

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

CROCUS SATIVUS L. VE *MYRTUS COMMUNIS* L. EKSTRAKTLARININ
ANTİGENOTOKSİK VE ANTİKARSİNOJENİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

SELDA ÖZ

HAZİRAN 2016

Biyoloji Anabilim Dalında Selda ÖZ tarafından hazırlanan *CROCUS SATIVUS L. VE MYRTUS COMMUNIS L. EKSTRAKTLARININ ANTİGENOTOKSİK VE ANTİKARSİNOJENİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ* adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr.Şükran ÇAKIR ARICA
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : (Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ) _____
Üye (Danışman) : (Prof. Dr. Şükran ÇAKIR ARICA) _____
Üye : (Prof.Dr. Aysun ERGENE) _____
Üye : (Prof.Dr. Şerife BAYRAM) _____
Üye : (Doç. Dr. Mustafa TÜRK) _____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof.Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

CROCUS SATIVUS L. VE MYRTUS COMMUNIS L.

EKSTRAKTLARININ ANTİGENOTOKSİK VE ANTİKARSİNOJENİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZ, Selda

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. Şükran ÇAKIR ARICA

Haziran 2016, 157 sayfa

Bu çalışmada safran (*Crocus sativus L.*) ve mersin (*Myrtus communis L.*) meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antijenotoksik ve antikarsinojenik etkileri somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromid (MTT) testi ve floresan mikroskopi yöntemleri ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak genotoksik ve karsinojenik etkileri bilinen ve birçok kanser hastalığının tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlardan biri olan doksorubisin kullanılmıştır.

İncelenen bitki ekstraktlarının üç farklı dozu (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) ayrı ayrı ve doksorubisin (0,125 mg/ml) ile birlikte flare (*flr³*) ve çoklu kanat kılı (*mwh*) mutant işaret genlerini taşıyan 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila*

melanogaster larvalarına uygulanmış ve etkileri SMART ile değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında bitki ekstraktlarının 4 farklı dozu (100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml) ayrı ayrı ve doksorubisin (10 µM) ile birlikte, DLD-1 (insan kolon kanseri) hücre hattına uygulanmış, etkileri MTT ve floresan mikroskopi yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre safran, mersin meyve ve yaprak ekstraktlarının test edilen dozlarda genotoksik etki göstermedikleri, doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Ekstraktların DLD-1 hücre hattı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi sonucunda, uygulanan dozlarda her üç ekstraktın sitotoksik, mersin meyve ve yaprak ekstraktlarının nekrotik etki gösterdikleri saptanmıştır. Ekstraktların uygulanan dozlarda apoptotik etkiye neden olmadıkları gözlenmiştir. Ayrıca kombine uygulamalarda ekstraktların doksorubisinin sitotoksik ve nekrotik etkisini bazı dozlarda arttırdığı, apoptotik etkisini ise engellediği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Drosophila melanogaster*, safran, mersin, antigenotoksisite, antikarsinojenite, SMART, MTT, apoptoz, nekroz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIGENOTOXIC AND ANTICARCINOGENIC EFFECTS OF *CROCUS SATIVUS* L. AND *MYRTUS COMMUNIS* L. EXTRACTS

ÖZ, Selda

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Şükran ÇAKIR ARICA

June 2016, 157 pages

In this study the antigenotoxic and anticarcinogenic effects of the extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) and myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits and leaves were investigated by somatic mutation and recombination test (SMART), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test and fluorescent microscopy method. Doxorubicin, is one of the chemotherapeutic drugs used for treatment of many types of cancer and genotoxic and carcinogenic effects are known, was used as positive control.

Three different doses of the investigated plant extracts (1 mg / ml, 5 mg / ml, 10 mg / ml) were applied separately and combined with doxorubicin (0.125 mg / ml) to the 72 ± 4 hours transheterozygous *Drosophila melanogaster* larvae for flare (*flr³*) and multiple wing hair (*mwh*) mutant marker gene and their effect were evaluated by

SMART. In cell culture studies four different doses (100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml) of plant extracts were applied separately and combined with doxorubicin (10 µM) to DLD-1 (human colon cancer) cell line and their effect were evaluated by MTT and fluorescent microscopy method.

According to the data obtained from this study, saffron, myrtle fruit and leaf extracts did not show genotoxic effect, but show antigenotoxic effect against the genotoxic effect of doxorubicin at the doses tested. As a result of evaluation of the effects of the extracts on DLD-1 cell line, it was detected all three extracts showed cytotoxic effect, myrtle fruit and leaf extracts showed necrotic effect at the doses applied. It was observed extracts did not cause apoptotic effect at the doses applied. In addition, it was observed extracts increased the cytotoxic and necrotic effects of the doxorubicin at some doses but inhibited its apoptotic effect.

Key words: *Drosophila melanogaster*, saffron, myrtle, antigenotoxicity, anticarcinogenicity, SMART, MTT, apoptosis, necrosis

TEŐEKKÖR

Tezimin hazırlanması sırasında desteğini ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Őukran ÇAKIR ARICA'ya, araőtırmamın çeşitli aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Hacer ÖNLÖ, Prof. Dr. Aysun ERGENE ve Prof. Dr. BÖlent KAYA'ya, hücre kÖltÖrÖ araőtırmalarının yÖrÖtÖlmesinde verdiği bÖyÖk destek için Doç. Dr. Mustafa TÖRK'e, laboratuvar çalıőmalarının yÖrÖtÖlmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen Kırıkkale Öniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araőtırmalar Laboratuvarı'ndaki uzman arkadaőlarım, verdikleri manevi destek için tÖm dostlarıma, hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve her adımında yanımda olduklarını hissettiğim sevgili aileme teőekkÖrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER DİZİNİ.....	xviii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Crocus sativus</i> L. ile İlgili Genel Bilgiler.....	10
1.2. <i>Myrtus communis</i> L. ile İlgili Genel Bilgiler	14
1.3. Doksorubisin	18
1.4. Genotoksisite ve Karsinojenite	19
1.4.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	22
1.4.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> ile İlgili Genel Bilgiler.....	22
1.4.1.2. SMART’inde kullanılan <i>Drosophila</i> Irklarının Özellikleri.....	29
1.4.2. MTT Testi.....	33
1.4.3. Floresan Mikroskopî Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun	

Belirlenmesi	35
2. MATERYAL VE YÖNTEM	38
2.1. Materyal	38
2.1.1. Bitki Örnekleri	38
2.1.1.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	38
2.1.2. Doksorubisin	39
2.2. Yöntem	39
2.2.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	39
2.2.1.1. <i>Drosophila</i> Irklarının Kültürü	41
2.2.1.2. Uygulama	41
2.2.1.3. Kanat Preparatlarının Hazırlanması.....	43
2.2.1.4. Kanat Preparatlarının Mikroskopta İncelenmesi	43
2.2.1.5. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması	46
2.2.1.6. Verilerin Değerlendirilmesi	47
2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	48
2.3.1. Hücre Hatları.....	48
2.3.2. Kullanılan Cihazlar	49
2.3.3. Kimyasallar	49
2.3.4. MTT Testi.....	50
2.3.4.1. Hücrelerin Üretilmesi ve Ekim İşlemi	50
2.3.4.2. Uygulama	51

2.3.5.	Floresan Mikroskopi Yöntemi	51
2.3.5.1.	Uygulama	51
2.3.6.	Verilerin Değerlendirilmesi	52
3.	BULGULAR	53
3.1.	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular	53
3.1.1.	Kontrol Grupları.....	53
3.1.2.	Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	54
3.1.2.1.	Safran Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	54
3.1.2.2.	Mersin Meyve Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	57
3.1.2.3.	Mersin Yaprak Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	58
3.1.3.	Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	60
3.1.3.1.	Safran Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	60
3.1.3.2.	Mersin Meyve Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	62

3.1.3.3.	Mersin Yaprak Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	65
3.2.	MTT Testinden Elde Edilen Bulgular	67
3.2.1.	Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	68
3.2.1.1.	Safran Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	68
3.2.1.2.	Mersin Meyve Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	71
3.2.1.3.	Mersin Yaprak Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi	73
3.3.	Floresan Mikroskopî Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular	76
3.3.1.	Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	77
3.3.2.	Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Nekrotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	93
3.3.2.1.	Safran Ekstraktının Nekrotik Etkisinin Değerlendirilmesi	93
3.3.2.2.	Mersin Meyve Ekstraktının Nekrotik Etkisinin Değerlendirilmesi	95
3.3.2.3.	Mersin Yaprak Ekstraktının Nekrotik Etkisinin	

Değerlendirilmesi	98
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	101
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	156



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	24
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in gelişiminde imajinal diskler	25
1.3. Kanat benek testinde yürütülebilecek farklı uygulama süreleri ve çeşitleri.....	27
1.4. Kanat benek testinde mutant klonların oluşum yolları.....	30
1.5. Kanattaki trikóm çeşitleri a) normal b) farklılaşmış fakat <i>flr3</i> ya da <i>mwh</i> olarak sınıflandırılmayan trikóm lar c) <i>mwh</i> trikóm lar d) <i>flr3</i> trikóm lar.....	31
1.6. <i>mwh</i> , <i>flr³</i> ve <i>Bd^s</i> genlerinin 3. kromozom üzerindeki yerleşimleri.....	31
1.7. <i>flr3/TM3</i> , <i>Bd^s</i> ve <i>mwh/mwh</i> genotipli bireylerin çaprazı sonucu transheterozigot (<i>mwh/flr3</i>) ve dengelenmiş heterozigot <i>mwh/Bd^s</i> bireylerin eldesi	32
1.8. <i>flr³</i> ve <i>mwh</i> fenotipindeki bireylerin çaprazlanması sonucu elde edilen bireylerdeki kanat tipleri: (a) transheterozigot bireyde normal kanat tipi, (b) dengelenmiş heterozigot bireyde serrat kanat tipi	33
2.1. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi uygulamasının şematik gösterimi	40
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'de kanat bölümleri	44

2.3.	Büyük tek tip <i>flr³</i> klon görünümü	44
2.4.	İkiz klon görünümü	45
2.5.	Küçük tek tip <i>mwh</i> klon görünümü	45
2.6.	Büyük tek tip <i>mwh</i> klon görünümü	46
3.1.	Safran ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	56
3.2.	Mersin meyve ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	58
3.3.	Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	59
3.4.	Safran ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	62
3.5.	Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	63
3.6.	Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı	67
3.7.	Safran ekstraktının ayrı ve doksorubisille kombine uygulamalarında dozlara göre % sitotoksosite değerlerindeki değişim	70
3.8.	Mersin meyve ekstraktının ayrı ve doksorubisille kombine uygulamalarında dozlara göre % sitotoksosite değerlerindeki değişim	73
3.9.	Mersin yaprak ekstraktının ayrı ve doksorubisille kombine	

uygulamalarında dozlara göre % sitotoksisite değerlerindeki değişim	76
3.10. Negatif (A,B) ve pozitif (C,D) kontrol uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	78
3.11. 100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) safran ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	79
3.12. 400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) safran ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	80
3.13. 100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) safran ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	81
3.14. 400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) safran ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	82
3.15. 100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	83
3.16. 400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D)	

	filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	84
3.17.	100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	85
3.18.	400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	86
3.19.	100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	87
3.20.	400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	88
3.21.	100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü	89
3.22.	400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki	

hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü.....	90
3.23. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim.....	91
3.24. Mersin meyve ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim.....	92
3.25. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim.....	92
3.26. Safran ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim.....	94
3.27. Mersin meyve ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim.....	96
3.28. Mersin yaprak ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ho ve Ha hipotezlerinin değerlendirilmesi	48
3.1. Distile su, doksorubisin ve safran, mersin meyve, mersin yaprak ekstraktlarının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	55
3.2. Safran ekstraktının 1,5 ve 10 mg/ml dozlarının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	61
3.3. Mersin meyve ekstraktının 1,5 ve 10 mg/ml dozlarının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	64
3.4. Mersin yaprak ekstraktının 1,5 ve 10 mg/ml dozlarının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	66
3.5. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri	69
3.6. Safran ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri.....	69
3.7. Mersin meyve ekstraktının uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri	71
3.8. Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri.....	72
3.9. Mersin yaprak ekstraktının uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri	74

3.10. Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri.....	75
3.11. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri	93
3.12. Safran ekstraktının doksorubisinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	95
3.13. Mersin meyve ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	96
3.14. Mersin meyve ekstraktının doksorubinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	97
3.15. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	99
3.16. Mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	100

SİMGELER DİZİNİ

<i>Bd^s</i>	Beaded-serrate
<i>flr</i>	Flare
<i>mwh</i>	Multiple wing hair

KISALTMALAR DİZİNİ

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLD-1	İnsan kolon kanseri hücre hattı
Dxr	Doksorubisin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
MTT	3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide
O.D	Optik yoğunluk
ROS	Reaktif oksijen türleri
ME	Mersin meyve ekstraktı
YE	Mersin yaprak ekstraktı
SE	Safran ekstraktı
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

1. GİRİŞ

Teknoloji ve endüstrinin ilerlemesi ile birlikte değişen yaşam koşulları, beslenme alışkanlıklarında da değişikliğe neden olmuş, bu değişikliklerin sonucu olarak insanlar doğal hayattan ve doğal besin kaynaklarından gün geçtikçe daha çok uzaklaşmışlardır. Son zamanlarda bilgi düzeyinin artması ve kitle iletişim araçlarının günümüzde daha yaygın kullanılması ile tüketiciler gıda seçimi konusunda daha dikkatli davransalar da günümüzde doğal ürünlere ulaşmak ve tüketmek eskiye nazaran daha zor ve pahalıdır.

Günümüzde doğal gıdalara göre tüketimi daha fazla olan hazır gıdalar koruma, raf ömrünü uzatma, tüketiciler için çekiciliğini arttırma gibi çeşitli nedenlerden dolayı katkı maddeleri ile işlendikten sonra piyasaya sunulmaktadır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde (Anonim, 2014) "besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler" gıda katkı maddesi olarak tanımlanmıştır. Gıdalarda kullanılmakta olan katkı maddeleri elde ediliş biçimlerine göre doğal veya sentetik olarak nitelendirilmektedirler. Sentetik katkı maddeleri doğal katkı maddelerine göre daha kolay elde edilmeleri, daha ucuz olmaları, daha dayanıklı ve daha parlak renkli

olmaları gibi nedenlerle üreticiler tarafından tercih edilmektedirler. Bitkiler ve bitkilerden elde edilen çeşitli bileşenler gıda sektöründe katkı maddesi olarak kullanılmakla beraber çoğu üretici daha ucuz ve kolay elde edilen sentetik katkı maddelerinin kullanımını tercih etmektedir. Fakat yapılan çalışmalarla gıdaları korumak, renklendirmek, tatlandırmak, aroma vermek gibi amaçlarla eklenen çeşitli sentetik gıda katkı maddelerinin sitotoksik, mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkilerinin olduğu, böbrek ve karaciğerde fonksiyon bozukluklarına neden oldukları bildirilmiştir.

Kurokawa vd. (1986) ratlar ile yürütülen uzun dönemli çalışmanın sonucunda unun işlenmesi ve ekmek yapımında kullanılan potasyum bromat'ın karsinojenik etkiye neden olduğunu göstermişlerdir. Ahmad vd. (2012) tarafından yapılan araştırmada potasyum bromatın böbrekte toksisiteye neden olduğu ve oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir. Soffritti vd. (2010) İsveç farelerine prenatal dönemden başlayarak ömür boyu aspartam uygulamasının erkek bireylerde hepatoselüler, alveolar/bronşiyal karsinoma oluş sıklığını doza bağlı olarak önemli derecede arttırdığını saptamışlardır. Tsuda vd. (2001) gıda boyası olarak birçok ülkede kullanılan amarant, allura red ve asid red'in gebe fare dokularındaki (beyin, akciğer, karaciğer, böbrek, glandular mide, kolon, idrar kesesi ve embriyo) etkilerini incelenmiş, allura red ve amarant'ın kolonda genotoksisiteye neden olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca amarant zayıf olmakla birlikte akciğerde de genotoksik etkiye neden olmuştur. Aynı çalışmada amarant, allura red ve new coccin'in erkek fareler üzerindeki etkileri de incelenmiş ve bu gıda boyalarının düşük dozlarda uygulanmasına rağmen kolonda DNA hasarına neden oldukları gözlenmiştir. Ayrıca new coccin'in erkek farelerde kolonla birlikte glandüler mide

ve idrar kesesinde de genotoksik etkiye neden olduğu saptanmıştır. Sasaki vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada renklendirici, koruyucu, renk sabitleyici, antioksidan, fungusit ve tatlandırıcı olarak kullanılan 39 farklı gıda katkı maddesinin etkileri araştırılmış, başta gıda boyaları olmak üzere antioksidan, fungusit ve tatlandırıcıların fare gastrointestinal organlarında genotoksik etkiye neden olduğu gözlenmiştir. İçöz vd. (2008) gıda boyası olarak kullanılan eritrosin, rose bengal, phloxine, allura red ve amaranth'ın in vitro ortamda hücre canlılığını önemli derecede azalttıklarını göstermişlerdir. Ashida vd. (2000) yaptıkları çalışmada bazı gıda katkı maddeleri ve gıda boyaalarının sitotoksik etkilerini test etmişlerdir. Bu çalışmada gıda boyaaları (eritrosin, allura red, new coccine, brilliant blue, tartrazin ve fast green) karışım halinde rat karaciğer primer hücre kültürüne uygulandığında hücre canlılığında ve glukoneogenez, üreogenez aktivitelerinde azalmaya neden oldukları gözlenmiştir. Türkoğlu (2008) tarafından yapılan çalışmada bazı gıda koruyucularının soğan (*Allium cepa*) kök meristem hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemelerde sodyum propiyonat, kalsiyum propiyonat ve potasyum propiyonatın test edilen dozlarının (1000-3000 ppm) hücre bölünmesini inhibe edici etki gösterdikleri, mitotik indeks değerlerinde düşmeye, C-mitoz, anafaz köprüsü, yapışkanlık, mikronukleus, çift çekirdekli hücre, kromozom kırıkları gibi kromozom anomalilerine neden oldukları gözlenmiştir. Ayrıca test edilen gıda koruyucularının çekirdek DNA içeriğinde de azalmaya neden oldukları bildirilmiştir. Gıdaların yanısıra ilaçlarla kozmetik ürünlerde de sıklıkla kullanılan sentetik boyalardan tartrazin ve karmosin ile ratlarda yürütülen bir çalışmada test edilen boyaaların serum alanin transaminaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), kreatinin ve üre değerlerinde yükselmeye, vücut ağırlığında azalmaya neden oldukları görülmüştür (Amin vd., 2010). Yapılan araştırmalarda yüksek serum ALT,

AST ve ALP değerlerinin karaciğer, böbrek gibi organlardaki hasar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Varely vd., 1987; Mekkawy vd., 1998; Amin vd., 2010; Hyder vd., 2013). Yürütülen başka çalışmalarda tartrazin ve karmosin ile birlikte sunset yellow ve brilliant blue'nun da ratlarda serum ALT, AST ve ALP değerlerini arttırdığı grlmştir (Aboel-Zahab vd., 1997; Sharma vd., 2009). Serumdaki yüksek üre ve kreatinin değerleri bozulmuş böbrek fonksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (Amin vd., 2010). Hasan (2010) tarafından yapılan çalışmada tartrazin ve chocolate brown gıda boyalarının DNA hasarına ve kromozom aberasyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada gıda boyları 50 gün boyunca farklı dozlarda oral yolla albino Wistar farelerine uygulanmış sonuç olarak karaciğer ve böbrekte DNA hasarı, kemik iliği hücrelerinde poliploidi, halka kromozom, kromatid gap, kromatid kırılması, sentromerik atenüasyon ve sentrik füzyon gibi kromozom aberasyonlarının meydana geldiği gözlenmiştir. Soares vd. (2015) tarafından yürütülen araştırmada tartrazinin insan periferal lenfosit kültüründe sitotoksik etkiye neden olmadığı fakat DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir. Peycheva vd. (2014) yaptıkları araştırmada çeşitli gıda katkı maddelerinin (sodyum nitrit, kafein, indigo karmin, eritrosin, fast green) genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri, maya hücrelerinde ve insan eritrolösemi hücre hattında (K 562) Comet testi ile değerlendirilmiş, hem maya, hem de K 562 hücrelerinde genotoksik etkiye neden oldukları bildirilmiştir. Test edilen gıda katkı maddelerinden sodyum nitritin ve kafeinin genotoksik etkisinin yüksek olduğu, gıda boylarının ise orta derecede genotoksik etkiye sahip oldukları belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada gıda katkı maddelerinin maya hücresinde sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. Test edilen gıda katkı maddeleri arasında en fazla gıda boylarının (zellikle fast green) sitotoksik etkiye neden oldukları gözlenmiştir. Fast green ve

indigo karmin boyalarının sitotoksik etkilerinin yüksek olması yapılarında DNA'da hasara neden olan aromatik halkaların bulunması ile açıklanmıştır. Dwivedi ve Kumar (2015), gıda sektöründe sıklıkla kullanılan gıda boyalarından biri olan sunset yellow' un genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada sunset yellow *Brassica campestris* L. bitkisinin kök hücrelerine uygulandığında doza bağlı olarak mitotik indeks değerinin düştüğü ve çeşitli kromozomal anormallikleri (yapışkanlık, mikronukleus oluşumu, erken kromozom yoğunlaşması, kromatin köprüsü) meydana geldiği görülmüştür. Basu ve Kumar (2015) tarafından yapılan çalışmada azo grubundan bir gıda boyası olan amaranth'ın hemoglobine bağlanarak bu proteinin yapısını değiştirdiği gösterilmiştir.

Yapılan başka çalışmalarla da mutajenik, karsinojenik, sitotoksik, genotoksik etkileri belirlenen sentetik gıda katkı maddelerini içeren hazır gıdaların günümüzde tüketimi giderek artmaktadır. Sentetik gıda katkı maddeleri hazır gıdaların hemen her çeşidinde kullanıldıklarından vücuda alınan miktarları, muhtemelen günlük alımına izin verilen miktarları (ADI) aşmaktadır. Yapılan araştırmalarda sağlık için birçok olumsuz etkiye neden oldukları saptanan sentetik gıda katkı maddelerinin vücuda alınan miktarlarının azaltılması, alternatif olarak doğal kaynaklardan elde edilen katkı maddelerinin kullanımı ile mümkün olabilir.

Bitki ve/veya bitkisel bileşenler gıda sektöründe renklendirme (E100 kurkumin, E162 betanin, E163 antosiyaninler), aroma verme (E297 fumarik asit), tatlandırma (E420 sorbitol) koruma (E210 benzoik asit, E261 potasyum asetat), antioksidan (E300 askorbik asit, E302 kalsiyum askorbat, E306 tokoferoller) kıvam verme (E410 keçi boynuzu zıncığı, E412 guar zıncığı, E440 pektin) gibi amaçlarla gıda katkı

maddesi olarak kullanılmaktadır (Anonim, 2015b). Bitkilerden elde edilen gıda katkı maddeleri sentetik gıda katkı maddeleri tarafından oluşturulan olumsuzluklara neden olmadıkları gibi içerdikleri bileşenlerin insan sağlığı için olumlu etkileri bulunmaktadır. Çeşitli bitkiler ve bitkilerden elde edilen bileşenlerle (flavonoid, antosiyanin, karotenoid, likopen, ksantofil, fenolik bileşik, yağ asiti vb.) yapılan çalışmalar bu bitkilerin ve bileşenlerin antikarsinojenik (Dai vd., 2009), antitümöral (Abdullaev vd., 2003), antigenotoksik (Abdullaev vd., 2003; Dias vd., 2009), antimikrobiyal (Maqsood vd., 2013; Ermis vd., 2015), antiinflamatuvar (Comalada vd., 2005; Lanzilli vd., 2012), antioksidan (Montoro vd., 2006; Dias vd., 2009; Maqsood vd., 2013), antiotofajik ve antiapoptotik (Büyükü vd., 2015) etki gibi özelliklere sahip oldukları saptanmıştır.

Bitkisel ekstraksiyon içeren gıdalar bitki ekstraksiyonu içinde bulunan ve insan sağlığı için olumlu etkileri olduğu bilinen flavonoid, karotenoid, fenolik bileşikler, yağ asitleri gibi bileşenler sayesinde fonksiyonel gıda haline getirilebilirler. Gıdalarda doğal katkı maddelerinin kullanımı ile olumsuz etkileri bilinen sentetik katkı maddelerinin vücuda alımı önleneceği gibi, insanların günlük hayatta karşılaştıkları çeşitli genotoksinlere karşı doğal katkı maddelerinin sahip oldukları potansiyelden de yararlanılabilir.

Günümüzde içerdikleri bileşenler ve bu bileşenlerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılan bitkilerin iyileştirici etkileri uzun zaman önce keşfedilmiş ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımlarına başlanmıştır (Agarwal vd., 2012; Umadevi vd., 2013; Hamedi vd., 2013). *Salix L.* (söğüt) ağacının kabuk ve yapraklarında elde edilen ekstraktların binlerce yıl önce doğum ağrısı, romatizma,

ülser ve yaraların tedavisi, diyare gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. Günümüzde söğüt ağacı kabuğundan elde edilen salisilatlar başta aspirin® olmak üzere birçok ilacın etken maddesi olarak kullanılmaktadır (Rainsford, 2004). *Taraxacum officinale* (karahindiba) bitkisinin yüzyıllardır laksatif ve diüretik olduğu bilinmekte ayrıca safra ve karaciğer rahatsızlıkları için de kullanılmaktadır (Elumalai ve Eswariah, 2012). Munari vd. (2014) yaptıkları çalışmada spazm giderici, şeker ve kolesterol düşürücü gibi özellikleri nedeniyle Brezilya'da alternatif tıpta kullanılan bir bitki olan *Solanum lycocarpum* bitkisinin meyvesinden elde edilen glikoalkoloidik ekstraktın antigenotoksik ve antikarsinojenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Ekstraktın antikarsinojen etkisinin içeriğinde bulunan solamarjin ve solasonin glikoalkoloidlerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda glikoalkoloidlerin birçok farklı kanser hücresi üzerinde inhibe edici etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (Li vd., 2011; Ding vd., 2012; Munari vd., 2013). He vd. (2012) Tibette hepatit tedavisinde alternatif olarak kullanılan *Meconopsis quintuplinervia* bitkisinin etanolik ekstraktı ile yaptıkları çalışmada ekstraktın güçlü antioksidan özellikte olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan ekstrakt farelerde karbon tetraklorid uygulaması sonucu düşen katalaz ve glutatyon antioksidan enzimlerinin düzeylerinde önemli derecede artış sağlamıştır. Guterres vd. (2015) yaptıkları çalışmada antifungal, antidiyabetik, antiviral vb. özellikleri nedeniyle alternatif tıpta yaygın olarak kullanılan *Momordica charantia* bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktın *Drosophila melanogaster*'de SMART ile antigenotoksik özelliğinin olduğunu göstermişlerdir. Paraguay ve Uruguay'da yerliler tarafından çok eski zamanlardan beri tatlandırıcı olarak kullanılan *Stevia rebaudiana* bitkisinin diyabetik ratlarda kandaki glikoz düzeyini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Misra vd.,

2011). Ayrıca *Stevia rebaudiana* bitkisinin antimikrobiyal (Jayaraman vd., 2008), antifungal (Silva vd., 2008), antitümör (Jayaraman vd., 2008), antirotavirüs (Takahashi vd., 2001; Kedik vd., 2009) aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Misra vd., 2011). Tıbbi amaçlı kullanılan bir diğer bitki, *Foeniculum vulgare* (rezene) ile yapılan bir çalışmada (Amkiss vd., 2013) bitkinin antigenotoksik özellik taşıdığı bildirilmiştir. Çalışmada bitkiden elde edilen ekstraktın *Drosophila melanogaster*'de yapılan SMART'inde metal metanosülfatın genotoksik etkisini engellediği gösterilmiştir. Rezene bitkisinin antigenotoksik özelliğinin içerdiği trans-anetol, estragol, fenkon, seskiterpenoid, kumarin bileşiklerinden kaynaklanabileceği, ayrıca rezene ekstraktının fenolik bileşenlerce (3-kafeoil kinik asit, 4-kafeoil kinik asit, 1.5-O-di kafeoil kinik asit, rosmarinik asit, eriyodiktiyol-7-O-rutinozit, kuersetin-3-O-galaktozid, kaempferol -3-O-rutinozid ve kaempferol -3- O-glukozid) zengin olduğu bildirilmiştir.

Günümüzde modern tedavi teknikleri oldukça gelişmiş olmasına rağmen hastalıkların tedavisinde ve koruyucu tıpta bitkilerin kullanımı giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünya nüfusunun % 80'i bitkisel tedavi yöntemlerini kullanmaktadır (Safarzadeh vd., 2014). Dünya genelinde en çok görülen hastalıklar arasında yer alan kanser hastalığının tedavisinde de bitkilerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Modern kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler her zaman etkili sonuç vermeyebilmekte, kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinde kanser hücreleri zamanla tedaviye dirençli hale gelebilmektedirler (Safarzadeh vd., 2014). Ayrıca bitkisel tedavinin modern tedavi yöntemlerine göre daha ucuz olması, daha kolay

uygulanabilmesi, yan etkisinin daha az olması gibi avantajları vardır (Prema vd., 2011; Murray, 2013).

Kanser tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerin antikanser aktivitelerinin oluşumunda içerdikleri antioksidan bileşenlerin büyük rolü olduğu düşünülmektedir (Agarwal vd., 2012). Yapılan birçok çalışmada yüksek oksidatif stres yada düşük antioksidan enzim aktivitesi ile kanser arasında ilişki olduğu (Kasapović vd., 2008; Arsova-Sarafinovska vd., 2009; Gecit vd., 2012), gıdalarla ve takviye olarak günlük antioksidan alımının çeşitli kanser türlerine (meme, kolon, pankreas) yakalanma riskini azalttığı görülmüştür (Han vd., 2013; La Vecchia vd., 2013; Pantavos vd., 2015; Rossi vd., 2016). Anand vd. (2008) kolorektal kanser hastalığında beslenme ile ölüm oranı arasındaki ilişkinin % 70' e kadar çıkabildiğini rapor etmişlerdir. Tıbbi bitkilerin bünyelerinde antikanser bileşikler bulundurmalarının yanısıra immun sistemi destekleyip vücudun hastalıklara karşı dirençli olmasını sağlayarak, geleneksel tedavi yöntemlerinin yan etkilerini önleyerek ya da azaltarak, besinsel ve fizyolojik destek sağlayarak kanserin tedavisinde ve önlenmesinde etkili oldukları düşünülmektedir (Bolhassani, 2014).

Çeşitli bitkiler ve bitki bileşenlerinin pek çok çalışma ile olumlu etkileri gösterilmiş olmakla birlikte, bu bitkiler ve bileşenler tek başlarına gösterdikleri olumlu etkiyi vücuda alınan diğer bazı maddelerle (ilaç, gıda gibi) etkileşime girdiklerinde göstermeyebilmekte ya da bazı istenmeyen etkilere neden olabilmektedirler. Bu nedenle özellikle kanser gibi bağışıklık sisteminin çok zayıfladığı ve tedavisinde güçlü yan etkileri olan ilaçların kullanıldığı hastalıklarda tıbbi bitkiler tedavi amaçlı kullanılmadan önce test edilmelidirler.

1.1. *Crocus sativus* L. ile İlgili Genel Bilgiler

Crocus sativus L. (safran) birçok Asya ve Akdeniz ülkesinde yetiştirilen Iridaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir (Fernández ve Pandalai, 2004; Khazdair vd., 2015). Bitkinin mavi-mor renkteki çiçeğinin stigma ve stilus kısımları baharat olarak kullanılmakta ve safran olarak adlandırılmaktadır. (Melnik vd., 2010). Safranın eski çağlardan beri antidepresan, sedatif, anodin, dekonjestan, antispazmodik, diyaforetik, ekspektoran özellikleri nedeniyle bitkisel tedavide kullanıldığı bilinmektedir (Abdullaev ve Espinosa-Aguirre, 2004). Tedavi amaçlı kullanımının yanı sıra safran baharat olarak, gıdalara renk ve aroma verme amacıyla da kullanılmaktadır (Bolhassani vd., 2014).

Yapılan çalışmalarda safranın antosiyanin, karotenoid (krosin, krosetin, α -karoten, β -karoten, likopen, zeaksantin vb.) monoterpen aldehyd (safranal, pikrokrosin vb.), izoforon, flavonoid (kaempferol, taxifolin, naringenin) bileşenlerini içerdiği tespit edilmiştir (Barreira vd., 2014; Gismondi vd., 2012; Karimi, 2010; Goli vd., 2012; Montoro vd., 2008; Escibano vd., 1996; Melnik vd., 2010; Bathaie ve Mousavi, 2010; Fernández ve Pandalai, 2004; Champalab vd., 2011; Hosseinzadeh ve Nassiri-Asl, 2013; Baba vd., 2015; Tuberoso vd., 2016).

Safran ekstraktı ve bileşenleri ile yapılmış olan çalışmalar antikarsinojenik (Samarghandian vd., 2013; Malaekheh-Nikouei vd., 2013; Nair vd., 1991,1993; Magesh vd., 2007; Abdullaev, 1994; Abdullaev vd., 2003; Escibano vd., 1996; Das vd., 2004; Aung vd., 2007; Tanaka vd., 2015), antigenotoksik (Hosseinzadeh vd., 2008; Premkumar vd., 2003), antioksidan (Hosseinzadeh vd., 2005; Sadeghnia vd.,

2013; Assimopoulou vd., 2005; El Daly, 1998; Karimi vd., 2010), antiinflamatuvar (Hosseinzadeh ve Younesi, 2002), antihiperglisemik (Assimopoulou vd., 2005), antihipertansif (Fatehi vd., 2003), antiiskemik (Hosseinzadeh vd., 2009; Zheng vd., 2007), antidepresant (Hosseinzadeh vd., 2004; Akhondzadeh vd., 2004), nöroprotektif (Rao vd., 2016), obeziteyi önleyici (Mashmoul vd., 2014), karaciğeri koruyucu (Omidı vd., 2014) özellikler taşıdıklarını göstermiştir.

Hosseinzadeh vd. (2008) safran ekstraktı ve krosinin farenin çeşitli organlarında (akciğer, karaciğer, böbrek, dalak) metil methanosülfat (MMS) ile oluşturulmuş DNA hasarı üzerindeki etkisi incelemiş ve koruyucu etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Premkumar vd. (2003) tarafından yapılan araştırmada safran ekstraktının, Swiss albino farelerinde, sisplatin (CIS), siklofosamid (CPH), mitomisin-C (MMC) ve ürethan (URE)'nin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Sadeghnia vd. (2013) safran bileşenlerinden safranalın, ratlarda kinolinik asit uygulaması ile beyin hipokampus bölgesinde meydana gelen oksidatif hasarı engellediğini göstermişlerdir. Kinolinik asitin birçok nörodejeneratif hastalığın oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Safranın ana bileşenlerinden biri olan safranalın kinolinik aside karşı gösterdiği etki safranın nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Hosseinzadeh vd. (2005) safran ekstraktının ve aktif bileşeni olan krosinin, ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarı (IRI) sonrasında oluşan oksidatif stresi önlemede etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Assimopoulou vd. (2005) safran ekstraktı ile krosin ve safranal bileşenlerinin yüksek derecede antioksidan özellik gösterdiklerini

bildirmişlerdir. Karimi vd. (2010) farklı çözücüler kullanılarak elde ettikleri safran ekstraktlarında bulunan fenolik bileşenlerin ve flavonoidlerin etkilerini incelemişler, ekstraktların antioksidan etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Samarghandian vd. (2013) safran ekstraktının akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde antikarsinojen etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada safranin hücre çoğalmasını engelleyerek ve kaspaz bağımlı yollar aracılığıyla apoptozu indükleyerek antikarsinojen etki yaratmış olabileceği saptanmıştır. Malaekhe-Nikouei vd. (2013) safranın ana bileşenlerinden biri olan safranalin kanser hücre hatlarında (HeLa, MCF-7) antitümör etki gösterdiğini bildirilmişlerdir. Bu çalışmada safranalin direkt ve lipozom kapsüller aracılığıyla uygulanmış, lipozomal uygulamada safranalin antitümör etkinliğinin arttığı görülmüştür. Nair vd. (1991) safran ekstraktının, intraperitoneal transplantasyonla Sarkoma 180 (S-180), Ehrlich asit tümörü (EAC) ve Dalton lenfoma (DLA asit) tümörleri nakledilen edilen farelerde antitümöral etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ekstrakt in vitro ortamda P38B, S-180, EAC ve DLA tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiştir. Abdullaev (1994) safrandan izole edilen krosetinin insan malign hücre hatlarında (HeLa, A549 ve VA13) doza bağlı olarak nükleik asit ve protein sentezini engellediğini göstermiştir. Escibano vd. (1996) krosin, pikrokrosin ve safranalin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini bildirilmişlerdir. Abdullaev vd. (2003) safran ekstraktının normal (CCD-18Lu) ve üç farklı malign insan hücre hattı (HeLa, A-204 ve HepG2) üzerindeki etkilerini in vitro koloni formasyonu testi ile incelenmiş, safran ekstraktının normal hücrelere etki etmezken, en fazla A-204 olmak üzere malign hücrelere karşı doza bağlı sitotoksik etki gösterdiğini bildirilmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca safranın farklı bileşenlerinin HeLa hücre hattı

üzerindeki etkisi incelenmiş, karotenoidlerin tümör hücrelerinin gelişimini önlediği görülmüştür. Aynı çalışmada yapılan Ames testi ile safranın, *Salmonella typhimurium*'un TA98 suşunda benzo (a) piren (BP) ile indüklenen genotoksisite üzerinde önemli bir etkisi olmadığı kaydedilmiştir. Magesh vd. (2007) BP etkisi ile akciğer kanseri oluşturulan İsveç albino farelerinde krosetinin, ksenobiyotik enzimler ve glutasyon metabolize eden enzimler üzerindeki etkisi araştırmış, krosetinin BP kaynaklı akciğer kanserine karşı koruyucu etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Das vd. (2004) safran ekstraktının dişi Swiss albino farelerde cilt kanseri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada safran ekstraktının cilt kanserinin 2. evresindeki farelerde kanser oluşumunu azaltıcı etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada yapılan biyokimyasal analizlerde safran uygulamasına bağlı olarak glutasyon-S-transferaz (GST), glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Tümör oluşumunun azalması Faz 2 detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesinin artması sonucu lipid peroksidasyonun azalması ile açıklanmıştır. Tanaka vd. (2015) 18 hafta boyunca azoksimetan ve dekstran sodyum sülfat verilerek kolorektal lezyon oluşturulan farelerde krosin uygulaması ile inflasyon ve tümör oluşum sıklığının önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Omidi vd. (2014) safran petal ekstraktının Wistar ratlarında karaciğer koruyucu özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Wistar ratlarda asetaminofen uygulaması sonucu yükselen alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz ve bilirubin seviyelerinde safran petal ekstraktının uygulanması ile artış olduğunu, ayrıca asetaminofen uygulaması sonucu meydana gelen toplam protein ve albumin seviyelerinin de ekstraktın uygulanması ile yükseldiğini belirtmişlerdir.

Ayrıca safran ekstraktı ve krosin ile yapılan diğer araştırmalarda obeziteyi önleyici ve nöroprotektif etkiler de gösterdikleri bildirilmiştir (Mashmoul vd., 2014; Rao vd., 2016).

1.2. *Myrtus communis* L. ile İlgili Genel Bilgiler

Myrtus communis L. (mersin), Myrtaceae familyasından, Türkiye'nin de dahil olduğu birçok Akdeniz ülkesinde endemik olarak yetişen, yaz kış yeşil, çalı formunda bir bitkidir (Mendes vd., 2001; Ghnaya vd., 2013). Mersin bitkisinin eski zamanlardan beri diyare, peptik ülser, hemoroid, inflamasyon, akciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Alipour vd., 2014).

Yapılan çalışmalarda mersin meyvelerinin tartarik, malik ve sitrik asit, kalsiyum, potasyum, fosfor, magnezyum ve sodyum mineralleri (Haciseferoğulları vd., 2012), linoik, palmitik, oleik ve stearik asit (Wannes vd., 2009; Barboni vd., 2010), flavonoidler (Piras vd., 2009) antosiyaninler (Martin vd., 1990; Montoro vd., 2006; Piras vd., 2009), tanninler (Diaz ve Abeger, 1986), mirisetin, hesperidin, esculin, naringin, gallik asit, kafeik asit, klogenik asit, p-hidroksi-benzoik asit, gibi fenolik bileşikler (Piras vd., 2009; şan vd., 2015) bakımından zengin olduğu, yapraklarının tanen (gallotanen), flavonoid (kuersetin, kateşin, mirisetin, kaempferol) ve uçucu yağ (mirtenil asetat, 1,8 sineol, α -pinen) içerdiği tespit edilmiştir (Amensour vd., 2010; Cherrat vd., 2014; Romani vd., 1999; Wannes vd., 2010; Sumbul vd., 2011).

Mersin ekstraktları ve bileşenleri ile yapılmış çalışmalar antigenotoksik (Hayder vd., 2003; Hayder vd., 2004; Hayder vd., 2008a; Hayder, 2008b; Ines vd., 2012; Mimica-Dukić vd., 2010; Khalil vd., 2015), antikarsinojen (Habibzadeh vd., 2014; Tretiakova vd., 2008; Izgi vd.,2015) antioksidan (Jabri vd., 2015; Hayder vd., 2008b; Rosa vd., 2003; Mimica-Dukić vd., 2010; Montoro vd., 2006; Ines vd., 2012; Wannes vd., 2010), antibakteriyal (Djenane vd., 2011; Mansouri vd., 2001), antifungal (Mahboubi ve Ghazian, 2010), antihiperglisemik (Nassar vd., 2010), antinosiseptif (Nassar vd., 2010) ve antienflamatuar (Nassar vd., 2010; Amira vd., 2012; Rossi vd., 2009) özelliklere sahip olduklarını göstermiştir.

Hayder vd. (2003, 2004, 2008a) tarafından yapılan çalışmalarda mersin yaprak ekstraktının *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98 ve TA1535 suşlarında aflatoksin B1 ve sodyum azidin, *Escherichia coli*'nin PQ37 suşunda aflatoksin B1 ve nifuroksazidin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca mersin yaprak ekstraktının 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini yakalayıcı (antioksidan) etkisi olduğu da gösterilmiştir (Hayder vd., 2004). Bir başka çalışmada (Hayder vd., 2008b) mersin yaprak ekstraktından izole edilen mirisetin- 3-*o*-galaktozid ve mirisetin- 3-*o*- ramnozid bileşiklerinin antioksidan ve antigenotoksik etkileri araştırılmış, yapılan uygulamalarda bu bileşiklerin ksantin oksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonu önledikleri, 1,1 -difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikalini etkisiz hale getirdikleri görülmüştür. Bu çalışmada yapılan SOS kromotest ve Comet testi uygulamaları ile de bileşiklerin aflatoksin B1 ve nifuroksazidin genotoksik etkisini engelledikleri gösterilmiştir. Ines vd. (2012) mersin yaprağında bulunan bileşiklerden 3,5-O-di-galloilkuinik asidin (DGQA), K562 (kronik miyeloid lösemi) hücre hattında H₂O₂ ile indüklenen lipid peroksidasyonunu ve

genotoksisiteyi engelleyerek antioksidan ve antigenotoksik özellik gösterdiklerini kaydetmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada mersin ekstraktının doksorubisinin erkek albino farelerin sperm hücreleri üzerinde neden olduğu genotoksik etkiyi önlediği gösterilmiştir (Khalil vd., 2015).

Wannes vd. (2010) mersin bitkisinden elde edilen esansiyel yağlarla, bitkinin yaprak, kök ve çiçek kısımlarından elde edilen ekstraktların, Montoro vd. (2006) mersin meyve ekstraktının antioksidan özellik gösterdiğini kaydetmişlerdir. Mimica-Dukić vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada da mersin bitkisinden elde edilen esansiyel yağların DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalini yakalayıcı özellikte olduğu kaydedilmiştir. Aynı çalışmada esansiyel yağların antimitojenik etkileri de gözlenmiştir. Jabri vd. (2015) mersin meyve ekstraktının asetik asitle indüklenen lipid peroksidasyonunu ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin düzeyindeki azalmayı engelleyerek kolon üzerinde koruyucu etki oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Habibzadeh vd. (2014) yürütükleri araştırmada mersin ekstraktının MCF-7 ve HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada mersin ekstraktı 72 saat süreyle HeLa ve MCF-7 hücrelerine uygulanmış, HeLa hücrelerinde 1.25, 0.312 ve 0.156 mg/ml dozlarında, MCF-7 hücrelerinde 2.5, 1.25, 0.312 ve 0.625 mg/ml dozlarında gelişimi etkili olarak durdurduğu saptanmıştır. HeLa hücrelerinde 0.625 mg/ml, MCF-7 hücrelerinde 1.25 mg/ml gelişimi durduran etkili doz olarak kaydedilmiştir. Mersin ekstraktı bu dozlarda HeLa ve MCF-7 hücrelerinin gelişimini sırasıyla % 82.33 ve % 70.64 oranlarında durdurucu etki göstermiştir.

Mersin yaprağında bulunan mirtukomulon ile yapılmış çok sayıda çalışmada bu bileşenin antioksidan, antienflamatuar özellikler taşıdığı, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilere neden olduğu saptanmıştır (Blaesius, 2009; Rossi vd., 2009; Rosa vd., 2003; Tretiakova vd., 2008; Izgi vd., 2015). Tretiakova vd. (2008) tarafından yapılan araştırmada mirtukomulonun kolon kanseri (DLD-1), prostat kanseri (PC-3, LNCaP), rabdomiyosarkoma (KFR), lösemi (JURKAT, HL-60, MM6), lenfoma (H9) gibi farklı kanser grubuna ait hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri olduğu gösterilmiştir. Rosa vd., (2003) mirtukomulonun yanısıra semimirtukomulon bileşeninin de güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada mirtukomulon ve semimirtukomulon bileşenlerinin FeCl₃, TBH ve EDTA aracılı oksidasyonu ve ferriknitriлотriasetat tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri bildirilmiştir. Izgi vd. (2015) mirtukomulonun fare göğüs kanseri hücre hattı (4T1) üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Blaesius (2009) tarafından yapılan araştırmada da mirtukomulonun güçlü antienflamatuar etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca mirtukomulonun K562 (kronik miyeloid lösemi) ve HL60 (insan promiyositik lösemi) hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Mirtukomulon apoptotik etki mekanizmaları incelendiğinde kaspaz ve PARP klivajı, DNA fragmentasyonu, mitokondri membran potansiyelinde kayıp ve sitokrom c salınımı ile apoptotik etkiye neden olduğu saptanmıştır.

Nassar vd. (2010) mersin yapraklarından izole edilen mirisetin 3-O- β -glikopiranosid, mirisetin 3-O- α -ramnopiranosid ve gallik asit bileşiklerinin önemli derecede antihiperlipidemik, antienflamatuar ve antinosiseptif özellik gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

1.3. Doksorubisin

Doksorubisin (14-hidroksi daunomisin, Adriamisin)'in öncül maddesi olan daunomisin (daunorubisin) 1960'lı yıllarda *Streptomyces peucetius* adlı bakteriden elde edilmiştir. Daha sonra bu bakterinin mutant ırkı olan *Streptomyces peucetius* var. *caesius*'dan elde edilen doksorubisin, daunorubisinden farklı olarak 14. karbonunda hidroksil grubu bulundurur (Arcamone vd., 1981).

Doksorubisin Hodgkin lenfoma, idrar kesesi, meme, mide, akciğer, yumurtalık ve tiroid kanseri, yumuşak doku sarkomu, multiple miyelom gibi birçok kanser türüne karşı etkili bir kemoterapik ilaçtır (Malla vd., 2010). Bu ilacın antitümoral etkisinin oluşumunda kullanımı sonucu hücre içinde açığa çıkan serbest radikallerin önemli olduğu düşünülmektedir (Keizer vd., 1990). Doksorubisinin neden olduğu redoks reaksiyonları sonucunda meydana gelen serbest radikaller hücre DNA'sının ve hücredeki diğer makromoleküllerin zarar görmesine neden olur ayrıca doksorubisine bağlı olarak Ca^{+2} dengesinin bozulması da hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır (Kozluca, 1996). Diğer bir mekanizma doksorubisinin baz çiftleri arasına girerek DNA'ya bağlanmasıdır. Bu durum genetik materyalin yapısal olarak bozulmasına ve RNA sentezinin engellenmesine neden olur (Yang vd., 2014). Bunların yanısıra doksorubisinin, DNA polimeraz aktivitesinin engellenmesi yoluyla DNA sentezinin durdurulması (Goodman vd., 1974; Zunino vd., 1975; Goodman ve Lee, 1977), topoizomeraz aktivitesinin engellenmesi ile DNA kırıklarına yol açma gibi mekanizmalarla da hücrede sitotoksiste ve genotoksisiteye neden olduğu

bilinmektedir. Doksorubisin diğer birçok genotoksik ajan gibi p53-DNA bağlanmasını aktive eder.

Doksorubisin geniş çapta kullanılan bir kemoterapötik ilaç olmakla birlikte genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Minotti vd., 2004). Doksorubisinin etki mekanizması kanserli hücreleri olduğu kadar sağlıklı hücreleri de etkileyebilmektedir (Antunes vd., 2007; Fragiorge vd., 2007; Valadares vd., 2008). Genotoksisiteye neden olan diğer etkenler gibi doksorubisinin neden olduğu DNA hasarları hücre tarafından onarılmazsa mutasyon oluşumu gerçekleşebilir (Islaih vd., 2005).

1.4. Genotoksisite ve Karsinojenite

Genotoksisite, gen ve kromozomların yapı ve sayısında toksik maddelerin etkisiyle meydana gelen değişiklikleri ifade eden bir terimdir. Organizmanın maruz kaldığı iç (reaktif oksijen türleri, alkilleyici ajanlar vb.) ve dış (viral, kimyasal ve fiziksel) etkenler, yapısal ve sayısal olarak, kromozomlarda (delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon, öploidi, anöploidi) ya da genlerde (transisyon, transversiyon, çerçeve kayması) değişikliklere neden olmaktadır. Genotoksik maddeler direkt olarak gen veya kromozoma etki edebilecekleri gibi DNA replikasyonu, hücre bölünmesi, DNA tamiri, hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan proteinlerin ve enzimlerin yapısında değişikliğe neden olarak indirekt yollarla da genotoksisiteye neden olabilirler (Doak vd., 2012). İnsanlar günlük hayatta birçok

yolla (besinler, radyasyon, UV, kimyasallar vb.) genotoksik etkenlere maruz kalmaktadır. İnsan vücudu genetik materyal üzerinde meydana gelen mutasyonları onarmak için çeşitli mekanizmalara (baz ve nükleotid kesip çıkarma, hata okuma, SOS, fotoreaktivasyon, yanlış eşleşme vs.) sahiptir fakat bu mekanizmalarda zaman zaman aksaklıklar olabilir, mutasyonlar tamamen onarılamayabilir. Genetik materyalde onarılamayan mutasyonların birikimi ise kanser gelişimine neden olabilir. Bu nedenle organizmada genotoksik etkiye neden olan bir maddenin karsinojen etkiye de neden olması beklenebilir.

Günümüzde birçok faktörün etkisi ile oluştuğu bilinen kanserin oluşumunda reaktif oksijen türleri (ROS)'nin önemli etkisi olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikaller ve serbest olmayan radikaller olarak gruplandırılan (Halliwell, 2006) ROS, oksijenli solunum yapan canlılarda normal metabolik olayların sonucu olarak oluşmalarının yanısıra organizmanın ksenobiyotik, sitokin, bakteriyel invazyona (Ray vd., 2012) maruz kalması sonucu meydana gelen bileşiklerdir. ROS, düşük miktarda organizma için gerekli ve yararlı iken, yüksek miktarda bulduklarında canlı için tehlike oluşturmaktadırlar (Valko vd., 2006). Hücre içindeki ROS'nin infeksiyon ajanlarına karşı hücresel cevabın oluşmasında (Valko vd., 2006), hücre sinyal yollarının düzenlenmesinde, fizyolojik ve biyosentetik süreçlerde (Brieger vd., 2012), hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde (Thannickal ve Fanburg, 2000) önemli rolü olduğu bilinmektedir. Schaar vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada düşük miktardaki ROS'nin canlının ömür uzunluğu üzerinde olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir.

Kanser hücrelerinin metabolizması normal hücrelere göre daha hızlı olduğundan üretilen ROS miktarı da daha fazladır. Bunun sonucu olarak kanser hücrelerinde yüksek oranda açığa çıkan ROS'nin hücreye zarar vermesinin önlenmesi için yüksek antioksidan aktivite meydana gelir (Schieber ve Chandel, 2014). Artan antioksidan aktivite sonucu ROS'nin miktarı hücrenin ihtiyacı olduğu düzeye kadar azaltılabilse de canlılığı devam eden kanser hücresinde üretimi devam eden ROS'lerinin etkisi ile mutasyon oluşumu devam edebilir ve tümör oluşumu meydana gelebilir (Cairns vd., 2011).

ROS hücre içinde enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vb.) ya da enzimatik olmayan (glutatyon, flavonoidler, karotenoidler, tiyoller vb.) yollarla antioksidanlar tarafından yıkılır, böylece ROS'nin canlı için zararlı etkileri önlenir (Valko vd., 2006). Vücuttaki ROS miktarı arttığında ya da antioksidan maddelerin miktarı azaldığında, ROS ile antioksidan maddeler arasındaki dengenin bozulması sonucu vücutta oksidatif stress meydana gelir (Ray vd., 2012). Oksidatif stres canlılığın yapısındaki DNA, RNA, lipid, protein gibi moleküllerin yapı ve işlevlerinin bozulmasına neden olmaktadır (Dizdaroğlu, 1991; Dizdaroğlu, 1992; Rodriguez vd., 1999; Cabisco vd., 2000; Halliwell ve Gutteridge, 2015). Canlıdaki makromoleküllerin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar ise kanser, diyabet, arteroskleroz ve nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkması ile sonuçlanabilmektedir (Ray vd., 2012). Oksidatif stress yaşlanmanın da önemli bir etkeni olarak kabul edilmektedir (Seo vd., 2010; Dai vd., 2014).

Bugüne kadar çeşitli fiziksel maddelerin (ışın, ısı, sıcaklık), kimyasalların, ilaçların, gıda katkı maddelerinin, kozmetiklerin genotoksik ve karsinojenik etkilerini

belirlemek amacıyla farklı test sistemleri geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu test sistemlerinin herbirinin diğerlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu çalışmada safran ve mersin bitki ekstraktlarının antijenotoksik ve antikarsinojenik etkilerinin değerlendirilmesi için SMART, MTT ve floresan mikroskopi yöntemleri kullanılmıştır.

1.4.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

1.4.1.1. *Drosophila melanogaster* ile İlgili Genel Bilgiler

Drosophila melanogaster diptera ordosundan $2n=8$ kromozoma sahip holometabol bir böcektir. (Rothwell, 1993). Hayat döngüsü yumurta, larva, pupa ve ergin birey olarak 4 evreye ayrılır (Ashburner ve Roote, 2000).

Drosophila melanogaster ilk olarak 1910 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından deneysel genetik çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Kohler, 1994). Diğer ökaryotik deney hayvanlarına göre üretiminin daha kolay ve ucuz olması (Abrahamson ve Lewis, 1971), vücut yapısının küçük olması nedeniyle yetiştirilme ve deney uygulamaları sırasında geniş üretim alanına gereksinim duyulmaması, beslenme ihtiyacının pahalı olmayan kaynaklarla kolaylıkla giderilebilmesi, jenerasyon süresinin kısa olması (25 °C de 9-10 gün) ve çok sayıda döl vermesi, kromozom sayısının az olması, dev kromozoma sahip olması (Graf vd., 1992) gibi birçok nedenden dolayı günümüzde halen deneysel araştırmalarda kullanımı tercih

edilmektedir. Ayrıca memeliler ve *Drosophila melanogaster*'deki biyolojik, fizyolojik ve nörolojik özelliklerin birçoğunun benzerlik göstermesi, insanlarda çeşitli hastalıklara neden olan genlerin yaklaşık %75'inin *Drosophila melanogaster*'in genomunda homolog olarak bulunması (Pandey ve Nichols, 2011) nedenleri ile de *Drosophila melanogaster* ideal bir model organizmadır.

Tam başkalaşımın görüldüğü *D. melanogaster*' in yaşam döngüsündeki evreler Şekil 1.1. de verilmiştir. Bu evrelerin optimum sıcaklıktaki (25°C) süreleri aşağıdaki gibidir (Graf vd., 1992).

Embriyonik gelişim: 1 gün

Birinci larval evre (L1): 1 gün

İkinci larval evre (L2): 1 gün

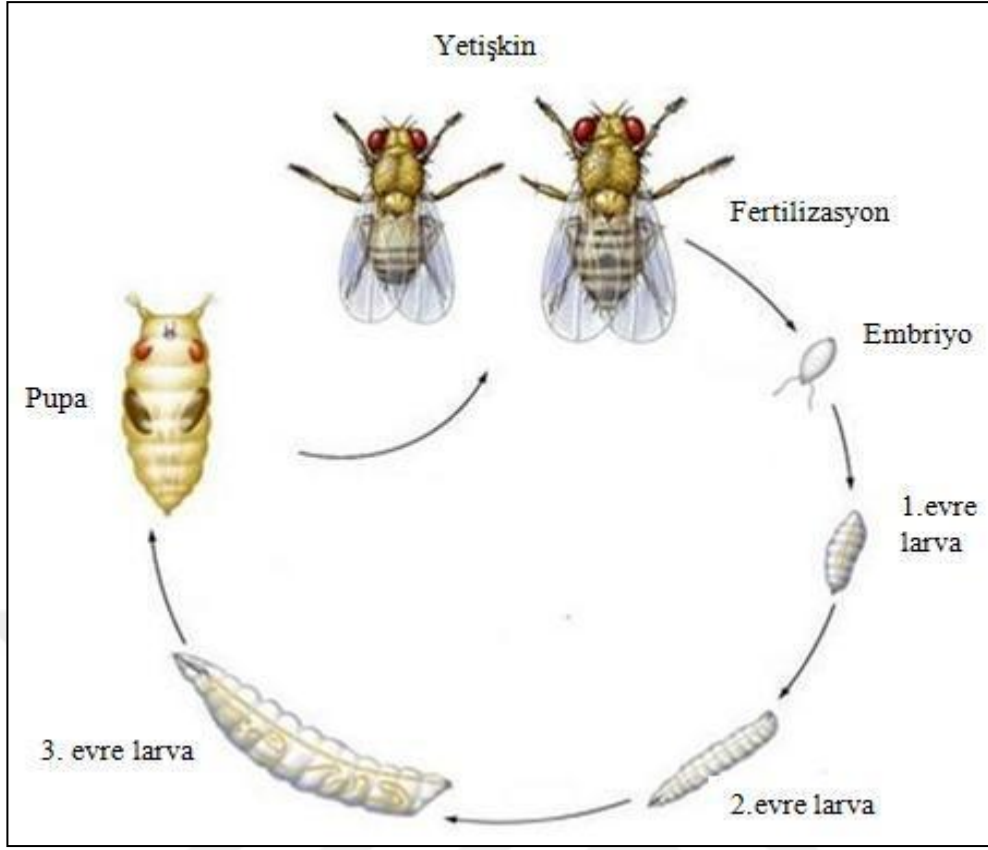
Üçüncü larval evre (L3): 2 gün

Prepupa evresi : 4 saat

Pupa evresi : 4.5 gün

Yetişkin evresi : 40-50 gün

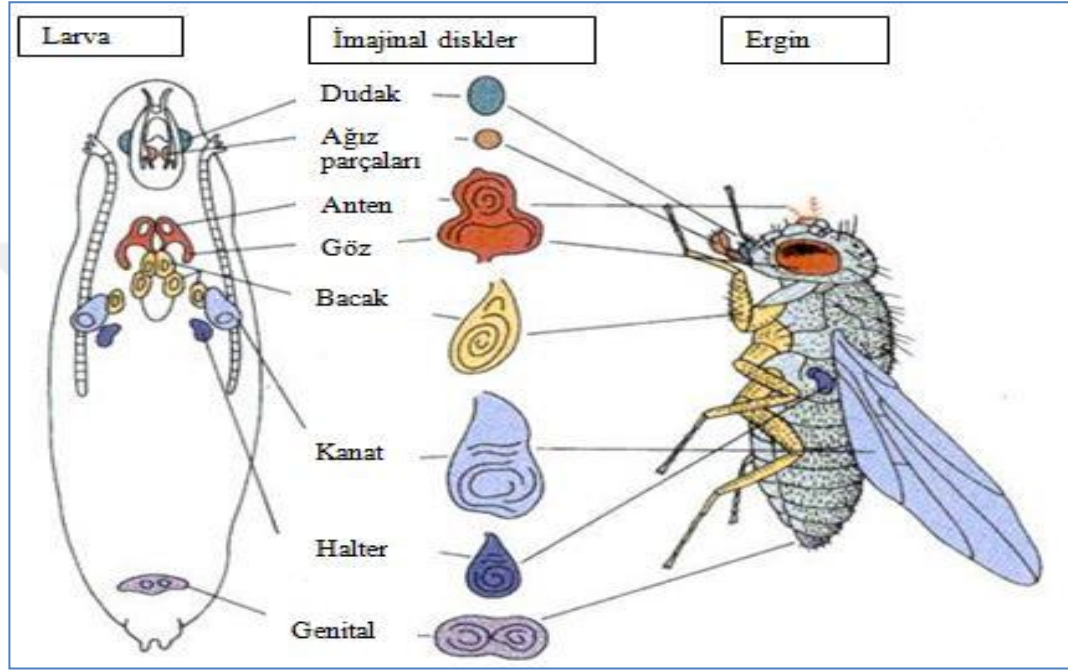
Yumurtaların döllenmesi sonucu meydana gelen embriyogenezden yaklaşık olarak 24 saat sonra birinci evredeki larvalar yumurtadan çıkar. 4 gün süren gelişme dönemi boyunca larval dokuların çoğaltılması ile larvanın ağırlığı yaklaşık olarak 200 kat artar. Larval dokular metamorfoz sırasında yok edilir ve ergin bireyde görülmezler. İmajinal disk hücreleri ise metamorfoz sırasında ergin bireydeki vücut kısımlarına dönüştürülmek üzere değişikliğe uğrarlar (Şekil 1.2). 3. larval evrenin sonuna doğru larva beslenmeyi bırakır ve pupa oluşturmak üzere besiyerini terkedip



Şekil 1.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü (Anonim, 2015a)

kuru bir ortama geçer. Yaklaşık olarak 4 gün süren pupa evresi boyunca larvalar metamorfoza uğrayarak ergin bireylere dönüşürler. Pupa evresinin sonunda, yumurtlamadan yaklaşık olarak 9-10 gün sonra ergin bireyler ortaya çıkar. Dişi bireylerin vücut ağırlığı ve büyüklüğü erkek bireylere göre daha fazladır (Stocker ve Gallant, 2008). Erkek bireyler pupadan çıktıktan kısa bir süre sonra eşeyssel olgunluğa erişirken, dişi bireyler ırka ve sıcaklığa bağlı olarak 6-12 saat sonra eşeyssel olgunluğa erişirler. Pupadan çıkan dişi bireyler eşeyssel olgunluğa erişinceye kadar geçen bu süre içerisinde virjin olarak adlandırılırlar. Bireyler çiftleşmeye başladıktan sonra erkek bireylerden gelen spermler dişi bireylerdeki sperm

keselerinde toplanır ve daha sonra bu spermler ile yumurtalar döllendir. Bu nedenle *Drosophila*'nın farklı ırkları arasında yapılan çaprazlarda dişi bireylerin virjin olması gerekmektedir (Graf vd., 1992).



Şekil 1.2. *Drosophila melanogaster*'in gelişiminde imajinal diskler (Mathews vd., 2000)

Drosophila melanogaster genotoksosite (Budak ve Çakır, 2005), yaşlanma ve ömür uzunluğu çalışmaları (Sarıkaya vd., 2006; Peleg vd., 2016), nörodejenerasyon (Laurent vd., 2013; Yang vd., 2015), diyabet (Broughton vd., 2008; Haselton vd., 2010), kanser (Dar vd., 2012) kalp (Diop vd., 2015), renal (Zhang vd., 2013) hastalıkların moleküler mekanizmalarının anlaşılması, lipid (Katewa vd., 2012; Song

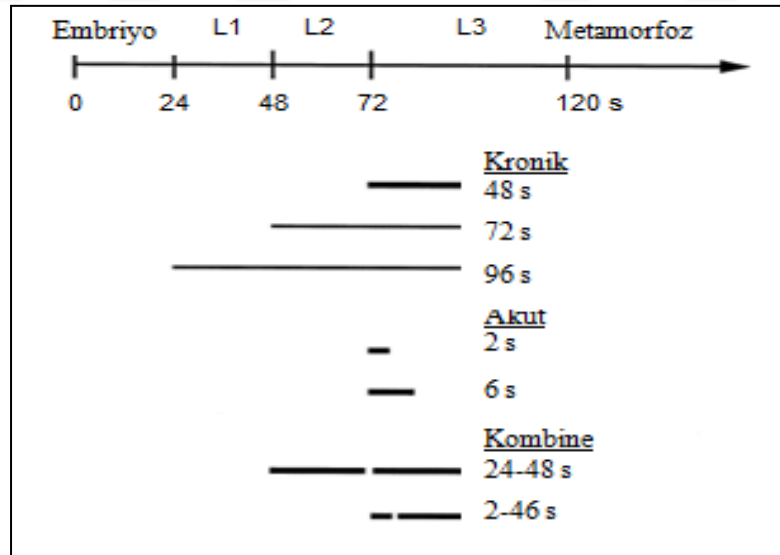
vd., 2014), protein (Ferreira vd., 2014) metabolizmalarının incelenmesi gibi birçok araştırmada kullanılan bir model organizmadır.

SMART, *Drosophila melanogaster*'de uygulanan in vivo genotoksisite testlerinden biridir, göz ve kanat benek testi olmak üzere iki farklı deney sistemi olarak uygulanabilmektedir (Graf vd., 1984). Göz ve kanat benek testlerinin her ikisinin temelinde de erken embriyonik evrede bulunan imajinal disk hücreleri vardır (Graf vd., 1998). Larval dönemde imajinal disk hücrelerinde nokta mutasyon, translokasyon, delesyon, ayrılmama gibi mutasyonlar ve rekombinasyon meydana gelmesi durumunda bu hücrelerin mitotik olarak çoğalması ile oluşan göz, kanat gibi vücut kısımlarında mutajenin etkileri fenotipik olarak gözlenebilmektedir. İmajinal disk hücrelerinin mutasyona uğraması durumunda baskın yabancı tip allellerin yerine çekinik *flr*³ ve/veya *mwh* allellerin geçmesi ile ergin bireyde mutant hücrelerin oluşturduğu klonlar kanat ya da gözde benek şeklinde gözlenir (Graf vd., 1984, 1998).

SMART testinin diğerk genotoksisite testlerine göre avantajları şöyle sıralanabilir:

1. Mutasyonun etkisi fenotipte gözlenebilir (Graf vd., 1998).
2. Uygulanan test maddesinin etkisi larvadaki imajinal disk hücrelerinin bölünmesi ile oluşan binlerce hücrede gözlenebilir (Graf vd., 1984).
3. Hızlı bir test sistemidir, bir jenerasyon sonrasında sonuç alınır (Mollet ve Würigler, 1974).
4. Ekonomik ve güvenilir bir yöntemdir (Graf vd., 1998).

5. Bir maddenin mutasyona ya da rekombinasyona neden olup olmadığı aynı anda test edilebilir (Mollet ve Würbler, 1974).
6. Birden fazla test maddesinin etkisi aynı anda değerlendirilebilir. Uygulanacak test maddeleri aynı anda uygulanabildiği gibi biri diğerinden önce ya da sonra da uygulanabilir, test maddelerinin etkileri farklı süreler boyunca değerlendirilebilir (Şekil 1.3). Birden fazla test maddesinin aynı anda uygulanabilirliği bu test ile sadece genotoksitenin değil aynı zamanda antigenotoksitenin de değerlendirilebilmesini sağlar (Graf vd., 1998).
7. Uygulama yapıldıktan sonra bireyler % 70 lik etanol içerisinde daha sonra incelemek üzere bekletilebilir (Graf vd., 1984).
8. Kalıcı kanat preparatlarının yapılabilmesi verilerin tekrar incelenebilmesine ve değerlendirilebilmesine imkan verir (Graf vd., 1984).



Şekil 1.3. Kanat benek testinde yürütülebilecek farklı uygulama süreleri ve çeşitleri (Graf vd., 1998)

Drosophila melanogaster'de imajinal disk hücreleri larva ve prepupa dönemleri boyunca yaklaşık 12 kez bölünür, bu bölünmelerden 1-2 si prepupa döneminde gerçekleşir (Postlethwait, 1978). Bu nedenle kanat benek testi ile genotoksik etkisi incelenen test maddesi eğer larval dönemde genotoksik etkiye neden olduysa kanatta büyük benek, pupa döneminde genotoksositeye neden olduysa kanatta küçük benek oluşumu görülür. Ayrıca larva döneminde canlı beslenirken, prepupa döneminde beslenme sona erdiğinden, oluşan beneklerin çeşidinden genotoksik etkinin hangi dönemde (beslenme döneminde ya da beslenme sonrası dönem) meydana geldiği anlaşılabilir (Frei ve Würzler, 1995).

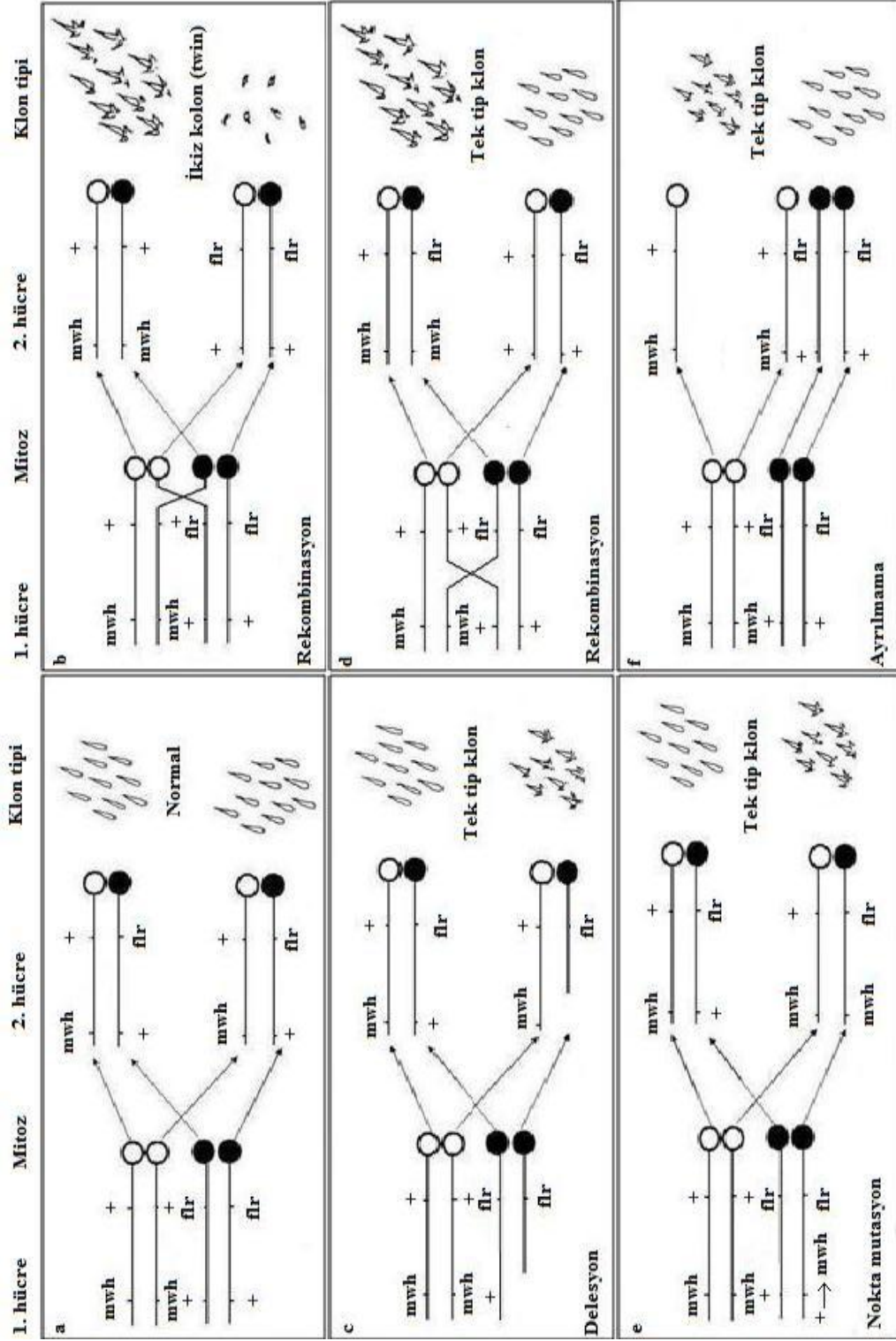
Kanat benek testi 3. kromozom üzerinde flare (flr^3) ve multiple wing hair (mwh) işaret genlerini taşıyan bireylerin çaprazlanması ile meydana gelen transheterozigot bireylerin kanat imajinal disk hücrelerinde mutasyon ve/veya rekombinasyon meydana gelmesi durumunda bu değişikliklerin ergin bireyde fenotipe yansması esasına dayanır. İmajinal disk hücrelerinde larva ya da prepupa döneminde meydana gelebilecek delesyon, ayrılmama, nokta mutasyon ve rekombinasyon sonucunda değişen genetik materyal imajinal disk hücrelerinin bölünmesi ile yavru hücrelere aktarılır ve metamorfoz sonrasında ergin bireyin kanadında mutant hücreler benek şeklinde gözlenir (Graf vd., 1984, 1989).

Mutasyonlar içerdikleri mutant hücrelerin tipine ve sayısına bağlı olarak küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olarak sınıflandırılmaktadır. Tek tip klonlar nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve iki belirleyici gen (mwh ve flr^3) arasındaki mitotik rekombinasyonla oluşurken ikiz klonlar üçüncü kromozomun sentromeri ile

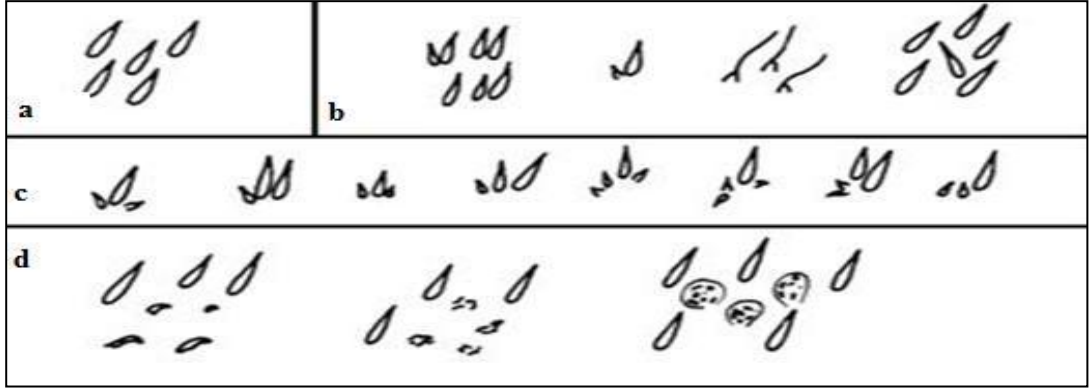
flr³ geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Graf vd., 1984). Klon tiplerinin oluşum mekanizmaları Şekil 1.4’ de gösterilmiştir.

1.4.1.2. SMART’inde kullanılan *Drosophila* Irklarının Özellikleri

Kanat benek testinde *Drosophila melanogaster*’in *mwh* (multiple wing hair, *mwh/mwh*) ve *flr³* (flare, *flr³/TM3*, *Bd⁸*) genlerine sahip iki mutant ırkı kullanılır (Graf vd., 1992). *mwh* geni 3. kromozom üzerinde 0.3 bölgesinde bulunur, homozigot çekinik bir mutasyondur. *Drosophila melanogaster*’in doğal ırklarında kanat hücrelerindeki her hücreden tek kıl çıkarken, *mwh* geni taşıyan bireylerde her bir kanat hücresinden 3 veya daha fazla kıl çıkar (Şekil 1.5). *flr³* geni 3. kromozomda 38.8 bölgesinde bulunur, fenotipte kısa, noktasal, kalın veya şekilsiz kıl olarak görülür (Şekil 1.5).

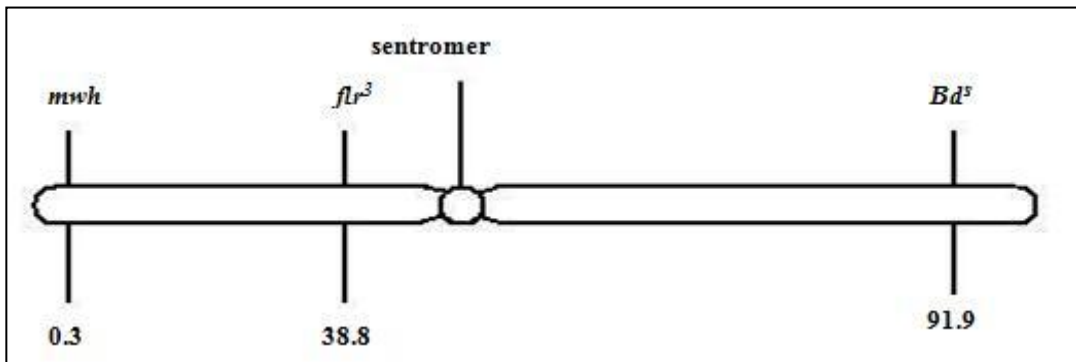


Şekil 1.4. Kanat benek testinde mutant klonların oluşum yolları (Graf vd., 1984)



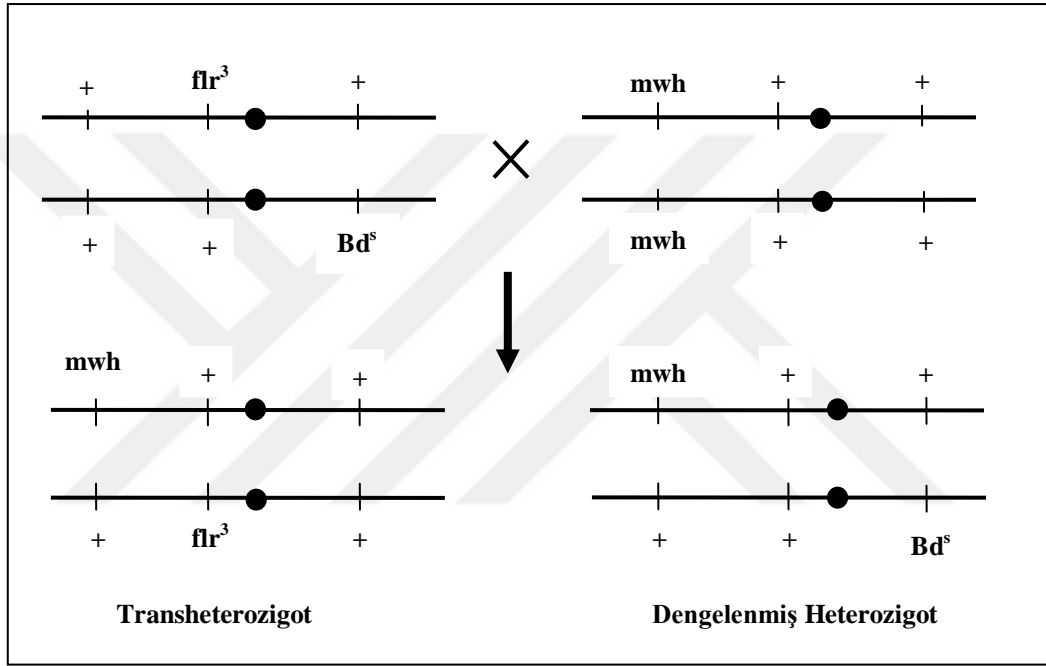
Şekil 1.5. Kanattaki trikrom çeşitleri a) normal b) farklılaşmış fakat *flr3* ya da *mwh* olarak sınıflandırılmayan trikromlar c) *mwh* trikromlar d) *flr3* trikromlar (Graf vd., 1984)

flr³ geni homozigot olduğunda lethal etki gösteren TM3 (third multiple 3) ve *Bd^s* (Beaded-serrate) genleri ile dengelenir (Graf vd., 1998). *mwh*, *flr³* ve *Bd^s* genlerinin 3. kromozom üzerindeki yerleşimleri Şekil 1.6’ da gösterilmiştir.



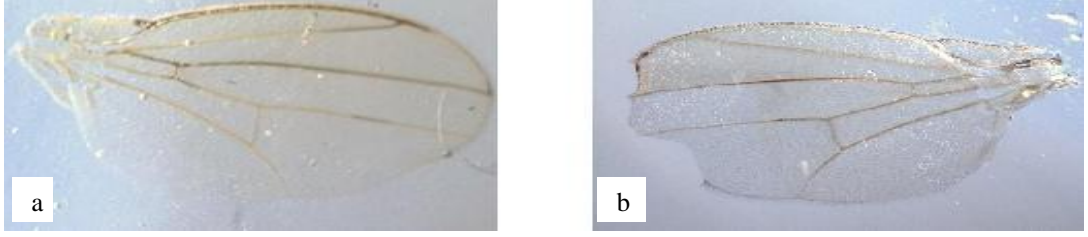
Şekil 1.6. *mwh*, *flr³* ve *Bd^s* genlerinin 3. kromozom üzerindeki yerleşimleri (Graf vd., 1984)

flr3 dişileri ile *mwh* erkeklerinin çaprazlanmaları sonucunda elde edilen bireylerde (Şekil 1.7) iki farklı kanat fenotipi gözlenebilir. Transheterozigot bireylerde kanatlar normal fenotipte iken (Şekil 1.8a) dengelenmiş heterozigot bireylerde *Bd^s* geni bulunması nedeniyle kanatlar testere uçlu (serrat tip) dur (Şekil 1.8b).



Şekil 1.7. *flr3/TM3*, *Bd^s* ve *mwh/mwh* genotipli bireylerin çaprazı sonucu transheterozigot (*mwh/flr3*) ve dengelenmiş heterozigot *mwh/Bd^s* bireylerin eldesi (Graf vd., 1984)

Graf vd. (1984) tarafından geliştirilen SMART, günümüze kadar çeşitli fiziksel ve kimyasal maddelerin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin test edilmesinde oldukça sık kullanılan bir yöntem olmuştur.



Şekil 1.8. *flr³* ve *mwh* fenotipindeki bireylerin çaprazlanması sonucu elde edilen bireylerdeki kanat tipleri: (a) transheterozigot bireyde normal kanat tipi, (b) dengelenmiş heterozigot bireyde serrat kanat tipi (Orijinal)

Bugüne kadar gıda boyaları (Sarıkaya vd., 2012), gıda koruyucuları (Sarıkaya ve Çakır, 2005), insektisitler (Çakır Arıca ve Sarıkaya, 2006; Budak ve Çakır Arıca, 2005), herbisitler (Kaya vd., 2004), nanopartiküller (Demir vd., 2013; Carmona vd., 2015), kimyasal elementler (Sarıkaya vd., 2016), bitki ekstraktları (Gabriel vd., 2013), ilaçlar (Danesi vd., 2012; Koksall ve Gürbüzell, 2015; Lopes vd., 2015), karotenoidler (Dias vd., 2009), esansiyel yağlar (Gül vd., 2012), alkaloidler (Guterres vd., 2013) gibi birçok farklı maddenin genotoksik ve antigenotoksik etkileri SMART ile test edilmiştir.

1.4.2. MTT Testi

İlk olarak Mosmann (1983) tarafından tanımlanan 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) testi canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin

ölçümü esasına dayanan kolorimetik bir yöntemdir. MTT boyası içerisindeki sarı renkteki suda çözülebilen tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin içine girdikten sonra meydana gelen enzimatik reaksiyonlar ile mor renkte ve kristal formdaki formazana indirgenir. Reaksiyon sonucu meydana gelen formazan hücre zarından geçemediği için canlı hücre içerisinde birikir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Gerçekleşen reaksiyon sonucu ortamdaki canlı hücrelerin sayısı ile orantılı olarak renk değişimi meydana gelir. Bu yöntemde üzerinde değişik sayılarda kuyucuk bulunan plakalara ekimi yapılan hücreler belirli süre ile etkisi belirlenmek istenen madde ile muamele edilir. MTT çözeltisinin uygulanması sonucu oluşan formazan kristalleri suda çözünür hale getirildikten sonra kuyucuklardaki optik yoğunluk spektrofotometre ile saptanır. Spektrofotometrede okunan değer (O.D) büyüklüğü kullanılan MTT çözeltisinin yoğunluğu, inkübasyon süresi, canlı hücrelerin sayısı ve bu hücrelerin metabolik aktiviteleri gibi birçok faktöre bağlıdır (Riss vd., 2015).

MTT yönteminde kullanılan tetrazolyum tuzunun formazana indirgenme mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Daha önceleri indirgenme reaksiyonunun mitokondriyal enzimlerce gerçekleştirildiği düşünülse de daha sonra yapılan çalışmalarda bu reaksiyonun mitokondri dışında NADH ve NADPH enzimleri aracılığıyla da meydana gelebileceği belirtilmiştir (Riss vd., 2015; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Daha sonra araştırmacılar tarafından çeşitli değişiklikler yapılarak geliştirilen MTT yöntemi (Denizot ve Lang, 1986; Twentyman, 1987; Hansen vd., 1989) birçok genotoksisite çalışmasında kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bitki ekstraktları

(Eren ve Özata, 2014; Lee vd., 2013), bitki bileşenleri (Kling vd., 2013; Ghasemi, 2015), dış dolgu malzemesi (Khedmat vd., 2014), nanomateryal (Ciofani vd., 2010), ilaç (Manuja vd., 2016), saç boyası (Maiti vd., 2015), ağır metal (Jose vd., 2011), pestisit (Jose vd., 2011) gibi birçok farklı maddenin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde MTT yöntemi kullanılmıştır.

1.4.3. Floresan Mikroskopi Yöntemi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Organizmalarda embriyonik gelişimden itibaren hayatın her evresinde hücre yapımı ve yıkımı gerçekleşmektedir. Sağlıklı bir canlıda dengeli biçimde işleyen hücre yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması durumunda canlıda kanser, erken yaşlanma (progeria), ateroskleroz, iskemi, metabolik bozukluklar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar meydana gelmektedir (Tomatir, 2003). 1972 yılında Kerr vd. tarafından apoptotik hücre ölümünün tanımlanmasına kadar hücre ölümünün sadece nekroz ile gerçekleştiği düşünülmekteydi. Günümüzde nekroz ve apoptozun yanısıra moleküler özellikleri daha farklı hücre ölümü şekilleri de tanımlanmıştır (Denton vd., 2012).

Nekroz patolojik nedenler sonucu meydana gelir ve inflamasyon gelişimine neden olur iken, apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik nedenlerle meydana gelebilmektedir. Hücre ölümünün apoptoz ya da nekroz yoluyla gerçekleşmesine bağlı olarak, ölümü gerçekleştirecek hücrede bazı farklı morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Nekrotik hücrede, zar geçirgenliği bozulduğu için hücre içine

sıvı girişı artar, bunun sonucunda hücre şişer, büyük vakuoller oluşur. Hücrenin patlaması sonucunda hücre zarı bütünlüğü bozulur. Apoptotik hücrede ise nekrotik hücrenin aksine büzüşme meydana gelir, zarın bütünlüğü bozulmaz, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimler meydana gelir (Coşkun ve Özgür, 2011; Tomatir, 2003; Nikoletopoulou vd., 2013).

Nekroz ısı, hipoksi, hipertermi, otolizis, toksin ve ağır metallere maruz kalma gibi nedenlerle gerçekleşen hücre ölümüdür (Coşkun ve Özgür, 2011; Tomatir, 2003). Hücrenin belirtilen etkenlere maruz kalması durumunda iyon dengesi bozulur. ATP eksikliğinden dolayı iyon pompaları yeterli biçimde çalışmaz, hücreye sıvı girişı artar ve hücre şişer. Hücrede şişmenin geri dönüşümsüz biçimde ilerlemesi sonucunda hücre zarı patlar, hücre içeriği dış ortama çıkar ve inflamasyon meydana gelir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Embriyonik gelişim, dokusal homestasinin sağlanması, patolojik koşullar ve yaşlılık süreçlerinde etkin olan apoptoz, hücrenin programlı şekilde ölümüdür (Hingorani vd., 2011). Apoptotik hücre ölümü intrinsik (hücre içi) ve ekstrinsik (hücre dışı) olmak üzere iki ana yolla gerçekleşmektedir. Hücre içi yol anormal hücre döngüsü, DNA'da hasar oluşumu, hücre içi pH düzeyinde azalma ve Ca^{+2} düzeyinde artma gibi etkenlerle, hücre dışı yol FAS ve TNFR-1 reseptörlerinin aktive olması, büyüme faktörlerinin eksikliği, sitotoksik T lenfositleri, kemoterapi ilaçları, UV, radyasyon, toksinler, viral enfeksiyon, oksidatif stress gibi etkenler tarafından başlatılmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011; Ouyang vd., 2012).

Apoptoz ve nekroz hematoksilin-eosin boyama, Giemsa boyama, floresan mikroskopi, elektron mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, Anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, Agoroz jel elektroforezi, M30 yöntemi, Kaspaz-3 yöntemi, Western blot, flow sitometri, fluorimetrik yöntem ve ELISA gibi morfolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve immunolojik yöntemlerle saptanabilmektedir (Güleş ve Eren, 2008; Dinçel ve Kul, 2016).

Bu çalışmada apoptotik ve nekrotik hücrelerin saptanmasında floresan mikroskopi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan floresan özellikteki boyalar (Hoechst, propidium iyodür) DNA'ya bağlanarak hücre çekirdeğinin görünür hale gelmesini sağlarlar. Hoechst boyası hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, propidium iyodür sadece ölü hücreleri boyar. Floresan mikroskobu ile inceleme sonucunda boyanma özelliklerine göre hücrelerin ölü veya canlı oldukları, çekirdek morfolojilerine göre de apoptoz veya nekrozla öldükleri saptanabilmektedir (Dinçel ve Kul, 2016).

Bu çalışmada safran (*Crocus sativus* L.) bitkisi ile mersin (*Myrtus communis* L.) bitkisinin meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antigenotoksik ve antikarsinojenik etkileri SMART, MTT ve floresan mikroskopi yöntemleri ile hem organizma düzeyinde hem de hücresel ölçekte araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Örnekleri

Bu çalışmada kullanılan safran 2014 yılı Mart ayında Karabük ili, Safranbolu ilçesi, Davutobası köyündeki safran yetiştiricilerinden temin edilmiştir. Çalışmada yaprak ve meyve kısımları ayrı kullanılan mersin bitkisi 2014 yılı Kasım ayında Hatay ili, İskenderun ilçesi, Güzelköy sınırları içerisinde bulunan, yerleşim yerlerinden ve yoldan uzak dağ eteklerinden toplanmıştır.

2.1.1.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

SMART ve hücre kültürü uygulamalarında mersin meyvesi, mersin yaprağı ve safrandan elde edilen kaba ekstraktlar kullanılmıştır. Ekstraktların hazırlanmasında çözücü olarak etanol kullanılmıştır.

Mersin meyvesi, mersin yaprağı ve safranın ekstraksiyonu için aynı yöntem izlenmiştir. Mersin meyveleri, mersin yaprakları ve safran ayrı ayrı porselen havanda toz haline gelinceye kadar ezildikten sonra öğütülen bitki materyallerinin etanol

çözücüsünde (w:v; 1:10), yatay çalkalayıcıda (Kuhner ISF1-XC) 125 rpm'de, oda sıcaklığında 24 saat süreyle ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon filtre edildikten sonra rotary evaporatör (Bucchi Rotavapor R-210) aracılığıyla etanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar denemelerde kullanılmaya kadar +4°C'de amber rengi şişelerde muhafaza edilmiştir.

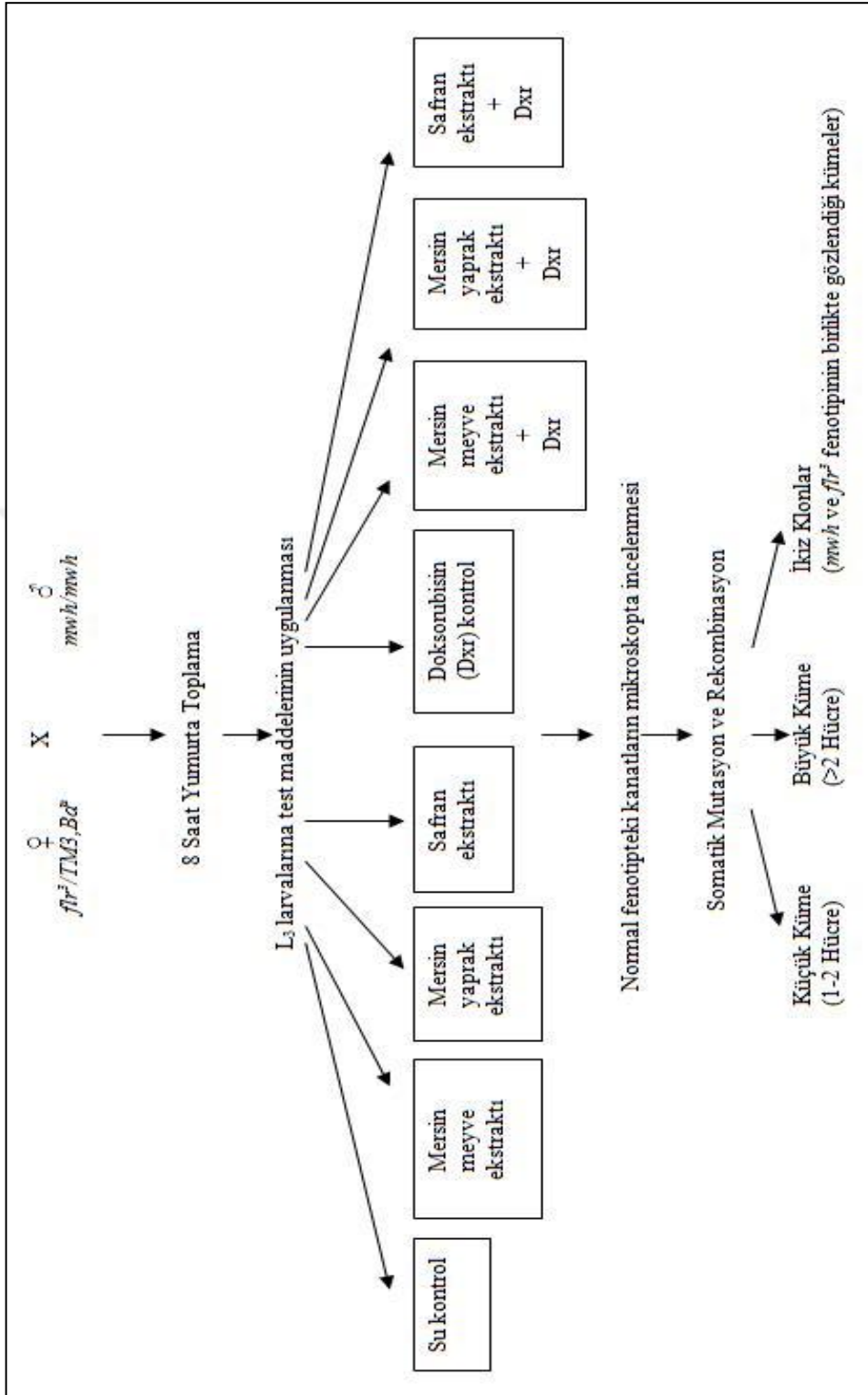
2.1.2. Doksorubisin

SMART ve hücre kültürü uygulamalarında pozitif kontrol olarak doksorubisin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) kullanılmıştır. SMART denemelerinde doksorubisin uygulamaların hemen öncesinde karanlık ortamda, distile suda çözüldükten sonra kullanılmıştır. Hücre kültürü uygulamalarında ise DLD-1 hücrelerine uygulamak üzere doksorubisin karanlık ortamda RPMI besiyerinde çözüldükten sonra kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Bu çalışmada uygulanan yöntemlerden ilki SMART dir. Bu testin çalışmada uygulanma biçimi Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi uygulamasının şematik gösterimi (Demir, 2011' den değiştirilerek)

2.2.1.1. *Drosophila* Irklarının Kùltürü

SMART'inde kullanılan *flr³* ve *mwh* mutant ırklarına ait stokların yapımında Lewis besiyeri kullanılmıştır. Lewis besiyeri mısır unu (104 g), agar (5 g), kuru maya (19 g) ve şekerin (94 g) distile su (1020 ml) içerisinde çözüldükten sonra elde edilen karışımın kaynatılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım kaynatılıp ateşten indildikten sonra içerisinde fungus kontaminasyonunu önlemek amacı ile propiyonik asit ve ortofosforik asitten oluşan asit karışımı (6 ml) eklenmiştir (Lewis, 1960). Hazırlanan besiyeri steril şişelere dökülüp soğutulduktan sonra kullanılmıştır.

flr³ ve *mwh* ırklarının çaprazlanması, yumurta ve larvaların toplanması ve test maddelerinin uygulanması aşamalarında ise *Drosophila melanogaster* için standart besiyeri (Instant *Drosophila* Medium Formula 4-24, Carolina Biological Supply Company, Burlington, N.C.) kullanılmıştır. Stoklar ve uygulama grupları 25 ± 1 °C ve % 40-60 nem ortamı içeren etüvlerde tutulmuştur.

2.2.1.2. Uygulama

SMART'inde Graf vd. (1984) tarafından izlenen prosedür değiştirilerek uygulanmıştır. *flr³* ve *mwh* ırklarına ait stoklar boşaltıldıktan sonra ortalama dört saat içinde *flr³* ırkına ait virgin (çiftleşmemiş) dişiler ile *mwh* ırkına ait erkek bireyler ayrı şişelerde toplanmıştır. Yapılacak çaprazda yumurta veriminin daha yüksek olması nedeniyle *flr³* ırkının dişileri tercih edilmiştir. 1-3 günlük *flr³* virgin dişiler ile aynı

yaştaki *mwh* erkekler çaprazlanmıştır. İlk çaprazlamada her şişede 20 dişi ve 20 erkek sineğin olduğu 10 şişe kullanılmıştır. Daha sonra çok sayıda aynı evrede larva elde etmek amacıyla bireyler 3'er saat aralıkla farklı şişelere aktararak çaprazlama işlemine devam edilmiştir. Yapılan her bir çaprazdan 72 ± 4 saat sonra larva toplama işlemi yapılmış, larvalar besi ortamından musluk suyu ile yıkanarak ayrılmıştır. Her uygulamada 1,5 gram hazır *Drosophila* ortamı (Instant Drosophila Medium Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) 5 ml test solüsyonu ile ıslatılmış ve 25 larva ortama eklenmiştir. Her doz için 4 ayrı grup halinde 100'er bireye uygulama yapılmış, her uygulama 3 kez tekrar edilmiştir. Mersin meyvesi, mersin yaprağı ve safrandan elde edilen ekstraktların 1, 5 ve 10 mg/ml konsantrasyonları genotoksik etkinin değerlendirilmesi için tek başına, antigenotoksik etkinin değerlendirilmesi için doksorubisinle kombine olarak 72 ± 4 saatlik L₃ larvalarına uygulanmıştır. Uygulamalarda negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak doksorubisin (0,125 mg/ml) kullanılmıştır. Doksorubisinin dozu daha önceki çalışmalara dayanarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda (Costa ve Nepomuceno, 2006; Pereira vd., 2008; Valadares vd., 2008; Dias vd., 2009; Mendanha vd., 2010; Passos vd., 2010; Vale vd., 2013) doksorubisinin *Drosophila melanogaster* için LD₅₀ değeri 0,125 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Doksorubisin ve/veya farklı dozlarda bitki ekstraktı içeren standart besi ortamına alınan larvalar gelişmelerini tamamlamaya bırakılmıştır. Her bir uygulama için, pupadan çıkan bireyler eterle bayılarak toplanmış, preparat yapımı için normal kanat şekline sahip bireyler seçilmiştir. Seçilen bireyler kanat preparatları hazırlanana kadar %70'lik etanol içeren tüplere alınıp +4 °C'de saklanmıştır.

2.2.1.3. Kanat Preparatlarının Hazırlanması

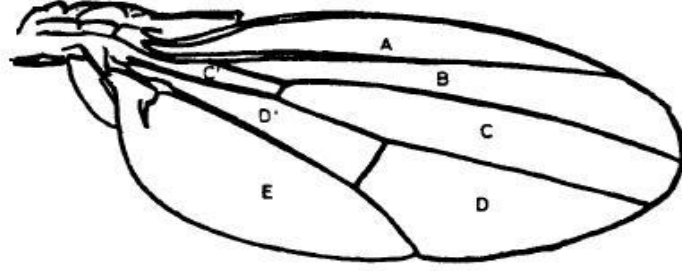
Normal kanatlı bireyler içerisinde distile su bulunan petriye alınıp, sterio mikroskop (Nikon SMZ800) altında pens yardımıyla bireylerin kanatları gövdelerinden ayrılmıştır. Aynı bireye ait kanatlar karşılıklı olarak lam üzerine yerleştirildikten sonra entellan yardımıyla kanatlar lama sabitlenip, petri kapları içinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatların kenarlarına tekrar entellan damlatılarak üzerleri lamel ile kapatılmış ve kalıcı preparatlar elde edilmiştir. Her bir uygulama için 40 bireyin kanadı incelenmiş, preparasyon sırasında zarar gören kanatlar mikroskopik incelemeye dahil edilmemiştir.

2.2.1.4. Kanat Preparatlarının Mikroskopta İncelenmesi

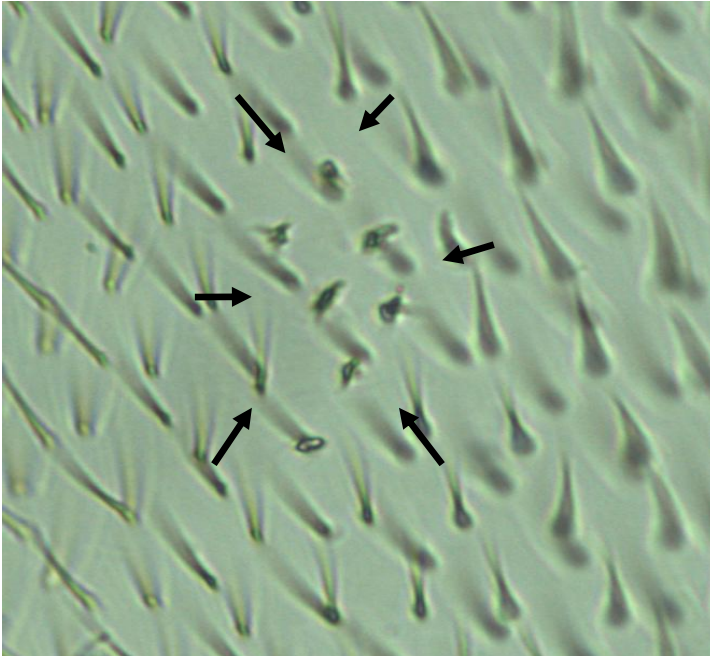
Hazırlanan kanat preparatları ışık mikroskobu altında (Zeiss Axio Scope.A1) 10x40 büyütme ile incelenerek doksorubisinin ve bitki ekstraktlarının genotoksik/antigenotoksik etkileri belirlenmiştir. Kanatlar Graf vd. (1984) tarafından tanımlandığı gibi A, B, C, C', D, D', E bölümlerine ayrılarak incelenmiştir (Şekil 2.2). Her bir uygulama grubu için 40 kanat çiftinin dorsal ve ventral yüzeyi incelenmiş, gözlenen mutant klonlar kaydedilmiştir.

İncelenen kanatlardaki mutant klonların değerlendirilmesi ve sınıflandırılmasında Graf vd. (1984) tarafından yapılan çalışma esas alınmıştır. Bu çalışmaya göre mutant hücre kümesinde 1- 2 *mwh* varsa küçük tek tip klon (S 1-2, small single spot), 3 veya

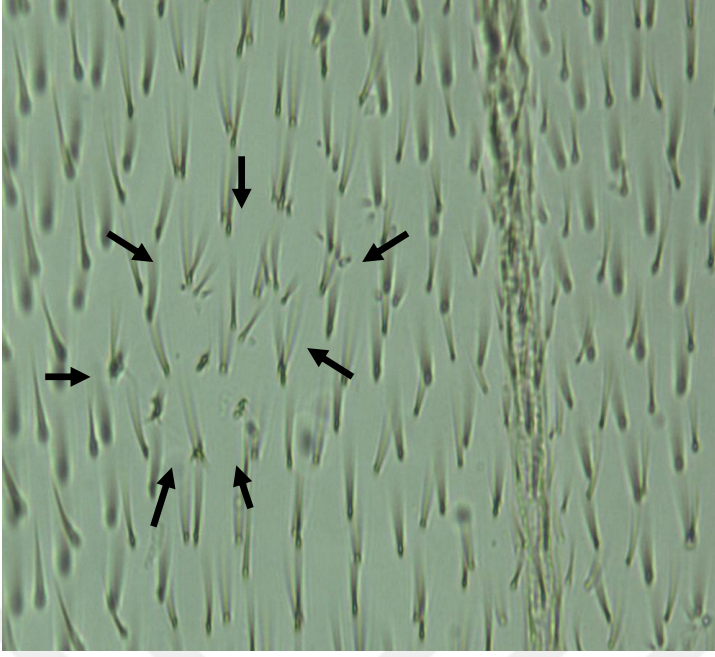
daha fazla *mwh* ya da 4 veya daha fazla *flr3* varsa büyük tek tip klon (S>2, large spot), *mwh* ve *flr3* fenotipleri birlikte bulunuyorsa ikiz klon (twin) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3-2.6)



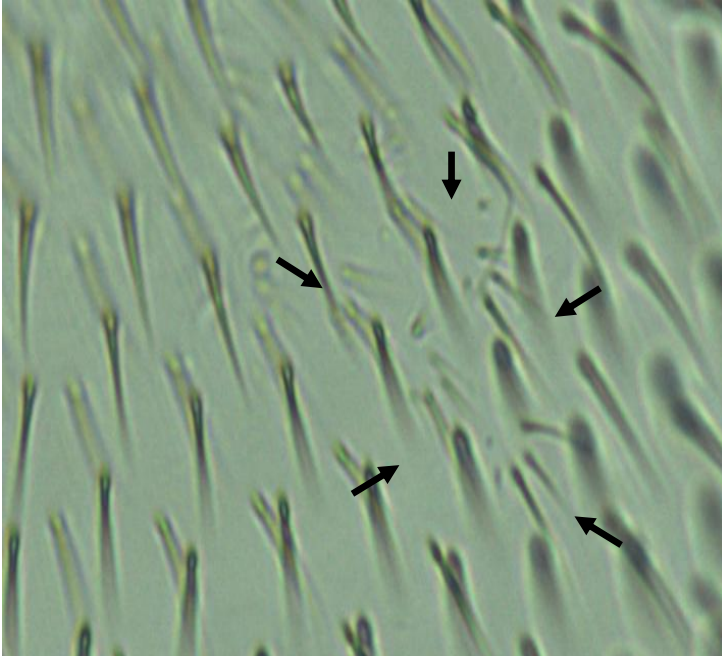
Şekil 2.2. *Drosophila melanogaster*'de kanat bölümleri (Graf vd., 1984)



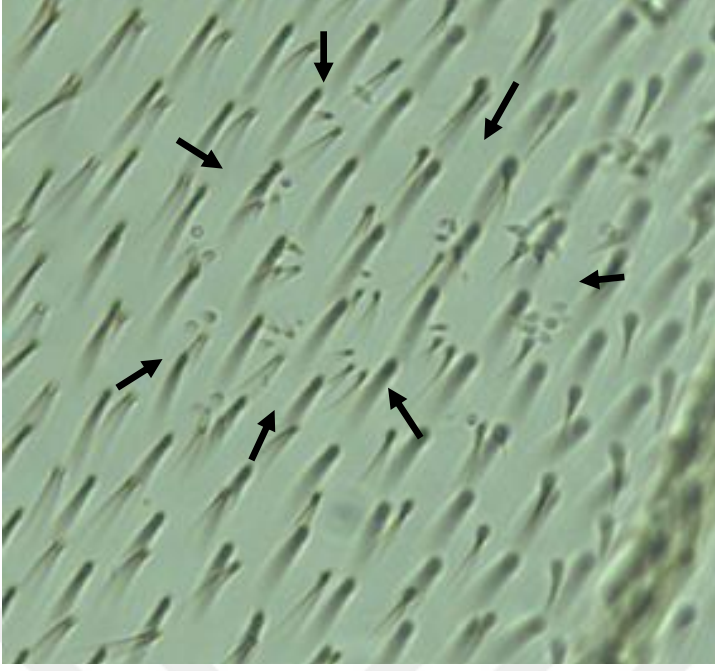
Şekil 2.3. Büyük tek tip *flr3* klon görünümü (Orijinal)



Şekil 2.4. İkiz klon görünümü (Orijinal)



Şekil 2.5. Küçük tek tip *mwh* klon görünümü (Orijinal)



Şekil 2.6. Büyük tek tip *mwh* klon görünümü (Orijinal)

2.2.1.5. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Bu çalışmadaki her bir uygulama grubu için her hücre bölünmesindeki indüksiyon frekansı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Szabad vd., 1983).

$$f = \frac{n}{NxC} \times 10^5$$

Bu formülde “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” toplam *mwh* klon sayısını, “N” incelenen kanat sayısını, “C” bir kanatta incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *Drosophila melanogaster*'in bir

kanadındaki incelenebilecek hücre sayısının 24400 olduğu belirlenmiştir (Garcia-Bellido ve Merriam, 1971).

Antigenotoksik etkinin değerlendirilmesinde kullanılan inhibisyon/indüksiyon yüzdelерinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Abraham, 1994).

$$\text{İnhibisyon/indüksiyon} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Bu formülde “a” genotoksik madde uygulamasındaki toplam klon frekansını, “b” genotoksik madde ile birlikte ekstrakt uygulamasındaki toplam klon frekansını göstermektedir.

2.2.1.6. Verilerin Değerlendirilmesi

SMART’inden elde edilen veriler MICROSTA programı ile değerlendirilmiştir. Bu programda veriler binomial şartlı test ile hesaplanmaktadır. Verilerin değerlendirilmesi için öncelikle Ho ve Ha hipotezleri kurulmuştur. Ho (orijinal, null) hipotezinde uygulama grupları ile kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı, Ha (alternatif) hipotezde ise uygulama gruplarında indüklenen mutasyon oranının kontrol gruplarındaki mutasyon oranından "m" defa daha fazla olduğu varsayılmıştır. Ho ve Ha hipotezlerinin kabul veya reddine Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesine göre karar verilmiştir (Çizelge 1.1). Uygulama grubundaki mutant klon sayısı (nt), çizelgedeki değere eşit veya bu değerden büyükse Ho, kontrol grubundaki mutant klon sayısı (nc) çizelgedeki değere eşit veya bu değerden büyükse Ha

reddedilmiştir. Sonuçlar kabul ya da reddedilen hipoteze bağlı olarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Frei ve Würzler, 1988).

Çizelge 1.1. Ho ve Ha hipotezlerinin değerlendirilmesi (Kastenbaum ve Bowman, 1970)

HİPOTEZLER		Ha	
		KABUL (1-β)	RED (β)
Ho	KABUL (1-α)	ÖNEMSİZ FARK $P = (1 - \alpha)(1 - \beta) = 1 - \alpha - \beta + \alpha\beta$	NEGATİF $P = \beta(1 - \alpha) = \beta - \alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P = \alpha(1 - \beta) = \alpha - \alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P = \alpha\beta$

2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.1. Hücre Hatları

Doksorubisinin ve bitki ekstraktlarının antikarsinojenik etkileri ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarla insan kolon kanseri hücre hattı (DLD-1)'nda MTT ve floresan mikroskopi yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında

kullanılacak doksorubisin dozu Tai vd. (2013) tarafından yapılan çalışmaya göre belirlenmiştir.

2.3.2. Kullanılan Cihazlar

Hücre kültürü çalışmalarında biyogüvenlik kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet), hassas terazi (Mettler Toledo Ms New Classic), hücre sayım cihazı (InVitrogen Countess), ışık mikroskobu (Leica DMIL LED), invert mikroskop (Leica DMI6000 B), inkübatör (Binder), mikroplak okuyucu (Biotek PowerWave XS2), otomatik pipet (Pipetman, Gilson), santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 380R), vorteks (Heidolp Reax Top) kullanılmıştır.

2.3.3. Kimyasallar

Hücre kültürü çalışmalarında RPMI besiyeri (Biological Industries), serum (Biological Industries), tripsin-EDTA (Biological Industries), penisilin ve streptomisin antibiyotikleri (Biological Industries), MTT boyası (Roche), PBS (Amresco), DMSO (Merck), ribonükleaz A (Serva), propidium iyodür (Serva), Hoechst boyası (Serva) kullanılmıştır.

2.3.4. MTT Testi

2.3.4.1. Hücrelerin Üretilmesi ve Ekim İşlemi

Sıvı nitrojen tankında depolanan DLD-1 hücre hattı ekim yapılmak üzere çözülüp, hücreler falkon tüpe aktarıldıktan sonra üzerlerine 1 ml hücre medyumunu (% 89 RPMI, % 10 Fetal Bovine Serum, % 1 Antibiyotik) eklenmiştir. 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atılmış, tüpte kalan hücrelerin üzerine her bir flask için 3,5 ml medyum ilave edilip homojenize hale getirildikten sonra flaslara ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 37°C'de 2 gün süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Hücrelerin sayımı otomatik hücre sayım cihazı ile yapılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda flaslardaki medyum atılıp, her flaska 0,5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiştir. Hücrelerin flastan kalkması için 3-4 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Hücreler tamamiyle kalktıktan sonra enzim aktivitesini durdurması için hücrelerin üzerine 1 ml medyum eklenmiştir. Enzim ve medyum karışımı falkon tüplere aktarılıp, 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, tüpte kalan hücrelerin üzerine 1 ml medyum eklenip hücre sayımı yapılmıştır. 48 kuyucuklu plağa her kuyucukta 20×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin plaklara tutunması için 24 saat beklenmiştir.

2.3.4.2. Uygulama

24 saatin sonunda plaklardaki medyum boşaltıldıktan sonra bitki ekstraktlarının 4 farklı dozu (100, 200, 400, 800 µg/ml) ayrı ayrı ve doksorubisinle (10 µM) kombine olarak uygulanmıştır. Ayrıca sadece besiyeri uygulanan negatif kontrol ve sadece doksorubisin uygulanan pozitif kontrol denemeleri yapılmıştır. Her kuyucuğa toplam hacim 150 µl olacak şekilde test maddesi eklenmiştir.

24 saatlik inkübasyon süresi sonunda plaklardaki medyumlar boşaltılıp tüm kuyucuklara 100'er µl içinde fenol red olmayan medyum ve 25 µl MTT solüsyonu eklenip 3,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 100 µl MTT çözücüsü (4 mM HCl, 0.1% Nondet P-40 (NP40), izopropanol) eklenip, 15 dakika süre ile inkübasyon sonrasında, farklı bir plağa aktarılıp, mikroplak okuyucuda 590 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Referans dalga boyu 620 nm alınmıştır.

2.3.5. Floresan Mikroskopi Yöntemi

2.3.5.1. Uygulama

DLD-1 hücre hattından hücreler 48 kuyucuklu plağa her kuyucukta 20×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda plaklardaki medyum boşaltıldıktan sonra bitki ekstraktlarının 4 farklı dozu (100, 200, 400, 800 µg/ml) ayrı ayrı ve doksorubisinle (10 µM) kombine olarak uygulanmıştır. Ayrıca sadece

besiyeri ile negatif kontrol ve doksorubisin ile pozitif kontrol uygulamaları yapılmıştır. İnkübasyonun ardından plaklardaki medyum boşaltıldıktan sonra her kuyucuğa 70µl ikili boyama solüsyonu (Hoechst, propidium iyodür) damlatılmış, plaklar alüminyum folyo ile sarılıp 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaklar floresan mikroskopta incelenerek çekilen fotoğraflardan apoptoza ve nekroza uğramış hücrelerin sayısı tespit edilmiştir.

2.3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler normal dağılıma uymadığı için nonparametrik yöntemler ile değerlendirilmiştir. Her bir uygulama için dozlar arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığına Kruskal Wallis testi ile bakılmıştır. Bitki ekstraktları ile bitki ekstraktı-doksorubisin kombinasyonu uygulamaları arasındaki farkların istatistiksel bakımdan anlamlı olup olmadığı Mann Whitney-U testi ile değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular

Mersin yaprağı, mersin meyvesi ve safran ekstraktlarının SMART ile genotoksik ve antigenotoksik özelliklerinin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1-3.4'de gösterilmiştir. Bu çalışmada her bir uygulama grubu için 80, toplamda 1600 kanat incelemeye alınmıştır.

3.1.1. Kontrol Grupları

Bu çalışmada uygulanan SMART'inde negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak doksorubisin (0,125 mg/ml) kullanılmıştır.

Negatif kontrol olan distile su uygulamasına ait kanat preparatları incelendiğinde, 7 adet küçük tek tip klon, 3 adet büyük tek tip klon, 1 adet ikiz klon gözlenmiştir. Bu uygulamada gözlenen toplam *mwh* klon sayısı 11 dir. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı 0.56 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Pozitif kontrol olarak seçilen doksorubisin (0.125 mg/ml) uygulamalarında 122 adet küçük tek tip klon, 52 adet büyük tek tip klon, 19 adet ikiz klon olmak üzere toplam 193 klon gözlenmiştir. Doksorubisin uygulamasında gözlenen toplam *mwh* klon

sayısı 183 dir. Bu uygulamada klon indüksiyon frekansı 9.38 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Daha önceki çalışmalarda (Costa ve Nepomuceno, 2006; Fernandes, 2014) genotoksik olduğu belirlenen ve bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubisin uygulamasına ait sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde distile su uygulamasına ait sonuçlara göre tüm klon tiplerinde pozitif fark olduğu gözlenmiş, doksorubisin genotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3.1).

3.1.2. Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

3.1.2.1. Safran Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Safranın ekstraktının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstrakt 1mg/ml (SE₁), 5 mg/ml (SE₂) ve 10 mg/ml (SE₃) dozlarında 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

Safran ekstraktı uygulamalarının her üç dozunda hem *mwh* hem de *flr*³ fenotipinde büyük tek tip klonlar gözlenirken, sadece SE₁ dozunda ikiz klon kaydedilmiştir (Çizelge 3.1). Safran ekstraktı uygulamaları ile negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasına ait sonuçlar karşılaştırıldığında, SE₁ ve SE₂ mg/ml dozlarında tüm klon tipleri için istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 3.1).

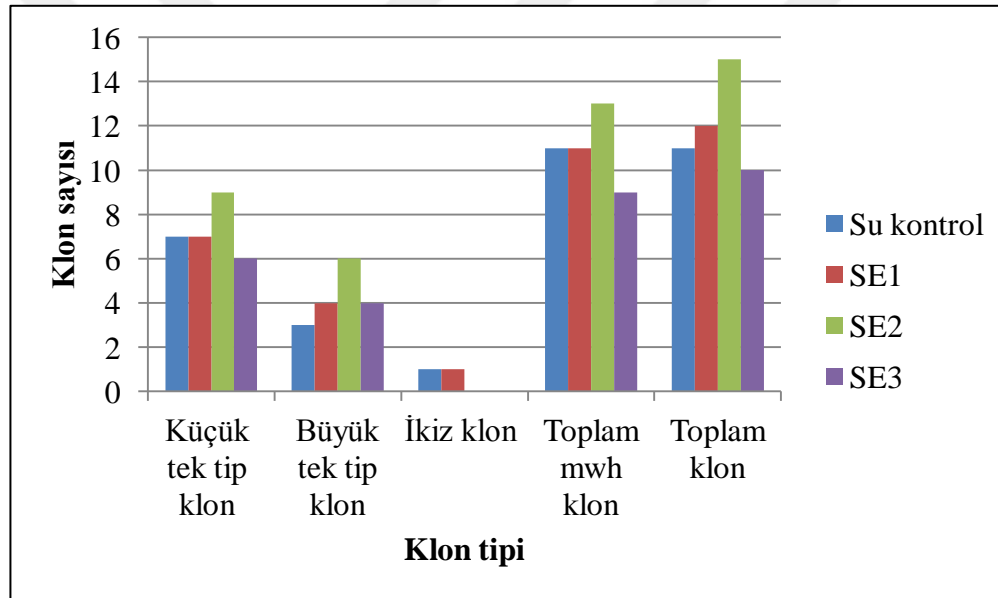
Test Maddesi	Kanat sayısı (N)	SSS(Küçük tek tip klonlar) (1-2 hücre) (m=2)			LSS (Büyük tek tip klonlar) (>2 hücre) (m=5)			TS (İkiz klonlar) (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klon (m=2)			Klon indüksiyon frekansı (10 ⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile su	80	7	(0.09)	3	(0.04)	1	(0.01)	11	(0.14)	11	(0.14)	11	(0.14)	11	(0.14)	0.56	
Doksorubisin (Dxr)	80	122	(1.53)	52	(0.65)	19	(0.24)	183	(2.29)	193	(2.41)	193	(2.41)	193	(2.41)	9.38	
SE ₁	80	7	(0.09)	4	(0.05)	1	(0.01)	11	(0.14)	12	(0.15)	12	(0.15)	12	(0.15)	0.56	
SE ₂	80	9	(0.11)	6	(0.08)	0	(0.00)	13	(0.16)	15	(0.19)	15	(0.19)	15	(0.19)	0.67	
SE ₃	80	6	(0.08)	4	(0.05)	0	(0.00)	9	(0.11)	10	(0.13)	10	(0.13)	10	(0.13)	0.46	
ME ₁	80	10	(0.13)	1	(0.01)	1	(0.01)	12	(0.15)	12	(0.15)	12	(0.15)	12	(0.15)	0.61	
ME ₂	80	7	(0.09)	3	(0.04)	0	(0.00)	10	(0.13)	10	(0.13)	10	(0.13)	10	(0.13)	0.51	
ME ₃	80	4	(0.05)	1	(0.01)	0	(0.00)	5	(0.06)	5	(0.06)	5	(0.06)	5	(0.06)	0.26	
YE ₁	80	6	(0.08)	2	(0.03)	0	(0.00)	8	(0.10)	8	(0.10)	8	(0.10)	8	(0.10)	0.41	
YE ₂	80	9	(0.11)	0	(0.00)	0	(0.00)	9	(0.11)	9	(0.11)	9	(0.11)	9	(0.11)	0.46	
YE ₃	80	2	(0.03)	2	(0.03)	0	(0.00)	3	(0.04)	4	(0.05)	4	(0.05)	4	(0.05)	0.15	

No: klon sayısı, Fr: frekans, D: istatistiksel değerlendirme sonucu (Frei ve Würger 1988), +: pozitif fark, -: negatif fark, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü; olasılık düzeyi: $\alpha = \beta = 0.05$

Çizelge 3.1. Distile su, doksorubisin ve safran, mersin meyve, mersin yaprak ekstraktlarının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

SE₃ dozunda ise küçük tek tip klonlar, büyük tek tip klonlar ve toplam klonlarda istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmezken, toplam *mwh* klonlarda negatif sonuç gözlenmiştir (Çizelge 3.1).

Safran ekstraktı uygulamasında gözlenen klon tipleri ve klon sayıları arasındaki ilişki Şekil 3.1 de verilmiştir. Elde edilen verilere göre safran ekstraktının uygulanan dozlarının genotoksik etkiye neden olmadığı görülmektedir.



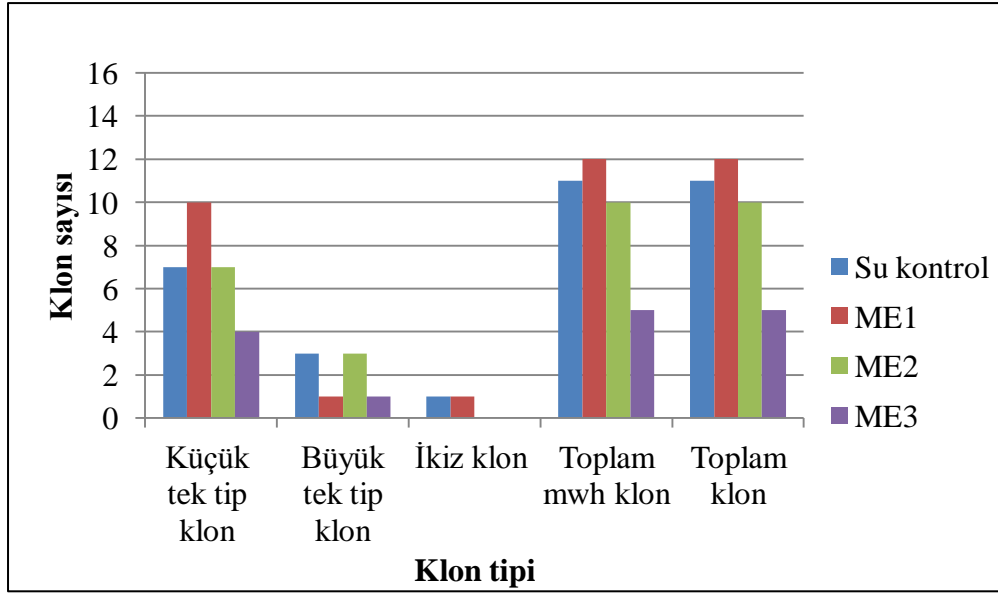
Şekil 3.1. Safran ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

3.1.2.2. Mersin Meyve Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin meyve ekstraktının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstrakt 1mg/ml (ME₁), 5 mg/ml (ME₂) ve 10 mg/ml (ME₃) dozlarında 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

Mersin meyve ekstraktı uygulamalarında gözlenen büyük tek tip klonlar *mwh* fenotipindedir, ikiz klon sadece ME₁ dozunda kaydedilmiştir (Çizelge 3.1). Mersin meyve ekstraktı uygulamaları negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasına ait sonuçlar karşılaştırıldığında ME₁ dozunda büyük tek tip klonlarda negatif sonuç gözlenirken diğer bütün klonlarda istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 3.1). ME₂ dozunda bütün klon tipleri için gözlenen farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür (Çizelge 3.1). ME₃ dozunda ikiz klonlarda önemli fark gözlenmezken diğer tüm klonlarda negatif fark gözlenmiştir (Çizelge 3.1). Küçük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon sayılarında doza bağlı olarak azalma olduğu saptanmıştır (Şekil 3.2).

Uygulamaların sonucunda elde edilen verilerden mersin meyve ekstraktının denenen dozlarının genotoksik etkiye neden olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 3.2. Mersin meyve ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

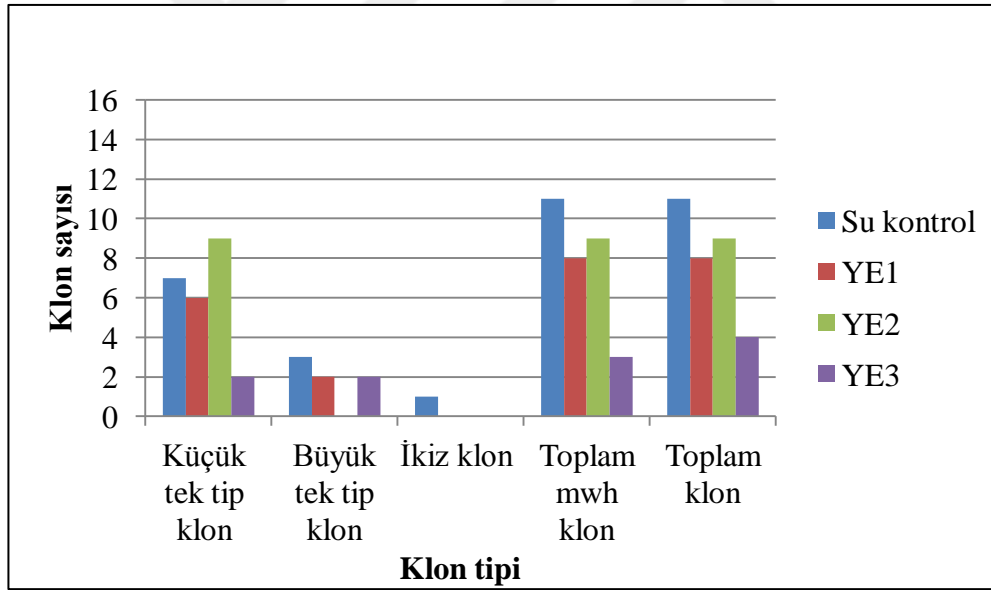
3.1.2.3. Mersin Yaprak Ekstraktının Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin yaprak ekstraktının genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstrakt 1mg/ml (YE₁), 5 mg/ml (YE₂) ve 10 mg/ml (YE₃) dozlarında 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

Mersin yaprak ekstraktı uygulamalarında YE₁ ve YE₂ dozlarında sadece *mwh* fenotipinde büyük tek tip klon gözlenirken, YE₃ dozunda hem *mwh* hem de *flr*³ fenotipinde büyük tip klon saptanmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda ikiz klon gözlenmemiştir (Çizelge 3.1). Mersin yaprak ekstraktı uygulamaları ile negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasına ait sonuçlar karşılaştırıldığında YE₁ ile

YE₂ mg/ml dozlarında küçük tek tip klonlar ve ikiz klonlar için istatistiksel olarak önemli fark gözlenmezken diğer klon tipleri için negatif fark gözlenmiştir (Çizelge 3.1). YE₃ dozunda ikiz klonlarda önemli fark gözlenmezken diğer tüm klonlarda negatif fark gözlenmiştir.

Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında gözlenen klon tipleri ve klon sayıları arasındaki ilişki Şekil 3.3 de verilmiştir. Elde edilen veriler mersin yaprak ekstraktının uygulanan dozlarının herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.3. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

3.1.3. Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

3.1.3.1. Safran Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Safran ekstraktının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstraktın her bir dozu 0,125 mg/ml doksorubisin ile kombine olarak, 1mg/ml (SE₁+Dxr), 5 mg/ml (SE₂+Dxr) ve 10 mg/ml (SE₃+Dxr) dozlarında, 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

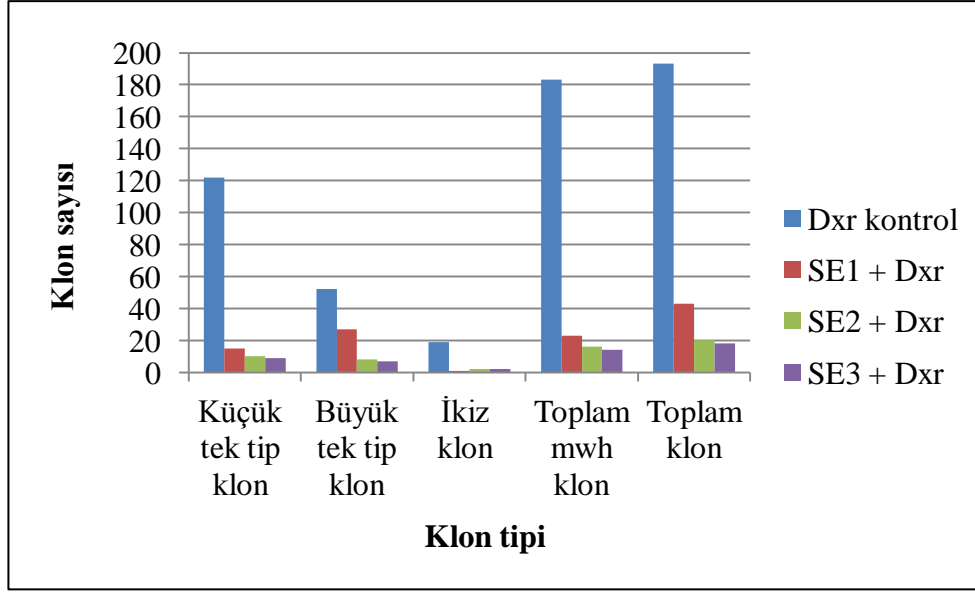
Safran ekstraktının doksorubisinle kombine uygulandığı denemelerin sonuçlarına bakıldığında tüm klon tiplerinde pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2). İkiz klon sayısında doza bağlı olarak bir azalma gözlenmezken diğer tipteki klonlarda doz arttıkça sayıca azalma olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2). Toplam klon frekanslarına bakıldığında doz arttıkça frekansın azaldığı görülmektedir (Çizelge 3.2). İnhibisyon/indüksiyon yüzdeleri incelendiğinde tüm dozlarda inhibisyon olduğu, inhibisyonun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 3.2).

Elde edilen verilere göre safran ekstraktının uygulanan her üç dozu da doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etki göstermiş, antigenotoksik etki doza bağlı olarak artmıştır (Şekil 3.4).

Test Maddesi	Kanat sayısı (N)	SSS(Küçük tek tip klonlar) (1-2 hücre) (m=2)	LSS (Büyük tek tip klonlar) (>2 hücre) (m=5)	TS (İkiz klonlar) (m=5)	Toplam mw h klonları (m=2)	Toplam klon (m=2)	Klon indüksiyon frekansı (10 ⁵ hücre)	% İnhibisyon/indüksiyon
Distile su	80	7 (0.09)	3 (0.04)	1 (0.01)	11 (0.14)	11 (0.14)	0.56	
Doksorubisin (Dxr)	80	122 (1.53) +	52 (0.65) +	19 (0.24) +	183 (2.29) +	193 (2.41) +	9.38	
SE ₁ +Dxr	80	15 (0.19) -	27 (0.34) -	1 (0.01) -	23 (0.29) -	43 (0.54) -	1.18	↓77.59
SE ₂ +Dxr	80	10 (0.13) -	8 (0.1) -	2 (0.03) -	16 (0.20) -	20 (0.25) -	0.82	↓89.63
SE ₃ +Dxr	80	9 (0.11) -	7 (0.09) -	2 (0.03) -	14 (0.18) -	18 (0.23) -	0.72	↓90.46

No: klon sayısı, Fr: frekans, D: istatistiksel değerlendirme sonucu (Frei ve Würger 1988), +: pozitif fark, -: negatif fark, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü; olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0.05$

Çizelge 3.2. Safran ekstraktının 1,5 ve 10 mg/ml dozlarının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi



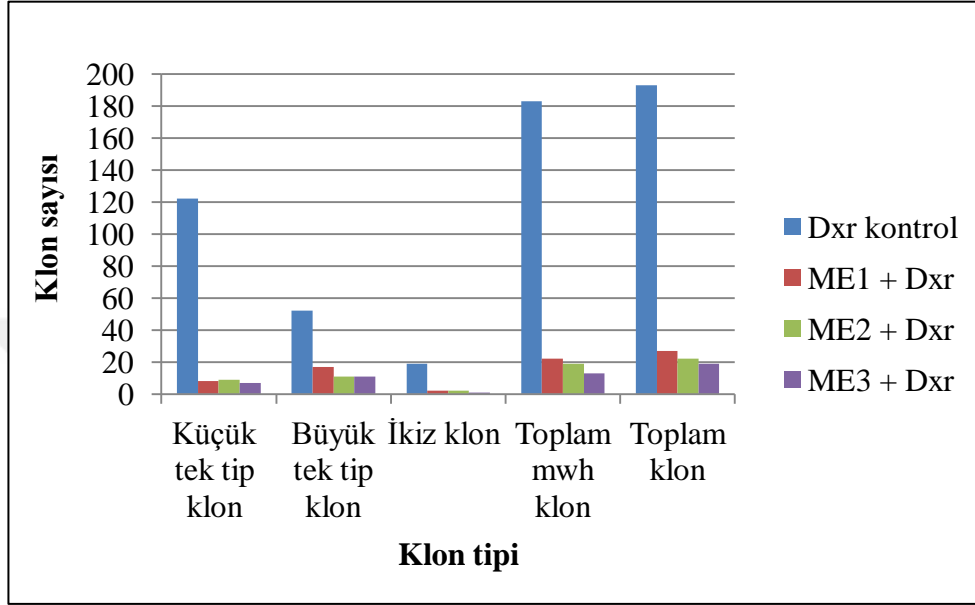
Şekil 3.4. Safran ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

3.1.3.2. Mersin Meyve Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin meyve ekstraktının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstraktın her bir dozu 0,125 mg/ml doksorubisin ile kombine olarak, 1mg/ml (ME₁+Dxr), 5 mg/ml (ME₂+Dxr) ve 10 mg/ml (ME₃+Dxr) dozlarında, 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

Mersin meyve ekstraktının doksorubisinle kombine olarak uygulandığı denemelerin sonuçlarına göre tüm klon tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu

görülmüştür (Çizelge 3.3). Küçük tip klon sayısındaki azalma doza bağlı değil iken diğer klon tiplerindeki azalmanın doza bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

Toplam klon frekansları incelendiğinde doza bağlı olarak azalma olduğu görülmektedir. İnhibisyon/indüksiyon yüzdeleri incelendiğinde tüm dozlarda inhibisyon olduğu, inhibisyonun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 3.3).

Bu uygulamanın sonuçlarına göre mersin meyve ekstraktının uygulanan dozlarının doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antijenotoksik etki gösterdiği ve bu etkinin doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.5).

Test Maddesi	Kanat sayısı (N)	SSS(Küçük tek tip klonlar) (1-2 hücre) (m=2)			LSS (Büyük tek tip klonlar) (>2 hücre) (m=5)			TS (kız klonlar) (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klon (m=2)			Klon indüksiyon frekansı (10 ³ hücre)	% inhibisyon/indüksiyon
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D		
Distile su	80	7	(0.09)		3	(0.04)		1	(0.01)		11	(0.14)		11	(0.14)		0.56	
Doksonubisin (Dxr)	80	122	(1.53)	+	52	(0.65)	+	19	(0.24)	+	183	(2.29)	+	193	(2.41)	+	9.38	
ME ₁ +Dxr	80	8	(0.10)	-	17	(0.21)	-	2	(0.03)	-	22	(0.28)	-	27	(0.34)	-	1.13	↓85.89
ME ₂ +Dxr	80	9	(0.11)	-	11	(0.14)	-	2	(0.03)	-	19	(0.24)	-	22	(0.28)	-	0.97	↓88.38
ME ₃ +Dxr	80	7	(0.09)	-	11	(0.14)	-	1	(0.01)	-	13	(0.16)	-	19	(0.24)	-	0.67	↓90.04

No: klon sayısı, Fr: frekans, D:istatistiksel değerlendirme sonucu (Frei ve Würgler 1988), +: pozitif fark, -: negatif fark, i: önemsiz fark, m:çarpım faktörü; olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0.05$

Çizelge 3.3. Mersin meyve ekstraktının 1, 5 ve 10 mg/ml dozlarının antijenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

3.1.3.3. Mersin Yaprak Ekstraktının Antigenotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin yaprak ekstraktının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için ekstraktın her bir dozu 0,125 mg/ml doksorubisin ile kombine olarak, 1mg/ml (YE₁+Dxr), 5 mg/ml (YE₂+Dxr) ve 10 mg/ml (YE₃+Dxr) dozlarında, 72 ± 4 saatlik transheterozigot *Drosophila melanogaster* larvalarına uygulanmıştır.

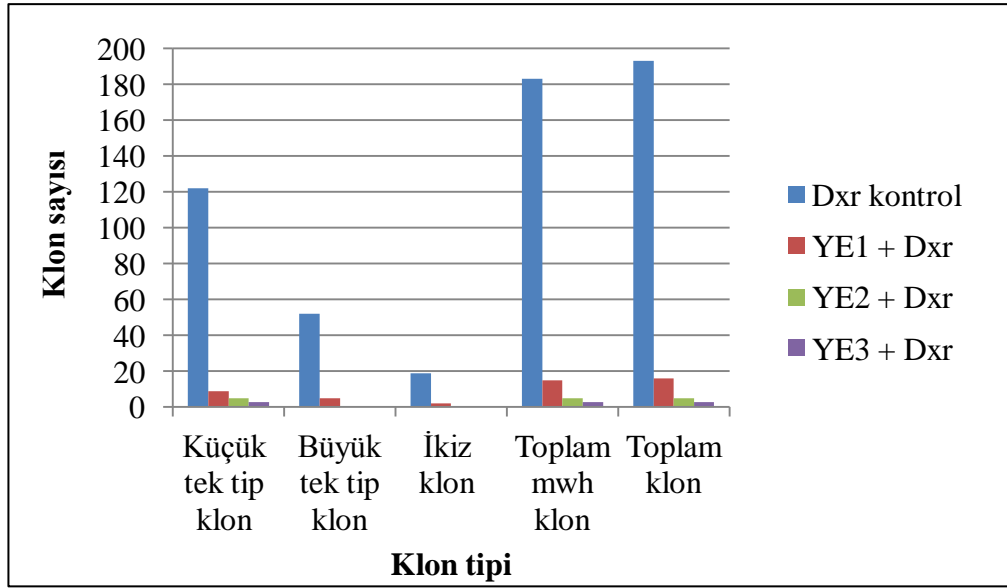
Mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle birlikte uygulandığı denemelerin sonuçları incelendiğinde tüm klon tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu ve bu azalmanın doza bağlı olduğu görülmüştür (Çizelge 3.4). Toplam klon frekansları incelendiğinde doza bağlı olarak frekansın azaldığı görülmektedir (Çizelge 3.4). İnhibisyon/indüksiyon yüzdeleri incelendiğinde tüm dozlarda inhibisyon olduğu, inhibisyonun doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 3.4).

Mersin yaprak ekstraktı ile yapılan uygulamaların sonuçlarına bakıldığında bu çalışmada uygulanan mersin yaprak ekstraktı dozlarının doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etkiye sahip olduğu ve bu etkinin doza bağlı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 3.6).

Test Maddesi	Kanat sayısı (N)	SSS(Küçük tek tip klonlar) (1-2 hücre) (m=2)		LSS (Büyük tek tip klonlar) (>2 hücre) (m=5)		TS (İkiz klonlar) (m=5)		Toplam mwh klonları (m=2)		Toplam klon (m=2)		Klon indüksiyon frekansı (10 ⁵ hücre)	% inhibisyon/indüksiyon
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No		
Distile su	80	7	(0.09)	3	(0.04)	1	(0.01)	11	(0.14)	11	(0.14)	0.56	
Dokсорubisin (Dxr)	80	122	(1.53)	52	(0.65)	19	(0.24)	183	(2.29)	193	(2.41)	9.38	
YE ₁ +Dxr	80	9	(0.11)	5	(0.06)	2	(0.03)	15	(0.19)	16	(0.20)	0.77	↓91.70
YE ₂ +Dxr	80	5	(0.06)	0	(0.00)	0	(0.00)	5	(0.06)	5	(0.06)	0.26	↓97.51
YE ₃ +Dxr	80	3	(0.04)	0	(0.00)	0	(0.00)	3	(0.04)	3	(0.04)	0.15	↓98.34

No: klon sayısı, Fr: frekans, D: istatistiksel değerlendirme sonucu (Frei ve Würgler 1988), +: pozitif fark, -: negatif fark, i: önemsiz fark, m: çarpım

Çizelge 3.4. Mersin yaprak ekstraktının 1,5 ve 10 mg/ml dozlarının antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 3.6. Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında klon tiplerine göre klon sayılarının dağılımı

3.2. MTT Testinden Elde Edilen Bulgular

Safran ekstraktı (SE), mersin meyve ekstraktı (ME) ve mersin yaprak ekstraktının (YE), DLD-1 (insan kolon kanseri) hücre hattı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için ekstraktlar ayrı ayrı 100 µg/ml (SE₁, ME₁, YE₁), 200 µg/ml (SE₂, ME₂, YE₂), 400 µg/ml (SE₃, ME₃, YE₃) ve 800 µg/ml (SE₄, ME₄, YE₄) dozlarında 24 saat süre ile uygulanmıştır. Ayrıca üç ekstraktın her bir dozu, 10 µM doksorubisin (Dxr) ile kombine olarak DLD-1 hücre hattına uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak hücre hattına sadece besiyeri, pozitif kontrol olarak sadece doksorubisin (10 µM) uygulanmıştır.

Yapılan uygulamalardan sonra mikroplak okuyucudan elde edilen optik dansite (OD) değerleri ile her bir uygulama için aşağıdaki formüllere göre % sitotoksite değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ sitotoksisite} = (1 - (\text{test maddesi eklenmiş kuyucuktaki absorbands} / \text{kontrol kuyucuğundaki absorbands})) * 100$$

3.2.1. Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

3.2.1.1. Safran Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Safran ekstraktı (SE) uygulamasına ait sonuçlar incelendiğinde SE₂ dozundan başlayarak doz arttıça % sitotoksisitenin arttığı görülmüştür (izelge 3.5). Dozlar arasındaki % sitotoksisite değerlerindeki fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

SE uygulamasında tüm dozlar için hem negatif hem de pozitif kontrol değerlerine göre daha yüksek % sitotoksisite değerleri gözlenmiş (izelge 3.5), SE uygulamaları ile negatif ve pozitif kontrol grubu uygulamaları arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Çizelge 3.5. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % sitotoksosite değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	SE ₁	SE ₂	SE ₃	SE ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksosite	-	16,943* (±4,386)	42,229*# (±7,587)	41,005*# (±5,028)	49,068*# (±6,859)	58,087*# (±3,654)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark (p<0,05)

Safran ekstraktı ve doksorubisin (SE+Dxr) uygulamasına ait verilere göre doz artıkça % sitotoksosite değerinin arttığı saptanmıştır (Çizelge 3.6). Dozlar arasındaki % sitotoksosite değeri farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p> 0,05).

Çizelge 3.6. Safran ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksosite değerleri

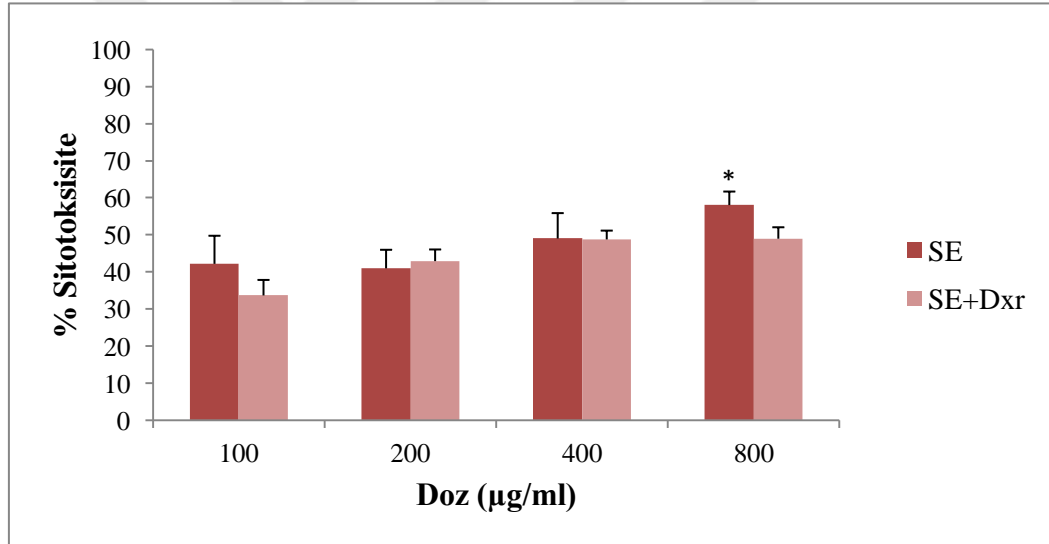
Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	SE ₁ +Dxr	SE ₂ +Dxr	SE ₃ +Dxr	SE ₄ +Dxr
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksosite	-	16,943* (±4,386)	33,714*# (±4,183)	42,966*# (±3,153)	48,828*# (±2,385)	49,015*# (±3,087)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark (p<0,05)

Tüm dozlar için % sitotoksosite değerlerinin negatif ve pozitif kontrole göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.6). Kontrol gruplarına göre SE+Dxr

uygulamalarındaki % sitotoksosite değeri artışı istatistiksel bakımından anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

% sitotoksosite değeri SE_2+Dxr uygulamasında SE_2 uygulamasına göre daha yüksek, diğer üç dozda (SE_1+Dxr , SE_3+Dxr ve SE_4+Dxr) daha düşüktür. SE ve $SE+Dxr$ uygulamaları karşılaştırıldığında, SE_4 ve SE_4+Dxr uygulamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), diğer dozlar için aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Safran ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % sitotoksosite değerlerindeki değişim

*ekstrakt ile ekstrakt+dxr arasında anlamlı fark ($p<0,05$)

3.2.1.2. Mersin Meyve Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin ekstraktı (ME) uygulaması sonuçlarına göre doz arttıkça % sitotoksosite değerinin doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 3.7). Uygulanan dozlarda saptanan % sitotoksosite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 3.7. Mersin meyve ekstraktının uygulamasında dozlara göre % sitotoksosite değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksosite	-	16,943* (±4,386)	44,020*# (±4,955)	49,888*# (±4,310)	51,526*# (±4,204)	53,344*# (±3,594)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark ($p < 0,05$)

ME uygulamasında tüm dozlarda gözlenen % sitotoksosite değerlerinin hem negatif hem de pozitif kontrol değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.7). İstatistiksel değerlendirme sonucunda negatif ve pozitif kontrol uygulamalarında gözlenen % sitotoksosite değerleri ile ME uygulamalarında gözlenen değerler arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

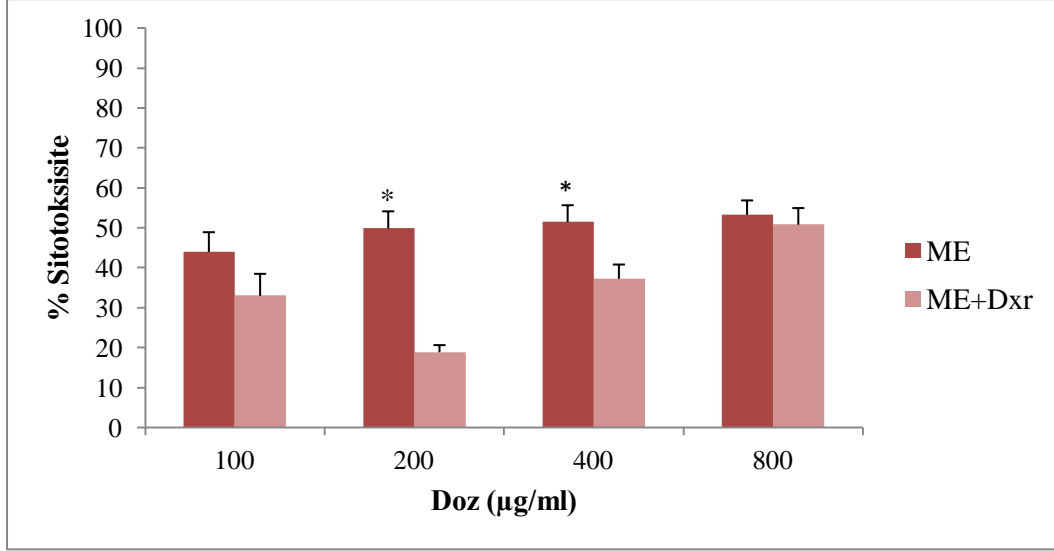
Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisin (ME+Dxr) uygulanmasından elde edilen veriler incelendiğinde % sitotoksosite değerinin ME₂+Dxr konsantrasyonundan itibaren doza bağlı arttığı görülmüştür (Çizelge 3.8). Uygulanan dozlarda saptanan % sitotoksosite değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Tüm dozlar için % sitotoksosite değerlerinin negatif ve pozitif kontrole göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksosite değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	ME ₁ +Dxr	ME ₂ +Dxr	ME ₃ +Dxr	ME ₄ +Dxr
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksosite	-	16,943* (±4,386)	33,037*# x (±5,511)	18,910* ^x (±1,784)	37,298*# ^x (±3,581)	50,869*# ^x (±4,151)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark , x dozlar arasında anlamlı fark (p<0,05)

İstatistiksel değerlendirmelerde negatif kontrole göre; tüm dozlarda, pozitif kontrole göre; ME₁+ Dxr, ME₃+ Dxr ve ME₄+ Dxr dozlarındaki artış anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Uygulanan tüm dozlarda ME+Dxr uygulaması ile elde edilen % sitotoksosite değerlerinin ME uygulamasındaki değerlere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Yapılan uygulamalardan ME₂+Dxr ile ME₂, ME₃+Dxr ile ME₃ arasındaki fark p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Mersin meyve ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % sitotoksosite değerlerindeki değişim

*ekstrakt ile ekstrakt+dxr arasında anlamlı fark ($p < 0,05$)

3.2.1.3. Mersin Yaprak Ekstraktının Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin yaprak ekstraktı (YE) uygulamasından elde edilen veriler incelendiğinde % sitotoksosite değerinin doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Çizelge 3.9). Dozlar arasındaki % sitotoksosite değerlerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$).

YE uygulamasında tüm dozlar için negatif kontrole göre % sitotoksosite değerinde artış gözlenmiş, istatistiksel analizler sonucunda bu artışın anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Çizelge 3.9. Mersin yaprak ekstraktının uygulamasında dozlara göre % sitotoksosite değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	YE ₁	YE ₂	YE ₃	YE ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksosite	-	16,943* (±4,386)	11,769*x (±1,059)	17,119*x (±6,477)	41,018*# x (±5,191)	55,188*# x (±2,638)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark, x dozlar arasında anlamlı fark (p<0,05)

Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında YE₂,YE₃ ve YE₄ dozlarında gözlenen % sitotoksosite değerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.9). Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda pozitif kontrol ile YE₃ ve YE₄ dozlarında gözlenen değerler arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür (p< 0,05).

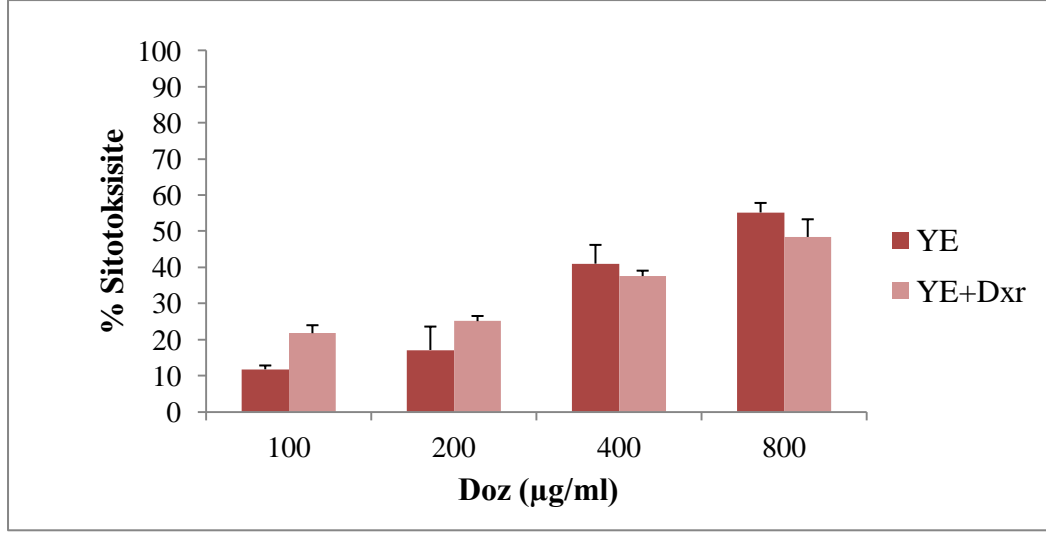
Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisin (YE+Dxr) uygulanması ile elde edilen verilere incelendiğinde % sitotoksosite değerinin doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır (Çizelge 3.10). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda dozlar arasındaki % sitotoksosite değerlerindeki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür (p> 0,05).

Çizelge 3.10. Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisinin kombine uygulamasında dozlara göre % sitotoksisite değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	YE ₁ +Dxr	YE ₂ +Dxr	YE ₃ +Dxr	YE ₄ +Dxr
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% sitotoksisite	-	16,943* (±4,386)	21,762 (±2,210)	25,097* (±1,43)	37,575*# (±1,496)	48,411*# (±4,887)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark, x dozlar arasında anlamlı fark (p<0,05)

Tüm dozlar için % sitotoksisite değerlerinin negatif ve pozitif kontrole göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.10). İstatistiksel değerlendirme sonucunda negatif kontrole göre; YE₂+ Dxr, YE₃+ Dxr ve YE₄+ Dxr dozlarında, pozitif kontrole göre; YE₃+ Dxr ve YE₄+ Dxr dozlarındaki artış anlamlı bulunmuştur (p<0,05). YE ile YE+Dxr uygulamaları karşılaştırıldığında YE₁+ Dxr ve YE₂+ Dxr uygulamalarında % sitotoksisite değerlerinin YE₁ ve YE₂ uygulamalarına göre daha yüksek, YE₃+ Dxr ve YE₄+ Dxr uygulamalarında % sitotoksisite değerlerinin YE₃ ve YE₄ uygulamalarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu uygulamalar arasındaki farklar (Şekil 3.9) istatistiksel olarak analiz edildiğinde ise anlamlı bulunmamıştır (p> 0,05).



Şekil 3.9. Mersin yaprak ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % sitotoksosite değerlerindeki değişim

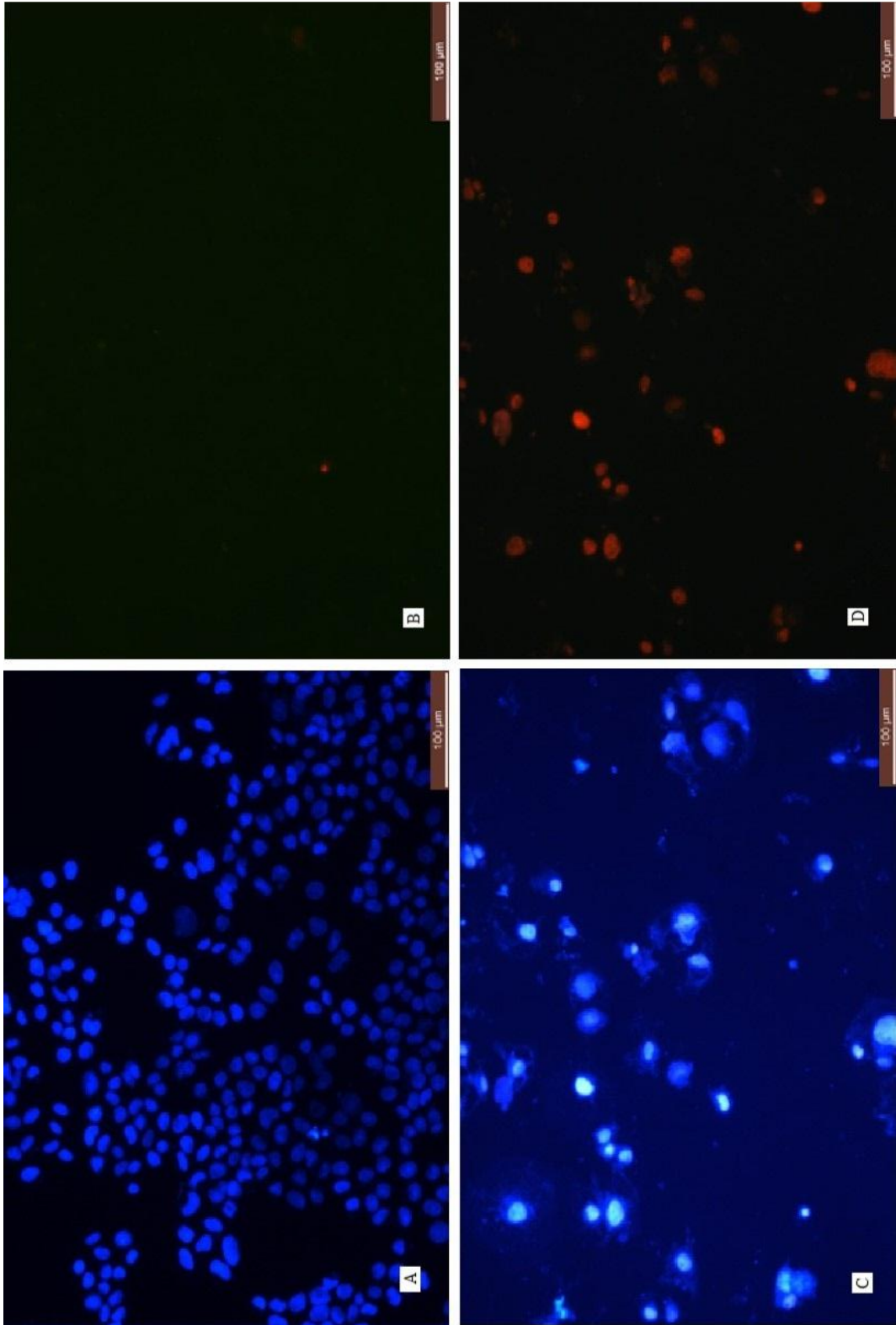
3.3. Floresan Mikroskopi Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular

Safran, mersin meyve ve mersin yaprak ekstraktlarının DLD-1 hücre hattı üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin değerlendirilmesinde MTT testinde olduğu gibi safran, mersin meyve ve mersin yaprak ekstraktları 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarında 24 saat süre ile uygulanmıştır. Ayrıca üç ekstraktın her bir dozu doksorubisin (10 µM) ile birlikte uygulanmış, sadece besiyeri eklenerek negatif, doksorubisin eklenerek pozitif kontrol denemeleri yapılmıştır. Yapılan uygulamalar sonunda plaklar floresan mikroskopta incelenmiş, apoptotik hücreler DAPI filtresi, nekrotik hücreler FITC filtresi ile incelenerek saptanmıştır (Şekil 3.10-3.22).

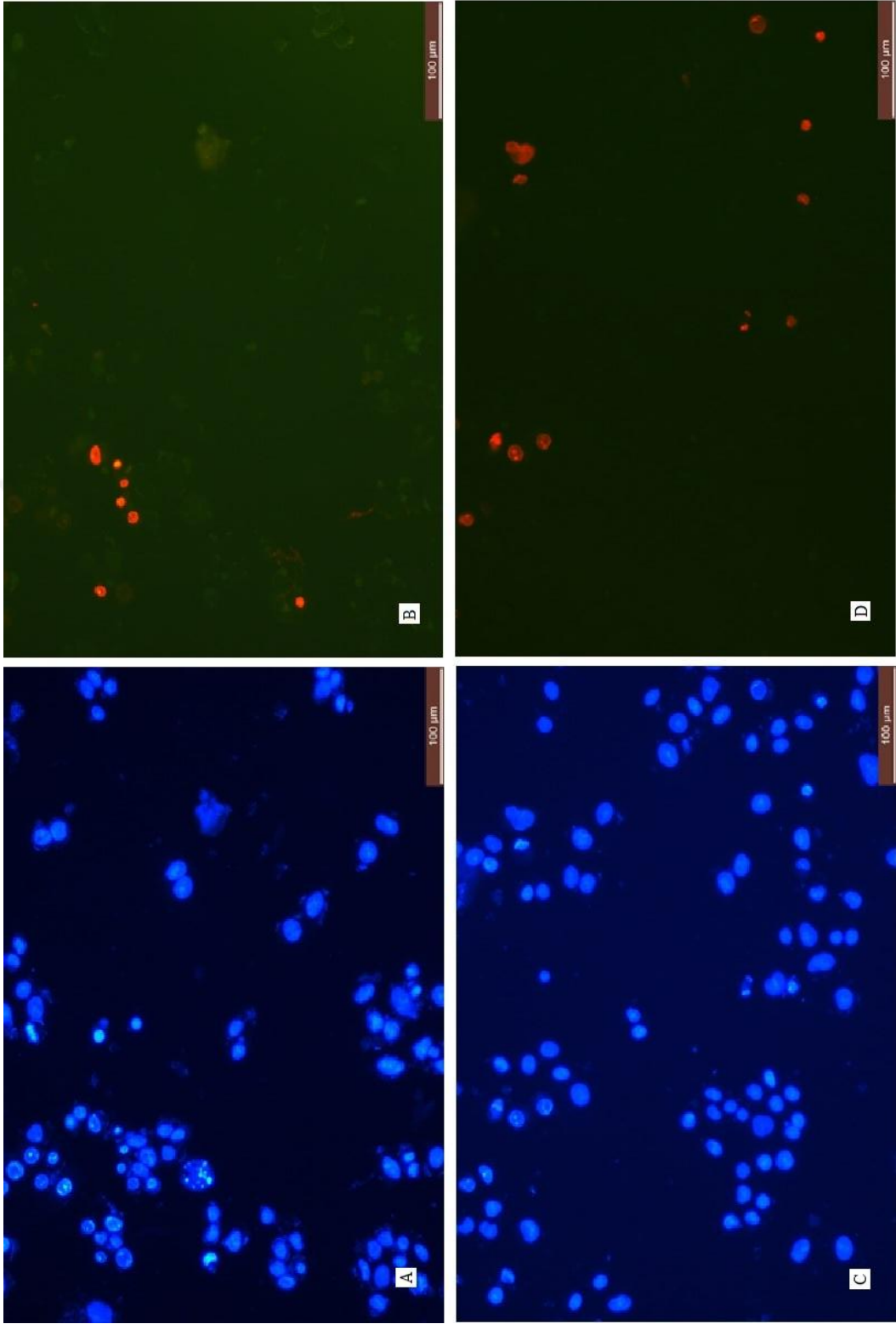
3.3.1. Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Yapılan denemelerde pozitif kontrol, YE, ME ve SE uygulamalarında apoptotik ölüm görülürken, negatif kontrol ve ekstrakt-doksorubisin kombine uygulamalarında apoptotik ölüme rastlanmamıştır (Şekil 3.10-3.22). Safran ekstraktı uygulamasında % apoptoz değerleri sırasıyla 0.161, 0.054, 0.100 ve 0.085 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 3.11). Mersin meyve ekstraktı uygulamasında, ME₁ dozunda apoptotik hücre görülmezken, ME₂, ME₃ ve ME₄ dozlarında % apoptoz değerinin doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 3.13). Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında YE₁, YE₂ ve YE₃ dozlarında % apoptoz değeri doza bağlı olarak artarken, YE₄ dozunda apoptotik hücre kaydedilmemiştir (Çizelge 3.15).

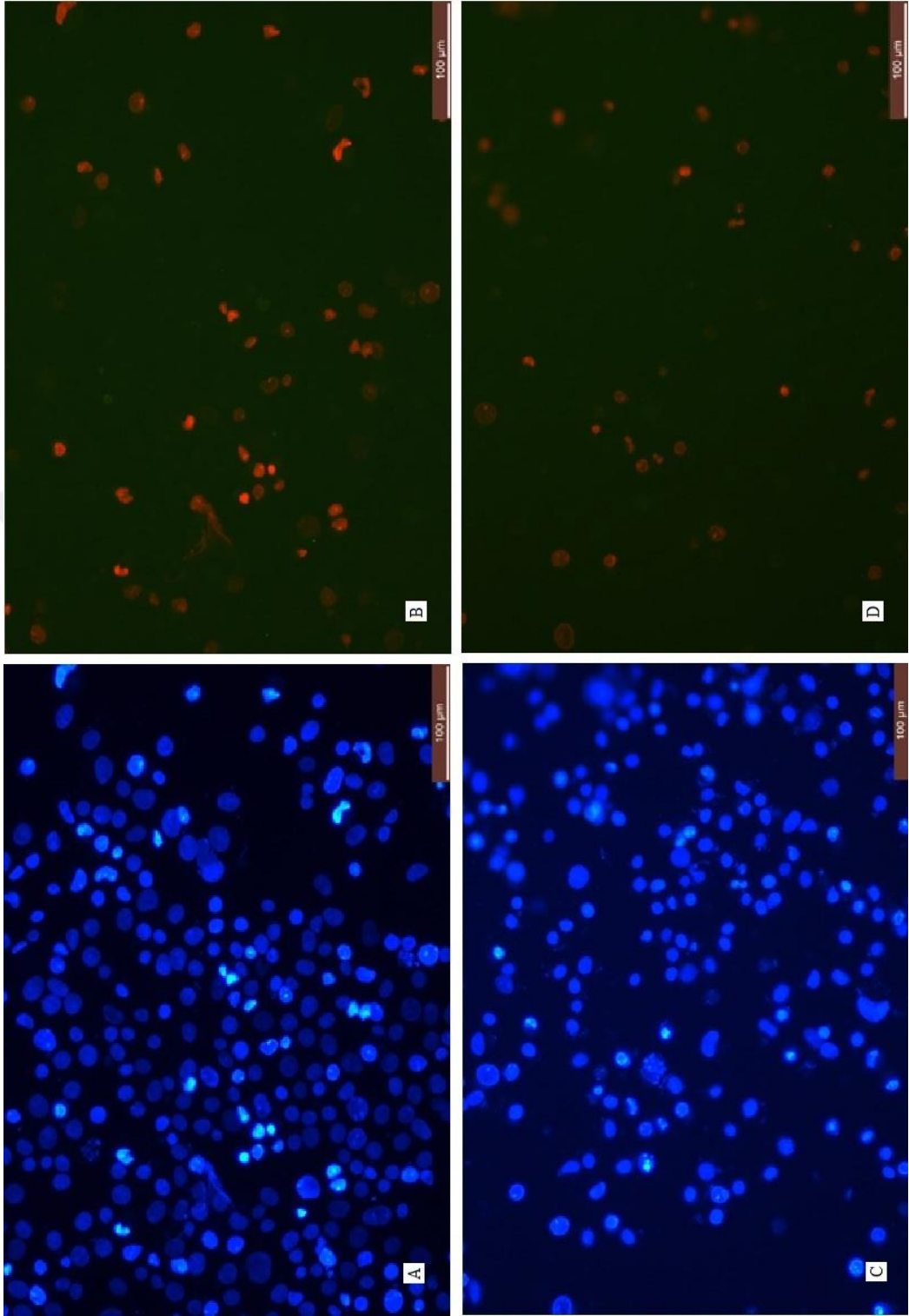
Ekstraktların uygulanan dozlarına göre % apoptoz değerlerindeki değişim Şekil 3.23, 3.24 ve 3.25 de verilmiştir.



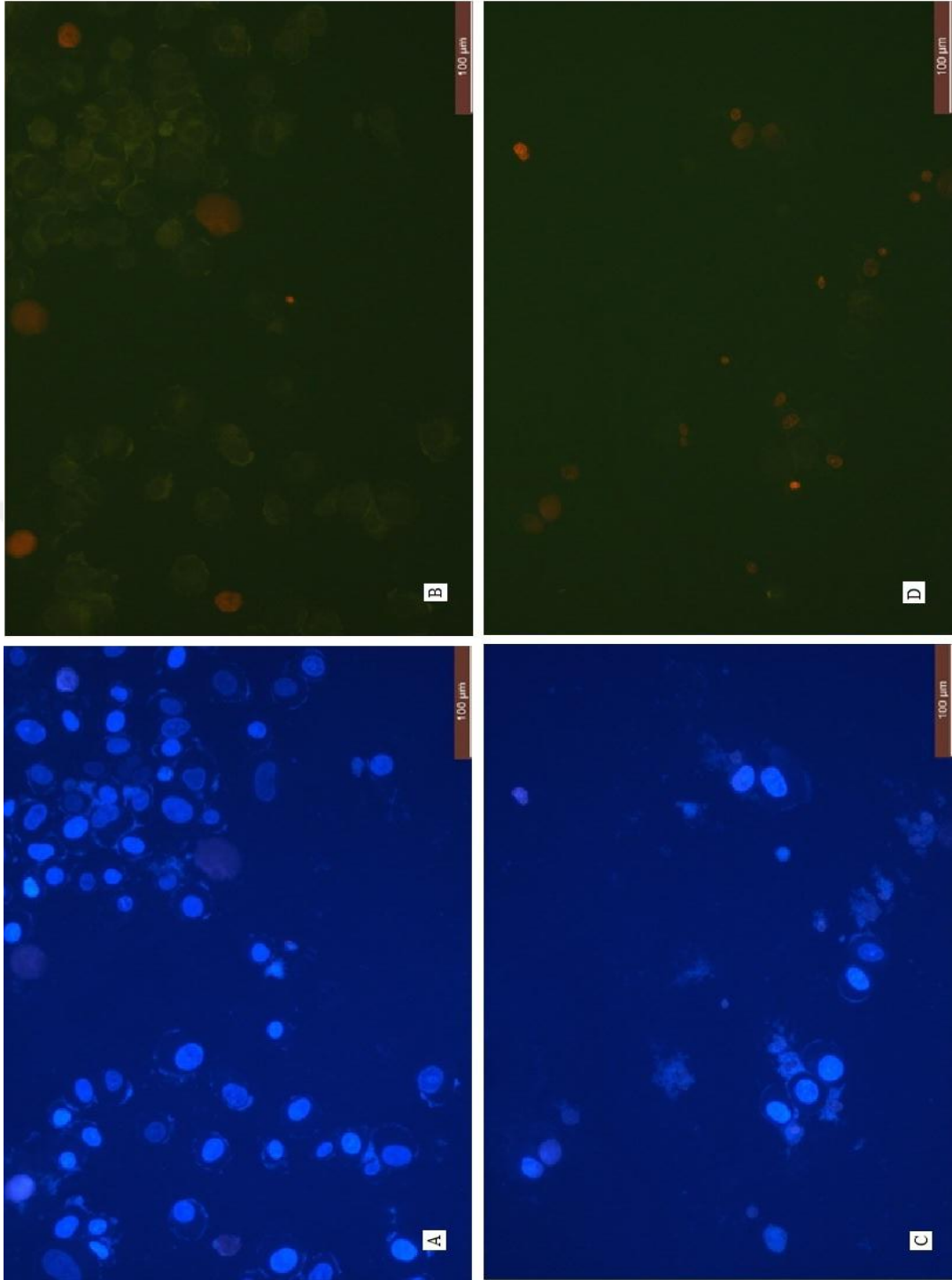
Şekil 3.10. Negatif (A,B) ve pozitif (C,D) kontrol uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



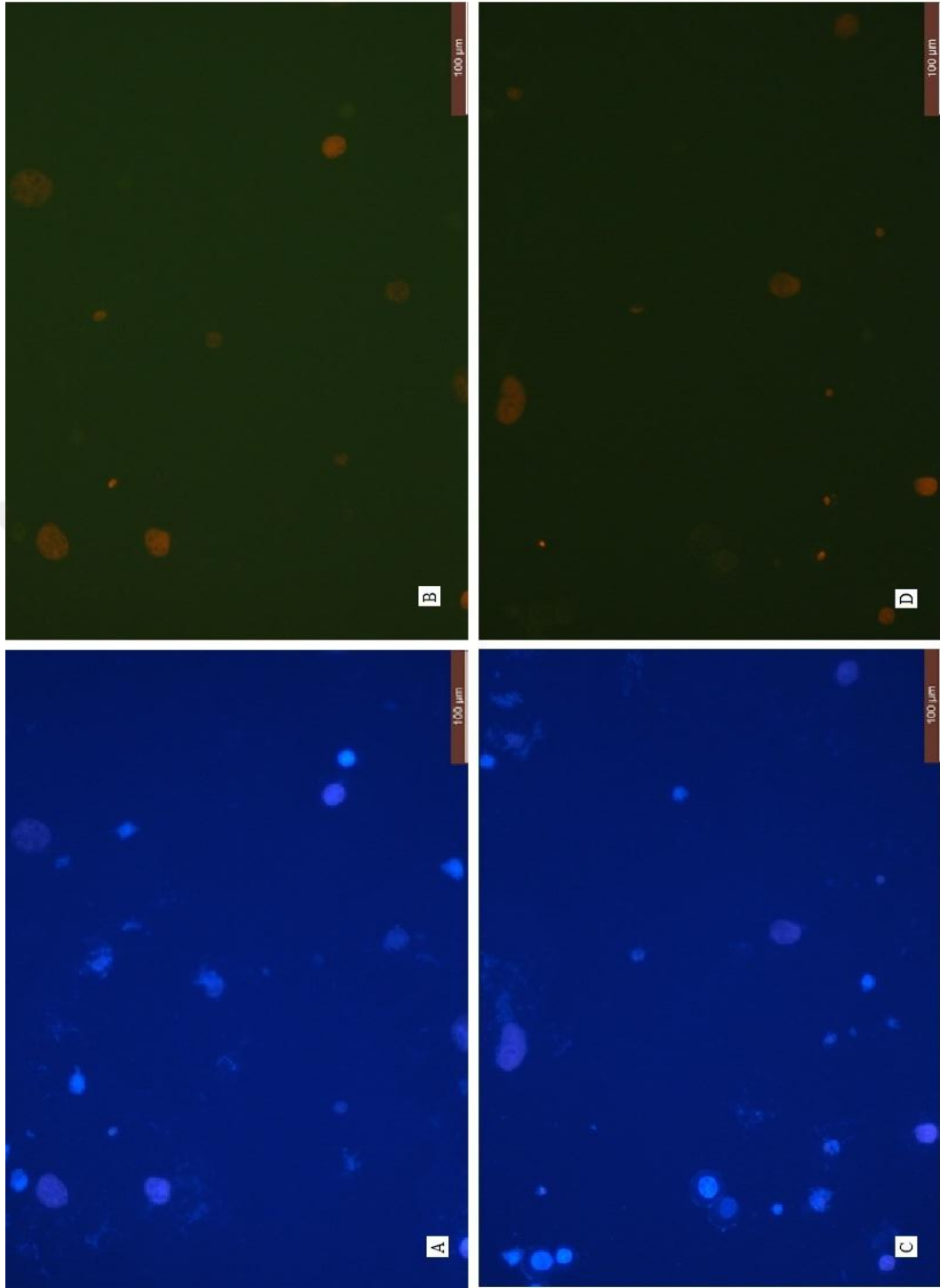
Şekil 3.11. 100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) safran ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



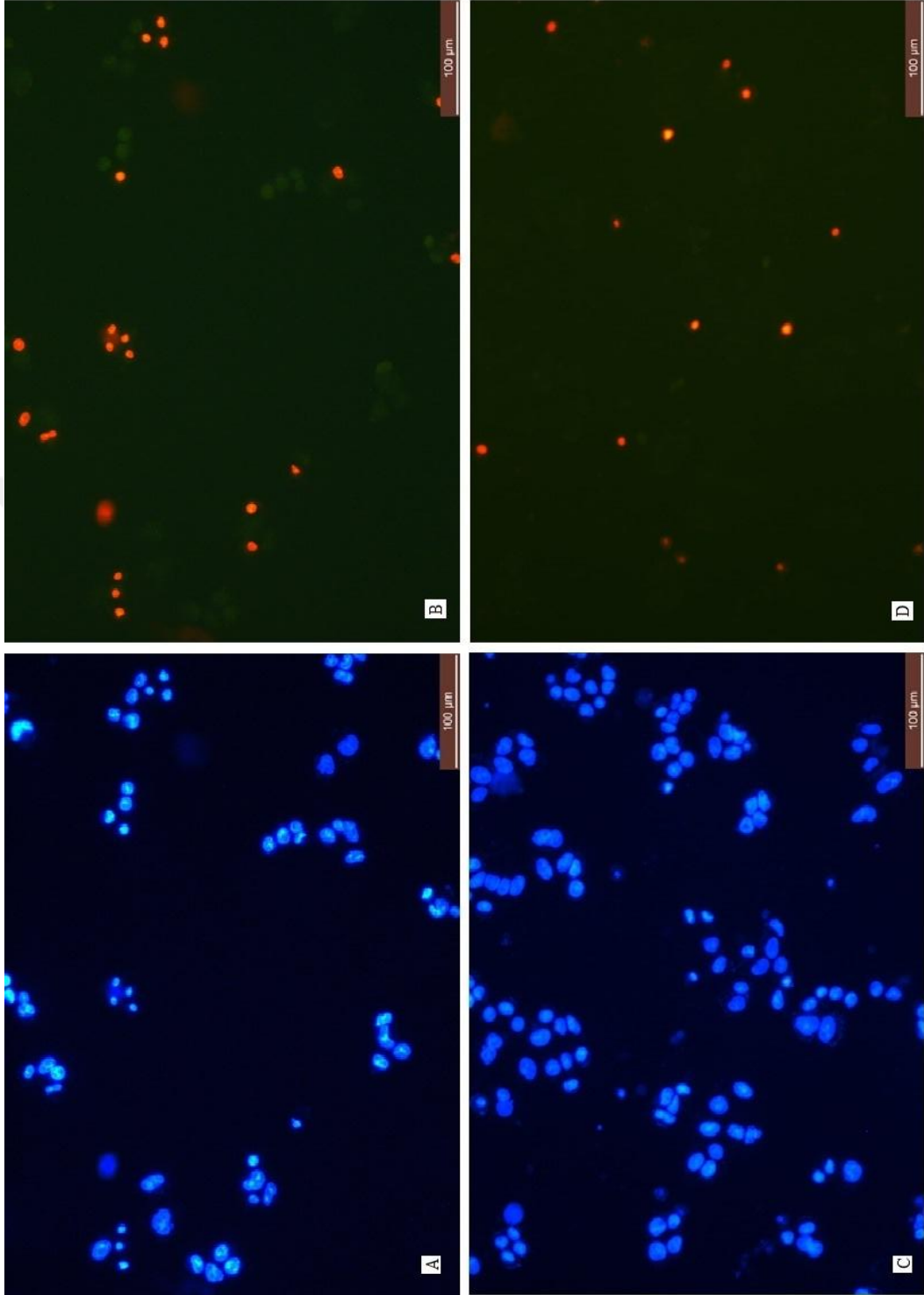
Şekil 3.12. 400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) safran ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



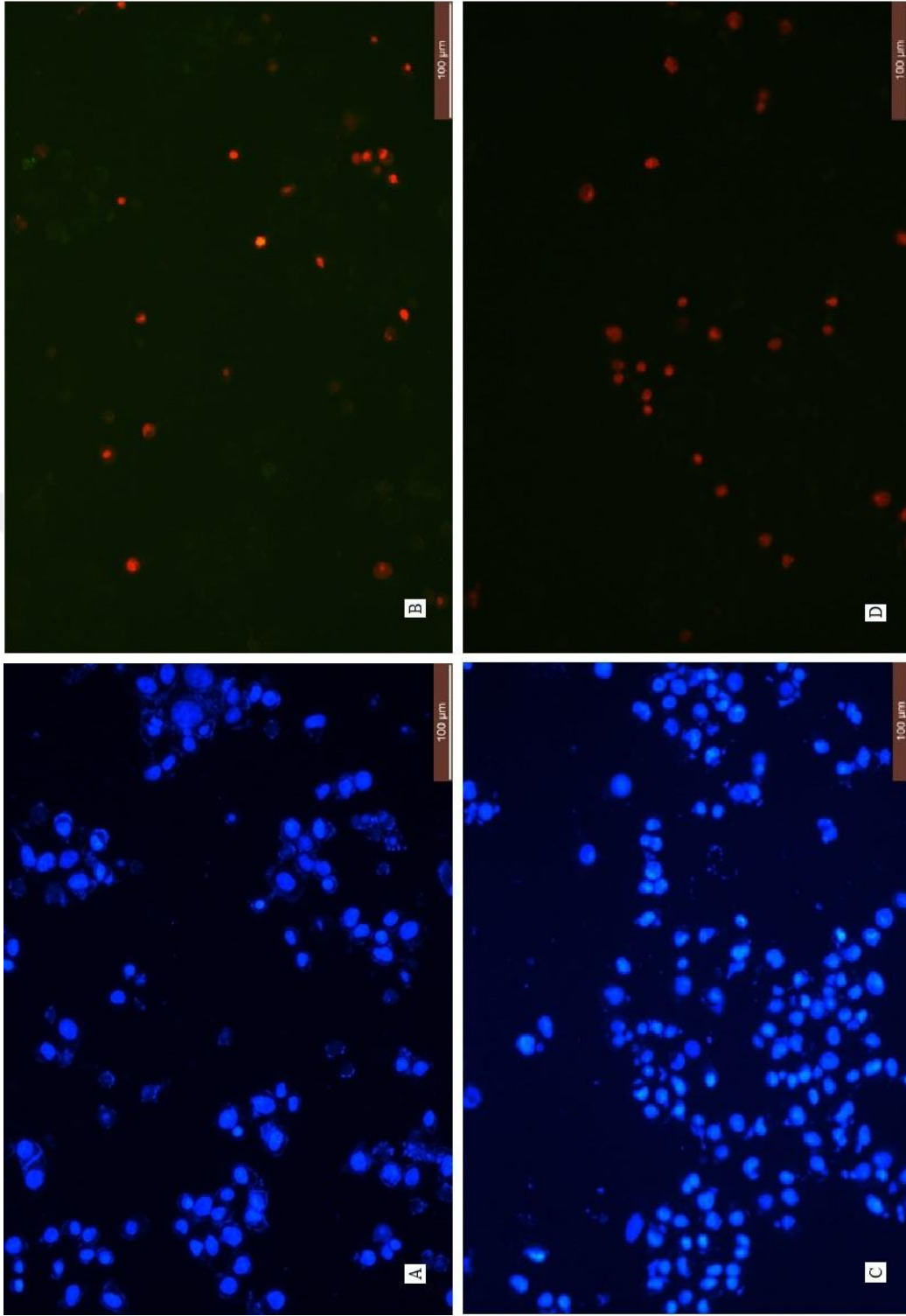
Şekil 3.13. 100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) safran ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



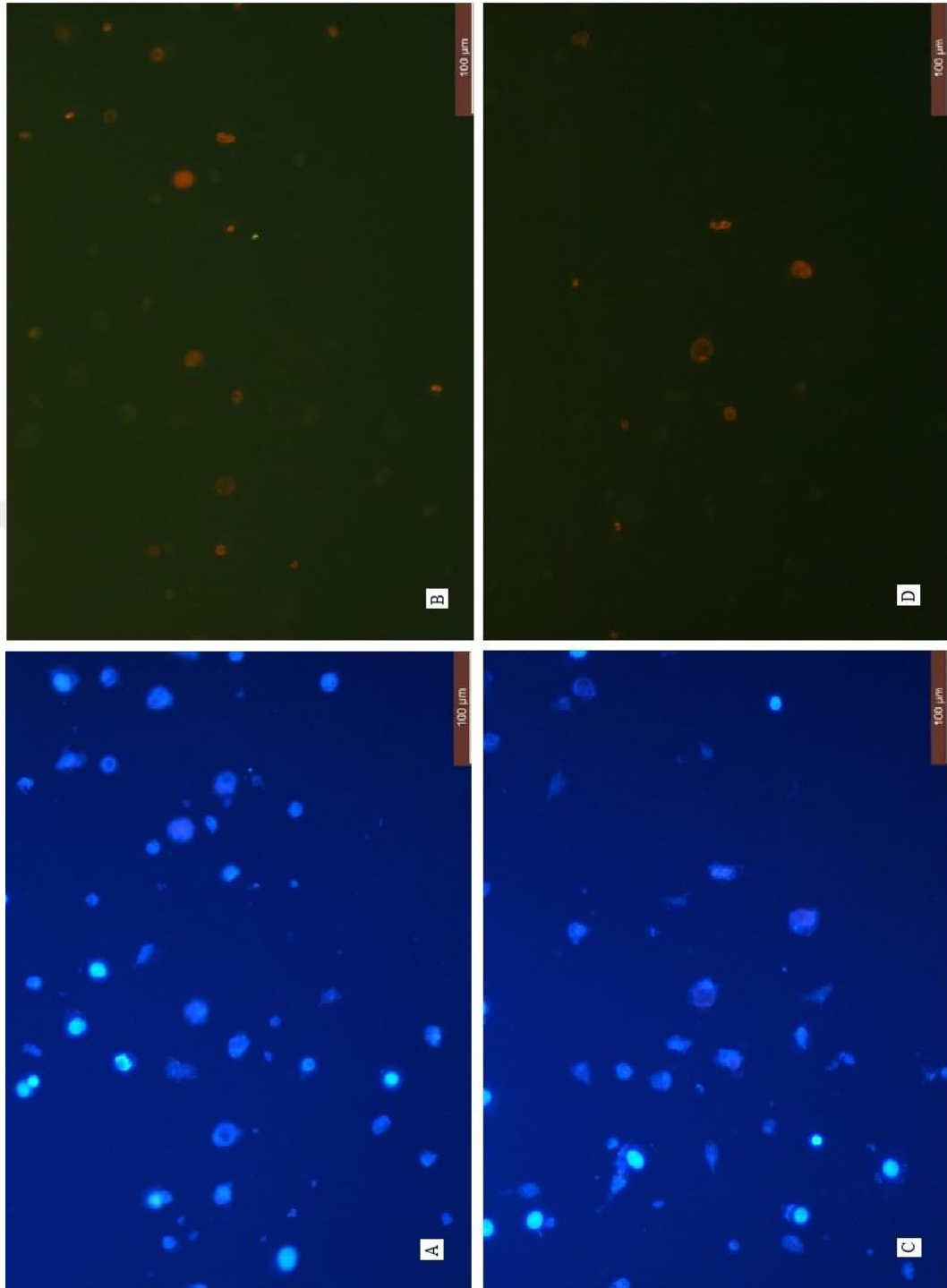
Şekil 3.14. 400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) safran ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



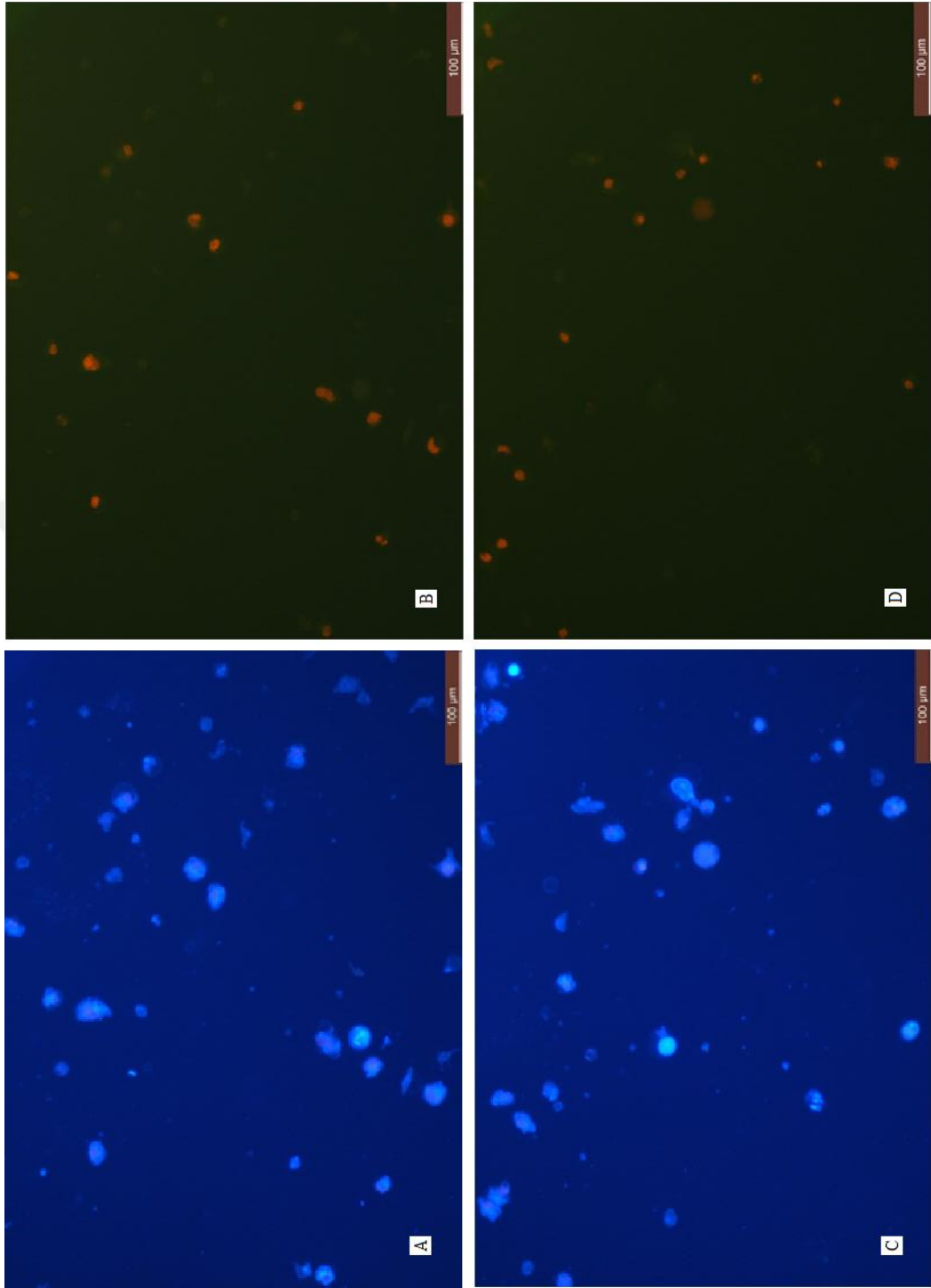
Şekil 3.15. 100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



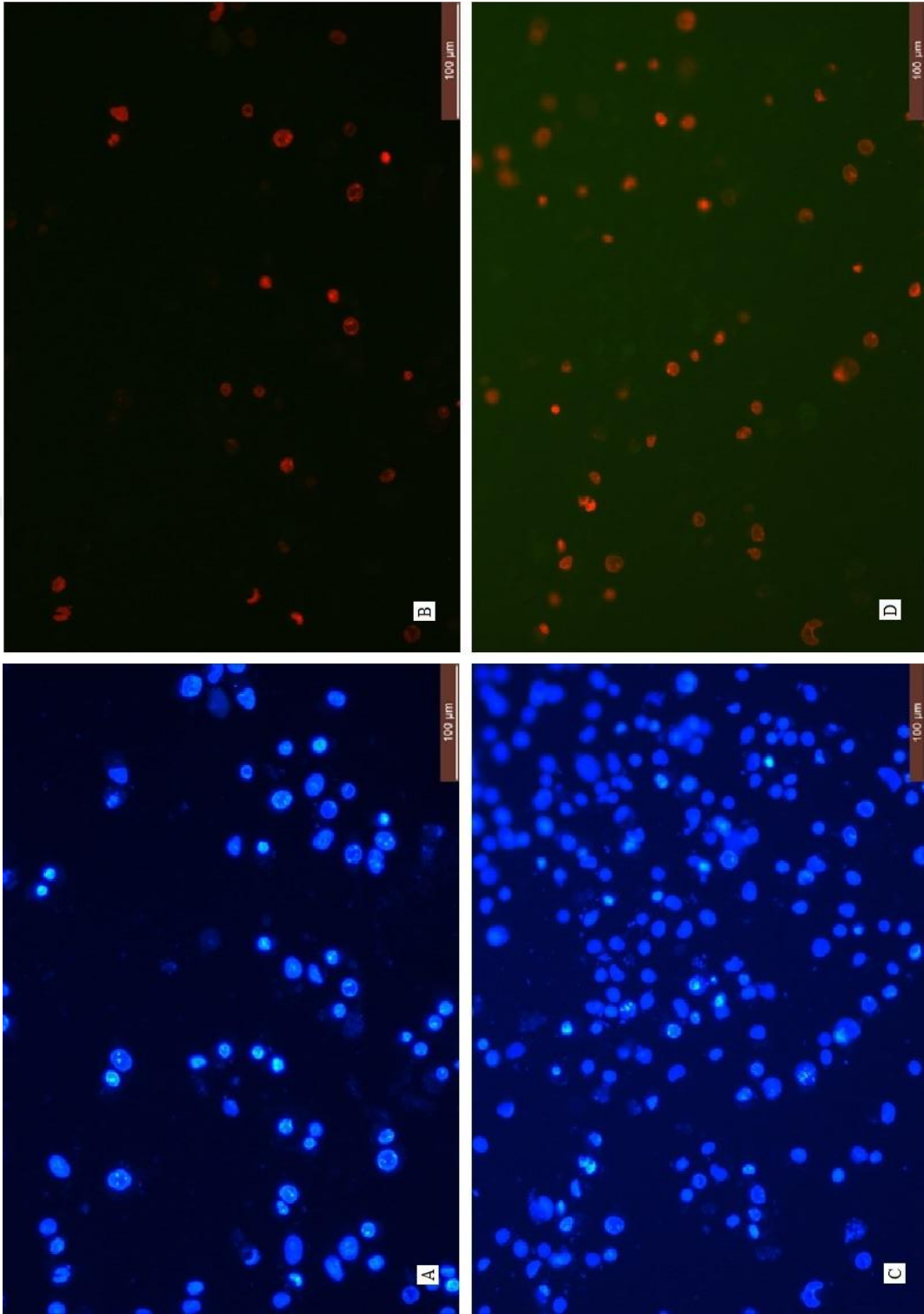
Şekil 3.16. 400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



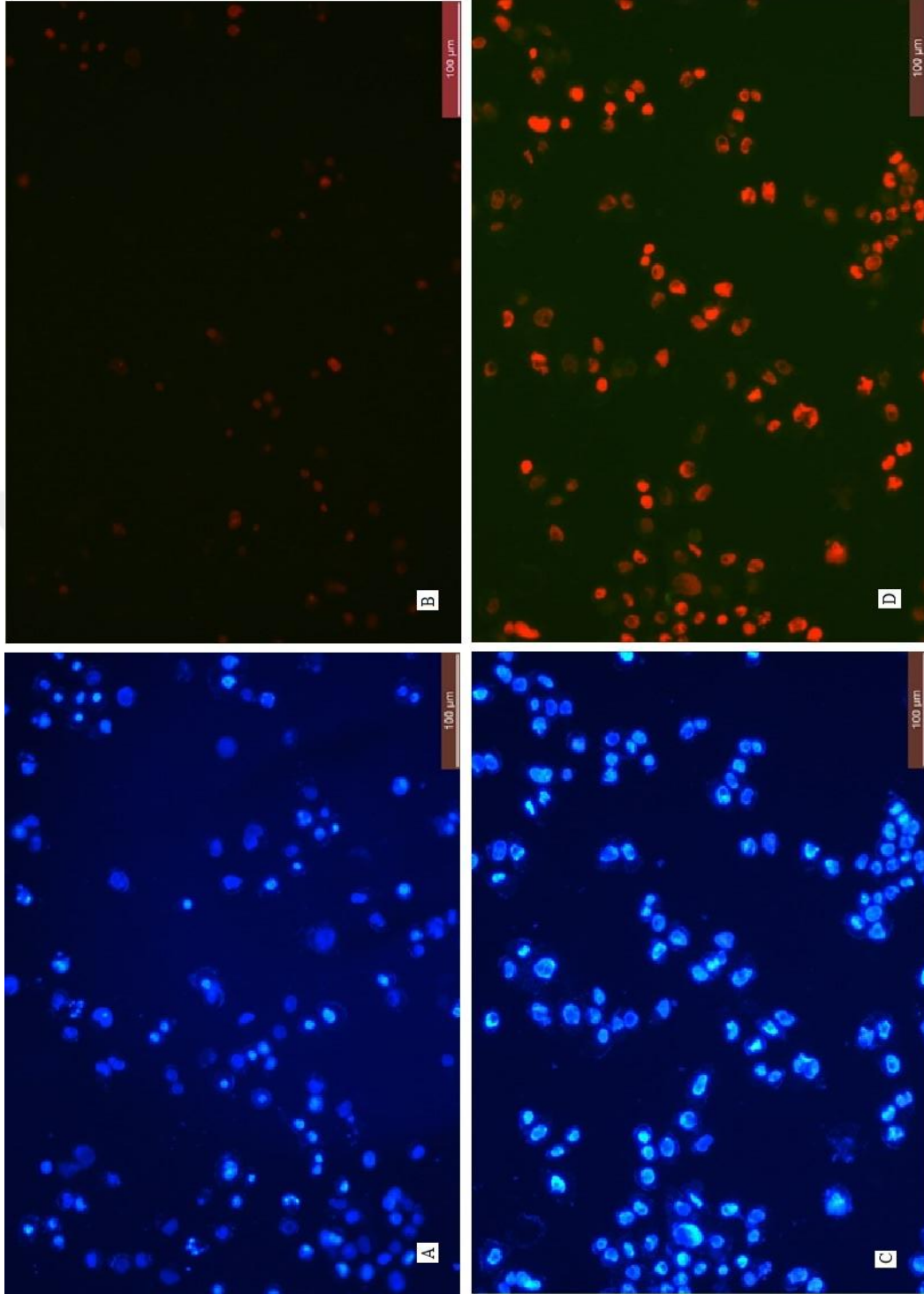
Şekil 3.17. 100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



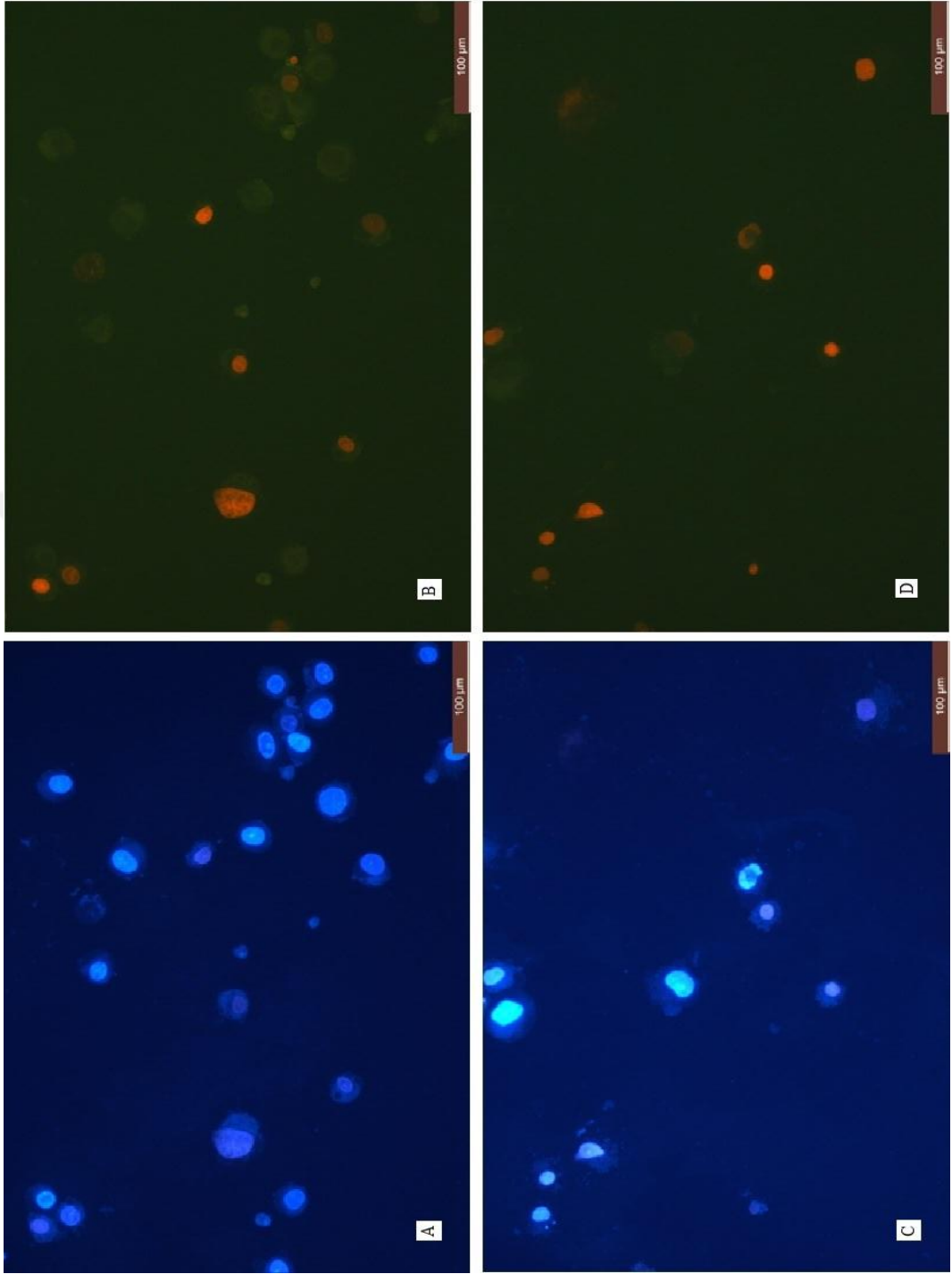
Şekil 3.18. 400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) mersin meyve ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



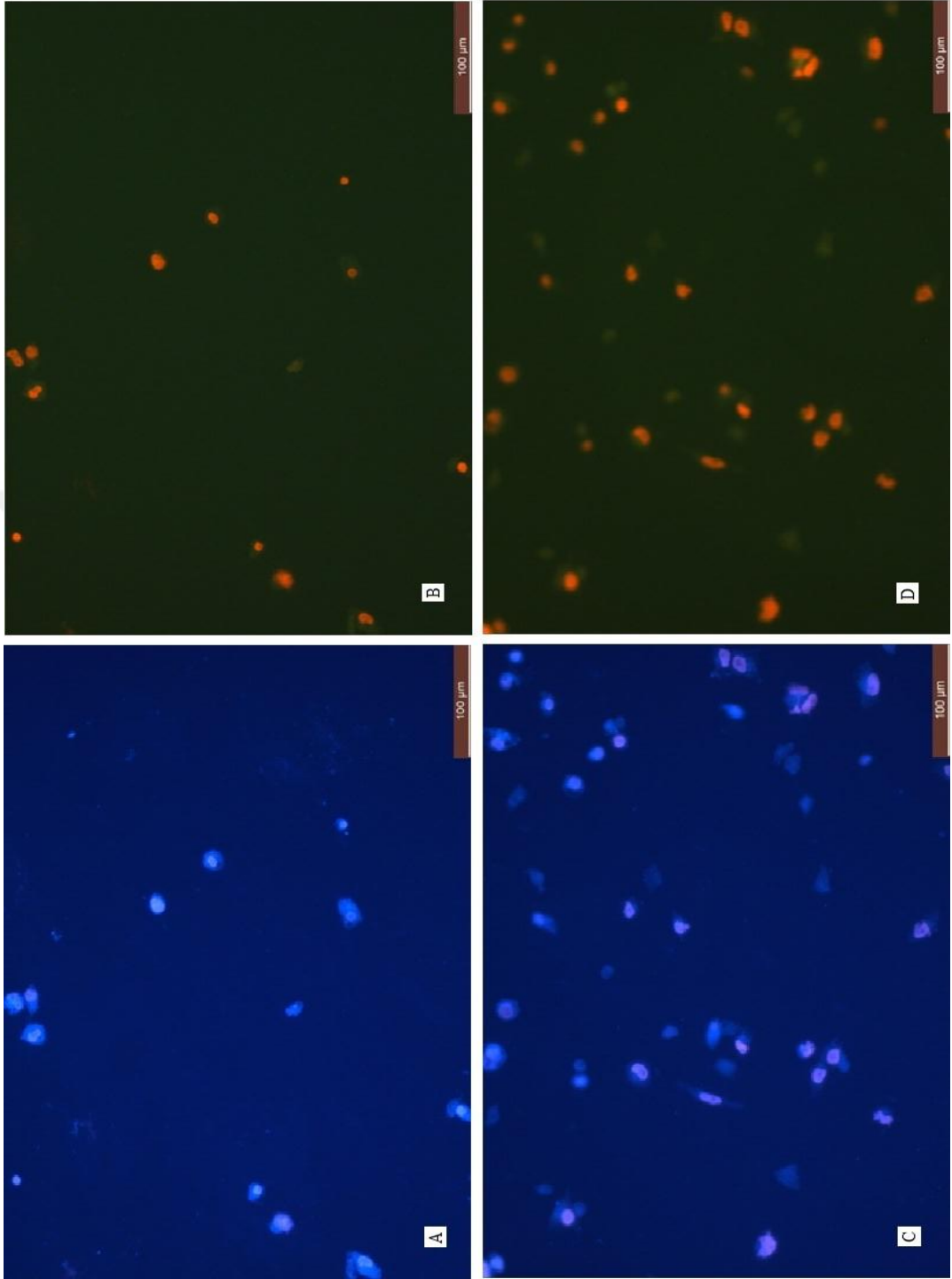
Şekil 3.19. 100 µg/ml (A,B) ve 200µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü



Şekil 3.20. 400 µg/ml (A,B) ve 800µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktı uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü

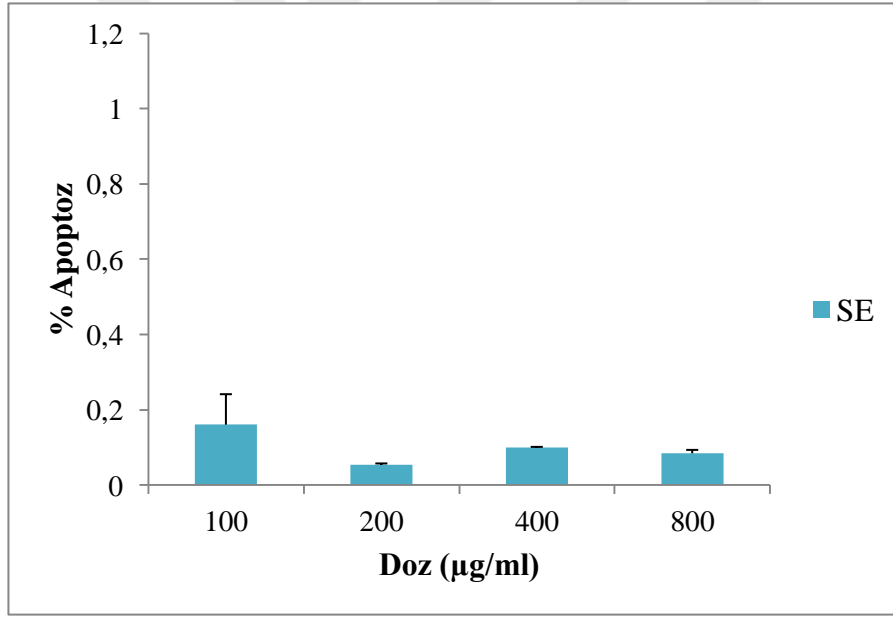


Şekil 3.21. 100 µg/ml (A,B) ve 200 µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü

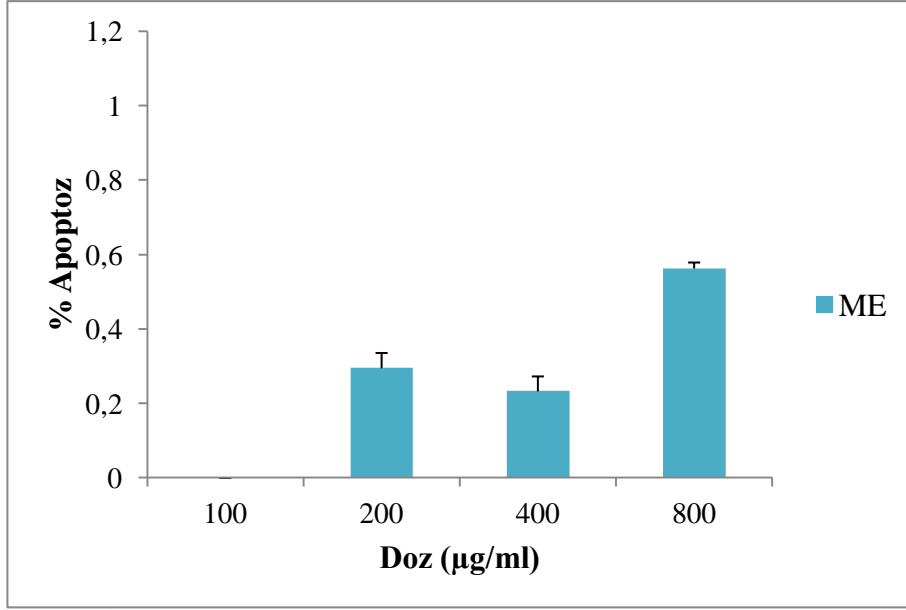


Şekil 3.22. 400 µg/ml (A,B) ve 800 µg/ml (C,D) mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle (10µM) kombine uygulamasında aynı alandaki hücrelerin DAPI (A,C) ve FITC (B,D) filtreleri ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü

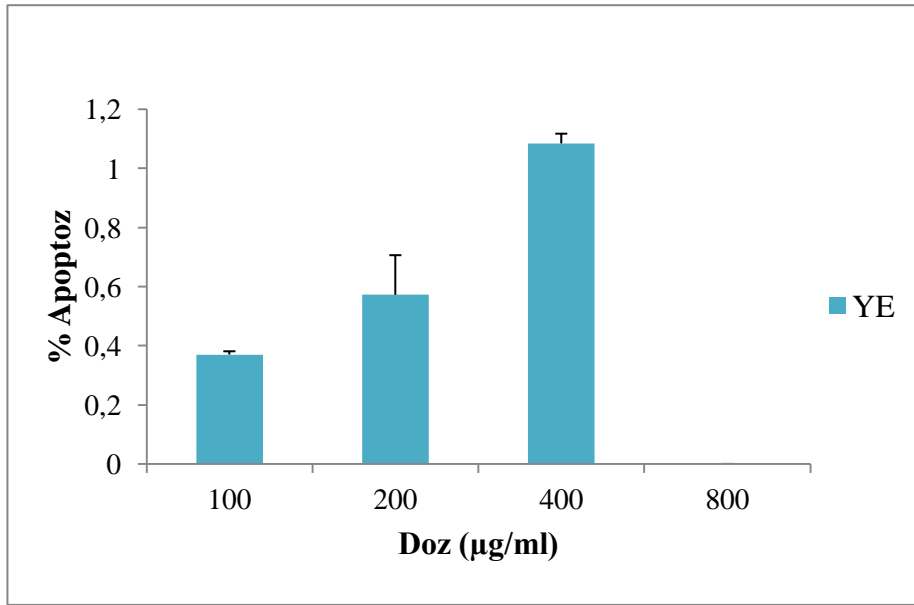
Elde edilen sonuçlara göre ekstrakt uygulamalarında dozlar arasındaki % apoptoz değerlerindeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). YE, ME, SE uygulamalarında gözlenen % apoptoz değerleri negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, uygulamalar pozitif kontrol ile karşılaştırıldıklarında % apoptoz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür (Çizelge 3.11, 3.13, 3.15). Ekstraktların doksorubisin ile kombine uygulamaları sonucunda ise herhangi bir apoptotik etkiye rastlanmamıştır (Çizelge 3.12, 3.14, 3.16).



Şekil 3.23. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim



Şekil 3.24. Mersin meyve ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim



Şekil 3.25. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz değerindeki değişim

3.3.2. Safran, Mersin Meyve ve Mersin Yaprak Ekstraktlarının Nekrotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

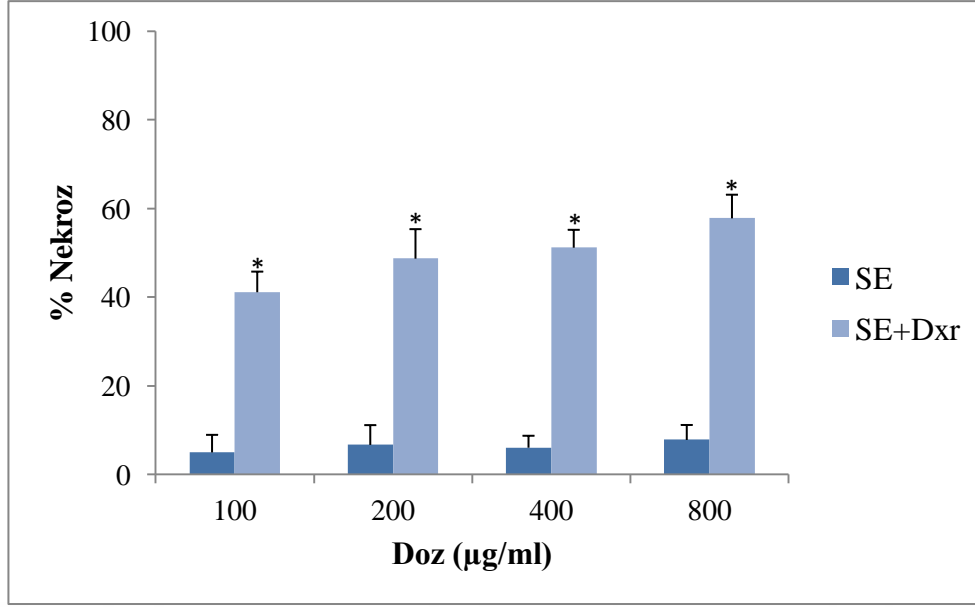
3.3.2.1. Safran Ekstraktının Nekrotik Etkisinin Değerlendirilmesi

Safran ekstraktı (SE) uygulamasından elde edilen verilere göre doz artıka % nekroz değerinde artış meydana geldiği görölmüştür (Şekil 3.26). Dozlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Kontrol uygulamaları ile karşılaştırıldığında SE uygulamasında gözlenen % nekroz değerlerinin kontrol ile aynı ya da yakın olduğu (Çizelge 3.11), aradaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.11. Safran ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	SE ₁	SE ₂	SE ₃	SE ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* (±2,365)	0,161# (±0,081)	0,054# (±0,004)	0,100# (±0,002)	0,085# (±0,009)
% Nekroz	5,000 (±0,123)	54,131* (±3,256)	5,018 (±3,966)	6,708 (±4,472)	6,081 (±2,695)	7,828 (±3,382)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark ($p<0,05$)



Şekil 3.26. Safran ekstraktının ayrı ve doksozürbisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim

*ekstrakt ile ekstrakt+dxr arasında anlamlı fark ($p < 0,05$)

Safran ekstraktı ve doksozürbisin (SE+Dxr) uygulamasında % nekroz değerinin doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 3.26).

Tüm dozlarda uygulamalar ile negatif kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). SE₄+Dxr dozunda pozitif kontrole göre % nekroz değeri daha yüksek bulunmuş (Çizelge 3.12) fakat iki uygulama arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

SE+Dxr uygulamasında tüm dozlarda % nekroz değerlerinin SE uygulamasına göre daha yüksek olduğu görülmüş, SE+Dxr uygulamasındaki % nekroz değerlerindeki artış $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.26). Tüm

dozlar için % nekroz değerlerinin negatif kontrole göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.12).

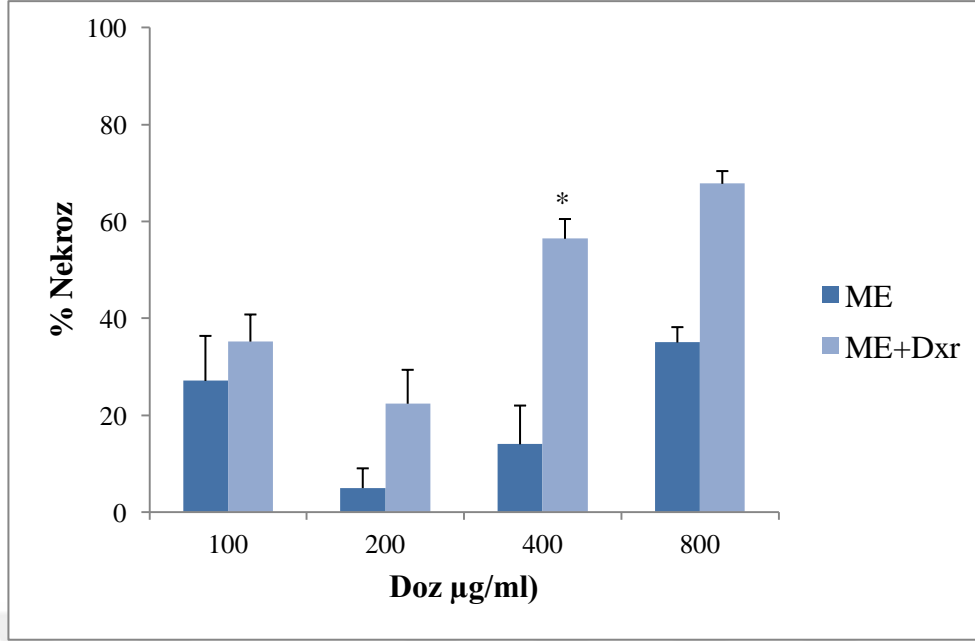
Çizelge 3.12. Safran ekstraktının doksorubisinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	SE ₁ +Dxr	SE ₂ +Dxr	SE ₃ +Dxr	SE ₄ +Dxr
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* (±2,365)	0	0	0	0
% Nekroz	5,000 (±0,123)	54,131* (±3,256)	41,148* (±4,654)	48,723* (±6,658)	51,197* (±4,033)	57,818* (±5,332)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark (p<0,05)

3.3.2.2. Mersin Meyve Ekstraktının Nekrotik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin meyve ekstraktı (ME) uygulamasından elde edilen veriler incelendiğinde ME₁ uygulamasında % 27 olan nekroz değerinin, ME₂ uygulamasında % 5'e düştüğü, daha sonraki konsantrasyonlarda doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.27). Dozlar arasındaki % nekroz değerlerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında ME uygulamalarında gözlenen değerlerin daha yüksek olduğu görülmüş (Çizelge 3.13), uygulanan dozlardan ME₄'deki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).



Şekil 3.27. Mersin meyve ekstraktının ayrı ve doksorubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim
*ekstrakt ile ekstrakt+dxr arasında anlamlı fark (p<0,05)

Çizelge 3.13. Mersin meyve ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* (±2,365)	0 [#]	0,295 [#] (±0,041)	0,233 [#] (±0,040)	0,563 [#] (±0,016)
% Nekroz	5,000 (±0,123)	54,131* (±3,256)	27,118 (±9,301)	5,003 (±4,082)	14,043 (±8,000)	35,048* (±3,180)

* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark (p<0,05)

Mersin meyve ekstraktı ve doksorubisin (ME+Dxr) uygulaması ile elde edilen verilere göre ME₁+Dxr dozunda % 35 olan nekroz değeri ME₂+Dxr konsantrasyonunda % 22'ye düşmüş daha sonraki konsantrasyonlarda doza bağlı olarak artmıştır (Çizelge 3.14). Bu uygulamada dozlar arasındaki % nekroz değerlerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p<0,05).

Çizelge 3.14. Mersin meyve ekstraktının doksorubinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	ME ₁ +Dxr	ME ₂ +Dxr	ME ₃ +Dxr	ME ₄ +Dxr
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* (±2,365)	0	0	0	0
% Nekroz	5,000 (±0,123)	54,131* (±3,256)	35,240* ^x (± 5,597)	22,417 ^x (±7,000)	56,456* ^x (±4,086)	67,798* ^x (±2,639)

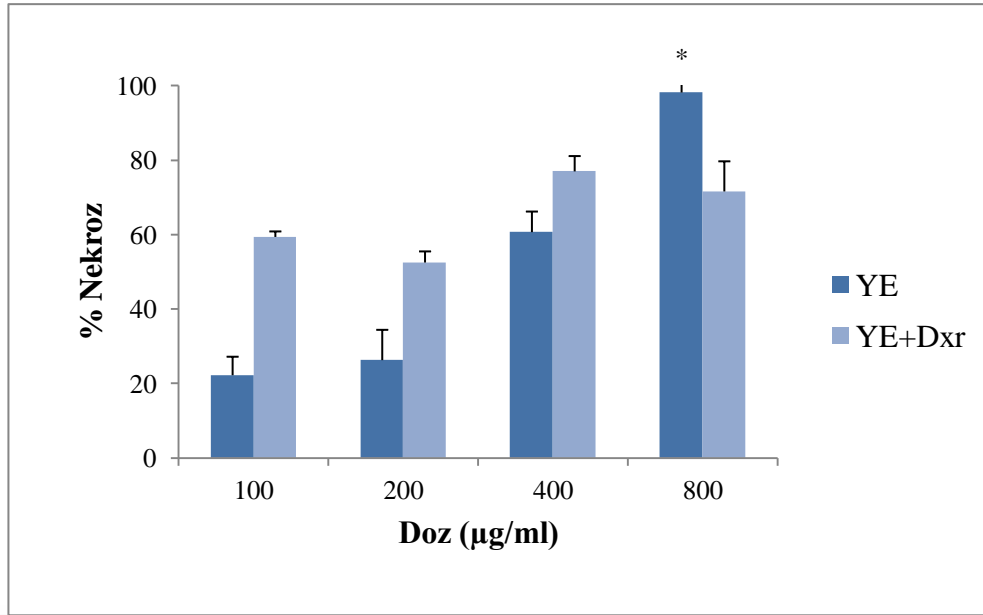
* negatif kontrole göre anlamlı fark , # pozitif kontrole göre anlamlı fark, x dozlar arasında anlamlı fark (p<0,05)

Negatif kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında tüm dozlar için % nekroz değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüş (Çizelge 3.14), ME₁+Dxr, ME₃+Dxr ve ME₄+Dxr dozlarında % nekroz değerlerindeki artış istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında ME₃+Dxr ve ME₄+Dxr dozlarında gözlenen % nekroz değerleri daha yüksek olmakla birlikte (Çizelge 3.14) bu uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı saptanmıştır (p > 0,05).

ME uygulaması ile karşılaştırıldığında tüm dozlar için % nekroz değerlerinin ME+Dxr uygulamasında daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 3.27). Yapılan uygulamalarda sadece ME₃ ve ME₃+Dxr konsantrasyonları arasındaki fark p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.27).

3.3.2.3. Mersin Yaprak Ekstraktının Nekrotik Etkisinin Değerlendirilmesi

Mersin yaprak ekstraktı (YE) uygulamasında elde edilen verilere göre % nekroz değerlerinin doza bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 3.28). Dozlar arasındaki % nekroz değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Tüm dozlarda % nekroz değerlerinin negatif kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 3.15). YE₂, YE₃ ve YE₄ dozları ile negatif kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). YE₃ ve YE₄ dozlarında gözlenen % nekroz değerlerinin pozitif kontrol uygulamasında gözlenen değerden daha yüksek olduğu görülmüş fakat bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Çizelge 3.15).



Şekil 3.28. Mersin yaprak ekstraktının ayrı ve dokсорubisinle kombine uygulamalarında dozlara göre % nekroz değerlerindeki değişim.

*ekstrakt ile ekstrak+dxr arasında anlamlı fark (p<0,05)

Çizelge 3.15. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	YE ₁	YE ₂	YE ₃	YE ₄
Doz (µg/ml)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* (±2,365)	0,370# (±0,011)	0,572# (±0,134)	1,084# (±0,033)	0#
% Nekroz	5,000 (±0,123)	54,131* (±3,256)	22,292 ^x (±4,978)	26,347* ^x (±8,145)	60,732* ^x (±5,535)	98,25* ^x (±8,583)

* negatif kontrole göre anlamlı fark, # pozitif kontrole göre anlamlı fark, x dozlar arasında anlamlı fark (p<0,05)

Mersin yaprak ekstraktı ve doksorubisin (YE+Dxr) uygulaması ile elde edilen veriler incelendiğinde tüm dozlarda, % nekroz değerinde negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) görülmüştür (Çizelge 3.16). Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında YE_1+Dxr , YE_3+Dxr ve YE_4+Dxr dozlarında daha yüksek % nekroz değerleri gözlenmekle birlikte (Çizelge 3.16) uygulamalar ile pozitif kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p> 0,05$).

Çizelge 3.16. Mersin yaprak ekstraktının doksorubisinle kombine uygulamasında dozlara göre % apoptoz ve % nekroz değerleri

Uygulama	(-) kontrol	(+) kontrol	YE_1+Dxr	YE_2+Dxr	YE_3+Dxr	YE_4+Dxr
Doz ($\mu g/ml$)	-	0,5	100	200	400	800
% Apoptoz	0	17,790* ($\pm 2,365$)	0	0	0	0
% Nekroz	5,000 ($\pm 0,123$)	54,131* ($\pm 3,256$)	59,444* ($\pm 1,483$)	52,571* ($\pm 2,986$)	77,050* ($\pm 4,123$)	71,665* ($\pm 8,098$)

* negatif kontrole göre anlamlı fark, # pozitif kontrole göre anlamlı fark ($p<0,05$)

YE_1+Dxr , YE_2+Dxr , YE_3+Dxr dozlarında, YE_1 , YE_2 ve YE_3 dozlarına göre daha yüksek % nekroz değerleri saptanmış (Şekil 3.28), fakat uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). YE_4+Dxr dozunda saptanan % nekroz değerinin YE_4 dozundakinden daha düşüktür olduğu (Şekil 3.28) ve bu dozlar arasındaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İnsanlar günlük hayatta sindirim, solunum, temas yolları ile direkt ya da dolaylı olarak birçok genotoksik maddeye maruz kalmaktadır. Çeşitli genotoksinler bazen çevre şartlarının da olumsuz etkileriyle birleşerek genetik materyalde onarılamayan hasarlara yani mutasyonlara neden olmaktadır. Mutasyonların zamanla vücutta birikimi yaşlanma, kanser, kalp damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıkların gelişimi gibi sonuçlara neden olmaktadır (Kennedy vd., 2012; Poduri vd., 2013).

Yapılan araştırmalarda birçok bitki ve bitki bileşeninin, genotoksik maddelerin olumsuz etkilerini önleyebilecek ya da azaltabilecek antijenotoksik etki potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Dias vd., 2009; Munari vd., 2014; Guterres vd., 2015; Amkiss vd., 2013; Khalil vd., 2015; Sadeghnia vd., 2013). Antijenotoksik etkilerinin yanısıra insan sağlığı için başka yararlı özellikleri de yapılan çalışmalarla gösterilmiş olan bitki ve bitki bileşenleri, aroma ve renk verme, oksidasyonu önleme gibi amaçlarla gıdalarda doğal katkı maddesi olarak kullanılabilir, gıdalar bitkisel bileşenler kullanılarak fonksiyonel gıda haline getirilebilir. Bulduğumuz çağda eskiye nazaran insanların daha çok etkileşim içinde olduğu genotoksik maddelerin olumsuz etkilerinin, yararlı etkileri bilinen bitki ve bitki bileşenlerinin gıdalar yoluyla alımı ile tamamen yok edilemese de azaltılabileceği yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Singh vd., 2008; Adebola vd., 2013; Navarro vd., 2015; Ismail ve Sakr, 2016).

Bu çalışmada ülkemizde üretimi yapılan safran ve doğal olarak yetişen mersin bitkilerinin antigenotoksik ve antikarsinojenik etkileri SMART, MTT ve floresan mikroskopi yöntemleri ile in vivo ve in vitro ortamda değerlendirilmiştir. Çalışmada safran bitkisinin baharat olarak kullanılan stigma ve stilus kısımları ile mersin bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır.

Bu çalışmada uygulanan SMART, MTT ve floresan mikroskopi yöntemi sonuçlarına göre;

1. Safran, mersin meyve ve mersin yaprak ekstraktları uygulanan dozlarda *Drosophila melanogaster* üzerinde genotoksik etkiye neden olmamışlardır.
2. Ekstraktların doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etkilerinin *Drosophila melanogaster* üzerinde değerlendirmesi sonucunda test edilen tüm dozlarda doksorubisin tarafından indüklenen genotoksik etkiyi inhibe edici etki gösterdikleri ve bu etkilerinin doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır.
3. Antigenotoksik etkinin göstergesi olan inhibisyon oranları incelendiğinde mersin yaprak ekstraktına ait inhibisyon değerlerin diğer ekstraktlarla elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Mersin yaprak ekstraktının denemelerde kullanılan en düşük dozu (1 mg/ml) ile elde edilen antigenotoksik etkinin mersin meyve ve safran ekstraktlarının

kullanılan en yüksek dozları (10 mg/ml) ile elde edilen antigenotoksik etkiden daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

4. Ekstraktların test edilen dozları arasında en yüksek antigenotoksik etki mersin yaprak ekstraktının 10 mg/ml dozunda (% 98) gözlenmiştir. Antigenotoksik etkinin en düşük olduğu uygulama ise safran ekstraktının 1 mg/ml dozu (% 78) olmuştur.
5. Her üç ekstrakt da uygulanan dozlarda DLD-1 (insan kolon kanseri) hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermiştir.
6. Mersin yaprak ekstraktı uygulamasında 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarında, safran ekstraktı ve mersin meyve ekstraktı uygulamalarında tüm dozlarda gözlenen sitotoksik etkinin, doksorubisinin gösterdiği sitotoksik etkiden daha yüksek olduğu saptanmıştır.
7. Mersin yaprak ekstraktının 800 µg/ml, mersin meyve ekstraktının 400 µg/ml ve 800 µg/ml, safran ekstraktının 800 µg/ml dozlarında sitotoksosite değeri % 50'den yüksek bulunmuştur.
8. Ekstraktların ayrı uygulanması ile en yüksek sitotoksosite değeri safran ekstraktının 800 µg/ml dozunda (% 58), en düşük sitotoksosite değeri mersin yaprak ekstraktının 100 µg/ml dozunda (% 12) gözlenmiştir.

9. Mersin yaprak, mersin meyve ve safran ekstraktları doksorubisin ile birlikte DLD-1 hücre hattına uygulandıklarında, mersin yaprak ekstraktının 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarında, mersin meyve ve safran ekstraktlarının tüm dozlarında sitotoksik etki gözlenmiştir.
10. Kombine uygulamalar pozitif kontrol ile kıyaslandığında mersin yaprak ekstraktının 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarının, mersin meyve ekstraktının 100 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarının, safran ekstraktının tüm dozlarının doksorubisinden (daha yüksek sitotoksik etkiye neden olduğu görülmüştür.
11. Ekstraktlarla kombine uygulama sonucunda 100 µg/ml mersin yaprak ekstraktını uygulaması dışında doksorubisinin DLD-1 hücre hattı üzerinde olan sitotoksik etkisinde herhangi bir azalma meydana gelmediği saptanmıştır.
12. Ekstraktların nekrotik etkilerinin incelenmesi sonucunda mersin yaprak ekstraktının 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozları ile mersin meyve ekstraktının 800 µg/ml dozunda nekrotik etki gözlenmiştir. Safran ekstraktı uygulamasında ise nekrotik etkiye rastlanmamıştır.
13. Ekstraktların ayrı uygulanması ile en yüksek nekroz değeri mersin yaprak ekstraktının 800 µg/ml dozunda (%98) gözlenmiştir. Mersin yaprak

ekstraktının 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarında %nekroz değerinin doksorubisine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

14. Nekroz değerinin en düşük olduğu uygulamalar ise safran ekstraktının 100 µg/ml dozu ile mersin meyve ekstraktının 200 µg/ml dozu (% 5) olmuştur.

15. Ekstraktlar doksorubisinle birlikte uygulandıklarında mersin yaprak ekstraktı uygulamasında tüm dozlarda, mersin meyve ekstraktı uygulamasında 100 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml dozlarında nekrotik etki gözlenmiştir. Safran ekstraktı ayrı uygulandığında nekrotik etki saptanmazken doksorubisin ile birlikte uygulandığında, tüm dozlarda nekrotik etki meydana geldiği görülmüştür.

16. 800 µg/ml mersin yaprak ekstraktı uygulaması dışındaki tüm kombine uygulamalarda % nekroz değerinin yalnızca ekstrakt uygulamalarına göre arttığı görülmüştür.

17. Ekstraktların doksorubisin ile birlikte uygulanması ile 200 µg/ml mersin meyve ekstraktı uygulaması dışında doksorubisinin DLD-1 hücre hattı üzerinde olan nekrotik etkisinin azalmadığı saptanmıştır.

18. Ekstraktların doksorubisin ile birlikte uygulanmaları sonucu en yüksek nekroz değeri mersin yaprak ekstraktının 400 µg/ml dozunda (% 77), en

düşük nekroz değeri ise mersin meyve ekstraktının 200 µg/ml dozunda (% 22) dozunda gözlenmiştir.

19. Ekstraktların hem ayrı hem de doksorubisinle kombine olarak uygulanması ile DLD-1 hücre hattı üzerinde herhangi bir apoptotik etkiye rastlanmamıştır.

20. Ekstraktların doksorubisinle kombine uygulamaları sonucu elde edilen apoptoz değerleri doksorubisin uygulaması ile elde edilen değerle karşılaştırıldığında, ekstraktların doksorubisinin apoptotik etkisini engellediği gözlenmiştir.

21. Elde edilen verilere göre kombine uygulamalar sonucunda doksorubisin uygulamasına göre, DNA ve mitokondri hasarına bağlı apoptotik hücre ölümü engellenirken, sitoplazma zarı hasarına bağlı nekrotik etki artmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda (Hayder vd., 2003, 2004, 2008a; Khalil vd., 2015; Hosseinzadeh vd., 2008; Premkumar vd., 2003) canlı sistemlerde çeşitli genotoksinlere karşı antigenotoksik etkileri gösterilen safran ve mersin ekstraktlarının bu çalışma ile *Drosophila melanogaster* üzerinde doksorubisine karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan literatür taramasında safran, mersin yaprak ve mersin meyvesinin etanol ekstraktlarının antigenotoksik etkilerinin

Drosophila melanogaster'de SMART ile değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ekstraktların doksorubisinin genotoksik etkisine karşı antigenotoksik etkilerinin değerlendirmesi sonucunda test edilen tüm dozlarda doksorubisin tarafından indüklenen genotoksik etkiyi inhibe edici etki gösterdikleri ve bu etkilerinin doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre uygulanan üç ekstraktan en yüksek antigenotoksik etkiye sahip olanın mersin yaprak ekstraktı olduğu görülmüştür. Daha önce yürütülen araştırmalarda mersin bitkisinin antigenotoksik özellikte oldukları bilinen flavonoidlerce zengin olduğu saptanmıştır (Amensour vd., 2010; Sumbul vd., 2011). Bu veriye göre mersin yaprak ekstraktının çalışmamızda gözlenen yüksek antigenotoksik etkisinin nedeni flavonoid içeriğinin yüksek oluşu ile açıklanabilir. Amensour vd. (2010) alışmalarında mersin bitkisinin yaprak kısmının flavonoid içeriğinin meyve kısmına göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu sonuç da çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle uyurmaktadır. Verilerimize göre mersin yaprak ekstraktı uygulamasında mersin meyve ekstraktı uygulamasına göre daha yüksek antigenotoksik etki saptanmıştır.

Mersin yaprak, mersin meyve ve safran ekstraktlarının DLD-1 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkilerinin incelenmesi sonucunda her üç ekstraktın sitotoksik etki gösterdiği, mersin yaprak ve meyve ekstraktlarının nekrotik etki gösterirken, safran ekstraktının göstermediği gözlenmiştir. Ayrıca ekstraktların apoptotik etkilerinin incelenmesi sonucunda her üç ekstraktın da DLD-1 hücre hattı üzerinde apoptotik etkilerinin olmadığı görülmüştür. Yapılan literatür taraması sonucunda mersin meyve, mersin yaprak ve safranın etanol ekstraktlarının DLD-1 hücre hattı

üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte safran ekstraktının başka kolon kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkilerinin değerlendirildiği, çalışmalar mevcuttur. Tuberoso vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada safran ekstraktının Caco-2 (insan kolon kanseri) hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada safran ekstraktının sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi değerlendirilmiş, ekstrakt 10 µl/ml dozunda 48 saat süre ile uygulandığında hücre canlılığında % 30, 50 µl/ml dozunda 24 saat süre ile uygulandığında hücre canlılığında % 32 azalma meydana geldiği görülmüştür. Çalışmamızda safran ekstraktının uygulanan dozlarının daha yüksek olduğu fakat, DLD-1 hücreleri üzerinde daha kısa uygulama süresi sonunda daha yüksek sitotoksik etki gösterdikleri görülmektedir. Aung vd. (2007) safran ekstraktı ve safranın ana bileşenlerinden krosini farklı tipteki kolon kanseri hücrelerine (HCT-116, SW-480, HT-29) uygulamış ve antiproliferatif etki gösterdiklerini saptamışlardır. Bu çalışmada safran ekstraktı uygulamasının en fazla HCT-116 hücre hattı üzerinde etkili olduğu, hücre gelişiminin 1 mg/ml dozunda % 45.5 ve 3 mg/ml dozunda % 6.8 oranında azaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda safran ekstraktının DLD-1 hücreleri üzerinde daha düşük dozlarda sitotoksik etki oluşumunu sağladığı görülmüştür. Safran ekstraktının izojenik HCT116 hücre hatları (HCT116 p53+/+ ve HCT116 p53-/-) üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmada ekstraktın uygulanan doza ve zamana bağlı olarak HCT116 hücrelerinde çoğalmayı engellediği gösterilmiştir. Uygulanan dozlar arasında en etkili sonuçlar 2 ve 4 mg/ml olmuştur (Bajbouj vd., 2012).

Safran ekstraktının farklı kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelendiği bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında, çalışmamızda safran ekstraktının

DLD-1 hücre hattı üzerinde gösterdiği sitotoksik etki ve etkili dozlar bakımından farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu durum hücre hatlarının farklılığından kaynaklanabileceği gibi, uygulanan ekstraktlardaki bileşenlerin farklı oluşundan da kaynaklanabilir. Birçok araştırmada yetiştikleri coğrafik ve mevsimsel koşulların yanı sıra depolama koşulları ve sürelerinin dahi bitkilerin içerdikleri bileşenlerin oranlarında değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir (Masi vd., 2016; Angioni ve Schirra, 2011; Mulas vd., 2013; Morales vd., 2014; Shokoohinia vd., 2014; Settanni vd., 2014).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre antigenotoksik ve sitotoksik etkileri belirlenen mersin ve safranın ekstraktlarının bu etkileri içeriklerindeki flavonoid ve karotenoid oranlarının yüksek olmasından kaynaklanmış olabilir. Flavonoid ve karotenoidlerle daha önce yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin antioksidan, antigenotoksik, antiinflamatuvar etki gösterdiği, hücre döngüsünün durdurulması, anjiyogenezin engellenmesi, apoptozun indüklenmesi, karsinogenik maddenin inaktivasyonu, tümör hücrelerinin gelişiminin ve kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesi gibi mekanizmalarla antikarsinogen etki yarattığı bildirilmiştir (Abdullaev vd., 2003; Assimopoulou vd., 2005; Hosseinzadeh vd., 2005,2008; Aung vd., 2007; Luo vd., 2008; Karimi vd., 2010; Chahar, 2011; Chen ve Chen, 2013; Yao vd., 2014; Rajendran vd., 2014; Kim vd., 2015; Tanaka vd., 2015; Kawabata vd., 2012). Mersin ve safran bitkilerinde de bulunduğu bildirilen bir flavonoid olan kaempferol ile yapılan çalışmalar bu bileşenin besin yoluyla alındığında kanser başta olmak üzere, kronik hastalıklara yakalanma riskini azalttığını göstermiştir (Chen ve Chen, 2013).

Bu çalışmada yürütülen antigenotoksisite araştırmasında uygulanan ekstraktlardan etkisi en yüksek olanın mersin yaprak, etkisi en düşük olanın safran iken, sitotoksisite araştırmasında safran ekstraktının en yüksek etkiye, yaprak ekstraktının ise en düşük etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç; mersin yaprak ekstraktındaki bileşiklerin antigenotoksik aktivitelerinin sitotoksik aktivitelerinden daha yüksek oluşu, safran ekstraktındaki bileşiklerin sitotoksik etkilerinin antigenotoksik etkilerinden daha yüksek oluşu, her iki ekstrakttaki bileşenlerin antigenotoksisite araştırmasında birlikte kullanıldıkları doksorubisin ile etkileşimlerinin farklı olması, antigenotoksisite araştırmasının canlı sistemde yürütülürken, sitotoksisite çalışmasının hücresel olarak yürütülmesi gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Doksorubisin birçok kanser çeşidinin tedavisinde oldukça sık kullanılan bir kemoterapik ilaçtır. Bu çalışmada ülkemizde yetişen ve üretimi yapılan, çeşitli etkileri nedeniyle halk tarafından kullanılan mersin ve safran bitkilerinin antikarsinojenik etkilerinin değerlendirilmesi esnasında doksorubisin ile olan etkileşimleri de incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre safran, mersin meyve ve mersin yaprak ekstraktlarının kombine uygulamalar sonucunda doksorubisinin DLD-1 hücre hattı üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiyi azaltmadığını, bazı dozlarda daha da arttırdığını söylemek mümkündür. Ayrıca ekstraktların birlikte uygulandığında doksorubisinin apoptotik etkisini engellerken, nekrotik etkisini arttırdığı saptanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışma ile de antigenotoksik ve kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri saptanan safran ve mersin bitkileri

baharat, gıda, çay gibi tükretim yollarının yanısıra, bu bitkilerden elde edilen ekstraktlar gıda katkı maddesi (renklendirme, aroma verme, antioksidan özellik kazandırma vb.) olarak da kullanılabilir. Hazır gıdaların hemen hepsinde bulunan sentetik gıda katkı maddelerinin yerine doğal bitki ekstraktlarının kullanıma sunulmasıyla insanlarda gıda kaynaklı kimyasalların vücuda alımı indirgenerek bu kimyasalların insanlardaki zararlı etkileri azaltılabilir. Gıdalarda sentetik gıda katkı maddelerine alternatif olarak, antijenotoksik ve antioksidan etkileri olan doğal katkı maddelerinin kullanılması ile özellikle genç nesilde mutasyon birikimi azaltılabilir, bu yolla mutasyon kaynaklı hastalıkların ortaya çıkışı geciktirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdullaev, F.I., Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicology Letters*, 70(2): 243-251, 1994.
- Abdullaev, F.I., Riverón-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Manuel Hernández, J., Pérez-López, I., Pereda-Miranda, R., Espinosa-Aguirre, J.J., Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicol In Vitro*, 17(5-6): 731-736, 2003.
- Abdullaev, F.I., Espinosa-Aguirre, J.J., Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention*. 28, 426-432, 2004.
- Aboel-Zahab, H., El-Khyat, Z., Sidhom, G., Awadallah, R., Abdel-Al, W., Mahdy, K., Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Bollettino chimico farmaceutico*, 136(10): 615-627, 1997.
- Abraham, S.K., Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*, 9, 383-386, 1994.
- Abrahamson, S., Lewis, E.B., The detection of mutations in *Drosophila melanogaster*, In the *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. 2,A. Hollaender, Ed. Plenum Press, New York, 1971.

Adebola, O., Corcoran, O., Morgan, W. A., Protective effects of prebiotics inulin and lactulose from cytotoxicity and genotoxicity in human colon adenocarcinoma cells. *Food research international*, 52(1), 269-274, 2013.

Agarwal, N., Majee, C., Chakraborty, G.S., Natural Herbs as Anticancer Drugs. *International Journal of PharmTech Research*, 4(3): 1142-1153, 2012.

Ahmad, M.K., Naqshbandi, A., Fareed, M., Mahmood, R., Oral administration of a nephrotoxic dose of potassium bromate, a food additive, alters renal redox metabolic status and inhibits brush border membrane enzymes in rats. *Food Chemistry* 134, 980-985, 2012.

Akhondzadeh, S., Fallah-Pour, H., Afkham, K., Jamshidi, A.H., Khalighi-Cigaroudi, F., Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial. *BMC Complement Altern Med*, 4, 1-5, 2004.

Alipour, G., Dashti, S., Hosseinzadeh, H., Review of Pharmacological Effects of *Myrtus communis* L. and its Active Constituents, *Phytotherapy Research*. 28(8): 1125-1136, 2014.

Amensour, M., Sendra, E., Abrini J., Pérez-Alvarez, J.A., FernándezLópez, J., Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts, *Journal of Food*, 8, 2, 95-101, 2010.

Amin, K.A., Hameid, H.A., Elsttar, A.H.A., Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10): 2994-2999, 2010.

Amira, S., Dade, M., Schinella, G., Rios, J.L., Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 25(1): 65-72, 2012.

Amkiss, S., Dallouh, A., Idaomar, M., Amkiss, B., Genotoxicity and anti-genotoxicity of fennel plant (*Foeniculum vulgare* Mill) fruit extracts using the somatic mutation and recombination test (SMART). *African Journal of Food Science*, 7(8): 193-197, 2013.

Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal B.B., Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes *Pharmaceutical Research*, 25, 9, 2008.

Angioni, A., Schirra, M., Long-term frozen storage impact on the antioxidant capacity and chemical composition of Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) berries. *J. Agric. Sci. Technol. B*, 1, 1168-1175, 2011.

Anonim, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm> Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 30.06.2013. (Erişim tarihi:07.05.2014).

Anonim a, *Drosophila melanogaster*: Genetic Portrait of the Fruit Fly, Reference D.

<http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/007352526x/873551/Reference>

[D.pdf](#) (Erişim tarihi: 19.08.2015)

Anonim b, <http://www.ukfoodguide.net> (Erişim tarihi: 03.02.2015)

Antunes, L.M.G., Bueno, R.B.L., Dias, F.L., Bianchi, M.L.P., Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutat Res* 626, 155-161, 2007.

Arcamone, F., Doxorubicin Anticancer Antibiotics. In the *Medicinal Chemistry*, 17, Academic Press, New York, 1981.

Arsova-Sarafinovska, Z., Eken, A., Matevska, N., Erdem, O., Sayal, A., Savaser, A., Banev, S., Petrovski, D., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Özgök, Y., Suturkova, L., Dimovski, A.J., Aydın A., Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin. Biochem.*, 42, 1228-1235, 2009.

Ashburner, M., Roote, J. Laboratory Culture of *Drosophila*. In the *Drosophila Protocols* (eds. Sullivan W., Ashburner M., Hawley R.S.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2000.

Ashida, H., Hashimoto, T., Tsuji, S., Kanazawa, K., Danno, G., Six food coloring agents have cytotoxic effects and amplify the toxicity of a chemical in a rat model of liver impairment. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 46(3): 130-136, 2000.

Assimopoulou, A.N, Sinakos, Z, Papageorgiou, V.P., Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother. Res.*, 19(11): 997-1000, 2005.

Aung, H.H., Wang, C.Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S.R., Xie, J.T., Shoyama, A.Y., Yuan, C.S., Crocin from *Crocus Sativus* Possesses Significant AntiProliferation Effects on Human Colorectal Cancer Cells. *Exp. Oncol.*, 29(3): 175-180, 2007.

Baba, S.A., Malik, A.H., Wani, Z.A., Mohiuddin, T., Shah, Z., Abbas, N., Ashraf, N., Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast. *South African Journal of Botany*, 99, 80-87, 2015.

Bajbouj, K., Schulze-Luehrmann, J., Diermeier, S., Amin, A., Schneider-Stock, R., The anticancer effect of saffron in two p53 isogenic colorectal cancer cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1): 69, 2012.

Barboni, T., Cannac, M., Massi, L., Perez-Ramirez, Y., Chiaramonti, N., Variability of polyphenol compounds in *Myrtus Communis* L. (Myrtaceae) berries from Corsica. *Molecules*, 15, 7849-7860, 2010.

Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., Costa, A.S.G., Santos-Buelga, C., Floral bio-residues of *Crocus sativus* L. as a potential source of anthocyanins. Livro de Resumos do XX Encontro Luso-Galego de Quimica, Porto, Portugal, 26 A 28 Novembro, 2014.

Basu, A., Kumar, G.S., Interaction of toxic azo dyes with heme protein: Biophysical insights into the binding aspect of the food additive amaranth with human hemoglobin. *Journal of Hazardous Materials*, 289, 204-209, 2015.

Bathaie, S.Z., Mousavi, S.Z., New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50, 761-786, 2010.

D., Blaesius D., Elucidation of molecular mechanisms of apoptosis induction by myrtucommulone from *Myrtus communis*. Dissertation. Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, 2009.

Bolhassani, A., Khavari, A., Bathaie, S.Z., Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(1): 20-30, 2014.

Brieger, K., Schiavone, S., Miller, Jr. F.J., Krause, K.H., Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.*, 142, 2012.

Broughton, S., Alic, N., Slack, C., Bass, T., Ikeya, T., Vinti, G., Tommasi, A.M., Driege, Y., Hafen, E., Partridge, L., Reduction of DILP2 in *Drosophila* triages

a metabolic phenotype from lifespan revealing redundancy and compensation among DILPs, PLoS One, 3(11): e3721, 2008.

Budak, F.A., Çakır Arıca, Ş., The Detection of the Deltamethrin and Permethrin By Somatic Mutation And Recombination Test With *Drosophila Melanogaster*. Gazi Üniversitesi Eğitim Fak. Dergisi, 6(1): 87-93, 2005.

Büyüklü, M., Kandemir, F.M., Özkaraca, M., Set, T., Bakırcı, E.M., Topal, E., İleriturk, M., Türkmen, K., Benefical effects of lycopene against contrast medium-induced oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis in rat kidney. Hum. Exp. Toxicol., 34(5): 487-496, 2015.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Internatl Microbiol, 3, 3-8, 2000.

Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W., Regulation of cancer cell metabolism. Natur Review Cancer, 11(2): 85-95, 2011.

Carmona, E.R., Escobar, B., Vales, G., Marcos, R., Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 778, 12-21, 2015.

Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P., Joshi, Y.C., Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs, Pharmacogn. Rev., 5, 1-12, 2011.

Champalab, K.D., Nilakshi, N., Vijay, G.R., Abhyankar, M.M., Detailed profile of *Crocus sativus*. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.*, 2, 531-540, 2011.

Chen, A.Y., Chen, Y.C., A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138(4): 2099-2107, 2013.

Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., García-Gonzalo, D., Rafael Pagan, Laglaouia, A., Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *J. Sci. Food Agric.*; 94, 1197-1204, 2014.

Ciofani, G., Danti, S., D'Alessandro, D., Moscato, S., Menciassi, A., Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: interference with the MTT assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(2): 405-411, 2010.

Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., Zarzuelo, A., *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *European Journal of Immunology*, 35(2): 584-592, 2005.

Costa, W.F., Nepomuceno, J.C., Protective Effects of a Mixture of Antioxidant Vitamins and Minerals on the Genotoxicity of Doxorubicin in Somatic Cells of

Drosophila melanogaster. Environmental and Molecular Mutagenesis, 47, 18-24, 2006.

Coşkun, G., Özgür, H., Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv, 20, 145, 2011.

Çakır Arıca, Ş., Sarıkaya, R., Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. Food and Chemical Toxicology, 43, 443-450, 2006.

Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J., A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. Food and Chemical Toxicology 47, 837-847, 2009.

Dai, D., Chiao, Y.A., Marcinek, D.J., Szeto, H.H., Rabinovitch, P.S., Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. Longevity & Healthspan, 3(6): 1-22, 2014.

Danesi, C.C., Dihl, R.R., Bellagamba, B.C., de Andrade, H.H., Cunha, K.S., Guimarães, N.N., Lehmann, M., Genotoxicity testing of combined treatment with cisplatin, bleomycin, and 5-fluorouracil in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutat Res., 747(2): 228-233, 2012.

Dar, A.C., Das, T.K., Shokat, K.M., Cagan, R.L., Chemical genetic discovery of targets and anti-targets for cancer polypharmacology. *Nature*, 486(7401): 80-84, 2012.

Das, I., Chakrabarty, R.N., Das, S., Saffron Can Prevent Chemically Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 5, 70-76, 2004.

E., Demir, Ayçiçek ve Soya Yağlarının Kızartma ve Kaynatma Ürünlerinin *Drosophila Melanogaster*'de Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2011.

Demir, E., Turna, F., Vales, G., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., *In vivo* genotoxicity assessment of titanium, zirconium and aluminium nanoparticles, and their microparticulated forms, in *Drosophila* Chemosphere. 93(10): 2304-2310, 2013.

Denizot, F., Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Meth.*, 89, 271-277, 1986.

Denton, D., Nicolson, S., Kumar, S., Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation*, 19, 87-95, 2012.

Dias, C.D., Araújo, B.C., Dutra, E.S., Nepomuceno, J.C., Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genet. Mol. Res., 8(4): 1367-1375, 2009.

Diaz, A.M., Abeger, A., Study of the polyphenolic compounds present in alcoholic extracts of *Myrtus communis* L. seeds. An. Real Acad. Farm., 52, 541-546, 1986.

Dinçel, G.Ç., Kul, O., Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi; 5(1): 86, 2016.

Ding, X., Zhu, F.S., Li, M., Gao, S.G., Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. J. Ethnopharmacol. 139, 599-604, 2012.

Diop, S.B., Bisharat-Kernizan, J., Birse, R.T., Oldham, S., Ocorr, K., Bodmer, R., PGC-1/Spargel Counteracts High-Fat-Diet-Induced Obesity and Cardiac Lipotoxicity Downstream of TOR and Brummer ATGL Lipase. Cell Rep., 10(9): 1572-1584, 2015.

Dizdaroğlu, M., Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to Dna. Free Radical Biology & Medicine, 10, 225-242, 1991.

Dizdaroğlu, M., Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin Mutation Research. 275, 331-342, 1992.

Djenane, D., Yanguela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., Roncales, P.,
Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus*
globulus, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli*
O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci Technol Int*
17(6): 505-515, 2011.

Doak, S.H., Liu, Y., Chen, C., Genotoxicity and Cancer. In *Adverse Effects of*
Engineered Nanomaterials 1st ed., Edited by Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova
A. *Academic Press*, USA, pp. 243-261, 2012.

Dwivedi, K., Kumar, G., Genetic Damage Induced by a Food Coloring Dye (Sunset
Yellow) on Meristematic Cells of *Brassica campestris* L. *Journal of*
Environmental and Public Health, 1-5, 2015.

El Daly, E.S., Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella*
sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *Journal of Pharmacology*,
53, 93-95, 1998.

Elumalai, A., Eswariah, M.C., Herbalism – A Review, *International Journal of*
Phytotherapy. 2(2): 96-105, 2012.

Eren, Y., Özata, A., Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium*
globuliferum aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. *Brazilian*
Journal of Pharmacognosy, 24(1): 51-59, 2014.

Ermis, E., Hertel, C., Schneider, C., Carle, R., Stintzing, F., Schmidt, H., Characterization of in vitro antifungal activities of small and American cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L. and *V. macrocarpon* Aiton) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) concentrates in sugar reduced fruit spreads. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 111-117, 2015.

Escribano, J., Alonso, G.L., Coca-Prados, M., Fernández, J.A., Crocin, safranal and picocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 100, 23-30, 1996.

Fatehi, M., Rashidabady, T., Fatehi-Hassanabad, Z., Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure. *J. Ethnopharmacol.*, 84, 199, 2003.

Fernandes, F.H., Guterres, Z.R., Garcez, W.S., Lopes, S.M., Corsino, J., Garcez, F.R., Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Research International*, 62, 20-26, 2014.

Fernández, J-A, Pandalai, S., Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Res. Devel. Plant. Sci.*, 2, 127-159, 2004.

Ferreira, T., Prudêncio, P., Martinho, R.G., *Drosophila* protein kinase N (Pkn) is a negative regulator of actin–myosin activity during oogenesis. *Developmental Biology*, 394(2): 277-291, 2014.

- Fotakis, G., Timbrell, J.A., In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2): 171-177, 2006.
- Fragiorge, E.J., Spanó, M.A., Antunes, L.M.G., Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.*, 30, 449-455, 2007.
- Frei, H., Würigler, F.E., Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res*, 203(4): 297-308, 1988.
- Gabriel, K.C., Dihl, R.R., Lehmann, M., Reguly, M.L., Richter, M.F., de Andrade, H.H., Homologous recombination induced by doxazosin mesylate and saw palmetto in the *Drosophila* wing-spot test. *Journal of Applied Toxicology*, 33(3): 209-213, 2013.
- Garcia-Bellido, A., Merriam, J.R., Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 24: 61-87, 1971
- Gecit, İ., Aslan, M., Güneş, M., Pirinççi, N., Esen, R., Demir, H., Ceylan, K., Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(5): 739-743, 2012.

Ghasemi, M., Investigation of Compositions and Effect of Herbal Essential Oils Local *Silybum Marianum*, *Foeniculum Vulgare* and *Glycyrrhiza Glabra* on Cell Line of Stomach Cancer by MTT Assays in Ardabil, Iran. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 22(6): 166, 2015.

Ghnaya, A.B., Chograni,H., Messoud C., Boussaid,M., Comparative Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Myrtus communis* L. Essential Oils Isolated from Tunisian and Algerian Population. *J. Plant Pathol. Microb.* 4, 7, 2013.

Gismondi, A., Serio, M., Canuti, L., Canini, A., Biochemical, antioxidant and antineoplastic properties of Italian saffron (*Crocus sativus* L.), *Am. J. Plant Sci.* 3, 1573–1580, 2012.

Goli, A.H., Mokhtari, F., Rahimmalek, M., Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Saffron (*Crocus sativus* L.) Petal Sayed, *Journal of Agricultural Science*, 4, 10, 2012.

Goodman, M.F., Bessman, M.J., Bachur, N.R., Adriamycin and daunorubicin inhibition of mutant T4 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1193-1196, 1974.

Goodman, M.F., Lee, G.M., Adriamycin interactions with T4 DNA polymerase. *J Biol. Chem.*, 252, 2670-2674, 1977.

Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juan, H., Hall, J.V., Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis, 6, 153-188, 1984.

Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J., Würgler, F.E., Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res., 222, 359-373, 1989.

Graf, U., van Schaik, N., Würgler, F.E., *Drosophila* Genetics: A Practical Course. Springer-Verlag, 239 pp, 1992.

Graf, U., Abraham, S.K., Guzmán-Rincón, J., Würgler, F.E., Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res., 402(1-2): 203-209, 1998.

Guterres, Z.R., da Silva, A.F., Garcez, W.S., Garcez, F.R., Fernandes, C.A., Garcez, F.R., Mutagenicity and recombinogenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. Mutat Res., 18; 757(1): 91-96, 2013.

Guterres, Z.R., Zanetti, T.A., Sennes-Lopes, T.F. Gomes, da S.A.F., Genotoxic and Antigenotoxic Potential of *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) in the Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster*, Journal of Medicinal Food., 18(10): 1136-1142, 2015.

Gül, S., Demirci, B., Başer, K.H.C., Akpulat, H.A., Aksu, P., Chemical Composition and In Vitro Cytotoxic, Genotoxic Effects of Essential Oil

from *Urtica dioica* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88(5): 666-671, 2012.

Güleş, Ö, Eren, Ü., Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(2): 73-78, 2008.

Habibzadeh, K. S., Nemati, F., Shiravi, A., Cytotoxic effects of *Myrtus communis* extract on Hela and MCF 7 cancer cells. Journal of animal biology, 6(2): 21-28, 2014.

Haciseferoğulları, H., Özcan, M.M., Arslan, D., Ünver, A., Biochemical compositional and technological characterizations of black and white myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. J. Food Sci. Technol., 49, 82-88, 2012.

Halliwell, B., Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology, 141 (2): 312-322, 2006.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine. 5.ed.Oxford University Press, Oxford, 2015.

Hamed, A., Zarshenas, M.M., Sohrabpour, M., Zargar, A., Herbal medicinal oils in traditional Persian medicine. Pharmaceutical biology, 51(9): 1208-1218, 2013.

Han, X., Li, J., Brasky, T.M., Xun, P., Stevens, J., White, E., Gammon, M.D., He, K., Antioxidant Intake and Pancreatic Cancer Risk the Vitamins and Lifestyle (VITAL) Study. *Cancer*, 119(7): 1314-1320, 2013.

Hansen, B.M., Nielsen, E.S., Berg, K., Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* 119, 203-210, 1989.

Hasan, G.M., Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab J. Biotech.*, 13(1): 13-24, 2010.

Haselton, A., Sharmin, E., Schrader, J., Sah, M., Poon, P., Fridell, Y.W., Partial ablation of adult *Drosophila* insulin-producing neurons modulates glucose homeostasis and extends life span without insulin resistance. *Cell Cycle*, 9, 3063-3071, 2010.

Hayder, N., Kilani, S., Abdelwahed, A., Mahmoud, A., Meftahi, K., Chibani, J.B., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Antimutagenic activity of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis*. *Pharmazie*, 58, 523-524, 2003.

Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(1): 89-95, 2004.

Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay. *South African Journal of Botany*, 74(1): 121-125, 2008a.

Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariote A.M., Ghedira K., Dijoux-Franca M.G., Chekir-Ghedira, L., In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro*, 22(3): 567-581, 2008b.

He, J., Huang, B., Ban, X., Tian, J., Zhu, L., Wang, Y., In vitro and in vivo antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*. *J. Ethnopharmacol.*, 141(1): 104-110, 2012.

Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., McIntyre, C., Mittar, D., Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. Application Note. BD Biosciences, 2011.

Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M., Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol*, 2, 1-8, 2002.

Hosseinzadeh, H., Karimi, G., Niapoor, M., Antidepressant effects of *Crocus sativus* stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Acta Horti*, 650, 435-445, 2004.

Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ziaee, T., Danaee, A., Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 8(3): 387-393, 2005.

Hosseinzadeh, H., Abootorabi, A., Sadeghnia, H.R., Protective Effect of *Crocus sativus* Stigma Extract and Crocin (trans-crocin 4) on Methyl Methanesulfonate-Induced DNA Damage in Mice Organs, *Dna and Cell Biology*, 27, 1-8, 2008.

Hosseinzadeh, H., Modagheh, M.H., Saffari, Z., *Crocus Sativus* L. (Saffron) Extract and its Active Constituents (Crocin and Safranal) on Ischemia-Reperfusion in Rat Skeletal Muscle. *Advance Access Publication, Evidence based complementary and alternative medicine*, 6(3): 343-350, 2009.

Hosseinzadeh, H., Nassiri-Asl, M., Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and Saffron (*Crocus sativus*): A Review. *Phytotherapy Research* 27(4): 475-483, 2013.

Hyder, M.A., Hasan, M., Mohieldein, A.H., Comparative Levels of ALT, AST, ALP and GGT in Liver associated Diseases. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2): 280-284, 2013.

Ines, S., Ines, B., Wissem, B., Mohamed, B.S., Nawel, H., Dijoux-Franca, M.G., Kamel, G., Leïla, C.G., *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of 3,5-*O*-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H₂O₂. *Journal of Applied Toxicology*, 32(5): 333-341, 2012.

Islaih, M., Halstead, B.W., Kadura, I.A., Li, B., Reid-Hubbard, J.L., Flick, L., Altizer, J.L., Deahl, J.T., Monteith, D.K., Newton, R.K., Watson, D.E., Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutation Research* 578, 100-116, 2005.

Ismail, M. A., Sakr, S. M., Validation of Replacement of the Synthetic Food Dye'Sunset Yellow'-Induced Hepatotoxicity and Genotoxicity with the Nutraceutical'Curcumin'in Mice. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(1), 25-50, 2016.

Izgi, K., İskender, B., Jauch, J., Sezen, S., Çakır, M., Charpentier, M., Canatan, H., Sakalar, C., Myrtucommulone-A Induces both Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 29(9): 432-439, 2015.

İçöz, A., Demirkol, O., Çağrı Mehmetoğlu, A., Çeşitli Gıda Boyalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin MTS Testi Kullanılarak Belirlenmesi. *GIDA*, 33(6): 275-279, 2008.

Jabri, M.A., Rtibi, K., Tounsi, H., Hosni, K., Souli, A., El-Benna, J., Marzouki, L., Sakly, M., Sebai, H., Myrtle berry seed aqueous extract inhibits human neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *RSC Advances*, 5(80): 64865-64877, 2015.

Jayaraman, S., Manoharan, M.S., Illanchezian, S., In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1143-1149, 2008.

Jose, S., Jayesh, P., Mohandas, A., Philip, R., Singh, I. B., Application of primary haemocyte culture of *Penaeus monodon* in the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of heavy metals and pesticides. *Marine environmental research*, 71(3): 169-177, 2011.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Jaafar, H.Z., Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15(9): 6244-6256, 2010.

Kasapović, J., Pejić, S., Todorović, A., Stojiljković, V., Pajović, S.B., Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem. Funct.* 26, 723-730, 2008.

Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9, 527-549, 1970.

Katewa, S.D., Demontis, F., Kolipinski, M., Hubbard, A., Gill, M.S., Perrimon, N., Melov, S., Kapahi, P., Intramyocellular Fatty-Acid Metabolism Plays a Critical Role in Mediating Responses to Dietary Restriction in *Drosophila melanogaster*, *Cell Metabolism* 16(1): 97-103, 2012.

Kawabata, K., Tung, N.H., Shoyama, Y., Sugie, S., Mori, T., Tanak, T., Dietary crocin inhibits colitis and colitis-associated colorectal carcinogenesis in male ICR mice, *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–13, 2012.

Kaya, B., Marcos, R., Yanıkoğlu, A., Creus, A., Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, 557, 53-62, 2004.

Kedik, S.A., Yartsev, E.I., Stanishevskaya, I.E., Antiviral activity of dried extract of Stevia. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 43(4): 198-199, 2009.

Keizer, H.G., Pinedo, H.M., Schuurhuis, G.J., Joenje, H., Doxorubicin (adriamycin):
A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity.
Pharmacol Ther 47, 219-231, 1990.

Kennedy, S.R., Loeb, L.A., Herr, A.J., Somatic mutations in aging, cancer and
neurodegeneration. Mech Ageing Dev., 133(4): 118-126., 2012.

Kerr John, F.R., Andrew, H., Wyllie, Alastair R. Currie. "Apoptosis: A Basic
Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics."
British Journal of Cancer 26, 239-57, 1972.

Khalil, W.K., Abidli, N., Ghaly, I.S., Hassanane, M.M., Sharafeldin, E.A., Myrtus
Species Prevents Reproductive Toxicity Induced By Doxorubicin In Male
Mice. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 8(3), 169-175,
2015.

Khazdair, M.R., Boskabady, M. H., Hosseini, M., Rezaee, R., Tsatsakis A.M., The
effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A
review, Avicenna J Phytomed. Sep-Oct; 5(5): 376-391, 2015.

Khedmat, S., Dehghan, S., Hadjati, J., Masoumi, F., Nekoofar, M.H., Dummer,
P.M., In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements
on human monocytes, a colorimetric MTT assay. Restor Dent Endod., 39(3):
149-154, 2014.

Kim, S.H., Park, J.G., Lee, J., Yang, W.S., Park, G.W., Kim, H.G., Yi, Y.S, Baek K-S, Sung, N.Y., Hossen, M.J., Lee, M., Kim, J.H., Cho, J.Y., The dietary flavonoid kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Mediators of inflammation*, 2015.

Kling, B., Bücherl, D., Palatzky, P., Matysik, F.M., Decker, M., Wegener, J., Heilmann, J., Flavonoids, flavonoid metabolites, and phenolic acids inhibit oxidative stress in the neuronal cell line ht-22 monitored by ecis and mtt assay: a comparative study. *journal of natural products*, 77(3): 446-454, 2013.

Kohler, R.E., *Lords of the fly: Drosophila genetics and the experimental life*. University of Chicago Press, Chicago, 1994.

Koksal, P.M., Gürbüz, M., Analysis of genotoxic activity of ketamine and rocuronium bromide using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2): 628-634, 2015.

Kozluca, O., Olcay, E., Surucu, S., Guran, Z., Kulaksız, T., Uskent, N., Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin. *Cancer Lett.* 99, 1-6, 1996.

Kurokawa, Y., Takayama, S., Konishi, Y., Hiasa, Y., Asahina, S., Takahashi, M., Maekawa, A., Hayashi Y., Long-term in vivo carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan. *Environmental Health Perspectives*, 69, 221-235, 1986.

- Lanzilli, G., Cottarelli, A., Nicotera, G., Guida, S., Ravagnan, G., Fuggetta, M.P.,
Anti-inflammatory Effect of Resveratrol and Polydatin by in Vitro IL-17
Modulation, *Inflammation*, 35, 240-248, 2012.
- Laurent, R.St., O'Brien, L.M., Ahmad S.T., Sodium butyrate improves locomotor
impairment and early mortality in a rotenone-induced *Drosophila* model of
Parkinson's disease, *Neuroscience*, 246, 382–390, 2013.
- La Vecchia, C., Decarli, A., Serafini, M., Parpinel, M., Bellocco, R., Galeone, C.,
Bosetti, C., Zucchetto, A., Polesel, J., Laggiou, P., Negri, E., Rossi, M., Dietary
total antioxidant capacity and colorectal cancer: A large case–control study in
Italy, *International Journal of Cancer*, 133(6): 1447-1451, 2013.
- Lee, J., Gupta, S., Huang, J.S., Jayathilaka, L.P., Lee, B.S., HPLC–MTT assay:
Anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. *Analytical
biochemistry*, 436(2): 187-189, 2013.
- Lewis, E.B., A new standard food medium. *Drosophila* Information Service. 34,
117-118, 1960.
- Li, X., Zhao, Y., Wu, W.K.K., Liu, S., Cui, M., Lou H., Solamargine induces
apoptose associated with p53 transcription-dependent and
transcriptionindependent pathways in human osteosarcoma UO2S cells. *Life
Sciences* 88, 314-321, 2011.

Lopes, J.C., Machado, N.M., Saturnino, R.S., Nepomuceno, J.C., Recombinogenic activity of Pantoprazole® in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

Luo, H., Jiang, B.H., King, S.M., Chen, Y.C., Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutrition and Cancer*, 60(6): 800-809, 2008.

Magesh, V., Venugopal, R., Bhavani, K.D., Sakthisekaran, D., Effect of Crocetin on Benzo (a) Pyrene Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *International Journal of Cancer Research*, 3, 143-150, 2007.

Mahboubi, M., Ghazian, B.F., In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with Myrtus communis essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine* 17(10): 771-774, 2010.

Maiti, S., Sinha, S.S., Singh, M., Hair Dye–DNA Interaction: Plausible Cause of Mutation. *Cosmetics*, 2(4): 313-321, 2015.

Malaekheh-Nikouei, B., Mousavi, S.H., Shamsavand, S., Mehri, S., Nassirli, H., Moallem S.A., Assessment of Cytotoxic Properties of Safranal and Nanoliposomal Safranal in Various Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research*, 27, 1868-1873, 2013.

- Malla, S., Niraula, N.P., Singh, B., Liou, K., Sohng, J.K., Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiological Research*, 165(5): 427-435, 2010.
- Mansouri, S., Ghaneie, A.T., Najar, A.G., Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology*, 39(5): 399-401, 2001.
- Manuja, A., Kumar, B., Chopra, M., Bajaj, A., Kumar, R., Dilbaghi, N., ... Yadav, S.C., Cytotoxicity and genotoxicity of a trypanocidal drug quinapyramine sulfate loaded-sodium alginate nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Shahidi, F., Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2): 162-179, 2013.
- Martin, T., Villaescusa, L., De Sotto, M., Lucia, A., Diaz, A.M., Determination of anthocyanin pigments in *Myrtus communis* berries. *Fitoterapia*. 61, 85, 1990.
- Mashmoul, M., Azlan, A., Yusof, B.N.M, Khaza'ai, H., Mohtarrudin, N., Boroushaki, M.T., Effects of saffron extract and crocin on anthropometrical, nutritional and lipid profile parameters of rats fed a high fat diet. *Journal of Functional Foods* 8, 180-187, 2014.

Masi, E., Taiti, C., Heimler, D., Vignolini, P., Romani, A., Mancuso, S., PTR-TOF-MS and HPLC analysis in the characterization of saffron (*Crocus sativus* L.) from Italy and Iran. *Food Chemistry* 192, 75-81, 2016.

Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G., *Biochemistry* (3rd Edition), Benjamin Cummings, 2000.

Mekkawy, H.A., Ali, M.O., El-Zawahry, A.M., Toxic effect of synthetic and natural food dyes on renal and hepatic functions in rats. *Toxicol. Lett.* 95(1): 155, 1998.

Melnyk, J.P., Wang, S., Marcone, M.F., Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron *Food Research International* 43, 1981–1989, 2010.

Mendanha, D.M., Ferreira, H.D., Felício, L.P., Silva, E.M., Pereira, D.G., Nunes, W.B., Carvalho, S., Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res.*, 9(1): 69-77, 2010.

Mendes, M.M., Gazarini, L.C., Rodrigues, M.L., Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments: effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. *Environ Exp Bot.*, 45(2), 165-78, 2001.

Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E., Couladis, M., Essential Oil of *Myrtus communis* L. as a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents. *Molecules*, 15, 2759-2770, 2010.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185-229, 2004.

Misra, H., Soni, M., Silawat, N., Mehta, D., Mehta, B.K., Jain, D.C., Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci*, 3(2): 242-248, 2011.

Mollet, P., Würigler, F.E., Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Research*, 25, 421-424, 1974.

Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Piacente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P., Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 41, 1614-1619, 2006.

Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Maldini, M., Cabras, P., Pizza, C., Qualitative profile and quantitative determination of flavonoids from *Crocus sativus* L. petals by LC-MS/M. *Nat Prod Commun*, 3, 12, 2008.

Morales, M.L., Callejón, R.M., Ubeda, C., Guerreiro, A., Gago, C., Miguel, M.G., Antunes, M. D., Effect of storage time at low temperature on the volatile compound composition of Sevillana and Maravilla raspberries. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 128-134, 2014.

Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63, 1983.

Mulas, M., Fadda, A., Angioni, A., Effect of maturation and cold storage on the organic acid composition of myrtle fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1): 37-44, 2013.

Munari, C.C., Oliveira, P.F., Campos, J.C.L., Martins, S.P.L., Costa, J.C., Bastos, J.K., Tavares D.C., Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine in tumor cell lines. *J Nad Med* 68, 231-41, 2013.

Munari, C.C, Oliveira, P.F.D., Leandro, L.F., Pimenta, L.M., Ferreira, N.H., Costa J.D.C.D., Bastos, J.K., Tavares, D.C., *In Vivo* Assessment of Genotoxic,

Antigenotoxic and Anticarcinogenic Activities of *Solanum lycocarpum* Fruits Glycoalkaloidic Extract. PLoS One, 9(11): e111999, 2014.

Murray, M.T., Botanical Medicine-A Modern Perspective. In the Textbook of Natural Medicine. 4th Edition.Ed:by Joseph E. Pizzorno, Michael T. Murray. Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, pp. 255-259, 2013.

Nair, S.C., Pannikar, B., Panikkar, K.R., Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). Cancer Letters, 57(2): 109-114, 1991.

Nair, S.C., Panikkar, K.R., Parathod, R.K., Protective effects of crocetin on bladder cytotoxicity induced by cyclophosphamide. Cancer Biother, 8, 339-343, 1993.

Nassar, M.I., Aboutabl, E.A., Ahmed, R.F., El-Khrisy, E.A., Ibrahim, K.M., Sleem, A.A., Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. Pharmacognosy Res, 2(6): 325-329, 2010.

Navarro, S. D., Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Ogo, F. M., Oliveira, R. J. Resistant starch: a functional food that prevents DNA damage and chemical carcinogenesis. Genetics and Molecular Research, 14(1), 1679-1691, 2015.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1833(12): 3448-3459, 2013.

Omidi, A., Riahinia, N., Montazer Torbati, M.B., Behdani, M.A.,
Hepatoprotective effect of *Crocus sativus*(saffron) petals extract against
acetaminophen toxicity in male Wistar rats. *Avicenna J Phytomed*, 4(5): 330-
336, 2014.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T.T., Liu, B., Bao, J.K.,
Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy
and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6): 487-498, 2012.

Pandey, U.B., Nichols, C.D., Human Disease Models in *Drosophila melanogaster*
and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol Rev*, 63(2):
411-436, 2011.

Pantavos, A., Ruiter, R., Feskens, E.F., de Keyser C.E., Hofman A., Stricker B.H.,
Franco O.H., Kiefte-de Jong J.C., Total dietary antioxidant capacity, individual
antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *International*

Passos, D.C., Ferreira, H.D., Vieira, I.L., Nunes, W.B., Felício, L.P., Silva,
E.M., Vale, C.R., Duarte, S.R., Silva, E.S., Carvalho, S., Modulatory effect of
Palicourea coriacea (Rubiaceae) against damage induced by doxorubicin in
somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res.*, 9(2): 1153-62,
2010.

Peleg, S., Feller, C., Forne, I., Schiller, E., Sévin, D.C., Schauer, T., Regnard, C.,
Straub, T., Prestel, M., Klima, C., Nogueira, M.S., Becker, L., Klopstock,

T., Sauer, U., Becker, P.B., Imhof, A., Ladurner, A.G., Life span extension by targeting a link between metabolism and histone acetylation in *Drosophila*. *EMBO reports*, 17(2): 123-278, 2016.

Pereira, D.G., Antunes, L.M.G., Graf, U., Spanó, M.A., Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4): 947-955, 2008.

Peycheva, E., Alexandrova, R., Miloshev, G., Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 510-517, 2014.

Piras, F.M., Dettori, M.F., Magnani, A., ToF-SIMS PCA analysis of *Myrtus communis* L. *Appl. Surf.*, 255, 7805-7811, 2009.

Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X., Walsh, C.A., Somatic Mutation, Genomic Variation, and Neurological Disease. *Science*, 341(6141): 1237758, 2013.

Postlethwait, J.H., Clonal analysis of *Drosophila* cuticular patterns, in: M. Ashburner and T.R.F. Wright (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, 2c, Academic Press, London, pp. 359-441, 1978.

Prema, R., Sathish Sekar, D., Chandra Sekhar, K.B., Review On: Herbs As Anticancer Agents. *Int. J. Pharma & Ind. Res.*, 1, 105, 2011.

Premkumar, K., Abraham, S.K., Santhiya, S.T., Ramesh, A., Protective effects of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytother Res*, 17(6): 614-7, 2003.

Rainsford, K.D., History and Development of the Salicylates. Aspirin and Related Drugs. Ed: by Kim D. Rainsford. CRC Press, 2004.

Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., Nishigaki, I., Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 103-112, 2014.

Rao, S.V., Muralidhara Yeniseti, S.C., Rajini, P.S., Evidence of neuroprotective effects of saffron and crocin in a *Drosophila* model of parkinsonism. *NeuroToxicology*, 52, 230-242, 2016.

Ray, P.D., Huang, B., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24, 981-990, 2012.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., Cell viability assays. In the Assay Guidance Manual. Ed: by Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. 2013 May 1 [Updated 2015 Jun 29]. <http://europepmc.org/books/NBK144065>, 2004. (Erişim tarihi: 14.10.2015).

- Rodriguez, H., Valentine, M.R., Holmquist, G.P., Akman, S.A., Termini J: Mapping of peroxy radical induced damage on genomic DNA. *Biochemistry* 38, 16578-16588, 1999.
- Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Tattini, M., Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L. *Chromatographia*, 49(1): 17-20, 1999.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Corona, G., Appendino, G., Bianchi, F., Ballero, M., Assunta Dess, Ì. M., Antioxidant Activity of Oligomeric Acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. *Free Radical Research*, 37(9): 1013-1019, 2003.
- Rossi, A., Di Paola, R., Mazzon, E., Genovese, T., Caminiti, R., Bramanti, P., Pergola C., Koeberle A., Werz O., Sautebin L., Cuzzocrea, S., Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(1): 76-86, 2009.
- Rossi, M., Tavani, A., Ciociola, V., Ferraroni, M., Parpinel, M., Serafini, M., Bellocco, R., Zucchetto, A., Montella, M., Serraino, D., Lagiou, P., La Vecchia, C., Dietary total antioxidant capacity in relation to endometrial cancer risk: a case-control study in Italy. *Cancer Causes & Control*, [Epub ahead of print], 1-7, 2016 (erişim tarihi:13.02.2016)

Rothwell, V.N., Understanding Genetics, A Molecular Approach. A John Wiley & Sons Inc. Publ. New York. 556 pp, 1993.

Sadeghnia, H.R., Kamkar, M., Assadpour, E., Boroushaki, M.T., Ghorbani, A., Protective effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus*, on quinolinic acid-induced oxidative damage in rat hippocampus. Iran J Basic Med Sci; 16, 73-82, 2013.

Safarzadeh, E., Sandoghchian Shotorbani, S., Baradaran, B., Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Adv Pharm Bull, 4 (Suppl 1): 421-7, 2014.

Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, S.K., Afshari, R., Davoodi, S., *Crocus sativus* L.(saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. BioMed research international, 2013, 2013.

Sarıkaya, R., Çakır, Ş., Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. Environmental Toxicology and Pharmacology 20(3): 424-430, 2005.

Sarıkaya, R., Çakır Arıca, Ş., Solak, K., “Gıdalardaki koruyucu maddelerin *Drosophila melanogaster*’de (mwh x flr) ömür uzunluğuna etkisi”. Kastamonu Eğitim Dergisi C:14, N:1, 173-184, 2006.

Sarıkaya, R., Selvi, M., Erkoç, F., Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88(8): 974-979, 2012.

Sarıkaya, R., Erciyas, K., Kara, M.I., Sezer, U., Erciyas, A.F., Ay, S., Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of boron by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila* Drug Chem Toxicol, Early Online: 1-7, 2016 (erişim tarihi 12.02.2016)

Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519, 103-119, 2002.

Schaar, C.E., Dues, D.J., Spielbauer, K.K., Machiela, E., Cooper, J.F., Senchuk, M., Hekimi, S., Van Raamsdonk, J.M., Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet.*, 11(2): e1004972, 2015.

Schieber, M., Chandel, N.S., ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 24, R453-R462, 2014.

Seo, A.Y., Joseph, A.M., Dutta, D., Hwang, J.C., Aris, J.P., Leeuwenburgh, C., New insights into the role of mitochondria in aging: Mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 123, 2533-2542, 2010.

Settanni, L., Randazzo, W., Palazzolo, E., Moschetti, M., Aleo, A., Guarrasi, V., Mammina, C., San Biagio, P.L., Marra, F.P., Moschetti, G., Germanà, M.A., Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. cultivars. Natural product research, 28(6): 383-391, 2014.

Sharma, G., Gautam, D., Goyal, R.P., Tartrazine Induced Haematological and Serological Changes in Female Swiss albino Mice, Mus musculus. Pharmacologyonline 3, 774-788, 2009.

Shokoohinia, Y., Yegdaneh, A., Amin, G., Ghannadi, A., Seasonal variations of Laurus nobilis L. leaves volatile oil components in Isfahan, Iran. Research Journal of Pharmacognosy, 1(3): 1-6, 2014.

Silva, P.A., Oliveira, D.F., Prado, N.R.T.D., Carvalho, D.A.D., Carvalho, G.A.D., Evaluation of the antifungal activity by plant extracts against Colletotrichum gloeosporioides Penz. Ciência e Agrotecnologia, 32(2): 420-428, 2008.

Singh, N., Kumar, D., Raisuddin, S., Sahu, A. P., Genotoxic effects of arsenic: prevention by functional food-jaggery. Cancer letters, 268(2), 325-330, 2008.

Soares, B.M., Araujo, T.M.T., Ramos, J.A.B., Pinto, L.C., Khayat, B.M., Bahia, M.D.O, Montenegro, R.C., Burbano, R.M.R., Khayat, A.S., Effects on DNA Repair in Human Lymphocytes Exposed to the Food Dye Tartrazine Yellow. Anticancer Research 35, 1465-1474, 2015.

Soffritti, M., Belpoggi, F., Manservigi, M., Tibaldi, E., Lauriola, M., Falcioni, L., Bua, L., Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine*, 53, 1197-1206, 2010.

Song, W., Veenstra, J.A., Perrimon, N., Control of lipid metabolism by tachykinin in *Drosophila*. *Cell reports*, 9(1): 40-47, 2014.

Stocker, H., Gallant, P., Getting Started: An Overview on Raising and Handling *Drosophila* *Methods Mol Biol.* 420, 27-44, 2008.

Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Akhtar, M., *Myrtus communis* Linn- A review. *Indian J Natural Products and Resources*; 2(4): 395-402, 2011.

Szabad, J., Soos, I., Polgar, G., Hejja, G., Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sexlinked recessive lethal tests. *Mutation Research*, 113, 117-133. 1983.

Şan, B., Yıldırım, A.N., Polat, M., Yıldırım F., Chemical Compositions of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes Having Bluish-Black and Yellowish-White Fruits *Erwerbs-Obstbau* 57, 203-210, 2015.

Tai, C.J., Wang, C.K., Tai, C.J., Lin, Y.F., Lin, C.S., Jian J.Y., Chang Y.J., Chang C.C., Aqueous Extract of *Solanum nigrum* Leaves Induces Autophagy and Enhances Cytotoxicity of Cisplatin, Doxorubicin, Docetaxel, and 5-

Fluorouracil in Human Colorectal Carcinoma Cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 1-12, 2013.

Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Abe, Y., Mori, S., Sato, N., Okutani, K., Shigeta, S., Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. Antiviral Research, 49(1): 15-24, 2001.

Tanaka, T., Mori, T., Yuan, C.S., Soed, S., Tung, N.H., Shoyama, Y., The Function of Saffron and its Constituent in Gastroenterological Tissues. Global Journal of Gastroenterology & Hepatology, 3(2): 31-38, 2015.

Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279, L1005-L1028, 2000.

Tomatir, A.G., Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T. Klin J Med Sci, 23(6): 499-508, 2003.

Tretiakova, I., Blaesius, D., Maxia, L., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Cinatl Jr, J., Michaelis M., Werz, O., Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. Apoptosis, 13(1): 119-131, 2008.

Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., Sasaki, Y.F., DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. Toxicological Sciences, 61, 92-99, 2001.

Tuberoso, C.I., Rosa, A., Montoro, P., Fenu, M.A., Pizza, C., Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (*Crocus sativus* L.) floral by-products. *Food Chemistry*, 199, 18-27, 2016.

Türkoğlu, Ş., Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2035-2041, 2008.

Twentyman, P.R., Luscombe, M., A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, 56, 279-285, 1987.

Umadevi, M., Kumar, K.P.S., Bhowmik, D., Duraivel, S., Traditionally Used Anticancer Herbs In India. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1, 3, 56-74, 2013.

Valadares, B.L.B., Graf, U., Spanó, M.A., Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 46(3): 1103-1110, 2008.

Vale, C.R., Silva, C.R., Oliveira, C.M.A., Silva, A.L., Carvalho, S., Chen-Chen L., Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. *Genet. Mol. Res.* 12(3): 2712-2724, 2013.

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

Varely, H., *Practical Clinical Biochemistry*, sixth ed. London Heinemann Medical Books. 477-549, 1987.

Wannes, W.A., Mhamdi, B., Marzouk, B., Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem*, 112(3): 621-626, 2009.

Wannes, W.A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M.B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E., Marzouk, B., Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1362-1370, 2010.

Yang, F., Teves, S.S., Kemp, C.J., Henikoff, S., Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1845(1):84-89, 2014.

Yang, D., Das, S., Song, L., Li, T., Yan, J., Smith, W.W., LDN-73794 Attenuated LRRK2-Induced Degeneration in a *Drosophila* Parkinson's Disease Model. *Advances in Parkinson's Disease*, 4, 49-58, 2015.

Yao, K., Chen, H., Liu, K., Langfald, A., Yang, G., Zhang, Y., Yu D.H., Kim M.O., Lee M.H., Li H., Bae K.B., Kim H.G., Ma W.Y., Bode A.M., Dong Z.,

Kaempferol targets RSK2 and MSK1 to suppress UV radiation-induced skin cancer. *Cancer prevention research*, 7(9): 958-967, 2014.

Zhang, F., Zhao, Y., Han, Z., An *In Vivo* Functional Analysis System for Renal Gene Discovery in *Drosophila* Pericardial Nephrocytes. *Journal of American Society of Nephrology* 24, 1-7, 2013.

Zheng, Y.Q., Liu, J.X., Wang, J.N., Xu, L., Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res*, 1138, 86-94, 2007.

Zunino, F., Gambetta, R., Di Marco, A., The inhibition in vitro of DNA polymerase and RNA polymerases by daunomycin and adriamycin. *Biochem Pharmacol.*, 24: 309-311, 1975.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selda ÖZ

Doğum Tarihi : 07/05/1978

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : İstanbul Üniversitesi, 1999

Yüksek Lisans : Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (Gebze Teknik Üniversitesi), 2004

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar:

05.11.2008- : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü

Yayımları (Diğer) : **Öz, S.**, Özdemir, M., Çevik, T., Oksijen Emici ve Farklı Ambalaj Malzemeleri Kullanımının Tost Ekmeği Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi. Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 5-8 Eylül 2006.

Sinapli, Ö., Çakır Arıca, Ş., **Öz, S.**, Myrtus Communis, Pistacia Terebinthus, Conyza Bonariensis Bitkilerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. Kırgızistan Birinci Uluslararası Biyoloji Kongresi, Bişkek, Kırgızistan, p190, 2012.

Çakır Arıca, Ş., Budak Yıldırım, F.A., **Öz, S.**, Ekolojik Kirliliğin Canlılar Üzerindeki Genotoksik Etkileri. Hatay'ın Çevre Sorunları Ve Çözüm Önerileri Sempozyumu. Hatay, 28-30 Mayıs 2015.

Öz, S., Çakır Arıca, Ş., Evaluation of antigenotoxic effect of Myrtus communis L. (myrtle) fruit extract. International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16) Kilis. p 2474-248, March 19-20, 2016.

Çakır Arıca, Ş., Demirci, S., Özyılmaz, A., **Öz, S.**, Arslantaş, E., Bazı Makroalglerin Drosophila melanogaster'in Hayatta Kalışı Üzerine Etkileri, 2. Alg Teknolojisi Sempozyumu, Seferihisar, İzmir, 24-27 Mayıs 2016.

Araştırma Alanları : Genetik, genotoksikoloji, moleküler biyoloji