldukları çalışmalarda kullanılan kurkuminin GST enzim aktivitesini arttırdığı yöndeki sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda sodyum arsenitin hücrelerde oluşturduğu hasara karşı GST enzim aktivitesi bakımından kurkuminin 3T3 embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde GST enzim aktivitesini arttırıcı bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre, arseniğin hücre canlılığını azalttığı ve laktat dehidrojenaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Arseniğin lipit peroksidasyonunu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali miktarlarını arttırmasıyla ve antioksidan sistemde görev alan antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz) miktarlarını ve aktivitelerini azaltmasıyla 3T3 embriyonik fibroblast hücrelerinde oksidatif hasara yol açtığı ortaya konulmuştur. Arseniğe ilave olarak bir antioksidan olan kurkuminin ilavesiyle reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu lipit peroksidasyonuna karşı

koruyucu olabileceği ve hücre içi antioksidan sistemde görev yapan enzimlerin aktivitelerinin de artmasına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdul, K.S.M., Jayasinghe, S.S., Chandana, E.P., Jayasumana, C., De Silva, P.M.C., 2015, Arsenic and human health effects: A review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40 (3), 828-846.
- Adriano, D.C., 2001, *Arsenic*, Trace elements in terrestrial environments, In: Adriano, D.C. (ed.), Chapter 7., Springer, New York, USA, 219-261.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., 2003, Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, 23, 363–398.
- Aitio, A. and Becking, G., 2001, Arsenic and arsenic compounds, *Environmental Health Criteria*, 224.
- Ak, T., Gülçin, I., 2008, Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin, *Chemico-Biological Interactions*, 174, 27–37.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Siddiqui, M.A., Ali, B.A., 2013, Arsenic trioxide-mediated oxidative stress and genotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells, *OncoTargets and Therapy*, 6, 75.
- Alpaslan, M.N., Dölgen, D., Boyacıoğlu, H., Sarptas, H., 2010, İçme suyundan kimyasal yöntemlerle arsenik giderimi, *ITU Journal Series E: Water Pollution Control*, 20 (1).
- Altınışık, M., 2000, *Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar*, ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD., Aydın.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. *Toxicological Profile for Arsenic*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology, Atlanta, GA.
- Barzegar, A., Moosavi-Movahedi, A.A., 2011, Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin, *PLoS ONE* 6 (10), e26012.
- Bera, A.K., Rana, T., Das, S., Bandyopadhyay, S., Bhattacharya, D., Pan, D., De, S., Das, S.K., 2010, L-Ascorbate protects rat hepatocytes against sodium arsenite—induced cytotoxicity and oxidative damage, *Human and Experimental Toxicology*, 29 (2), 103-111.
- Bhattacharya, P., Frisbie, S.H., Smith, E., Naidu, R., Jacks, G., Sarkar, B., 2002, *Arsenic in the Environment: A Global Perspective*, Handbook of heavy metals in the environment, In: Sarkar B. (ed), Chapter 6, Marcell Dekker Inc., New York, 147-215.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012, Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 5 (1), 9.

- Cai, Q., Rahn, R. O., Zhang, R., 1997, Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals, *Cancer Letters*, 119 (1), 99-107.
- Camelliti, P., Borg, T.K., Kohl, P., 2005, Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts, *Cardiovascular Research*, 65 (1), 40-51.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Jiang, L. P., Geng, C. Y., Yao, X.F., Kong, Y., Jiang, B.Y., Zhong, L.F., 2008, Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (24), 12059-12063.
- Cederbaum, A.I., Lu, Y., Wu, D., 2009, Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury, *Archives of Toxicology*, 83 (6), 519-548.
- Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P.O., 2002 Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 99 (20), 12877-12882.
- Chang, Y., Li, H., Guo, Z., 2014, Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34 (3), 703-714.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004, Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications, *Current Science-Bangalore*, 87, 44-53.
- Chen, C., Jiang, X., Hu, Y., Zhang, Z., 2013, The protective role of resveratrol in the sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis, *Biological Trace Element Research*, 155 (1), 119-131.
- Cnubben, N.H., Rietjens, I.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J., 2001, The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10 (4), 141-152.
- Cordeiro, S., Samuel, J.L., Rappaport, L., 2000, Extracellular matrix and growth factors during heart growth, *Heart Failure Reviews*, 5 (2), 119-130.
- Cossu, G., Bianco, P., 2003, Mesoangioblasts—vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues, *Current Opinion in Genetics & Development*, 13 (5), 537-542.
- Çalışkan, M.B., Pala, A., 2009 İçme sularında arsenik kirliliği: ülkemiz açısından bir değerlendirme, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15 (1), 69-79.
- Dai, C., Tang, S., Li, D., Zhao, K., Xiao, X., 2015, Curcumin attenuates quinocetone-induced oxidative stress and genotoxicity in human hepatocyte L02 cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25 (4), 340-346.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., Cebrian, M. E., 2009, Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2), 85-92.

- Devasagayam, T.P, Tarachand, U., 1987, Decreased lipid peroxidation in the rat kidney during gestation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198, 273-80.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P., 2008, Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins, *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 128–138.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Radwan, F.M., 2009, Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs, *Food and Chemical Toxicology*, 47 (1), 249-254.
- Ellman, G.L., 1959, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E., Rimbach, G., 2012, Curcumin— from molecule to biological function, *Angewandte Chemie International Edition*, 51 (22), 5308-5332.
- Flora, S.J., 2011, Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility, *Free Radical Biology and Medicine*, 51 (2), 257-281.
- Gorby, M.S., 1988, Arsenic poisoning, *Western Journal of Medicine*, 149 (3), 308.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U., 2014, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 4405-4409.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974, Glutathione-S- transferase. the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974, Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat, *Journal of Nutrition*, 104, 580-587.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in Enzymology*, 186, 1–85.
- Halliwell, B., 1991 Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *The American Journal of Medicine*, 91 (3), 14-22.
- Henke, K., 2009, *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*, John Wiley & Sons, United Kingdom, ISBN: 978-0-470-02758-5.
- Holland, M.K., Storey, B.T., 1981, Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa, *Biochemical Journal*, 198, 273-280.
- Hughes, M.F., 2002 Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology Letters*, 133 (1), 1-16.
- IARC, 2012, Arsenic, metals, fibres, and dusts, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100 (PT C), 11.

- Jiang, X., Chen, C., Zhao, W., Zhang, Z., 2013, Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: an implication for the paradoxical mechanism, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36 (3), 891-902.
- Jomova, K. and Valko, M., 2011 Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, 283 (2-3), 65-87.
- Jurenka, J.S., 2009, Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research, *Alternative Medicine Review*, 14 (2).
- Kabel, A.M., 2014, Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition., *World Journal of Nutrition and Health*, 2 (3), 35-38.
- Kalluri, R., Zeisberg, M., 2006, Fibroblasts in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 6 (5), 392-401.
- Karabulut, H., and Gülay, M.Ş., 2016, Serbest radikaller, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Khan, S., Telang, A.G., Malik, J.K., 2013, DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by sodium arsenite in cultured murine Sertoli cells: prevention by curcumin, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95 (6), 1006-1018.
- Khan, S., Vala, J.A., Nabi, S.U., Gupta, G., Kumar, D., Telang, A.G., Malik, J.K., 2012, Protective effect of curcumin against arsenic-induced apoptosis in murine splenocytes *in vitro*, *Journal of Immunotoxicology*, 9 (2), 148-159.
- Kiuchi, F., Goto, Y., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K., Tsuda, Y., 1993, Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41 (9), 1640-1643.
- Lampe, V., 1918, Synthese von curcumin. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 51 (2), 1347-1355.
- Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A., Syrjänen, S., 1994, Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes, *Pharmaceutical Research*, 11 (8), 1127-1131.
- Lii, C.K., Lin, A.H., Lee, S.L., Chen, H.W., Wang, T.S., 2011, Oxidative modifications of proteins by sodium arsenite in human umbilical vein endothelial cells, *Environmental Toxicology*, 26 (5), 459-471.
- Lin, S.L., Kisseleva, T., Brenner, D. A., Duffield, J.S., 2008, Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney, *The American Journal of Pathology*, 173 (6), 1617-1627.
- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati J., Srimal, R.C., 2006, Multiple biological activities of curcumin: A short review, *Life Sciences*, 78, 2081–2087.

- Mandal, B.K., and Suzuki, K.T., 2002, Arsenic round the world: a review, *Talanta*, 58 (1), 201-235.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974, Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry*, 47, 469-474.
- Mates, J.M., 2000, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153 (1-3), 83-104.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N., 1999 Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinical Biochemistry*, 32 (8), 595-603.
- Mathews, V.V., Binu, P., Paul, M.S., Abhilash, M., Manju, A., Nair, R.H., 2012, Hepatoprotective efficacy of curcumin against arsenic trioxide toxicity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), 706-711.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.M., Zujko, M.E., 2018, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Advances in Medical Sciences*, 63 (1), 68-78.
- Momeni, H.R. and Eskandari, N., 2017, Effect of curcumin on kidney histopathological changes, lipid peroxidation and total antioxidant capacity of serum in sodium arsenite-treated mice, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69 (2), 93-97.
- Mossman, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 33-33.
- Nizamlioglu, N.M. and Sebahattin, N.A.S., 2010, Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri, *Electronic Journal of Food Technologies*, 5 (1), 20-35.
- Noori, S., 2012, An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system, *Open Access Scientific Reports*, 1 (8), 1-9.
- Orta Yılmaz, B., Yildizbayrak, N., Erkan, M., 2018, Sodium arsenite-induced detriment of cell function in Leydig and Sertoli cells: the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system, *Drug and Chemical Toxicology*, 1-9.
- Özbolat, G. and Tuli, A., 2016, Effects of heavy metal toxicity on human health, *Archives Medical Review Journal*, 25 (4), 502-521.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z., 2015, Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3), 331-336.
- Petrusevski, B., Sharma, S., Schippers, J.C., Shordt, K., 2007, *Arsenic in Drinking Water*, Delft: IRC International Water and Sanitation Centre, 17 (1), 36-44.
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Ramirez-Tortosa, M., 2016, Curcumin and health, *Molecules*, 21 (3), 264.

- Puntarulo, S., Cederbaum, A.I., 1988, Effects of oxygen concentration on microsomal oxidation of ethanol and generation of oxygen radicals, *Biochemical Journal*, 251, 787-794.
- Rahman, M.M., Uson-Lopez, R.A., Sikder, M.T., Tan, G., Hosokawa, T., Saito, T., Kurasaki, M., 2018, Ameliorative effects of selenium on arsenic-induced cytotoxicity in PC12 cells via modulating autophagy/apoptosis, *Chemosphere*, 196, 453-466.
- Ramanathan, K., Balakumar, B.S., Panneerselvam, C., 2002, Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on arsenic-induced oxidative stress, *Human and Experimental Toxicology*, 21 (12), 675-680.
- Ravindran, P.N., Nirmal Babu, K., Sivaraman, K., 2007, *Turmeric: The Golden Spice of Life*, Turmeric: The Genus Curcuma, In Ravindran, P.N (ed), Chapter 1, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1-14.
- Rodemann, H. P. and Müller, G.A., 1991 Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis, *American Journal of Kidney Diseases*, 17 (6), 684-686.
- Saha, J.C., Dikshit, A.K., Bandyopadhyay, M., Saha, K.C., 1999, A review of arsenic poisoning and its effects on human health, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29 (3), 281-313.
- Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sung, B., Ahn, K.S., Murakami, A., Sethi, G., Limtrakul, P., Badmaev, V., Aggarwal, B.B., 2007, Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism, *Carcinogenesis*, 28, 1765-1773.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., 2001, Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochemical Journal*, 360 (1), 1-16.
- Shen, L., Ji, H.F., 2007, Theoretical study on physicochemical properties of curcumin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67 (3), 619-623.
- Sherratt, P. J. and Hayes, J.D., 2002, *Glutathione S-transferases*, Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, In: Ioannides C. (ed), Chapter 9, John Wiley and Sons Ltd, UK, ISBN: 0-471-894-66-4, 319-352.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J., 2004, Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255 (1-2), 67-78.
- Sinha, A.K., 1972, Colorimetric assay of catalase, *Analytical Biochemistry*, 47, 389- 394.
- Sun, H.J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L.P., Ma, L.Q., 2014, Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans, *Environment International*, 69, 148-158.
- Tabakoğlu, E. and Durgut, R., 2013, Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri, *AVKAE Dergisi*, 3 (1), 69-75.

- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012, *Heavy Metal Toxicity and the Environment*, Molecular, clinical and environmental toxicology, In: Andreas, L. (ed.), Chapter 6, Springer Basel, ISBN: 978-3-7643-8339-8, 133-164.
- Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013, Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings, *Redox Biology*, 1 (1), 448–456.
- Turrens, J.F., 2003, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *The Journal of Physiology*, 552 (2), 335-344.
- Usta, B. and Yilmaz-Ersan, L., 2013, Antioxidant enzymes of milk and their biological effects, *Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi*, 27(2), 123-130.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266 (1-2), 37-56.
- Yamamura, S., Bartram, J., Csanady, M., Gorchev, H. G., Redekopp, A., 2003, Drinking water guidelines and standards, *Arsenic, Water, and Health: the State of The Art*.
- Yang, P., He, X.Q., Peng, L., Li, A.P., Wang, X.R., Zhou, J.W., Liu, Q.Z., 2007, The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70 (11), 976-983.
- Zhao, X.Y., Li, G.Y., Liu, Y., Chai, L.M., Chen, J.X., Zhang, Y., Du, Z.M., Lu, L.J., Yang, B.F., 2008, Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*, *British Journal of Pharmacology*, 154 (1), 105-113.
- Zhu, X.X., Yao, X.F., Jiang, L.P., Geng, C.Y., Zhong, L.F., Yang, G., Zheng, B.L., Sun, X.C., 2014, Sodium arsenite induces ROS-dependent autophagic cell death in pancreatic β -cells, *Food and Chemical Toxicology*, 70, 144-150.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mehmet Can PERKER
Doğum Yeri	İstanbul/Bakırköy
Doğum Tarihi	09.11.1993
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05389682539
E-Posta Adresi	mehmetperker@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.07.2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Zooloji

Makale ve Bildiriler
Orta Yılmaz B., Aydın Y., Yıldızbayrak N., Perker M.C., Erkan M.B., "Anti-Oxidative Effects of Curcumin on Sodium Arsenite Induced Oxidative Damage in 3T3 Embryonic Fibroblast Cells", INTERNATIONAL EURASIAN CONFERENCE ON BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES, ANKARA, TÜRKİYE, 26-27 Nisan 2018, vol.1, no.1, pp.356-356