

**(-)-EPİGALLOKATEŞİN GALLAT(EGCG) VE KAFEİK ASİT  
FENETİL ESTERİN(CAPE) GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK  
ETKİLERİ**

**Özlem SARAÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

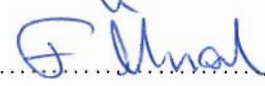
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2010  
ANKARA**

Özlem SARAÇ tarafından hazırlanan “(-)-EPİGALLOKATEŞİN GALLAT(EGCG) VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN(CAPE) GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Fatma ÜNAL

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı



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


Prof. Dr. Cafer Sırrı SEVİMAY  
Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Fatma ÜNAL  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi



Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU  
Biyoloji, Gazi Üniversitesi



Tarih: 14/06/2010

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## TEZ BİLDİRİMİ

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



Özlem SARAÇ

**(-)-EPİGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG)  
VE  
KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN (CAPE)  
GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Özlem SARAÇ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Haziran 2010**

**ÖZET**

**Bu çalışmada, (-)-epigallokateşin gallat (EGCG) ve kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) genotoksik ve MMC ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan hasarlar üzerindeki antijenotoksik etkileri, insan periferik lenfositlerinde, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılarak belirlenmiştir. EGCG ve CAPE tek başına önemli genotoksik etki oluşturmamıştır. Mutajenlerle birlikte kullanıldıklarında, KA testinde EGCG potansiye edici, CAPE ise antiklastojenik etki göstermiştir. KKD ve MN testinde her iki polifenol genelde önemli antimutajenik ve antiklastojenik etki gösterirken, comet testinde düşük konsantrasyonlarda primer DNA hasarını engelleyici, yüksek konsantrasyonda ise DNA hasarını uyarıcı etki göstermiştir. Ayrıca her iki polifenol, antimitotik etkilidir.**

**Bilim Kodu : 203.1.048**

**Anahtar Kelimeler : Epigallokateşin-3-gallat, Kafeik asit fenetil ester, MMC, genotoksik etki, antigenotoksik etki, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet testi, mitotik indeks (Mİ)**

**Sayfa Adedi : 124**

**Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Fatma ÜNAL**

**GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF  
(-)-EPIGALLOCATECHINE GALLATE  
AND  
CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER  
(M. Sc. Thesis)**

**Özlem SARAÇ**

**GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
June 2010**

**ABSTRACT**

**In this study, *in vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechine gallate (EGCG) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against MMC and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced genotoxicity were investigated by using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN) and comet assay. EGCG and CAPE were not significantly genotoxic alone. When they were used together with mutagens, in CA test, EGCG potantiated chromosome aberrations, however, CAPE showed anticlastogenic effect. While both polyphenols showed antimutagenic and anticlastogenic effect in SCE and MN assay, they have protective effect in primer DNA damage at lower concentrations whereas they increased DNA damage in higher concentrations. In addition, both polyphenols have antimitotic effect.**

**Science Code : 203.1.048**

**Key Words : Epigallocatechine-3-gallate, Caffeic acid phenetyl ester, MMC, genotoxic effects, antigenotoxic effect, chromosomal effects (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronucleus (MN), comet assay, mitotic index (MI),**

**Page Number: 124**

**Adviser : Prof. Dr. Fatma ÜNAL**

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, büyük yardımlarını gördüğüm ilgi ve desteğini benden esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım hocalarım Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, Yard. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a ve Yard. Doç. Dr. Serkan YILMAZ'a; benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvardaki tüm Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Kanser .....	4
2.1.1. Kanser tedavisi .....	5
2.1.2. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etkileri .....	7
2.2. Serbest Radikaller.....	9
2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler.....	12
2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hasarları.....	13
2.3. Antioksidanlar.....	17
2.3.1. Sentetik antioksidanlar.....	18
2.3.2. Doğal antioksidanlar .....	19
2.4. Polifenoller.....	19
2.5. Flavanoidler ve Hidroksisinnamik asitler.....	25

	<b>Sayfa</b>
2.6. (-)- Epigallokateşingallat.....	26
2.7. Kafeik asit fenetil ester.....	32
3. MATERYAL VE METOT .....	37
3.1. Materyal .....	37
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal .....	37
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi .....	38
3.2.2. Preparatların hazırlanması.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
4.1. (-)-Epigallokateşin gallat'ın tek başına ve MMC tarafından oluşturulan genetik hasara karşı etkileri.....	45
4.2. Kafeik asit fenetil esterinin tek başına ve MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine etkileri .....	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	75
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	124

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Reaktif Oksijen Türleri .....	11
Çizelge 2.2. Reaktif Nitrojen Türleri .....	11
Çizelge 2.3. Serbest radikallerle ilişkili olarak ortaya çıkan bazı patolojik durumlar .....	12
Çizelge 2.4. Polifenollerin iskelet yapılarına göre sınıflandırılması.....	22
Çizelge 2.5. Çay Yaprağının Bileşimi.....	28
Çizelge 2.6. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisnu.....	29
Çizelge 4.1. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde görülen kromozomal anormallikler ve frekansları.....	47
Çizelge 4.2. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD, Rİ ve Mİ frekansları.....	53
Çizelge 4.3. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi .....	56
Çizelge 4.4. EGCG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +EGCG uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı .....	58
Çizelge 4.5. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler ve frekansları.....	62
Çizelge 4.6. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD, Rİ ve Mİ frekansları.....	68
Çizelge 4.7. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi .....	71
Çizelge 4.8. CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +CAPE uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı .....	73

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Mitokondride radikal oluşumu.....	10
Şekil 2.2. Oksidatif stresin makromoleküller üzerine etkileri.....	16
Şekil 3.1. Epigallokateşin gallat'ın yapısal formülü .....	37
Şekil 3.2. Kafeik asit fenetil esterinin yapısal formülü.....	38
Şekil 4.1. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirmede anormal hücre frekansları.....	48
Şekil 4.2. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede anormal hücre frekansları.....	48
Şekil 4.3. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirmede KA/hücre .....	49
Şekil 4.4. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede KA/hücre .....	49
Şekil 4.5. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde KKD/hücre sayı.....	54
Şekil 4.6. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks .....	54
Şekil 4.7. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı.....	56
Şekil 4.8. EGCG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan % kuyruk yoğunluğu .....	58
Şekil 4.9. EGCG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan kuyruk uzunluğu .....	59
Şekil 4.10. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde poliploidili değerlendirmede anormal hücre frekansları.....	63

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.11. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede anormal hücre frekansları.....	63
Şekil 4.12. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirmede KA/hücre .....	64
Şekil 4.13. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede KA/hücre .....	64
Şekil 4.14. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde KKD/hücre sayısı .....	69
Şekil 4.15. CAPE ve CAPE+MMC uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks.....	69
Şekil 4.16. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı.....	71
Şekil 4.17. CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan % kuyruk yoğunluğu .....	73
Şekil 4.18. CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan kuyruk uzunluğu .....	74

**RESİMLERİN LİSTESİ**

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.1. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri.....	50
Resim 4.2. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimi .....	54
Resim 4.3. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler.....	57
Resim 4.4. EGCG ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü .....	59
Resim 4.5. MMC ve CAPE ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler .....	65
Resim 4.6. Kafeik asit fenetil ester uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri .....	69
Resim 4.7. Kafeik asit fenetil ester uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binukleat hücreler.....	72
Resim 4.8. CAPE ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü .....	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
°C	Santigrat derece
<b>Cu</b>	Bakır
<b>Fe</b>	Demir
<b>Mn</b>	Mangan
<b>Mo</b>	Mobliden
<b>Se</b>	Selenyum
<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	Mikrogram/ Mililitre
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Mikrolitre
<b><math>\mu\text{mol/L}</math></b>	Mikromol/ Litre
<b>mg/g</b>	Miligram/gram
<b>mM</b>	Milimolar
<b>LD<sub>50</sub></b>	Letal doz
<b>rpm</b>	Devir sayısı
<b>C</b>	Kateşin
<b>CAPE</b>	Kafeik asit fenetil ester
<b>CAs</b>	Chromosomal aberretions
<b>CP</b>	Cisplatin
<b>Cyt-B</b>	Sitokalsin-B
<b>DMBA</b>	Dimetilbenzoat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleikasit
<b>DPX</b>	Depex

**Kısaltmalar****Açıklama**

<b>Dxr</b>	Dokсорubisin
<b>EC</b>	(-)-Epikateşin
<b>ECG</b>	(-)-Epikateşin galat
<b>EGC</b>	(-)-Epigallokateşin
<b>EGCG</b>	(-)-Epigallokateşin galat
<b>GC</b>	Gallokateşin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojenperoksit
<b>i.p.</b>	İntraperitonal
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>KA</b>	Kromozomal anormallikler
<b>KKD</b>	Kardeş kromatid değişimi
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MI</b>	Mitotik indeks
<b>MN</b>	Mikronükleus
<b>MNNG</b>	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
<b>MMC</b>	Mitomycin-C
<b>MMS</b>	Metilmetansulfonat
<b>NBİ</b>	Nükleer bölünme indeksi
<b>NDGA</b>	Nordihidroguaiaretic asit
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrojendioksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Süperoksit
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozon
<b>PHA</b>	Fitohemaglütin
<b>RI</b>	Replikasyon indeksi
<b>ROP</b>	Reaktif oksijen partikülleri
<b>ROT</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SCE</b>	Sister chromatid Exchange
<b>SO<sub>2</sub></b>	Kükürtdioksit
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SSC</b>	Sodyumsalısitrat



**Kısaltmalar****TF****TR****UV****Açıklama**

Teaflavin

Tearubigin

Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Kanser 200'den fazla çeşidi olan bir hastalık grubu olup, kontrolsüz çoğalan ve yayılan anormal hücreler şeklinde tanımlanır. Kanserın görülme sıklığını iki temel faktör etkiler. Bunlar kalıtsal faktörler ve çevresel faktörlerdir. Kalıtsal faktörler, her bireyin ailesinden aldığı genetik mirastır ve değişmesi mümkün değildir. Çevresel faktörler ise, sigara içimi, sağlıksız beslenme, fiziksel aktivite yetersizliği, obezite, belirli bazı enfeksiyonlara neden olan organizmalar, bazı ilaç tedavileri, güneş ışınları, besinlerin içerisinde bulunan kanser yapıcı maddeler, çalışma alanlarında bulunabilecek kanser yapıcı öğeler ve soluduğumuz havada, içtiğimiz suda ve besinlerimizin temelini oluşturan toprakta bulunabilecek kanser yapıcı ajanlardır. Bütün bu ajanlar, genetik materyalde mutasyonlar oluştururlar. Yapılan çalışmalar, kimyasalların mutasyon oluşturma güçleri ile kanser oluşturma riskleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Günümüzde kanser hastalarında yapılan çalışmalarda, yüksek düzeyde gen ve kromozom hasarları olduğu belirlenmiştir.

Kansere yakalanan insanlar, ya radyasyon ile ve/veya ilaçla-kimyasallarla tedavi edilmektedir. Mitomisin-C (MMC), doxorubicin ve cisplatin, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan sadece bir kaçıdır. MMC, antineoplastik bir ilaç ve aynı zamanda doğal bir antibiyotik olup, bifonksiyonel alkilleyici etkiye sahiptir. MMC, sadece hedef alınan kanser hücrelerinde değil, bazen normal hücrelerde de DNA'da tek veya çift zincir kırıkları, nükleotidlerde baz değişmeleri, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak, genetik materyalde mutasyonlar meydana getirir. Antitümör ajanları, serbest radikaller oluşturarak kanserli hücreleri öldürürken, diğer taraftan tümör özelliğinde olmayan hücrelerde de sekonder tümörlerin meydana gelmesine neden olabilmektedir. Reaktif oksijen türleri olarak bilinen süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), serbest hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ) ve bunların etkisiyle oluşan lipid peroksitleri ve diğer benzer türevler, hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi önemli yapısal ve fonksiyonel molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Eğer bu hasarlar onarılamazsa, kanserin tetikleyicisi olabilirler.

İşte hem insanların kansere yakalanma risklerinin azaltılması, hem de kansere yakalanan kişilerde tedavi sırasında oluşabilecek ikincil kanserlerin engellenmesi ve azaltılması, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Diğer yandan, yapılan araştırmalarda, kanser oluşumu ile beslenme arasında çok önemli bir bağlantı olduğu, yüksek düzeyde meyve ve sebze tüketimi ile kansere yakalanma riski arasında ters orantı olduğu, bitkilerde bulunan çok çeşitli bileşiklerin kanser riskini yüzde 30 ila yüzde 40 oranında azaltılabileceği gösterilmiştir. Örneğin, domateste bolca bulunan ve karotenoidlerden biri olan likopen, prostat, meme ve akciğer gibi bazı kanserlerin riskini azaltmaktadır. Likopenin antikanserojen etkisinin, antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Likopen ayrıca karpuz, greyfurt ve kayısı gibi kırmızı meyve ve sebzelerde de bulunmaktadır. Benzer şekilde, mandalınada bulunan ve ona turuncu rengini veren karoten maddesinin, kansere yakalanma riskini azalttığı, ayrıca, karaciğer hastalıkları, damar sertliği ve şeker hastalığı riskini azalttığı, mandalina suyu içen hepatit hastalarının karaciğer kanserine yakalanmadıkları tespit edilmiştir. Brokoli, karnabahar, lahanası ve Brüksel lahanasının, yapısında yüksek oranda bulunan C vitamini, beta-karoten, lif, kalsiyum, folik asit ve birçok fitokimyasallar nedeniyle, kanser türleri arasında üçüncü sırada görülme sıklığına sahip olan kolon kanseri riskini azalttığı, DNA hasarını onaran enzimleri tetiklediği, tümör büyüklüğünü ve östrojen benzeri hormonların etkinliğini azalttığı gösterilmiştir.

Bitkilerde çok çeşitli fitokimyasallar mevcut olup, polifenoller bunlardan yalnızca biridir. Polifenollerin doğal kaynakları meyveler ve meyve suyu ile çay ve kahvedir. Sebzeler, tahıllar, çikolata ve kuru baklagiller de polifenol açısından oldukça zengindir. Bu bileşiklerin en önemli özelliği, antioksidan etkili olmalarıdır. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek onların hücrelere zarar vermesini engellemektedir. Antioksidanların aktivitesi serbest radikalleri tutabilme, onları bozundurabilme veya singlet oksijeni yakalayabilme kabiliyetlerine bağlıdır. Polifenoller ile, bunların antioksidan etkileri ve hastalıkları önleyici etkileri konusundaki çalışmalar, 1995’li yıllardan sonra hız kazanmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar, polifenollerin kalp-damar hastalıklarını, kanseri ve osteoporozu önlemede etkili olduğu, nörodejeneratif hastalıkların ve diyabetes mellitusun önlenmesinde rol

oynadığını desteklemektedir. Fakat, mevcut bilgiler, bu bileşiklerin, belli hastalıklar bakımından risk altında olan bütün popülasyona ya da belli popülasyonlara tavsiye edilmesi için hala yeterli değildir. Dünya sağlık örgütü, flavanoidlerin, kalp-damar hastalıkları riskini azaltmada “olası” etki gösterdiğini, kanser riskini önlemede ise “yetersiz” olduğunu yayınlamıştır [WHO, 2003].

(-)-Epigallokateşingallat (EGCG), kateşinlerin en aktif antijenotoksik bileşeni olup, çayda bolca bulunmaktadır. DNA stabilitesinin sağlanmasında ve sağlıklı yaşamada oldukça etkili bir maddedir. EGCG'nin, bleomisin ile muamele edilmiş insan periferik kan lökositlerindeki genetik hasara karşı iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Kafeik asit fenetil ester (CAPE), hidrokisinnamik asit sınıfında bulunan bir polifenolik bileşik olup, antioksidan ve antikarsinojenik etkilidir, sisplatin ile oluşturulmuş kromozomal hasarlara karşı koruyucu etki göstermektedir.

Yapılan literatür taramalarında, EGCG'nin ve CAPE'nin, kanser hastalarında antitümör ajan olarak kullanılan MMC'nin oluşturduğu hasarlara karşı iyileştirici bir etki yapıp yapamayacağı konusunda her hangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma, fenolik antioksidan maddelerden EGCG ve CAPE'in insan periferik lenfositlerinde her hangi bir genotoksik etkisi olup olmadığını ve ayrıca, antitümör ajanı olan MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine antijenotoksik etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, uluslararası genotoksik araştırmalarda sıkça kullanılan kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronukleus (MN) ve komet (Comet-Single Cell Gel Electrophoresisi-SCGE) testleri uygulanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar, insan sağlığı üzerine antioksidanların etkisinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kanser

Somatik hücrelerde, DNA replikasyonları esnasında veya iç ve dış ajanların etkisiyle mutasyonlar meydana gelebilmekte ve sonuçta bu hücreler bozularak normal yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirmektedirler. Kanser, DNA'nın hasarı sonucunda meydana gelen ve hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kanserde vücut hücreleri kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal edebilir (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak yerlere, kan veya lenf yoluyla yayılabilir (metastaz).

Vücudumuzda günde binlerce hücrenin DNA'sında çeşitli tipte mutasyonlar gerçekleşmesine rağmen, immün sistem sürekli olarak vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri bulup yok eder.

Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunda (eşlenmesi) meydana gelen hatalar sonucunda hücrenin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anomalisine sebep olduğu bilinen ve düşünülen bir çok faktör mevcuttur ve bunlara *predispozan* (hazırlayıcı) faktörler denir. Hücrede mutasyonlara neden olan pek çok etken vardır. Örneğin;

1) X-ışınları, gama ışınları, radyoaktif maddelerden yayılan partikül radyasyonları ve ultraviyole ışınları gibi *iyonize* edici radyasyonlar kansere zemin hazırlamaktadır. Bu radyasyonların etkisi altında doku hücrelerinde oluşan iyonlar yüksek derecede reaktif olduklarından DNA zincirlerini kopararak mutasyona sebep olmaktadır.

2) Bazı kimyasal maddelerin mutasyon potansiyeli yüksektir. Mutasyona neden olan kimyasal maddelere *mutajenler* denir. Anilin boya türevleri, sigara dumanındaki çok sayıdaki kimyasal, metilmetakrilat, asbest, silika tozları, kömür ve alçı tozu bunlara örnektir. Günümüzde toplumda en büyük sayıda kansere neden olan kanserojenler sigara dumanında bulunmaktadır. Bunların dışında, tarımda kullanılan bir çok

pestisitler, gıdalarda kullanılan bazı katkı maddeleri, çeşitli hastalıkların tedavisi için bazı ilaçlar da mutasyonlara neden olmaktadır.

3) Fiziksel olarak tahriş edici maddeler de kansere neden olmaktadır. Dokuda oluşan harabiyet, tahrip olan hücrelerin yerine, hızlı bir mitoz faaliyetiyle yeni hücreler oluşturur. Mitoz ne kadar fazla ve hızlı olursa mutasyon riski o kadar artar. Bu tür fiziksel etmenler arasında (dudak ısırma, saçla oynama, ben (nevus) koparma), yara kabuklarıyla oynama, bazı tahriş edici gıdaların aşırı ve sık tüketimi sayılabilir.

4) Bir çok ailede kansere yakalanmaya karşı güçlü bir kalıtsal eğilim vardır. Bu olay belki de bir çok kanser tipinde kanserin oluşmasından önce birden fazla mutasyona ihtiyaç olduğu gerçeğiyle de uyumaktadır. Kansere özellikle yatkınlığı olan bu ailelerin kalıtsal materyallerinde bir veya daha fazla mutasyona uğramış gen bulunmaktadır. Bu yüzden böyle kişilerde kanser büyümeye başlamadan önce çok daha az sayıda ilave mutasyon olması, kanseri başlatmak için yeterli olmaktadır.

5) Kanser oluşumunda viral ve çeşitli diğer enfeksiyonel materyaller de rol oynamaktadır.

### **2.1.1 Kanser tedavisi**

Tüm hastalıkların tedavilerinde esas rolü vücudun bağışıklık sistemi üstlenmektedir. Bağışıklık sistemini zayıflatan etmenlerin ortadan kaldırılması, tedavinin ilk basamağıdır. Kanserli hücrelerin ne kadar ve nerelere metastaz yaptığını tesbit etmek olanaksız olduğundan, kanser tedavisi gören hastaların bağışıklık sistemlerinin güçlendirilerek bu yayılmış hücreleri yok etmesi arzu edilen bir durumdur.

Kanserlerin tedavisi genel olarak dört yolla yapılmaktadır.

1. Cerrahi tedavi, kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokuyu alıp çıkartmaktır. Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkartmak imkansız olabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.

2. Radyoterapi-ışın tedavisi, uygun dozda ışın uygulayarak kanser hücrelerinin öldürülmesidir.

3. Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek amacıyla çeşitli ilaçların kullanılmasıdır.

4. Alternatif tıp, bağışıklık sistemine güç vermeyi, asıl tedaviye destek olmayı amaçlayan, ancak güvenilirliği ve etkinliği kontrollü deneylerle ispatlanmamış yöntemlerdir.

Bütün bu tedavi yöntemlerinin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Örneğin, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, patolojik şekilde çoğalmakta olan kanser hücrelerini çeşitli mekanizmalarla yok ettikleri gibi, hızlı bir şekilde çoğalan normal hücrelerde (embriyo ve fetüs hücreleri, kıl folikül hücreleri, kemik iliği hematopoietik hücreleri ile ağız ve barsak mukoza hücreleri vb.) veya çoğalma göstermeyen diğer hücrelerde de mutasyonlar oluşturabilir. İşte iyileşmek amacıyla kullanılan bu ilaçlar, özellikle oluşturdukları serbest radikaller ile sekonder olarak kanser oluşumuna neden olabilirler.

Hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi çeşitli serbest radikaller, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik reaksiyonların sonucunda oluştuğu gibi, bu radikallerin oluşumu radyasyon ve çeşitli ksenobiyotiklerle (ilaçlar veya çevresel kimyasallar) artış göstermektedir. Bu kısa ömürlü radikaller, hücredeki birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesinde, sinyal iletiminde rol oynarlar. Fakat, miktarları arttığında ve bu miktar hücrenin rejenerasyon veya tamir kapasitesini aşması durumunda, sinyal iletiminde düzensizliklere neden olurlar ve/veya hücresel makromolekülleri (lipitler, proteinler, DNA, RNA, karbohidratlar) oksidatif hasara uğrattırır. Sinyal iletimindeki düzensizlikler ve/veya makromoleküler hasarlar, sekonder olarak hücre fonksiyonlarını bozabilir veya apoptotik veya nekrotik hücre ölümlerini tetikleyebilir. Vücutta gerçekleşen oksidasyon reaksiyonları sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller, bilhassa DNA üzerinde hasara yol açarak yaklaşık 80 farklı hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu hastalıkların başında kalp ve beyin damarlarının tıkanmasına bağlı hastalıklar, kanserler ve artrit yer almaktadır. Ancak, hücrede

mevcut olan antioksidanlar (örneğin C ve E vitamini) ve antioksidatif enzimler, bu serbest radikallere karşı direkt veya indirekt koruma sağlar.

### **2.1.2. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etkileri**

Kanserin kemoterapi yolu ile tedavi edilmesinde, çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Siklofosfamid kemoterapide ve otoimmün hastalıklarda kullanılan, DNA'daki guanin bazlarını alkilleyerek etki gösteren bir ilaçtır. Siklofosfamid ile alkillenen DNA nedeniyle oluşan yüksek hasardan dolayı hücre ölümü meydana gelmektedir. Diğer bir kanser ilacı olan taksol ise mikrotübüller üzerine etkili bir maddedir ve tübülün sentezini uyarıp, anafaz geçişini durdurarak kanserli hücrenin mitozu tamamlamasını engeller.

Cisplatin de kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır ve DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak, transkripsiyon ve replikasyonun inhibe edilmesini sağlar [Hardman ve ark., 1996; Welters ve ark., 1999; Jordan ve ark., 2000]. Pirimidin analogu olan 5-florourasil, DNA ve RNA'da timin bazlarının yerine girerek sitotoksik etki meydana getiren ve hücre döngüsünü durdurarak hücrelerin apoptoza girmesine neden olan kemoterapötik bir ajandır [Boullata , 2007]. Kemoterapide kullanılan diğer bir ajan olan etopsid, topoizomeraz II aktivitesini inhibe edip, DNA'da kırıklar oluşturarak genetik materyalde hasar meydana getirir [Ng ve ark., 2006].

Bu ilaçlardan biri olan doksorubisin, hızla çoğalan kanserli hücrelerde DNA çift zincirinde birbirine yakın mesafede bulunan baz çiftleri arasına girip çapraz bağ oluşturarak DNA'nın şeker-fosfat yapısına bağlanır. Bunun sonucunda da DNA zincirinde kırılmalara ve RNA sentezinin durmasına neden olur [Bechter ve ark., 1987; Gheuens ve ark., 1991]. Böylece kanserli hücrelerin çoğalması engellenmeye çalışılır.

Antrasiklin glikosid antibiyotiği olup, insanda çok çeşitli tipte solid tümörlere ve hematolojik anormalliklere karşı kullanılmaktadır.



Fakat, böbreklerde, hematolojik sistemde ve testikular yapıdaki toksik etkilerinden dolayı, kemoterapide sınırlı bir şekilde kullanılmaktadır. Doksorubisin etkili toksisite, oksidatif streten kaynaklanmaktadır. Doksorubisin ile oluşan nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu etkinin serbest radikal oluşumu, biyolojik makromoleküllerin demire bağlı oksidatif hasarı ve membran lipid peroksidasyonu ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir [Mohan ve ark., 2010].

Mitomisin-C (MMC) yine kemoterapi amaçlı kullanılan, birincil hedefi DNA olan bir antibiyotik olup, aynı zamanda alkilleyici bir antitümör ajanıdır. DNA'ya çapraz bağlanarak etki eder ve bu çapraz bağlanma dolayısıyla DNA sentezinin inhibisyonuna neden olur. Bir yandan kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyip, tümör büyümesini azaltırken, diğer yandan normal ve sağlıklı hücrelerde de benzer etkileri göstermek suretiyle, klastogeneze ve mutageneze neden olmaktadır.

Kanser hücrelerinin, tüm bu kemoterapi ilaçlarının etkisi ile meydana gelen hasarları onarım kapasitesi normal hücrelere göre çok daha düşüktür. Bu nedenle hücreler daha ziyade apoptoza yönlendirilerek yok edilmekte ve böylece tümör büyümesi engellenmektedir. Ancak, kanser hücrelerini yok etmek için uygulanan bu kemoterapötik ajanlar, organizmanın sağlıklı hücrelerinde de genetik hasar meydana getirebilmekte ve böylece kanser hastalarında sekonder tümörler oluşabilmektedir. Benzer şekilde, bu ilaçlarla tedavi yapan sağlık çalışanlarında da istenmeyen hasarlara neden olabilmekte ve kanserogenezi başlatabilmektedir. Bütün bu kematerapötik ajanlar, genetik etkilerini daha ziyade serbest radikaller oluşturmak suretiyle meydana getirmektedir. DNA'ya zarar vermektedir.

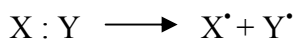
## 2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Paylaşılmamış elektrondan dolayı stabil olmayan, oldukça reaktif, yarı ömürleri çok kısa olan maddelerdir. Hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler [Halliwell, 2001].  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Mo^{+5}$  gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [Smith, 2005].

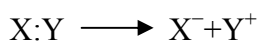
Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Aerobik metabolizmaya sahip olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir [Uysal, 1998]. Oksijen, canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir element olup hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşturur [Nakazawa ve ark., 1996]. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali oluşur. Dördüncü elektron eklenmesi ile su oluşmaktadır (Şekil 2.1).

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur [Akkuş, 1995];

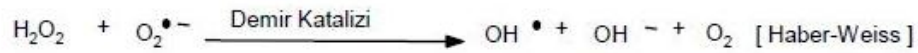
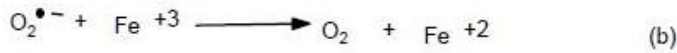
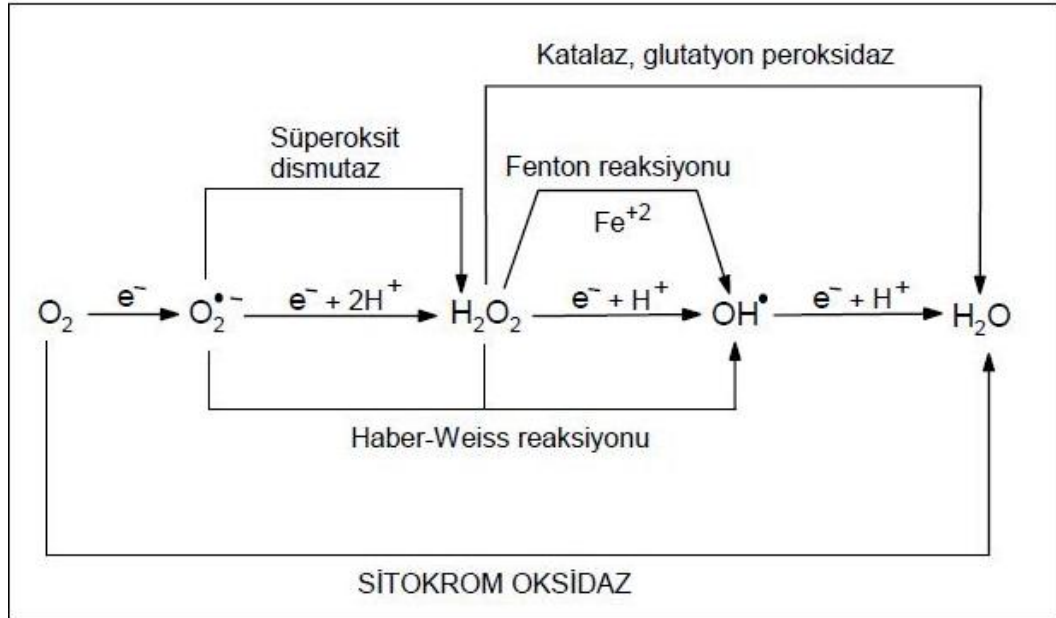
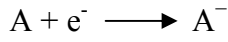
1- Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması



2-Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi



### 3-Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Şekil 2.1. Mitokondride radikal oluşumu

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türleri Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen species)-ROS ve Reaktif Nitrojen Türleri (Reactive Nitrojene Species)-RNS olarak bilinir. Bunlardan ROS; oksijen radikallerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türevlerini kapsayan genel bir terimdir (Çizelge 2.1). Aynı şekilde RNS'ler de, fizyolojik önemi olan serbest radikal türleridir (Çizelge 2.2) [Darley-Usmar ve ark., 1995; Halliwell, 2006].

Çizelge 2.1. Reaktif Oksijen Türleri

<i>Reaktif Oksijen Türleri (ROS)</i>	
Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit, $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Hipoklorik asit, $HOCl$
Peroksil, $LO_2^{\bullet}$	Ozon, $O_3$
Alkoksil, $LO^{\bullet}$	Singlet oksijen
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Lipit peroksitleri

Çizelge 2.2. Reaktif Nitrojen Türleri

<i>Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)</i>	
Radikaller	Non-radikaller
Nitrikoksit, $NO^{\bullet}$	Nitröz asit, $HNO_2$
Nitrojen dioksit, $NO_2^{\bullet}$	Dinitrojen trioksit $N_2O_3$ Dinitrojen tetraoksit, $N_2O_4$ Peroksinitrit, $ONOO^-$

Serbest radikaller ve radikal türevleri ile radikal olmayan reaktif türler yüksek konsantrasyonlarda bulduklarında, canlı organizmalar için tehlikelidir ve hemen hemen tüm hücre yapılarına zarar verirler. Düşük konsantrasyonlarda, ortamda bulunan nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde medyatör olarak önemli rol oynarlar. ROS'ların aracılık yaptığı bir çok cevap, aslında hücreleri oksidatif strese karşı korumakta ve redoks dengesini yeniden oluşturmaktadır [Dröge, 2002].

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme, ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir yaşam şansı sağlarlar. Organizmada, serbest radikallerin ve antioksidanların seviyeleri arasında uygun bir dengenin olması gerekmektedir. Bu denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır [Yalçın, 1998]. Yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenen patolojik değişiklikler Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Serbest radikallerle ilişkili olarak ortaya çıkan bazı patolojik durumlar

◆ YAŞLANMA	◆ RADYASYON HASARI
◆ ATEROSKLEROZ	◆ İNFLAMASYON
◆ KANSER	◆ DİYABET
◆ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	◆ BEYİN VE MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ HASTALIKLARI
◆ ROMATOİD ARTRİT	◆ BÖBREK BOZUKLUKLARI
◆ OTOİMMÜN HASTALIKLAR	◆ GÖZ BOZUKLUKLARI
◆ AKCİĞER HASTALIKLARI	◆ CİLT BOZUKLUKLARI
◆ KAS HASTALIKLARI	◆ GASTROİNTESTİNAL BOZUKLUKLAR
◆ KARACİĞER BOZUKLUKLARI	◆ BESLENME YETERSİZLİKLERİ
◆ KAN HASTALIKLARI	

### 2.2.1. Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler

Organizmada serbest radikal oluşumunu artıran faktörler, ekzojen ve endojen faktörler olmak üzere gruplandırılmaktadır [Uysal, 1998].

#### A. Ekzojen Faktörler

Organizmada serbest radikal oluşumunu artıran ekzojen faktörler;

1. Diyetel faktörler: Doymamış yağ asitleri bakımından zengin diyetle beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obezite), hayvansal proteinlerce zengin yiyeceklerle beslenme, az sebze ve meyve tüketimi, yiyeceklerin uygun olmayan ortam ve koşullarda hazırlanması.

2. Çevresel faktörler: Sigara dumanı, hava kirliliği (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, Hidrokarbonlar), radyasyon ve diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler, vs.)

3. İlaçlar: Antikanser ilaçları, glutatyon tüketen ilaçlar.

## B. Endojen Faktörler

Organizmada serbest radikal oluşumunu artıran endojen faktörler;

1. Fiziksel egzersiz
2. Stres
3. Yaşlılık
4. Doku hasarı ve kronik hastalıklar
5. Diyet ile antioksidan alımını etkileyen koşullar

### **2.2. 2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hasarları**

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir [Uysal, 1998];

- a) DNA'nın yapısının bozulması,
- b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- c) Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- d) Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- e) Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yapması,
- f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- g) Steroid ve yağ pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,

- h) Proteinlerin tahrip olması ve protein turnover'nin artması,
- i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi,
- j) Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde atrofibrotik değişikliklerin oluşması,
- k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir.

### Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkisi, lipit peroksidasyonunu uyarmasıdır. Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre zarlarında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikaller süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikalidir [Nakazawa ve ark., 1996; Halliwell, 1999].

Hücre zarlarında lipit peroksidasyonu sonucu zar transport sistemi etkilenmekte, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulmaktadır. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artmakta ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olmaktadır. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynamaktadır. Öte yandan lipit peroksidasyonun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir [Nakazawa ve ark.,1996; Halliwell, 1999; Uysal, 2006].

Organizmadaki etkileri;

- a) Lipid peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığı azalır, buna bağlı olarak normalde hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.
- b) Lipid peroksitler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.
- c) Lipid peroksidasyonu sırasında aktiviteleri için sülfidril ve amino grubuna gereksinim duyan, özellikle hormonal uyarılara cevap verme imkanı sağlayan yüzey reseptörlerini inhibe ederler (G6P-az ve Na-K ATP-az gibi).

- d) Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipid peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz.
- e) Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.
- f) MDA gibi aldehitler, LDL'yi modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler [Baykal, 2000].

### Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller bazı aminoasitlerle reaksiyona girerek, enzimlerin aktivitelerini ortadan kaldırarak, modifiye ya da fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına sebep olurlar. En çok sorumlu tutulan aminoasitler sülfür içerenlerdir [Nordberg ve ark., 2001]. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi halkalı amino asitler oksidasyona en fazla maruz kalan aminoasitlerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler, bunların fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallere duyarlı oldukları için, protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları da bozulmaktadır [Nakazawa ve ark., 1996; Halliwell, 1999].

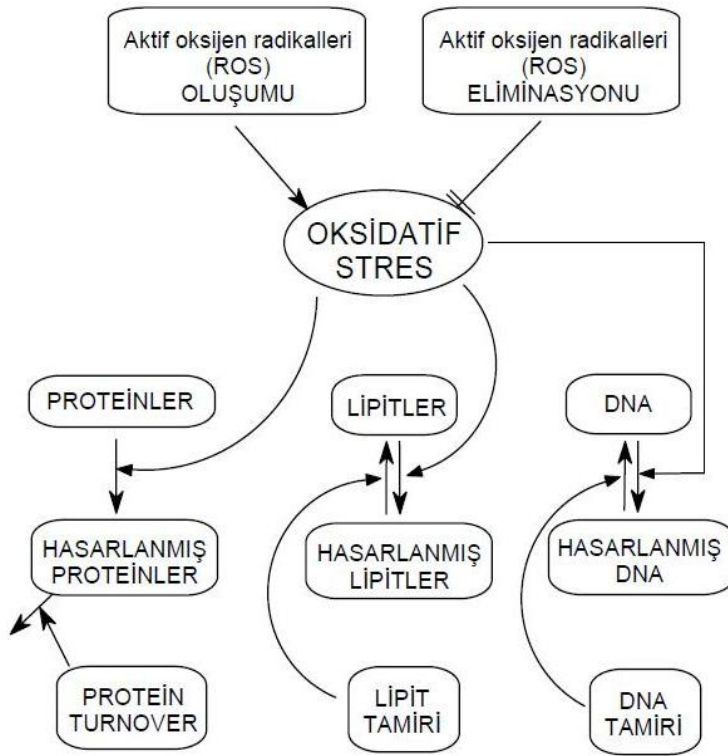
### Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin etkisi ile DNA'da yapısal değişimler meydana gelir. Bu yapısal değişimler özellikle OH<sup>-</sup> radikali ile pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları, DNA denatürasyonu gibi çeşitli olayları kapsamaktadır [Nakazawa ve ark.,1996; Halliwell, 1999]. Bu mekanizma, oksidatif strese maruz kalmış kişilerde kanser sıklığının artması ile açıklanmaktadır. Serbest radikal vasıtasıyla oluşan apoptozis, bazı vakalarda serbest radikale bağlı DNA hasarının bir parçasıdır [Nordberg ve ark., 2001].

Organizmada, sürekli biçimde serbest radikal niteliğinde bileşikler oluşmaktadır. Fakat, antioksidan kaynakları (örneğin C ve E vitamini) ve antioksidatif enzimler ROS'lara karşı direkt veya indirekt koruma sağlarlar [Wells ve ark., 2009].



Bu nedenle serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman, serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz etkilenmektedir. Yapılan çalışmalar, antioksidanların bolca bulunduğu bitkilerle beslenmenin ve bitkilerdeki kompleks bileşiklerin vücuda alınmasının, antikanser ilaçlarının neden olduğu genotoksisiteyi azalttığını, ve böylece kanser hastalarında sekonder tümörlerin oluşumunu da azalttığını göstermiştir. Bu nedenle antioksidan sistemlerin ve bunların etki mekanizmalarının bilinmesi ve kullanımı, oksidan stresin yol açtığı zararların engellenmesi ve sağlıklı bir yaşam açısından büyük önem taşımaktadır [Halliwell, 1999; Siddique ve Afzal, 2009].



Şekil 2.2. Oksidatif stresin makromoleküller üzerine etkileri

### 2.3. Antioksidanlar

Gelişen ve artan teknolojik ürünler ve atıkları, pestisit kullanımı, çevre kirliliği, sigara, UV ışınları, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar vs. gibi pek çok çevresel madde nedeniyle, sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmaktayız. Bu maddelerden bazıları, zararlı etkilerini, serbest radikal oluşturmak suretiyle göstermektedir. Ayrıca vücuda alınan besinler, sindirilebilmek için bir dizi reaksiyondan geçerken serbest radikaller oluşturmakta ve bu radikaller de hücreyi oksidasyonla hasara uğratmaktadır. Bu radikallerin organizmaya zarar vermesi, antioksidan kaynakları ve antioksidatif enzimlerle, direkt veya indirekt şekilde sağlanmaktadır [Wells ve ark., 2009].

Serbest radikallerin oluşum hızı ile, etkisizleştirme hızının dengede tutulması gerekmektedir, aksi takdirde serbest radikallerin zararlı etkileri çeşitli organ ve sistemleri olumsuz etkilemektedir [Halliwell ve ark., 2001; Yalçın ve ark., 1998].

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların önlenmesini sağlama, oluşan radikalleri ortadan kaldırma ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedirler. Antioksidan sistem; enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucularını ve metal iyonlarını bağlayan proteinleri kapsamaktadır [Yalçın ve ark., 1998; Halliwell ve ark., 2001].

Antioksidan maddeler organizmaya doğal yollarla, besinlerle alınmaktadır. Birincil antioksidanlar, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin baskılanması ile serbest radikallerin meydana gelmesini önlerken, ikincil antioksidanlardan olan vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanlar, oksidasyon zincirinin başlamasını inhibe ederek, zincirleme reaksiyonların yayılmasını önlerler. Üçüncül antioksidanlar ise onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimleri (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve tranferazlar gibi) kapsamaktadır. Üçüncül antioksidanlar son basamakta mevcut hasarı onararak organizmayı eski haline getirmeye çalışırlar [Willcox ve ark., 2004].

Antioksidanlar, çeşitli mekanizmalarla oksidanları etkisiz hale getirmekte ve bu işlemi dört yolla gerçekleştirmektedirler.

1) Temizleme (Scavenging ) etkisi

Enzimler tarafından yapılan, oksidanları tutma ve zayıf bir moleküle dönüştürme şeklinde oluşturulan etkidir.

2) Baskılama (quencher) etkisi

Oksidanlara bir elektron aktararak onları etkisiz hale getiren vitaminler ve flavanoidler bu şekilde etki etmektedirler.

3) Onarma etkisi

Hasar görmüş hedef moleküllerin hasar sonrası tamir işlemidir.

4) Zincir koparma etkisi

Oksidanları bağlama yolu ile oksidanların etkisini önlemektedir. Ağır metaller, hemoglobin ve E vitamini bu şekilde etkili olmaktadır [Şenel, 2005].

Antioksidanlar kaynakları bakımından, sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar [Altuğ , 2001].

### **2.3.1. Sentetik antioksidanlar**

Bu tip antioksidanlar, gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Antioksidan grubu katkı maddeleri, sanayide bitkisel ve hayvansal yağ içeren maddelerin üretimi, depolanması, taşınması ve pazarlanması sırasında meydana gelecek otooksidasyondan kaynaklanan zararları önlemede en önemli katkı maddeleridir. Antioksidanlar gıdalarda meydana gelebilecek bozulma ve acımayı da engeller. Bunların önemli özellikleri, ortamda pek az miktarda, binde ve hatta on binde bir oranında bulunsalar bile etkin olmalarıdır. En çok kullanılan sentetik antioksidanlardan bazıları; buthylated hydroxyanisole (BHA), buthylated hydroxytoluene (BHT), tertiary-buthylhydroquinone (TBHQ) ve propyl gallate (PG),

kalsiyum disodyum etilen-diamin-tetra-asetat (EDTA) [Alaca ve Arabacı, 2005]. BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanlar yağ içeren yiyeceklere ilave edilerek yağ oksidasyonunu yavaşlatmakta ve önlemektedir [Lee ve ark., 2002]. Sentetik antioksidanlar avantajları nedeniyle kullanılmakla birlikte, içeriğindeki kanserojen maddeler nedeniyle, yapılan bazı çalışmalarda potansiyel sağlık tehlikesi oluşturduğu tespit edilmiştir [Hettiarachchy ve ark. 1996; Lee ve ark., 2002]. Bu nedenle, mümkün olduğunca sentetik antioksidanlardan uzak durulması ve doğal antioksidanların kullanılması tercih edilmelidir.

### **2.3.2. Doğal antioksidanlar**

Yapılan araştırmalar, bitkilerde doğal olarak ortaya çıkan antioksidanlar olduğunu göstermiştir [Lee ve ark., 2002]. Doğal kaynaklı antioksidanlar, vitaminler, flavonoid ve fenolik asit içeren polifenoller, tıbbi ve baharat bitkilerindeki uçucu yağ bileşikleri olarak sınıflandırılmaktadır [Namiki, 1990; Lee ve ark., 2002]. Buna göre, sebzeler, tahıllar, meyveler, yağlı tohumlar, yapraklar, kökler, tıbbi ve baharat bitkileri birer doğal antioksidan kaynağıdır. Yapılan araştırmalar bitkilerden elde edilen antioksidanların düşük konsantrasyonlarda antioksiadan, kritik değerlerin üzerinde ise prooksidan özellik gösterdiğini belirtmektedir.

### **2.4. Polifenoller**

Fitokimyasallar, bitkiler tarafından üretilen, sağlıklı yaşam için önemli rolleri olan bileşiklerdir. Bu bileşikler meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, kabuklu yemişlerde ve diğer bitkilerde bulunur. Bilim insanları, binlerce farklı türde çeşitli fitokimyasallar bulmuşlardır. Bu fitokimyasallardan en iyi bilinenleri, betakaroten, askorbik asit (C vitamini), folik asit ve E vitamini. Fitokimyasallar insan sağlığını olumlu yönde etkilemekte ve özellikle bağışıklık sistemini kuvvetlendirerek, hastalıklara karşı direnci artırmaktadır. Fitokimyasalların en önemli etkisi, antikarsinogenik ve antimutajenik olmalarıdır [Surh, 2003; Kwon ve ark., 2007].

Bitkilerde en fazla bulunan ve en önemli bileşenlerden birisi olan fenolik bileşikler, en geniş kullanım özelliğine sahip olan fitokimyasallardandır [Han ve ark., 2007].

Polifenoller, yapılarında hidroksil veya karboksil grupları taşıyan, insan ve hayvan diyetlerinde büyük yeri olan organik yapılu bileşikleridir. Birçok fenolik bileşiğin antioksidan, antikanserojenik, antimutajenik, antiaterosklerotik, antibakteriyel, antiviral ve anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu belirlenmiştir [Barberan ve ark., 2001; Escarpa ve Gonzales, 2001; Han ve ark., 2007]. Polifenollerin ayrıca kolesterolü düşürücü, eikosonoid sentezini düzenleyici, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe edici, hipertansiyonu ve kalp damar hastalıklarını önleyici etki göstermeleri nedeniyle sağlık açısından da oldukça yararlı bileşikler olduğu bildirilmiştir [Hollman ve Katan, 1999; Karadeniz ve Ekşi, 2002]. Bitkilerin yapılarında sekonder metabolitler şeklinde oluşan polifenolik bileşikler odunlaşma, pigmentasyon, tozlaşma, allelopati, patojen ve predatör direnci ile büyüme gibi çeşitli fizyolojik olaylar için de gereklidir [Baidez ve ark., 2007]. Sebze ve meyvelerdeki fenolik bileşikler, kemopreventif olarak önemli rol oynarlar; örneğin elmada bulunan fenolik maddeler kolon kanserini önlemede oldukça büyük önem taşımaktadır [Veeriah ve ark., 2006]. Her bitkiye göre miktarı ve kompozisyonu değişen polifenoller, meyve ve sebzelerin kendine özgü buruk tadını da vermektedir [Hagerman ve ark., 1998].

Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklere sahip olan 112 adet Çin bitkisel ilacın antikanser etkili, 133 adet Hindistan geleneksel ilacının ve yaklaşık 50 yenilen bitkinin antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir [Cai ve ark., 2004; Hu ve ark., 2007; Huang ve ark., 2007].

Yenilen ve aynı zamanda ilaç olarak kullanılan pek çok bitki türünün yapısında fenoller, fenilpropanoidler, benzoik asit türevleri, flavonoidler, stilbenler, tanninler, kurkuminoidler, kumarinler, lignanlar, quinonlar ve feniletanoidler gibi fenolik bileşikler içerdikleri belirlenmiştir [Fresco ve ark., 2006]. Günümüzde 8000'den fazla tipi belirlenmiş olan ve özellikle bitkisel çaylarda bol miktarda bulunan polifenoller, biyolojik açıdan oldukça aktif yapılardır [Bravo ve ark., 1998]. Bitkilerin fizyolojik ve farmakolojik özellikleri ve birbirlerinden farklılıkları, onların antioksidan, radikal süpürücü ve detoksifikasyon enzimlerini düzenleyici özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu farklılıkları da fenolik yapılarındaki hidroksil

gruplarının sayısı ve pozisyonu ile hidroksil gruplarının glikolizasyonu ve yer değiştirmesine bağlıdır [Heim ve ark., 2002; Duthie ve ark., 2003; Cai ve ark., 2006]. Bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerin yararlı etkilerini řu şekilde sıralamak mümkündür [Wollgast ve ark., 2000].

- Serbest radikal oluşumunu engelleyerek kanser oluşumunu engeller.
- Kardiyovasküler geğirgenliği azaltarak kalp hastalıklarını engeller.
- Başta flavanoid grubundakilerde olmak üzere, polifenollerin antitrombotik, antimikrobik ve antiinflamatuvar (iltihap giderici) etkileri vardır.
- Fenolik asitler, hidrolize olabilen taninler ve bazı flavanoidler antimitojen ve antikanserojen etki göstermelerinin yanında, kötü huylu tümör oluřumunu engelleme, prokanserojenlerin aktivasyonunda rol alan enzimlerin aktivitesinin dūřürülmesinde rol oynamaktadırlar.
- Vücutta yüksek seviyeye ulaşmış olan metallerle kompleksler oluşturarak, bunların toksik ve alerjik etkilerini indirgemektedirler.

Polifenollerin ayrıntılı olarak sınıflandırılması Çizelge 2. 4'de verilmiştir [Ferguson, 2001].

Çizelgede belirtilen ve bu çalışmada kullanılacak olan;

- (-)-Epigallocateşingallat, yeşil çayda bulunan ve flavanoidler sınıfına ait bir bileşendir.
- Kafeik asit fenetil ester bal peteğinde bulunan bir polifenoldür ve hidroksisinnamik asit sınıfına ait bir polifenoldür [Ferguson, 2001].

Çizelge 2.4. Polifenollerin iskelet yapılarına göre sınıflandırılması

<i>Ana İskeleti</i>	<i>Sınıfı</i>	<i>Örnek</i>
C6-C1	Fenolik Asitler	Gallik asit, Salisilik asit, Vanilik asit, Tannik asit
C6-C3	Hidroksisinnamik Asitler Kumarinler	Kafeik asit, Ferulik asit, Aeskulatin, Umbelliferon
C6-C2	Asetofenonlar Tirozinler Fenilasetik asitler	3-asetil-6-metoksi benzaldehit, Tirosol, p-hidroksifenil asetat
C6-C-C6	Ksantonlar	Mangiferin
C6-C2-C6	Stilbenler Antrakinonlar	Resveratrol
C6-C3-C6	Flavanoidler İzoflavanoidler	Kateşin, Apigenin, Quercetin, Kaempferol, Genistein
(C6-C3) <sub>n</sub> (C6) <sub>n</sub>	Ligninler Kateşoller	Melanin

Çizelgede belirtilen flavanoidler grubuna ait polifenoller, renk pigmentleri olan bitkilerde daha çok gözlenmektedir. Yalnızca bu grup 5000'den fazla bileşik içermektedir. Bununla beraber flavonlar, flavanoller, izoflavanoidler ve proantosiyandinleri de içine alan 13 alt grup daha bulunmaktadır [Ferguson, 2001].

Günümüzde kullanılan polifenoller, *in vivo* çalışmalarda besinsel antioksidanlar olan C ve E vitaminlerinin eksikliğinde proteinlerde, lipidlerde ve DNA'da meydana gelen oksidatif hasarlara karşı antioksidan özellik göstermektedir.

Besinsel antioksidanların eksikliği sonucu oluşan hasarlar, kronik hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir [Diplock ve ark., 1991].

Bilinen 8000 polifenolden sadece 200 tanesinin mutajenik özellikleri incelenmiş olup, bu etkileri daha ziyade bakteriyel mutajenite testi ile değerlendirilmiştir [Czeczot ve ark., 1990]. Yapılan çalışmalarda, quercetin gibi bazı polifenollerin DNA'ya direk bağlandığı ve bu durumun bakteriyel mutajenitede önemli olduğu belirlenmiştir [Alvi ve ark., 1986]. Taninler, delfinidin ve prosiyanidin bakteriyel mutajenite testinde ne çerçeve kayması nede baz değişimi mutasyonlarına neden olmazken, V79 Çin hamsteri hücrelerinde mikronükleus oluşumunu ve kromozom hasarlarını arttırmıştır [Ferguson ve ark., 1985]. Bu sonuç, bakteriyel testlerde negatif özellik göstermiş olan polifenollerin, memeli hücrelerinde aynı sonuçları oluşturmayabileceğini göstermektedir. Polifenollerin, yüksek yapıli organizmalar üzerindeki mutajenik etki verileri sınırlıdır.

Tannik asit *Drosophila melanogaster* de dişi üreme hücrelerinde eşeye bağlı resesif letaliteye, eşey kromozomu kayıplarına, mozaizm ve ayrılmamaya neden olurken, kanatlarda zayıf pozitif mutasyona neden olduğu belirlenmiştir [Cunha ve ark., 1994]. Quercetin bakterilerde mutajen özellik göstermesine karşılık, memeli hücrelerinde rekombinojen özellik göstermektedir [Suzuki ve ark., 1991].

Son zamanlarda insanların polifenol alımları ile kanser gelişimi ve genomik stabilite arasındaki ilişki araştırılmaktadır. Hollanda ve ABD'de çeşitli insan populasyonlarında yapılan çalışmalarda, polifenol kullanımı ile kanser gelişimi, kalp hastalıkları ve başka hastalıklar arasında ters yönlü ilişki olduğu saptanmıştır [Hertog ve ark., 1993].

Bunun yanı sıra yapılan in vitro çalışmalar ve hayvan çalışmaları tüm polifenollerin aynı özelliklere ve etki şekillerine sahip olmadığını göstermiştir. Yapılan çalışmaların sonuçlarında polifenollerin tek başlarına etkili olmadığı, etkilerinin ortaya çıkmasında polifenollerin temel yapıları, alkalizasyon ya da glikolizasyon



dereceleri, diğ er fenolik maddelerle konjugasyonları ve polimerizasyonları gibi çeşitli etkenlerin de rol oynadığı belirlenmiştir [Ferguson, 2001].

Polifenoller genellikle diyet proteinlerinin alımını azaltıp sonrasında fekal nitrojen seviyesini arttırdıkları için antinutrient olarak adlandırılmaktadır [Longstaff ve ark., 1991; Alzueta ve ark., 1992]. En az üç flavanol ünitesi bulunduran polifenoller proteinlerin çökmesine neden olmaktadır. Antinutrient özelliğ in de bu proteinlerin çökmesinden ya da polifenollerin direk olarak proteinleri bağlamasından dolayı sindirim enzimlerinin etkinliğini kaybetmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Çeşitli polifenoller, hidrolazlar, izomerazlar, oksijenazlar, oksidoredüktazlar, polimerazlar, fosfatazlar, protein fosfokinazlar ve aminoasit oksidazların içinde bulunduğ u geniş enzim grupları üzerinde inhibitör etki göstermektedir [Ferguson, 2001]. Bazı polifenoller demir ve bakır gibi metallerle bağ oluşturarak kolayca bağırsaktan emilebilmektedir [Reddy, 1991]. Bu özellik galliol ve kateşil grubu içeren polifenollere özgü bir özelliktir [Brune ve ark., 1989]. Yeş il ç ayda ve bitki ç aylarında bulunan kateş inler, kahve içerisinde bulunan fenolik asitler, kakao ve siyah ç ay içerisinde bulunan yoğunlaşmış polimerize ürünler ve ş arapta bulunan polimerize tanin içermeyen polifenoller bu özelliğ i göstermektedir [Gillooly ve ark., 1983; Garcia-Lopez ve ark., 1990; Hurrell ve ark., 1998].

Polifenoller memeli hücrelerinde yapılan ç alışmalarda anti-karsinojenik ve anti-antherojenik süreçlerde *in vivo* ' da farklı prosesler izlemektedir. Bu prosesler gen ekspresyonu, apoptoz, plattellet agregasyonu, kan damarı genişlemesi, hücre iç i sinyalizasyonu, P-glikoprotein aktivasyonu, karsinojen aktivasyonu ve detoksifikasyonu ile ilişkili enzimlerin modülasyonunu kapsamaktadır [Duthie ve ark., 2000]. Ekstra durumlar dışında polifenollerin genomik stabilitenin korunmasında da faydalı olduğ u belirtilmiştir [Hursting ve ark., 1999].

## 2.5. Flavanoidler ve Hidroksisinnamik asitler

Flavanoidler, bitkilerin sahip olduğu ve 4000'den fazla varyasyonu olan bir polifenol sınıfıdır [Ren ve ark. 2003]. Bu bileşiklerin hepsi iki aromatik halka (A ve B halkaları) içeren ana bir fenilbenzopiren iskeleti ve ilave olarak genellikle bir piren halkası yada C halkası ihtiva etmektedir [Cai ve ark., 2004]. Flavanoidler, meyve ve sebzelerde en çok bulunan polifenollerden olup, bunlarla ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır [Cai ve ark., 2004; Shan ve ark., 2005; Huang ve ark., 2008, 2007].

Flavanoller soğan, brokoli, domates, vişne, elma, çay, kırmızı şarap, kimyon, kara kimyon gibi bitkilerde ve antikanser etkili *Sophora japonica* ve *Rosa chinensis* gibi çiçeklerde, *Alpinia officinarum* rizomları ile *Crataegus pinnatifida* meyvelerinde yüksek miktarda bulunmaktadır [Cai ve ark., 2004; Shan ve ark., 2005]. Flavanoller içerisinde quercetin sebze ve meyvelerde bol bulunan, batı ülkelerinde günlük alım miktarı 25-30 mg olan ve çok tüketilen bir flavanoiddir [Luk ve ark., 2007].

Lignanlar cis-*o*-hidroksisinnamik asitten ve dimerleşmesinden köken almaktadır [Cai ve ark., 2006]. Lignanlar bitkilerde serbest olarak ve az miktarda glikozidaz formunda bulunmaktadır [Fresco ve ark., 2006]. Önemli bir tümör ilacı olan podophyllotoxin, *Podophyllum peltatum* bitkisinden izole edilmiş bir lignandır ve Amerikalılar *Podophyllum emodi* var. *chinese* bitkisinin yumrularından elde ederek kullanılmaktadırlar [Efferth ve ark., 2007].

Kumarinler, trans-hidroksisinnamik asitlerin izomerizasyona ve hidroksilasyona uğramış yapısal analogudur. Kumarinler, bitkilerin yapısında serbest olarak ve glukosidler olarak bulunurlar [Fresco ve ark., 2006]. Bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, zeytinyağında, çeşitli içeceklerde (çay, kahve) de kumarinler yoğun olarak bulunmaktadır [Sonnenberg ve ark., 1995; Fresco ve ark., 2006].

Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin gallat (EGCG) hem ilaç etken maddesi olarak ve hem de diyetle oldukça önemli yeri olan flavanollerdir [Ren ve ark., 2003; Fresco ve ark., 2006].

Hidrosisinnamik asitlerin esterleşmiş formu olan kafeik asit kenetil ester (CAPE) yapı olarak iki halkasal yapı içerir ve flavaniodlere bezemektedir. Yapısındaki iki halkadan biri iki hidroksil grubu taşır ve bu hidroksil grupları sayesinde redoks reaksiyonlarında CAPE aktif rol oynayarak ve E, C vitaminlerinde olduğu gibi antioksidan etki göstermektedir [Koltuksuz ve ark., 2000].

## 2.6. (-)- Epigallokateşingallat

Kateşinler, polifenoller grubunda yer alan ve meyvelerde ve çay, şarap gibi içeceklerde ve çikolatada bulunan flavanollerdir. Bu grup flavanoller majör olarak kateşin, epikateşin ve epigallokateşin alt gruplarını içermektedir. Kateşinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle bilinirler ve bitkilerdeki bu polifenoller vasküler, viral, gastrointestinal ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılırlar [Gerhauser, 2005; Shimizu ve ark., 2005].

Çay yaprağında bol miktarda bulunan polifenollerin yaklaşık  $\frac{3}{4}$ 'ünü flavanoller, flavanollerin de % 60-70'ini (-)-epigallokateşin-3-gallat oluşturmaktadır [Katiyar ve ark., 1997]. Çayın antioksidan etkili bileşikleri olan polifenoller kuru çayın %35'ini oluştururlar. Başlıca polifenoller; flavanoller (kateşinler), flavonlar ve fenolik asitlerdir. Hem siyah hem de yeşil çaydaki en önemli kimyasallar ise kateşinlerdir [Shahidi ve ark., 1995].

Taze çay filizinde bulunan kateşinler ve oranları(%, kuru verim):

- (-)-epigallokateşingallat (EGCG) %9-13,
- (-)-epikateşingallat (ECG) %3-6,
- (-)-epigallokateşin (EGC) %3-6,

- (-)-epikateşin (EC) %1-3.
- Gallokateşin (GC) %3-4
- Kateşin(C) %1-2

Kateşinler yeşil çay yapraklarındaki ana biyoaktif bileşenleri oluşturur ve bir bardak yeşil çayda 100-200 mg kateşin bulunmaktadır [Xuczaj ve ark., 2005; Zaveri, 2006].

Çay dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir. Kişi başına düşen çay tüketiminin yılda ortalama 40 L olduğu belirtilmektedir [Sumpio ve ark., 2006]. Bu rakam ülkeler arasında farklılık göstermekle birlikte, ülkemizde kişi başına yıllık çay tüketiminin bu ortalamanın üzerinde olduğu düşünülmektedir. Yılda tüketilen 2,5 milyon ton çayın %78'i siyah çay, %20'si yeşil çay ve %2'si oolong çayıdır. Yeşil çay *Camellia sinensis*'in yapraklarının düşük buharlamadan geçirilmesiyle elde edilir. Taze çay (*Camellia cinensis*) yapraklarının kısmi fermantasyonuyla oolong çayı, kontrollü fermantasyonu ile ise siyah çay üretilir.

Dünyada çay imalatının ortalama %76'sını siyah çay oluşturmakta ve çoğunlukla batı ülkeleri ile bazı Asya ülkelerinde tüketilmektedir. Yeşil çay, total çay üretiminin yaklaşık %22'sini oluşturmaktadır ve çoğunlukla Asya ülkelerinde tüketilirken, kuzey Afrika ülkelerinde ve orta Asyada çok az tüketilmektedir. Oolong çayı ise total çay üretiminde yaklaşık olarak %2'lik bir dilime sahiptir ve genellikle Çin ve Tayvan' da tüketilmektedir [Trevisanato ve ark., 2000; Yang ve ark., 2000].

Yeşil çay üretimi, polifenol oksidaz dahil tüm yükseltgenme enzimlerini inaktif hale getirmek için yüksek sıcaklık veya buharla şok soldurma, kıvrırma ve kurutma; siyah çay üretimi, soldurma, kıvrırma, enzimatik oksidasyon ve kurutma aşamalarını; oolong çay üretimi ise hafif soldurmada sonra hafif kıvrırma, kısmen enzimatik oksidasyon ve kurutma aşamalarını içermektedir [Katiyar ve ark., 1997]. Siyah çaya, işleme sırasında uygulanan oksidasyon sonucu, flavanollerden teaflavinler ve tearubiginler gibi sekonder polifenoller oluşmakta, flavanol içeriği azalmaktadır [Langley-Evans, 2000; Richelle ve ark., 2001].

Siyah çay, yaprakların yavaş yavaş kurutulmasıyla elde edilirken, yeşil çay yaprakların toplanır toplanmaz hemen kavrulup hızlı bir şekilde kurutulması ile elde edilir. Siyah çay kurutulurken oksijenle tepkimeye girer, yeşil çayın kurutma sırasında tepkimeye girmesine izin verilmez.

Çizelge 2.5. Çay Yapağıının Bileşimi [Trevisanato ve ark., 2000; Tosun ve ark., 2005].

<i>Bileşen</i>	<i>% kuru madde</i>	<i>Bileşen</i>	<i>%kuru madde</i>
Flavanoller(Kateşinler)	17-30	Kafein	3-4
Epikateşin(EC)	1-3	Aminoasit ve protein	15-19
Epikateşin gallat(ECG)	3-6	Basit karbohidratlar	4
Epigallokateşin(EGC)	3-6	Polisakkaritler	13
Epigallokateşingallat(EGCG)	9-3	Kül	5
Kateşin(C)	1-2	Selüloz	7
Gallokateşin(GC)	3-4	Lignin	6
Flavanoller ve flavonol glikozitleri	3-4	Lipitler	2-3
Leykoantosiyeninler	2-3	Organik asitler	0,5-1,5
Polifenolik asitler ve depsitler	5	Pigmentler	0,5
Toplam polifenoller	30-36		

İşleme yöntemine bağlı olarak çayın fenolik içeriği de değişmektedir. Yapılan araştırmalardan elde edilen verilere dayanılarak, Çizelge 2.6'da çay tiplerine göre değişen fenolik madde kompozisyonları gösterilmiştir [Lee ve ark., 2000; Wang ve ark., 2000; Tosun ve ark., 2005].

Çizelge 2.6. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu

	<i>Yeşil çay</i>	<i>Siyah çay</i>	<i>Oolong çay</i>
Epikateşin	6,06a; 1,0-9,54b; 7,22-13,3c; 0,55-0,87e	4,0 b; 4,1d; 0,04e	1,75a; 0,34e
Epikateşin gallat	5,34a; 3-4,92b; 1,42-4,54c; 1,95-2,91e	1,19-11b; 8,0d	3,58a; 0,63e
Epigallokateşin	36,53a; 2,0-36,2b; 3,94-7,92c; 0,44-0,88e	0,9-6,0b; 10,5d; 0,19e	7,70a; 0,38e
Epigallokateşin gallat	18,10a; 6,0-32,6b; 5,55-10,4c; 13,37-13,74e	0,95-12,0b; 16,6d; 0,3e	8,99a; 3,62e
Gallokateşin gallat	0,26-0,38e	-	0,11e
Gallokateşin	2,57-2,81b	0,40-1,57b	-
Gallik asit	0,74-0,78b; 0,23-0,52e	2,79-3,33b; 1,83e	0,58e
Teaflavin	-	2,5d	0,66a
Tearubigin	-	59,4d	-

a: mg/g; b: mg/100 mL; c: %; d: mg/g (kuru maddede); e:% (kuru maddede)

Yapılan çalışmalar, siyah çayın en önemli kateşinlerinin, siyah çaya rengini ve buruk aromasını da veren theaflavinler (TF) ve thearubiginlerin (TB) olduğunu göstermiştir. Siyah çay ve yeşil çayın etken maddelerinin hastalıklara karşı korunmada benzer etkiler gösterdiği belirlenmiştir [Yang ve ark., 2000; Leung ve ark., 2002; Hadler ve ark., 2006].

Epidemiyolojik çalışmalar hem yeşil hem de siyah çayın her yaş grubu için başta koroner kalp hastalıkları, inme, kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, mide ve kolorektal hastalıklar, çeşitli kanser türleri, karaciğer rahatsızlıkları ve artrite karşı koruyucu, ayrıca antiviral ve antiinflamatuvar ve kemik yoğunluğunu düzenleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Hem yeşil hem de siyah çayın, içeriğinde bulunan polifenolik bileşikler nedeniyle antioksidan bir içecek olduğu ve kronik

hastalıklardan koruyucu etkisini bu yolla yaptığı belirtilmektedir [Weisburger ve ark., 2002; Cooper ve ark., 2005; Gardner ve ark., 2007].

Çayın polifenolik bileşikleri, lipid peroksidasyonunu önleyerek ve serbest radikal süpürücü özellikleriyle antioksidan etki gösterirler [Mukai ve ark.,2000]. Yapılan çalışmalar çay bileşiklerinin farelerde karsinogenezi önlediği ispatlanmıştır [Lin J.-K., ve ark., 2000]. Yeşil çaydan izole edilen çay kateşinleri ve teaflavinlerin (bilhassa teaflavingallat), antiviral (örn., grip), antibakteriyel (örn., karyojenik bakteri, *Streptococcus mutans*, *Helicobacter pylori*) ve ağız kokusunu önleyici ağız deodorantı etkileri gösterilmiştir.

Çay kateşinlerinin en önemlileri kateşin ve epikateşindir. (+)Kateşin, C halkasında beta hidroksil (OH) grubu taşırken, (-)epikateşin C halkasında alfa OH grubu taşımaktadır [Mendoza-Wilson, ve ark., 2006]. (-)-Epigallokateşingallat (EGCG)'in yapılan pek çok çalışma ile en etken çay polifenolü olduğu belirlenmiştir [Baek ve ark., 2005; Doss ve ark., 2005; Gramza ve ark., 2005; Rahman ve ark., 2005; Sutherland ve ark., 2006].

Araştırmacılar, çayın, özellikle yeşil çayın kanseri önleyici özelliği üzerinde yıllardır çalışmalar yapmaktadırlar. Ancak bugüne dek, bunun nasıl olduğu kesin olarak bilinmiyordu. Jankun ve ekibi, çaydaki kateşinin, (-)-epigallokateşin gallat olarak bilinen şeklinin, insandaki kanser türlerinde yaygın olarak görülen ürokinazı tasfiye edici şekilde tepkime gösterdiğini belirlemiştir. Farelerde yapılan deneyler, ürokinazı tutan kateşin etkinliğinin, deney hayvanlarındaki tümörleri küçülttüğünü, hatta tümüyle yok edebildiğini ortaya çıkarmıştır [Jankun ve ark., 1997]. Yeşil çayın yapısında bulunan EGCG'den dolayı, vitamin C ve E'den 100-25 kat daha güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir [Cao ve ark., 2002].

Çay kateşinlerinin antioksidan aktiviteleri büyükten küçüğe doğru epigallokateşin gallat>epigallokateşin>epikateşin gallat> epikateşin şeklinde sıralanmaktadır [Vinson ve ark.,1998]. Başka bir çalışmada ise; epigallokateşin gallat> epikateşin gallat> epikateşin> epigallokateşin olarak verilmiştir [Benzie ve ark., 1999].

Yeşil çay polifenolleri çeşitli tümör hatları için sitotoksik etkilidir [Paschka ve ark., 1998; Okabe ve ark., 1999]. Bazı çalışmalar yeşil çayın anti lösemik etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur [Asano ve ark., 1997]. Yeşil çay polifenolleri, apoptoza neden olmaktadır. Bu mekanizma T hücrelerinde bulunan protein reseptörleri ile, protein kinaz C nedenli, DNA polimeraz II nedenli, ürokinaz kaynaklı, DNA topoizomeraz II nedenli, aktivatör protein 1 (AP-1) ile, bağlayıcı protein ile ve vasküler endotelial büyüme faktörü ile olabilmektedir [Cao ve ark., 1999; Fujiki ve ark., 1999].

Yeşil çay içicilerinde doğal yolla oluşan ve yeşil çay yapraklarından ayrıştırılan serumda ve dokularda bulunan *in vitro* konsantrasyonlarda EGCG'nin, dihidrofolatredüktaz (DHFR) inhibitörü etkisi gösterdiği belirlenmiştir (0.1-1.0 µmol/L). Bu veriler yeşil çay içiminin kanser üzerinde kesin etki gösterdiğinin ilk kanıtıdır ve neden yeşil çayın antikarsinojenik ve antibiyotik olarak alternatif tıp adına kullanıldığı anlaşılmıştır [Navarro-Pera'n ve ark., 2005].

Yeşil çayın hayvan modellerinde deri, akciğer, özefagus ve gastrointestinal kanserlere karşı kemopreventif etki gösterdiği belirlenmiştir [Kuroda ve ark., 1999].

Yeşil çay polifenollerinin, *S.typhimirium* TA98 ve T 100 suşlarında, aril ve heterosiklik aminler, aflatoksin B<sub>1</sub>, benzo(a)piren, 1,2-dibromoeter ve 2 nitroproponin mutajenitesini inhibe ettiği belirlenmiştir [Weisburger ve ark., 1996]. Li ve arkadaşları, yeşil çay pigmentleri, çay polifenolleri ve çayın dimetilbenzoat (DMBA) kaynaklı karsinogenez önleyici etkilerini, syrian hamsterlerinde çalışmıştır. Çalışılan oral hücrelerin MN frekanslarında zamanla azalma gözlenmiştir [Hsu ve ark.,2003]. EGCG'nin diometrik bir antibiyotik olan bleomisin'in neden olduğu iki lenfoid hücre hattında kromozomal hasarları azalttığı belirlenmiştir [Hsu ve ark., 2003].

Epidemiyojik çalışmalar yeşil çay polifenollerinin en etkeni olan EGCG'nin anlamlı kanser önleyici etkilerinin olduğunu göstermiştir. EGCG'nin kanser önleyici etkileri



antimutajenik aktivitesinden, oksidatif DNA hasarı baskılayıcı özelliğinden ve tümör hücrelerinde apoptozu indüklemesinden kaynaklanmaktadır [Chung ve ark., 2001; Roy ve ark., 2001; Yokoyama ve ark., 2001].

EGCG'nin etkileri, Çin hamsterinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) tarafından hasara uğratılmış V79 hücre hattında, DNA hasarı ve mikronükleus formasyonu ile, insan K-562 lösemi hücre hattında ise apoptoz çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bilgilere göre, EGCG'nin, hasarlı hücreleri apoptoza yönlendirmek suretiyle genetik hasarlardan koruduğu belirlenmiştir [Madhumita ve ark., 2003].

Nick ve arkadaşları, kültüre edilmiş insan fibroblast hücrelerinde EGCG'nin UV hasarı üzerine etkilerini comet testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, EGCG'nin UV kaynaklı DNA hasarlarını azalttığı belirlenmiştir [Morley ve ark., 2005]. EGCG'nin göğüs kanseri üzerindeki etkisi, Kuzey Çinde 20-87 yaş aralığında göğüs kanserli kadın hastalarda araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre, düzenli EGCG alınımının göğüs kanserine karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir [Min ve ark., 2007].

Miao ve arkadaşlarının farelerde yaptığı çalışmada, EGCG'nin D-galaktoz tarafından oluşturulan hasara karşıtı nöroprotektif etkisini incelemişler ve EGCG'nin antiapoptotik ve antioksidan mekanizmalar ile nöroprotektif etki gösterdiğini belirlemişlerdir [Miao ve ark., 2009].

## 2.7. Kafeik asit fenetil ester

Kimyasal adı 3,4-dihidroksi sinamik asit olan kafeik asit fenetil ester (CAPE), kafeik asitin esterleşmesi sonucunda sentezlenen, kırmızı renkli meyvelerde (yaban mersini, böğürtlen, çilek, vişne, kiraz, mürver, kuş üzümü vb.), *Echinacea* cinsi bitkilerde, ayçekirdeği tohumlarında ve turpgillere ait sebzelerde bulunan bir polifenoldür. *Echinacea purpurea* kökleri, kikorik asit (% 1,2- 3,1), tartarik asit, kafeik asit ve klorojenik asit olmak üzere kafeik asit türevleri, alkilamidleri (% 0,01

– 0,04), poliasetilen türevleri, glikoproteinleri, karyofilen, humulen, epoksit gibi esansiyel yağları (% 0,2) içerir. *Echinacea purpurea* topraküstü aksamında uçucu yağlar (% 0,08 – 0,32), flavonoidler, alkamidler, polienler ve kafeik asit türevleri bulunur.

CAPE, meyve ve sebzelerin dışında, bal arılarının ürettiği propolisin de etken maddesidir [Watternberg ve ark., 1980; Özyurt, ve ark., 2006]. Propolisin içeriğinin % 50' den fazlasını fenolikler (flavonoidler: flavonlar, flavononlar, flavonoller) ile fenolik bileşikler (fenolik asitler ve esterleri, kumarinler, ketonlar ve diğerleri) ve en az 4 çeşit kafeik asit esteri (kafeik asit benzil ester, salisilik asit benzil ester, sinamik asit benzil ester ve kafeik asit fenetil ester -CAPE) oluşturur [Gabrys ve ark., 1986; Bankova ve ark., 1992].

CAPE, yapısal olarak flavanoidlere benzemekte ve iki halkasal yapı içermektedir. Bu halkasal yapılardan bir tanesinde, iki adet hidroksil grubu taşımaktadır. Bu OH grubu sayesinde, redoks reaksiyonlarında aktif bir rol oynayarak, E vitamini ve C vitamininde olduğu gibi, antioksidan özellik göstermektedir [Koltuksuz ve ark., 2000; Özyurt ve ark., 2006].

CAPE'nin, antioksidan, anti-kanserojen, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-anjiogenik, anti-invazif, anti-metastatik, immünodulator, immünostimülatör ve yara iyileşmesini arttırıcı etkileri vardır. 10 mM konsantrasyonda, insan nötrofillerinde reaktif oksijen türlerini ve xanthine/xanthine oksidaz sistemlerini engelleyici etkisi vardır [Koltuksuz ve ark., 2001; Un-Ho ve ark., 2008]. CAPE'nin, karaciğeri diyabetik oksidatif hasardan koruduğu, cisplatinin oluşturduğu hepatik ve renal hasardan koruduğu ve doxorubicin ile oluşturulan nefrotoksisiteye ve cisplatin tarafından oluşturulan kromozom hasarlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir [Yagmurca ve ark., 2004; Yilmaz ve ark., 2004; Yilmaz ve ark., 2005; Yilmaz ve ark., 2010].

Propolisin antimikrobik etkinliğinin esas olarak pinosembrin, pinobanksin gibi flavonoidler ve benzil pumarat ve kafeik asit esterlerine bağlı olduğu bildirilmiştir [Ikeno ve ark., 1991]. Propolis içindeki antibakteriyal etki gösteren maddelerin en

önemlisi kafeik asit ve kafeatlardır [Bankova ve ark., 1992]. Propolisin aköz ekstraktının dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek anti inflamatuvar etki oluşturduğu ve bu enzim üzerindeki etkisinin kısmen kafeik asit esterlerine bağlı olduğu gösterilmiştir [Strehl ve ark., 1994].

CAPE'in, propolisin karsinostatik etkisinden sorumlu olan en önemli madde olduğu düşünülmektedir [Grunberger ve ark., 1988]. CAPE, adenovirüsler ile transforme olmuş rat embriyo fibroblastlarının çoğalmasını engeller. Kültür ortamında, transforme sıçan ve insan hücrelerinde apoptozisi uyararak transforme hücrelerin gelişimini yavaşlatır [Hall ve ark., 1986]. CAPE, transforme hücrelere karşı seçici olarak sitostatik etki gösterirken, normal fibroblastlara karşı çok az etkili ya da hiç etkisiz olduğu gösterilmiştir [Su ve ark., 1994; Chiao ve ark., 1995].

Bütün bunlara ilave olarak, CAPE, insan tümör hücrelerinin çoğunun çoğalmasını engelleyebilir ve bu etkisini mitojenik uyaran tarafından indüklenen oksidatif süreci engelleyerek meydana getirebilir. Metil kafeat, fenil etil kafeat ve fenil etil dimetil kafeat gibi kafeik asit esterlerinin üçü de kemo profilaktik etkiye sahiptir. Bu maddelerin her üçünün de azoksi metil ile oluşturulan kolon kanseri üzerine inhibitör etkisi belirlenmiştir. İnsan kolon adeno karsinomunda bu üç kafeik asit esterinin de tirozin protein kinaz enziminin etkisini önemli miktarda engellediği gösterilmiştir [Rao ve ark., 1993]. Başka bir çalışmada, azoksi metil tarafından oluşturulan kolon kanserinin inhibisyonunda, fenil etil metil kafeatın, kafeik asit esterleri içinde en etkili olduğu gösterilmiştir [Hepşen ve ark., 1996].

Sprague-Dawley erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada bir antitümöral ajan olan bleomisin (BL) kaynaklı pulmoner fibrosis üzerinde CAPE ve E vitaminin iyileştirici etkileri araştırılmıştır. CAPE ve E vitaminin, pulmoner fibrosis enzim aktivitelerini bozarak hasara neden olan BL'nin etkisini azalttığı gözlenmiştir. Bu etkinin, enzim aktiviteleri bozulurken oluşan serbest radikallerin, uygulanan antioksidan karakterli E vitamini ve CAPE'nin radikal süpürücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür [Özyurt ve ark., 2006].

Wistar albino erkek sıçanlarında, CCl<sub>4</sub> kullanımı ile akciğer dokusunda meydana gelen hasara karşı CAPE'nin koruyucu etkisi incelendiğinde, CAPE'nin CCl<sub>4</sub> kaynaklı histopatolojik değişikliklerin kaybolmasına sebep olduğu gözlenmiştir [Ögetürk ve ark., 2009].

Propolise benzer biyolojik ve farmakolojik özellikler gösteren CAPE'nin HL-60 lösemi hücrelerinde, SW480 kolorektal tümör hücreleri, HCT 116 insan kolorektal hücreleri, ME 180 insan serviks kanser hücreleri, C6 glioma hücreleri, MCF-7 göğüs kanseri hücreleri, transforme olmuş rat embriyonik fibroblast hücreleri ve transforme olmamış rat fibroblast hücrelerinde proliferasyonu inhibe edip, apoptozu indüklediği gösterilmiştir [Liao ve ark., 1999; Hung ve ark., 2003; Lee ve ark., 2003; Watabe ve ark., 2004; Wang ve ark., 2005; He ve ark., 2006].

İnsan miyeloid lösemi U937 hücrelerinde CAPE'nin apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. CAPE'nin U937 hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir. DAPI nüklear boyaması sonucunda, 5 µg/ml CAPE uygulanmış U937 hücrelerinde tipik nüklear kondensasyon ve apoptoz fenotipi gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda CAPE'nin insan miyeloid lösemi U937 hücrelerinde mitokondri kaynaklı apoptozu uyardığı belirlenmiştir [Un-Ho ve ark., 2008].

Sıçanlarda sigara inhalasyonu sonucu prefrontal kortekste oluşan yapısal değişiklikler üzerine kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in koruyucu etki sağlayıp sağlamadığı incelenmiştir. Bu çalışmada, sigara dumanının prefrontal kortekste meydana getirdiği hasarın CAPE uygulaması ile önlediği tespit edilmiştir [Pekmez ve ark., 2004]. Buradaki koruyucu etkinin CAPE'in olası antioksidan özelliğine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada, sıçan testisinde sigara maruziyeti ile oluşan histolojik değişiklikler üzerine kafeik asit fenetil esterin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sigara dumanına maruz kalan sıçanların testis fonksiyonlarında bir azalma olduğu, serum testosteron seviyeleri ve seminifer tübül çaplarında bir düşüş olduğu ve bu düşüşün CAPE uygulaması ile engellendiği tespit edilmiştir [Pekmez ve ark., 2001].

Lidip peroksidasyonuna neden olduğu bilinen 900 MHz'lik elektromanyetik alanda bırakılmış olan ratların karaciğer enzim düzeyleri üzerine CAPE'nin antioksidan etkisi incelenmiştir. CAPE, antioksidan enzim seviyelerini yükseltip, oksidatif bileşiklikler yaparak rat karaciğerinde bir koruma sistemi oluşturmuştur [Koyu ve ark., 2009].

Yukarıda kısaca özetlenen çalışmalardan da görebildiğimiz gibi, antioksidan alımının çeşitli mutajenlere karşı koruyucu rol oynadığı bunu da, hücrelerdeki çeşitli hasarları azaltarak, özellikle serbest radikalleri azaltmak veya bunların etkisini engellemek suretiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Antioksidan takviyesi yapılmış hayvanlardaki yaşam süresinin, antioksidan takviyesi yapılmayanlara göre daha uzun olduğu belirlenmiştir [Lee ve ark., 2008]. E ve C vitaminleri yaşam süresini uzatan önemli antioksidan vitaminler olarak karşımıza çıkmaktadır [Miguel ve ark. 1982].

Bu tez çalışmasının amacı, güçlü antioksidanlar oldukları bilinen (-)-epigallokateşingallat ve kafeik asit fenetil ester'in genotoksik etki gösterip göstermediğini ve antikanser ilacı olarak kullanılan MMC ve oksidan olduğu bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan genotoksik hasar üzerine koruyucu etkili olup olmadığını, insan lenfositlerinde kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet testleri ile değerlendirmektir.

### 3.MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

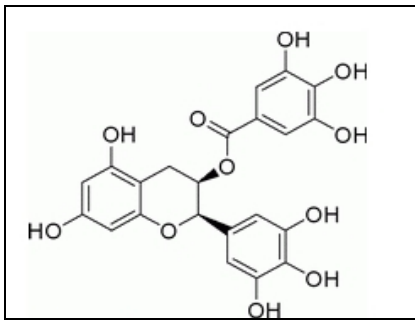
##### 3.1.1 Kromozom İncelenmesi İçin Materyal

Bu araştırmada, epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil ester'in olası genotoksik etkileri ve antikanser tedavisinde kullanılan mitomisin-C tarafından oluşturulan genetik hasara karşı antigenotoksik etkileri insan periferal kan lenfositlerinde incelenmiştir. Araştırmada kullanılan periferal kan, sigara ve alkol kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 24 yaşında bir bayan ve 21 yaşında bir erkek donörden temin edilmiştir.

##### Test Materyali

##### Epigallokateşin gallat

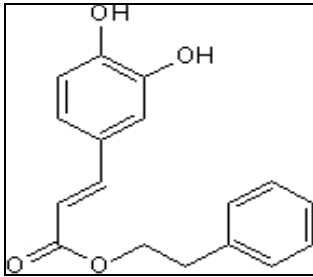
Bu araştırmada kullanılan antioksidan maddelerden (-)-epigallokateşin gallat çeşitli adlarla bilinmektedir: (-)-*cis*3,3',4',5,5',7-hekzahidroksi-flavan-3-gallat (2R, 3R)-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiren-3,5,7-triol 3 (3, 4, 5 trihidroksi-benzoat). CAS NO: 89-51-5, kimyasal formülü: C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>, moleköl ağırlığı: 458,38 gr'dır. Yapısal formöl şekil 3.1'de verilmiştir.



şekil 3.1. Epigallokateşin gallat'ın yapısal formölü

## Kafeik Asit Fenetil Ester

Bu çalışmada kullanılan diğer antioksidan kafeik asit fenetil esterdir. Kafeik asit fenetil ester, çeşitli adlarla bilinmektedir: 2-Propenoik asit, 3-(3,4-dihidroksifenil)-, 2-fenetil ester, (E), fenetil kafeat gibi. CAS NO: 4594-70-9, kimyasal formülü:  $C_{17}H_{16}O_4$ , molekül ağırlığı: 284,31 gr'dır. Yapısal formül Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kafeik asit fenetil ester yapısının yapısal formülü

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi

Epigallocateşin gallat ile ilgili daha önce literatürde yapılmış çalışmalarda, oral  $LD_{50}$  dozu farelerde 2170 mg/kg olarak, ratlarda 2800 mg/kg olarak belirlenmiştir. Ratlarda intraperitoneal  $LD_{50}$  dozu 1500 mg/kg'dır. Yapılan çalışmalarda, polifenollerin en etkili konsantrasyonlarının özellikle 0,1  $\mu$ M ve civarı olduğu belirlenmiştir. Bütün bu bilgiler dikkate alınarak, EGCG'nin insan periferal kan lenfositlerine uygulanacak konsantrasyonları başlangıç için 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05  $\mu$ g/mL olarak belirlenmiştir. Ancak, yapılan ön denemelerde, EGCG'nin yüksek konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu engellemesi nedeniyle, iki yüksek konsantrasyon çıkarılmış ve çalışma dozları 0,5, 0,1, 0,05, 0,01  $\mu$ g/mL olarak belirlenmiştir.

Bu araştırmada kullanılan diğer antioksidan kafeik asit fenetil esterin uygulama konsantrasyonları, Devipriya ve arkadaşlarının yaptığı komet deneyinde kullandıkları konsantrasyonlar referans alınarak 12, 10, 8, 6, 4, 2 ve 1 µg/mL olarak denenmiştir [Devipriya ve ark., 2008]. Ancak yapılan ön denemede, kafeik asit fenetil esterin kullanılan yüksek düzeydeki konsantrasyonları, hücre proliferasyonunu baskıladığı için, uygulama dozları 8, 4, 2 ve 1 µg/mL olarak belirlenmiştir.

### 3.2.2. Preparatların Hazırlanması

#### Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

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

Lenfositlerin elde edilmesi için, sigara içmeyen, herhangi bir sağlık sorunu olmayan bir bayan ve bir erkekten alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 mL'si steril şartlarda, 2,5 mL'lik kromozom ortamına (Chromosome medium B) ilave edilmiştir. Her bir tüpe, 10 µg/mL olacak şekilde BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) ilavesi yapılmıştır. Lenfosit proliferasyonunu arttırmak amacıyla, yine her bir tüpe 50 µg/mL fitohemaglutin (PHA) ilavesi yapılmıştır. Tüpler, 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir.

Bu çalışmada epigallokateşin gallatın olası genotoksik ve antigenotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, 2 deney grubu oluşturulmuştur. Birinci gruba, sadece EGCG'nin önceden belirlenmiş olan 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 µg/mL'lik konsantrasyonları tek başına uygulanırken, ikinci gruba, 0,2 µg/mL mitomisin-C (MMC) ile birlikte EGCG'nin aynı konsantrasyonları, eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Çalışmalarda ayrıca, hişbir uygulama yapılmayan bir negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu (50 µg/ml etanol) ve antikanser ilacı olan MMC'nin tek başına uygulandığı bir pozitif kontrol grubu (0,2 µg/ml mitomisin-C) da kullanılmıştır. Bütün uygulamalarda, EGCG, MMC+EGCG, çözücü ve MMC ilaveleri, inkübasyonun 48. saatinde gerçekteştirilmiştir. Toplam inkübasyon süresi 72 saat olarak uygulanmıştır.



Kafeik asit fenil ester'in (CAPE) olası genotoksik ve antigenotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, EGCG uygulamasına benzer bir uygulama yapılmıştır. Bu çalışmada da CAPE'nin 1, 2, 4 ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonları hem tek başına ve hem de 0,2 µg/mL'lik MMC ile eş zamanlı olarak insan lenfositlerine, inkübasyonun 48. saatinde ilave edilmiştir. Burada da bir negatif, bir çözücü ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. Toplam inkübasyon süresi bu deneyde de 72 saat olarak uygulanmıştır.

Her iki antioksidan madde çalışmasında, kültür süresinin 70. saatinde, her bir tüpe 0,06 µg/mL kolkisin ilave edilmiştir. 72. saatte kültür tüpleri etüvden çıkarılarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik kısma, 37°C'deki 0,075 M KCl çözeltisinden 5 ml ilave edilmiştir. Kültür tüpleri 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüplere, soğuk 3:1 metanol:asetik asitten, 5 ml ilave edilmiş ve takiben, buzdolabında +4°C'de, 45 dakika tespit işlemi uygulanmıştır. Tespit işlemi 2 kez daha tekrarlandıktan sonra, süpernatant atılmıştır. Pipetaj yapılarak homojen hale getirilen tüpün dibindeki hücre süspansiyonu, soğuk lamalar üzerine, 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılmıştır. Hazırlanan preparatlar, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda, 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu çalışmada, Çelik ve arkadaşlarının metodu kullanılmıştır [Çelik ve ark., 2006].

#### *Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması*

Mikronükleus testi için sağlıklı, sigara içmeyen bir erkek ve bir bayan donörden alınan periferik kanın 0,2 mL'si, içerisinde 2,5 mL kromozom besi ortamı (chromosome medium B) bulunan tüplere ilave edilmiş ve 37°C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. Kültür süresinin 24. saatinde besi ortamlarına EGCG'nin 0,01, 0,05, 0,1 ve 0,5 µg/mL'lik konsantrasyonları hem tek başına ve hem de 0,2 µg/mL MMC ile eş zamanlı olarak ilave edilmiştir. MN uygulamasında da bir pozitif, bir negatif ve bir de çözücü kontrol bulundurulmuştur. MN analizi için uygulamalar, 48 saat süre

ile yapılmıştır. Sitokinezi bloke etmek amacıyla tüm kültürlere inkübasyonun 44. saatinde 7 µl sitokalsin-B ilave edilmiştir. Bu çalışmada da inkübasyon süresi 72 saat olarak uygulanmıştır.

Kafeik asit fenetil esterinin 48 saatlik uygulamasında yeterli sayıda binüklat hücre elde edilemediğinden, modifiye bir metot kullanılmıştır. Bu metoda göre toplam 68 saat olan kültür süresinin 44. saatinde kafeik asit fenetil ester'in 1, 2, 4 ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonları hem tek başına ve hem de 0,2 µg/mL MMC ile birlikte eş zamanlı olarak besi ortamına ilave edilmiştir. Bu uygulamada da bir negatif, bir çözücü ve bir de pozitif kontrol grubu oluşturulmuştur. Burada muamele süresi 24 saat olarak uygulanmıştır. Kültür süresinin 44. saatinde tüm tüplere sitokinezi bloke etmek amacıyla, 7 µl sitokalsin-B ilave edilmiştir.

Uygulamalar tamamlandıktan sonra, kültür tüpleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüplere soğuk 0,075 M KCl çözeltisinden 5'er ml ilave edilmiştir. Tüpler buzdolabında 5 dakika bekletildikten sonra, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Tüplere soğuk 3:1 metanol:asetikden 5'er ml eklenmiş ve hücreler 15 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 kez uygulanmıştır. 3. fiksatife son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Son kez santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant atılmış ve kalan kısım homojenize edilip, 15-20 cm yükseklikten soğuk lamlara damlatılmıştır.

#### *Preparatların boyanması*

Hazırlanan preparatlar, kromozomal anormalliklerin, mikronükleusların ve mitotik indeksin belirlenmesi amacıyla, % 5'lik Giemsa'da (pH=6,8), 20-25 dakika boyanmıştır. Kardeş kromatit değişimlerinin gözlenmesi için, floresan+Giemsa boyaması, Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metotta bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır [Speit ve Haupter, 1985]. Buna göre, preparatlar 254 nm dalga boyunda 13 dakika ışınlanmıştır. Preparatlar, 60°C'lik 1xSSC'de, 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Preparatlar, % 5'lik Giemsa ile (pH= 6,8) 20 dakika

boyanmıştır. Saf suda yıkanan preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuş ve DPX ile daimi hale getirilerek mikroskopik incelemeye alınmıştır.

#### *Kromozom anormalliklerinin belirlenmesi ve mitotik indeksin saptanması*

Kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde, her bir uygulama için kromozomları iyi dağılmış olan 200 metafaz hücresi (100 bayan ve 100 erkek, toplam 200 hücre) incelenmiştir. Toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir. Mitotik indeksin (Mİ) belirlenmesinde, her uygulama için 2000 hücre (1000 bayan ve 1000 erkek, toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir.

#### *Kardeş kromatid değişiminin ve replikasyon indeksinin belirlenmesi*

Kardeş kromatid değişimi sayısının belirlenmesinde her uygulama konsantrasyonunda, bayan ve erkek bireye ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre (toplam 50 hücre) incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatitindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatitindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir. Her bir uygulama için replikasyon indeksi, 200 hücre üzerinden (100 bayan, 100 erkek),  $RI = \frac{1x(M1) + 2x(M2) + 3x(M3)}{N}$  formülünden belirlenmiştir. Burada M1, birinci; M2, ikinci ve M3, üçüncü metafaz evresindeki hücreler, N ise incelenen toplam hücre sayısını göstermektedir [Gomez-Arroya, 2000].

#### *Mikronükleus frekansının ve nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi*

Mikronükleus frekansının belirlenmesinde, çekirdek bölünmesini tamamlamış, fakat sitoplazma bölünmesini gerçekleştirememiş iki çekirdekli (binükleat) hücreler değerlendirilir. Bu çalışmada, her bir uygulama için 2000 adet (1000 erkek ve 1000 bayan) binükleat hücre, mikronükleus taşıyıp taşımadığına göre değerlendirilmiştir.

Binükleat hücreler, taşıdıkları mikronükleus sayısına göre, 1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu olmak üzere değerlendirilmiş ve hücre başına düşen MN sayısı ( $MN/hücre = 1x(1MN) + 2x(2MN) + 3x(3MN + 4MN)/N$  (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak belirlenmiştir. Nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi için, her uygulamadan toplam 1000 hücre incelenmiştir (500 bayan ve 500 erkek). Hücreler 1, 2, 3 ve 4 çekirdekli hücreler şeklinde değerlendirilmiş (sırasıyla 1N, 2N, 3N ve 4N) ve nükleer bölünme indeksi ( $NBI = 1x(1N) + 2x(2N) + 3x(3N + 4N)/n$  (n, incelenen toplam hücre sayısı) formülü ile hesaplanmıştır [Aksoy ve ark., 2006].

### İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

#### *Comet testi*

Bu çalışmada, antioksidan maddelerden EGCG ve CAPE'nin, insan periferik lenfositlerinde meydana getirdiği DNA hasarı ve oksidan olduğu bilenen  $H_2O_2$ 'in meydana getirdiği DNA hasarına karşı olası iyileştirici etkisi, comet testi ile incelenmiştir.

Comet testinde, Singh ve arkadaşlarının metodu bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır [Singh ve ark., 1988]. Bu testte, PBS ile süspansiyon edilen periferik kandan lenfositler izole edilmiştir. Bu hücreler, EGCG'nin 0,01, 0,05, 0,10 ve 0,50  $\mu g/mL$ 'lik konsantrasyonları ile hem tek başına ve hem de 100  $\mu M$   $H_2O_2$  ile muamele edilmiştir. Benzer şekilde, izole lenfositler, CAPE'nin 1, 2, 4 ve 8  $\mu g/mL$ 'lik konsantrasyonları ile hem tek başına ve hem de 100  $\mu M$ 'lik  $H_2O_2$  ile eş zamanlı olarak 1 saat muamele edilmiştir. Her iki antioksidan uygulamasında da hem pozitif (100  $\mu M$   $H_2O_2$ ), hem negatif ve hem de çözücü kontroller bulundurulmuştur. Canlılık oranı % 90'den fazla olan kültürden elde edilen ve agar kaplı lam üzerine yayılan lenfositlere lizing uygulanmış, takiben elektroforez tamponunda (pH>13), 25 V, 300 mA'da 20 dak. elektroforez uygulanmıştır. Nötralizasyon tamponu ile muamele edilen preparatlar, 50  $\mu l$  EtBr (20  $\mu g/mL$ ) ile boyanmıştır. DNA hasarlarını belirlemek için, flöresan ataçmanlı mikroskopta (Olympus BX 51), "Comet Assay

IV”, Perceptive Instruments Ltd. UK analiz sistemi kullanılarak, X400 büyütmede her bir konsantrasyondan 200 hücre (100 erkek, 100 bayan) incelenmiştir. Elde edilen DNA hasarları, % kuyruk (comet) yoğunluğu ve kuyruk (comet) uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

#### *İstatistiksel analizler*

Bu çalışmada, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi sayısı, mitotik indeks, replikasyon indeksi, mikronükleus frekansı, nükleer bölünme indeksi ve % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI), anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği ve mikronükleus frekansı sonuçları z-testi ile, kardeş kromatid değişimi ve comet testi sonuçları t-testi ile analiz edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. (-)-Epigallokateşin Gallat'ın Tek Başına ve MMC Tarafından Oluşturulan Genetik Hasara Karşı Etkileri

Bu çalışmada, (-)-Epigallokateşin gallatın genetik etkilerini belirlemek amacıyla, in vitro insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet testleri kullanılmıştır. EGCG'nin 0,01, 0,05, 0,10, 0,50 µg/mL'lik konsantrasyonları hem kendi başına ve hem de antikanser tedavisinde kullanılan MMC (0,2 µg/mL) ile birlikte eş zamanlı olarak, lenfositlere 24 saat süreyle uygulanmıştır. Bu maddelerin uygulaması, kültürün 48. saatinde yapılmıştır. Deneylerde bir negatif, bir çözücü (%50 etanol) ve bir de pozitif kontrol (0,2 µg/mL MMC) bulundurulmuştur.

#### Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

EGCG'nin dört farklı konsantrasyonda yalnız başına ve pozitif kontrol MMC ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bu uygulamalarda elde edilen anormallikler, poliploidinin dahil edildiği ve dahil edilmediği iki ayrı şekilde değerlendirilmiştir.

EGCG'nin tek başına uygulaması sonucunda, insan lenfositlerinde kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom olmak üzere beş farklı yapısal ve poliplodi şeklinde bir tip sayısal kromozom anormalliği gözlenmiştir. En çok görülen anormallik, kromatid kırığıdır. Kromozom anormalliği frekansı, tüm konsantrasyonlarda hem poliploidili ve hem de poliploidisiz (0,10 µg/mL hariç) değerlendirmede, önemli düzeyde artış gösterirken, bu artış çözücü kontrole göre önemli değildir. EGCG'nin kromozom anormalliklerinde meydana getirdiği artış, pozitif kontrol düzeyinde değildir.

KA/hücre sayısı da, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, negatif kontrole göre tüm konsantrasyonlarda (poliploidisiz, 0,10 µg/mL hariç), önemli artış gösterirken, bu artış çözücü kontrole kıyaslandığında, sadece en yüksek konsantrasyonda (0,50 µg/mL), poliploidili değerlendirmede önemli düzeydedir. EGCG'nin anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısında meydana getirdiği artış, pozitif kontrolden önemli düzeyde düşüktür.

EGCG'nin antikanser ilaç olan MMC'nin 0,2 µg/mL'lik konsantrasyonu ile birlikte uygulaması sonucunda da insan lenfositlerinde kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid değişimi olmak üzere altı farklı yapısal ve poliplodi şeklinde bir tip sayısal kromozom anormalliği gözlenmiştir. Bu uygulamada da en sık görülen anormallik kromatid kırığıdır. Elde edilen sonuçlar poliploidili ve poliploidisiz olarak değerlendirilmiştir. EGCG, MMC ile eş zamanlı uygulandığında, anormal hücre frekansı, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, pozitif kontrole göre bile artış göstermekle beraber, bu artış istatistiksel açıdan önemli değildir (poliploidili, 0,01 µg/mL hariç). Ancak, KA/hücre sayısında gözlenen artış, MMC ile eş zamanlı uygulanan bütün EGCG konsantrasyonlarında, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, önemli düzeydedir.

Cizelge 4.1. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonunda insan periferal kan lenfositlerinde görülen kromozomal anormallikler ve frekansları

Uygulama Grubu	Uygulama		Yapısal Anormallikler						Sayısal anormallikler	Poliploidili Anormal Hücre ±SE (%)	Poliploidisiz Anormal Hücre ±SE (%)	Poliploidili KA/hücre ± SE	Poliploidisiz KA/hücre ± SE	
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)		ktk	kzk	f	kkb	dk						kd
		MMC	EGCG											
Negatif Kontrol	24	-	-	6	1	-	-	-	-	-	3,5±1,29	3,5±1,29	0,03± 0,01	0,03± 0,01
Çözücü Kontrol	24	-	-	20	1	-	-	1	-	1	10,5± 2,17	10,0± 2,12	0,11± 0,02	0,11± 0,02
Pozitif Kontrol(MMC)	24	0,2	-	67	13	6	1	4	8	-	35,5± 3,38	35,5± 3,38	0,48± 0,03	0,48± 0,03
EGCG	24	-	0,01	20	2	-	-	1	-	4	11,0± 2,21**	9,00± 2,02*	0,13± 0,02***	0,11± 0,02**
		-	0,05	21	2	2	-	1	-	7	14,0± 2,45***	10,5± 2,17**	0,16± 0,02***	0,13± 0,02***
		-	0,10	16	-	-	-	-	-	7	11,5± 2,25**	8,00± 1,92	0,11± 0,02**	0,08± 0,01
		-	0,50	30	2	2	1	-	-	2	17,0± 2,65***	16,0± 2,59***	0,18± 0,027***	0,17± 0,02***
MMC+ EGCG	24	0,2	0,01	152	6	11	-	1	30	2	45,5± 3,52*	44,5± 3,51	1,01± 0,00***	1,00± 0,00***
		0,2	0,05	193	5	4	-	-	11	1	43,0± 3,50	42,5± 3,49	1,07± 0,01***	1,06± 0,01***
		0,2	0,10	148	6	12	1	-	19	3	39,0± 3,44	37,5± 3,42	0,94± 0,01***	0,93± 0,01***
		0,2	0,50	222	10	12	1	-	23	1	42,5± 3,49	42,0± 3,49	1,34± 0,04***	1,43± 0,05***

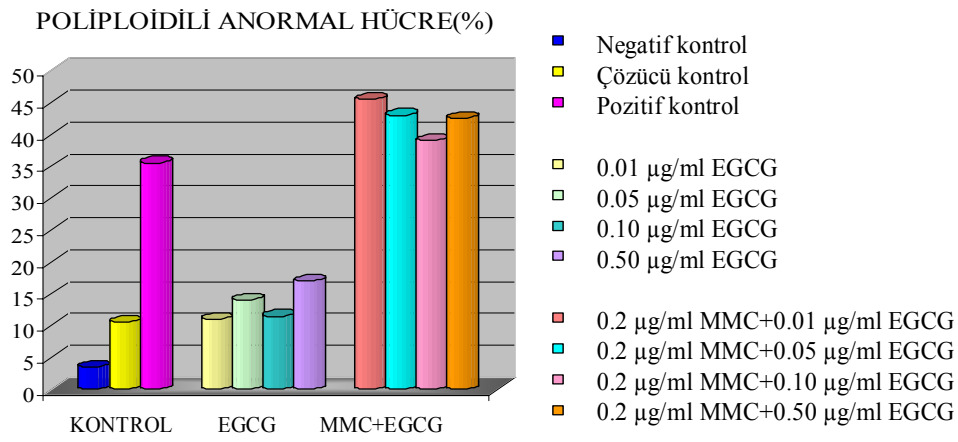


Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme Dk: Disentrik kromozom, Kd: Kromatid değişimi, P: Poliploidi MMC: Mitomisin-C, EGCG: Epigallokateşin galat

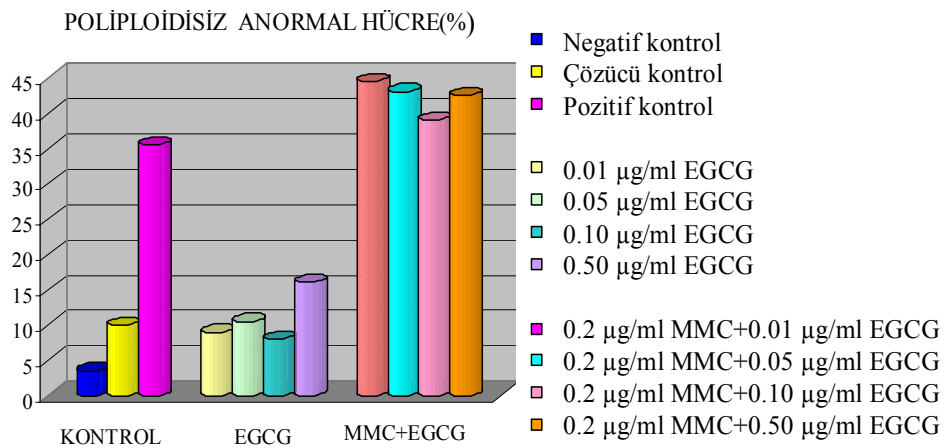
- Negatif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- Negatif kontrole göre  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- Negatif kontrole göre  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlı (z-test)

\* Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)

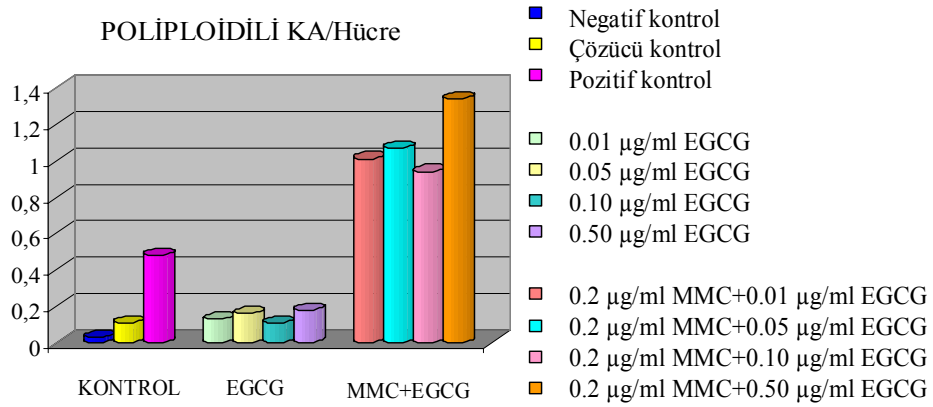
+++ Pozitif kontrole göre  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlı (z-test)



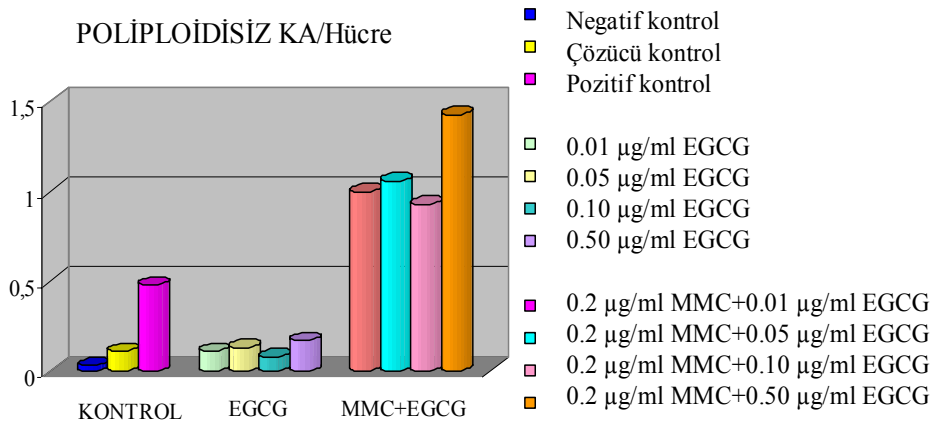
Şekil 4.1. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirilmede anormal hücre frekansları



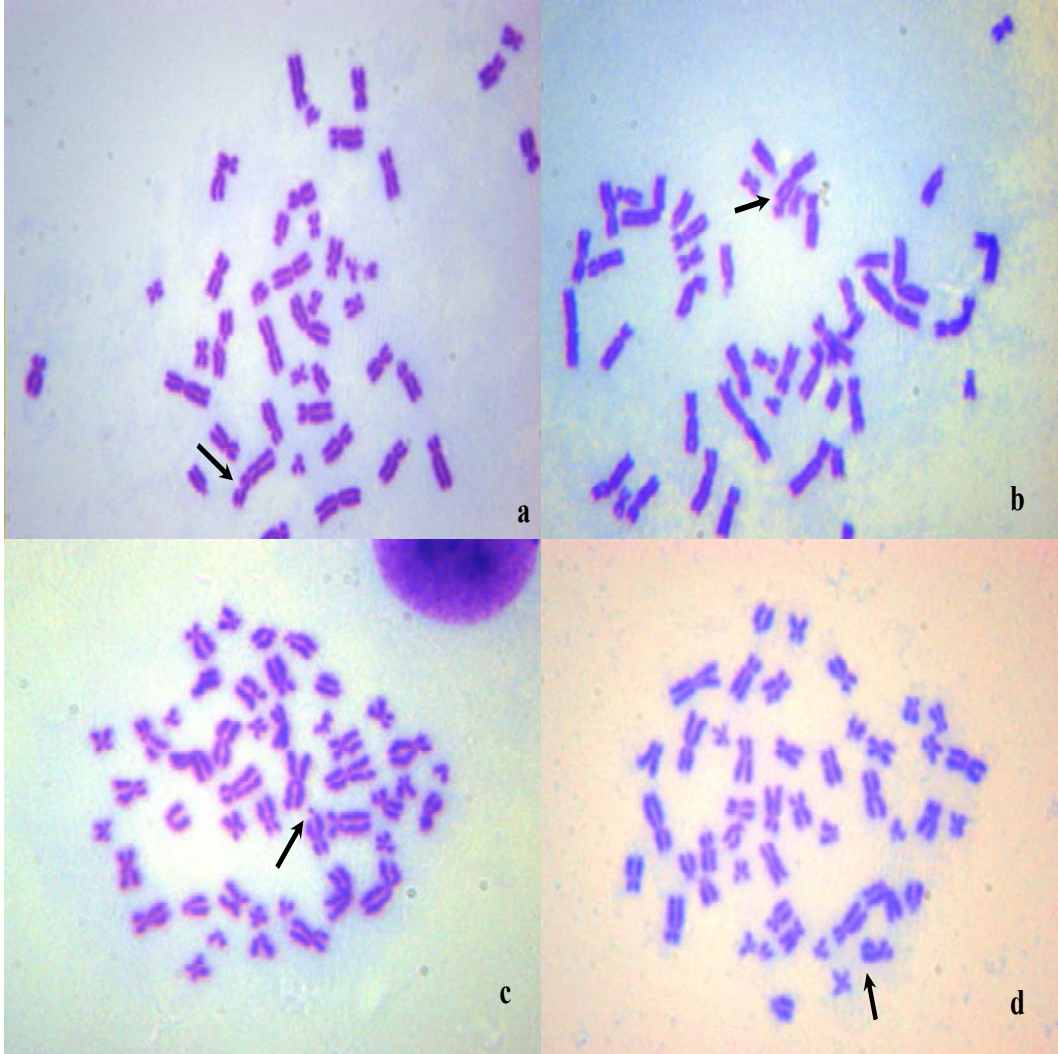
Şekil 4.2. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirilmede anormal hücre frekansları



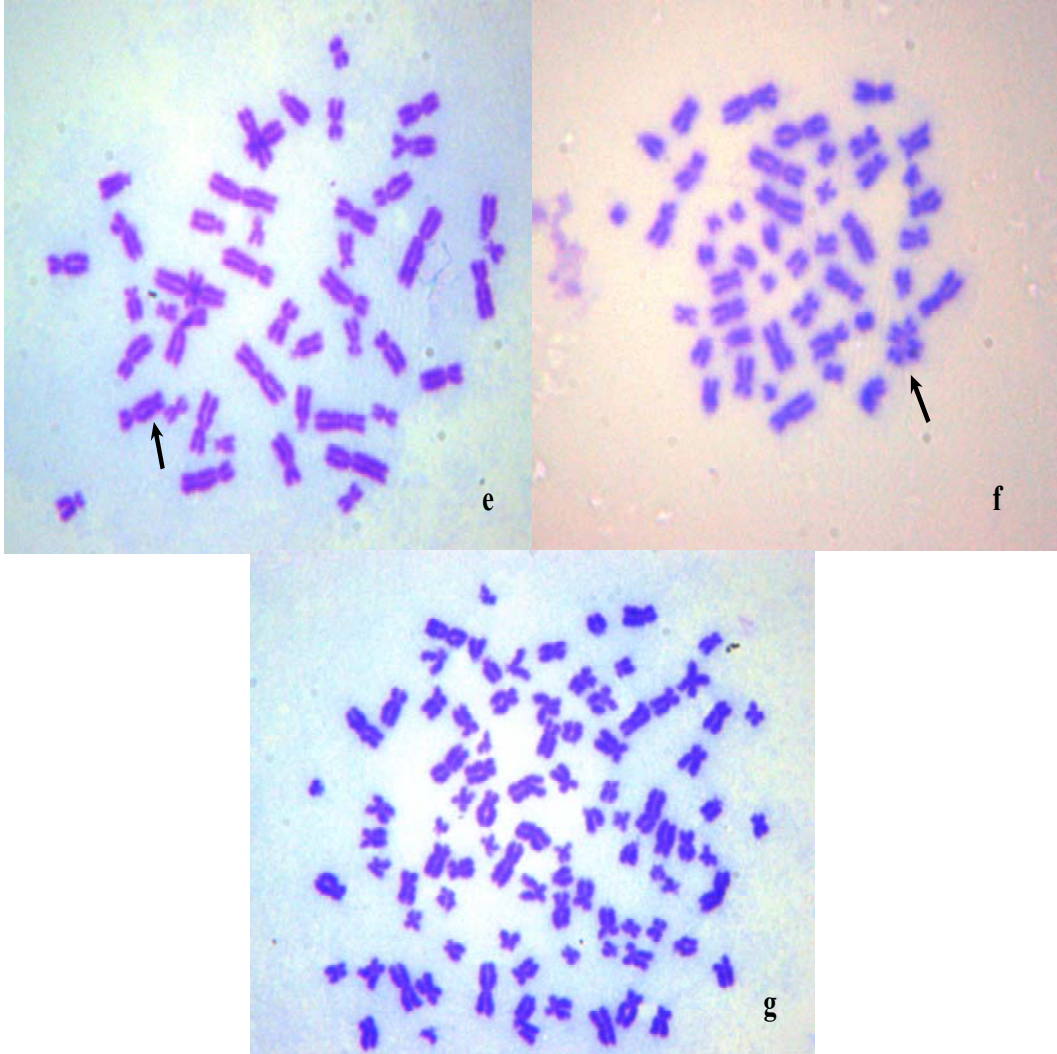
Şekil 4.3. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde, poliploidili değerlendirilmede KA/hücre



Şekil 4.4. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirilmede KA/hücre



Resim 4.1. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı b)kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatidlerde birleşme, e) disentrik kromozom f) kromatid değişimi, g) poliploidi



Resim 4.1. (Devam) Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatidlerde birleşme, e) disentrik kromozom, f) kromatid değişimi, g) poliploidi

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

Çizelge 4.2’de (-)-epigallokateşin gallat’ın dört farklı konsantrasyonunun, tek başına ve pozitif kontrol MMC ile birlikte eş zamanlı uygulaması sonucunda, kültürdeki insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks üzerine etkileri gösterilmiştir. EGCG’nin tek başına uygulaması, 1-13 arasında KKD oluşumuna neden olmuştur, fakat bu miktar, negatif ve çözücü kontrolle aynı düzeydedir. KKD/hücre sayısı, negatif kontrolle karşılaştırıldığında, 0,01 µg/mL dışındaki tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde artış göstermiştir. EGCG’nin tek başına uygulaması, çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında yalnız en yüksek konsantrasyon olan 0,01 µg/mL’lik doz azalma sağlarken, diğer konsantrasyonlarda KKD sayısında artışa neden olmuştur. Ancak bu artış, sadece en yüksek konsantrasyon olan 0,50 µg/mL’lik konsantrasyonda önemli düzeydedir.

MMC ile eş zamanlı olarak EGCG uygulaması yapılan insan lenfositlerinde, minimum-maksimum KKD sayısı, 7-38 arasında olup, bu sayı, pozitif kontrole göre daha azdır. KKD/hücre sayısı, pozitif kontrole göre, 0,50 µg/mL dışındaki tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde azalma göstermiştir. Ancak bu azalma, negatif ve çözücü kontrollere kıyasla yine de anlamlı düzeyde yüksektir.

Bu uygulamada, replikasyon indeksinde bir miktar değişim gözlenmiş, fakat bu değişim, ne EGCG’nin tek başına uygulaması ve ne de MMC+EGCG uygulamalarında, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildir.

EGCG’nin tek başına uygulaması, mitotik indeksi düşürmüştür. Bu düşüş, sadece negatif kontrole göre anlamlı iken, çözücü kontrole göre anlamlı değildir. MMC+EGCG uygulamaları, negatif ve pozitif kontrole göre anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. Ancak bu azalma, çözücü kontrole göre sadece, 0,01 ve 0,10 µg/mL’lik EGCG ilavelerinde anlamlı düzeydedir.

Çizelge 4.2. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD, Rİ ve Mİ frekansları

Uygulama grubu	Uygulama			Min-max KKD	KKD/hücre± SH	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	RI ± SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)								
		MMC	EGCG							
Negatif Kontrol	24	-	-	1-13	5,30 ± 0,35	35	76	89	2,27± 0,05	5,85± 0,52
Çözücü Kontrol	24	-	-	2-11	6,08 ± 0,37	46	71	83	2,18± 0,05	3,50± 0,41
Pozitif Kontrol	24	0,2	-	19-39	27,50±0,85	51	83	66	2,07± 0,05	4,70± 0,47
EGCG	24	-	0.01	2-13	5,98± 0,33	45	85	70	2,12± 0,05	3,35± 0,40 <sup>***</sup>
		-	0.05	1-10	7,10± 0,40 <sup>a</sup>	70	92	38	1,84± 0,05	3,95± 0,43 <sup>**</sup>
		-	0.10	2-12	7,04± 0,33 <sup>a</sup>	76	82	42	1,83± 0,05	3,55± 0,41 <sup>***</sup>
		-	0.50	3-13	7,54± 0,38 <sup>ab</sup>	57	89	54	1,98± 0,05	4,05± 0,44 <sup>**</sup>
MMC+EGCG	24	0,2	0.01	11-27	17,96± 0,62 <sup>c</sup>	80	76	44	1,82± 0,05	2,45± 0,34 <sup>+++</sup>
		0,2	0.05	7-32	15,88± 0,99 <sup>c</sup>	76	88	36	1,80± 0,05	3,10± 0,39 <sup>++</sup>
		0,2	0.10	10-38	19,24± 0,84 <sup>c</sup>	72	81	47	1,87± 0,05	2,40± 0,34 <sup>+++</sup>
		0,2	0.50	11-37	25,32± 0,92	85	82	33	1,74± 0,05	2,65± 0,36 <sup>+++</sup>

KKD/hücre, Kardeş Kromatit Değişimi, M<sub>1</sub>: mitoz 1, M<sub>2</sub>: mitoz 2, M<sub>3</sub>: mitoz 3, RI: replikasyon indeksi, MI: mitotik indeks, SH: standart hata

<sup>a</sup> Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

<sup>b</sup> Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

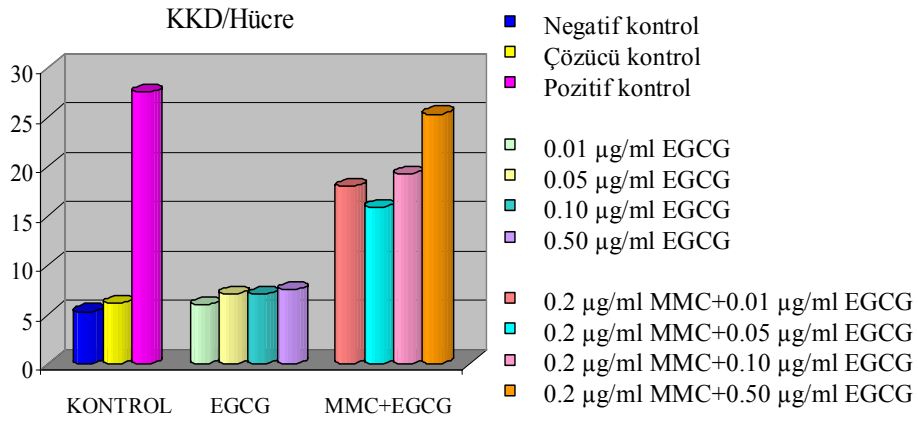
<sup>c</sup> Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

<sup>\*\*</sup> Negatif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-test)

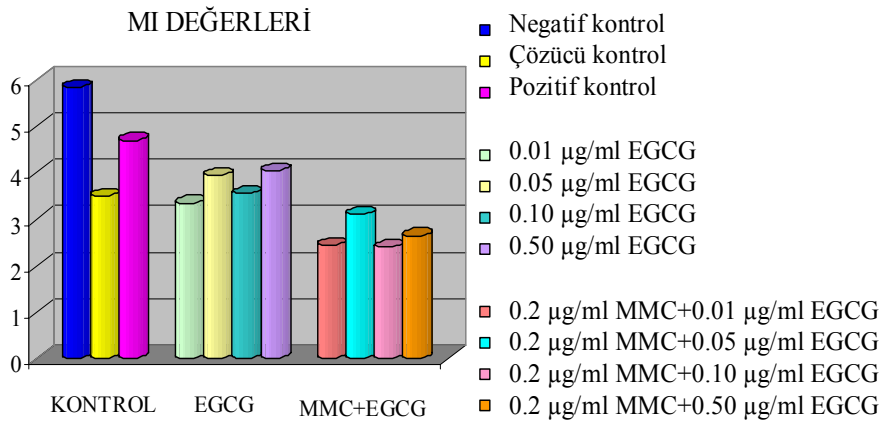
<sup>\*\*\*</sup> Negatif kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-test)

<sup>++</sup> Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-test)

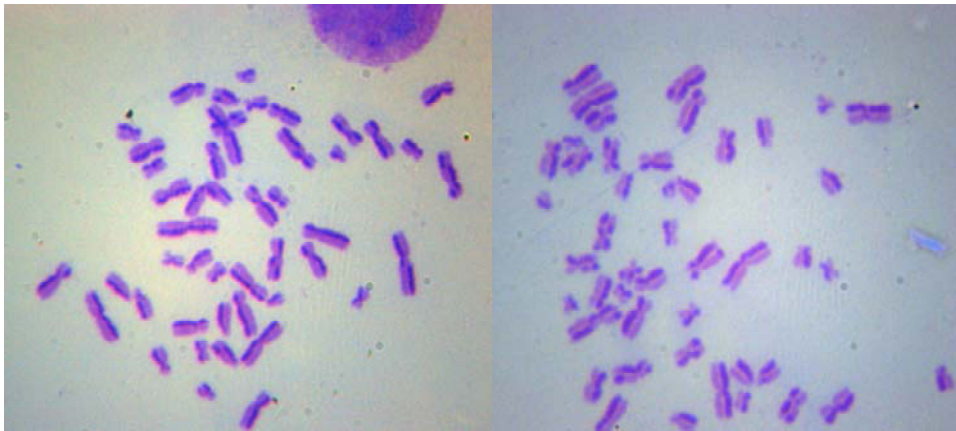
<sup>+++</sup> Pozitif kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.5. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde KKD/hücre sayısı



Şekil 4.6. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks



Resim 4.2. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

### Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

EGCG'nin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve pozitif kontrol MMC ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. EGCG'nin 0,01, 0,05 ve 0,10 µg/mL'lik konsantrasyonları, mikronükleus frekansını artırmakla beraber, bu artış, 0,01, ve 0,10 µg/mL'de sadece çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlıdır. EGCG, binükleat hücrelerde genellikle 1 mikronükleus oluştururken, 2 ve 3 MN oluşumu sadece birer hücrede gözlenmiştir. EGCG, nükleer bölünme indeksinde önemli bir değişim yapmamıştır.

MMC uygulanan lenfositlerdeki mikronükleus frekansı, negatif ve çözücü kontrole göre anlamlı düzeyde artış göstermiştir. MMC+EGCG'nin eş zamanlı uygulandığı lenfositlerde, mikronükleus frekansında, pozitif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde azalma gerçekleşmiştir. Bu uygulama grubunda, nükleer bölünme indeksinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.



Çizelge 4.3. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi

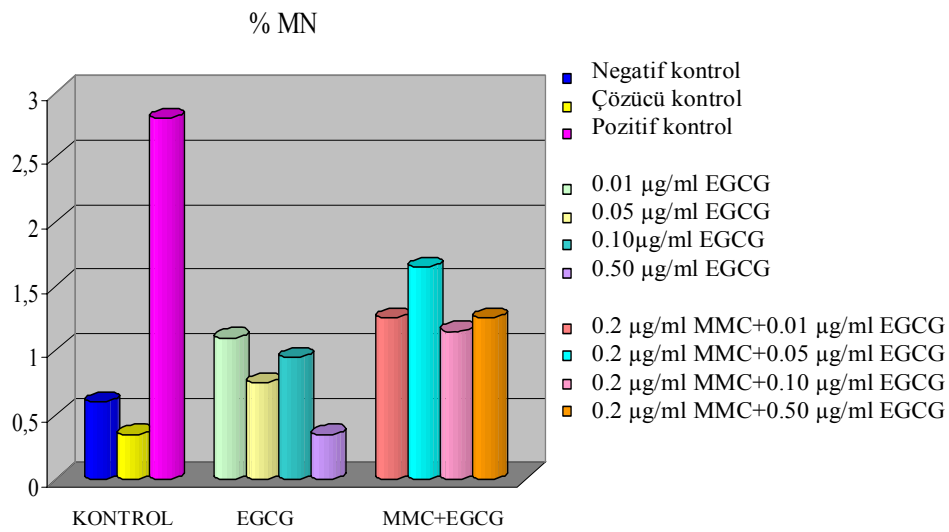
Uygulama grubu	Uygulama		İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBİ)	
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)		(1)	(2)	(3)			
		MMC							EGCG
Negatif Kontrol	48	-	-	2000	10	1	-	0,60± 0,18	1,28± 0,33
Çözücü Kontrol	48	-	-	2000	7	-	-	0,35± 0,13	1,08± 0,33
Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,2	-	2000	56	-	-	2,80± 0,36	1,52± 0,39
EGCG	48	-	0,01	2000	22	-	-	1,10± 0,23**	1,10± 0,33
	48	-	0,05	2000	13	1	-	0,75± 0,19	1,13± 0,33
	48	-	0,10	2000	16	-	1	0,95± 0,22*	1,10± 0,33
	48	-	0,50	2000	7	-	-	0,35± 0,13	1,15± 0,34
MMC+EGCG	48	0,2	0,01	2000	25	-	-	1,25± 0,25+++	1,12± 0,33
	48	0,2	0,05	2000	31	1	-	1,65± 0,28+	1,13± 0,33
	48	0,2	0,10	2000	19	2	-	1,15± 0,24+++	1,11± 0,33
	48	0,2	0,50	2000	23	1	-	1,22± 0,25+++	1,16± 0,34

\* Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)

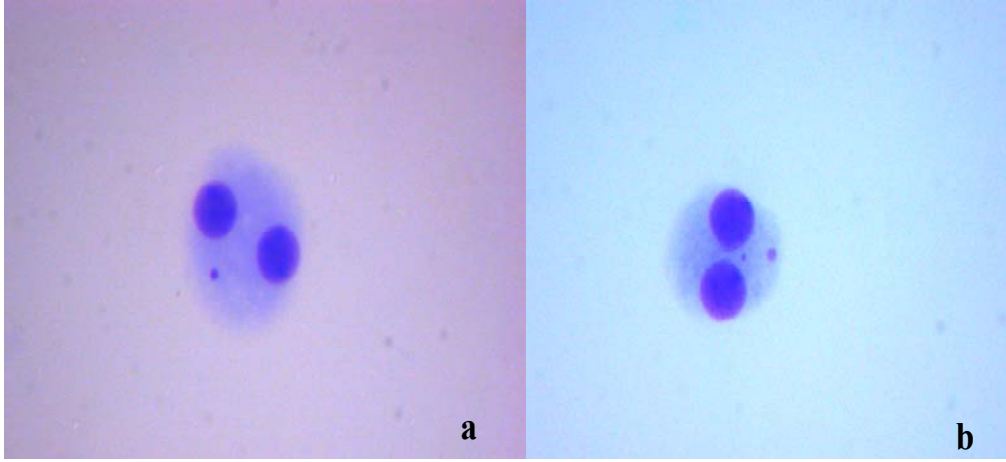
\*\* Çözücü kontrole göre  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı (z-test)

+ Pozitif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)

+++ Pozitif kontrole göre  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.7. EGCG ve MMC+EGCG uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı



Resim 4.3. Epigallokateşin gallat uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat b) iki mikronükleuslu binükleat

#### Comet testi

EGCG'nin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve pozitif kontrol  $H_2O_2$  ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan periferel lenfositlerinde comet testi sonuçları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.  $H_2O_2$  uygulanan lenfositlerde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu, negatif kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. EGCG'nin tek başına yapılan uygulamasında, negatif ve çözücü kontrole göre, kuyruk yoğunluğunda 0,01 ve 0,10  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda negatif ve çözücü kontrole göre artış, 0,05 ve 0,50  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda ise azalma meydana gelmiştir. Ancak bu değişimler, anlamlı düzeyde değildir. EGCG'nin tek başına uygulandığı lenfositlerde, kuyruk uzunluğunda da, 0,01  $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda önemli düzeyde artış meydana gelmiştir. Bu artış,  $H_2O_2$  düzeyine ulaşmıştır. Diğer tüm konsantrasyonlarda azalma meydana gelmiştir, fakat bu azalma istatistiksel açıdan önemli değildir.

$H_2O_2$ +EGCG'nin eş zamanlı uygulandığı lenfositlerde kuyruk yoğunluğu, pozitif kontrole kıyasla, 0,01, 0,05 ve 0,10  $\mu\text{g/mL}$ 'de azalma göstermiş, ancak bu azalma sadece 0,01  $\mu\text{g/mL}$ 'de önemli düzeye ulaşmıştır. 0,5  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda ise, kuyruk yoğunluğu, pozitif kontrolden dahi daha fazladır.  $H_2O_2$ +EGCG'nin eş

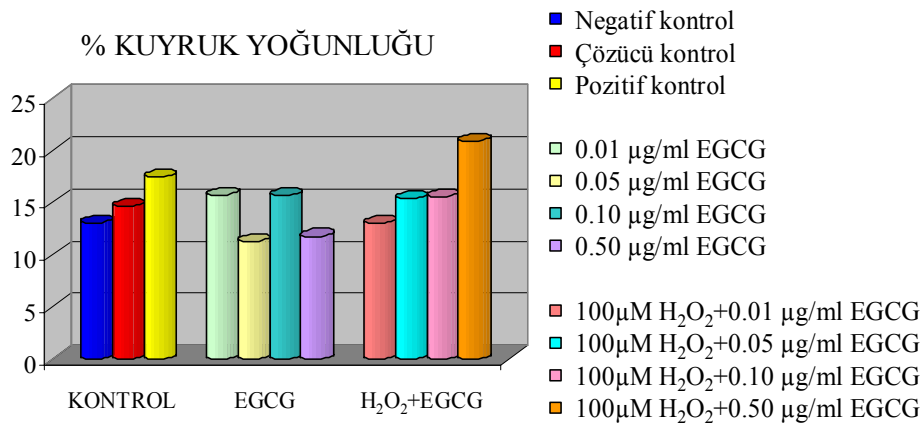
zamanlı uygulandığı lenfositlerde kuyruk uzunluğu pozitif kontrole kıyasla bütün konsantrasyonlarda artış göstermiştir. Bu artış,  $H_2O_2+0,50 \mu\text{g/mL}$  EGCG uygulamasında anlamlıdır.

Çizelge 4.4. EGCG ve  $H_2O_2+EGCG$  uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı

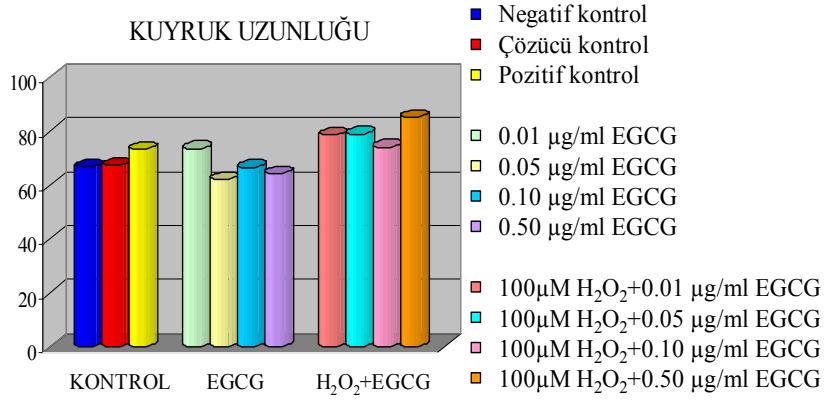
Test maddesi	Süre (saat)	Doz		Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )
		$H_2O_2$ ( $\mu\text{M}$ )	EGCG ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Negatif Kontrol	1	-	-	13,03± 1,27	66,80± 2,16
Çözücü Kontrol (DMSO)	1	-	-	14,64± 1,46	67,39± 2,40
Pozitif Kontrol ( $H_2O_2$ )	1	100	-	17,44± 1,65	73,32± 2,47
EGCG	1	-	0,01	15,73± 1,50	73,55± 1,69 <sup>a</sup>
	1	-	0,05	11,25± 1,19	62,14± 1,39
	1	-	0,10	15,63± 1,62	66,64± 1,86
	1	-	0,50	11,77± 1,42	64,26± 1,75
$H_2O_2 + EGCG$	1	100	0,01	12,97± 1,25 <sup>c</sup>	78,55± 2,85
	1	100	0,05	15,37± 1,68	78,96± 2,92
	1	100	0,10	15,53± 1,60	74,16± 2,15
	1	100	0,50	20,91± 1,99	85,22± 2,56 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Negatif kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (t-test)

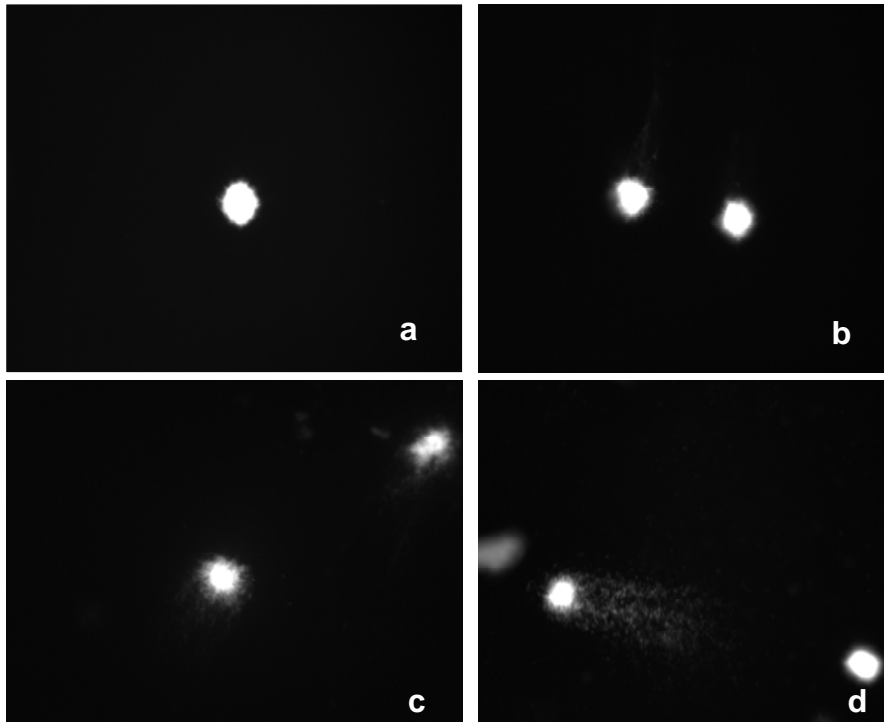
<sup>c</sup> Pozitif kontrole göre  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı (t-test)



Şekil 4.8. EGCG ve  $H_2O_2+EGCG$  uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan % kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.9. EGCG ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan kuyruk uzunluğu



Resim 4.4. EGCG ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EGCG uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü  
a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

## 4.2. Kafeik Asit Fenetil Esterin Tek Başına ve MMC Tarafından Oluşturulan Genetik Hasar Üzerine Etkileri

Bu çalışmada, kafeik asit fenetil esterin genetik etkilerini belirlemek amacıyla, in vitro insan periferik lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet testleri kullanılmıştır. Bu çalışmada insan lenfositleri, CAPE'nin 1, 2, 4 ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonları ile, hem tek başına ve hem de antikanser tedavisinde kullanılan MMC (0,2 µg/mL) ile birlikte eş zamanlı olarak, 24 saat muamele edilmiştir. Bu maddelerin ilavesi, kültürün 48. saatinde yapılmıştır. Deneylerde bir negatif, bir çözücü (%50 etanol, 10 µl) ve bir de pozitif kontrol (0,2 µg/mL MMC) bulundurulmuştur.

### Kromozomal anormallikler (KA) üzerine etkisi

Kafeik asit fenetil esterin (CAPE) 4 farklı konsantrasyonunun tek başına ve MMC ile birlikte eş zamanlı olarak uygulandığı insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozomal anormallik sayısı Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Bu uygulamalarda elde edilen anormallikler, poliploidili ve poliploidisiz olmak üzere iki ayrı şekilde değerlendirilmiştir.

CAPE'nin tek başına uygulaması sonucunda, insan lenfositlerinde beş tip yapısal anormallik gözlenmiş olup bunlar kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kromatid değişimidir. Ayrıca poliploidi olarak bilinen bir tip sayısal kromozom anormalliği de gözlenmiştir. Yapısal anormalliklerden en sık gözlenen kromatid kırığıdır. Kromozom anormalliği frekansı, hem poliploidinin dikkate alındığı ve hem de dikkate alınmadığı değerlendirmede, tüm konsantrasyonlarda artış göstermiştir. Fakat bu artış, negatif ve çözücü kontrolle karşılaştırıldığında, sadece 4 µg/mL'de anlamlıdır.

KA/hücre sayısı da, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede artış göstermiştir. Fakat bu artış, poliploidili değerlendirmede, negatif kontrole göre 2, 4

ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonlarda anlamlı iken, çözücü kontrole göre sadece 4 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlıdır. Poliploidisiz değerlendirmede ise, 4 ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonlarda, hem negatif ve hem de pozitif kontrole göre anlamlıdır. EGCG'nin anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısında meydana getirdiği artış, pozitif kontrolden önemli düzeyde düşüktür.

CAPE'nin 0,2 µg/mL'lik MMC ile birlikte insan lenfositlerine uygulanması sonucunda da beş farklı yapısal anormallik gözlenmiştir, bunlar kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom ve kromatid değişimidir. Bu uygulamada sayısal bir anormallik olan poliploidi de belirlenmiştir. Bu uygulamada en sık görülen anormallik kromatid kırığıdır. Elde edilen sonuçlar yine poliploidili ve poliploidisiz olarak değerlendirilmiştir. CAPE, MMC ile eş zamanlı uygulandığında, anormal hücre frekansı, poliploidili değerlendirmede, pozitif kontrole göre, sadece en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL'de anlamlı olmayan küçük bir artış göstermiş, diğer tüm konsantrasyonlarda ise azalma göstermiştir. Bu azalma, 4 µg/mL'de anlamlıdır. Poliploidisiz değerlendirmede, bütün CAPE konsantrasyonları, pozitif kontrole göre azalma sağlamıştır, ancak bu azalma sadece 2 ve 8 µg/mL'de anlamlıdır. CAPE'nin MMC ile birlikte uygulandığı lenfositlerde KA/hücre sayısı, pozitif kontrole göre, 1 ve 4 µg/mL'lik konsantrasyonlarda önemli olmayan küçük bir artış göstermiş, 2 ve 8 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise düşüş göstermiştir. Bu düşüş, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, sadece en yüksek konsantrasyon olan 8 µg/mL'de anlamlıdır. Hem anormal hücre frekansında ve hem de KA/hücre sayısında meydana gelen azalmalar, her iki durumda da, hem negatif ve hem de çözücü kontrole göre hala anlamlı düzeyde yüksektir.

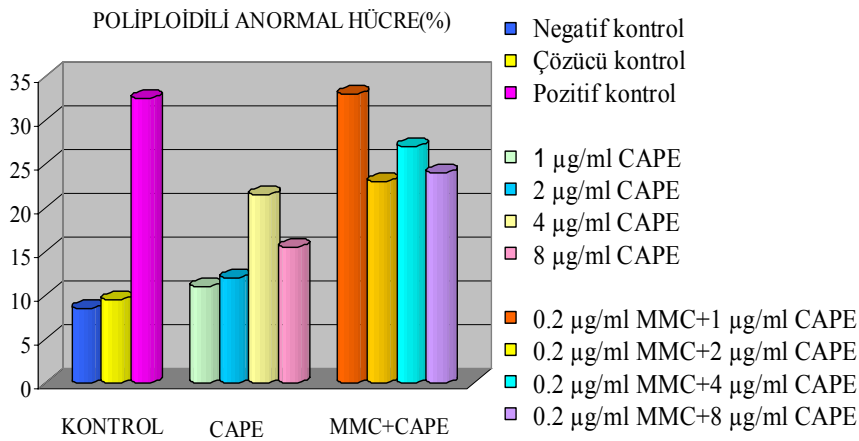
Çizelge 4.5. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal kan lenfositlerinde görülen kromozomal anormallikler ve frekansları

Uygulama Grubu	Uygulama			Yapısal Anormallikler						Sayısal anormallikler	Poliploidili Anormal Hücre ±SE (%)	Poliploidisiz Anormal Hücre ±SE (%)	Poliploidili KA/hücre ± SE	Poliploidisiz KA/hücre ± SE
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)		krk	kzk	f	kkb	dk	kd	p				
		MMC	CAPE											
Negatif Kontrol	24	-	-	11	4	3	-	-	-	1	8,5±1,97	8,5± 1.97	0,09± 0,02	0,09± 0,02
Çözücü Kontrol	24	-	-	20	1	1	-	1	-	1	9,5± 2,07	9,5± 2.07	0,11± 0,02	0,11± 0,02
Pozitif Kontrol (MMC)	24	0,2	-	74	6	1	1	1	1	-	32,5± 3,31	32,5± 3.31	0,42± 0,03	0,42± 0,03
CAPE	24	0,2	1	20	3	1	-	1	-	1	11,0± 2,21	10,5± 2,17	0,13± 0,02	0,12± 0,02
		0,2	2	21	6	2	-	-	-	1	12,0± 2,30	11,5± 2,25	0,15± 0,02*	0,15± 0,02
		0,2	4	44	5	2	-	1	1	1	21,5± 2,90****	21,0± 2,88****	0,27± 0,03****	0,26± 0,03****
		0,2	8	32	3	-	-	1	1	2	15,5± 2,56*	14,5± 2,49	0,19± 0,03**	0,18± 0,02**
MMC+ CAPE	24	0,2	1	83	9	-	-	-	6	2	33,0± 3,32****	32,0± 3,30****	0,45± 0,03****	0,44± 0,03****
		0,2	2	65	6	3	-	-	-	1	23,0± 2,97****	22,5± 2,95****+	0,37± 0,03****	0,37± 0,06****
		0,2	4	70	9	10	-	-	2	2	27,0± 3,14****++	26,0± 3,10****	0,46± 0,03****	0,45± 0,03****
		0,2	8	38	10	8	-	1	-	2	24,0± 3,02****	23,0± 2,97****+	0,30± 0,03****+	0,29± 0,03****++

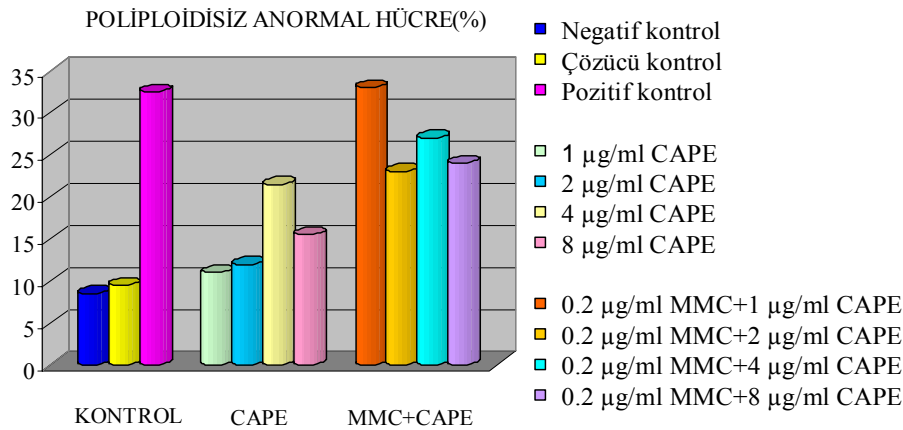
- Negatif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- Negatif kontrole göre  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- Negatif kontrole göre  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlı (z-test)

- \* Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- \*\* Çözücü kontrole göre  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- \*\*\* Çözücü kontrole göre  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlı (z-test)

- + Pozitif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)
- ++ Pozitif kontrole göre  $p < 0,01$  düzeyinde anlamlı (z-test)

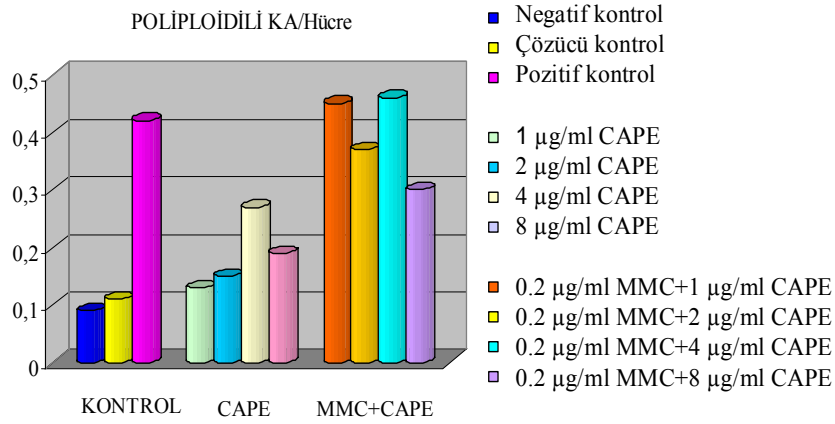


Şekil 4.10. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirmede anormal hücre frekansları

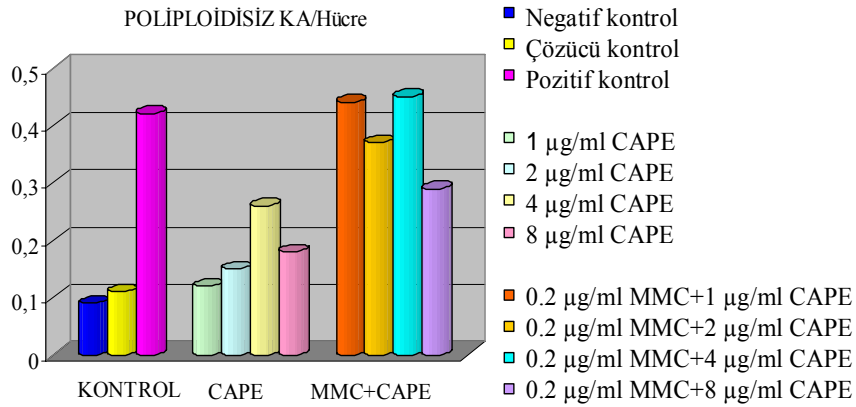


Şekil 4.11. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede anormal hücre frekansları

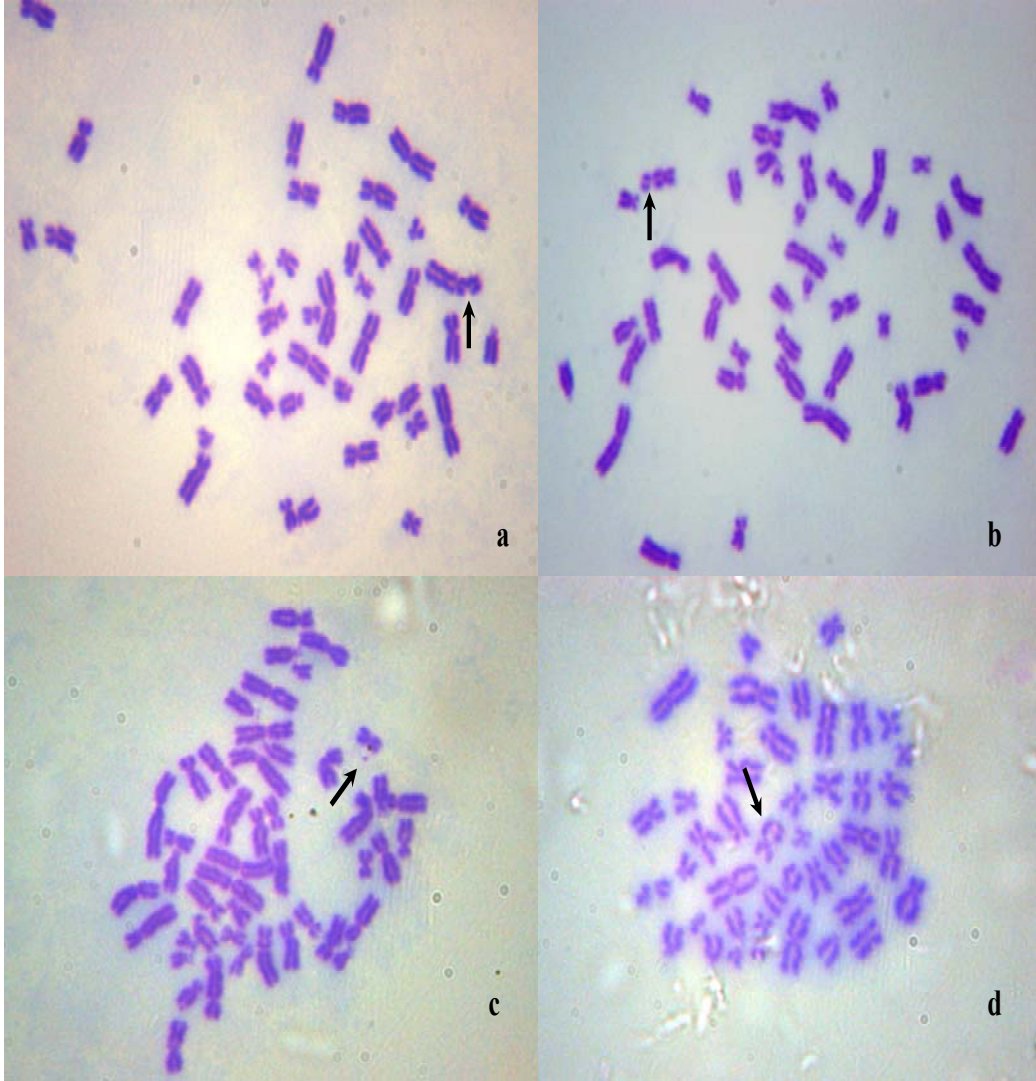




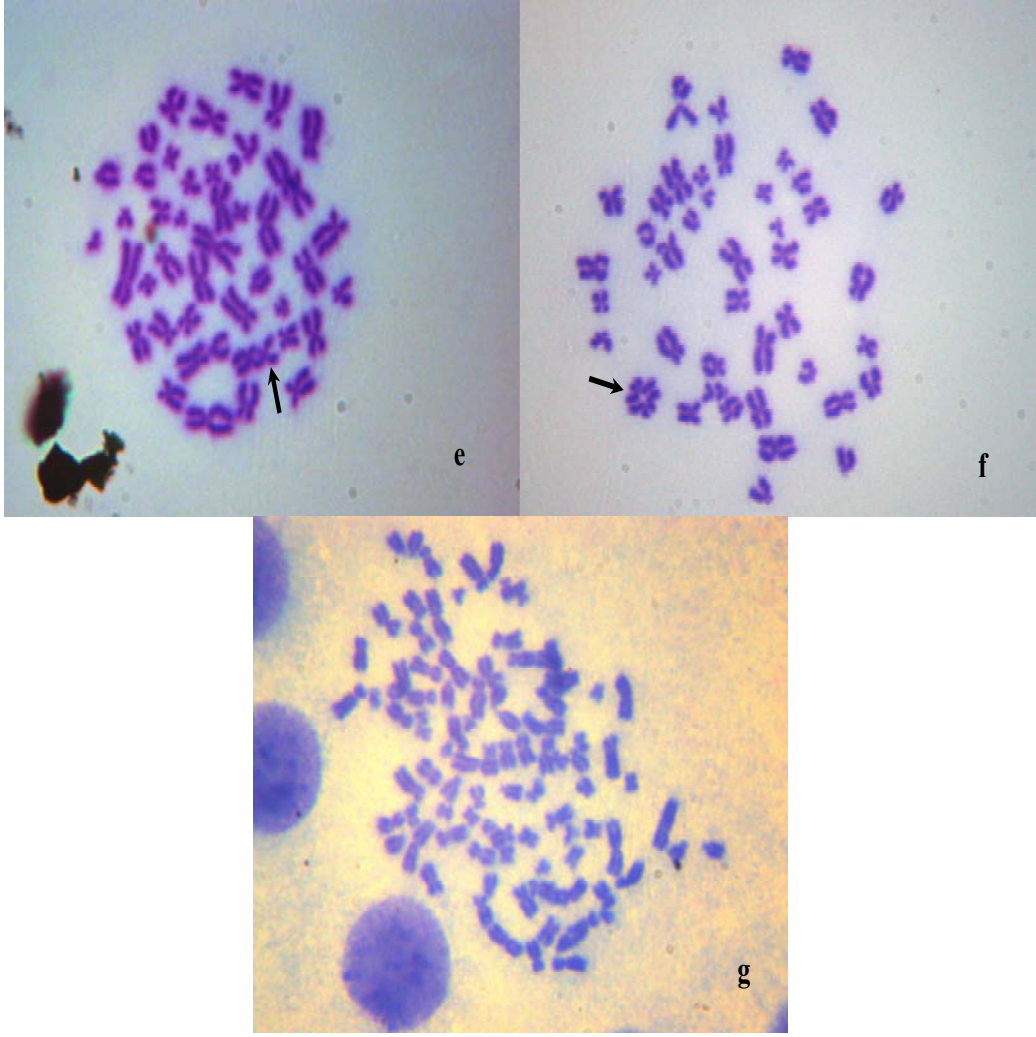
Şekil 4.12. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidili değerlendirmede KA/hücre



Şekil 4.13. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde, poliploidisiz değerlendirmede KA/hücre



Resim 4.5. Kafeik asit fenetil ester uygulaması sonucunda insan periferall lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı, b)kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatidlerde birleşme, e)disentrik kromozom, f) kromatid değişimi, g) poliploidi



Resim 4.5. (Devam)Kafeik asit fenetil ester uygulaması sonucunda insan periferik lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri a) kromatid kırığı, b)kromozom kırığı, c) fragment, d) kardeş kromatidlerde birleşme, e)disentrik kromozom, f) kromatid değişimi, g) poliploidi

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

Kafeik asit fenetil esterinin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve pozitif kontrol MMC ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, replikasyon indeksi ve mitotik indeks değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. CAPE'nin tek başına uygulaması lenfositlerde, 1-17 arasında KKD oluşumuna neden olmuştur.

CAPE'nin tek başına uygulaması, çözücü kontrolle karşılaştırıldığında, KKD miktarını anlamlı düzeyde azaltmıştır. KKD/hücre sayısı, negatif kontrolle karşılaştırıldığında, bir miktar artış göstermiştir. Bu artış, yalnız 1 µg/mL konsantrasyonunda anlamlı düzeydedir. Ancak bu artış yine de pozitif kontrole yakın değildir.

MMC+CAPE'nin eş zamanlı uygulandığı insan lenfositlerinde, minimum-maksimum KKD sayısı, 3-34 arasında değişmektedir. CAPE'in MMC ile birlikte uygulaması, KKD/hücre sayısını, MMC'nin tek başına uygulamasındakine nazaran bütün konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde azaltmıştır. Ancak bu azalma, negatif ve çözücü kontrollere kıyasla yine de anlamlı düzeyde yüksektir.

CAPE'in tek başına uygulaması, negatif ve çözücü kontrole göre bütün konsantrasyonlarda RI'i bir miktar azaltmasına rağmen, bu azalma anlamlı değildir. Bu uygulamada, mitotik indekste de azalma meydana gelmiş, fakat bu azalma sadece 8 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlıdır. MMC+CAPE uygulanan lenfositlerde RI'de, pozitif kontrole göre azalma olmuştur, fakat bu azalma anlamlı düzeyde değildir. MMC+CAPE uygulanan lenfositlerde, MI'te, pozitif kontrole göre önemli düzeyde azalma meydana gelmiştir. Bu azalma, negatif ve çözücü kontrollere göre de anlamlı düzeyde düşüktür.

Çizelge 4.6. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD, Rİ ve Mİ frekansları

Uygulama grubu	Uygulama			Min-max KKD	KKD/hücre± SH	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	RI ± SH	MI ± SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)								
		MMC	CAPE							
Kontrol	24	-	-	1-13	5,62 ± 0,36	49	76	75	2,13 ± 0,05	6,75 ± 0,56
Çözücü Kontrol	24	-	-	2-15	7,24 ± 0,456	54	76	70	2,08 ± 0,05	6,80 ± 0,56
Pozitif Kontrol (MMC)	24	0,2	-	3-48	24,86 ± 1,47	63	97	40	1,88 ± 0,05	6,30 ± 0,54
CAPE	24	-	1	2-11	5,90 ± 0,34 <sup>b</sup>	69	72	59	1,95 ± 0,06	5,95 ± 0,52
		-	2	2-17	6,08 ± 0,38	76	81	43	1,83 ± 0,05	6,10 ± 0,53
		-	4	1-13	6,20 ± 0,41	78	72	50	1,86 ± 0,05	5,85 ± 0,52
		-	8	2-12	6,08 ± 0,34	79	94	27	1,74 ± 0,05	4,75 ± 0,48 <sup>***</sup>
MMC+CAPE	24	0,2	1	7-34	19,96 ± 0,87 <sup>c</sup>	68	95	37	1,84 ± 0,05	4,50 ± 0,46 <sup>+</sup>
		0,2	2	3-33	17,42 ± 1,05 <sup>c</sup>	88	83	29	1,70 ± 0,05	4,00 ± 0,43 <sup>++</sup>
		0,2	4	5-24	14,90 ± 0,63 <sup>c</sup>	84	99	17	1,51 ± 0,04	4,15 ± 0,45 <sup>++</sup>
		0,2	8	8-22	14,54 ± 0,51 <sup>c</sup>	96	80	24	1,64 ± 0,05	4,00 ± 0,43 <sup>++</sup>

KKD/hücre, Kardeş Kromatit Değişimi, M<sub>1</sub>: mitoz 1, M<sub>2</sub>: mitoz 2, M<sub>3</sub>: mitoz 3, RI: replikasyon indeksi, MI: mitotik indeks, SH: standart hata

<sup>a</sup> Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

<sup>b</sup> Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

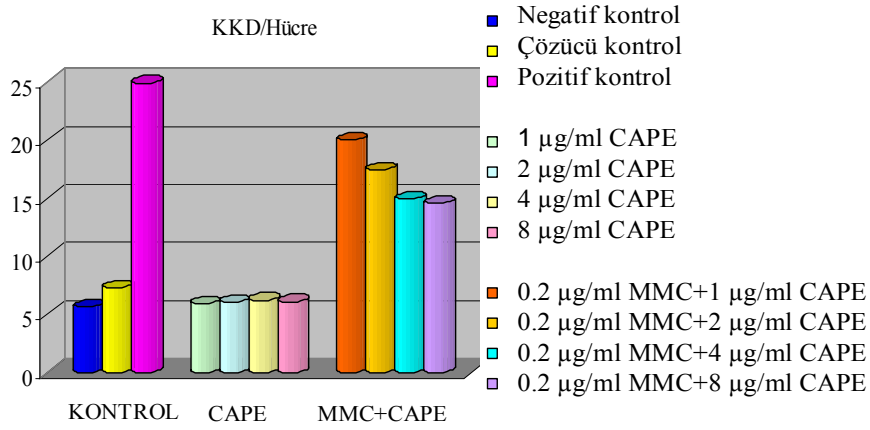
<sup>c</sup> Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

•• Negatif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-test)

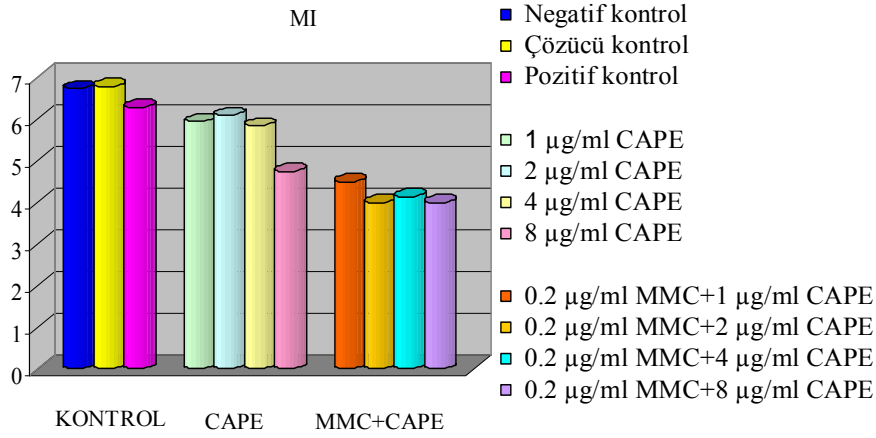
\*\* Çözücü kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-test)

<sup>+</sup> Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z-test)

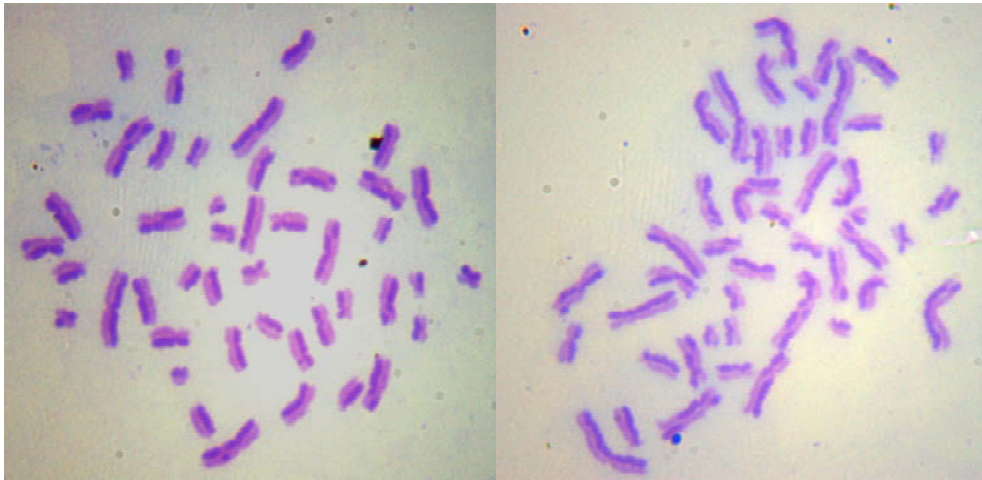
<sup>++</sup> Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.14. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde KKD/hücre sayısı



Şekil 4.15. CAPE ve CAPE+MMC uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks



Resim 4.6. Kafeik asit fenil ester uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

### Mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Bu çalışmada, CAPE'nin tek başına oluşturabileceği genotoksik ve MMC'ye karşı oluşturabileceği antigenotoksik etkileri belirlemek amacıyla mikronükleus testi de uygulanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir. CAPE'nin kromozomal anormallik ve kardeş kromatit değişimi testlerinde kullanılan en yüksek konsantrasyonu olan 8 µg/mL'lik dozu, tek başına ve MMC ile eş zamanlı uygulandığında toksik etki göstermiştir. CAPE'nin tek başına uygulandığı lenfositlerde genellikle 1 adet mikronükleus, çok azında da 2 adet mikronükleus oluşumu gözlenmiştir (Resim 4.7). MN frekansı, negatif ve çözücü kontrole göre bir miktar artış göstermesine rağmen, bu artış sadece 4 µg/mL'lik dozda anlamlıdır. Nükleer bölünme indeksindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. MMC+CAPE uygulanan binükleatlı lenfositlerde de genellikle 1 adet MN, bazılarında 2 MN ve çok azında da 3 MN oluştuğu gözlenmiştir. Bu uygulamada MN frekansı, pozitif kontrole kıyasla bütün konsantrasyonlarda artış göstermiş, bu artış, 2 ve 4 µg/mL'lik dozlarda istatistiksel anlam ifade etmiştir. MMC+CAPE uygulamasında nükleer bölünme indeksindeki azalma, pozitif kontrole göre anlamlı değildir.

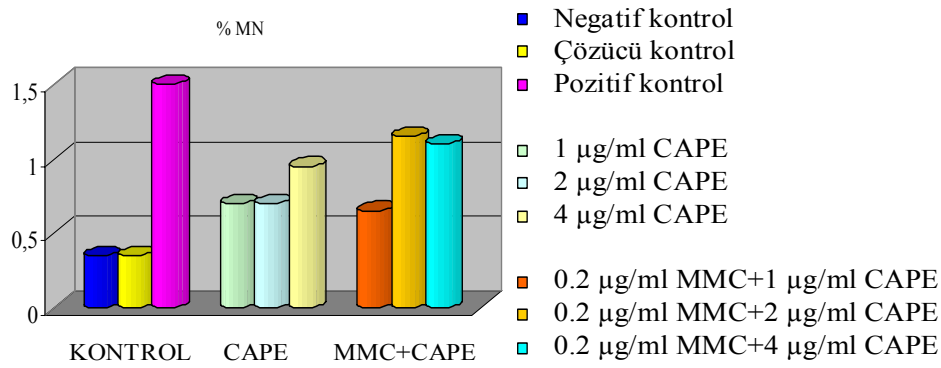
Çizelge 4.7. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi

Uygulama grubu	Uygulama			İncelenen binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları			MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBİ)
	Süre (saat)	Dozlar (µg/mL)			(1)	(2)	(3)		
		MMC	CAPE						
Kontrol	24	-	-	2000	15	-	-	0,35± 0,13	1,66± 0,40
Çözücü Knt.	24	-	-	2000	5	1	-	0,35± 0,13	1,65± 0,40
Pozitif Knt. (MMC)	24	0,2	-	2000	26	-	1	1,50± 0,27	1,49± 0,38
CAPE	24	-	1	2000	12	1	-	0,70± 0,19	1,34± 0,36
	24	-	2	2000	12	1	-	0,70± 0,19	1,18± 0,33
	24	-	4	2000	17	1	1	0,95± 0,22*	1,09± 0,33
	24	-	8	-	-	-	-	Toksik	Toksik
MMC+CAPE	24	0,2	1	2000	13	-	-	0,65± 0,18 <sup>+</sup>	1,19± 0,34
	24	0,2	2	2000	13	4	-	1,15± 0,24	1,11± 0,33
	24	0,2	4	2000	15	2	-	1,10± 0,23	1,04± 0,32
	24	0,2	8	-	-	-	-	Toksik	Toksik

\*Negatif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)

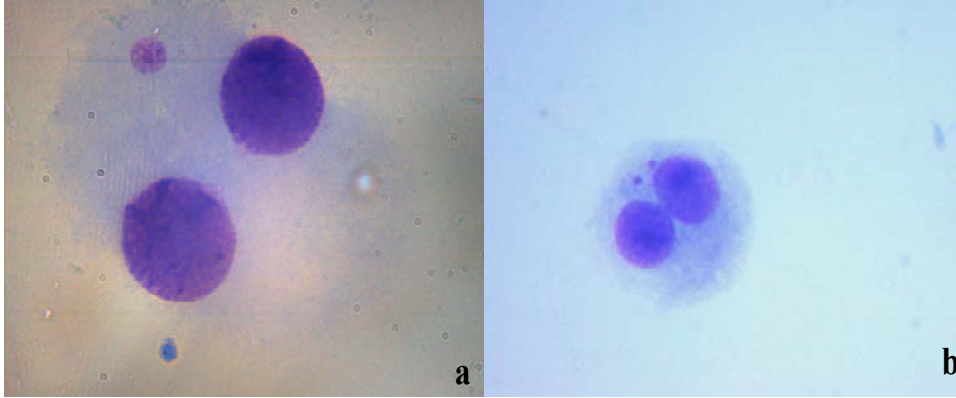
\*Çözücü kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)

<sup>+</sup>Pozitif kontrole göre  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı (z-test)



Şekil 4.16. CAPE ve MMC+CAPE uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı





Resim 4.7. Kafeik asit fenetil ester ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu binükleat hücreler a)bir mikronükleuslu binükleat b)iki mikronükleuslu binükleat

#### Comet testi

CAPE'nin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve pozitif kontrol  $H_2O_2$  ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan periferik lenfositlerinde comet testi sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. CAPE ile yapılan comet testinde, kuyruk yoğunluğunda negatif kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda önemli artışlar meydana gelmiştir. Bu artışlar, çözücü kontrole göre anlamlı değildir. CAPE'nin dört farklı konsantrasyonunun tek başına uygulandığı lenfositlerde, kuyruk uzunluğu, bütün konsantrasyonlarda, hem negatif ve hem de çözücü kontrole göre önemli artış göstermiştir.

$H_2O_2$ +CAPE'nin eş zamanlı uygulandığı insan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu, pozitif kontrole kıyasla artış göstermiştir fakat bu artış sadece en yüksek konsantrasyon olan  $8 \mu\text{g/mL}$ 'de anlamlı düzeye ulaşmıştır.  $H_2O_2$ +EGCG'nin eş zamanlı uygulandığı lenfositlerde kuyruk uzunluğu,  $1, 2$  ve  $4 \mu\text{g/mL}$  CAPE uygulamasında azalma göstermiş, bu azalma  $1 \mu\text{g/mL}$  CAPE'de, önemli düzeye ulaşmıştır.  $H_2O_2$ + $8 \mu\text{g/mL}$  CAPE dozunda ise, kuyruk uzunluğu, pozitif kontrole göre önemli artış meydana getirmiştir.

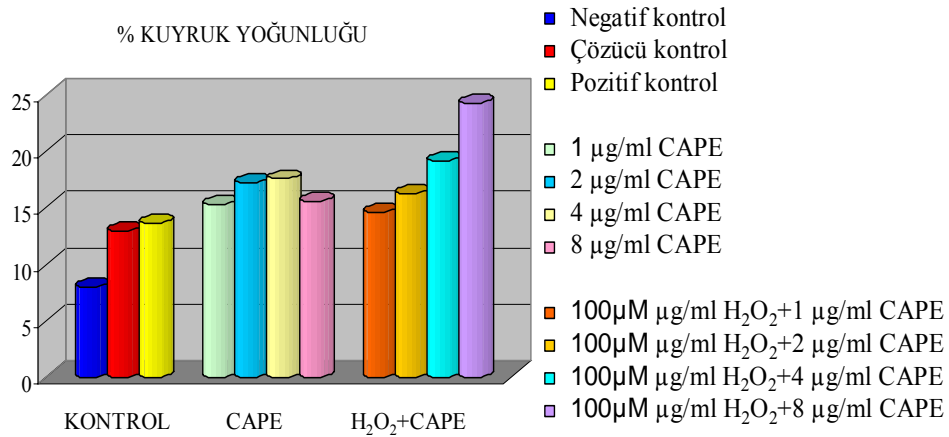
Çizelge 4.8. CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CAPE uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarı

Test maddesi	Süre (saat)	Doz		Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	CAPE (µg/ml)		
Negatif Kontrol	1	-	-	7,94± 1,21	64,15± 1,72
Çözücü Kontrol (DMSO)	1	-	-	12,97± 1,60	79,84± 2,12
			-	13,56± 1,54	102,22± 3,05
Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1	100	-		
CAPE	1	-	1	15,33± 1,94 <sup>a</sup>	97,63± 4,54 <sup>ab</sup>
	1	-	2	17,18± 2,17 <sup>a</sup>	88,21± 3,18 <sup>ab</sup>
	1	-	4	17,54± 1,98 <sup>a</sup>	93,83± 2,53 <sup>ab</sup>
	1	-	8	15,60± 1,66 <sup>a</sup>	89,47± 2,22 <sup>ab</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + CAPE	1	100	1	14,52± 1,93	88,39± 2,63 <sup>c</sup>
	1	100	2	16,23± 2,06	91,82± 3,32
	1	100	4	19,07± 2,14	99,96± 2,50
	1	100	8	24,22± 2,33 <sup>c</sup>	111,27± 3,39

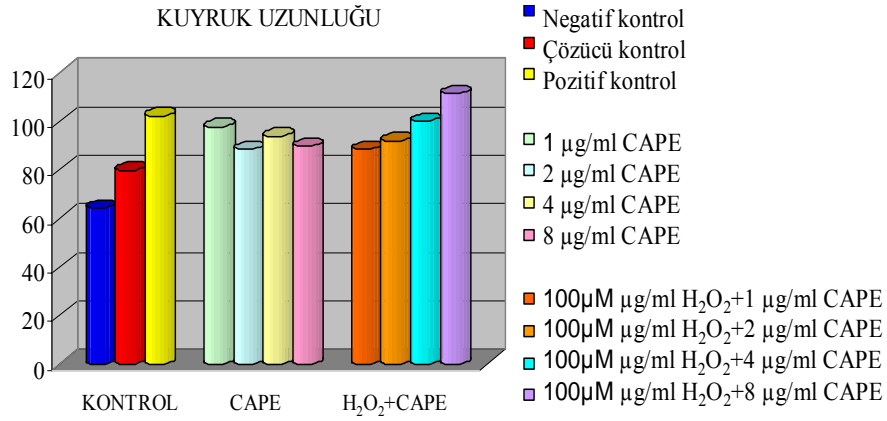
<sup>a</sup> Negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

<sup>b</sup> Çözücü kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)

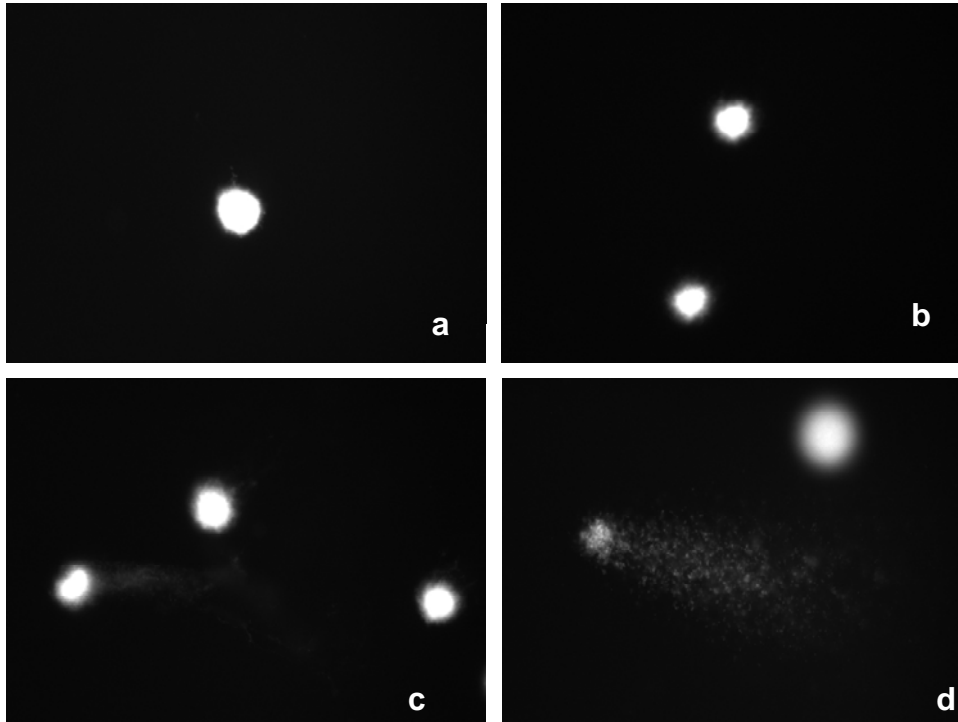
<sup>c</sup> Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-test)



Şekil 4.17. CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CAPE uygulaması sonucunda insan periferik lenfositlerinde oluşan % kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.18. CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CAPE uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan kuyruk uzunluğu



Resim 4.8. CAPE ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+CAPE uygulaması sonucunda insan periferel lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü  
a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser dünyada kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada ölüme neden olan ve hızla büyüyen bir sağlık problemidir [Reddy ve ark., 2003]. Ülkemizde 1970’li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Dünya çapında her yıl 10 milyon kişi akciğer kanseri, karaciğer kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, meme kanseri ve 100’den fazla çeşidini kapsayan çeşitli kanserlere yakalanmaktadır [Surh, 2003; Luk ve ark., 2007]. Dünya sağlık örgütünün (WHO) yayınladığı verilere göre, dünya çapında 2005 yılında meydana gelen 58 milyon ölümün % 13’ünün kanserden kaynaklandığı belirtilmiştir. Erişkinlerde her yıl 100 bin nüfus için 150-300 kişinin kansere yakalandığı tahmin edilmektedir [Fresco ve ark., 2006].

Kanserin çok çeşitli sebepleri vardır. Bunlar genel olarak iç ve dış sebepler olarak ikiye ayrılabilir. İç sebepler arasında hormonal değişiklikleri, bağışıklık sistemi bozukluklarını, kalıtsal mutasyonları ve ailesel genetik yatkınlığı sayabiliriz. Çevresel nedenler arasında, yaşamımızda kullandığımız bir çok kimyasalları, gıda katkılarında kullanılan, ziraatte kullanılan kimyasalları, ultra viyole ve iyonize radyasyonu, sigara içimi, virüs enfeksiyonları (hepatit B virüsünden kaynaklanan karaciğer kanseri ve papilloma virüsünden kaynaklanan servik kanseri), bakterileri (*Helicobacter pylori* kaynaklı mide kanseri) ve parazitleri (sistozomyas kaynaklı mesane kanseri), yiyeceklerin mikotoksin ile kontaminasyonu (aflatoksin kaynaklı karaciğer kanseri) gibi pek çok faktörü sayabiliriz. Bütün bu faktörler, birlikte veya ardışık olarak hücreleri etkileyerek, uzun yıllar içinde kansere yol açabilirler. Bu maddeler çeşitli mekanizmalarla kansere neden olurlar. Bu mekanizmalardan biri, oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumu ve serbest radikal türlerinin biyomoleküller (proteinler, lipidler, DNA, RNA) üzerinde hasar oluşturmasıdır [Lee ve ark., 2007; Raposo ve ark., 2007; Tabor ve ark., 2007; Vauhkonen ve ark., 2007].

Kanserin tedavisi farklı şekillerde yapılmaktadır. Başlıca tedavi yöntemleri immünoterapi, hormonoterapi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale ile tedavi yöntemleridir. Kanserin kemoterapi yolu ile tedavi edilmesinde, çeşitli

özelliklere sahip olan çok çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Siklofosfamid, taksol, cisplatin ve mitomisin-C gibi ilaçlar bunlardan sadece birkaç tanesidir. Bu tür ilaçlar, kanserli hücrelerin ve dolayısıyla tümörlerin küçültülmesi ve yok edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, DNA'daki bazıları alkilleyerek, serbest radikaller oluşturup DNA'yı hasara uğratarak, DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak, transkripsiyon ve translasyonu engelleyerek, mikrotübüller üzerine etki edip tübülün sentezini engelleyip mitozu durdurarak ve buna benzer çeşitli mekanizmalarla kanser özelliğinde olan hücrelerin çoğalmasını ve başka yerlere metastaz olmasını engellemeye çalışmaktadır. Ancak, bu ilaçlar sadece hedef alınan hücreleri etkilemez, o kişideki normal hücrelerde de benzer etkiler oluşturarak, sekonder kanserlerin meydana gelmesini tetikleyebilmektedir. Bunun da ötesinde, bu tür antineoplastik ilaçlar, genellikle her bir hasta için özel olarak hazırlanmakta ve verilmektedir. Bu ilaçları hazırlayan ve hastalara uygulayan sağlık çalışanlarında da büyük riskler oluşturmaktadır [Welters ve ark., 1999; Jordan ve ark., 2000; Rekhadevi ve ark., 2007].

Hem kanser hastalığı olan ve ilaçlarla tedavi gören hastalarda ve hem de bu ilaçları kullanan sağlık çalışanlarında yapılan genotoksisite çalışmalarında ve ayrıca bu tür ilaçlarla *in vivo* ve *in vitro* da yapılan araştırmalarda, bu ilaçların kardeş kromatid değişimi, kromozom anormallikleri, mikronükleus oluşumu ve comet kuyruk uzunluğunda önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir [Jakab ve ark., 2001; Xu ve ark., 2003; Rekhadevi et al., 2007]. Bu tür etkileri nedeniyle, hem kanserli hastalarda sekonder tümörlerin oluşmasının engellenmesi, hem de sağlık sektöründe çalışan kişilerde, tedavi amaçlı kullanılan antineoplastik ilaçlara maruziyet nedeniyle oluşabilecek kanserlerin engellenmesinde veya azaltılmasında, kemopreventif özellikteki fitokimyasallar önemli bir yer tutmaktadır. Kemopreventif etkileri nedeniyle, antikanser ilaçlarının neredeyse yarısı bitkisel kökenli ürün yada türevlerinden meydana gelmektedir [Efferth ve ark., 2007]. 1960'lı yılların başında, Ulusal Kanser Enstitüsü (ABD), bitki ekstraktlarının antitümör aktivitesi olduğunu bildirmesinden sonra, doğal bileşiklere olan ilgi giderek artmaya başlamıştır [Monks ve ark., 2002; Bo ve ark., 2002; Efferth ve ark., 2007].

Polifenoller çeşitli bileşikleri içeren, çoğunluğu yenilebilen bitkilerde doğal olarak bulunan bir fitokimyasal sınıfı olup, en çok çalışılan grubu flavanoidlerdir. Bu bileşikler, antioksidan, antimutajenik, antiöstrojenik, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar etkiler göstererek hastalıkların önlenmesine ve genomik stabilitenin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Buna rağmen bütün polifenoller faydalı etki göstermemektedir. Bazı polifenol türleri topoizomeraz enzim aktivitesini, prostanoid biyosentezini ve sinyal iletim mekanizmalarını etkileyerek mutajenik ve prooksidan etkiler de gösterebilmektedir. Kısaca polifenollerin hem oksidan ve hem de antioksidan etkili oldukları ve hücrenin fizyolojik olaylarında bir birinin zıttı yönde etki gösterdiği belirlenmiştir. Polifenoller, antioksidan etkileri ile hücre canlılıklarını arttırmaları, prooksidan etkileri ile de apoptozisi uyarıp, tümör büyümesini engellerler [Escarpa ve Gonzales, 2001; Ferguson, 2001; Han ve ark., 2007]. Polifenoller ile ilgili pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma olmasına karşın, bir birinin tersi yöndeki etkileri nedeniyle, henüz polifenollerin hepatik enzim sistemleri üzerine etkileri tam olarak bilinmemekte ve insanlar ile ilgili tam bir öngörü bulunmamaktadır [Ferguson, 2001; Glej ve Pool-Zobel, 2006; Ogura ve ark., 2008].

Bu tez çalışmasında, son yıllarda kullanımları ve önemleri artan polifenolik antioksidan bitki ekstraktları olan (-)-epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil esterinin insan periferik lenfositlerinde, antikanser ilacı olan MMC ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan genetik hasara karşı antigenotoksik bir etki oluşturup oluşturmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, bu antioksidanların insan lenfositlerinde tek başına uygulamasının genotoksik bir risk oluşturup oluşturmadığı da incelenmiştir. Bütün bu incelemelerde, mutajenite ve antimutajenitenin belirlenmesinde sıkça tercih edilen kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet testleri kullanılmıştır. Eğer bir ajan, bu testlerle ortaya çıkarılabilen bir genetik hasar oluşturuyorsa genotoksik ajan olarak adlandırılırken, bir ajanın ortaya çıkardığı genotoksik hasarların azaldığı bu testlerle gösterilebilirse, bu ajan antigenotoksik ajan olarak adlandırılmaktadır. Bu nedenle bu testler hem mutajenite ve hem de antimutajenite çalışmalarında kullanılmaktadır [Anderson, 1995; Dragonova-Filipanova ve ark., 2008; Wang, 2008; Benkovic ve ark., 2009].

Kromozomal anormallikler, kromozomlarda meydana gelen ve mikroskopik düzeyde gözlenebilen genetik değişiklerdir. Çeşitli ajanların etkisiyle kromozomlarda meydana gelen hasarlar, tamir edilemeyen veya yanlış tamir edilen kromozom hasarları ve kromozomların kutuplara hareketi sırasında meydana gelen anormallikler, mitoz veya mayozda mikroskop altında belirlenebilmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, insan periferel kan lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallik frekansındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmiş ve kromozomal anormallik testinin kanserogenezin erken safhada teşhisinde önemli bir marker olduğu belirlenmiştir [Hagmar ve ark., 1998; Ji ve ark., 2001; Bolognesi, 2003; Munari ve ark., 2008; Yılmaz ve ark., 2010].

Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinden kırılarak, kırılan parçaların yer değiştirdikten sonra kırılma noktaları ile yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır [Carrono ve Natarajan, 1988; Soysal, 2008]. Herhangi bir maddenin KKD frekansında artışa neden olması, o maddenin replikasyon mekanizmasını etkilediğinin ve DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir. Klastojenlerin ve klastojenik aktivitenin belirlenmesinde KKD testi hassas bir metot olarak kullanılmaktadır [Stanimirovic ve ark., 2005; Santoro ve ark., 2008; Beg ve ark., 2009]. Mikronükleuslar, spontan ya da indüklenmiş olarak, asentrik kromozomal fragmentlerinin ya da bütün kromozomların hücre bölünmesi sırasında ana çekirdek dışında kalmasıyla ayrı bir yavru çekirdek şeklinde oluşmaktadır [Flack ve ark., 1997; Poletta ve ark., 2008]. Mikronükleus testi, mutajenik ve/veya anöjenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir [Fenech, 2000]. Comet testi, DNA hasar oranı ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metottur [Singh ve ark., 1988; Olive ve ark., 1990; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Garry ve ark., 2003; Poletta ve ark., 2008; Hoelzl ve ark., 2009]. Bu metoda göre, DNA ipliğinde meydana gelen kırıklar sonucu oluşan küçük DNA parçaları, bir elektrik alanında, yapısı bozulmamış ve bütün haldeki DNA moleküllerine göre daha hızlı hareket etmektedir. Comet testinin en önemli avantajları, çok düşük düzeydeki DNA hasarlarını bile ayırt edebilmesi, her uygulama grubu için az sayıda hücreye ihtiyaç göstermesi, değişik hücre ve dokulara uygulanabilir olması, hızlı sonuç elde

edilebilmesi ve hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenebilmesidir [Olive ve ark., 1990; Fairbairn ve ark., 1995; Tice ve ark., 2000; Piperakis, 2009].

Antitümöral ajanlardan biri olan mitomycin-C (MMC), antimitotik etki gösteren, kromozomal aberasyonları ve kardeş kromatid değişimini arttıran alkile edici bir antibiyotiktir ve hücredeki birincil hedefi DNA'dır. Diğer alkile edici ajanlar gibi pek çok kimyasal tepkime oluşturur. MMC bir kez aktive olduğunda, DNA'yı adeninin N6 atomundan, guaninin O6, O7, N2 atomlarından alkile eder ve DNA'ya çapraz bağlanır. Bu çapraz bağlanmalar DNA sentezinin inhibisyonuna ve hücre ölümüne neden olur [Soysal ve ark., 2008]. Ayrıca MMC'nin, mikronükleus testinde de önemli düzeyde artışa neden olduğu bilinmektedir [Ferrara ve ark., 2006]. Antigenotoksisite çalışmalarında, referans mutajen olarak MMC'nin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur [Soysal, 1999; Roza ve ark., 2003; Maurich ve ark., 2004; Ferrara ve ark., 2006; Soysal ve ark., 2008]. MMC'nin yanısıra, quinakrin dihidroklorid, siklofosfamid, cisplatin, bleomycin ve doxorubicin tüm dünyada birçok farklı kanser türü için kullanılan antitümör ajanlar olup, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır [Gentile ve ark., 1998; Krishnaja ve ark., 2008].

Bu çalışmada, EGCG ve CAPE'nin tek başına uygulaması sonucunda, insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid değişimi olmak üzere altı tip yapısal anormallik gözlenirken, sayısal anormallik olarak poliploidi gözlenmiştir. En çok gözlenen kromozomal anormallikler kromatid kırıkları ve kromatid değişimleridir. Kromozomal anormalliklerin frekansı ve KA/hücre sayısı, poliploidinin dahil edildiği ve dahil edilmediği, iki ayrı şekilde değerlendirilmiştir.

(-)Epigallokateşin gallatın tek başına uygulaması, poliploidili anormal hücre frekansında, bütün konsantrasyonlarda, çözücü kontrolle kıyaslandığında bir artış meydana getirmiş fakat bu artışın anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Poliploidilerin dahil edilmediği değerlendirmede, anormal hücre frekansı çözücü kontrole göre 0,01 ve 0,10 µg/ml'de azalma, 0,05 ve 0,50 µg/ml'de artış göstermiştir. Fakat bu değişimler



anlamli değildir. KA/hücre sayısında da, poliploidili değerlendirmede 0,01, 0,05 ve 0,10 mg/mL'lik konsantrasyonlarda, çözücü kontrole göre artış gözlenmiş, fakat bu artış sadece 0,5 mg/mL'de anlamlı düzeye ulaşmıştır. KA/hücre sayısı, poliploidisiz değerlendirmede, 0,10 mg/mL'de değişmemiş, 0,01 mg/mL'de azalmış ve 0,50 mg/mL'de artış göstermiştir, fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. EGCG'nin MMC ile birlikte uygulandığı insan lenfositlerinde, MMC'nin tek başına uygulandığı lenfositlere nazaran, kromozom anormalliklerinde artış olduğu gözlenmiştir. Ancak bu artış, ne poliploidili ve ne de poliploidisiz değerlendirmelerde pozitif kontrole göre, anlamlı değildir. KA/hücre sayısında hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, pozitif kontrole göre artışlar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, EGCG'nin insan lenfositlerinde tek başına uygulamasının, kromozom anormalliklerini önemli olmayan düzeyde artırdığını veya azalttığını, MMC ile birlikte eş zamanlı uygulamasının, pozitif kontrole göre özellikle KA/hücre sayısında önemli artışlara neden olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla EGCG, MMC tarafından oluşturulan hasarları azaltmamış, tam tersine artırmıştır.

Bu çalışmada, diğer bir antioksidan olan kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) tek başına kullanılması ile insan lenfositlerinde meydana getirdiği kromozomal anormalliklerin değerlendirilmesi de, poliploidinin dahil edildiği ve dahil edilmediği iki ayrı şekilde yapılmıştır. CAPE'nin insan lenfositlerine tek başına uygulanması sonucunda, anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısı, hem poliploidili ve hem de poliploidisiz değerlendirmede, çözücü kontrole göre bir miktar artış göstermekle beraber, bu artış sadece 4 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlıdır. CAPE'nin MMC ile eş zamanlı uygulandığı lenfositlerde, poliploidili anormal hücre frekansı, pozitif kontrole göre 1 µg/ml'de anlamsız artış, diğer konsantrasyonlarda azalma göstermiştir. Bu azalma, 4 µg/ml'de anlamlıdır. Poliploidilerin dahil edilmediği değerlendirmede, bütün MMC+CAPE konsantrasyonları, anormal hücre frekansında azalmaya neden olmuştur ve bu azalma 2 ve 8 µg/ml'de anlamlı düzeydedir. MMC+CAPE uygulaması, pozitif kontrole göre, poliploidili ve poliploidisiz değerlendirmede KA/hücre sayısında, 1 ve 4 µg/ml'de anlamsız artış, 2 ve 8 µg/ml'de anlamlı azalma

gözlenmiştir. Bu sonuçlar, CAPE'nin kullanılan konsantrasyonlarının, MMC kaynaklı kromozom anormalliklerini azalttığını göstermiştir.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, polifenollerin ve polifenollerden kateşinin hem antigenotoksik ve hem de genotoksik etkili olduğunu gösteren sonuçlar mevcuttur. Kateşinin çok etkili bir antioksidan olması nedeniyle, anti-mutajenik ve anti-karsinojenik olduğu gösterilmiştir [Lin ve ark., 1999; Baek ve ark., 2005; Doss ve ark., 2005; Liu ve ark., 2008]. Alkilleyici ajan olarak bilinen kemoterapötik ilaçlardan metil metan sülfonat (MMS) ve siklofosfamid (CP) ile indüklenmiş kromozomal aberasyonların EGCG ile azaldığı tespit edilmiştir. Bu etkinin, EGCG'nin, MMS ve CP'nin metabolik aktivasyonunu engellemesi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir [Beg ve ark., 2009]. Yeşil çay tüketimindeki artışın kanda total kolesterolü ve triasilgliserolü düşürdüğü ve koroner kalp hastalıkları riskini azalttığı da belirlenmiştir. Katyar ve Muktar, yeşil çayın kanser önleyici etkisinin büyük kısmının EGCG kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir [Katiyar ve Muktar, 1996]. EGCG'nin, serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarı üzerinde iyileştirici etkisi olduğu belirlenmiştir [Kinlen ve ark., 1988; Yang ve Wang, 1993; Katiyar ve Mukhtar, 1996]. Kurt ve arkadaşları, sıçanlarda CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan oksidatif stres üzerinde kateşinin etkisini inceledikleri çalışmada, hem CCl<sub>4</sub>'ün ve hem de kateşinin tek başına uygulaması yapıldığı gibi, CCl<sub>4</sub>+kateşin'in eş zamanlı uygulaması da yapılmıştır. Eş zamanlı uygulama yapılan hücrelerde, yalnız CCl<sub>4</sub> uygulanan hücrelere göre, oksidatif stres kaynaklı hasarın azaldığı belirlenmiştir [Kurt ve ark., 2004].

Bu antioksidan özelliklerinin yanı sıra, EGCG'nin prooksidan özellik göstererek, DNA'da hasarların oluşmasına neden olduğu da belirlenmiştir. Kanser hücrelerini öldürme ve apoptoza yönlendirme etkisinin, bu prooksidan etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Fakat fazla miktarda kullanımı, ratlarda kolon kanserine de neden olabilmektedir [Furukawa ve ark., 2003]. Mukherjee ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada diyetle alınan siyah çayın *in vivo* fare kemik iliği kromozomlarında tek başına ve klastojen (MMC, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ile eş zamanlı etkilerini araştırmışlardır. Çay ekstresi günde bir kez ve iki kez olmak üzere farelere uygulanırken, klastojenler her

24 saat bitiminde bir kez uygulanmıştır. Günde bir kere çay ekstresi verilen uygulama grubunda herhangi bir değişim gözlenmezken, günde iki kere çay ekstresi verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla kromozomal anormallik frekansında artış olduğu belirlenmiştir. 7 günlük periyotta günde iki kere çay uygulaması  $K_2Cr_2O_7$  kaynaklı hasarların oluşumunu önemli derecede azaltırken, MMC kaynaklı hasarlar üzerinde herhangi bir azaltıcı etkisi olmamıştır [Mukherjee ve ark., 1997]. Çin hamsteri akciğer hücrelerinde (CKL/IU) kateşinden dolayı oluşan kromozomal aberasyonları belirlemek amacı ile yapılan bir çalışmada, yeşil çay kateşinleri GTC-1 ve GTC-2 olmak üzere iki gruba ayırarak denemeler yapılmıştır. GTC-1, ısı muamelesi yapılmış olan yeşil çay kateşinlerini içeren bir grupken, GTC-2 ise herhangi bir muameleye tabi tutulmamış olan yeşil çay kateşinlerini içeren gruptur. Çalışmada GTC-1, 56,3-900  $\mu\text{g/ml}$  doz aralığında uygulanırken, GTC-2 35,1-700  $\mu\text{g/ml}$  doz aralığında uygulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, her iki grupta da uygulanan konsantrasyonların artışına bağlı olarak kromozomal aberasyon frekansında artış gözlenmiştir [Ogura ve ark., 2008]. Yapılan bazı çalışmalar kateşinlerin kromozomal aberasyonları uyardığını göstermektedir. EGCG'nin kültüre edilmiş insan hücrelerinde, DNA çift zincir kırıklarını uyararak kromozomal aberasyonlara ve kardeş kromatid değişimlerine neden olduğu gösterilmiştir [Shirahata ve ark.,1989; Jain ve ark., 1991; Bertram ve ark., 2003; Malik ve ark., 2003].

Asuka ve arkadaşları, çin hamsteri akciğer hücrelerinde (CHL/IU) kateşin ile indüklenmiş kromozomal aberasyonların mekanizmasını araştırmışlardır. Çalışmaya göre, kateşin, *in vitro* kültür ortamında, önemli miktarda  $H_2O_2$  oluşturmuştur. Ancak, aynı konsantrasyonda su içerisinde bekletilen kateşinlerin düşük miktarda  $H_2O_2$  ürettiği gözlenmiştir. Kültür ortamında,  $H_2O_2$  kaynağı olan kateşin ile ortam pH'sı yaklaşık 6 ya yükselmiştir, bu da *in vitro* şartlarda kateşinlerden oluşacak  $H_2O_2$  miktarında pH'nın belirleyici bir faktör olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma, kateşinleri de içine alan bazı polifenollerin, *in vitro* şartlarda prooksidan özellik gösterdiklerini desteklemektedir [Asuka ve ark., 2008]. Tanaka yaptığı çalışmada EGCG'nin yüksek konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  oluşumuna neden olduğunu belirtmiştir. Johnson ve Loo yaptıkları çalışmalarla, EGCG'nin oksidize özellik gösteren ve DNA hasarını indükleyen dozunun 100  $\mu\text{mol}$ , Tanaka hücre döngüsü sürecini yavaşlatan

dozun 200  $\mu\text{mol}$  ve Long ve arkadaşları da  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretiminin olduğu dozun 100  $\mu\text{mol}$  olduğunu belirlemişlerdir [Tanaka, 2000; Johnson ve Loo, 2000; Long ve ark., 2000].

Bazı epidemiyolojik çalışmalar, yeşil çay tüketiminin karaciğer ve barsak kanserlerinin gelişimini uyardığını, *in vitro* da  $\text{Fe}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları varlığında DNA kırılmasını arttırdığını gösterirken [Hirose ve ark., 1993; Hiramoto ve ark., 1996; Hayakawa ve ark., 1997; Hirose ve ark., 2002], diğer çalışmalar, artan yeşil çay tüketimi ile göğüs, mide, rektal ve pankreatik kanserlerin gelişiminin baskılandığını desteklemektedir [Imai ve ark., 1997; Inoue ve ark., 1998; Nakachi ve ark., 1998; Ji ve ark., 2001; Arts ve ark., 2002].

Azam ve arkadaşları çay polifenollerinden olan epikateşin (EC) ve epigallokateşin gallat'ın serbest radikal oluşturma yeteneklerini karşılaştırmıştır. Kültür ortamında bu çay polifenollerinin  $\text{Cu(II)}$ 'yi,  $\text{Cu(I)}$ 'e dönüştürdüğü ve bu işlemi gerçekleştirirken de hidroksil radikali oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir [Bhatt ve Hadi, 1994]. Oluşan hidroksil radikallerinin artan konsantrasyonun da DNA'da kırılmalara neden olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda iki önemli sonuç ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlardan ilkinde göre, EGCG süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikaller oluşturarak prooksidan özellik göstermektedir ve bu etkinin varlığında DNA'da hasarlara sebep olmaktadır, ikinci sonuç, bakır kaynaklı oksidasyon EGCG'nin polimerize bir polifenol olmasından kaynaklanmaktadır [Azam ve ark., 2004]. Yapılan çalışmalar kromatinin yapısında eser miktarda bakır iyonlarının bulunduğunu ve bu iyonların habis tümör gelişimini arttırdığını göstermiştir [Ebadi ve Swanson, 1988; Yoshida ve ark., 1993].

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), yaban mersini, böğürtlen, çilek, vişne, kiraz, mürver, kuş üzümü gibi kırmızı renkli meyvelerde, ayçekirdeği tohumlarında ve turpgillere ait sebzelerde bulunan bir polifenol olup, bal arılarının ürettiği propolisin de aktif bileşenlerinden birisidir [Hepşen ve ark., 1996; Koltuksuz ve ark., 1999; Un-Ho ve ark., 2008; Ögetürk ve ark., 2009]. Yapılan bazı çalışmalarda, CAPE'nin antiinflamatuvar, antifungal ve antimikrobiyal, immünomodülatör, antimutajenik ve

antioksidan özelliklere sahip olduğu, oksidatif hasarlara karşı yüksek koruyuculuk gösterdiği belirlenmiştir [Krol ve ark., 1990; Dimov ve ark., 1992; Edenharder ve ark., 1993; Pascual ve ark., 1994; Mirzoena ve ark., 1996; Un-Ho ve ark., 2008; Koyu ve ark., 2009]. CAPE 10 µM konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder [Sahin ve ark., 2002]. CAPE iki halkasal yapı içerir ve flavaniodlere bezemektedir. Bu halkasal yapılardan bir tanesi, yapısında iki hidroksil grubu taşımaktadır ve hidroksil grupları sayesinde redoks reaksiyonlarında aktif rol oynayarak, E ve C vitaminlerinde olduğu gibi, antioksidan etki göstermektedir [Koltuksuz ve ark., 2000].

Öğetürk ve arkadaşları, ratlarda CCl<sub>4</sub> kaynaklı oluşturulan nefrotoksisiteye karşı kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) koruyucu etki sağlayıp sağlamadığını belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada, hem CCl<sub>4</sub> ve hem de CAPE'nin tek başına uygulaması ile birlikte, CCl<sub>4</sub>+CAPE'yi eş zamanlı olarak da uygulamışlardır. CCl<sub>4</sub>+CAPE eş zamanlı uygulamasının, CCl<sub>4</sub> uygulaması sonucunda oluşturulan hasarları önemli düzeyde azalttığını gözlemişlerdir [Öğetürk ve ark., 2009]. Vardi ve arkadaşları, ratlarda gentamisin etkisi ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı CAPE'nin koruyucu etkisini belirlemek amacıyla yalnız gentamisin ve yalnız CAPE içeren gruplar ile gentamisin+CAPE içeren üç uygulama grubu oluşturmuştur. Gentamisin+CAPE eş zamanlı uygulama grubunda, yalnız gentamisin uygulaması yapılan gruba göre nefrotoksisite oranında azalma gözlenmiştir [Vardi ve ark., 2005].

Yılmaz ve arkadaşları, sisplatin ile indüklenmiş kromozomal aberasyonlar üzerinde CAPE'nin etkisini rat kemik iliği hücrelerinde incelemişlerdir. Bunun için ratlara sisplatin uygulamasından (5 µg/ml i.p.) 24 saat önce, CAPE'nin 10 µg/ml'lik tek dozu intra peritoneal (i.p.) injeksiyon ile verilmiştir. Sisplatin uygulamasından 24 saat sonra ratlar sakrifiye edilmiştir. Yalnızca sisplatin uygulaması yapılan gruba kıyasla, CAPE uygulamasının kromozomal aberasyonları ve anormal metafaz miktarını azalttığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda CAPE'nin sisplatin kaynaklı kromozomal aberasyonları radikal temizleyici aktivitesi ile önlediği bildirilmiştir [Yılmaz ve ark., 2010].

Propolis, bal peteğinde bulunan polifenollerce zengin bir madde olup, kafeik asit bakımından da zengindir. Tavares ve arkadaşları wistar rat kemik iliği hücrelerinde doxorubicin (DXR) ile oluşturulan kromozomal hasarların, propolis ile azaltılıp azaltılamayacağını belirlemek için propolis ekstraktının 6, 12, 24 mg/kg'lık dozları, DXR ile eş zamanlı olarak ve 12 mg/kg'lık dozu subakut olarak uygulanmıştır. 12 mg/kg'lık doz uygulamasının hem eş zamanlı hem de subakut uygulamada, kromozomal anormallik frekansında anlamlı azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu azalmanın çalışılan propolis maddesi içerisindeki fenolik bileşiklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür [Tavares ve ark., 2007].

Bu çalışmada kullanılan (-)-epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil ester, MMC tarafından oluşturulan genetik hasara karşı farklı sonuçlar vermiştir. (-)-epigallokateşin gallat, hem tek başına ve hem de MMC ile eş zamanlı uygulandığında kromozomal anormallik frekansında artışa sebep olmuştur. Bu durum, (-)-Epigallokateşin gallatın kuvvetli bir antioksidan olmasının yanında, prooksidan özelliğinin de olmasıyla açıklanmaktadır. Kafeik asit fenetil ester uygulamasında ise kromozomal anormallik frekansında pozitif kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Bu da kafeik asit fenetil ester'in anormallik frekansını antioksidan özelliği ile düşürdüğünü göstermiştir. Buna göre bu çalışmada (-)-epigallokateşin gallat, kafeik asit fenetil estere göre çok daha düşük dozlarda kullanılmasına rağmen, prooksidan etki göstermiştir. Bu prooksidan etkinin, EGCG'nin kültür süresi boyunca ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretmesinden, kromatinin yapısındaki eser miktardaki bakır iyonları varlığında serbest radikal oluşumunu uyarma mekanizmasından ya da kandaki demir varlığında fenton reaksiyonu gelişiminden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Kafeik asit fenetil esterinin antioksidan etkisinin mekanizmasının tam olarak bilinmemekle beraber, CAPE'nin serbest radikal temizleyici ve antioksidan enzimleri aktive edici özelliklerinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca EGCG ve CAPE uygulamalarındaki sayısal anormallik olan poliploidinin fazla olması, bu maddelerin topoizomeraz zehiri şeklinde etki göstermesinden kaynaklanmış olabilir. Bazı kimyasallar, topoizomeraz II enziminin aktivitesini engeller ve sonuçta poliploidiye neden olur. Bu enzim normalde, kardeş kromatidlerin ayrılmasında gerekli olan bir enzimdir [Sumner, 1995; Cummings ve

ark., 1995; Sumner, 1998]. Topoizomeraz enzimi, mitoz bölünme sırasında kromozomların karşılıklı kutuplara çekilmesinde çok önemli bir rol oynar. Kromozom kondensasyonundan sonra, topoizomeraz fonksiyonu engellenirse, hücreler metafazda kalır, kromatidler kutuplara ayrılamaz ve sonuçta kromozom artışı olur [Clarke ve ark., 1993].

Bu çalışmada, MMC tarafından oluşturulan kardeş kromatit değişimlerinin EGCG ve CAPE ile iyileştirilip iyileştirilmeyeceği de incelenmiştir. KKD, yeni eşleşmiş kromatid ile kardeş kromatidi arasında karşılıklı değişimlerle meydana gelen, hücre döngüsünün S fazıyla ilişkili bir mekanizma olup [Bozkurt ve ark., 2004], mutajenik ve karsinojenik ajanların belirlenmesinde kullanılan hassas bir göstergedir. DNA'daki yanlış kodlanmaların ve hatalı DNA sekans onarımlarının KKD'ye neden olduğu düşünülmesine rağmen, KKD'nin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. KKD oluşum mekanizmasında DNA tek zincir kırıkları önemli rol oynamaktadır. KKD tamir işlemi, homolog rekombinasyon yoluyla yapılır, ayrıca diğer bir onarım mekanizması olan homolog olmayan uçların birleşmesi yoluyla da yapılmaktadır. Homolog rekombinasyon mekanizması, tamir işlemini gerçekleştirebilmek için tam bir homolog sekansa ihtiyaç duyarken, homolog olmayan mekanizma, yüksek düzeyde sekans (DNA dizisi) homolojisi gerektirmeden kırık olan komşu DNA uçlarını tamir etmektedir [Bozkurt ve ark., 2004; Aydemir ve ark., 2005].

(-)-Epigallokateşin gallatın insan lenfositlerine tek başına uygulaması, çözücü kontrole göre sadece en yüksek konsantrasyonda (0,50 µg/ml) KKD/hücre sayısında önemli artışa neden olmuştur. EGCG, MMC ile eş zamanlı uygulandığında, MMC'nin tek başına uygulamasına kıyasla, KKD/hücre sayısında anlamlı düzeyde azalmaya neden olmuştur. Sadece en yüksek konsantrasyondaki (0,50 µg/ml EGCG) azalma önemli değildir. Kafeik asit fenetil esterinin tek başına uygulamasının, insan lenfositlerinde KKD frekansını, çözücü kontrole kıyasla azalttığı, hatta bu azalmanın 1 µg/ml uygulamasında anlamlı olduğu gözlenmiştir. MMC ile eş zamanlı uygulanan bütün CAPE konsantrasyonları, KKD frekansını, pozitif kontrole kıyasla önemli

düzeyde düşürmüştür. KKD testinde, her iki antioksidanın da iyileştirici yönde etki gösterdiği ve antimutajenik etkili olduğu belirlenmiştir.

Shim ve arkadaşları, 20-52 yaş aralığında sağlıklı sigara içen erkeklerin periferal lenfositlerinde, yeşil çay tüketiminin sigara kaynaklı KKD frekansı üzerindeki etkisini araştırmıştır. Altı ay süre ile günde 2-3 kupa yeşil çay içen sigara içicilerinin KKD frekansında azalma gözlenmiştir. Yeşil çay tüketimi sigara kaynaklı oluşan KKD'yi azaltmıştır [Shim ve ark., 1995].

Imanishi ve arkadaşları yeşil ve siyah çaydan elde ettikleri tanin karışımının çin hamsteri hücrelerinde MMC tarafından uyarılmış KKD frekansı üzerinde etkisini araştırmıştır. İçeriğinde EGCG'nin de bulunduğu tanin karışımı S9 karışımı olmadan KKD frekansında artmaya sebep olmuştur. Rat karaciğeri metabolik enzimi olan S9 ile ön muamelenin ardından tanin karışımı uygulandığında ise KKD değerlerinde anlamsız değişimler gözlenmiştir. MMC ve UV ile indüklenmiş KKD frekansında, düşük konsantrasyonda S9 varlığında, tanin karışımının sonradan uygulanması, KKD frekansında azalmaya sebep olmuştur. Diğer taraftan S9 karışımının yüksek konsantrasyonu (20 µg/ml) komutajenik etki göstermiştir. Bu çalışmada, çay polifenollerinin değiştirici etkisinin, hücre döngüsünün G<sub>1</sub> fazında etkili olduğu belirtilmiştir [Imanishi ve ark., 1991].

Tanaka ve arkadaşları, parakuat ile hasara uğratılmış kültür hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin koruyucu etkisini araştırmışlar ve yeşil çayın ana bileşeni olan EGCG'nin serbest radikal kaynağı olan parakuat nedenli KKD frekansında azalmaya neden olduğunu gözlemişlerdir [Tanaka ve ark., 2000]. Swiss albino ratlarında dimetilbenzoat (DMBA) ve cisplatinin (CP) mutajenik etkisine karşı teafalavinlerin (TF) ve tearubiginlerin(TR) etkisi incelendiğinde, DMBA ve CP kaynaklı KKD frekansında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir [Lijinsky, 1999]. Beg ve arkadaşları insan lenfosit kültürlerinde cisplatin ve metil metan sülfonat ile oluşturulan hasarlara karşı EGCG'nin koruyucu etkisini S9 metabolik aktivasyon sistemi enzimleri varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. Kuvvetli bir antioksidan



olduğu bilinen EGCG'nin S9 varlığı ve yokluğunda, CP ve MMS kaynaklı KKD frekansında anlamlı azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir [Beg ve ark., 2009].

Kırmızı ve beyaz her iki üzüm çeşidinin de yapısında bulunan polifenollerin insan lenfositlerinde MMC kaynaklı hasarlar üzerindeki koruyucu etkisi KKD testi ile araştırılmıştır. Üzüm polifenollerinden kafeik asit, gallik asit ve rutin hidrat'ın MMC tarafından oluşturulan KKD frekansını arttırdığı gözlenirken, ferulik asit, protokateşuik asit, (+)-kateşin, (-)-epikateşin ve trans-resveratrol'ün 5 ve 100 µM konsantrasyon aralığında KKD frekansında değişime neden olmadığı belirlenmiştir. MMC klastojenitesine karşı ortaya çıkan sonuçların, polifenollerin yapısal farklılıklarından kaynaklandığı belirtilmiştir [Stagos ve ark., 2007]. Kültüre edilmiş Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHOK-1) MMC ile oluşturulan KKD frekansı üzerinde 21 çeşit polifenolik içeriğin etkisi araştırıldığında, skopoletin, jasmon, kafeik asit ve ferulik asit'in KKD frekansında artışa sebep olduğu, kafeik asit ve ferulik asitin KKD artıcı etkilerinin alfa, beta-ansatüre karbonil gruplarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür [Sasaki ve ark, 1989].

(-)Epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil ester'in, MMC tarafından oluşturulan kardeş kromatid değişimi sayılarında istatistiksel olarak önemli derecede azalma sağlamış olmaları, antioksidan aktivitelerine bağlı olarak antimutajenik olduklarını göstermektedir. MMC'nin hücrelerde serbest radikal oluşumuna neden olduğu bilindiğine göre, bu iki polifenolik maddenin radikal süpürücü ve antioksidan enzimleri aktive edici mekanizmaları yolu ile antioksidan özellik gösterdikleri tahmin edilebilir. Ayrıca her iki polifenolik madde, kromozomal anormallik testinde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileştirici etki sağlamazken, KKD testinde önemli bir iyileşme sağlamışlardır. Buna göre, hem (-)-epigallokateşin gallat ve hem de kafeik asit fenetil ester DNA tamir sistemlerini aktive edici etki göstermiş olabilir. Bu antioksidanların, kromozom anormallikleri ve KKD testlerinde farklı etki göstermelerinin sebebi, bu iki mekanizmanın, bazı ortak özelliklerine rağmen, bir birlerinden farklı mekanizmalara sahip olduğunu da göstermektedir.

Bu çalışmada her bir antioksidan madde için, sitotoksitenin bir göstergesi olan mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksi (RI) değerleri de hesaplanmıştır. Replikasyon indeksi, genetik etkilerin belirlenmesinde faydalanılan kriterlerden biri olup, hücre döngüsü kinetiklerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, EGCG ve CAPE'nin ne kendi başına olan uygulamaları ve ne de MMC ile eş zamanlı yapılan uygulamaları sonucunda, insan lenfositlerinde RI'de meydana gelen değişimler, negatif, çözücü ve pozitif kontrolden önemli farklılıklar göstermemiştir. EGCG'nin tek başına uygulaması, insan lenfositlerindeki mitotik indeks, çözücü kontrole göre önemli olmayan şekilde düşürmüştür. Eş zamanlı uygulamada, EGCG'nin bütün konsantrasyonları mitotik indeks, pozitif kontrole göre önemli düzeyde düşürmüştür. CAPE uygulamasında, mitotik indeks, çözücü kontrole kıyasla, sadece en yüksek konsantrasyon olan 8 µg/ml'de önemli düşüş gösterirken, MMC+CAPE'nin bütün konsantrasyonları, mitotik indeks pozitif kontrole göre anlamlı şekilde düşürmüştür.

Replikasyon indeksinde herhangi bir değişiklik olmaması, bu maddelerin hücre bölünmesinde sentez safhasından sonra etkili olduğunu desteklemektedir [Soloneski ve ark., 2002; Çelik ve ark., 2004]. Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mitotik indeksteki azalmanın, hücrelerin mitozu girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesinden dolayı ya da ATP seviyesinde azalmadan ve enerji üretim merkezindeki bozukluktan kaynaklandığını öne sürmektedir. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iğ oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması ve G2 periyodunun uzaması da gösterilmektedir [Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Bu çalışmada mitotik indeksteki düşüşlerin her iki polifenolik maddenin apoptozu indükleyici özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. EGCG'nin apoptozu indüklemesi, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> kontrol basamağında hücre döngüsünün durdurulması, NFκB'nin inhibisyonu ardından TNFα inhibisyonu ve hücreden salınımı, salınan TNFα'lerin hücre yüzeyine bağlanması sonucunda mitokondriyal depolarizasyon oluşumu, depolarizasyonun ardından büyüme faktörleri sinyal inhibisyonu ve son olarak kaspaz 3 ve 8 inhibisyonu basamaklarının arda arda gelişimi ile olmaktadır. Kaspaz aktivasyonu, apoptozda meydana gelen yapısal ve moleküler değişikliklerin temel nedeni olarak

bilinmektedir [Roy ve ark., 2003]. Mitotik aktiviteyi baskılayıcı etki, hidroksil radikali süpürücü bir antioksidan olmalarından da kaynaklanabilir. Pryor ve Tang yaptıkları çalışma ile hidroksil radikali süpürücü etkisi olan bileşiklerin diğer yüksek reaktif özellikteki oksiradikaller ile etkileştiğini belirlemiştir [Pryor ve Tang, 1978]. Hücresel hasarın serbest radikallerin etkisi ile indüklenebileceğini ve bu hasarın serbest radikal süpürücü antioksidanlar ile engellenebileceğini gösterirken, serbest radikal süpürücü antioksidanların hücreler üzerine farklı etkilerinin de olabileceğine işaret etmektedir [Cohen, 1978]. Hidroksil radikalleri (OH·) mitojenik sinyalin transdüksiyonu için zorunlu araçlar olabileceğinden dolayı, hidroksil radikalini temizleme yeteneğine sahip olan birçok birleşimin, lenfosit mitogenezini baskılama yeteneğine sahip olduğu da düşünülmektedir [Novogrodsky ve ark., 1982].

Bu çalışmada kullanılan bir diğer parametre olan mikronükleus testi, sitokinezin bloke edilmesine dayanan ve genetik hasarın belirlenmesinde insan lenfositlerinde yaygın şekilde kullanılan bir metottur (CBMN). MN'ler, kromozom kırıkları veya geri kalmış kromozomlardan oluşabileceği gibi, kromozomlarda yeniden düzenlenmeler ve değişmiş gen ekspresyonları gibi yollarla da oluşabilir. MN oluşumu ile kanser arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir [Umegaki ve Fenech 2000; Fenech, 2002; Ames ve Vakimoto, 2002; Rajagolpan ve ark., 2004; Fenech ve ark., 2007; Bonassi ve ark., 2007]. Bu çalışmada, EGCG'nin tek başına uygulaması, çözücü kontrole göre, MN frekansında artışa neden olmuştur. Fakat bu artış, sadece en düşük konsantrasyonda anlamlıdır. MMC ile eş zamanlı EGCG uygulamalarında, MN frekansında, pozitif kontrole göre anlamlı azalma gerçekleşmiştir. CAPE'nin insan lenfositlerinde tek başına uygulaması da, MN frekansını, çözücü kontrole göre artırmıştır, ancak bu artış sadece 4 µg/mL'lik konsantrasyonda anlamlıdır. CAPE'nin MMC ile eş zamanlı uygulaması, pozitif kontrole nazaran MN frekansında düşüşe neden olmuştur fakat bu düşüş en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL'de anlamlıdır. Bu sonuçlar, hem EGCG'nin ve hem de CAPE'nin, MMC kaynaklı MN frekansını bir miktar azalttığını göstermektedir. CAPE'nin 8 µg/mL'lik konsantrasyonu, hem tek başına ve hem de MMC ile birlikte uygulandığında toksik etki göstermiştir.

EGCG ve CAPE uygulamaları, ne tek başına ve ne de MMC ile birlikte, nükleer bölünme indeksinde önemli bir değişim yapmamıştır.

Literatür taramalarında da benzer sonuçlar gözlenmiştir. Çay kateşinlerinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla farelerde ICR ve sıçanlarda SD hücrelerinde yapılan çalışmada, eritrositlerde MN frekansında artış olmadığı belirlenmiştir [Ogura ve ark., 2008]. Sugisawa ve Umegaki, insan B lenfoblastik hücre hattında WIL2-NS hücrelerinde EGCG'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e ve diğer ROS'a karşı meydana getirdiği koruyucu etkiyi MN testi ile araştırmıştır. EGCG'nin yüksek konsantrasyonlarda (100 µmol/L) MN frekansında artmaya neden olduğu, düşük konsantrasyonlarda (<1 µmol/L) ise MN frekansında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir [Sugisawa ve Umegaki, 2002].

Teaflavin (TF) ve tearubiginlerin (TR) insan lenfositleri V79 hücrelerinde MMC ile oluşturulmuş hasar üzerine koruyucu etkisi incelendiğinde, TF ve TR'nin antiklastojenik etkisi olduğu belirlenmiştir [Liu, 1990; Liu ve ark., 2003]. Fare kemik iliği hücrelerinde MMC kaynaklı mikronükleus (MN) frekansı üzerinde yeşil ve siyah çay tanin karışımının etkisi araştırılmış ve MMC'nin intra peritoneal (i.p.) enjeksiyonundan önce oral yolla tanin karışımı verilen uygulama grubunun MN frekansının azaldığı gözlenmiştir. Yeşil ve siyah çay tanin karışımının MMC'den 6 saat önce i.p. yolla verildiği grupta MN frekansında %73-%83 arasında azalma gözlenmiştir. MMC sonrası uygulamada MN frekansında değişiklik gözlenmemiştir [Imanishi ve ark., 1991].

Sugisawa ve arkadaşlarının WIL2-NS hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada (-)-epigallokateşin gallat (EGCG), (-)-epikateşin gallat (ECG), (-)-epigallokateşin (EGC), (-)-epikateşin (EC), (+) kateşin (+C) ve gallik asidi (GA) içeren altı çay bileşeninin antigenotoksik etkisi MN testi ile araştırılmıştır. Çay bileşenlerinin hiçbiri <10 µM konsantrasyonda MN frekansında artışa sebep olmazken, EGCG, EGC, ECG, C ve GA, 1 µM konsantrasyonda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı hasar oluşumunu engellemiştir. Tert-bütillhidroperoksid kaynaklı MN frekansında EGCG ve ECG, 0,3 µM konsantrasyonda, EGC ve GA 10 µM konsantrasyonda iyileştirici etki

göstermiştir. Bu çalışmada, koruyucu etkide galloil grubuna bağlı olan flavan-3-ol grubunun önemli olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucuna göre çay bileşenlerinin genotoksik ve antigenotoksik özelliklerinin kimyasal yapılarına göre değiştiği öne sürülmüştür [Sugisawa ve ark., 2004].

Raj ve arkadaşları hibrid dişi B6C3F1 fareleri %2'lik kafeik asit içeren ve içermeyen yem karışımları ile 1 hafta beslemişler ve takiben farelere intra peritoneal enjeksiyon ile DMBA (25 mg/kg) vermişlerdir. Enjeksiyon sonrasında kemik iliği örnekleri belirli zaman aralıklarında alınıp her bir fareden 500 polikromatik eritrosit analiz edilmiştir. Kafeik asit içeren yemle beslenen farelerde, sadece DMBA uygulaması yapılan farelere kıyasla, MN frekansında %50 azalma olduğu gözlenmiştir [Raj ve ark., 1983]. Diğer yandan Senedese ve arkadaşları, propolis ekstraktının % 1.2, 2.4 ve 3.6'lik konsantrasyonlarının genotoksik etkilerini MN testi ile analiz etmişler ve bu üç konsantrasyonun, MN frekanslarında negatif kontrole göre anlamlı bir değişim yapmadığını gözlemişlerdir [Senedese ve ark., 2008].

Ozkul ve arkadaşları propolisin antikarsinojenik potansiyelini insan lenfosit kültürlerinde araştırmıştır. Çalışmada, sigara içmeyen sağlıklı erkeklerden alınan kan kültürlerine, propolisin 0,01, 0,05, 0,10, 0,20, 0,50, 0,70 ve 1,00 mL konsantrasyonları uygulanmıştır. Propolisin, MN frekansında doza bağlı artışa ve MI frekansında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak propolisin artan konsantrasyonlarının, klastojenik olduğu ileri sürülmüştür [Ozkul ve ark., 2005]. Eroğlu ve arkadaşları yüzeysel mesane kanserli hastaların trasüretal rezeksiyon (TUR) doku örneklerinden hazırlanan karsinom hücre hatları üzerinde propolis ve MMC'nin mutajenik etkilerine bakmışlardır. Sonuçlar propolis ve MMC'nin, kontrol gruplarına kıyasla MN frekansını arttırdığını göstermiştir [Eroğlu ve ark., 2004].

Bu çalışmada son olarak kullanılan comet testi, tek hücre alkali jel elektroforezi olarak da bilinmektedir. Comet testi DNA hasarı ve tamirinin incelenmesinde kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metottur [Singh ve ark., 1988; McKelvey-Martin ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Garry ve ark., 2003; Poletta ve ark.,

2008]. DNA hasarlarının yanı sıra, kesip çıkarmayla yapılan DNA tamiri esnasında, DNA ipliğinde meydana gelen kırıklardan kaynaklanan migrasyonu ölçmede de kullanılmaktadır [Green ve ark., 1992].

EGCG'nin dört farklı konsantrasyonunun tek başına ve pozitif kontrol  $H_2O_2$  ile birlikte eş zamanlı uygulandığı insan periferik lenfositlerinde, EGCG'nin 0,05 ve 0,50  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları, çözücü kontrole göre kuyruk yoğunluğunu azaltmış, 0,01 ve 0,10  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları ise artırmıştır. Kuyruk uzunluğunda, 0,01  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon artışa, diğer konsantrasyonlar ise azalmaya sebep olmuştur. Fakat bunların hiç biri, çözücü kontrole göre anlamlı değildir.  $H_2O_2$ +EGCG'nin eş zamanlı uygulandığı lenfositlerde kuyruk yoğunluğu, ilk üç konsantrasyonda, pozitif kontrole kıyasla azalmıştır, ancak bu azalma sadece 0,01  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda anlamlıdır. En yüksek konsantrasyon olan 0,50  $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz,  $H_2O_2$  ile birlikte kuyruk yoğunluğunda artışa sebep olmuştur fakat bu artış anlamlı düzeyde değildir.  $H_2O_2$ +EGCG uygulamasında, EGCG'nin ilk üç konsantrasyonu, pozitif kontrole nazaran kuyruk uzunluğunda azalmaya sebep olmuştur fakat bu azalma anlamlı değildir.  $H_2O_2$ +0,50  $\mu\text{g/mL}$  EGCG uygulaması, pozitif kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur. Bütün bu sonuçlar, EGCG'nin tek başına uygulamasının genotoksik olmadığı,  $H_2O_2$  ile birlikte eş zamanlı uygulamasının kuyruk yoğunluğunda azalmaya fakat kuyruk uzunluğunda hafif artışa neden olduğunu göstermiştir. Eş zamanlı uygulamada 0,50  $\mu\text{g/mL}$  EGCG, kuyruk yoğunluğunda anlamsız, kuyruk uzunluğunda ise anlamlı artışa neden olmuştur.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE) uygulamasında da CAPE'nin tek başına uygulamasının, kuyruk yoğunluğunda, çözücü kontrole göre önemli olmayan artışlara, kuyruk uzunluğunda ise önemli artışlara neden olduğu gözlenmiştir.  $H_2O_2$ +CAPE uygulamasında, CAPE'nin ilk üç konsantrasyonu kuyruk yoğunluğunda anlamlı olmayan, en yüksek konsantrasyon olan 8  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyon ise, anlamlı artışa sebep olmuştur.  $H_2O_2$ +CAPE uygulamasında kuyruk uzunluğu, 1  $\mu\text{g/mL}$ 'de anlamlı azalma, diğer konsantrasyonlar ise, pozitif kontrole nazaran daha düşük olmakla birlikte, CAPE konsantrasyonları arttıkça, artış göstermiştir ve bu artışın 8  $\mu\text{g/mL}$ 'de pozitif kontrolden anlamlı derecede yüksek

olduğu belirlenmiştir. Bütün bu sonuçlar, CAPE'nin tek başına uygulamasının DNA'da hasarlara neden olduğunu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile eş zamanlı uygulandığında ise, düşük dozlarda iyileştirici, yüksek dozda ise DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, KA, KKD ve MN testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMC, kısa süreli uygulama olan comet testinde hasara neden olmadığı için, literatürde comet testlerinde pozitif kontrol olarak yaygın şekilde tercih edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturarak bu formdaki demiri çok güçlü oksitleyici özelliğe sahip olan, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatan bir maddedir [Johnson ve ark., 2000; Fan ve Lou, 2004; Wang ve ark., 2008].

Glei ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bleomisin tarafından oluşturulan hasarlara karşı EGCG'nin koruyucu etkisini insan periferik lökositlerinde comet testi ile incelemiştir. Kandan izole edilen lökositlerin fitohemaglutinin ile uyarılması faz I, genotoksik bleomisin ile uyarılması faz II ve DNA onarımı için inkübasyon ise faz III olarak belirlenmiştir. Her bir fazda DNA bütünlüğü comet testi ile ölçülmüştür. EGCG (2, 20, 100 µM) hem her bir faz boyunca ayrı ayrı hem de tüm uygulama boyunca kültürlerle ilave edilmiş ve onarım mekanizmaları araştırılmıştır. Faz I'de radikal savar aktivite, faz II'de DNA tamir uyarımı, faz III'de ise bu mekanizmalar sırası ile etkin olmuştur. EGCG faz I, II ve III'de eklendiği zaman bleomisin kaynaklı oluşan DNA hasarının ve endonükleaz III spesifik hasarının azaltılmasında etkili olmamıştır. Ancak faz I ve II süresince yapılmış EGCG uygulaması serbest radikaller ile oluşturulan DNA hasarını, çeşitli mekanizmaların aktivasyonu ile azaltmıştır [Glei ve ark., 2006].

Salter ve arkadaşları antioksidan olarak bilinen quercetin (Q), epigallocateşingallat (EGCG) ve N-asetilsistein (NAC)'in normal fetal akciğer fibroblastlarında (MRC5) UV kaynaklı hasar üzerindeki etkisini comet testi (% DNA kuyruk) ile değerlendirmiştir. Her üç antioksidan madde de kuyruk yoğunluğunda doza bağlı azalma gösterirken, bu maddelerin artan dozlarında prooksidan etkiden dolayı

kuyruk yoğunluğunda artış gözlenmiştir [Salter ve ark., 2004]. Monomerik ve dimerik polifenollerin, bir heterosiklik amin olan Trp-P-2 ile oluşturulan DNA hasarları üzerindeki iyileştirici etkisi comet testi ile incelendiğinde, 1-100 µM konsantrasyon aralığında, ne monomerik ne de dimerik polifenollerin, lenfositlerde meydana gelen hasarı engellemediği belirlenmiştir. Buna karşılık hem monomerik hem de dimerik polifenollerin 0,1-0,5 mg/mL aralıkta, Trp-P-2 kaynaklı hasarı, doza bağlı olarak engellediği gözlenmiştir [Dhawan ve ark., 2002].

Johnson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada DPPH radikallerini süpürmede etkin olan EGCG ve daha az etkili olan quercetin'in antioksidatif özelliklerini Jurkat T lenfositlerinde incelemiştir. EGCG ve quercetin'in düşük dozları ile ön muamele yapılan Jurkat T lenfositlerinde serbest oksijen türleri ve serbest nitrojen türleri nedeniyle oluşan hasarlar comet testi ile analiz edilmiştir. Hücrelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı hasarların, 10 µM EGCG ve quercetin varlığında azaldığı gözlenirken, uygulanan konsantrasyonun 10 katına (100 µM EGCG, quercetin) maruz bırakılan hücrelerde DNA hasarının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda Johnson ve arkadaşları EGCG'nin düşük dozda antioksidan özellik gösterirken, yüksek dozlarda prooksidan özellik gösterdiğini bildirmiştir [Johnson ve ark., 2000]. Yeşil çay, siyah çay ve oolong çayı ile beş çay polifenolünün (epikateşin, EC; epikateşin gallat, ECG; epigallokateşin, EGC; epigallokateşin gallat, EGCG ve teaflavinler, THFs), benzo[a]pyrene (B[a]P) kaynaklı hasarlar üzerindeki etkisi Chang akciğer hücrelerinde comet testi ile değerlendirilmiştir. 100 µg/ml yeşil çay, oolong çayı ve siyah çayın uygulaması, B[a]P kaynaklı DNA hasarlarını (% kuyruk yoğunluğu), sırasıyla %10, %9 ve %13 oranında azaltmıştır. EGC ve EC düşük konsantrasyonda comet testinde hasarın artmasına neden olmazken, EGC, EGCG ve teaflavinler 100 µg/ml konsantrasyonda hasara neden olmuştur. EGC, EGCG ve teaflavinler yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarına sebep olurken, düşük konsantrasyonlarda (10-50 µM), B[a]P kaynaklı hasarlara karşı koruyucu etki göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları yüksek konsantrasyonlarda EGC, EGCG ve teaflavinler'in superoksit ürettiğini ve bunun da DNA hasarını arttırdığını göstermiştir [Yen ve ark., 2004].



Morley ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemopreventif etkisi olduğu bilinen EGCG'nin kültüre edilmiş insan hücrelerinde UV ile indüklenmiş DNA hasarları üzerindeki etkisini komet testi ile analiz etmişlerdir. EGCG'nin, akciğer fibroblastlarında, deri fibroblastlarında ve epidermal keratositlerde doza bağlı olarak DNA hasarını azalttığı belirtilmiştir [Morley ve ark., 2005]. McCoy-Plovdiv hücre hattında Bulgar propolisi ve propolisden elde edilen bir kimyasal olan CAPE'nin etkileri moleküler biyolojik ve immünolojik teknikler ile karşılaştırılmıştır. McCoy-Plovdiv hücre hattı, propolisin (0,01, 0,1, 1,0 ve 10 mg/L) ve CAPE'nin artan konsantrasyonları (2,5, 4, 8 ve 16 mg/L) ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonu nükleer antijeni (PCNA) ve tümör supressör p-53 geninin ifadesi, immünohistokimyasal olarak ölçülmüştür. Comet testi ile de apoptoz aktivitesi ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, PCNA ifadesinin, CAPE uygulamasında doza bağlı olarak azaldığı gözlenirken, propolis uygulamasında da doza bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. p53 sentezinin propolis uygulamasında doza paralel olarak arttığı, CAPE uygulamasında ise değişmediği belirtilmiştir. Yükselen dozlarda (10 mg/L propolis ve 16 mg/L CAPE), artan DNA degradasyonuna bağlı olarak apoptozun arttığı ve yüksek dozların toksik olduğu öne sürülmüştür [Dragonova-Filipanova ve ark., 2008].

Lee ve arkadaşları, rat karaciğeri HepG2 hücrelerinde, tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) kaynaklı DNA hasarlarının, bal arısı propolisinin etken maddesi olan kafeik asit fenetil ester ile engellendiğini göstermişlerdir [Lee ve ark., 2008]. Yine bal arısı propolisinin etken maddesi olup antikarsinojenik ve antioksidan aktivitesi bilinen kafeik asit fenetil esterinin 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kaynaklı hasara karşı koruyucu etkisi comet testi ve SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile incelenmiştir. CAPE ve onunla ilişkili polifenolik asit esterlerinin, eritrosit membran lipidleri peroksidasyonunu, hücresel DNA zincir kırıklarını ve protein fragmentasyonunu dikkate değer ölçüde azalttığı gösterilmiştir [Wang ve ark., 2008].

Benkovic ve arkadaşları suda çözünebilir propolislerin ve tek flavanoidler olan kafeik asit, cypisin ve naringin'in gama radyasyonuna maruz kalan farelerde

etkilerini komet testi ile analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda gama radyasyon maruziyeti öncesinde flavanollerin verildiği hayvan gruplarında gama radyasyonu ile oluşan DNA hasarlarında azalma gözlenmiştir [Benkovic ve ark., 2008]. Benkovic ve arkadaşlarının suda çözünebilen propolisler ile insan beyaz kan hücrelerinde radyasyon ile indüklenmiş DNA hasarına karşı iyileştirici etkiyi belirlemek için yaptıkları çalışmada, polifenollerin nekrotik hücrelerin miktarını azalttığını ve DNA'da hasar oluşturmadığını comet testi ile desteklemişlerdir [Benkovic ve ark., 2009].

Devipriya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada gama radyasyonuna maruz bırakılan lenfositler üzerinde kafeik asit'in artan konsantrasyonlarının (5,5, 11, 22, 44, 66, 88 µM) etkilerini comet ile testi araştırmışlardır. Kafeik asit ile ön muamele yapılan hücrelerde, bu maddenin antioksidan potansiyeli nedeni ile gama radyasyonuna bağlı DNA hasarlarını azalttığı belirtilmiştir [Devipriya ve ark., 2008].

Bu çalışmada hem (-)-epigallokateşin gallat hem de kafeik asit fenetil esterin hücre kültürü ortamında çeşitli dozları denenmiş ve bu maddelerin antiproliferatif özellikleri ve prooksidan etkileri dikkate alınarak düşük dozları tercih edilmiştir. İnsan lenfosit kültüründe uygulanan dozlarında (-)-epigallokateşin gallatın MMC tarafından oluşturulan kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu, diğer antioksidan madde kafeik asit fenetil esterin de yine kromozomal anormallikleri, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleus oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. İlave olarak comet testinde, hem (-)-epigallokateşin gallat hem de kafeik asit fenetil ester, düşük konsantrasyonlarda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan hasarları azaltırken, yüksek konsantrasyonda hasarları artırdığı ve bu artışın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in neden olduğu hasardan önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların ışığında (-)-epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil esterin düşük dozlarının MMC ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan hasara karşı antiklastojenik ve antimutajenik ve DNA hasarını azaltıcı etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, güçlü antioksidanlar olan (-) -epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil esterin antitümör ajanların ve reaktif oksijen türlerinin genotoksik etkilerine karşı koruyucu

ve antigenotoksik olabileceklerini göstermektedir. (-)-Epigallokateşin gallat ve kafeik asit fenetil esterinin uygulama gruplarında mitotik indeks değerlerini istatistiksel olarak önemli derecede düşürmeleri nedeniyle, antimitotik özellikte oldukları anlaşılmıştır. Bu özellikleri her iki antioksidanın da kanser tedavisinde ve tümör gelişiminin baskılanmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada kısaca, EGCG'nin tek başına insan lenfositlerinde hafif genotoksik olduğu, MMC ile birlikte bu etkinin daha da arttığı, CAPE'nin de tek başına hafif genotoksik etki gösterdiği fakat MMC kaynaklı hasarları azalttığı belirlenmiştir. KKD testinde, EGCG'nin tek başına genotoksik olmadığı, MMC ile eş zamanlı uygulamasının, önemli düzeyde antigenotoksik olduğu; CAPE'nin tek başına kullanımının hafif antigenotoksik, MMC ile birlikte kullanımının anlamlı antigenotoksik olduğu gözlenmiştir. MN testine göre, EGCG tek başına bazı konsantrasyonlarda anlamlı genotoksik etkili olurken, MMC ile eş zamanlı uygulaması önemli antigenotoksik etki göstermiştir. CAPE ise MN testinde, tek başına hafif genotoksik, MMC ile birlikte hafif antigenotoksik etkilidir. Her iki antioksidan da mitotik indeksi anlamlı düzeyde düşürmüştür. Comet testinden elde edilen sonuçlar, EGCG ve CAPE'nin, hafif genotoksik ve hafif antigenotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Bütün bu sonuçlara göre, polifenoller sadece antioksidan etkili değil, belli fizyolojik koşullarda prooksidan etki gösterirler. Polifenoller, yüksek konsantrasyonlarda kromozom hasarlarına neden olurken, düşük konsantrasyonlarda, reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan genotoksik hasarları önlemektedir. Polifenollerin prooksidan olarak mı yoksa antioksidan olarak mı davranacakları, bulunduğu ortamın redoks potansiyeline, pH'sına, fenolik yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu ile hidroksil gruplarının glikolizasyonu ve yer değiştirmesine, kullanılan teste ve kullanılan konsantrasyona, kullanım süresine, oksidan maddelerle birlikte, onlardan önce veya onlardan sonra kullanımlarına göre de değişmektedir. Sonuçlar ümit verici olmakla birlikte, klinik denemelere geçmek için, doğal kaynaklı antioksidanların etki şekilleri ve kullanım miktarları konusunda daha detaylı, daha fazla konsantrasyonu kapsayan ve özellikle *in vivo* koşullardaki etkilerini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

Alaca, Güre, F., Arabacı, O., “Bazı tıbbi bitkilerdeki doğal antioksidanlar ve önemi”, *Türkiye VI. Tarla bitkileri kongresi*, Antalya, 1:465-470(2005).

Altuğ, T., “Gıda katkı maddeleri”, *Meta Basımevi*, İzmir, 19–36(2001).

Akkuş, İ., “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri”, *Mimoza Yayınevi*, Sağlık dizisi 5, Konya, 1-19, 39-40 (1995).

Alvi, N.K., Rizvi, R.Y., Hadi, S.M., “Interaction of quercetin with DNA”, *Bioscience Reports*, 6 :861–868(1986).

Aksoy, H., Yilmaz, S., Celik, M., Yüzbaşoğlu, D., Ünal, F., “Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers”, *Journal of Applied Toxicology*, 26: 10-15 (2006).

Alzueta, C., Trevino, J., Ortiz, L., “Effect of tannin from fava beans on protein utilisation in rats”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59:551–553(1992).

Ames, B.N., Wakimoto, P., “Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? ”, *Nature Reviews Cancer*, 2: 694-704 (2002).

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

Arts, I.C., Jacobs Jr., D.R., Gross, M., Harnack, L.J., Folsom, A.R., “Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women’s Health Study (United States)”, *Cancer Causes Control*, 13:373–382(2002).

Asano, Y., Okamura, S., Ogo, T., Eto, T., Otsuka, T., Niho, Y., “Effect of (–)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia”, *Life Sciences*, 60:135–142 (1997).

Asuka, T.K., Ryosuke, O., Osamu, M., Naohiro, N., Toshio, K., “Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins *in vitro* and implications for risk assessment”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657:13-18( 2008).

Aydemir, N., Çeliker, S., Bilaloğlu, R., “*In vitro* genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes”, *Mutation Research*, 582: 35-41 (2005).

Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U., Hadi S.M., “Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties”, *Toxicology in Vitro*, 18:555–561(2004).

Baek, W.K., Jang, B.C., Lim, J.H., Kwon, T.K., Lee, H.Y., Cho, C.H., Kim, D.K., Shin, D.H., Park, J.G., Lim, J.G., Bae, J.H., Bae, J.H., Yoo, S.K., Park, W.K., Song, D.K., “ Inhibitory modulation of ATP-sensitive potassium channels by gallate-ester moiety of (-)- epigallocatechin-3-gallate”, *Biochemical Pharmacology*, 70: 1560-1567(2005).

Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J.A., Ortuno, A., “Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:3373–3377 (2007).

Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., Zamjansan, Z., “Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: Phenolic compounds and plant origin” , *Apidologie*, 23:79-85, (1992).

Barberan, F.A.T., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Pierce, B.H., Kader, A.A., “HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums” , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10): 4748-4760(2001).

Baykal, Y., Kocabalkan F., “Serbest radikalleri ve hücre hasarı”, *Sendrom*, 9: 31–36 (2000).

Bechter, R., Haebler, R., Ettlin, R.A., Haseman, J.K., Dixon, N.R., “Differential susceptibility of immature rat testes to doxorubicin at critical stages of maturation”, *Archives of Toxicology*, 60:415-421(1987).

Beg, T., Siddique, Y. H., Ara, G., Gupta, M., Afzal, J., “ Protective action of EGCG against anticancer drugs MMS and CP”, *The Internet Journal of Pharmacology*, 6(2): 1-7(2009).

Benkovic, V., Orsollic, N., Knezevic, A.H., Ramic, S., Dikic, D., Basic, I., Kopjar, N., “Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study”, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(1):167-172(2008).

Benkovic, V., Knezevic, A.H., Orsollic, N., Basic, I., Ramic, S., Viculin, T., Knezevic, F., Kopjar, N., “Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: in vitro study on human white blood cells”, *Phytotherapy Research*, 23(8):1159-1168(2009).

Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., “Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 633-636(1999).

Bertram, B., Bollow, U., Rajaei-Behbahani, N., Burkle, A., Schmezer, P., “Induction of poly(ADP-ribosylation) and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (-)-epigallocatechingallate”, *Mutation Research*, 534:77–84(2003).

Bhatt, R., Hadi, S.M., “DNA breakage by tannic acid and Cu(II): sequence specificity of the reaction and involvement of active oxygen species”, *Mutation Research*, 313:39–48(1994).

Bo, Q.M., Wu, Z.Y., Shun, Q.S., Bao, X.S., Mao, Z.S., “A selection of the illustrated chinese anti-cancer herbal medicines”, *Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press*, 1-10, 2002.

Bolognesi, C., “Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies”, *Mutation Research*, 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., “An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans”, *Carcinogenesis*, 28(3): 625–631 (2007).

Boullata, J.I., Armenti, V.T., “Handbook of drug-nutrient interactions”, 207-208, *Humana Press*, 2007.

Bozkurt, G., Abay, E., Ateş, İ., Karaboğaz, G., Türe, M., Savran, F.O., Palandüz, S., Temocin, K., Algüneş, Ç., “Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors”, *Mutation Research*, 558(1-2): 137-144 (2004).

Bravo, L., “Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance”, *Nutrition Reviews*, 56: 317-333 (1998).

Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., “Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures”, *European Journal of Clinical Nutrition*, 43:547–548(1989).

Cai, YZ., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., “Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer”, *Life Sciences*, 74:2157–2184(2004).

Cai, YZ., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., Corke, H., “Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants”, *Life Sciences*, 78:2872–2888(2006).

Cao, Y., Cao, R., “Angiogenesis inhibited by drinking tea”, *Nature*, 398:381 (1999).

Cao, Y., Cao, R., Brakenhielm, E., “Antiangiogenic mechanisms of dietderived polyphenols”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:380–390(2002).

Carrono, A.V., Natarajan, A.T., “Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques”, *Mutation Research*, 204: 379-406 (1988).

Chiao, C., Carothers, A. M., Grunberger, D., Solomon, G., Preston, G. A., Barrett, J. C., “Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells” , *Cancer Research*, 55: 3576-3583, (1995).

Chung, F.L., “The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4:244–248(1999).

Chung, L.Y., Cheung, T.C., Kong, S.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Chan, Z.Y., Kwok, T.T., “Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU 145 cells”, *Life Sciences*, 68:1207–1214(2001).

Clarke, D.J., Johnson, R.T., Downes, C.S., “Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks”, *Journal of Cell Science*, 105(2): 563-569 (1993).

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

Cooper, R., Morr , D.J., Morr  , D.M., “Medical benefits of green tea: part II. review of anticancer benefits”, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 11:639-652,(2005).

Cummings, J., Sumner, A.T., Slavotinek, A., Meikle, I., Macpherson, J.S., Smyth, J.F., “Cytogenetic evaluation of the mechanism of cell death induced by the novel anthracenyl-amino acid topoisomerase II catalytic inhibitor NU/ICRF 500”, *Mutation Research*, 344(1-2): 55-62 (1995).

Cunha, K.S., Reguly, M.L., Gimmler-Luz, M.C., Santos, J.H., Lehmann, M., de Andrade, H.H., “Co-mutagenic effect of tannic acid on ring-X chromosome loss induced by mitomycin C in sperm cells of *Drosophila melanogaster*”, ***Mutation Research***, 308:143–148(1994).

Czeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., Szymczyk, T., Dobrowolska, B., Glinkowska, G., Malinowski, J., Strzelecka, H., “Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs”, ***Mutation Research***, 240:209–216(1990).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Ergün, M.A., Arslan, O., Kasap, R., “*In vitro* effects of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes”, ***Mutagenesis***, 20(2): 101-104 (2004).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S., Aksoy, H., Karaman, Ş., “Effects of *Thymus kotschyanus* var. *glabrescens* boiss. extract on mitomycin-C induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes”, ***Cytotechnology***, 51: 99-104 (2006).

Darley-USmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B., “Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance”, ***FEBS Letters***, 369: 131-135 (1995).

Devipriya, N., Sudheer, A.R., Menon, V.P., “Caffeic acid protects human peripheral blood lymphocytes against gamma radiation-induced cellular damage”, ***Journal of Biochemical and Molecular Toxicology***, 22(3):175-186(2008).

Dhawan, A., Anderson D., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Clifford, M.N., Ioannides, C., “Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay”, ***Mutation Research***, 515(1-2):39-56(2002).

Diplock, AT., “Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview”, ***American Journal of Clinical Nutrition***, 53: 1895-1935 (1991).

Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., “Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the watersoluble derivate”, ***Vaccine***, 10: 817-823(1992).

Doss, M.X., Potta, S.P., Hescheler, J., Sachinidis, A., “Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutical target for prevention of proliferative diseases”, ***Journal of Nutritional Biochemistry***, 16: 259-266(2005).



Draganova-Filipova, M.N., Georgieva, M.G., Peycheva, E.N., Miloshev, G.A., Sarafian, V.S., Peychev, L.P., “Effects of propolis and CAPE on proliferation and apoptosis of McCoy-Plovdiv cell line”, *Folia Medical (Plovdiv)*, 50(1):53-59(2008).

Dröge, W., “Free radicals in the physiological control of cell function” *Physiological Reviews*, 82: 48 (2002).

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M., “Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants”, *Nutrition Research Reviews*, 13:79–106(2000).

Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., “Plant polyphenols: are they the new magic bullet”, *Proceeding of the Nutrition Society*, 62: 599-603(2003).

Ebadi, M., Swanson, S., “The status of zinc, copper and metallothionein in cancer patients.”, *Progress in Clinical Biological Research*, 259:161–175(1988).

Edenharder, R., von Petersdorff, I., Rauscher, R., “Antimutagenic effects of flavanoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food”, *Mutation Research*, 287: 261-74(1993).

Efferth, T., Li, P.C.H., Konkimalla, V.S.B., Kaina, B., “From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy”, *Trends in Molecular Medicine*, 13:353–361(2007).

Eroğlu, H.E., Tatlışen, A., Özkul, Y., “Mesane kanserli doku kültürlerindeki mikronükleus üzerine propolis ve mitomisin-c'nin etkileri”, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2):15-20(2004).

Escarpa, A., Gonzales, M.C., “An overview of analytical chemistry phenolic compounds in foods”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(2): 57-139(2001).

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., “The comet assay: a comprehensive review”, *Mutation Research*, 339 (1): 37–59 (1995).

Fan, P., Lou, H., “Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 267:67–74(2004).

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

Fenech, M., “Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer”, *Drug Discovery Today*, 7(22): 1128-1137 (2002).

Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus cytome assay”, *Nature Protocols*, 2 (5): 1084-1104 (2007).

Ferguson, L.R., Zijl, P.V., Holloway, W.D., Jones, W.T., “Condensed tannins induce micronuclei in cultured V79 Chinese hamster cells”, *Mutation Research*, 158: 89–95(1985).

Ferguson, L. R., “Role of plant polyphenols in genomic stability”, *Mutation Research* , 475:89–111(2001).

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

Flack, G., Catalan, J., Norppa, H., “Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin B.”, *Mutation Research*, 392(1-2): 71-79 (1997)

Fresco, P., Borges F., Diniz, C., Marques, M.P.M., “New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols”, *Medicinal Research Reviews*, 26:747–766(2006).

Furukawa, A., Oikawa, S., Murata, M., Hiraku Y., Kawanishi S., “(-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA”, *Biocheical Pharmacology*, 66 :769–1778(2003).

Fujiki, H., Sukanuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K., Kimura, S., “Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220:225–228 (1999).

Gabrys, J., Konecki, J., Krol, W., Scheller, S., Shani, J., “Free amino acids in bee hive products (Propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography”, *Pharmacological Research Communications*, 18(6): 513-518, (1986)

Garcia-Lopez, S., Erdman, J.W., Sherman, A.R., “Iron retention by rats from casein-legume test meals: effect of tannin level and previous diet”, *Journal of Nutrition*, 120:760–766(1990).

Gardner, E.J., Ruxton, C.H.S., Leeds, A.R., “Black tea – helpful or harmful? a review of the evidence”, *European Journal of Clinical Nutrition*, 61:3-18,(2007).

Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J.M., Marzin, D., “Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay”, *Mutation Research*, 534(1-2): 33-43 (2003).

Gentile, J.M., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, G.J., and Ferguson, L.R., "Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(2):289-298(1998).

Gerhauser, C., "Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents", *European Journal of Cancer*, 41: 1941-1954(2005).

Gheuens, E.E.O., Bockstaele, D.R., Vander Keur, M., Tanke, H.J., Oosterom, A.T., De Bruijn, A., "Flow cytometric double labelling technique for screening of multidrug resistance", *Cytometry*, 12:636-644(1991).

Gillooly, M., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., MacPhail, A.P., Derman, D.P., Bezwoda, W.R., Mills, W., Charlton, R.W., Mayet, F., "The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables", *British Journal of Nutrition*, 49:331-342(1983).

Glei, M., Pool-Zobel, B.L., "The main catechin of green tea,(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes", *Toxicology in Vitro*, 20: 295-300 (2006).

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

Gramza, A., Korczak, J., "Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems", *Trends in Food Science & Technology*, 16: 351-358(2005).

Green, M.H.L., Lowe, J.E., Harcourt, S.A., Akinluyi, P., Rowe, T., Cole, J., Anstey, A.V., Arlett, C.F., "UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique", *Mutation Research*, 273(2): 137-144 (1992).

Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V., Nakanishi, K., "Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis", *Experientia*, 44: 230-232, (1988).

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L., "High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5): 1887-1892(1998).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH)", *Cancer Research.*, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hadler, B., Pramanick, S., Mukhopadhyay, S., Giri, A.K. , “Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro”, *Toxicology in Vitro*, 20: 608- 613( 2006).

Hall, A. H., Kulig, K. W., Rumack, B. H., “Drug and chemical-induced methaemoglobinemia: Clinical features and management”, *Medical Toxicology*, 1: 253-260, (1986).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., “ Free radicals in biology and medicine”, *Oxford University Press*, Oxford,188-260,(1999).

Halliwell, B., Gutteridge, John M.C., “Free radicals in biology an medicine” , Oxford, *Oxford University Pres*, 3: 22-24(2001).

Halliwell, B., “Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life” , *Plant Physiology*, 141: 312-322 (2006).

Han, X.Z., Shen, T., Lou, H.X., “Dietary polyphenols and their biological significance”, *International Journal of Molecular Sciences.*, 8:950–988(2007).

Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G., “Antineoplastic agents”, Goodman&Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics, *United States of America:Company Mc Graw-Hill Companies*, 1269-1271, (1999).

Hayakawa, F., Kimura, T., Maeda, T., Fujita, M., Sohmiya, H., Fujii, M., Ando, T., “DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336:123–131(1997).

He, Y.J., Liu, B.H., Xiang, D.B., Qiao, Z.Y., Fu, T., He, Y.H., “Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway downregulation”, *World Journal Of Gastroenterology*, 12:4981–4985(2006).

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism, and structure-activity relationships”, *J. Nutr. Biochem.*, 13:572–584(2002).

Hepşen, İ., Tilgen, F., Er, H., “Propolis: tıbbi özellikler ve oftalmojik kullanımı” , *Turgut özal tıp merkezi dergisi*, 3(4):386-391, (1996).

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhaut, D., “Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands”, *Nutrition and Cancer*, 20:21–29(1993).

Hettiarachchy, N.S., Glenn, K. C., Gnanasambandam, R., Johnson, M. G., “Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) for ground beef patties”, *Journal of Food Science*, 61: 516-519(1996).

Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K., Kikugawa, K., “Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical”, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19:558–563(1996).

Hirose, M., Hoshiya, T., Akagi, K., Takahashi, S., Hara, Y., Ito, N., “Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model”, *Carcinogenesis*, 14:549–1553(1993).

Hirose, M., Yamaguchi, T., Mizoguchi, Y., Akagi, K., Futakuchi, M., Shirai, T., “Lack of inhibitory effects of green tea catechins in 1,2 dimethylhydrazineinduced rat intestinal carcinogenesis model: comparison of the different formulations, administration routes and doses”, *Cancer Letters*, 188:163–170(2002).

Hoelzl, C., Knasmüller, S., Misic, M., Collins, A., Dusinska, M. Nersesyan, A., “Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends”, *Mutation Research*, 681: 68-79 (2009).

Hollman, P.C.H. and Katan, M.B., “Dietary flavonoids: intake, health effects and Bioavailability”, *Food and Chemical Toxicology*, 37(9/10): 937-942(1999).

Hsu, T.C., Zhao, Y.J., Wang, R.Y., Wu, Y.F., Spitz, M.R., Hong, W.K., “Comparative efficacy as antioxidants between ascorbic acid and epigallocatechin gallate on cells of two human lymphoblastoid lines”, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 124:169–171(2003).

Hu, C., Cai, Y.Z., Li, W.D., Corke, H., Kitts, D.D., “Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract”, *Food and Chemical*, 104:955–961(2007).

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Xing, J., Corke, H., Sun, M., “A potential antioxidant resource: endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plants”, *Economic Botany*, 61:14–30(2007).

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Xing, J., Corke, H., Sun, M., “Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species”, *Planta Medica*, 74:43–49(2008).

Hung, M.W., Shiao, M.S., Tsai, L.C., Chang, G.G., Chang, T.C., “Apoptotic effect of caffeic acid phenethyl ester and its ester and amide analogues in human cervical cancer ME180 cells”, *Anticancer Research*, 23:4773–4780(2003).

Hurrell, R.F., Reddy M., Cook, J.D., “Influence of polyphenolcontaining beverages on iron absorption”, in: R. Amado, H. Andersson, S. Bardocz, F. Serra (Eds.), Polyphenols, *Office for Official Publications of the European Communities*, Luxembourg, 169–172(1998).

Hursting, S.D., Kari, F.W., “The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future directions”, *Mutation Research*, 443:235–249(1999).

Ikeno, K., Ikeno, T., Myazawa, C., “Effects of propolis on dental caries in rats”, *Caries Research*, 25: 347-351, (1991).

Imai, K., Suga, K., Nakachi, K., “Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population”, *Preventive Medicine*, 26:769–775(1997).

Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T., Shirasu, Y., “Tea tannin components modify the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice”, *Mutation Research*, 259:79–87(1991).

Inoue, M., Tajima, K., Hirose, K., Hamajima, N., Takezaki, T., Kuroishi, T., Tominaga, S., “Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan”, *Cancer Causes Control*, 9:209–216(1998).

Jain, A.K., Sethi, N., “Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes induced by epigallocatechin gallate”, *Cytologia*, 56:539–42(1991).

Jakab, M.G., Major, J., Tompa, A., “Folloe-up genotoxicological monitoring of nurses handling antineoplastic drugs”, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 62: 307-318 (2001).

Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., Skrzypczak-Jankun, E., “Why drinking green tea could prevent cancer”, *Nature*, 5;387(6633):561(1997).

Ji, B. T., Silverman, D. T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G. M., Baris, D., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., Brown, L. M., Lillemoe, K. D., Schoenberg, J. B., Pottern, L. M., Schwartz, A. G., Hoover R. N., “Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer”, *American Journal of Industrial Medicine*, 39 (1): 92-99, (2001).

Johnson, M. K., Loo, G., “Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA”, *Mutation Research*, 459:211-218(2000).

Jordan, P., Carmo-Fonesca, M., “Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:1229-1235(2000).

Karadeniz, F., Ekşi, A., “Gıdalardaki başlıca fenolik bileşikler”, *Dünya Gıda*, 6(5): 80-89(2002).

Katıyar, S.K., Mukhtar, H., “Tea in chemoprevention of cancer: epidemiologic and experimental studies(review)”, *International Journal of Oncology*, 8:221–238(1996).

Katıyar, S.K., Mukhtar, H., “Tea antioxidants in cancer chemoprevention”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 27: 59-67(1997).

Kinlen, L.J., Willows, A.N., Guldblatt, P., Yudkin, J., “Tea consumption and cancer”, *British Journal of Cancer*, 58:397–401(1988).

Koltuksuz, U., Ozen, S., Uz, E., Aydın, M., Karaman, A., Gültek, A., Akyol, Ö., Gürsoy, M.H., Aydın, E., “Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats”, *Journal of Pediatric Surgery*, 34: 1458- 1462(1999).

Koltuksuz, U., Uz, E., Karaman, A., Özyurt, H., Aydınç, M., Akyol, Ö., “Detorsiyon öncesi uygulanan kafeik asit fenetil ester'in testiküler reperfüzyon hasarına etkisi”, *Klinik Bilimler & Doktor*, 6:633-636(2000).

Koltuksuz U., Mutus H.M., Kutlu R., Ozyurt, H., Cetin, S., Karaman, A., Gürbüz, N., Akyol, Ö., Aydın, E.N., “Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats”, *Journal of Pediatric Surgery*, 36: 1504-1509(2001).

Koyu, A., Ozguner1, F., Yilmaz, H.R., Uz, E., Cesun, G., Ozcelik, N., “The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field”, *Toxicology and Industrial Health*, 25: 429–434(2009).

Krishnaja, P., Sharma, N.K., “Variability in cytogenetic adaptive response of cultured human lymphocytes to mitomycin C, bleomycin, quinacrine dihydrochloride, Co60 g-rays and hyperthermia”, *Mutagenesis*, 23(2):77–86(2008).

Krol, W., Czuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., Grabiec, S., Shani, J., “Anti-oxidant property of etanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol”, *Biochemistry International*, 21: 593-97(1990).

Kuroda, Y., Hara, Y., “Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols”, *Mutagen Research*, 436:69–97(1999).

Kurt, H., Başaran, A., Musmul, A., “Sıçanlarda Karbon Tetraklorit (CCl<sub>4</sub>)'in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ile Önlenmesi”, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5: 29- 34(2004).

Kwon, K.H., Barve, A., Yu, S., Huang, M.T., Kong, A.N.T., “Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers, and animal models”, *Acta Pharmacologica Sinica*, 28:1409–1421(2007).

Langley-Evans, S.C., “Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51: 309- 315(2000).

Lee, B., Ong, C., “Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography A*, 881: 439- 447(2000).

Lee, K., Shibamoto, T., “Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:4947-4952 (2002).

Lee, Y.J., Kuo, H.C., Chu, C.Y., Wang, C.J., Lin, W.C., Tseng, T.H., “Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells”, *Biochemical Pharmacology*, 66:2281–2289(2003).

Lee, J.Y., Li, J.W., Yeung, E.S., “Single-molecular detection of surface hybridized human papilloma virus DNA for quantitative clinical screening”, *Analytical Chemistry*, 79: 8083–8089(2007).

Lee, K.J., Choi, J.H., Hwang, Y.P., Chung, Y.C., Jeong, H.G., “Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity and DNA damage”, *Food and Chemical Toxicology*, 46(7):2445-2450(2008).

Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Y.H., Chen, Z., “Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants”, *Journal of Nutrition*, 132: 2248- 2251(2002).

Liao, H., Chen, Y., Liu, J., “Inhibitory effect of caffeic acid phenyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:7907–7912(1999).

Lijinsky, W., “N-Nitroso compounds in the diet”, *Mutation Research*, 443:129–138(1999).

Lin, J.K., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., “Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade”, *Biochemical Pharmacology*, 58:911–915(1999).



Lin, J.K., Lin, Y.L., Liang, Y.C., Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., “Modulating prooxidative mitotic signaling as action mechanisms of cancer chemopreventive agents including curcumin, epigallocatechin gallate and other phytopolyphenols”, *In Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, edited by F. Shahidi and C.T. Ho, Champaign, Illinois: AOAC Pres, 239-251(2000).

Liu, X.L., “Genotoxicity of fried fish extract, MeIQ and inhibition by green tea Antioxidant”, *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih.*, 12:170–173(1990).

Liu, R.H., “Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 78:517– 520(2003).

Liu, J., Xing, J., Fei, Y., “Green tea (*Camellia sinensis*) and cancer prevention: a systematic review of randomized trials and epidemiological studies”, *Chinese Medicine*, 3:(12)1-7 (2008).

Long, L.H., Clement, M.V., Halliwell, B., “Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273:50-53(2000).

Longstaff, M.A., McNabb, J.M., “The inhibitory effects of hull polysaccharides and tannins of field beans (*Vicia faba* L.) on the digestion of amino acids, starch and lipid, and on digestive activities in young chicks”, *British Journal of Nutrition*, 65:199–216(1991).

Luk J.M., Wang, X.L., Liu, P., Wong, K.F., Chan, K.L., Tong, Y., Hui, C.K., Lau, G.K., Fan, S.T., “Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation”, *Liver International*, 27:879–890(2007).

Madhumita, R., Sutapa, C., Dona, S., Rathin, K. B., Maqsood, S., “Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol”, *Mutation Research*, 523–524:33–41 (2003).

Malik, A., Azam, S., Hadi, N., Hadi, S.M., “DNA degradation by water extract of green tea in the presence of copper ions: implications for anticancer properties”, *Phytotherapy Research*, 17:358–63(2003).

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

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L, Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M. P., Collins, A., “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review”, *Mutation Research*, 288: 47–63 (1993).

Mendoza-Wilson, A.M., Glossman-Mitnik, D., “Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability”, *Journal of Molecular Structure (Theocem)*, 761: 97-106(2006).

Miao H., Lin Z., Min-Jie W., Wei-Fan Y., Hai-Shan Z., and Fu-Jun C., “Neuroprotective Effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on Aging Mice Induced by D-Galactose”, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(1):55-60 (2009).

Miguel, J., Fleming, J., “Antioxidation, metabolic rate, and aging in *Drosophila*”, *Archives of gerontology and geriatrics*, 1-159(1982).

Min, Z., C. D’Arcy , J.Holman, Jiang-ping, H., Xing, X., “Green tea and the prevention of breast cancer: a case–control study in Southeast China”, *Carcinogenesis*, 8(5 ):1074–1078(2007).

Mirzoeva, O.K., Calder, P.C., “The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response”, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 55:441–449(1996).

Mohan, M., Kamble, S., Gadhi, P., Kasture S., “Protective effect of *Solanum torvum* on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats”, *Food and Chemical Toxicology*, 48(1): 436-440(2010).

Monks, N.R., Bordignon, S.A.L., Ferraz, A., Machado, K.R., Faria, D.H., Lopes, R.M., Mondin, C.A., Souza, I.C.C., Lima, M.S.F., Rocha, A.B., Schwartzmann, G., “Anti-tumor screening of Brazilian plants”, *Pharmaceutical Biology*, 40:603–616(2002).

Morley, N., Clifford T., Salter L., Campbell S., Gould, D., Curnow, A., “The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage”, *Photodermatology & Photoimmunology & Photomedicine*, 21: 15–22(2005).

Mukai, K., Kanasaki, Y., Egawa, Y. and Nagaoka, S.-I., “Free radical-scavenging action of catechin and related compounds in homogeneous and micellar solutions”, *In Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, edited by F. Shahidi and C.-T. Ho, Champaign, Illinois: AOAC Pres, 222-238(2000).

- Mukherjee, P., Sarkar, D., Sharma, A., “Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on the mouse bone marrow chromosomes in vivo”, *Food and Chemical Toxicology*, 35:657–666(1997).
- Munari, C.C., Resende, F.A., Alves, J.M., de Sousa, J.P., Bastos, J.K., Tavares, D.C., “Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells”, *Planta Medica*, 74(11):1363-1367(2008).
- Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K., Higashi, Y., “Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients”, *Japanese Journal of Cancer Research*, 89:254–261(1998).
- Nakazawa, H., Genka, C., Fujishima, M., “Pathological aspects of active oxygens/free radical”, *Japanese Journal of Physiology*, 46:15–32(1996).
- Namiki, M., “Antioxidants antimutagens in food Crit.Rev.”, *Food Sciences and Nutrition*, 29:273-300(1990).
- Navarro-Peran, E., Cabezas-Herrera, J., Garcia-Canovas, F., Durrant, M.C., Thorneley, R.N.F., Rodriguez-Lopez, J.N., “The Antifolate Activity of Tea Catechins”, *Cancer Research*, 65: 2059-2064(2005).
- Ng, A., Taylor, G.M., Eden, O.B., “Genotoxicity of etoposide: greater susceptibility of MLL than other target genes”, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 164(2):164-167(2006).
- Nordberg, J., Arner, E.S., “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free Radical Biology and Medicine*, 31:1287–1312(2001).
- Novogrodsky, A., Ravid, A., Rubin, A.L., Stenzel, K.H., “Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis”, *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, 79: 1171–1174 (1982).
- Ogura, R., Ikeda, N., Yuki, K., Morita, O., Saigo, K., Blackstock, C., Nishiyama, N., Kasamatsu, T., “Genotoxicity studies on green tea catechin”, *Food and Chemical Toxicology*, 46:2190–2200(2008).
- Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., “Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay”, *Radiation Research*, 122: 69–72 (1990).

Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H., “Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines”, *Japanese Journal of Cancer Research*, 90:733–739 (1999).

Ozkul, Y., S.Silici, Eroğlu, E., “The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture”, *Phytomedicine*, 12(10):742-747(2005).

Ögetürk, M., Çolakoğlu, N., Kuş, A.M., Kuş, İ., Sarsılmaz, M., “Karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel akciğer hasarında kafeik asit fenetil esterin koruyucu etkinliği”, *Fırat Üniversitesi Sağlık BilimleriTıp Dergisi*, 23 (2): 57 – 61(2009).

Özyurt, B., Özyurt, H., Atış Ö., Akbaş, A.,Yılmaz, H.R., Söğüt, S., “Deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisinde E vitamini ve kafeik asit fenetil esterin akciğer dokusundaki bazı metabolik enzimlere etkisi”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 4(3):14-18(2006).

Özyurt, B., Güleç, M., Özyurt, H., Ekici F., Atış, Ö., Akbaş, A., “The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neurotoxicity in rats”, *European Journal of General Medicine*, 3(4):167-172(2006).

Paschka, A.G., Butler, R., Young, C.Y., “Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate”, *Cancer Letters*, 130:1–7(1998).

Pascual, C., Gonzales, R., Torricella, R.G., “Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals”, *Journal of Ethnopharmacology*, 41: 9-13(1994).

Pekmez, H., Kuş, İ., Çolakoğlu, N., Zararsız, İ., Ögetürk, M., Sarsılmaz, M., “Protective effects of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) on exposure of cigarette smoke-induced histological changes in rat testes”, *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(1):1-5(2001).

Pekmez, H., Kuş, İ., Çolakoğlu, N., Zararsız, İ., Ögetürk, M., Sarsılmaz, M., “Sıçanlarda sigara inhalasyonu sonucu prefrontal kortekste oluşan yapısal değişiklikler üzerine kafeik asit fenetil ester (CAPE)’in etkisi”, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü.Journal of Health Sciences)*, 13(3) 18-25 (2004).

Piperakis, S.M., “Comet assay: A brief history”, *Cell Biology and Toxicology*, 25: 1-3 (2009).

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., “*Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay”, *Mutation Research*, 650(2): 202-209 (2008).

Pryor, WA., Tang, RH., “Ethylene formation from methional”, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 81 (2): 498–503 (1978).

Rahman, R.M.A., Nair, S.M., Helps, S.C., Shaw, O.M., Sims, N.R., Rosengren, R.J. ve Appleton, I., “(-)-Epigallocatechin gallate as an intervention for the acute treatment of cerebral ischemia”, *Neuroscience Letters*, 382: 227-230(2005).

Raj, A.S., Heddle, J.A., Newmark, H.L., Katz, M., “Caffeic acid as an inhibitor of DMBA-induced chromosomal breakage in mice assessed by bone-marrow micronucleus test”, *Mutation Research*, 124(3-4):247-253(1983).

Rajagolpan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C. “Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability”, *Nature*, 428(6978): 77-81 (2004).

Rao, C. V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S., Reddy, B. S., “Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethaneinduced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon”, *Cancer Research*, 53: 4182-4188, (1993).

Raposo, C.G., Carpeno J.D., Baron M.G., “Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures, and genetic predisposition”, *Medicina Clinica*, 128:390–396(2007).

Reddy, M.B., Cook, J.D., “Assessment of dietary determinants of nonheme iron absorption in humans and rats”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 54:723–728(1991).

Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D., “Natural products for cancer prevention: a global perspective”, *Pharmacology & Therapeutics*, 99: 1–13(2003).

Rekhadevi, P.V., Salija, N., Chandrasekhar, M., Mahboob, M., Rahman, M.F., Grover, P., “Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs”, *Mutagenesis*, 22:395-401 (2007).

Ren, WY., Qiao, ZH., Wang, H.W., Zhu, L., and Zhang, L., “Flavonoids: promising anticancer agents”, *Medicinal Research Reviews*, 23:519–534(2003).

Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., “Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3438-3442(2001).

Roy, M., Siddiqi, M., Bhattacharya, R.K., “Cancer chemoprevention: tea polyphenol induced cellular and molecular responses”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2:109–116(2001).

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

Sahin, S., Sögüt, S., Özyurt, H., Uz, E., Ilhan, A., Akyol, Ö. , “Tissue xantine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone”, *Neuroscience Research Communications*, 31:111-121(2002).

Salter L., Clifford T., Morley N., Gould D., Campbell S., Curnow A., “The use of comet assay data with a simple reaction mechanism to evaluate the relative effectiveness of free radical scavenging by quercetin, epigallocatechin gallate and N-acetylcysteine in UV-irradiated MRC5 lung fibroblasts”, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 75(1-2):57-61(2004).

Santoro, A., Bianco, G., Picerno, P., Aquino, R. P., Autore, G., Marzocco, S., Gazzero, P., Lioi, M. B., and Bifulco, M., “Verminoside and verbascoside-induced genotoxicity on human lymphocytes: Involvement of PARP-1 and p53 proteins”, *Toxicology Letters*, 178(2):71-76(2008).

Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., Shirasu, Y., “Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells”, *Mutation Research*, 226(2):103-110(1989).

Senedese, J.M., Rodrigues, A.R., Furtado, M.A., Faustino, V.D., Berretta, A.A., Marchetti, J.M. and Tavares, D.C., “Assessment of the Mutagenic Activity of Extracts of Brazilian Propolis in Topical Pharmaceutical Formulations on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo”, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1- 7(2008).

Shahidi, F., Naczki, M., “Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications”, Lancaster: *Technomics*, 2-50, (1995).

Shan, B., Cai Y.Z., Sun, M., and Corke, H., “Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:7749–7759(2005).

Shim, J.S., Kang, M.H., Kim, Y.H., Roh, J.K., Roberts, C., Lee, I.P., “Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) among cigarette smokers”, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4:387–391(1995).

Shimizu, M., Weinstein I.B., “Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals”, *Mutation Research*, 225: 147-160(2005).

Shirahata, S., Murakami, H., Nishiyama, K., Yamada, K., Nonaka, G., Nishioka, I., Omura, H., “DNA breakage by flavan-3-ols and procyanidins in the presence of cupric ion”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37:299-303 (1989).

Siddique , Y.H., Afzal, M., “Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells”, *Food and Chemical Toxicology*, 47(3):536-539(2009).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Experimental Cell Research*, 175: 184-191 (1988).

Smith, C, Marks Allan, D., Lieberman, M., “Basic Medical Biochemistry” Second Edition., Philadelphia, *Lippincott Williams & Wilkins*, 441(2005).

Soloneski, S., Gonzales, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., “Effects of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. III. genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells”, *Mutation Research*, 514: 201-212 (2002).

Sonnenberg, H., Kaloga, M, Eisenbach, N., and Fromming, KK., “Isolation and characterization of an angular-type dihydropyranocoumarin glycoside from the fruits of *Ammi visnaga* (L) Lam (Apiaceae)”, *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences*, 50:729–731(1995).

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

Soysal, Y., Şahin, F.İ., Menevşe, S., “İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve b-karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine in vitro etkileri”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15(3):23-29(2008).

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

Stagos, D., Spanou, C., Margariti, M., Stathopoulos, C., Mamuris, Z., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Kouretas, D., “Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13):5246-5252(2007).

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M., “Evaluation of genetic effects of Apitol *in vitro* by measurement of sister chromatid exchange”, *Mutatin Research*, 588: 152–157 (2005).

Strehl, E., Volpert, R., Elstner, E. F., “Biochemical activities of propolis extracts: III. Inhibition of dehydrofolate reductase”, *Zeitschrift für Naturforschung*, 49(1-2): 39-43, (1994).

Su, Z. Z., Lin, J., Grunberger, D., Fisher, P. B., “Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenetyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression”, *Cancer Research*, 54: 1865-1870, (1994).

Sugisawa, A., and Umegaki, K., “Physiological Concentrations of (-)-Epigallocatechin-3-*O*-Gallate (EGCg) Prevent Chromosomal Damage Induced by Reactive Oxygen Species in WIL2-NS Cells”, *Journal of Nutrition*, 132:1836-1839(2002).

Sugisawa, A., Kimura, M., Fenech, M., Umegaki, K., “Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells”, *Mutatin Research*, 559(1-2):97-103(2004).

Sumner, A.T.. “Inhibitors of topoisomerase II delay progress through mitosis and induce doubling of the DNA content in CHO cells”, *Experimental Cell Research*, 217: 440-447 (1995).

Sumner, A.T., “Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II”, *Chromosoma*, 107: 486-490 (1998).

Sumpio, B.A., Cordova, A.C., Berke-Schlessel, D.W., Qin, F., Chen, Q.H., “Green tea, the “Asian paradox”, and the cardiovascular disease ”, *Journal of American College of Surgeons*, 202: 813-825(2006).

Surh, Y-J., “Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals”, *Nature Reviews Cancer*, 3:768–780(2003).

Sutherland, B.A., Rahman, R.M.A., “Appleton I. mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced deurodegeneration”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:291-306(2006).



Suzuki, S., Takada, T., Sugawara, Y., Mut,o T., Kominami, R., “Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting”, *Japanese Journal of Cancer Research*, 82:1061–1064(1991).

Şenel, N., “Sıçanların periodontal dokularında radyoterapi ile oluşan serbest radikal ve siyalik asit düzeylerinin belirlenmesi ile bioflavanoid ve polifenollerin koruyucu etkisinin araştırılması”, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Oral Diagnozi ve Radyoloji A.B.D., *Doktora Tezi*, İstanbul, 50-55, (2005).

Tabor, E., “Pathogenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma”, *Hepatology Research*, 37:110–114(2007).

Tanaka, R., “Protective effects of (-)-epigallocatechin gallate and (+)-catechin on paraquat-induced genotoxicity in cultured cells”, *Journal of Toxicological Sciences*, 25:199-204(2000).

Tavares, D.C., Lira, W.M., Santini, C.B., Takahashi, C.S., Bastos, J.K., “Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats”, *Planta Medica*, 73(15):1531-1536(2007).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., “Single cell gel/comet assay: guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221 (2000).

Trevisanato, S.I., Young-In Kim, M.D., “Tea and health”, *Nutrition Reviews* , 58: 1-10(2000).

Tosun, İ., ve Karadeniz, B., “Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi”, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1):78-83(2005).

Umegaki, K., Fenech, M. “Cyokinesis-block micronucleus assay in WIL-2 NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophyls”, *Mutagenesis*, 15(3): 261-269 (2000).

Un-Ho, J.,Kwon-Ho, S., Muneo, M., Ikukatsu,S., Yeun-Hwa, G.,Yun-Jeong, K., Tae-Chul, M., Cheorl-Ho, K., “Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells” , *Molecular and Cellular Biochemistry*, 310:43–48(2008).

Uysal, M., “Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşulları”, *Klinik gelişim*, 11: 336–341(1998).

Uysal, M., “Serbest radikaller ve oksidatif stres”, Biyokimya, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoglu, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 829 -835(2006).

Wang, D., Xiang, D.B., He, Y.J., Li, Z.P., Wu, X.H., Mou, J.H., Xiao, H.L., Zhang, Q.H., “Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro”, *World Journal of Gastroenterology*, 11:4008–4012(2005).

Wang, T., Chen, L., Wu, W., Long, Y., Wang, R., “Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins”, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(5):279-87(2008).

Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A. et al., “Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFκB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells”, *Journal of Biological Chemistry*, 279:6017–6026(2004).

Waternberg, L. W., “Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis, in: E. C. Miller, J. A. Miller, I. Hirono, T. Sugimara and S. Takayama (Eds), Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis; Proceedings of the Ninth International Symposium of the Princess Takamtsu Cancer Research Fund”, *University Park Press*, Baltimore, 315-330, (1980).

Weisburger, J.H., Hara, Y., Dolan, L., Luo, F.-Q., Pittman, B., Zang, E., “Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens”, *Mutation Research*, 371:57–63(1996).

Weisburger, J.H., Chung, F.L., “Mechanism by chronic disease caused by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols”, *Food and Chemical Toxicology*, 40:1145-1154(2002).

Wells, P.G., McCallum, G.P., Chen, C.S., Henderson, J.T., Lee, C.J. J., Perstin, J., Thomas J. Preston, Michael J. Wiley and Andrea W. Wong, “Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer”, *Toxicological Sciences*, 108(1):4-18(2009).

Welters, M.P.J, Fichtinger-Schepman, A.M.J., Baan, R.A. , Jacobs-Bergmans, A.J., Kegel, A., van der Vijgh, W.J.F., Braakhuis, B.J.M., “Pharmacodynamics of cisplatin in human head and neck cancer: correlation between platinum content, DNA adduct levels and drug sensitivity in vitro and in vivo”, *British Journal of Cancer* , 79(1):82–88(1999).

WHO/FAO, “Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases”, *Geneva: World Health Organization*, (2003).

Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., “Antioxidants and prevention of chronic disease”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 275–295(2004).

Wollgast, J., Anklam, E., “Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?”, *Food Research International*, 33:449-459 (2000).

Xu, S.J., Wang, J.X., Yang, D.P., “An investigation on the chromosomal damage in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs”, *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 37: 119-120 (2003).

Xuczaj, W., Skrzydlewska, E., “Antioxidative properties of black tea”, *Preventive Medicine*, 40: 910-918(2005).

Vardi, N., Parlakpınar, H., Ozturk, F., Acet, A., “Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats”, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19:73–177(2005).

Vauhkonen, H., Bohling, T., Eissa, S., Shoman, S., and Knuutila, S., “Can bladder adenocarcinomas be distinguished from schistosomiasis-associated bladder cancers by using array comparative genomic hybridization analysis?”, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 177:153–157(2007).

Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., et al., “Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics”, *Molecular Carcinogenesis*, 45:164–174( 2006).

Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., “Tea Phenols: Antioxidant Effectiveness of Teas, Tea Components, Tea Fractions and Their Binding With Lipoproteins”, *Nutrition Research*, 18: 1067-1075(1998).

Yağmurca M., Erdoğan H., Iraz M, Songur, A., Ucar, M., Fadilloğlu, E., “Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats”, *Clinica Chimica Acta*, 348: 27-34(2004).

Yalçın, A.S., “Antioksidanlar”, *Klinik gelişim* , 11: 342 –334(1998).

Yang, C.S., Wang, Z.Y., “Tea and cancer”, *Journal of the National Cancer Institute*, 85:1038–1049 (1993).

Yang, C.S. and Landau, J.M., “Effects of tea consumption on nutrition and health”, *American Society for Nutritional Sciences*, 130: 2409-2412(2000).

Yen, G.C., Ju, J.W., Wu, C.H., “Modulation of tea and tea polyphenols on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in Chang liver cells”, *Free Radical Research*, 38(2):193-200(2004).

Yılmaz H.R., Söğüt S., Özyurt H., Iraz, M., Yıldırım, Z., Akyol, Ö., “Sıçanlarda sispilatinle oluşturulan nefrotoksisitede metabolik enzim aktivitelerine kafeik asit fenetil ester’in etkisi”, *Van Tıp Dergisi*, 11(1):1-6(2004).

Yılmaz H.R., Söğüt S., Özyurt B., Özüğurlu, F, Şahin, Ş., Işık, B., Uz, E., Özyurt, H., “The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester”, *Toxicology and Industrial Health*, 21: 67-73(2005).

Yılmaz, H.R., Uz, E., Altunbasak, A., Sakallı, E., and Ozcelik, N., “Anticlastogenic effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells”, *Toxicology and Industrial Health*, 26(1):33-37 (2010).

Yokoyama, S., Hirano, H., Wakimaru, N., Sarker, K.P., Kuratsu, J., “Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on brain tumor cell lines in vitro”, *Neuro-Oncology*, 3:22–28(2001).

Yoshida, D., Ikada, Y., Nakayama, S., “Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selective human brain tumors”, *Journal of Neurooncology*, 16:109–115(1993).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research*, 604(1-2): 53-59 (2006).

Zaveri, NT., “Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications”, *Life Sciences*, 78: 2073-2080(2006).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SARAÇ, Özlem  
 Uyuşu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 26.11.1983, Ankara  
 Medeni hali : Bekar  
 e-mail : [sara\\_zlem@hotmail.com](mailto:sara_zlem@hotmail.com)

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	G.Ü. Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği	2008
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Çankaya 50. Yıl süper Lisesi	2002

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

#### A) Özeti Basılmış Ulusal Kongre Tebliğleri

1. Saraç, Ö., Filiz, F., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Taner, G., Aksoy, H., Yılmaz, S., Genotoxic and antigenotoxic effects of (-)-epigallocatechine gallate (egcg) against mitomycin-c induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro*, 10. International Conference on Enviromental Mutagens, 20-25 August, Italy, 2009.