



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

C ve E VİTAMİNLERİNİN KROMOZOM HASARLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Merve CİVELEK

Biyoloji Anabilim Dalı

Radyobiyojoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuncay ORTA

Temmuz, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 10.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı
, Radyobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuncay ORTA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Bayram DEMİR
İstanbul Üniversite
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Murat BELİVERMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Önder KILIÇI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAHI
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu



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 23029 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Tuncay ORTA'ya sonsuz minnet ve teşekkürü borç bilirim.

Araştırma ve çalışmalarına yardım eden, her anda yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Leyla AKPUNAR, Gözde KILIÇ, İsa DOĞAN ve Medine TOY'a teşekkür ederim.

Deneyimi ve bilgisiyle desteğini her zor anımda fazlasıyla hissettiğim arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Narin ABDULLAH'a çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana her koşulda inanan ve güvenen aileme, arkadaşlarım Neslihan ERDEM, Tuğba MANİCİ, Gizem DÖNER'e, biricik ablam Melek CİVELEK'e, kardeşim Mert CİVELEK'e ve canım kedim Eunice KEDAY'a sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2018

Merve CİVELEK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. KANSER	3
2.2. OKSİDATİF STRES	3
2.2.1. Serbest Radikaller	4
2.2.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	7
2.2.1.2 Hidroksil Radikali(OH.)	8
2.2.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
2.3. ANTİOKSİDANLAR	9
2.3.1. Süperoksit Dismütaz (SOD)	11
2.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	11
2.3.3. Glutasyon (GSH)	11
2.3.4. Katalaz (CAT)	12
2.4. C VİTAMİNİ	13
2.4.1. C Vitamininin Kimyasal Yapısı	13
2.4.2. C Vitamininin Biyolojik Etkileri	14
2.4.3. C Vitamininin Antioksidan Etkileri	15
2.5 E VİTAMİNİ	17
2.5.1. E Vitamininin Kimyasal Yapısı	18
2.5.2 E Vitamininin Biyolojik Etkileri	18
2.5.3 E Vitamininin Antioksidan Etkileri	19
2.6 MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ	20
3. MALZEME VE YÖNTEM	23

3.1. DENEY MATERYALLERİ.....	23
3.1.1. C Vitamini	23
3.1.2 E Vitamini	23
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
3.3. MN TESTİ.....	23
3.4. FRAP TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ TESTİ.....	26
3.5. PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	27
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	27
4. BULGULAR.....	29
4.1 MN TESTİ SONUÇLARI	29
4.2 FRAP SONUÇLARI	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: O ₂ 'nin indirgenerek ROSların oluşması.....	7
Şekil 2.2: L-askorbik asidin kimyasal formu.....	13
Şekil 2.3: Alfa tokoferolün yapısal formülü.....	18
Şekil 2.4: MN oluşum şeması.....	21
Şekil 2.5: Sitokalsin B etkisi ile MN oluşumu.....	22
Şekil 3.1: İnkübasyona bırakılan flasklar.....	25
Şekil 3.2: FRAP reaksiyonu.....	26
Şekil 3.3: FRAP standart eğrisi.....	27
Şekil 4.1: C vitamini ve C vitamini+H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerin MN/BN karşılaştırılması.....	30
Şekil 4.2: C vitamini ve C vitamini+ H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerin PI karşılaştırılması.....	31
Şekil 4.3: E vitamini ve E vitamini+H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerin MN/BN karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.4: E vitamini ve E vitamini + H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerin PI karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.5: C+E vitamini ve C+E+H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerde MN/BN karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.6: C+E vitamini ve C+E+H ₂ O ₂ tedavisi uygulanan hücrelerde PI karşılaştırılması.....	36

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Reaktif oksijen türleri (ROS).....	6
Tablo 2.2: Reaktif nitrojen türleri (RNS).....	6
Tablo 2.3: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	9
Tablo 4.1: Farklı C vit konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.....	29
Tablo 4.2: Farklı E vit konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.....	32
Tablo 4.3: C ve E vit. kombinasyonu konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.....	34

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

μg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
M	: Molar
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
$\text{OH}\cdot$: Hidroksil radikali
Fe	: Demir
Cu	: Bakır
LOOH	: Lipid Hidroperoksit
O^{2-}	: Süperoksit Anyon
Cu^{2+}	: Bakır di anyon

Kısaltmalar Açıklama

BN	: Binükleat
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FRAP	: Plazmanın Demir İndirgeyebilme Kapasitesi
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Glutatyon
MN	: Mikronukleus
Pİ	: Proliferatif indeks
Sit-B	: Sitokalsin B
SOD	: Süperoksit Dismütaz
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

C ve E VİTAMİNLERİNİN KROMOZOM HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Merve CİVELEK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Hücreyi ölüme götüren faktörlerin başında oksidan maddeler gelir. Oksidan maddeler; nükleik asitler, lipidler, proteinler, enzimler ve karbonhidratlarla etkileşerek hücre hasarı ve ölümü ile sonuçlanan zararlı etkilere neden olur. Başta hidroksil radikali olmak üzere oksidan maddeler, DNA polimeraz aktivitesinin inhibisyonuna, nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA kırıklarına neden olarak hücreyi ölüme götürebilirler.

Oksidan maddeler tarafından oluşan oksidatif stres önlenemediğinde koroner kalp hastalıkları ve kanser riski artmaktadır. Reaktif oksijen metabolitleri, genetik materyele etki ettiklerinde, özellikle p53 gibi genlere etki ettiğinde, DNA’da hasar meydana getirerek karsinogenezi teşvik etmektedirler. DNA hasarlarının yanında membranlardaki lipid peroksidasyonuna da yol açılarak başlatılan bu süreçte hücre içi antioksidan molekülleri önemlidir. C vitamini (l-askorbik asit) ve E vitamininin (D-alfa tokoferol) hücre içinde antioksidan etki göstererek reaktif oksijen metabolitlerinin genotoksik etkilerini engelleyici potansiyelleri vardır.

E vitamini (D-alfa tokoferol) hücre membranının integral bileşeni olan; iskelet-kas, üreme, sinir ve vasküler sistemin normal fonksiyonları için önemli olan yağda çözünen bir vitamindir. Membranın fiziksel özelliklerine olan etkilerinin yanında, E vitamini; çoklu doymamış yağ asitlerinin oksitleyici etkisini azaltır. Lipit peroksitler kanser ve yaşlanmaya neden olan genetik hasarlara neden olabilirler. E vitamini takviyeleri ve günlük alınması gereken miktarın fazlası lipidlerin oksidasyonuna karşı koruyucu etki yapabilir. Yüksek miktardaki E vitaminin koroner

kalp hastalıkları ve kolorektal kanser riskini düşürdüğü bilinmektedir ancak kanser riskine etkisi net değildir. C vitamini hem *in vitro* hem *in vivo*'da antioksidan etki göstermektedir ve reaktif oksijen metabolitlerin genotoksik etkilerini engelleyici potansiyeli vardır. Epidemiyolojik verilere göre yüksek oranda C vitamininden zengin besin tüketilmesi çeşitli kanserlerin oluşma riskini yarı yarıya kadar düşürebilmektedir. C vitamini DNA'ya bağlanmış Cu^{2+} 'ları azaltabilmekte ve oluşan Cu^{+} 'lar H_2O_2 'in etkisini azaltabilmektedir.

Bu çalışmada insan kökenli TK6 lenfoblast hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerde stres koşullarının oluşturulması için H_2O_2 uygulanmıştır. Bu dozun *in vitro* koşullarda TK6 hücrelerine uygulanmasıyla oluşabilecek kromozom hasarlarına, antioksidan rolü olan C ve E vitaminleri farklı dozlarda ve kombinasyon olarak verilerek etkileri araştırılmıştır. Genotoksik etkiler mikronükleus tekniği ile saptanmıştır. Hücrenin bulunduğu stres koşullarında oluşan mikronükleuslar doz cevap eğrileri ile karşılaştırılmıştır.

C vitamini test grubunda, hem sadece farklı dozlar halinde uygulanan C vitamini tedavisi hem de hidrojen peroksit verilen grupta MN/BN oranlarının verilen dozlarla düştüğü gözlenmiş fakat aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,99$). MN testi sonucunda genotoksik ya da antigenotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. E vitamini grubunda vitamin dozları ve vitamin dozları+ H_2O_2 verilerinin Pİ karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. ($p<0,001$). Alfa tokoferolün H_2O_2 varlığında koruyucu etkisi gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da C vitamini varlığında E vitamininin oksidatif hasara karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir. E ve C vitamini ile E+C vitamini ve H_2O_2 verilen hücrelerde Pİ karşılaştırılması yapıldığında da anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır ($p<0,001$).

Temmuz 2018, 13+45 sayfa.

Anahtar kelimeler: mikronükleus teknik, C vitamini, E vitamini, oksidatif stres

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECT of VITAMINS C and E on CHROMOSOME DAMAGES

Merve CİVELEK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tuncay ORTA

Oxidants are the leading factors that lead to cell death. Oxidative substances; interact with nucleic acids, lipids, proteins, enzymes and carbohydrates, leading to deleterious effects resulting in cell damage and death. Oxidants, particularly hydroxyl radicals, can lead to cell death by inhibiting DNA polymerase activity, modification of nucleic acid bases, and DNA breaks.

The risk of coronary heart disease and cancer is increasing if oxidative stress caused by oxidant substances can not be prevented. Reactive oxygen metabolites stimulate carcinogenesis when they affect genetic material, particularly when it affects genes such as p53, damaging DNA. Intracellular antioxidant molecules are important in this process, which is initiated by DNA damage as well as lipid peroxidation in membranes. Vitamin C (L-ascorbic acid) and vitamin E (D-alpha tocopherol) have antioxidant effects in the cell, potentially inhibiting the genotoxic effects of reactive oxygen metabolites.

Vitamin E (D-alpha tocopherol) is an integral component of the cell membrane; skeletal muscle, fat-soluble vitamins that are important for normal functions of the reproductive, nervous and vascular system. In addition to the effects on the physical properties of the membrane, Vitamin E; reduces the oxidizing effect of polyunsaturated fatty acids. Lipid peroxides can cause cancer and genetic damage causing aging. Vitamin E supplements and dietary supplements can protect against the oxidation of excess lipids. High amounts of vitamin E are known to lower coronary

heart disease and colorectal cancer risk, but the effect on cancer risk is unclear. Vitamin C has an antioxidant effect both *in vitro* and *in vivo*, and has the potential to inhibit the genotoxic effects of reactive oxygen metabolites. Consumption of vitamin C rich nutrients higher than epidemiological data can reduce the risk of various cancers by half. C vitamins can reduce the Cu^{2+} bound to DNA and the formed Cu^+ can reduce the effect of H_2O_2 .

Human TK6 lymphoblast cells were used in this study. To establish stress conditions in the cells, H_2O_2 applied to the cells. Effects of antioxidant C and E vitamins in different doses and combinations were investigated for the chromosome damage that could be caused by application of this dose to TK6 cells *in vitro*. Genotoxic effects were determined by micronucleus technique. It was compared with the micronuclei formed in the stress conditions in which the cells were present, in terms of dose response curves.

In the vitamin C test group, the MN / BN ratio was observed to decrease with doses given only in different doses of C vitamin therapy and in the hydrogen peroxide group, and no statistically significant difference was observed between the two groups. ($P=0.99$). Genotoxic or antigenotoxic effects were not observed as a result of the MN test. There was a statistically significant difference in vitamin E doses and vitamin doses + H_2O_2 in the vitamin E group compared to the PI. ($P < 0.001$). A protective effect on the presence of alpha-tocopherol H_2O_2 has been observed. In this study, vitamin E in the presence of vitamin C has been shown to be more effective against oxidative damage. A significant difference was also found when comparing E and C vitamins with E + C vitamins and H_2O_2 -treated cells with PI ($p < 0.001$).

July 2018, 13+45 pages.

Keywords: micronucleus test, vitamin C, vitamin E, oxidative stress

1. GİRİŞ

Kanser; hücrelerin gen ekspresyonlarını alt edip anormal şekilde büyüdüğü, diğer dokulara taşınabilen ve normal fonksiyonlarını bozan kompleks bir hastalıktır. Karsinogenezin erken evrelerinde önemli bir olay olan fenotipin genomik kararsızlığı, hücrenin kanser hücresine dönüşmesine, proliferasyon kapasitesinin artmasına ve yerleştiği bölgenin immünolojik direncini kırmasına neden olur[1].

Serbest radikal eşlenmemiş elektron içeren atom veya atom gruplarına verilen addır. Reaktif oksijen türleri ise hem peroksil, süperoksit, hidroksil ve hidroperoksil gibi oksijen radikalleri hem de hidrojen peroksit, ozon ve hipoklorik asit gibi radikale kolayca dönüşebilecek non radikal oksitleyici ajanları kapsayan bir terim olarak tanımlanır[2]. Hidrojenperoksit zayıf reaktiviteli oksitleyici bir ajandır. Superoksitin aksine hidrojenperoksit hücre membranından kolayca geçebilir. Hidrojenperoksit eşleşmemiş elektron içermez, radikal değildir. Hidrojenperoksit bazı durumlarda metabolik sinyal gibi iş görebilir. Katalaz ile etkisi ortadan kaldırılabılır [3].

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin, hücrenin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için fizyolojik olarak bulunması gerekir [4]. Fazla miktarlarda bulunması ise nükleik asitler, lipidler, proteinler ve diğer biyomoleküllerin hasar almasına neden olur[5].

Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, suda çözünebilen vitaminler sınıfındandır. C vitamini hem *in vivo* hem *in vitro*'da antioksidan işlevi görür ve ROS'ların genotoksik etkilerini engelleme potansiyeline sahiptir. *In vivo*'da ROS'ların etkilerini etkin bir biçimde giderebilme yeteneği proonkogenlerin ve tümör supresör genlerin zarar görmesini azaltabilir ve böylece kanser riskini düşürmede yardımcı olabilir. Epidemiyolojik verilere göre, C vitamininden zengin besinlerin tüketimi çeşitli kanser türlerinin görülmesini yarı yarıya azaltabilmektedir [6]. Yüksek dozda C vitamini ve diğer antioksidanların alımının, muhtemelen antioksidan mekanizmaları sayesinde kanser ve kalp damar hastalıkları gibi kronik hastalıklara yakalanma riskinin azalmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir [7]. C vitamini suda çözünen kompartmanda oksijen radikalleriyle ilk etkileşime giren tabakadır. Süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijenle direkt olarak reaksiyona girer. Serbest radikaller hem kanserin başlamasında hem de ilerlemesinde rol oynar. Askorbik asit bu prosesleri engelleyebilir [8].

d-alpha tocopherol olarak da bilinen e vitamini yağda çözünebilen vitaminler sınıfındadır. İskelet kas sistemi, üreme sistemi, nöral ve vaskular sistemlerin normal fonksiyonlarında çalışabilmeleri için integral bir vitamindir. Hücre membranının fiziksel özelliklerini etkiler. Çoklu doymamış yağların oksidatif hasarlarına karşı koruyucu etkisi vardır [9]. Lipid peroksidazlar, kanser ve yaşlanmanın en önemli nedenlerinden olan background genetik hasara neden olur. E vitaminin çeşitli kanser tipleri üzerindeki koruyucu etkileri henüz net olmasa da ortalama üstü tüketiminde kalp damar hastalıkları ve kolorektal kanser riskini düşürdüğü saptanmıştır [10].

Bu çalışmada insan kökenli lenfoblast hücre soyu olan TK6 hücreleri kullanılmıştır. Hücreleri H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakarak uygulanan vitaminlerin koruyucu etkileri gözlemlenmiştir. Sitotoksik olmayan dozun *in vitro* koşullarda TK6 hücrelerine uygulanmasıyla oluşabilecek kromozom hasarlarına, antioksidan rolü olan C ve E vitaminleri farklı dozlarda ve kombinasyon olarak verilerek etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kromozom hasarı tesbiti için sitokinezle bloklanan hücrelere MN tekniği uygulanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser, bir grup anormal hücrenin, hücre bölünmesinin normal kurallarını göz ardı ederek kontrol edilemez şekilde büyüdüğü bir hastalık olarak tanımlanabilir. Normal hücreler, hücre bölünmesi veya hücre ölümü olayları için sürekli hücre içi sinyallere maruz kalırken; kanser hücrelerinin bu sinyalleri görmezden gelmesi kontrolsüz büyüme ve çoğalma ile sonuçlanır. Bu aşırı çoğalma devam ederse ve yayılırsa, bu durum ölümcül olabilir. Kansere bağlı ölümlerin %90'ı metastaz adı verilen bu tümör yayılmasına bağlıdır [11].

Kanser, Türkiye ve dünya çapında insidansı giderek artan, toplum sağlığını tehdit eden bir hastalıktır. Türkiye Kanser İstatistiklerine göre (Ankara,2017) ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2005 yılı verilerine göre, dünyadaki genel ölüm oranlarının %13'ü kanserden kaynaklanmaktadır(WHO, 2005).

Normal hücrenin malignant bir hücreye dönüşmesi, genom hasarı ile sonuçlanan ardışık mutasyonlar ile gerçekleşmektedir. Bu hasarlar DNA replikasyonu esnasında oluşan hatalar, metabolizmada gerçekleşen serbest radikal etkileşimleri gibi endojen proseslerden kaynaklanabileceği gibi; iyonizan radyasyon, UV ve kimyasal karsinojenler gibi eksojenik kaynaklı olabilir.

2.2. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, esas olarak, serbest radikallerin üretimi ile vücudun antioksidanlar tarafından nötralizasyon yoluyla zararlı etkilerine karşı koyma veya detoksifiye etme becerisi arasında bir dengesizliktir.

Hücreler sürekli olarak mitokondriyal solunum, yabancı bileşik metabolizması ve diğerlerinin yanı sıra radyasyon gibi patofizyolojik durumlar gibi fizyolojik süreçlerden oksidantlara maruz kalmaktadır. Serbest radikaller oksijen kökenli ise reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır. Serbest radikaller nitrojen kökenli ise reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır. Reaktif oksijen türleri, yararlı olabilecek, oldukça reaktif bir tür ailesidir [12]. Bağışıklık sistemi tarafından patojenlere saldırmak ve öldürmek için bir yol olarak kullanılırlar.

Reaktif nitrojen türleri (RNS) de benzer bir davranışa sahip olabilir: Nitrik oksit radikali (NO), vasorelaxing ve antiproliferatif özelliklere sahipken peroksinitrit anyonu (ONOO-), zararlı sonuçlarla hücre içi ROS konsantrasyonunu artırır [13].

2.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan ve diğer moleküller ile son derece reaktif olan oksijen içeren bir moleküldür. Bu eşlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktif özellik kazandırır. Bu özelliği ile protein, lipid, DNA ve nükleotidler gibi birçok biyolojik materyalde zarara neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp damar hastalıkları, kanser türleri, bağışıklık sisteminde zayıflama, katarakt, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalıkla ilişkisine dair araştırmalar bulunmaktadır [13,14,16].

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel oksidanlar ve stres uzun zamandır kanserle ilişkilendirilmektedir. ROS ve diğer oksidan maddeler kansere yol açabilir. Transform olmuş hücrelerin normal hücrelerden daha fazla ROS ürettiği düşünülmektedir. Bitkilerde ROS sürekli olarak farklı hücrel bölmelerde lokalize olmuş çeşitli metabolik yolların yan ürünleri olarak üretilir[15]. Fizyolojik kararlı durum koşulları altında bu moleküller, genellikle belirli bölmelere sınırlı farklı antioksidatif savunma bileşenleri tarafından atılır [16].

ROS, çok çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girer ve bu nedenle doku nekrozuna yol açabilecek ve sonuçta hücreyi ölüme götürebilecek geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Diğer taraftan, ROS bir dizi genin ve sinyal iletim yollarının ifadesini etkiler. Yapılan son çalışmalar, hücrelerin, çeşitli genetik stres yanıtı programlarını aktive eden ve kontrol eden çevresel göstergeler ve biyolojik işaretler olarak ROS'u kullanmak için stratejileri geliştirdiğini göstermektedir [17].

Serbest radikaller ve serbest radikal türevli oksidanlar biyolojik sistemlerde önemli rol oynadıkları gibi birçok hastalığın da nedenleri arasındadır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) rolünün belirlenmesindeki en büyük problem, bu kısa ömürlü türlerin *in vivo* olarak ölçülmesinin zor olmasıdır.

ROS üretimi her türlü aerobik yaşamın fizyolojik ve normal bir özelliğidir. Memelilerde, fizyolojik koşullar altında, hücreler, herhangi bir toksik ara madde oluşmadan, oksijenin (O_2) yaklaşık % 95'ini suya metabolize eder [18].

ROS'ların kaynakları endojen ve eksojen kökenli olabilir. Eksojen olarak ROS üretimine sebep olabilecek kaynaklar:

- Sigara ve alkol kullanımı
- Çevre kirliliği
- Radyasyon
- UV, X ışınları, Gama ışınları
- Pestisitler, çeşitli endüstriyel kimyasallar
- Ozon, formaldehit, asbest vb kimyasallar.

ROS'lar endojen kaynaklı olarak da üretilebilir. Çeşitli enzimatik ve nonenzimatik süreçler memeli hücrelerinde ROS oluşturabilir. En önemli kaynaklar arasında, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, ksantin oksidoredüktaz (XOR) ve miyeloperoksidaz (MPO) enzimleri tarafından katalize edilen reaksiyonlar bulunmaktadır. Mitokondride gerçekleşen aerobik solunumun sonucunda yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Kortizol ve kateşolamin hormonları gibi bazı etkenler vücudu stres durumuna sokabilir. Bu durum da serbest radikal üretimi ile sonuçlanabilir [19].

Hayvanlarda NADPH-oksidad fagositlerde ve B lenfositlerinde bulunur. Elektron donörü olarak NADPH kullanarak tek elektronlu oksijeni, süperoksit üretimine katalizler. Bu enzim tarafından üretilen O_2^- , oksitlenmiş halojenler, serbest radikaller ve tekli oksijen de dahil olmak üzere çok çeşitli reaktif oksidanların üretimi için bir başlangıç malzemesi olarak hizmet eder. Bu oksidanlar, istilacı mikroorganizmaları öldürmek için fagositler tarafından kullanılır, fakat aynı zamanda konakçının çevreleyen hücrelerine de zarar verebilirler [20].

Süperoksit (O_2^-), hidroksil ($OH\cdot$), peroksil ($ROO\cdot$), lipid peroksil ($LOO\cdot$), ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri reaktif oksijen türleri arasındadır (Tablo 2.1). Tablo 2.2'de verilen nitrik oksit ($NO\cdot$) ve nitrojen dioksit ($NO_2\cdot$) ise reaktif nitrojen türleri arasındadır. Oksidan grubunda olan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH$) ise serbest

radikal değillerdir. Bu canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilen oksidan türleri patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilirler [21].

Tablo 2.1: Reaktif oksijen türleri (ROS) [19]

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^{\cdot}	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	ROO^{\cdot}	Hipobromöz asit	$HOBr$
Alkoksil	RO^{\cdot}	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	HO_2^{\cdot}	Ozon	O_3
Lipid peroksil	LOO^{\cdot}		

Tablo 2.2: Reaktif nitrojen türleri (RNS) [19].

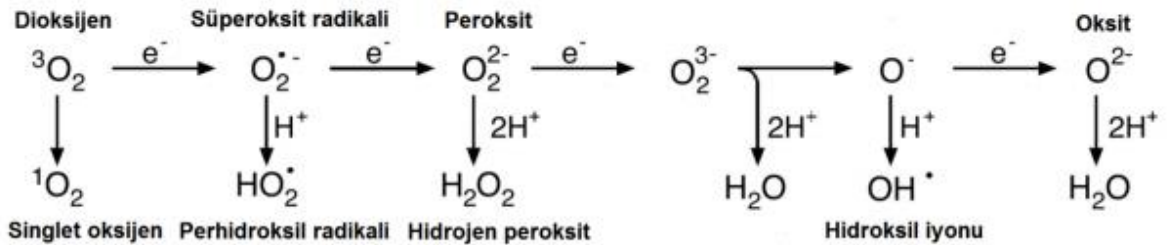
Radikaller		Nonradikaller	
Nitrik oksit	NO^{\cdot}	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	NO_2^{\cdot}	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	$NO^{\cdot-}$
		Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
		Dinitrojen triksid	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot-}$
		Peroksinitrik asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	$ROONO$

Valko ve diğ., (2006) yüksek konsantrasyonlarda, ROS'un hücre yapılarına, nükleik asitlere, lipidlere ve proteinlere verilen hasarın önemli araçları olabileceğini belirtmiştir[22].

Oksijenin bir elektron alması ile indirgenip süperoksit radikali oluşurken, iki elektron alarak indirgenmesi sonucunda hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektronun alınması ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektron eklenmesi ile de su oluşur. Oksijen molekülünün elektron alarak açığa çıkardığı ve en çok rastlanan ROS'lar singlet oksijen ($^1\text{O}_2$ peroksit (O_2^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2),), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ve hidroksil iyonu (OH^{\bullet})'dur [23].

2.2.1.1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$):

Süperoksit, O_2 'in aniyonik formudur. Süperoksit, çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Ayrıca, peroksi radikalleri oluşturmak için karbonil bileşikleri ve halojenlenmiş karbonlar ile reaksiyona girer. Süperoksit radikali oksidatif stresin ana kaynağıdır [23,24]. Oksijen azaltıldığında tek bir elektron tarafından üretilen yüksek derecede reaktif bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerde, bir dizi enzimin normal katalitik fonksiyonu sırasında ve hemoglobinin methemoglobine oksidasyonu sırasında üretilebilirler [24].



Şekil 2.1: O_2 'nin indirgenerek ROSların oluşması

Metabolik süreçler veya fiziksel ışınlama yoluyla oksijen aktivasyonundan sonra ortaya çıkan süperoksit anyonu, "primer" ROS olarak kabul edilir ve enzim veya metal yoluyla doğrudan veya yaygın olarak "sekonder" ROS oluşturmak için diğer moleküller ile etkileşime girebilir. Cadenas ve diğ. (1998), süperoksit üretiminin çoğunlukla mitokondri içinde meydana geldiğini belirtmiştir [24].

Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, memeli hücreindeki ATP'nin ana kaynağıdır ve bu nedenle yaşam için gereklidir.

2.2.1.2.Hidroksil Radikali ($\bullet\text{OH}$):

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötr formudur. Yarılanma ömrü 10^{-9} 'dur. Bu nedenle etkisini oluşturduğu bölgenin yakınlarında gösterir. Hidroksil radikalının, hem pürin hem de pirimidin bazlarına ve ayrıca deoksiriboz omurgasına zarar veren DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Hidrojen peroksit, fenton reaksiyonu ile Fe^{+2} ve Cu^+ veya diğer geçiş elementleri (Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek $\bullet\text{OH}$ 'ye dönüştürülmüş olur (denklem 2.1). Süperoksit anyonu ($\bullet\text{O}_2^-$), Fe^{+2} nin katalizlediği su ile reaksiyona girdiği zaman hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikallerini oluşturan “Haber-Weiss reaksiyonu” oluşmaktadır.



2.2.1.3.Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksit esas olarak enzimatik reaksiyonlarla üretilir. Bu enzimler mikrozomlar, peroksizomlar ve mitokondri içerisinde bulunur. Peroksizom organeli ayrıca, hidrojen peroksiti parçalayan ve bu toksik bileşiğin birikmesini önleyen katalaz içerir. Peroksizom, net ROS üretimini sağlamak için bu enzimlerin nispi konsantrasyonları veya aktiviteleri ile ilgili hassas bir dengeyi korur [25]. Organelin bu dengeyi nasıl koruduğu belli değildir. Peroksizomlar zarar gördüklerinde ve H_2O_2 tüketen enzimleri azaldığında, H_2O_2 sitozole salınır ve bu da oksidatif strese önemli ölçüde katkıda bulunur [25]. Hidrojen peroksit zayıf oksitleyici bir ajandır. Hücre zarından kolayca geçebilir. Eşlenmemiş elektronu bulunmayışı sebebiyle radikal değildir [25,26]. H_2O_2 , belirli koşullar altında, muhtemelen spesifik protein tiyol gruplarını oksitleyerek bir metabolik sinyal olarak hareket edebilir [26].

2.3. ANTIOKSİDANLAR

Fonksiyonları yerine getirmek için enzimleri ve oksijeni kullanan her hücre, hücreye ciddi zarar verme potansiyeline sahip olan oksijen içermeyen radikal reaksiyonlara maruz kalmaktadır. Antioksidanlar, hücrelerde bulunan ve bu reaksiyonları engelleyen bir moleküldür ve serbest radikallere kendileri kararsız forma girmeden, bir elektronu verirler. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif stresin temelini oluşturur[27].

Biyolojik sistemlerde, indirgeyici ve oksidan ajan terimleri kullanmak yerine, sırasıyla antioksidan ve prooksidan terimleri kullanılmaktadır [28]. Antioksidan madde elektronlarını bağışlayan, oksidan madde ise elektronları alan maddelerdir.

Antioksidanlar birkaç şekilde kategorize edilebilir (Tablo 2.3). Enzimatik ve nonenzimatik oluşlarına göre ikiye ayrılırlar. Enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri indirgeyerek ve süpürücü etki ederek çalışırlar. Antioksidan enzimleri, tehlikeli oksidatif ürünlerini; bakır, çinko, manganez ve demir kofaktörleri varlığında çok adımlı bir işlem ile önce hidrojen peroksite sonra suya çevirir. Nonenzimatik antioksidanlar ise serbest radikal zincir reaksiyonlarına müdahale ederek iş görür. Nonenzimatik antioksidanlara örnek olarak C vitamini, E vitamini, polifenol, karotenoidler ve glutatyon verilebilir.

Tablo 2.3: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal	Sentetik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPx)	α - tokoferol	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon-S-transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Katalaz	Karotenoidler	Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)
Glutatyon redüktaz (GR)		Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

Antioksidanları kategorize etmenin bir başka yolu da suda ve yağda çözünürlüklerine göre yapılabilir. Suda çözünen antioksidanlar, örneğin c vitamini, sitozol ya da sitoplazmik matriks gibi hücre sıvılarında bulunur [29]. Yağda çözünen antioksidanlar, örneğin e vitamini, karotenoid ve lipoik asit, ise genellikle hücre membranında bulunurlar.

Antioksidanlar küçük molekülü ve büyük molekülü olmak üzere de ikiye ayrılırlar. Küçük molekülü antioksidanlar, radikal süpürme ve taşınması adı verilen ROSların nötralize edilme olayında görev alır [30]. Bu kategorideki ana antioksidanlar c vitamini, e vitamini, karotenoidler ve glutatyondur. Büyük molekülü antioksidanlar; ROS'ları absorbe eden ve ROS'ların esas proteinlere saldırılarını engelleyen SOD, CAT, GSHPx gibi enzimler ve albüminlerden oluşur.

Antioksidanların düşük seviyede bulunuyor oluşu, kalp hastalıkları ve kanserle ilişkilendirilir. Antioksidanların; yaşlanma, alerjiler, algesia, arthitis, astım, otoimmün hastalıklar, kanser gibi hastalıkların gelişmesine karşı korucu etkisi vardır. Antioksidanların korunma sağladığı diğer hastalıklar; katarakt, serebral iskemi [31].

Antioksidanlar öncelikle diğer radikal türlere göre daha yüksek konsantrasyonda bulunan peroksil radikalleriyle reaksiyona girer. Peroksil radikalleri, diğer radikallere kıyasla sahip oldukları düşük enerjileri nedeniyle daha kolay reaksiyona girer.

C vitamini ve E vitamininin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* pestisit maruziyet modellerinde antikarsinojenik, antiklastojenik ve antimutajenik özelliklere sahip olduğunu gösterilmiştir [32].

2.3.1. Süperoksit Dismütaz (SOD):

SOD'lar, ROS'a karşı ilk savunma hattı olarak görev yapar. Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini hidrojen peroksite çevirerek temizler.

İnsanlarda, SOD üç formu vardır: sitozolik Cu/Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstraselüler SOD (EC-SOD) [33]. Süperoksit dismutaz birbirini izleyen oksidasyon ve geçiş metal iyonlarının indirgenmesi ile süperoksit radikalini yok eder.

Süperoksit dismutaz (SOD), oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmasında süperoksit radikal anyonlarının kararlı durum konsantrasyonunu azaltır [34]. Bununla birlikte, kan dolaşımından hızlı bir şekilde elimine edilir ve gastrointestinal sistemde hızla bozunur, transferi zordur [35].

2.3.2. Glutasyon peroksidaz (GPx):

En büyük endojen antioksidan molekülüdür. H_2O_2 ve organik peroksitlerin suya ve alkole dönüşümünü katalizler. GSH kullanılarak hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize ederek memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korur [36]. Sitozolik ve mitokondriyal glutasyon peroksidaz yağ asidi hidroperoksitleri ve H_2O_2 'yi glutasyonu kullanarak azaltır [36].

GPx, düşük seviyelerde oksidan strese karşı, lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle etkin bir şekilde reaksiyona girebilir.

2.3.3. Glutasyon (GSH):

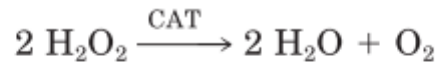
GSH, glutamat-sistein ligaz ve glutasyon sentetazın ardışık etkisi ile sitozolde sentezlenir. Glutasyon, oksidatif strese karşı çeşitli detoksifiye edici enzimlerin bir kofaktörüdür. Hücre nükleusundaki GSH, DNA onarımı ve ifadesi için gerekli olan kritik protein sülfidrillerin redoks durumunu korur.

GSH plazma membranından amino asit taşınmasına katılır. Glutasyon peroksidazın katalitik etkisi ile hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri detoksifiye ederek doğrudan hidroksil radikal ve singlet oksijeni temizler. Glutasyon, en önemli antioksidanlar olan Vitamin C ve E'yi aktif

formlarına dönüştürebilir; glutatyon, direkt olarak E vitamininin tokoferol radikalini indirgeyebilir [37].

2.3.4. Katalaz (CAT):

CAT su ve moleküler oksijen oluşturmak için Hidrojen peroksit ve peroksidaz aktivitesine sahip H donörleri (metanol, etanol, formik asit veya fenoller) ile birlikte çok etkili bir şekilde reaksiyona girer (Denklem 2.2) [38].



Katalaz, hücreleri içlerinde üretilen hidrojen peroksitten korur. Her ne kadar CAT normal koşullar altında bazı hücre tipleri için gerekli olmasa da, hücrelerin adaptif yanıtında oksidatif strese karşı toleransın kazanılmasında önemli bir rol oynar [38].

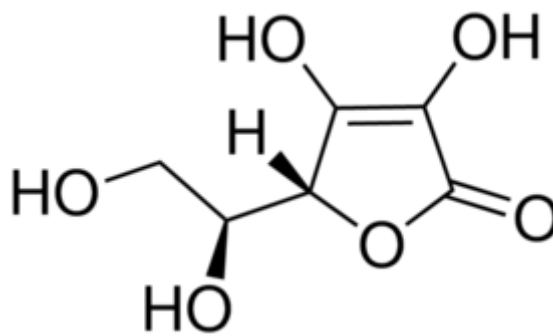
2.4. C VİTAMİNİ

Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, suda çözünebilen vitaminler sınıfındadır. C vitamini hem *in vivo* hem *in vitro*'da antioksidan işlevi görür ve ROS'ların genotoksik etkilerini engelleme potansiyeline sahiptir. C vitamini (L-askorbik asit) hidrofilik yapıdadır ve ekstraselüler sıvılardaki serbest radikal süpürmede çok önemlidir, sulu fazda radikalleri yakalar ve membranları peroksidatif hasardan korur.

C vitamininin antikanserojenik, antiklastojenik ve antimutagenik rolleri, radyasyon ve pestisitlere maruz kalan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde test edilmiştir [39]. Çeşitli hücresel kompartmanlarda ve dokularda lipid ve lipoproteinlere oksidatif hasarın neden olduğu serbest radikallerin üretiminin artmasını önler [40].

2.4.1. C Vitaminin Kimyasal Yapısı

C vitamini, altı karbonlu bir bileşiktir (Şekil 2.2). Turunçgillerde ve birçok sebze doğal olarak bulunur. Suda çözünebilir vitaminlerdendir. C vitamini, insanlar tarafından üretilemez veya saklanamaz ve besinlerle alınmalıdır. L-askorbik asit, C vitamininin doğal olarak oluşan ve biyolojik olarak aktif olan formdur. Suda çözünebilir L-askorbik asitin %99'u fizyolojik pH'da iyonize olarak L-askorbat'a dönüşür; bu da H atomu vererek askorbil radikalini oluşturabilir. L-askorbik asidin kimyasal ismi 2,3-didehidro-L-threo-heksano-1,4-lakton'dur [41].



Şekil 2.2: L-askorbik asidin kimyasal formu

C vitamini terimi genellikle askorbat ve dehidroaskorbik asidin de dahil olmak üzere askorbatın biyolojik aktivitesini niteliksel olarak sergileyen tüm bileşikleri tarif etmek için kullanılır.

2.4.2. C Vitaminin Biyolojik Etkileri

C vitaminin fizyolojik fonksiyonu indirgeyici ajan veya elektron verici olarak görev almasıdır. C vitaminin insanda sekiz enzim için spesifik bir elektron donörü olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin üçü (prolin hidroksilaz, lizin hidroksilaz ve prokollajen-prolin 2-oksoglutarat 3-dioksijenaz), kolajenin posttranslasyonel hidroksilasyonuna katılmakta, bu da stabil kolajen helezonların formasyonu için gereklidir. C vitamini eksikliğinde oluşan hastalıklar çoğunlukla kusurlu kolajen sentezi sonucu oluşur. Örneğin; kan damarının kırılmaşması, diş kaybı, kemik ve bağ doku bozuklukları, yaraların geç iyileşmesi, iskemi gibi. C vitamini ayrıca enerji metabolizmasında kritik görevi olan L-karnitinin biyosentezinde de görev alır. İskorbüt hastalığının erken belirtilerinden olan yorgunluk ve bitkinlik hali L-karnitinin metabolizmada sentezlenememesinden kaynaklanır. C vitamini, dopaminin norepinefrine dönüşmesini katalize eden enzim olan dopamine- β -monooksijenazın kosubstratı olarak görev alır. İskorbüt hastalığının etkilerinden olan depresyon, ruh hali değişimleri ve hipokondri gibi nöropsikiyatrik değişiklikler, yetersiz dopamin hidroksilasyonu ile ilişkili olabilir [42].

Bazı bitki ve hayvan türleri tarafından sentezlenen bu vitamin insanın da içinde bulunduğu primatlar takımı, bazı balık türleri, gine domuzu ve meyve yarasaları tarafından ise üretilemez ve dolayısıyla dışarıdan takviye edilmesi gerekmektedir [43]. Bazı türlerde c vitamininin sentezlenememesinin nedeni, bu türlerde, askorbat biyosentezinin son reaksiyonunu katalizleyen gulonolakton oksidaz enziminin bulunmamasıdır.

Farklı ülkelerde günlük alınması gereken C vitamini değeri 40mg/gün ile 90mg/gün arasında farklılık göstermektedir. Örneğin büyük Britanya 40 mg/gün, dünya sağlık örgütü 45 mg/gün, Kanada ve Amerika'da kadınlarda 75 mg/gün erkeklerde 90 mg /gün C vitamini alınmasını önermektedir [44]. Yapılan uzun dönemli çalışmalara göre C vitaminin plazmada serbest radikallerin neden olduğu hastalıklardan koruyucu etkisi için kanda minimum 50 mikromolar/l bulunması gerekiyor. Bu da günlük 124.2 mg C vitamini alınması anlamına gelmektedir. Buna müteakip Carr ve Frei günlük 120 mg alınmasını tavsiye etmektedir. C vitamini alınmasının insanda en önemli etkisi bu vitaminin biyokimyasal fonksiyonlarıdır. Oksijenden türetilen serbest radikallerle reaksiyona girerek mikrozomal hidroksilasyon enzimlerini etkiler ve böylece zenobiyotiklerin biyotransformasyonunda etkilidir [45].

2.4.3. C Vitaminin Antioksidan Özellikleri

Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, suda çözünebilen vitaminler sınıfındandır. C vitamini en çok tüketilen antioksidanların başında gelir. C vitamini hem *in vivo* hem *in vitro*'da antioksidan işlevi görür ve ROS'ların genotoksik etkilerini engelleme potansiyeline sahiptir. *In vivo*'da ROS'ların etkilerini etkin bir biçimde giderebilme yeteneği protoonkogenlerin ve tümör supresör genlerin zarar görmesini azaltabilir ve böylece kanser riskini düşürmede yardımcı olabilir. Epidemiyolojik verilere göre, C vitamininden zengin besinlerin tüketimi çeşitli kanser türlerinin görülmesini yarı yarıya azaltabilmektedir [6]. 2 g takviyenin, plazma vitamin C düzeylerini yaklaşık 74 ila 170 μM (17) arasında arttırabildiği bildirilmiştir [6].

Yüksek dozda C vitamini ve diğer antioksidanların alımının, muhtemelen antioksidan mekanizmaları sayesinde kanser ve kalp damar hastalıkları gibi kronik hastalıklara yakalanma riskinin azalmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir [46]. C vitamini suda çözünen kompartmanda oksijen radikalleriyle ilk etkileşime giren tabakadır. Superoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijenle direkt olarak reaksiyona girer. Serbest radikaller hem kanserin başlamasında hem de ilerlemesinde rol oynar. Askorbik asit bu prosesleri engelleyebilir [47].

C vitamini, selüler makromolekülleri, özellikle DNA'yı farklı ajanlar tarafından indüklenen oksidatif hasardan korumada kullanışlı ve önemli bir antioksidandır. C vitaminin kendisi mutajen değildir. Oksi radikalleri sayesinde, mutajenite özelliği kazanır. C vitamini ile yapılan *in vitro* çalışmalara göre antitümör ajanların klastojenik etkisini düşürebilmektedir. C vitamini tümör hücresinin büyümesini baskılar. C vitamini *in vivo* ve *in vitro*da bazı tümör hücrelerinin gelişimini baskılayabilir. Glutasyon, üre, E ve C vitamini gibi antioksidanlar veya süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi enzimler antimutajenik ve antikarsinojenik özellikleriyle hücreleri oksidatif hasardan korur.

Askorbatın antioksidan özelliğinden dolayı, askorbil radikalının reaktivitesi azdır. Yüksek reaktiviteli serbest radikaller askorbat tarafından indirgenir ve oluşan yeni askorbil radikali zayıf reaktiviteye sahiptir. Askorbat ayrıca hipoklorus asit, ozon gibi radikal olmayan reaktif türleri de temizleyebilir [48].

Yaşlanma sürecini hızlandıran en önemli faktörün oksidatif stres olduğu düşünülmektedir. Yüksek dozda C vitamini alımının, muhtemelen antioksidan etkisi ile, kardiyovasküler hastalıklar ve kansere yakalanma riskini düşürdüğüne dair çalışmalar sıkça yapılmaktadır.

C vitamini, dokuları oksidatif hasara karşı korumada etkilidir. Nitrozaminler ve kinonlar gibi karsinojenlerin oluşumunu baskılamaktadır. Suda çözünür olduğu için ekstraselüler vücutta serbest radikal ile kolayca reaksiyona girebilir

C vitamini, antioksidan etkilerini hem doğrudan hem de dolaylı yollarla uygular. Direkt olarak, C vitamini metabolik reaksiyonların bir yan ürünü olarak oluşan serbest radikalleri temizler.



2.5. E VİTAMİNİ

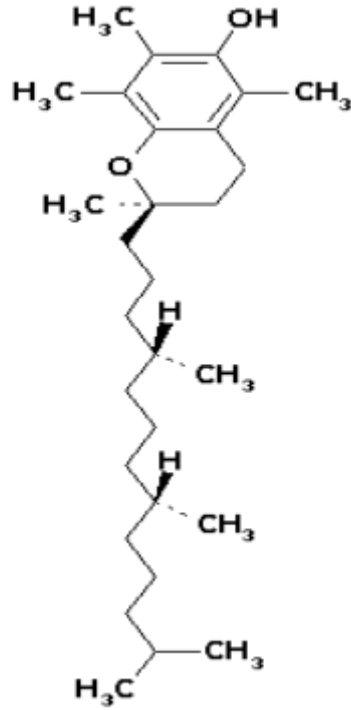
E vitamini 1922 yılında sıçanların üremesinde etkili olan besinsel faktörleri çalışan Evans ve Bishop tarafından keşfedilmiştir. 1936'da buğday tohumu yağında E vitamininin aktif bileşiği izole edildi ve bu bileşik Evans tarafından alfa-tokoferol olarak adlandırıldı. Alfa-tokoferol kelimesi, Yunanca *tocos* (doğum) ve *feroin* (getiren) kelimelerinin birleşiminden gelmektedir [49].

E vitaminin antioksidan etkisi C vitamini takviyesi ile artırılabilir [50]. E vitamini ve askorbik asit etkileşimi, ootoksitleme lipit sistemlerinde vitamin E'yi rejenere eder. E vitamininin çeşitli işlevleri, kanseri önleme ve kanserin kontrolü ile ilişkilidir. E vitamini serbest radikal süpürücü olmasının yanında, yüksek miktarda alınımı vücut bağışıklımı yükseltebilir [50,51,52].

2.5.1. E Vitaminin Kimyasal Yapısı

E vitamini terimi, doğal olarak oluşan α , β , γ ve δ olarak adlandırılan dört tokoferol ve dört tokotrienol içeren sekiz lipofilik bileşiği tarif etmek için kullanılır. Tokoferoller ve tokotrienoller aynı kroman halkaya sahipken tokotrienoller fitil zincirinde üç çifte bağ içerir.

E vitamini yağda çözünebilir 6-hidroksi kroman bileşikleri için ortak bir terimdir. (2-metil-2- (4', 8', 12'-trimetiltridesil) -kroman-6-ol) genellikle ana tokoferol bileşiği olarak kabul edilir. E vitamini terimi, α -tokoferolün biyolojik aktivitesini niteliksel olarak gösteren tüm tokol ve tokotrienol türevleri için jenerik tanımlayıcı olarak kullanılmaktadır. Tüm fotosentetik organizmalar tarafından sentezlenir. Bitkisel ürünler E vitaminin doğal kaynaklarını oluşturur. Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, alfa tokoferol hem fotosentetik hem de yüksek bitkilerin fotosentetik olmayan dokularında kloroplastlarında yoğunlaşmıştır. Diğer tokoferoller ve tokotrienoller ise fotosentetik olmayan dokularda daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Golgi membranlarında ve sitozolde hiçbir tokoferol bulunmamaktadır. Tokoferollerin biyosentezi öncelikle kloroplastlarda meydana gelmektedir [51].



Şekil 2.3: Alfa tokoferolün yapısal formülü

2.5.2. E Vitaminin Biyolojik Etkileri

E Vitamini, diğer lipid ve suda çözünen antioksidanlarla birlikte, serbest radikallere karşı etkili bir savunma ve serbest radikallerin hücresel düzeyde verdiği zararlara karşı etkili bir savunma sağlamak için çalışır.

E vitamininin en iyi bilinen işlevi, lipid peroksidasyonunun döngüsel progresyonunu engelleyen zincir kırıcı antioksidan olmasıdır. Antioksidan fonksiyonuna rağmen, insanlarda diyet E vitamini gereksinimi sadece α -tokoferol ile sınırlıdır, çünkü diğer E vitamini formları hepatik bir α -tokoferol transfer proteini (TTP) tarafından zayıf bir şekilde tanınır ve insanlarda bir α -tokoferole dönüşmezler.

α -Tokoferol, hücre zarlarında bulunan ve lipoproteinleri korumak için mevcut olan memeli ve bitki hücrelerinde birincil, yağda çözünebilir, antioksidandır. Membranın fiziksel özelliklerine olan etkilerinin yanında, E vitamini; çoklu doymamış yağ asitlerinin oksitleyici etkisini azaltır. Alfa Tokoferol, bir antioksidanın yanı sıra önemli bir membran stabilize edici bileşen olarak kabul edilir. Membranın iki tabakası içine gömülü olarak bulunur. Hidrojen bağı ve hidrofobik

etkileşimlerin alfa tokoferolün kromanol halkası, membranın fitil kuyruğu ve yağ asitleri arasında gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu etkileşimler membranı stabilize eder. *In vitro*'da E vitaminini H atomu vererek rejenere eden askorbik asit ve glutatyondur. Suda çözünür hidrojen donörlerinin radikalleri, oksidasyon-redüksiyon döngüleri vasıtasıyla, radikal olmayan durumlarına geri döndürülür.

E vitamini en az toksik vitaminlerden biridir ve gıdalarda doğal olarak bulunan E vitamini tüketiminin yan etkilerine dair kanıt yoktur [52].

Kardiyovasküler hastalık; kalp ve/veya kan damarları, koroner kalp hastalığı, inme, periferik damar hastalıkları ve yüksek tansiyon hastalıkları için kullanılan genel bir terimdir. Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunun kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde majör etken olduğu düşünülmektedir. E vitamini; Protein kinaz C'nin inhibisyonu ile düz kas hücresi proliferasyonunu ve LDL oksidasyonunu inhibe eder. Ayrıca Hücre içi ve vasküler hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe eder.

2001 yılında, FDA, E vitamini besin takviyeleri ve kalp hastalığı riskinin azalması arasındaki ilişki hakkında yayınladığı rapora göre; düşük doymuş yağ ve düşük kolesterolü sağlıklı bir diyetin parçası olarak günlük 400 IU E vitamini alınması kalp hastalığı riskini azaltmaktadır [53].

Vitamin E ayrıca mide içindeki nitritlerin, kanser promotörleri olan nitrozaminlere dönüşümünü inhibe eder. Tokoferoksil radikalleri askorbat ile reaksiyona girerek tokoferole dönüşür.

2.5.3. E Vitaminin Antioksidan Etkileri

Vitamin E, *in vivo*'da olarak güçlü bir peroksil radikal süpürücü olarak işlev görür [54]. Peroksil radikalleri (ROO \cdot) α -tokoferol ile çoklu doymamış yağ asitleri (RH) ile olandan 1000 kat daha fazla reaksiyona girme eğilimindedir.

Araştırmalar, yaşlanma sürecinde serbest radikal hasarının hızlandığı ve lipid peroksidasyonunun olması gereken uzun ve sağlıklı süreç için önemli bir faktör olabileceğine dair kanıtlar olduğunu göstermiştir [55]. Hayvan ve insan çalışmaları, yaşlanma sürecindeki

serbest radikal reaksiyonları ve peroksidatif değişiklikler üzerine E vitamini ve diğer antioksidanların koruyucu etkilerini göstermiştir.

E vitamini bulunduğu biyolojik ortamda serbest radikal türlerini toplayarak peroksidasyonun ilk evresinde zardaki fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitlerini korumak için oksidatif strese karşı ilk savunma yolunu oluşturur [56]. E vitamini singlet oksijen, süperoksit ve daha çok hidroksil radikallerini indirger [55].

E vitamini radikal giderme, serbest radikalleri baskılama ve endojen savunmayı onarma mekanizmalarının tamamını kullanabildiği gösterilmiştir. Yüksek bir antioksidan kapasitesine sahip olduğu ve hızlı bir etki gösterdiği bildirilmiştir [56].

Lipit peroksitler kanser ve yaşlanmaya neden olan genetik hasarlara neden olabilirler. Alfa tokoferol fenolik H⁺’yi lipid peroksi radikallerine hızlı aktarabildiğinden etkili bir zincir kırma antioksidanıdır.

2.6. MİKRONÜKLEUS TEKNİğİ

Kromozom seviyesindeki DNA hasarı genetik toksikolojinin ana kısmıdır çünkü kromozomal mutasyon karsinogenezin önemli bir adımıdır. DNA üzerinde hasar meydana getirerek genetik bilgiye hasar veren veya kansere neden olabilecek mutasyonlar oluşturabilen kimyasal ya da ajanlara genotoksin denir [57].

Mikronükleus testi, kromozom aberasyonlarının tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Mikronükleus testi; mitotik hücrelerin anafaz esnasındaki kromatid kırıkları veya kromatitteki değişimlerini gözlemlenmesi esasına dayalıdır. Bu testin en önemli kullanımı kullanılan kimyasalın bilinmeyen mutajenik potansiyelini ölçmek ve farklı dozlarda oluşturabileceği etkilerini belirleyebilmektir.

Yaşam tarzı (örneğin diyet), çeşitli medikal terapiler, iklimsel değişimler ve özellikle endüstriyel aktiviteler kimyasal ve fiziksel genotoksinlere neden olurlar. İnsan popülasyonundaki kabul edilebilen genetik hasarın seviyesi, seçili genotoksinlere karşı aşırı duyarlı olan bireyler, çevreye yayılan yeni kimyasalların etkilerinin belirlenebilmesi için mikronükleus testi kullanılmaktadır.

MN testi kromozom aberasyon testi ile karşılaştırıldığında hem skorlama süresi hem de tespit işlemleri bakımından daha kolay ve basit bir yöntemdir. İnsan lenfositlerinde yapılan MN testi hem tüm kromozom kayıplarını hem de kromozom kırıklarını belirleyebilir (Şekil 2.4). MN sadece binükleat hücrelerde skorlanır. Mikronükleuslar, sitokinezin bloke edilmesi ile elde edilir (Şekil 2.5). Sitokinezin bloke edildiği hücrelerde binükleat hücrelerin saptanması için şu kriterleri sağlamalıdır [58].

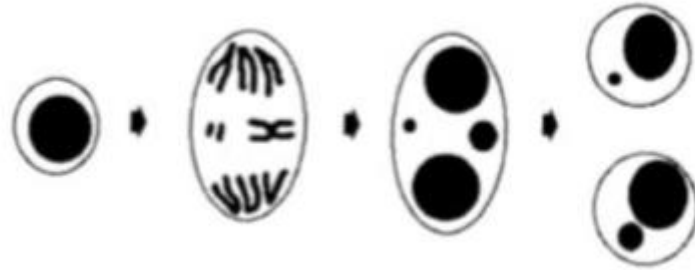
i) hücre birbirine eş iki nükleusa sahip olmalıdır.

ii) hücreler 6'dan fazla MN içermemelidir.

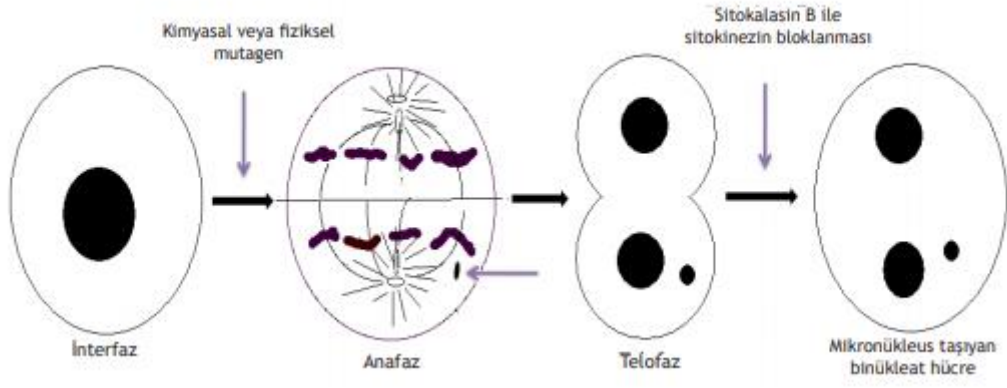
iii) 2 nükleus, nükleoplazmik köprü ile bağlı olabilir.

iv) 2 nükleus hafifçe üst üste binmiş olabilir veya köşelerden birbirine dokunabilir.

Mikronükleusun belirlenme kriterleri: MN'ler morfolojik olarak birbirine eş fakat normal nükleustan küçüktür. Ölçüleri ana nükleusun 1/16'sı ile 1/3'ü arasındadır. Kırılgan değildir. Ana nükleusa nükleoplazmik köprü ile bağlı değildirler. MN bazen ana nükleusun sınırlarıyla üst üste binmiş halde olabilir.



Şekil 2.4: MN oluşum şeması [58].



Şekil 2.5: Sitokalsin B etkisi ile MN oluşumu [58].

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez projesinde, insan kökenli lenfoblast hücre soyu olan TK6 hücresi kullanılmıştır. Hücrelerde oksidatif stres koşulları oluşturulması için H₂O₂ uygulanmıştır. Hücre kültür flasklarına 0,5.10⁶ hücre ekilmiştir.

3.1. DENEY MATERYALLERİ

3.1.1 E Vitamini

Bu projede kullanılan antioksidanlardan biri olan E vitaminin suda çözünen sentetik formu α - tokoferolün kimyasal adı DL- alfa-Tocopherol'dür. Molekül ağırlığı: 250,29 g/mol ve kimyasal formülü: C₁₄H₁₈O₄ 'dir. Sinonimleri: (\pm)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksili asit, trolox. Kullanılacak dozlar 20, 50, 100, 200 ve 400 μ g/ml olarak belirlenmiştir.

3.1.2. C Vitamini

Bu projede kullanılan diğer antioksidan L-askorbik asidin kimyasal formülü C₆H₈O₆'dır. Molekül ağırlığı 176,12 g/mol'dür. Sinonimleri: L-Threoaskorbik asit, Antiskorbutik faktör, C vitamini. Kullanılacak dozlar 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml olarak belirlenmiştir. Vitamin RPMI-1640 medyum içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ

Toksikoloji çalışmalarına uygun olan TK6 lenfoblast hücrelerinin *in vitro* çalışmalarda devamlılığı için haftada iki kez olmak üzere deney süresince pasajı yapıldı. RPMI-1640 Hepes medyumu ve %10 Fetal bovine serum kullanıldı. %5 CO₂ içeren 37°C etüvde muhafaza edildi.

Bu projede hem askorbik asitin hem de α -tokoferolün *in vitro* ortamında farklı dozları test edilmiş ve prooksidan özellikleri de göz önünde bulundurularak düşük konsantrasyonları tercih edilmiştir.

3.3 MN TESTİ

Kültüre ekilen hücrelere oksidatif hasarı oluşturmak için H₂O₂ ve hasardan korunmak için de vitaminlerin değişik dozları aynı anda verildikten sonra 30 dk CO₂ etüvde inkubasyona bırakıldı. 30 dakika sonunda 1 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi hücre medyumu ile

yapıldı. Deneyin 4. saatinde hücreleri sitokineзде durdurmak için 3 µg/ml Cytochalasin-B uygulandı. 48. saatte inkubasyon süresi sonlandırılarak fiksasyon işlemine geçildi. İnkubasyon süresi dolan hücreler 200 g'de 8 dk santrifüj edilerek süpernatantı alınan tüplere 0,075 M KCl çözeltisi eklenip 8 dk daha santrifüj edildi. Bu işlem sonunda süpernatant kısmı tekrar atılıp pelete 7:1 oranında metanol asetik asit karışımı uygulandı. 2 tekrar halinde uygulandıktan sonra buzlu lamlara hücreler 15 cm yükseklikten damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruma gerçekleştiğinden sonra fosfat tamponlu %5'lik Giemsa boyası ile 5 dk muamele edildi. En az 24 saat kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra entellan ile üzerlerine lamel kapatıldı, 24 saat kurutuldu ve preparatlar sayıma hazır hale getirildi. C vitamini, E vitamini ve C+E vitamini kombinasyonunun farklı dozları ile ayrı ayrı yapıldı. Her set üçer kez tekrarlandı.

C vitamini tedavisi deneyinde toplam 12 flask kullanılmıştır. 1. Kültür kontrol dozu olarak belirlenmiş ve hiçbir doz uygulanmamıştır. 2,3,4,5 ve 6 numaralı flaslara sırasıyla 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml askorbik asit dozları uygulanmıştır. 7. flask hidrojen peroksitin kontrolü olarak belirlenip sadece hidrojen peroksit uygulanmıştır. Geri kalan numaralarda ise 50 µM H₂O₂ ile birlikte sırasıyla 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında askorbik asit uygulanmıştır.

E vitamini tedavisi deneyinde yine toplamda 12 flask kullanılmış, 1 numaralı flask kontrol dozu olarak belirlenip hiçbir tedavi uygulanmamıştır. 2,3,4,5 ve 6 numaralı flaslara sırasıyla 20, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozlarında alfa tokoferol uygulanmıştır. 7 numaralı flask hidrojen peroksitin kontrolü olarak belirlenip sadece 50 µM H₂O₂ uygulanmıştır. 8,9,10,11 ve 12 numaralı flaslara ise 50 µM H₂O₂ ile birlikte sırasıyla 20, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozlarında alfa tokoferol verilmiştir.

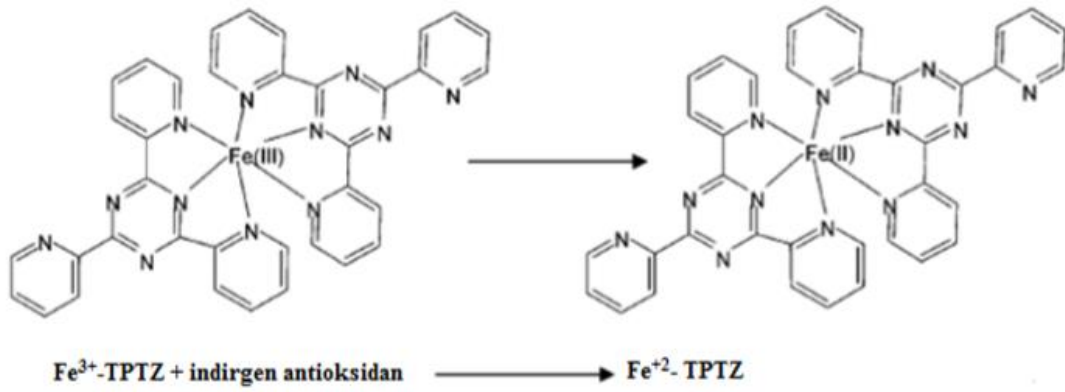
C ve E vitamini kombinasyonu deneyinde total 12 flask kullanılıp 1 numaralı flask hücre kontrolü 7 numaralı flask ise hidrojen peroksit kontrolü olarak belirlenmiştir. 2,3,4,5 ve 6 numaralı flaslara sırasıyla 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında askorbik asit ve 20, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozlarında alfa tokoferol uygulanmıştır. 8,9, 10, 11 ve 12 numaralı flaslara ise hem 50 µM H₂O₂ hem sırasıyla sırasıyla 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında askorbik asit ve 20, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozlarında alfa tokoferol uygulanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: İnkübasyona bırakılan flasklar

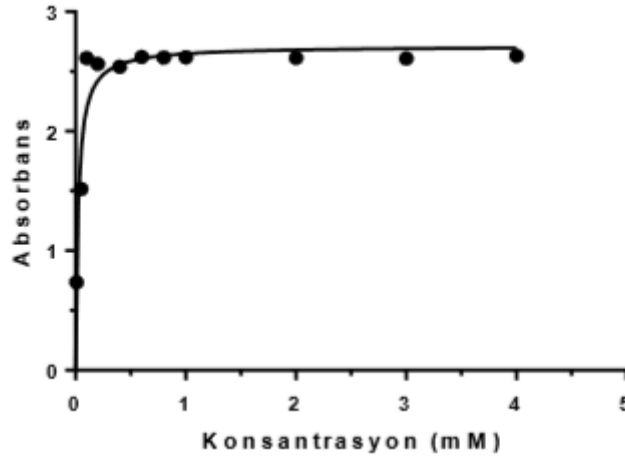
3.4 FRAP TOTAL ANTIÖKSİDAN KAPASİTE

Total antioksidan kapasite ölçüm yöntemi FRAP (Plazmanın demir indirgeyebilme kapasitesi) tekniği, antioksidanlar tarafından ferrik tripiridiltriazin [Fe(III)-(TPTZ)^2] bileşiğinin ferröz tripiridiltriazin [Fe(II)-(TPTZ)^2] formuna indirgenme kapasitesini belirlemektedir. FRAP 4 dk içinde gerçekleşen redoks tepkimesine dayalı bir metod olduğunda hızlı ve kolayca uygulanabilmektir [59].



Şekil 3.2: FRAP reaksiyonu [59]

FRAP metodunda kültüre edilen hücre 200g'de 8 dk santrifüj edilip süpernatantı ayrılmıştır. FRAP reaktifi 10:1:1 oranında 300 mM asetat solüsyonu (25 ml, pH 3,6): 40 mM hidroklorik asit (HCl) içerisinde 10 mM TPTZ (2,5 ml): 20 mM demir III klorür hegzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (2,5 ml) karışımı ile taze olarak hazırlanmıştır. Spektrofotometride 593 nm dalga boyunda 3 ml taze hazırlanmış FRAP reaktifi kullanılmadan hemen önce 37 °C'ye ısıtılmış ve blank (M1) olarak okutulmuştur. Örneğin karışımdaki hacmi 1/34 (v/v) olacak şekilde 100 µl örnek ve 300 µL distile su küvete eklenerek spektrofotometrede absorbans ölçülmüştür. Standart olarak ferröz sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) kullanılmıştır. İlk yapılan ölçümlerden 4 dk sonra tekrarlanan ölçümlerde absorbanstaki değişim ile FRAP değeri hesaplanmıştır [60].



Şekil 3.3: FRAP standart eğrisi

FRAP standart eğrisinde $r^2=0,91$ ve $y=2,713x/(0,0244+x)$ olarak bulunmuştur ve FRAP değeri bu denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5 PREPARATLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sayım işlemleri Nikon E100 ışık mikroskopunda gerçekleştirildi. Hücreler x400 büyütmede incelenip, mikronükleusların teyidi x1000 büyütmede gerçekleştirildi. C vitamini, E vitamini ve C+E vitamini uygulanan kültür sonunda elde edilen BN hücrelerdeki MN frekansları kendi aralarında değerlendirildi. Her grubun proliferatif indeksi (Pİ) belirlenip farklı dozları ve H₂O₂ sonucu ilişkisi değerlendirildi. Pİ değerleri aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır (Denklem 4.1) [61].

$$P\dot{I} = (M1 + 2M2 + 3 M3 + 4 M4) / N \quad (4.1)$$

(M1: Bir nükleuslu hücreler, M2: İki nükleuslu hücreler, M3: Üç nükleuslu hücreler, M4: Dört nükleuslu hücreler ve N: Toplam hücre sayısı)

3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlarda verilen grafikler regresyon analizi ile elde edilmiştir. Farklı kombinasyonlarda vitamin ve hidrojen peroksit+vitamin uygulanması ile elde edilen MN ve Pİ verilerinin istatistik karşılaştırılmaları Graphpad Prism 7.0 programı ile yapılmıştır. Lineer olmayan regresyon

analizine göre birinci dereceden polinom olarak çizilen eğriler F testi ile karşılaştırılıp F ve p değerlerine ulaşılmıştır. Bu değerleri aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır (Denklem 3.1 ve 3.2).

$$F = \frac{(SS1 - SS2) / (DF1 - DF2)}{SS2 / DF2} \quad (3.1)$$

$$p = F \text{ DAĞ} (F \text{ değeri}; DF1 - DF2; DF2) \quad (3.2)$$

Formüllerde SS1; karelerinin toplamının birleşimi, SS2; karelerinin toplamını, DF1; serbestlik derecesinin birleşimini ve DF2; serbestlik derecesini ifade eder.



4. BULGULAR

4.1. MN TESTİ SONUÇLARI

C vitamini grubuna ait veriler Tablo 4.1’de verilmektedir. C vitamininin tek başına uygulandığı kültürlerde yüksek 2 adet doz hariç olmak üzere, elde edilen BN hücre sayıları 1000 üzerinde olmuştur. Fakat H₂O₂ ile birlikte uygulandığında BN hücre sayıları artan vitamin dozu ile birlikte düşüş göstermektedir. Buna bağlı olarak çoklu nükleusların sayılarında H₂O₂ grubunda azalmaktadır. C vitamini hidrojen peroksit ile indüklenen hücrelerde MN/BN sıklığını değiştirmemiştir.

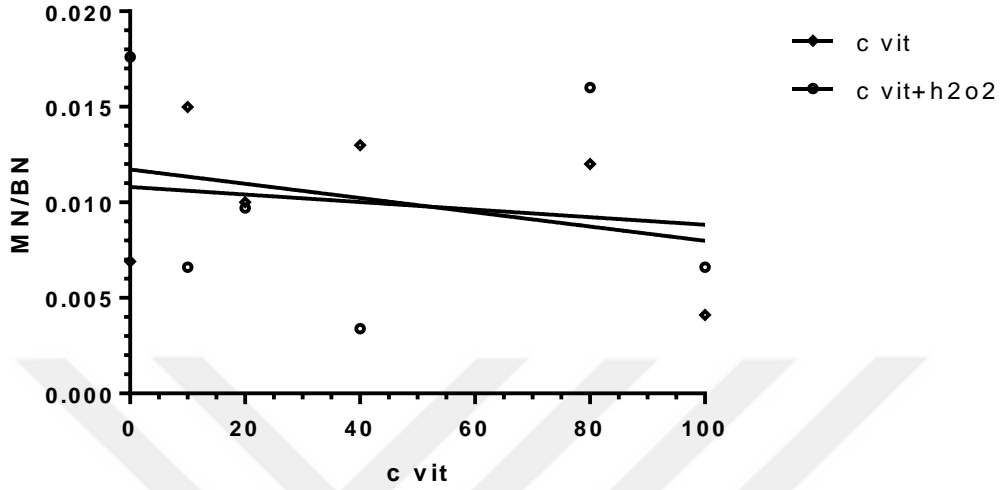
Tablo 4.1: Farklı C vit konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.

No	C vit (mg/ml)	BN hücre	MN	MN/BN	Çoklu nükleuslar					Pİ
					M1	M2	M3	M4	M5	
1	0	1000	7	0,007	954	15	324	326	237	1,108
2	10	1100	17	0,015	830	19	336	279	86	1,102
3	20	1096	11	0,010	866	33	385	434	130	1,27
4	40	1216	17	0,013	933	16	434	385	130	1,21
5	80	736	9	0,012	478	24	135	145	56	0,95
6	100	241	1	0,0041	191	2	24	18	14	0,69
No	H ₂ O ₂ +C vit (µg/ml)	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
7	0	400	6	0,015	324	6	203	96	8	1,26
8	10	453	3	0,0066	458	2	327	114	15	1,38
9	20	307	3	0,0097	365	1	145	76	11	1,22
10	40	288	1	0,0034	144	5	140	68	14	1,28
11	80	120	2	0,016	150	4	57	34	9	1,23
12	100	150	1	0,0066	100	0	42	22	0	0,98

BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks. H₂O₂ dozu her birinde 50 µM dozunda uygulanmıştır.

Binükleat hücrelerden elde edilen MN sıklıkları ile C vitamini konsantrasyonları arasındaki ilişki Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Yalnızca C vitamininin verildiği grupta, MN sıklıkları ile C vitamini konsantrasyonları arasında korelasyon gözlenmemiştir ($r^2=0,31$). H₂O₂ uygulanan

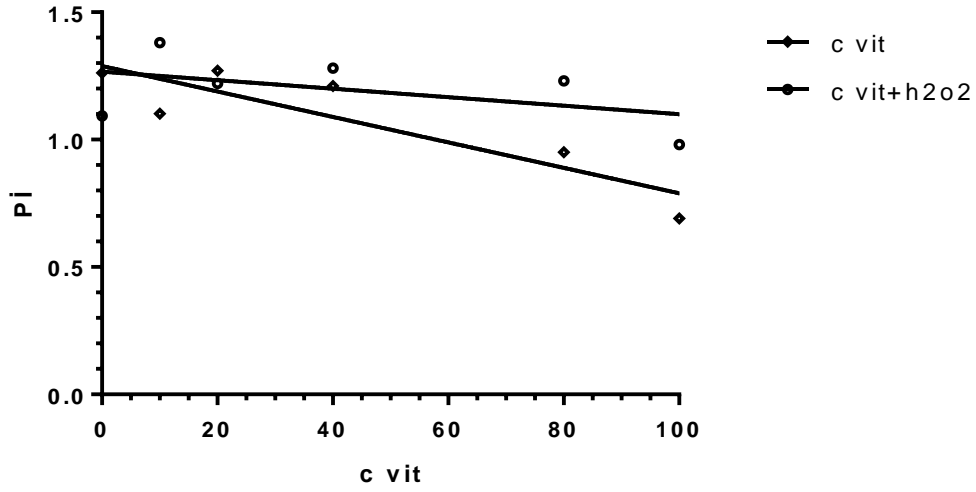
hücre grubunda da C vitaminin farklı dozları uygulamasında, MN sıklığı ile arasında korelasyon bulunmamaktadır ($r^2=0,02$).



Şekil 4.1: C vitamini ve C vitamini+H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerin MN/BN karşılaştırılması

Deney sonuçlarına ait verilerin eğrileri, istatistiksel olarak en iyi fit veren 1. derece denklem ile çizilmiştir. Verilerin aralarındaki farklılıkları belirlemek için her bir eğriyi tanımlayan denklemlerin istatistiksel karşılaştırmaları F-testi ile yapılarak p değerlerine ulaşılmıştır.

C vitamini test grubunda, hem sadece farklı dozlar halinde uygulanan C vitamini tedavisi hem de hidrojen peroksit verilen grupta MN/BN oranının verilen dozlarla düşme eğiliminde olduğu gözlemlenmiş olmakla birlikte 2 eğrinin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,99$). L-askorbik asidin *in vitro* ortamda konsantrasyonu arttıkça askorbata dönüşerek toksik etki gösterebilir. Fakat bu çalışmada her ne kadar eğriler düşme eğiliminde olsa dahi genotoksik ya da antigenotoksik etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 4.2: C vitamini ve C vitamini+ H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerin Pİ karşılaştırılması

C vitamini tek başına mutajen özelliğe sahip değildir. Fakat, güçlü bir radikal süpürücü olan C vitamini antioksidan özelliği olmasına rağmen, yüksek dozlarda otooksidasyona uğrar ve hasarı engelleyemediği gibi hasarı artırır [62]. Yüksek konsantrasyonlarda fenton reaksiyonu ile H₂O₂'ten hidroksil radikali üretimini artırır ve sonuç olarak hem hasara sebep olur hem de koruyucu özellik göstererek etki eder[63].

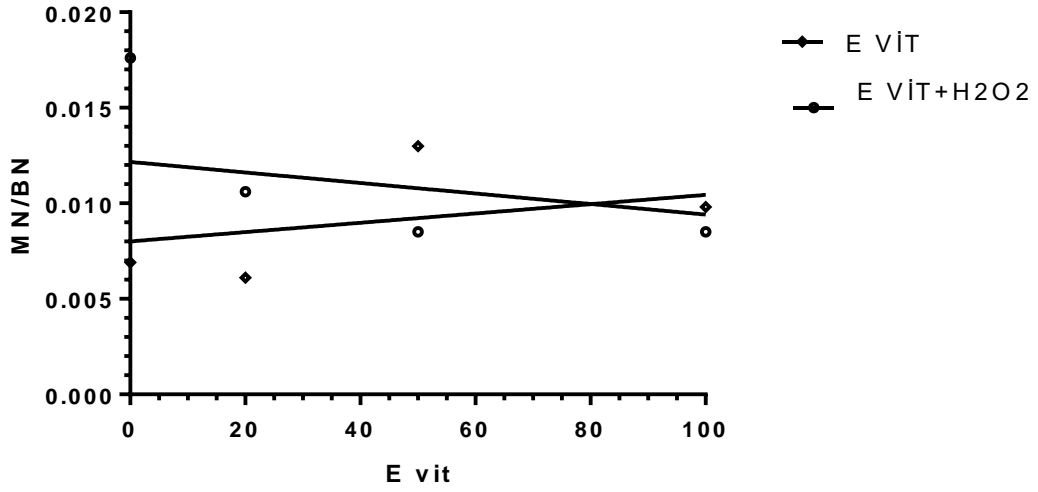
Tablo 4.2'de verilen E vitamin grubuna ait verilerde, E vitamininin tek başına uygulandığı kültürlerde elde edilen BN hücre sayıları 1000 üzerinde olmuştur. Fakat H₂O₂ ile birlikte uygulandığında BN hücre sayıları artan vitamin dozu ile birlikte düşme eğilimine girmişlerdir. Çoklu nükleusların sayıları H₂O₂ grubunda azalma göstermektedir.

Tablo 4.2: Farklı E vit konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.

No	E vit ($\mu\text{g/ml}$)	BN hücre	MN	MN/BN	Çoklu nükleuslar					Pİ
					M1	M2	M3	M4	M5	
1	0	1351	8	0,0059	831	25	559	628	218	1,379
2	20	1300	8	0,0061	650	22	600	593	146	1,43
3	50	1000	13	0,013	422	6	356	265	138	1,16
4	100	1016	10	0,0098	466	19	308	199	27	1,08
5	200	1000	14	0,014	783	24	416	204	66	1,12
6	400	1000	17	0,017	503	17	433	236	73	1
No	H ₂ O ₂ + E vit ($\mu\text{g/ml}$)	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
7	0	621	8	0,012	450	14	193	86	28	1
8	20	562	6	0,0106	440	4	100	57	19	0,82
9	50	467	4	0,0085	276	4	86	55	21	0,83
10	100	468	4	0,0085	369	1	144	67	0	1,01
11	200	320	1	0,0031	318	2	118	31	0	1
12	400	285	1	0,0035	146	1	93	18	0	0,91

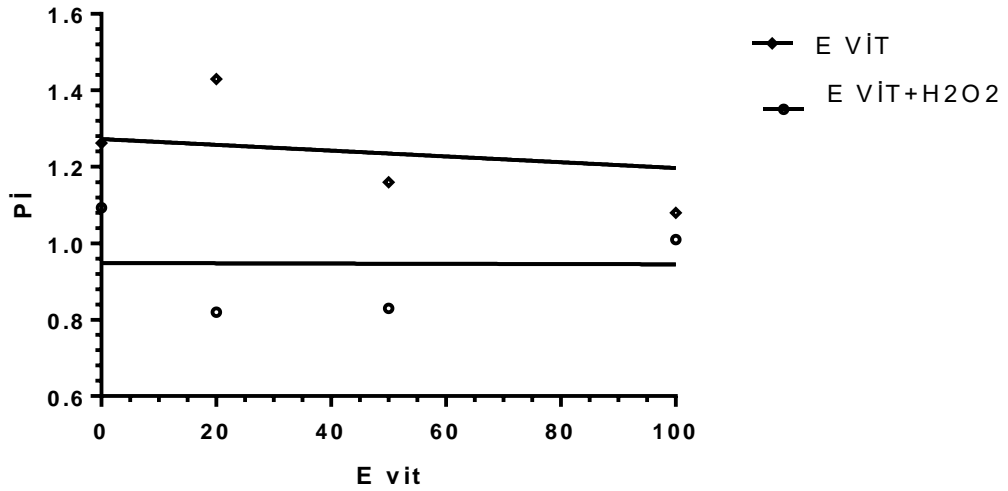
BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks. H₂O₂ dozu her birinde 50 μM dozunda uygulanmıştır.

Artan vitamin E konsantrasyonlarının MN sıklıkları üzerine olan etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir. MN sıklıkları yükselen E vitamini konsantrasyonlarına bağlı olarak artma eğilimindedir ($r^2= 0,74$). Fakat buna karşılık MN sıklıkları hidrojen peroksit uygulamasında da yükselen E vitamini konsantrasyonlarına bağlı olarak düşme eğilimindedir ($r^2= 0,77$).



Şekil 4.3: E vitamini ve E vitamini+ H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerin MN/BN karşılaştırılması

Sadece farklı dozlarda E vitamini verilen ve hem E vitamini hem hidrojen peroksit verilen hücrelere ait regresyon eğrileri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir ($p < 0,001$).



Şekil 4.4: E vitamini ve E vitamini+H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerin Pİ karşılaştırılması

Şekil 4.4'te verilen E vitamini grubunda vitamin dozları ve vitamin dozları+H₂O₂ verilerinin Pİ karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). Alfa tokoferolün H₂O₂ varlığında koruyucu etkisi gözlemlenmiştir.

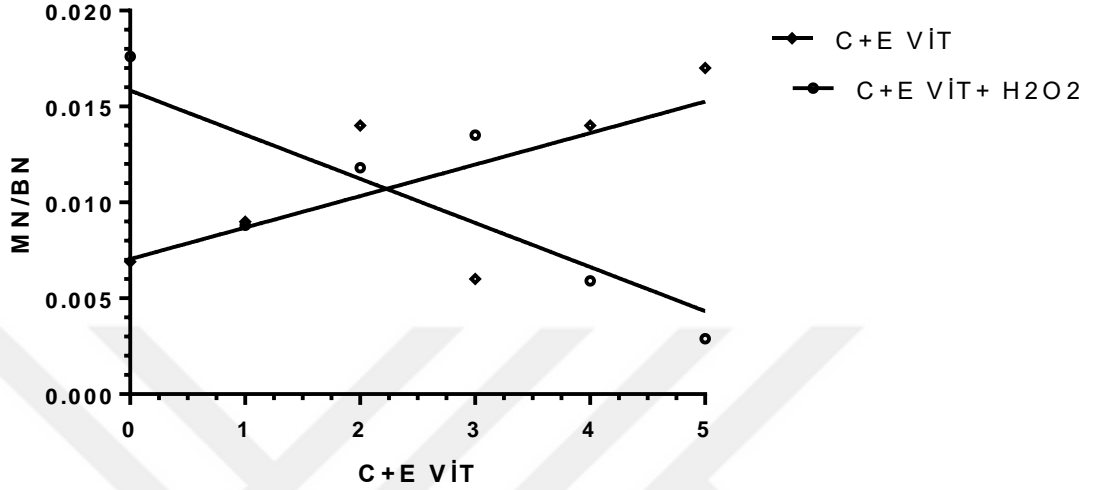
C ve E vitaminlerini konsantrasyonların kombinasyonu ile elde edilen MN ve Pİ değerleri Tablo 4.3'te gösterilmektedir. Bu grupta kombine vitamin uygulaması ile elde edilen BN hücre sayıları 1000 üzerinde olmuştur. Fakat H₂O₂ ile birlikte uygulandığında BN hücre sayıları aynı verimliliği göstermemektedir. Çoklu nükleusların sayıları H₂O₂ grubunda azalma göstermektedir.

Tablo 4.3: C ve E vit. kombinasyonu konsantrasyonları ile elde edilen MN ve Pİ değerleri.

No	C vit (mg/ml) +E vit (µg/ml)	BN hücre	MN	MN/BN	Çoklu nükleuslar					Pİ
					M1	M2	M3	M4	M5	
1	0	1000	8	0,008	831	21	521	409	218	1,3
2	10+20	1100	10	0,009	840	17	446	507	161	1,306
3	20+50	1000	14	0,014	772	13	503	251	55	1,25
4	40+100	1000	6	0,006	693	9	389	283	128	1,12
5	80+200	1000	14	0,014	783	24	316	204	66	1,05
6	100+400	1000	17	0,017	503	17	333	236	73	1,12
No	H ₂ O ₂ +C vit (mg/ml) +E vit (µg/ml)	BN hücre	MN	MN/BN	M1	M2	M3	M4	M5	Pİ
7	0	380	10	0,026	306	16	128	45	13	1,02
8	10+20	452	4	0,0088	389	6	58	25	19	0,711
9	20+50	506	6	0,0118	389	6	69	36	28	0,723
10	40+100	442	6	0,0135	214	22	85	37	34	0,79
11	80+200	507	3	0,0059	381	19	48	38	11	0,70
12	100+400	339	1	0,0029	411	24	65	36	19	0,88

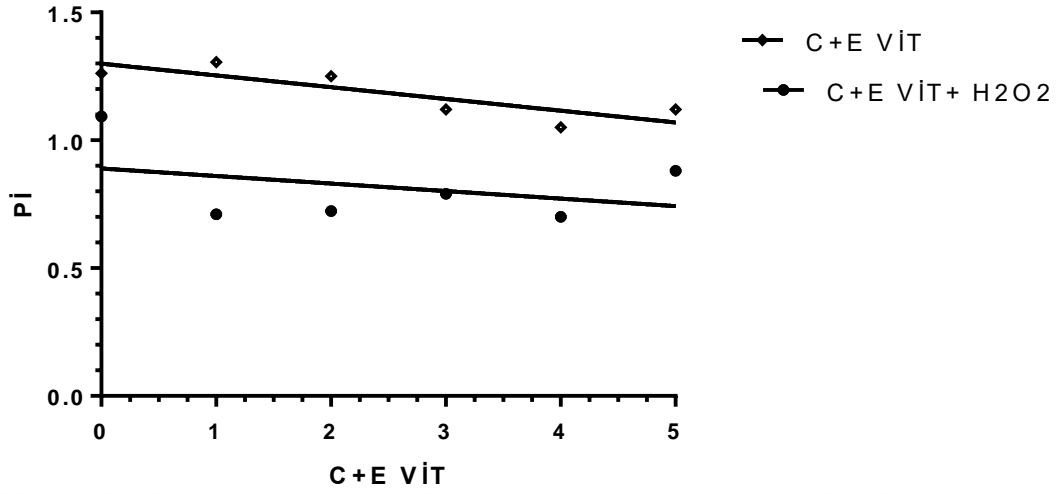
BN; binükleat hücre, MN; mikronükleus, M1; 1 nükleuslu hücre, M2; 2 nükleuslu hücre, M3; 3 nükleuslu hücre, M4; 4 nükleuslu hücre, M5; 5 nükleuslu hücre, Pİ; proliferatif indeks. H₂O₂ dozu her birinde 50 µM dozunda uygulanmıştır.

Şekil 4.5'te C ve E vitaminlerinin birlikte uygulanması ile elde edilen MN sıklıklarının meydana gelmesindeki sinerjistik etki gösterilmektedir. Şekil 4.5'te C+E vitamin dozu olarak belirtilen 0,1,2,3,4,5 numaraları verilen kombinasyon dozları olan 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında askorbik asit ve 20, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml dozlarında alfa tokoferolu belirtmektedir.



Şekil 4.5: C+E vitamini ve C+E+H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerde MN/BN karşılaştırılması
Yalnız kombine vitamin uygulaması ile MN sıklıkları arasında ($r^2=0,53$) ve H₂O₂'li kombine vitamin uygulamasında ($r^2=0,52$) zayıf korelasyon gözlenmiştir.

Deneyin vitamin kombinasyonu grubunda E ve C vitamini ile E+C vitamini ve H₂O₂ verilen hücrelerde MN/BN eğrilerinin karşılaştırılması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. ($p<0,01$)



Şekil 4.6: C+E vitamini ve C+E+H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerde Pİ karşılaştırılması

Şekil 4.6'da verilen C+E vitamini ve C+E+H₂O₂ tedavisi uygulanan hücrelerde elde edilen Pİ eğrilerinin karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılığa gözlenmiştir ($p < 0,001$).

4.2. FRAP SONUÇLARI

TK6 hücresine uygulanan FRAP analizi sonucu, FRAP değeri 4,25 mikromolar olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

C vitamini ve E vitamininin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* modellerde antikarsinojenik, antiklastojenik ve antimutajenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [64].

Epidemiyolojik verilere göre C vitamininden zengin besinlerin fazla tüketilmesi bazı kanser türlerinin oluşmasını yarı yarıya azaltmaktadır [6].

C vitamini, DNA'ya bağlı bakır di-anyonları (Cu^{2+}) ve bundan elde edilen anyonları (Cu^+) azaltabilir. Son derece reaktif hidroksil radikalini oluşturan hidrojen peroksiti (H_2O_2) azaltabilir [65]. Hidroksil radikallerinin DNA ile etkileşimi fosfodiester omurgasında kırılmalara ve DNA bazlarının modifikasyonuna (örneğin 8-oksoguanin) neden olabilir. Bu hasarın artan miktarları, kanser riskinin artması anlamına gelebilir. Yapılan son çalışmalara göre Fe iyonlarının da DNA'ya bağlanabildiği düşünülmektedir. C vitamini, Fe^{3+} ile Cu^{2+} ile olduğu şekilde etkileşir ve Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açar. C vitamini ayrıca geçiş metallerinin varlığında kendinden dehidro askorbik asit formuna ve hidrojen peroksit'e dönüşebilir [66].

C vitaminin genotoksik etkileri bir çok çalışmanın konusu olmuştur. Doz artışı ile DNA hasarının arttığı ve yüksek konsantrasyonlarında Hidroksil radikal üretimini artırarak H_2O_2 'nin insan lenfositlerine sitotoksitesini artırır [67].

C vitaminin antioksidan özelliklerinin yanında Fenech'in yaptığı çalışmada hidrojen peroksit ile indüklenmiş kromozomal hasarları %60 oranında arttırdığı saptanmıştır [68]. Vitamin C'nin insan lenfositlerindeki DNA hasarının boyutunu modüle etme yeteneği hakkında genel bir karara varılamamıştır. Antioksidan vitaminler olarak C, E ve beta-karoten'in insan lenfositlerinin *in vitro* gama ışınlanması ile ortaya çıkan DNA hasarını da azalttığı gözlenmiştir.

C vitamininin koruyucu özelliklerini etkileyebilecek faktörlerden bir tanesi de konsantrasyonudur. Yapılan çalışmaların çoğu, oksidatif DNA hasarın C vitamini ile azaldığını göstermiştir [69], ancak diğerleri hiç değişiklik göstermemiştir.

Yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 ile hasar gören hücreler, yüksek doz askorbatın potansiyel sitotoksik etkilerine karşı daha duyarlı olabilir. 1 μM üzeri H_2O_2 konsantrasyon dozları hücrede büyümenin duraklatılmasına ve oksidatif strese sebep olabileceği düşünülmektedir[70].

Vitaminlerin koruyucu etkisi hasar anında verilen doz ile, öncesinde verilen doza göre daha etkili olduğu görülmüştür [71].

FDA, gıdalardaki antioksidanların kanser riskini azaltabileceği yönünde bir sağlık talebini onaylamadı [72].

Bazı bilimsel kanıtlar, antioksidan vitaminlerin tüketiminin bazı kanser türlerinin riskini azaltabileceğini göstermektedir. Ancak FDA, bu kanıtın yetersiz ve kesin olmadığını tespit etmiştir [72].

Tek başına veya kombinasyon halinde ve bazı kanserlerde, C vitamini ve E vitamini de dahil olmak üzere antioksidan vitaminler arasında bir ilişki için anlamlı bir bilimsel konsensus yoktur [72].

C vitamininin takviyesinin, lökosit DNA'sındaki endojen oksidatif hasar seviyesini (oksidlenmiş pirimidinler ve iplik kopmaları) azalttığı gösterilmiştir [73]. C vitamini hem radikal süpürücü hem de oksidan olarak iş yapar [72].

Yapılan *in vivo* MN testinde, dokularda alfa tokoferol yeterli bir koruyucu etki göstermemiştir (Chorvatovicova ve ark., 1991) [74]. Buna gerekçe olarak oral olarak alınan vitaminin fazlasının metabolizmadan hızlı bir şekilde atılması ve alfa tokoferolün dokuda endojen konsantrasyonunun artmamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir[74].

E vitamini, hidrojen peroksit veya süperoksidin etkilerine karşı etkili bir antioksidan değildir. Alfa-tokotrienoller genellikle alfa tokoferolden daha iyi radikal süpürücüleri olarak değerlendirilirler [75]. E vitamini en az toksik vitaminlerden biridir ve *in vivo* testlere uygundur, fakat *in vitro*da kullanılan türevleri toksik etki yapabilir. Serbest radikalleri yok etme özelliği ile antikarsinojen olarak iş görebilir.

Stocker, Durak ve diğ.; E vitamininin antioksidatif veriminin bu vitamin için ko-antioksidan olan C vitamini takviyesi ile önemli ölçüde artırılabilir olduğu savunmuştur [50]. Bu çalışmada da C vitamini varlığında E vitamininin oksidatif hasara karşı daha etkili olabileceği sonucu çıkarılabilir. Farklı kombinasyonlar ve farklı oksidanlar ile yapılacak ileri çalışmalar bu sonucu destekleyebilir.

Total antioksidan ölçüm yöntemi olan FRAP'ın hücre içi total antioksidan konsantrasyonu hakkında anlamlı bir fikir verdiği düşünülmektedir [76].

Fenech ve Bonassi'ye göre, makroelement veya besin alımı ile MN frekansı arasındaki ilişkiyi henüz kanıtlanamamıştır.

Sonuç olarak kanserojen etkilere maruz kalan metabolizmalarda vitaminlerin koruyucu etkileri olabilir. Kullanılan konsantrasyon ve kombinasyonun önemi göz önünde bulundurularak daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Fenech, M., 2002 Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discov. Today*, 7, 1128-1137.
- [2]. Bayır, H., 2005 Reactive oxygen species, *Critical Care Medicine*, S498-S501.
- [3]. Salvemini D, Cuzzocrea S. 2002 Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*; 33: 1173–1185.
- [4]. Krajčovičová-Kudláčková, M. . 2006 Products of DNA, protein and lipid oxidative damage in relation to vitamin C plasma concentration, *Phyiol Res*;55(2):227-31.
- [5]. Nefic, H. , 2001 Anticlastogenic effect of Vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures, *Mutation research*, 498;1-2.
- [6]. Fenech, M. , 1999 Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis ex vivo, *Carcinogenesis*, 20; 6; 1035-41.
- [7]. Padayatty, S., J.Katz, A., Wang, Y., 2003 Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention, *Journal of the American College of Nutrition*, 22;1,18-35.
- [8]. Bendich, A., Machlin, L.J., 1986 The antioxidant role of vitamin C, *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2;2, 419-444.
- [9]. Fenech, M., 1997 Vitamin E supplements and their effect on vitamin E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes, *Carcinogenesis*, 18;2; 359-364.
- [10]. Toth, B. and Patil, K., 1983 ,Enhancing effect of vitamin E on murine intestinal tumorigenesis by 1,2 dimethylhydrazine dihydrochloride. *J. Natl Cancer Inst.*, 70, 1107–1111.
- [11]. Hejmadi, M., *Introduction to Cancer Biology*, 2. Edition, 2010, S.45 ISBN 978-87-7681-478-6.
- [12]. Apel, K., Hirt, H., 2004, REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55;1, 373-399.
- [13]. Krötz, F., 2004, Reactive oxygen species: Players in the platelet game, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24;11;1986-1991.
- [14]. Diplock, A. T. and Packer, L. 1998. Efficacy of α -tokoferol in human health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 121: 1123-1137.
- [15]. Foyer CH, Harbinson JC. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plant, eds. CH Foyer, *PM Mullineaux*. pp. 1–42. Boca Raton, Fla.: CRC.

- [16]. Alscher RG, Donahue JH, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and anti-oxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plantarum*. 100:224–33.
- [17]. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67–101.
- [18]. Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ. 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* 330:115–20.
- [19]. Karabulut, H. 2016, Free Radicals, *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 4(1): 50-59.
- [20]. Garreton V, Carpinelli J, Jordana X, Holuigue L. 2002. The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol.* 130:1516–26.
- [21]. Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D., 2004, Glutathione metabolism and its implications for health, *J. Nutr.*, 134 (3), 489-492.
- [22]. Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T., 2005, Cronin Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr. Med. Chem.*, 12 (10), 1161–1208.
- [23]. Gill, S.S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- [24]. Cadenas E, Sies H. 1998. The lag phase. *Free radic res.* 28(6), 601-35.
- [25]. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, 2006, *Chem.–Biol. Interact.*, 160, 1–40
- [26]. Cadenas E, Sies H. 1998. The lag phase. *Free radic res.* 28(6), 601-40.
- [27]. Brigelius-Flohé, R.; Traber, M. G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13:1145–1155.
- [28]. Frisard M, Ravussin E. 2006, Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine*; 29:27-32.
- [29]. Zhang, H. and Forman, H.J., 2009, Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41 (5), 509–515.
- [30]. Nawar WW. 1996. Lipids. In “Food Chemistry”. 3rd ed. O.R. Fennema (Ed). *New York: Marcel Dekker*, 225-319.
- [31].] H. Pohl, J.A. Reidy, 1989, Vitamin C intake influences the bleomycin-induced chromosome damage assay: implications for detection of cancer susceptibility and chromosome breakage syndromes, *Mutat. Res.* 224 247–252.
- [32]. Hoda Q, Sinha SP (1993) Vitamin C-mediated minimisation of rogor induced genotoxicity. *Mutat Res* 299:29-36.

- [33]. Sandstro J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund 1994, SL.10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 269: 19163–6.
- [34]. I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 18515.
- [35]. C. Regnault, M. Soursac, M. Roch-Arveiller, E. Postaire, G. Hazebroucq, 1996, *Biopharm. Drug Dispos.* 17, 165.
- [36]. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jugens G. 1992; The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341–90.
- [37]. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.*, 333, 19–39.
- [38]. Mates, J. 1999, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin Biochem*, 32-8; 595-603.
- [39]. Castillo J, , (2000) Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agricul Food Chem* 48 1738-1745.
- [40]. Di Mascio P., Murphy M. E. and Sies H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. clin. Nutr.* 53, 194S-200S.
- [41]. I.D. Podmore, H.R. Griffiths, K.E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, J. Lunec, 1998, Vitamin C exhibits pro-oxidant properties, *Nature*, 392 392 559.
- [42]. R.J. Shamberger, 1989, Genetic toxicology of ascorbic acid, *Mutat. Res.* 133 135–159.
- [43]. Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman Jr DH, Beck GJ, Bond JH, 1994, Colacchio TA, Collier JA, Frankl HD, Haile RW, et al.: A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 331: 141–147
- [44]. R.J. Sram, P. Rossner, Z. Smerhovsky, 2004, Cytogenetic analysis and occupational health in the Czech Republic, *Mutat. Res.* 566 21–48.
- [45]. C. Ragin, A. Minor, A. Agudo, P.B. Farmer, S. Garte, C. Gonzales, I. Kalina, G. Matullo, T. Popov, D. Palli, M. Peluso, F. Ricceri, R. Sram, P. Vineis, E. Taioli, 2010 Pooled analysis of studies on DNA adducts and dietary vitamins, *Mutat. Res.* 705 77–82
- [46]. S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.* 22 18–35.
- [47]. Bendich, A. (1986), The Antioxidant Role of Vitamin C, *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2-2; 419-444

- [48]. Gultekin F., Delibaş N., Yaşar S., Kılınç I., 2001 *In vivo* changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 75:88-96.
- [49]. Evans, H.M.; Bishop, K.S. 1922, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650–651.
- [50]. Stocker, R (1994) Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol* 5:422-433.
- [51]. Hess, J.L. (1993) Vitamin E, α -tocopherol. In *Antioxidants in Higher Plants*; Alscher, R.G., Hess, J.L., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL.
- [52]. Tappel, A.L. , 1992; Vitamin E. In *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*; Combs, G.F., Ed.; *Academic Press: California*, 179–203.
- [53]. FDA/CFSAN. Response to Health Claim Petition Regarding Dietary *Supplements of Vitamin E and Reduced Risk of Heart Disease*. Docket No. 99P-4375. January 11, 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/nutftoc.html>.
- [54]. Burton, G.W. (1994) Vitamin E: molecular and biological function. *Proc. Jun Nutr. Soc.*, 53, 251–262
- [55]. Landvik, S. V., Diplock, A. T. and Packer, L. 1998. Efficacy of α -tokoferol in human health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 121: 1123-1137.
- [56]. Liebler DC, 1993: The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 23, 147–169.
- [57]. Fenech, M, 1986, Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low-dose x-irradiation, *Mutat. Res.*, 161.
- [58]. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 534, 65-75.
- [59]. Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay, *Anal Biochem.*, 239 (1), 70-76.
- [60]. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K., 2002, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst.*, 127 (1), 183-198.
- [61]. Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989, Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody, *Env. Mol. Mutagen.*, 13 (1), 34–43.
- [62]. Bendich, A. (1986), The Antioxidant Role of Vitamin C, *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2-2; 419-444

- [63]. Halliwell B, 2001, Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, *Drug Aging*, 18(9):685-716.
- [64]. Hoda Q, Sinha SP (1993) Vitamin C-mediated minimisation of rogor induced genotoxicity. *Mutat Res* 299:29-36
- [65]. Burkitt, M.J. 1994. Copper-DNA adducts. *Methods Enzymol.*, 234, 66–79.
- [66]. Chiou, S.H. (1983) DNA- and protein-scission activities of ascorbate in the presence of copper ion and a copper peptide complex. *J. Biochem.*, 94, 1259–1267.
- [67]. Nowak, D., Piasecka, G., Pietras, T. and Antczak, A. 1991 Effect of ascorbic acid on killing of lymphocytes and macrophages by hydrogen peroxide. *Biochim. Biomed. Acta.* 50, 1077–1086.
- [68]. Cozzi, R., Ricordy, R., Aglitti, T., Gatla, V., Perticone, P. and De Salvia, R. (1997) Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis*, 18, 223–228.
- [69]. M. Noroozi, W.J. Angerson, M.E.J. 1998, Lean, Effect of flavonoids and Vitamin C on oxidative DNA damages to human lymphocytes, *Am. J. Clin. Nutr.* 6, 1210–1218.
- [70]. Stone, J.R. and Yang, S., 2006, Hydrogen peroxide: a signaling messenger, *Antioxid Redox Signal*, 8 (3-4), 243–270.
- [71]. Konopacka, M, 2001, Antioxidant Vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes *in vitro*, *Mut. Res.* 491, April 1.
- [72]. FDA/CFSAN. FDA's Implementation of "Qualified Health Claims": *Questions and Answers*, August 27, 2003. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/labqhcqa.html>.
- [73]. Byers, T.; Guerrero, N. 1995, Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* , 62, 1385S–1392S
- [74]. Zhuravlev, A.I., "Bioantioxidants in animal organism", in: Ivanov, I.I., (Ed.), *Bioantioxidants*, Nauka, Moscow, 15–29 (1975)
- [75]. Serbinova, E.; Kagen, V.; Han, D.; Packer, L. 1991, Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radic. Biol. Med.*, 10, 263–275.
- [76]. Ioannou, I., Chaaban, H., Slimane, M. and Ghoul, M., 2015, Origin of the Variability of the Antioxidant Activity Determination of Food Material, *Biotechnology*, Ekinci, D., (ed.), Chapter 4, InTech.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve CİVELEK
Doğum Yeri	Trabzon
Doğum Tarihi	27.09.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05355982971
E-Posta Adresi	Cmerve92@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	14.07.2015

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