

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**PROPOLİS EKSTRAKTLARININ FİBROBLAST HÜCRE
SERİLERİNDE H₂O₂ İLE UYARILMIŞ DNA HASARI
(GENOTOKSİSİTE) ÜZERİNE ETKİSİNİN COMET ASSAY YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELİM DEMİR

HAZİRAN - 2010

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**PROPOLİS EKSTRAKTLARININ FİBROBLAST HÜCRE SERİLERİNDE H₂O₂ İLE
UYARILMIŞ DNA HASARI (GENOTOKSİSİTE) ÜZERİNE ETKİSİNİN COMET
ASSAY YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Selim DEMİR

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi: 10.06.2010

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 28.06.2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet AYAR

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Haziran 2010

TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı başta tez danışman hocam Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU olmak üzere bilgilerinden faydalandığım ana bilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Doç. Dr. Birgül KURAL ve Doç. Dr. Ahmet ALVER' e; fibroblast hücrelerinin teminini sağlayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Murat ERTÜRK' e, çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Figen CELEP ve Doç. Dr. Ersan KALAY' a, çalışmanın tüm aşamalarında benimle olan başta İbrahim TURAN olmak üzere Müge KOPUZ, Ayşegül UZUN, Ahmet MENTEŞE, Selçuk YAMAN, Hüseyin YAMAN, Tuğba ÇAKIROĞLU ve İbrahim AKALIN' a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü' ne, Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma ve beni bugünlere getiren değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Selim DEMİR

Bu çalışma K.T.Ü.B.A.P. 2008.114.001.5 kod numaralı
proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Propolis	3
2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	6
2.1.2.1. Flavonoidler	9
2.1.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri	10
2.1.2.3. Esansiyel Yağlar	11
2.1.2.4. Mineral Elementler	11
2.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	11
2.2. DNA Hasarı	12
2.2.1. Serbest Radikaller	13
2.2.1.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları	14
2.2.2. Serbest Radikal Türleri	16
2.2.2.1. Süperoksit Radikalleri (O ₂ [·])	16
2.2.2.2. Hidroksil Radikalleri (HO [·])	16
2.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	17
2.2.3. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	18
2.2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	19

2.2.5. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri ve Oksidatif Stres	21
2.2.5.1. Çekirdek DNA'sında Gelişen Oksidatif Hasar	24
2.2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	26
2.2.6.1. Antioksidan etki mekanizmaları	27
2.3. Oksidatif DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler	27
2.3.1 Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	28
2.3.1.1. Tarihçe	28
2.3.1.2. Kullanım Alanları	29
2.3.1.3. Comet Protokolü	30
2.3.1.4. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi	31
2.3.1.5. Comet Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları	33
2.3.1.6. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler	34
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	35
3.1.1. Cihaz ve Malzemeler	35
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	35
3.2. Metodlar	36
3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.2.2. Jellerin Döküleceği Lamaların Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması	38
3.2.3. Propolisin Etanol Ekstraktlarının Hazırlanması	38
3.2.4. Hücre Kültürü	39
3.2.4.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	39
3.2.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması	39
3.2.4.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığın Tespiti	40
3.2.5. Comet Yönteminin Uygulanması	40
3.2.6. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi	42
3.2.7. Fibroblast Hücre Serisinin H ₂ O ₂ İle Muamele Süresinin Belirlenmesi	43
3.2.8. Etanolün Fibroblast Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	43
3.2.9. H ₂ O ₂ Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi	43
3.2.10. Fibroblast Hücre Serisinde Propolisin Uygulanma Protokolüne Göre Etkinliğinin Karşılaştırılması	44
3.2.11. İstatistiksel Analiz	44

4. BULGULAR	45
4.1. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	45
4.2. Fibroblast Hücre Serisinin H ₂ O ₂ İle Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	47
4.3. Etanolün Fibroblast Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	49
4.4. H ₂ O ₂ Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonu	49
4.5. Fibroblast Hücre Serisinde Propolisin Uygulanma Protokolüne Göre Etkinliğinin Karşılaştırılmasına İlişkin Sonuçlar	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. ÖZET	63
8. SUMMARY	64
9. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLolar DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	7
Tablo 2. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri	8
Tablo 3. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler	10
Tablo 4. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	15
Tablo 5. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	19
Tablo 6. Antioksidan sistem	26
Tablo 7. Primer fibroblast hücrelerinde kademeli konsantrasyonlarda verilen H ₂ O ₂ ' ye karşılık comet skorları ve hücre canlılığı	46
Tablo 8. 40 µM H ₂ O ₂ ile muamele edilen hücrelerde uzayan muamele süresine bağlı olarak elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı	48
Tablo 9. % 20' lik etanolün DNA hasarı ve hücre canlılığı üzerine etkisi	49
Tablo 10. Propolis konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi	50
Tablo 11. Propolisin uygulanma protokolüne göre bağlı olarak elde edilen comet sayıları	52
Tablo 12. Propolisin uygulanma protokollerine göre elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı	53
Tablo 13. Propolisin muamele protokolüne göre DNA hasarındaki % azalma	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları	5
Şekil 2. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri	6
Şekil 3. Propolis'te bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları	9
Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	14
Şekil 5. Reaktif oksijen bileşikleri oluşum nedenleri ve hücresel hasar	19
Şekil 6. Hücrede radikal aracılı hasar	20
Şekil 7. Reaktif oksijen ve azot türlerinin vücuttaki etkileri	20
Şekil 8. 8-hidroksiguanin ve Fappy Guanin'in oluşum mekanizmaları	21
Şekil 9. 8-OH Guanin ve timin glikol yapıları	23
Şekil 10. Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi	31
Şekil 11. Görsel analiz ile comet skorlaması	32
Şekil 12. Çalışmada DNA' ların skorlanmasında kullanılan skala	42
Şekil 13. H ₂ O ₂ konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi	46
Şekil 14. 4.derece hasarlı, baş yapısı tamamen kaybolmuş DNA fragmanları	47
Şekil 15. 40 µM H ₂ O ₂ ile muamele sonucu zamana bağlı comet skoru değişimi	48
Şekil 16. Propolis konsantrasyonuna bağlı comet skoru ve hücre canlılığı değişimi	51
Şekil 17. Propolisin uygulanma protokolüne göre comet skorları	53

KISALTMALAR LİSTESİ

ALS	: Alkali labil bölgeler
AP	: Apürinik/apirimidinik bölge
BER	: Baz eksizyon tamir mekanizması (Base excision repair)
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSB	: Çift zincir kırığı
EDTA	: Etilendiamintetra asetikasit
FBS	: Fetal bovine serum
FPG	: Formamidopirimidin DNA glikozilaz
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
LMP agaroz	: Düşük kaynama noktalı agaroz
NMP agaroz	: Normal kaynama noktalı agaroz
MMS	: Metil metan sülfonat
NO	: Nitrik oksit
OH [·]	: Hidroksil radikali
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikali
PBS	: Fosfat tuz tamponu
RAS	: Reaktif azot ürünleri
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
SCGE	: Tek hücre jel elektroforezi (Comet analizi)
SSB	: Tek zincir kırığı
t-BHP	: Tersiyer bütül hidroperoksit
8-OH-Gua	: 8-hidroksi guanin

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda insan sağlığını ilgilendiren doğal yiyeceklerin fizyolojik fonksiyonları artan bir şekilde ilgi çekmektedir. Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etkenlerinin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi, insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yönlendirmiştir. Bu doğal ürünler kategorisinde arı ürünleri önemli bir yer tutmaktadır. Bal arısı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılması *Apiterapi* olarak adlandırılmaktadır. Apiterapi; arıcılık kadar eski bir tarihe sahiptir (1).

Yaklaşık 2000 yıl önce tıp adamları tarafından kaleme alınmış Mısır metinlerinde bazı hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinin kullanıldığına dair yazılar dikkat çekicidir. Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehiri kullanımını kapsar (2).

Propolis, bal arılarının insanoğluna sunduğu önemli arıcılık ürünlerinden biridir. Propolis (arı tutkalı) bal arılarının çeşitli bitkilerin tomurcuk ve sürgünlerinde bulunan reçineye balmumu katarak kovanda çeşitli amaçlarla kullandıkları yapışkan, koyu renkli maddedir (3).

Propolis antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antioksidatif, tümorisidal, antimutajenik, immunomodölatör, karsinostatik ve diğer faydalı aktiviteleri ile doğal ilaç olarak kullanılan önemli bir arı ürünüdür (4, 5).

Hücre kültürü, deneysel amaçlı kullanılan hayvan hücrelerinin canlı vücudunda normal homeostaz sebebi ile oluşabilecek sistemik varyasyonlardan ve deney koşullarının yaratacağı stresten bağımsız olarak incelenebilmesi için Harrison tarafından 1907 yılında keşfedilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında doku parçalarından izole edilen hücrelerin, canlı vücudundan bağımsız olarak kontrollü fiziksel ve fizikokimyasal koşullar (sıcaklık, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ yoğunluğu, pH) altında canlılığını koruyarak çoğaltılmaları gerçekteştirilir. Hücre kültürünün günümüzde hücre içinde DNA ve RNA' nın replikasyonu ve transkripsiyonu, protein sentezi, enerji ve ilaç metabolizması, sinyal iletim mekanizmaları,

hücre membran trafiği, yaralı dokuların tedavisi, sitotoksisite, karsinogenez araştırmaları gibi oldukça yaygın kullanım alanları vardır (6).

Genotoksisite; endojen (oksidan stres gibi) ve/veya ekzojen (fiziksel, kimyasal ve çevresel faktörler gibi) nedenlerle DNA' da oluşan her türlü hasarlanmayı tanımlamaktadır. Bu hasarlar; çift zincir kırıkları (DSB), DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağları, alkali labil bölgeler (ALS) ile tam olmayan eksizyon tamir alanları ile ilişkili tek zincir kırıkları (SSB)' dır.

Günümüzde genotoksisite çalışmalarında birçok yöntem kullanılmaktadır. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE-Comet)' nin; basit, ucuz ve tekrarlanabilir bir metot olarak genotoksisitenin araştırılmasında kullanılabileceği, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Comet analizi, esasında hücre DNA fragmanlarının büyüklüğünün ölçümüne dayanır. Comet analizi ile çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeler gibi DNA hasarlanmaları değerlendirilebilmektedir (7).

Bu çalışmada DNA Comet analizi kullanılarak, Trabzon yöresinden toplanmış propolis örneklerinin etanol ile hazırlanmış ekstraktlarının fibroblast hücre kültür serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı üzerine etkisi incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir. Apiterapi, arıcılık kadar eskidir (1).

2000 yıl önce devrin tıp adamları tarafından yazılan Mısır metinlerinde halk arasında hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinin kullanıldığına dair açıklamalar bulunmaktadır. Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehiri kullanımını kapsar (2).

İnsanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Uzun yıllar boyunca propolisten tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmıştır. Günümüze kadar gelen eski Yunan yazıtları propolisin iltihaplanan yaralar ve diş çürükleri için tedavi amacıyla kullanıldığını tanımlarken, Romalılar döneminde yara üzerine konulan lapa benzeri karışımın içerisine katılarak kullanıldığı aktarılmaktadır. İbranice eski vasiyetnamelerde *Tzori* olarak geçmektedir ve tedavi edici özelliklerinden bahsedilmektedir. Avrupa' daki on ikinci yüzyıl kayıtları, propolisin medikal preparatlarının ağız ve yara enfeksiyonlarının tedavisi ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. Propolis son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir. Arılar propolisi milyonlarca, insanlar ise binlerce yıldır kullanmaktadır. Arılar ve insanoğlu propolisin birçok yararlı özelliğinden faydalanmışlardır. İnsanlık için bu reçinemi yapının keşfedilen yararları henüz çok az aydınlatılabilmektedir (8).

Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuk ve kozalaklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli polenler, yağlar, özel reçine ve mumsu maddelerden oluşur (9, 10).

Diğer adı *bee glue* olan propolis pro- ve -polis köklerinden oluşur ve kovanın (şehirin) savunması anlamını taşır (11).

Bal arıları reçineyi toplarken çiğneyip tükürük enzimleri ile karıştırarak kısmen sindirirler ve kısmen sindirilmiş materyal, balmumu ile karıştırılarak kovanda kullanılmaktadır. Tükürük enzimleriyle karışan propolisin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı, propolisin standardize edilmesinde güçlükler oluşur (12, 13).

Propolis kovanda çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Arılar propolisi; kovan deliklerinin ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamir edilmesinde ve birbirine yapıştırılmasında, çeşitli arı hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etmenlerinin etkisiz duruma getirilmesinde kullanırlar (14). Şekil 1' de arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları görülmektedir.

Ayrıca yavru yetiştirme döneminde yarık ve çatlaklardan suyun buharlaşıp kaybolması engellenir. Böylece kovan için gerekli olan nem de korunmuş olur. Bunların yanında olumsuz çevre koşullarından kovayı korumak, kovan giriş deliğini küçültmek amacıyla da kullanılmaktadır (15, 16).

Propolis aynı zamanda bir mumyalama maddesidir. Arılar kovana saldıranları öldürüp kovan içinden atamadıklarında, bu canlıları propolis ile mumyalarlar. Böylece, bu mumyalama işlemi ile olması muhtemel bakteri ve maya üremesi durdurulur (8).

Arılar, propolisi arka bacaklarında bulunan polen sepetlerinde depo etmekte ve koloniye taşımaktadırlar (8).

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler; kavak (*Populus spp*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), at kestanesi (*Alnus glutinosa*) gibi bitkiler olabilmektedir (17).

Propolisin; antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antioksidatif, tümörisidal ve antimitojenik özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (4).

Propolisin antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra; karaciğer koruyucu, antiülseratif, immün sistemi stimüle edici, antikanserojenik, antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik, kanamayı durdurucu, antiviral, spazmolitik, anestezik, antioksidan özelliklere sahip olması günümüzde apiterapi, biokozmetik, ilaç ve gıda sektöründe popüler bir hammadde olarak kullanılmasını beraberinde getirmektedir (12, 18).



Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları

Propolis; Tayvan, Japonya, Brezilya, ABD ve Avrupa ülkeleri gibi dünyanın pek çok yerinde, sağlıklı yaşam ve hastalıkların önlenmesinde bir gıda ürünü ve alternatif ilaç olarak oldukça ilgi görmektedir (4).

Cildi nemlendirme, yenileme, kırışıklıkları giderme ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı güzellik kremlerinde, çeşitli losyonlarda kullanılarak kozmetik endüstrisinde yer alır (19). Ayrıca propolis; dişeti, dudak ve ağız iltihaplarını iyileştirebilmek için diş macunları ile ağız yıkama solüsyonlarında da kullanılmaktadır (12).

Yiyecek teknolojisinde de önemli bir yere sahip olan propolis, konservecilikte kimyasal koruyucu olarak (12) ve insan vücuduna yararlı bileşenler içermesi nedeniyle de mineral destekli diyetetik ürünlerde yer almaktadır (20). Propolis içeren meşrubat ve yiyeceklere kanserden, diyabetten, inflamasyondan ve çeşitli kalp hastalıklarından korunmak isteyen tüketiciler rağbet etmektedirler (13, 21). Özellikle son yıllarda; propolis içeren tablet, toz ve sakız ürünleri marketlerde tüketicinin hizmetine sunulmuştur (12).



Şekil 2. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri (23)

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis yapışkan ve reçineli bir madde olup, rengi kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak, sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir (13, 21). Genel olarak 60-69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir (22). Soğukta sert ve kırılğan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (12). Şekil 2’ de çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri gösterilmiştir.

Propolis; su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (23).

2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Afrika’ dan toplanan propolis örnekleri kimyasal içerikleri bakımından incelendiğinde, aralarında farklılıklar olduğu rapor edilmiştir (21, 24). Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (12). Propolisdeki temel kimyasal sınıflar; flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Bu sınıflar dışında birçok B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de içerir (23). Tablo 1’ de propoliste bulunan başlıca bileşenler, bulunma oranlarıyla birlikte verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler Terpenler Fenolik asitler ve esterler	% 45-55
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden mum, Bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	% 25-35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	% 10
Polen	Eser elementler Serbest amino asitler	% 5
Diğer maddeler	Laktonlar Steroidler Şekerler Kinonlar	% 5

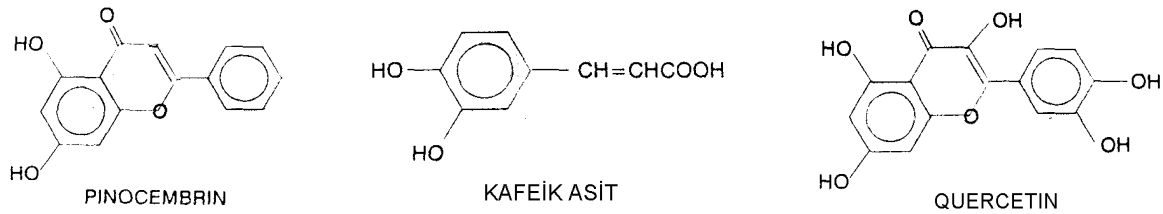
Propolis, arıların ziyaret ettiği ekolojik flora nedeniyle oldukça kompleks ve değişik bir kimyasal kompozisyona sahiptir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda değişik propolis örneklerinde; yağ asitleri, fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler (flavonlar, flavononlar, flavonoller, dihidroflavonoller, kalkanlar) terpenler, β -steroidler, aromatik aldehitler ve alkoller, seskiterpenler ve stilben türevleri gibi yaklaşık 200 kadar bileşik tanımlanmıştır (4). Tablo 2’ de propolisin yapısında bugüne kadar tanımlanan etken maddeler ve bilinen etkileri gösterilmiştir.

Tablo 2. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri (12, 26, 27, 28)

Krizin: Tümör hücre toksisitesi, <i>anti-helicobacter pylori</i>
Apigenin: Gastrik ülserin iyileştirilmesi
Akasetin: Ateş düşürücü
Kuersetin: Antiviral, kılcal damarların güçlendirilmesi, antitümöral aktivite, spazmolitik, antihistaminik, ülser iyileştirici
Kaempferid: Spazmolitik, <i>anti-mycobacterium phlei</i> , mikroorganizmaların asit direncine karşı etkili
Kaemperol-7,4-dimetil eter: Antifungal
Baicalin: Antigenotoksik
Galangin: Bakteriyostatik aktivite, antibakteriyel ve antifungal, <i>anti-helicobacter pylori</i>
Pinosembrin: Bakteriyostatik aktivite, antifungal, antimikrobiyal, lokal anestezi, <i>anti-helicobacter pylori</i>
Pinobanksin: Antibakteriyel ve antifungal
Pinobanksin-3-asetat: Antibakteriyel ve antifungal
Pinostrobin: Lokal anestezi
3,4 -dihidroksiflavonidler: Kılcal damarların güçlendirilmesi
Flavan-3-ol: Kılcal damarların güçlendirilmesi
Pektolinarinenin: Spazmolitik
Luteolin: Antiviral, gastrik ülserin iyileştirilmesi
Luteolin 3,4-dimetil eter: Spazmolitik ve hipokoleretik
Artepillin C: Antitümöral, antilökemik etki
Eriodiktol: Kalp yetmezliğini iyileştirici etki, akut kalp yetmezliğini önleyici etki
Pinosilvin (3,5-dihidroksistilben): <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> ' u inhibe edici, <i>mycobacterium phlei</i> ve <i>M. semegmatis</i> 'e karşı etkinlik
Ferulik asit: Antibakteriyel etki, aglutinant etki, kollojenik etki
Isoferulik asit: <i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etkinlik
Benzoik asit: Bakteriostatik ve bakterisid etki, balzamik ve antiseptik aktivite
Sinnamik asit: <i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı etkinlik
Isopentil ferulat: <i>Influenza</i> virusa karşı etkinlik (A/Hong Kong (H3N2))
p-Kumarik asit benzil esteri: Antimikrobiyal ve antifungal etkinlik
Kafeik asit: Antiviral, antibakteriyel aktivite, ateş düşürücü özellik
Prenil kafeat: Gizli kontakt alerjen
3-metil-2-enil kafeat: Antiviral aktivite
Kafeik asit fenetil ester: Antitümöral ve antigenotoksik
Metil kafeat: Tümör sitotoksitesi ve inhibisyonu
Diterpenoid klerodan: Antitümöral aktivite, antibakteriyel özellik
Bisabolol: Ateş düşürücü özellik

2.1.2.1 Flavonoidler

Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (29). Bugüne kadar propolisten 38' den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir. Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (30). Şekil 3' te propolisteki tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı gösterilmiştir. Tablo 3' te ise propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler verilmiştir (23).



Şekil 3. Propolis'te bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (23)

Flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinden dolayı gösterdikleri antioksidan özellikleri, onlar hakkında daha pek çok alanda çalışma yapma ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan özellikleri yanında; hücre proliferasyonu üzerine etkili oldukları, anjiogenezi ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe ettikleri ve DNA tamir enzimlerini stimüle ettikleri ortaya konmuştur (31). Flavonoidlerin metabolizması sonucu çok sayıda fenolik asit türevidir oluşur ve oluşan ürünlerin çoğu serbest radikal oluşumunu inhibe eder (32).

Flavonoidler biyolojik aktivitelerini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek dört farklı şekilde gösterir (12). Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antijenotoksik aktiviteye sahiptir (33). Flavonoidler antioksidan özelliğini yapılarındaki karbonil ve hidroksil gruplar, çift bağlar ve 3'-4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (33, 34).

Epidemiyolojik çalışmalar; günlük diyeteye ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı şarap, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (35).

Tablo 3. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler (23)

Flavonlar	Flavonoller	Flavononlar	Dihidro Flavoneller	Sinamik asit türevleri	Diğerleri
Apigenin	Kaempferol	Pinosembrin	Pinobanksin	Ferulik asit	11-Farnesol (seskiterpen)
Akasetin	Kaempferid	Sakuranetin	Pinobanksin-3-asetat	Kafeik asit	β -karyofilen (terpenoid)
Baisetin	Galangin	İsosakuranetin	Pinobanksin-7-metil eter	<i>p</i> -Kumarik asit	Terpinkol (terpenoid)
Krisin	İsohamnetin				Benzoik asit
Luteolin	Ramnetin				Syringaldehit (diterpenikasit)
Tektokrisin	Mirisetin				Protocate huikasit (benzoik asit türevi)
	Fisetin				Vanillin (benzaldehit türevi)
	Rutin				

2.1.2.2 Arı Mumu ve Yağ Asitleri

Propoliste bulunan arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık % 30' unu oluşturur (25). Arı mumu başlıca mono esterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (24).

2.1.2.3 Esansiyel Yağlar

Propolisteki uçucu bileşenler propolisin yaklaşık % 10' unu oluşturur (25). Ancak Schmidt ve arkadaşlarına göre propoliste bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu propolisin etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilememektedir (24).

2.1.2.4 Mineral Elementler

Propolis mineral elementleri üzerine yapılan çalışmalarda, Makedonya örneklerinde; Ca, Mg, K, Na, Fe ve Zn; Küba örneklerinde ise Fe, Mn, Zn, Cu elementleri belirlenmiştir. Her iki çalışmada atomik absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır (27).

2.1.3 Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolisin; en fazla *Candida albicans'* a olmakla birlikte Candida türleri ve dermatofitlere karşı antifungal, influenza, herpes simpleks ve reovirüs üzerine antiviral, lokal anestezik, nöroprotektif (36), antibakteriyel, antikaryojenik, tümörisidal, antimutajenik (4), radyoprotektif (37), kardiyoprotektif (38), hepatoprotektif (39), immünostimülatör (40), sitostatik (41), yara iyileştirici (42), apopitotik (25), antioksidatif (43), antiinflamatuvar (44), antimetastatik (23) ve antiproliferatif (45) özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu özelliklerinden dolayı hastalıklardan korunma ve genom kararlılığının sürdürülmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (35).

Polifenoller pek çok biyolojik aktiviteye sahip sekonder bitkisel metabolitlerdir ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra diğer enzim ve antioksidanlarla sinerjik etkileşimleri tanımlanmıştır. Polifenollerin değişik hücre tiplerinde oksidatif DNA hasarını engellediğine dair pek çok çalışma mevcuttur (46).

Bununla beraber tüm flavonoidlerin tamamen sağlıklı olduğunu düşünmek yanlış olur. Bazı polifenol türlerinin konsantrasyona bağlı olarak mutajenik ve pro-oksidan özellik gösterebileceği, dolayısıyla topoizomeraz enzim aktiviteleri, prostanoit biyosentezi ve sinyal transdüksiyonu gibi esansiyel biyokimyasal yolları olumsuz etkileyebileceği de ileri sürülmektedir (35).

Değişik ülkelerden elde edilen propolisin farklı kimyasal yapıya sahip olması, onların farklı biyolojik aktiviteye sahip olmasına neden olmaktadır. Ancak bu durum her farmakolojik özellik için aynı değildir. İlginç bir şekilde karasal ve ekvatorial bölgeleri de

içine alan farklı bölgelerden toplanan ve farklı kimyasal yapıya sahip olan propolis örneklerinin, benzer biyolojik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur. Propolis kovanda enfeksiyonlardan korunma amaçlı kullanılmaktadır ve bu nedenle değişik propolis tiplerinin hem antibakteriyel hem de antifungal özellik göstermesi doğaldır. Bu sebeple gözlenen aktivitenin sadece belirli bir bileşik grubuna atfedilmesi doğru değildir. Nitekim propolisin antibakteriyel aktivitesinden sorumlu bileşik grupları; kavak tipi propoliste flavonlar, flavononlar, fenolik asitler ve onların esterleri iken, *Baccharis* tipi (Brezilya) propoliste prenilenmiş p-kumarik asitler, diterpenler, Kırmızı Küba propolisinde ise prenilenmiş benzofenonlardır. Bu nedenle propolisin antibakteriyel özelliği tüm dünyada propolisin üzerinde en çok çalışılan özelliği olmuştur (15).

2.2. DNA Hasarı

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde devamlı olarak hasarlar oluşmakta, oluşan hasarlar DNA tamir sistemleri tarafından onarılmaya çalışılmakla birlikte, hasarın çok büyük boyutta olduğu veya DNA onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasarlar birikmektedir. Bu birikme zamanla mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olmaktadır.

DNA üzerinde oluşan hasar iki grupta incelenebilir:

A. Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan hasar

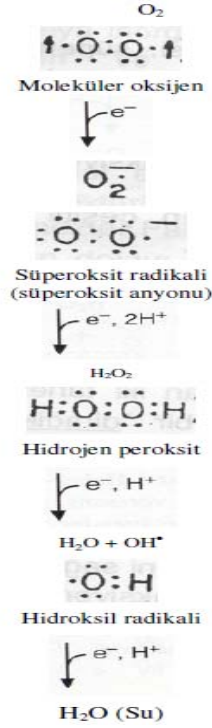
- a) Yanlış eşleşme
- b) Bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimler
 - 1- Keto-enol tautomerizasyonu
 - 2- Bazların deaminasyonu
- c) Baz kaybı
- d) Oksidatif hasar

B. Çevresel hasar

- a) DNA hasarına yol açan fiziksel etkenler
 - 1- İyonizan radyasyon
 - 2- Ultraviyole (UV)
- b) DNA hasarına yol açan kimyasal etkenler
 - 1- Alkilleyici maddeler
 - 2- Çapraz bağlayıcılar
 - 3- Elektrofilik reaktanlara metabolize edilen kimyasallar (47).

2.2.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma ya da moleküle büyük bir aktiflik kazandırır. Bir ya da daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren, bağımsız olarak varlığını sürdürebilen molekül, atom veya atom grupları *serbest radikal* olarak tanımlanır ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle (R^{\cdot} , $R^{\cdot-}$) gösterilir (48-50). Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen biradikal olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{+2} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturma eğilimindedir (51). Şekil 4' de reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu gösterilmiştir (52).



Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (52)

2.2.1.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

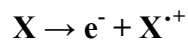
Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girerler.

1. İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (53).

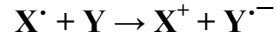


2. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

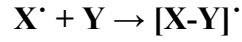
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal).



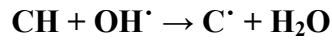
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal).



► Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



► Radikal, C-H bağından bir hidrojen atomu koparabilir.



Ancak bu reaksiyonların sonunda, radikal olmayan bileşik radikal hale gelir. Bu nedenle serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonları şeklinde olur (54).

Bu özellikleri ile reaktif oksijen ürünleri; radikaller ve non-radikaller olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (55). Tablo 4' de biyolojik önemi olan reaktif oksijen ürünleri verilmiştir (56).

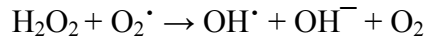
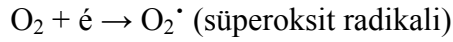
Tablo 4. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (56)

Radikaller	Non-radikaller
Süperoksid, $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksid, H_2O_2
Hidroksil, OH^{\bullet}	Hipokloröz asid, $HOCl$
Peroksil, RO_2^{\bullet}	Ozon, O_3
Alkoksil, RO^{\bullet}	Singlet oksijen, O^{\bullet}
Hidroperoksil, HO_2^{\bullet}	Peroksinitrit, $ONOO^{\bullet-}$
Nitrik oksid, NO^{\bullet}	Hidroperoksid, $L(R)OOH$

2.2.2. Serbest Radikal Türleri

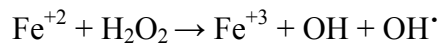
2.2.2.1. Süperoksit Radikalleri (O_2^{\cdot})

Süperoksit radikali (O_2^{\cdot}), hemen tüm aerobik hücrelerde oluşan, indirgen ve orta derecede yükseltgen olan bir ajandır. O_2^{\cdot} radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. O_2^{\cdot} oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Uzun bir yarı ömre sahip olup, lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. Zayıf bir oksidan olan O_2^{\cdot} radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak O_2^{\cdot} radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil (OH^{\cdot}) radikallerini oluşturmaktadır. Üretilen bu OH^{\cdot} radikalleri; DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (57, 58).



2.2.2.2. Hidroksil Radikalleri (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali (OH^{\cdot}), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Hidrojen peroksitin (H_2O_2) Fe^{+2} veya Cu^{+2} ile reaksiyona girmesiyle OH^{\cdot} oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde, bu oluşan OH^{\cdot} radikalinin olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiştir ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.

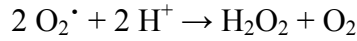


Hidroksil radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH[•] radikallerinin, DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve oluşan bu ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH[•] radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiğinden, DNA ve RNA' da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak, radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin; timine katılarak timin radikalini oluştururlar ve timin radikali de oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH[•] radikali, DNA' nın baz ve şeker yapılarında da ciddi hasarlara neden olarak DNA üzerinde zincir kırıkları oluştururlar. Hasarın çok kapsamlı olması durumunda, oluşan hasar hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir (58, 59).

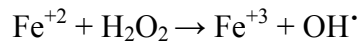
2.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. O₂[•] radikalinin, hidrojenle verdiği reaksiyona 'Dismutasyon Reaksiyonu' adı verilir ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (55).

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girer. Çünkü Fe⁺² veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, O₂[•] radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan OH[•] radikali oluşturur (56).



Fenton Reaksiyonu

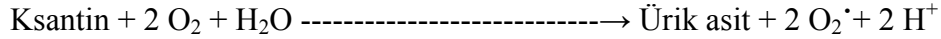


Haber – Weiss Reaksiyonu

2.2.3. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

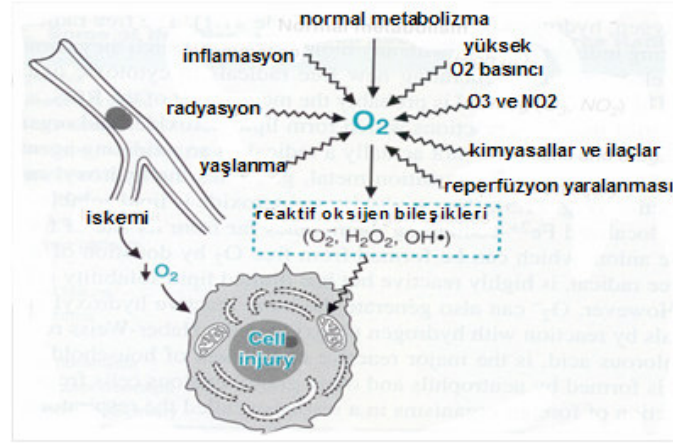
- 1- Aktive olmuş fagositler (respiratory burst)
- 2- Radyasyon
- 3- Alkol, uyuşturucu
- 4- Çevresel faktörler (sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar)
- 5- Cerrahi stres
- 6- Mitokondriyal e⁻ transportu: Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağıdır. e⁻ transportu sırasında, e⁻ sızması olur. Sızan e⁻ ların O₂' yi indirgemesi ile ROS meydana gelir.
- 7- Ksantin oksidaz: Enerji azlığı ve artmış intraselüler kalsiyum varlığında kalsiyuma bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenazı, ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz, ksantinün ürik aside dönüşümü sırasında O₂' oluşumuna neden olur.

Ksantin Oksidaz



- 8- Hemoglobin yıkımı: Hem yıkımında görevli bir enzim olan, hem oksidaz enzimi ROS oluşumuna neden olur.
- 9- Endoplazmik retikulum e⁻ transport sistemleri
- 10- Peroksizomlarda bulunan oksidazlar: Bol miktarda H₂O₂ üretirler.
- 11- Araşidonik asit metabolizması: Lipooksigenaz ve siklooksigenaz, reaksiyonun katalizi sırasında ROS oluştururlar.
- 12- İskemi, travma, intoksikasyon (60).

Şekil 5' de reaktif oksijen bileşiklerinin oluşum nedenleri ve reaktif oksijen türleri aracılı hücrel hasar özetlenmiştir.



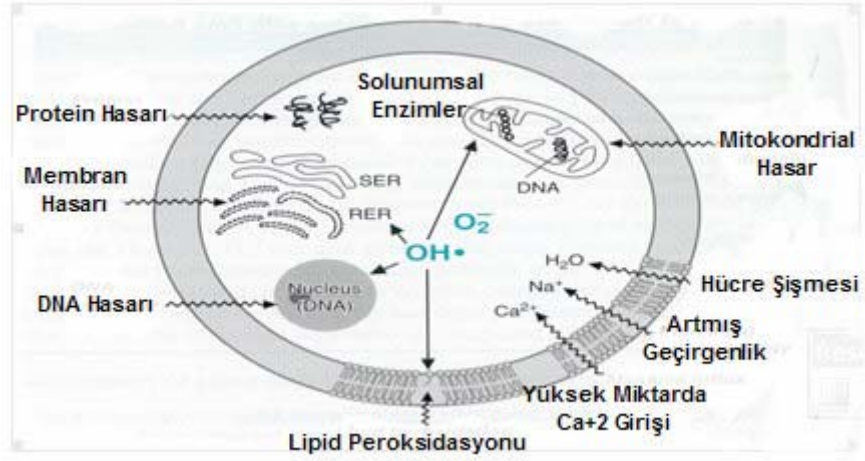
Şekil 5. Reaktif oksijen bileşikleri oluşum nedenleri ve hücresel hasar (52)

2.2.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu; inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3), azot dioksit (NO_2^*), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Tablo 5’ de serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri verilmiştir. Hücrede serbest radikal aracılı hasar Şekil 5’ de gösterilmiştir. O_2^* radikali ve OH^* radikali; sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (47, 51).

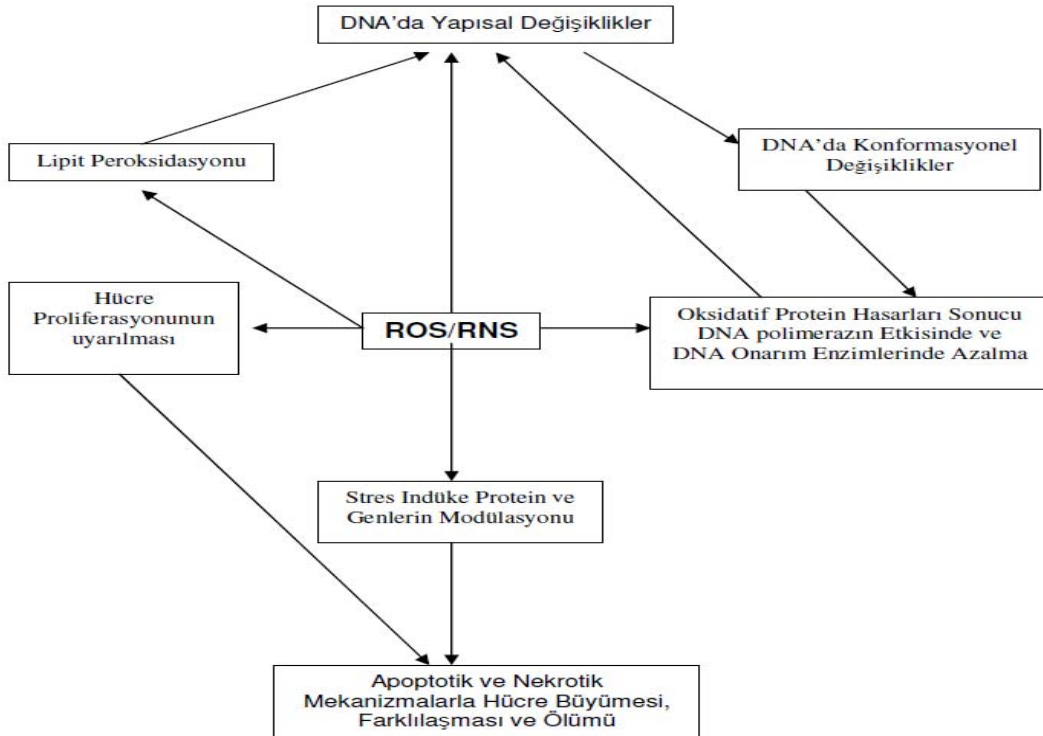
Tablo 5. Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

Lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asitler	Tek ve çift zincir kırıkları, protein çapraz bağları, baz içermeyen bölgeler, kimyasal modifikasyonlar
Proteinler	Peptid zincirinde kopmalar, denatürasyonlar, enzim inhibisyonu



Şekil 6. Hücrede radikal aracılı hasar (52)

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının, birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, anfizem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi durumlarda ROS aracılı hücre hasarı söz konusudur (51, 61). Şekil 6' da reaktif oksijen ve azot türlerinin vücuttaki etkileri gösterilmiştir.



Şekil 7. Reaktif oksijen ve azot türlerinin vücuttaki etkileri

2.2.5. Serbest Radikallerin DNA' ya Etkileri ve Oksidatif Stres

Hücrel DNA serbest oksijen radikalleri tarafından hasara uğratılır. ROS, hücrel solunum, fagositoz, hücre yaralanması ve bazı enzimatik reaksiyonlar esnasında endojen olarak üretilebildiği gibi; çeşitli kimyasallar, hava kirliliği, sigara dumanı ve iyonizan radyasyon gibi çevresel faktörler tarafından da oluşturulabilmektedir. Serbest oksijen radikalleri, DNA yapısındaki deoksiriboz-fosfat iskeletinde hasara, pürin ve pirimidin bazlarının spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olmaktadır (47). ROS, canlı hücrelerde sabit olarak sürekli üretilmektedir (62).

İnsan vücudunda her hücrede günde 2×10^4 DNA hasarı olduğu tahmin edilmektedir. Bu hasarın önemli bir bölümü ROS ile oluşmaktadır. İlk olarak 1952' de Conger ve Fairchild, artmış oksijen basıncının, kromozom aberasyonlarında artışa yol açtığını tanımlamıştır. ROS' un aşırı üretimi ve/veya bunu nötralize edecek antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stresten bahsedilir. Oksidatif stresin biyolojik etkileri; oluşan ROS' ların içeriğine, kokarsinojenlerin varlığına, maruz kalma süresine ve konsantrasyonu ile maruz kalma sırasında hücre siklusunun durumuna bağlıdır (62).

Hücrel oksijen konsantrasyonu, metabolik ölüme yol açan yetersiz oksijenden ve oksidatif hasara yol açan aşırı oksijenden kaçınarak sağlanır. Enerji üretiminin esas bileşeni olan oksijen, gerçekten de çoğu yaşamsal yapılar için tehlikelidir. Oksijen toksisitesine karşı ilk savunma sistemi, tüm memelilerde görülen % 20' lik çevresel oksijenin, % 0,5-5' lik dokulardaki konsantrasyonunu sağlayan oksijen basıncının net gradientidir. Dokulardaki bu rölatif oksijenin düşük konsantrasyonu, canlıyı oksidatif hasardan korumaktadır (62). Serbest radikallerin DNA atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. OH' radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. H₂O₂ ise membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğindeki DNA' ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açabilir. Bu nedenle DNA, kolay zarar görebilen bir moleküldür. DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksit (NO), azot dioksit (NO₂), peroksinitrit (ONOO), diazot trioksit (N₂O₃) ve nitrik asit (HNO₃) gibi reaktif azot türleri (RAS), nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı reaktif oksijen ürünleri farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar (47, 59).

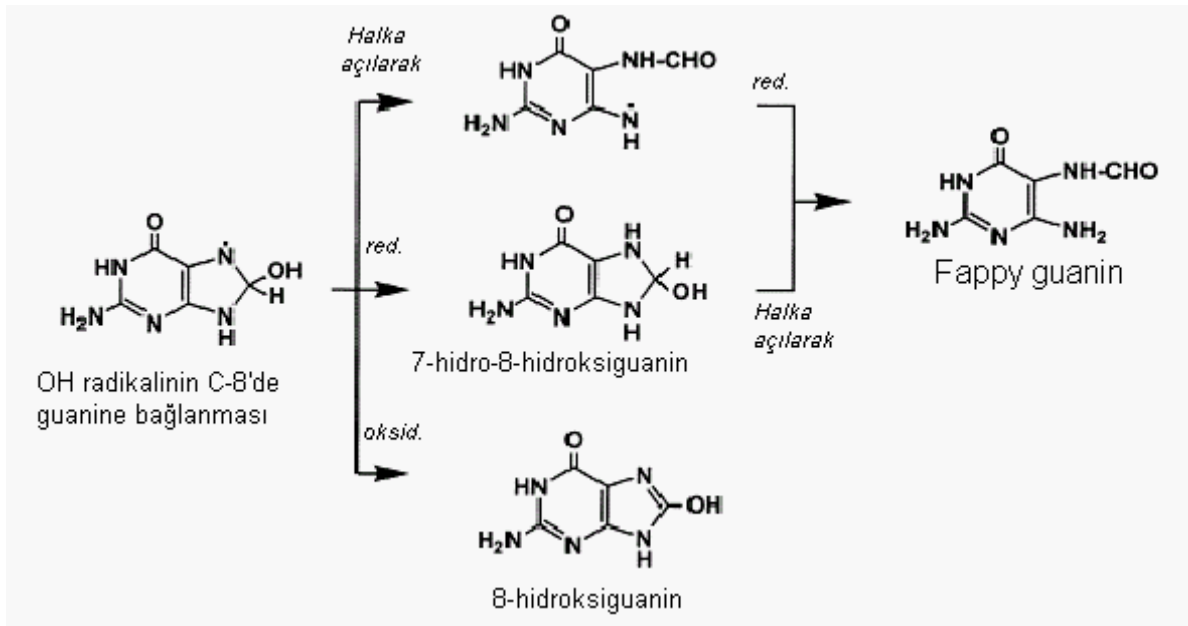
Örneğin; O_2 ' ve H_2O_2 hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken, OH^{\bullet} radikali DNA' daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır. OH^{\bullet} radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH-pürin radikallerini oluşturmaktadır.

C4-OH- ve C5-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oksopürinler) ve formamido pirimidinler oluşur. Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (62). Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu; baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken, oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara neden olur (47).

Oksidatif DNA lezyonları kimyasal ve yapısal olarak tanımlanmıştır. Çeşitli kanser dokularında, ROS bağımlı spesifik DNA modifikasyonlarında artış görülmüştür. En çok rastlanılan oksidatif DNA baz modifikasyonu 8-hidroksiguanindir. Normal insan hücresinde bile yaklaşık olarak 100 000 guanin rezidüsünde, bir 8-hidroksiguanin oluşmaktadır (63).

DNA yapısında bulunan 8-OH guaninin, $G \equiv C \rightarrow T = A$ mutasyonuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (47).

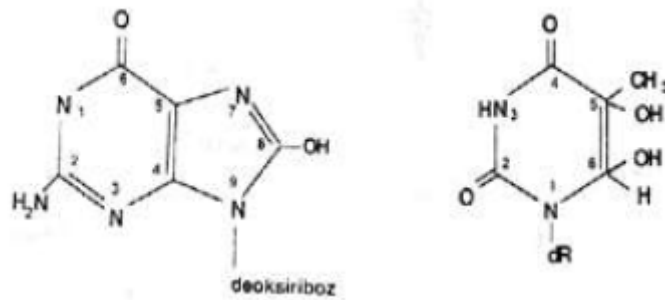
Günümüzde HPLC ve GC-MS ile düzeyi belirlenebilen 8-OH guanin, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu DNA hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçtir (47).



Şekil 8. 8-hidroksiguanin ve Fapy Guanin'in oluşum mekanizmaları

Şekil 8’ de 8-hidroksiguanin (7,8-dihidroksi–8-oksoguanin: 8-OH-Gua) ve 2,6-diamino–4-hidroksi–5-formamidopirimidin (Fapy Guanin) oluşum mekanizmaları görülmektedir. Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamido pirimidinlerin oluşumunu arttırırken, 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan, oksidatif DNA hasarlarının belirlenmesinde hasar indeksi olarak görülmektedir. Çoğu zaman 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleozidi şeklinde ölçülmektedir (64).

Diğer bir oksidasyon ürünü olan timin glikol, hücre içinde oluşuktan 24 saat sonra kandan temizlenerek idrara geçer. İdrarda bulunan deoksitimin glikol diyet kaynaklı değildir. İdrar timin glikol düzeyi de oksidatif DNA hasarının bir belirtici olarak değerlendirilebilir. Şekil 9’ da 8-OH-guanin ve timin glikol yapıları gösterilmiştir (47).



Şekil 9. 8-OH Guanin ve timin glikol yapıları (47)

Endojen ROS’ ların esas kaynağı öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif metabolizmanın ürünleridir. Serbest oksijen ürünleri her zaman hücrel metabolizmanın bir ürünü olmayabilir; sitokinlere, büyüme faktörlerine ve spesifik sinyal yollarındaki ikincil habercilere cevap olarak özel plazma membran oksidazları tarafından da üretilir (65).

Oksidatif DNA hasarı spesifik ve non-spesifik tamir mekanizmaları ile sürekli olarak tamir edilebilir. Aşırı hasarlanma ve hasarın geri döndürülememesi durumunda hücreler kontrol organları tarafından programlı olarak apoptozise yönlendirilirler. Yaşayan hücrelerde kontrol noktaları yolağı aktive olur ve hücre döngüsünün ilerlemesi hasarın giderilebilmesi için G1 ve G2 kontrol noktalarında durdurulur. Hasar giderildikten sonra hücre döngüsü tekrar başlatılır. Eğer DNA hasarı onarılamazsa yüksek oranda gen mutasyonları oluşur ve bu durum malign transformasyonlara yol açabilir. Baz eksizyon tamir mekanizması (BER) oksidatif hasara uğramış DNA bazlarının tamirinden sorumludur. Hasarlı bazlar artan 8-oksoguanin-DNA glikosilaz 1 (hOGG1) ve apürinik/apirimidinik endonükleaz (APE/Ref-1)

aktivitesiyle ortadan kaldırılır. DNA polimeraz β (DNA Poly β) 8-OH-dG kalıntılarının kaldırılmasıyla oluşan boşlukları uygun baz ile doldurur (31). BER mekanizması ile okside baz hasarı tamirinin, zincir kırıklarının ligasyonundan daha yavaş bir proses olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar okside bazların BER mekanizması ile tamirinin 3 saat, zincir kırıklarının ligasyonunun ise 30 dakikalık bir sürede tamamlandığını ortaya koymuştur (66).

DNA hasarının çeşitli hastalıkların etyolojisinde ve yaşlanmada önemli roller oynadığı ileri sürülmekte olup, mitokondrial DNA' da nokta mutasyonların birikiminin yaşa bağlı olarak arttığı, bu nedenle özellikle mitokondrideki oksidatif DNA hasarının yaşlanma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (67).

Oksidatif stres; ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (50, 68).

2.2.5.1. Çekirdek DNA' sında gelişen oksidatif hasar

Stabil bir molekül olan DNA da, lipidler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde yüzlerce kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (54). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8-OH-dG) olduğu gösterilmiştir (69).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA' da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker-fosfat omurgası hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (70, 71). ROS kaynaklı hasarın iki farklı şekilde olduğu öne sürülmektedir:

1- Fenton Kimyası hipotezinde OH^{\cdot} radikalleri DNA' ya saldırarak hasar oluşturur. H_2O_2 , O_2^{\cdot} gibi radikaller doğrudan DNA hasarı oluşturamazlar. OH^{\cdot} radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için bizzat DNA' da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. DNA çok sayıda

negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{+2/+3}$ ve $Cu^{+1/+2}$ iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi, oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'nin hedefi haline getirmektedir (53, 54). DNA'ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 'nin DNA üzerindeki reaksiyonu sonucu oluşan $OH\cdot$ radikalleri, $OH\cdot$ radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, $OH\cdot$ radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedirler (72).

2- Nükleaz Aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres; sitozolik Ca^{+2} iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak, nukleusdaki Ca^{+2} bağımlı endonukleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmantasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca^{+2} şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır.

In vivo koşullarda her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir (73).

Reaktif azot türleri (RAS; NO_2 , $ONOOH$, N_2O_3 , HNO_3) DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RAS etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır. DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon, zincir kırıklarıdır. Zincir kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek zincir kırıklarında, diğer zincirdeki bilgi doğru okunarak, hasarlı zincir onarıcı enzimlerle onarılabilirdiğinden çift zincir kırıkları daha önemlidir (71).

DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında programlı hücre ölümü (apoptoz) gerçekleşmektedir. DNA'da zincir kırıklarının oluşumundan sonra DNA onarım mekanizmasının bir komponenti olan NAD^+ bağımlı poli ADP-riboz polimeraz enzimi (PARP) aktive olmakta ve DNA hasarı belirli bir düzeyi aştığında, aşırı NAD^+ ve ATP tüketimi sonucunda hücre ölümüne gitmektedir. Hücrenin *NAD^+ -bağımlı programlı ölümü* olarak adlandırılan bu olayın, yaygın hasarlı DNA'ya sahip hücrelerde, malign potansiyelli somatik mutantların oluşumunu engellemeye yönelik intihar yanıt olduğu öne sürülmüştür (74).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu^{+2} iyonları DNA’ da G-C’ den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OH-dG’ dir. 8-OH-dG, oksidatif DNA baz hasarının bir belirteci olarak kabul edilmektedir (70, 71, 75).

2.2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiğİ hasarı önlemek için vücutta *antioksidan savunma sistemi* adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı mücadele etmektedirler. Savunma sistemleri; serbest radikal toplayıcılar ve bazı enzimlerden oluşmakta olup, savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Tablo 6’ da enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemde görevli moleküller verilmiştir. Antioksidanlar reaktif oksijen ürünlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen ya da geciktiren bileşiklerdir (76). Gıdalar ile alınan antioksidanların başında vitamin E, vitamin C, fenolik bileşikler ve karotenoidler gelir (77).

Tablo 6. Antioksidan Sistem

Enzimatik	Non-enzimatik	
Sürekoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Bilirubin
Katalaz (CAT)	α -tokoferol (Vit E)	Ürik asit
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (Vit C)	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GR)	β -karoten	Laktoferrin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Albümin
Mitokondrial sitokrom oksidaz	Seruloplazmin	Transferrin

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı reaktivitelerine bağıldır. *In vitro* çalışmalarda flavonoidler, basit fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğı

ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşır burada lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilir. Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini artırma ya da redoks hemostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlar ile ilgili çalışmalar *in vitro* koşullarda yapılmış olup, *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır (78).

2.2.6.1. Antioksidan etki mekanizmaları

A. Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler ve fenolik bileşikler bu tipte etki gösterirler.

B. Bastırıcı (quencher) etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak, aktivitelerini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren mekanizmadır. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

C. Onarıcı (repair) etki: Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşiklerin, BER mekanizmasında görevli olan 8-oxoguanin DNA glikosilaz 1, apürinik/apirimidinik endonükleaz ve DNA polimeraz beta gibi DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indüklediği ortaya konmuştur.

D. Zincir kırıcı (Chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller zincir kırıcı özellik gösterirler (31, 79).

2.3. Oksidatif DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Alkali elüsyon, alkali unwinding, GC-MS, HPLC (elektrokimyasal dedektör ile) ve comet analizi günümüzde oksidatif DNA hasarını belirlemede kullanılan yöntemlerdir. Alkali elüsyon ve alkali unwinding güvenilir ve duyarlılığı yüksek metodlar olmasına rağmen, comet analizine göre daha kısıtlı uygulama alanına sahiptirler. HPLC ve GC-MS, DNA hasarını

belirlemede ileri teknikler olmalarına rağmen işlem süresinin uzun olması, daha maliyetli olmaları ve analize hazırlık aşamasında numunelerde, oksidasyon reaksiyonlarının gelişebilmesi sebebiyle, comet analizine göre nispeten daha az tercih edilmektedirler (80).

2.3.1 Comet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen comet analizi de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir (62).

2.3.1.1. Tarihçe

Tek hücre jel elektroforez yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirilmiştir. Geliştirilen bu tekniğe göre hücreler mikroskobik lamalar üzerindeki agaroz jelle gömülürken, tuz ve deterjan içeren çözeltilerle muamele edilip lizise uğratılmakta ve nötral şartlarda elektroforez yapılarak, DNA serbestleştirilmekteydi. Elektrik akımı uygulanması, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının, çekirdekten hızla göçünü sağlamaktaydı. Özellikle DSB artmış hücrelerde, kırık DNA'nın katottan anoda göçü floresans bir boya ile boyanarak görüntülenmekteydi. Görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldızla benzediklerinden *comet* diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilmekteydi (7).

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemekteydi. Ayrıca, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha sonradan Singh ve arkadaşları (1988) ile Olive ve arkadaşları tarafından (1989), alkali şartlarda (pH >13) elektroforeze dayalı mikrojelle tekniği tanımlanmıştır. Olive ve arkadaşları da bundan iki yıl sonra bu tekniğin başka bir alkali versiyonunu (pH >12.3) geliştirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda da Collins ve arkadaşları (1993) ile Singh ve arkadaşları (1994) tarafından modifiye protokoller geliştirilmiştir (62, 81).

Kullanılan daha güçlü liziz koşulları, proteinlerin % 95' inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali labil bölgelerin ve tek zincir

kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok, tek zincir kırıkları ve/veya alkali labil bölgeler oluşturması nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir (81, 82).

Böylelikle comet tekniğinin yeni dizaynı, insan hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır. Bunun yanında DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması çalışmalarında da kullanılabilir (7, 83).

Geleneksel alkali comet protokolünden ayrı olarak lezyon spesifik endonükleazların kullanıldığı modifiye protokoller de vardır. Standart alkali comet yöntemi zincir kırıklarını ve alkali labil bölgeleri belirler. Alkali labil bölgeler apürinik/apirimidinik alanları temsil eder ve bu durum hasarlanmış ya da kayıp bazlardan kaynaklanır. AP bölgeleri, BER esnasında oluşan ara ürünlerdir ve bazlarda ya da şekerlerde kendiliğinden meydana gelir ve kimyasal kararlılığın değişimiyle sonuçlanır. pH >13 şartlarında AP bölgeler kırıklara dönüşür. Normal hücrelerde zincir kırıklarının ve AP bölgelerin yanı sıra okside bazlar da oluşur. Okside bazların varlığı comet yöntemiyle kolaylıkla saptanabilir. Bunun için endonükleazların kullanıldığı ilave bir basamak gerekir. Lizizden sonra, agaroz gömülü hücreler lezyon spesifik endonükleazlarla muamele edilir. Formamidopirimidin (FPG), okside pürin 8-okso guanini tanır ve halkası açılmış pürinleri, Endonükleaz III ise okside pirimidinleri zincir kırığına çevirir. Özellikle FPG ile modifiye edilmiş Comet protokolü, insan hücrelerindeki bazal 8-okso guanin seviyesinin belirlenmesinde kullanılır. FPG ayrıca alkilasyon hasarlarını da tanıyabilmektedir. Bunların dışında T4 pirimidin dimer glikozilaz; siklobütan pirimidin dimerlerini zincir kırığına çevirir. Bu özelliğinden dolayı UV ışığın verdiği DNA hasarını belirlemede etkilidir. Urasil DNA glikozilaz ise folat eksikliğinden kaynaklanan yanlış birleşmiş urasilleri tanır ve zincir kırığına çevirir (84).

2.3.1.2. Kullanım Alanları

Comet tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının (özellikle radyoterapi ve kemoterapide) saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. Comet tekniği; değişik deneysel şartlarda DNA hasar ve

onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir (85-87).

Günümüzde comet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonizan radyasyona duyarlılıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle biyoizleme (human biomonitoring) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelemesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir (86-88).

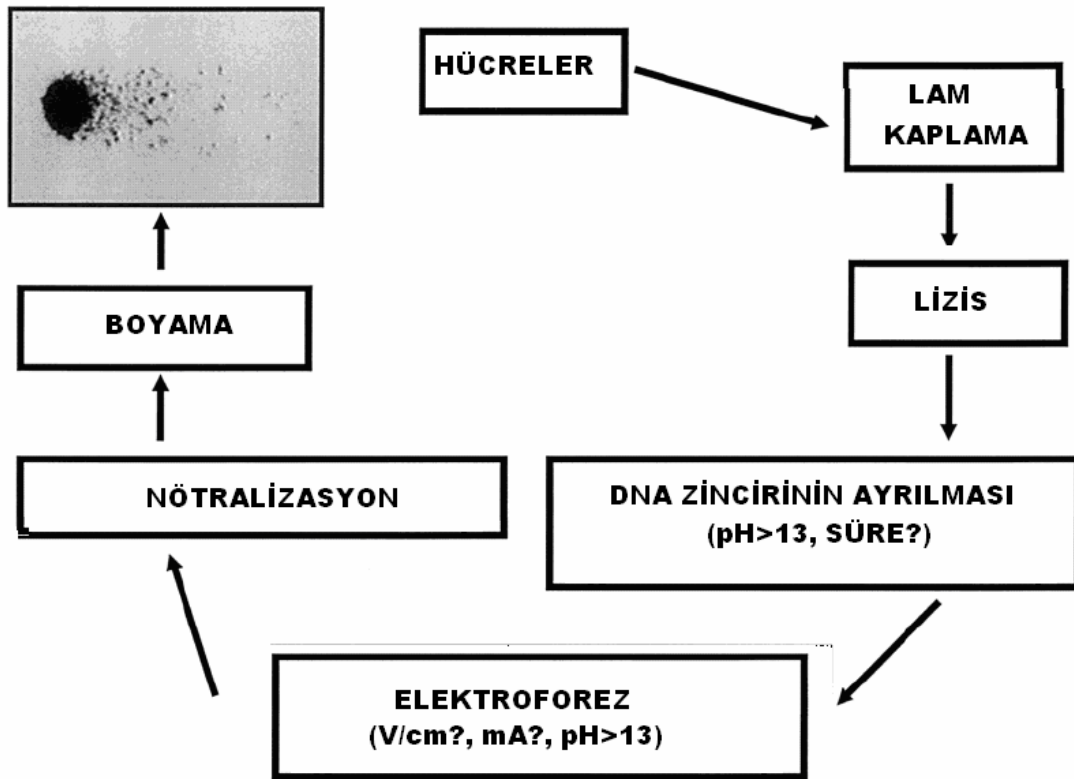
2.3.1.3. Comet Protokolü

Comet yönteminin alkali protokolü ile düşük düzeylerdeki zincir kırılmalarını, yüksek duyarlılık ile tayin edilmesi amaçlanmıştır. Şekil 10' da alkali comet tekniğinin kritik basamakları gösterilmiştir. Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali comet protokolü 7 basamak içermektedir (7, 62, 89).

- 1-Mikroskobik lamaların hazırlanması
- 2-DNA' nın serbestleşmesi için hücrelerin lizizi
- 3-Zincir kırıkları gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamele (pH >13)
- 4-Alkali şartlarda elektroforez (pH >13)
- 5-Alkali şartların nötralizasyonu (pH = 7.5)
- 6-DNA' nın boyanması ve comet görüntülemesi
- 7-Comet skorlaması

Yöntemdeki uygulama farklılıklarının çoğu elektroforez esnasında görülür; uygulanan voltaj, elektroforez zamanı ve tampondaki tuz konsantrasyonu değiştirilebilecek parametrelerdir (84, 89). Tekniğin uygulanmasında iki tip jel modeli vardır. Tek tabakalı jel ve sandviç jeller. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir. Singh ve arkadaşlarının comet protokünde; az sayıda hücre içeren düşük kaynama noktalı (LMP) agaroz jel, iki normal kaynama noktalı (NMP) agaroz jel tabakası arasına ince tabaka halinde mikroskobik lamalar üzerinde sandviç edilir. Gömülen bu hücreler, liziz solüsyonunda (pH 10, 100 mM EDTA, 2.5 mM NaCl, 10 mM Tris , %1(v/v) Triton X-100) bekletilir. En çok tercih edilen yöntem, en az bir saat süreyle, pH >10-12' de, deterjanla ve yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin bekletilmesi şeklindedir. Liziz sırasında protein ve lipidler uzaklaştırılmış, hücre membranında porlar açılmış olur. Ayrıca liziz ve alkali muamele basamakları arasında serbest DNA, proteinaz K ile muamele edilerek mevcut proteinler uzaklaştırılarak çeşitli enzim ve

antikorlarla spesifik DNA hasarları araştırılabilir. Elektroforezden önce lamlar, alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu sayede tek zincirli DNA oluşturularak SSB ve ALS' lerin ortaya çıkması sağlanır. Bu solüsyon pH >12 ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, bu parametreler denemelerle standardize edilmelidir. Elektroforezi takiben lamların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. Böylelikle DNA' nın renatürasyonu sağlanmış olur. Son aşamada ise, DNA bağlayıcı boya ile (akridin oranj, etidyum bromür, propidyum iyodür, DAPI, SYBR green, YOYO gibi) floresan renk oluşturulur (7, 90).



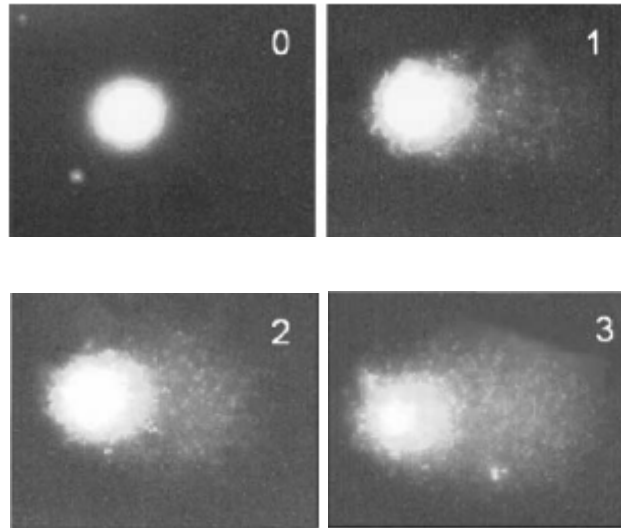
Şekil 10. Alkali comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi (7)

2.3.1.4. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Comet görüntülerinin değerlendirilmesi 2 şekilde yapılır:

- 1- Görsel analiz
- 2- Bilgisayar analizi

Gözlemler için 515-600 nm eksitasyon filtreli epi-floresan mikroskop kullanılır. Floresan boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopta her alana birkaç hücre düşecek şekilde, en azından 100 hücre olacak şekilde değerlendirilir. Comet skorlamasında en basit yöntem görsel değerlendirmedir. Hasar büyüklüğü; hasarsızlıktan en çok hasara doğru 0-4 arasında olacak şekilde sınıflandırılır. Görsel analiz, comet görüntülerinin değerlendirilmesinde yaygın kullanıma sahiptir. Özellikle basit olması, daha az zaman alması ve pahalı bilgisayar sistemlerine gereksinim göstermemesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Uzman gözlerin yaptığı görsel analiz sonuçları ile bilgisayarlı analiz sonuçları arasında önemli farklar olmadığı otoritelerce vurgulanmaktadır (83, 85, 87, 88, 90, 91).



Şekil 11. Görsel analiz ile comet skorlaması (91)

Gelişmiş laboratuvarlarda genellikle bilgisayar analizinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda ise ölçümler LSM (Laser-scanning microscopy) teknolojisiyle geliştirilmiştir. Böylece sarmal kırılmalarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir (7, 83, 86, 87, 88, 90).

2.3.1.5. Comet Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları

1. Az sayıda hücre gerektirir.
2. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
3. Hassastır.
4. Kolay uygulanabilir.
5. Hızlıdır.
6. Ekonomiktir.
7. Güvenilirdir.
8. Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir.
9. Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.
10. Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlenimleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda kullanılabilir (85, 89). Yöntem *in vivo* modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı çoğalan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksisite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür (89).

Comet analizi, insan çalışmalarında kullanılacak en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir. Normalde sıklıkla kullanılan hücre grubu, beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler rölatif olarak invaziv olmayan yollarla, kolaylıkla ayrılabilir ve metoda iyi uyum sağlarlar. Ancak kanser için hedef doku olmamaları ve beyaz kan hücrelerindeki hasarın gerçek hedef dokudaki hasarı yeterince yansıtmadığının net olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bazen cerrahi sonrası çıkarılan dokular kullanılabilirle birlikte sağlıklı kontrol dokusu elde etmek oldukça güçtür. Yöntem bukkal ve üreteryal epitel hücreler de denenmiştir ancak bu hücreler, yapıları nedeniyle ek proteaz kullanımını ve uzun bir lizis süresini gerektirirler (86). Comet yöntemi için hazır ticari kitler kullanıma sunulmakla birlikte, halen manuel uygulamalar geçerliliğini korumaktadır. Fakat manuel uygulamalar, yöntemi uygulayan kişiye doğrudan bağlı olduğu için kişisel performanstan fazlasıyla etkilenmektedir. Ayrıca comet tekniğinin farklı uygulanması da sonuçlarda farklılıklara sebep olmaktadır.

2.3.1.6. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Comet tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), liziz solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Bugünkü mevcut şartlarda, çevresel ve fizyolojik değişikliklerin comet yönteminin varyasyonlarına katkısını tahmin etmek zordur. Sağlıklı ve tedavi almamış kişilerde DNA hasarında değişiklik oluşturan faktörler; yaş, hava kirliliği, diyet, cinsiyet, sigara, güneş ışığına maruziyet, enfeksiyon ve meslek olarak sayılabilir (62).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1. Cihaz ve Malzemeler

Hücre kültürü kabini (Heraeus KS-12 Air Flow), ışık mikroskobu (Olympus XSZ-D2), CO₂ inkübatörü (Thermo Forma 381), santrifüj (Eppendorf 5810), floresan mikroskop (Nikon Eclipse E800), hassas terazi (Mettler Toledo AB204-S), pH metre (Hanna Instrument), mikro dalga fırın (Altus ALMD 17I), çalkalayıcı inkübatör (ShellLab/Sheldon S14-2), vorteks (IKA Genus 3), magnetik karıştırıcı (Termal), aspiratörlü pipet (JetPip Pipette Aid), membran filtreleri (Agilent Econofilter 0.2µm), semiotomatik pipetler (0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL), standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları, 15 mL' lik ve 50 mL' lik steril falkon tüpler, 25 mL, 10 mL ve 2 mL' lik steril disposable pipetler, steril pipet uçları (Sarstedt biosphere fitler tips), beher, erlen, balonjoje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, 5-10-20 ve 50 mL' lik steril enjektör, steril cerrahi eldiven, UV lamba, etüv, neubauer lamı ve lameli, 0.5 ve 1.5 mL' lik eppendorf tüpler, 1/3 rodajlı lamlar, 24x24 mm lameller, elektroforez tankı, elektroforez güç kaynağı, pens, yatay ve dikey tip boyama şaleleri, lam sepeti, kurutma kağıdı, magnetik bar, parafilm, buzdolabı, çeker ocak, tüp sporu.

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO, Carlo Erba reagents), Penisilin+Streptomisin (Gibco 15140), Foetal Bovine Serum (Biochrom S0113), Tripsin/EDTA Solüsyonu (Gibco 25300), Tripkan Blue (Sigma), Etanol (Carlo Erba reagent), DMEM (Biochrom FG 0435), EDTA

disodyum tuzu (Sigma), NMP Agaroz (Sigma), Agarose Type 1-A Low EEO(Sigma), Poly L-Lysine(Biochrom), Etidyum Bromür (Sigma), PBS Tablet (Medicago), H₂O₂ (Labcem), pH metre kalibrasyon çözeltileri (4.01, 7.00, 9.18), Sodyum Klorür (NaCl, J.T.Baker), Tris Baz (Sigma), Triton X-100 (Sigma), Sodyum hidroksit (NaOH, Riedel-de-Haen), %70' lik etanol çözeltisi.

3.2. Metodlar

3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7.4, 1L

Temiz bir beher alındı ve içerisine 900 mL kadar saf su konuldu. 10 tane PBS tablet behere konuldu ve magnetik karıştırıcıda magnetik bar yardımıyla tabletler çözünür hale getirildi. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH' sı 7.4' e ayarlandı. Çözelti balon jøjeye aktarılarak, saf su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı ve 2-8 °C' de saklandı.

Liziz Çözeltisi, pH 10, 250 mL

NaCl, 2.5 M, 37.025 g

EDTA, 100 mM, 9.305 g

TRIS, 10mM, 0.3025g

Her biri tartılarak behere konuldu. Üzerine 200 mL saf su ilave edilip magnetik karıştırıcıda magnetik bar yardımıyla çözünür hale getirildi. Kalibre edilmiş pH metre ile pH 10' a ayarlandı. Balon jøjeye aktarıldıktan sonra saf su ile son hacim 250 mL' ye tamamlandı ve 2-8 °C' de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde 247.5 mL liziz çözeltisi içerisine, 2.5 mL Triton X-100 eklendi.

Elektroforez Tampon Çözeltisi, pH 13.1, 500 mL

3M NaOH → 60 g NaOH tartıldı, 500 mL saf suda çözüldü ve 2-8 °C' de saklandı.

10 mM EDTA → 0.37224 g EDTA tartıldı, 100 mL saf suda çözüldü ve 2-8 °C' de saklandı.

50 mL 3M NaOH

50 mL 10mM EDTA

10 mL DMSO

Mezürle ölçülerek behere aktarıldı ve üzerine 400 mL saf su ilave edildi. Kalibre edilmiş pH metrede pH 13.1' e ayarlandı. Çözelti balon jöjeye aktarılıp saf su ile son hacim 500 mL' ye tamamlandı ve çözelti 4 °C' de saklandı.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi, 0.4 M, pH 7.5, 250 mL

24.2289 g TRİS tartıldı ve temiz bir behere aktarıldı ve 200 mL kadar saf su içerisinde magnetik karıştırıcıda magnetik bar yardımıyla çözüldü. Çözelti balon jöjeye aktarılarak son hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlandı ve 2-8 °C' de saklandı.

LMP Agaroz Jel, % 1 (PBS içinde)

0.1 g LMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

NMP Agaroz Jel, % 0.5 (PBS içinde)

0.05 g NMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

Polilizin Kaplama Çözeltisi, 70 mL

7 mL poli L-Lizin, 7 mL PBS ile karıştırıldı ve üzerine 56 mL saf su ilave edildi. Karışım 4 °C' de saklandı.

Etidyum Bromür

100 µg/mL' lik etidyum bromür stok çözeltisinden 16 µL alınarak 40 mL PBS (pH 7.5) içinde çözüldü ve böylece son konsantrasyonu 0.04 µg/mL olan etidyum bromür hazırlanmış oldu.

3.2.2. Jellerin Döküleceği Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması

Lamlar polilizin ile normal kaynama noktalı agaroz jelin tutunmasını kolaylaştırmak için önceden kaplandı (7, 62).

Bu kaplama işleminde sırasıyla;

1) Lamlar ve lameller % 70' lik alkol çözeltisiyle iyice silinerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

2) Kuruyan lam alındı, üzerine 75 µL polilizin damlatılıp ikinci bir lam ile sandviç modeliyle sıkıca bastırılıp çekilmek suretiyle polilizin her iki lam arasında yayılması sağlandı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3) Kuruyan lamlar alındı ve üzerine mikrodalga fırının orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılmış % 0.05' lik NMP agaroz çözeltisinden 75 µL aktarılıp, kabarcık oluşturmadan lamel kapatıldı. Lamel kapatılan lamlar 4 °C' de 5 dakika bekletildi. Süre sonunda çıkarılan lamaların üzerindeki lameller çekilerek alındı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.2.3. Propolisin Etanol Ekstraktlarının Hazırlanması

S.S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifi tarafından, Trabzon ilinin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında -20 °C' de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, blenderde toz haline getirildi ve -20 °C' de donduruldu.

0.5 gram toz propolis 20 mL saf etanol ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra 60 °C' de 150 rpm' de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda çalkalayıcı

inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve süpernatantlar 0.2 µm' lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 25 000 µg/mL' lik konsantrasyondaki propolis ekstraktları daha sonra kullanılmak üzere 100' er µL halinde aligotlanıp -20 °C' de, karanlıkta saklandı.

3.2.4. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada K.T.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' ndan temin edilen primer fibroblast hücreleri kullanıldı. Fibroblast hücreleri L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin+streptomisin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂ ortamında, 37 °C' de, T-25 ve T-75' lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması

Büyütülen hücreler flask yüzeyinin % 70-80' lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası 5' er mL DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-25 flasklara uygun sayıda (2×10^5) hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL' ye tamamlandı.

3.2.4.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığın Tespiti

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 μL ' si 10 μL tripan blue ile karıştırılarak Neubauer hematositometre camına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılmamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir (92). Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü.

3.2.5. Comet Yönteminin Uygulanması

Her bir çalışma aynı gün içinde 3 kere tekrarlandı. Çalışılacak hücreler 24 saat önce T-75' lik flaklardan tripsinizasyonla kaldırıldı ve sayılarak T-25' lik flaklara, flask başına 200 000 hücre/mL olacak şekilde ekildi. 24 saatin bitiminde planlanan çalışma doğrultusunda flaklara ilgili maddeler ilave edilip, belirlenen sürelerde hücrelerin bu maddelerle inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda tripsinizasyonla kaldırılan hücreler santrifüjlendi, çöken kısım DMEM ile sulandırılarak canlılık sayımı yapıldı ve ardından comet protokolü başlatıldı.

Canlılık sayımı ardından hücreler comet laboratuvarına getirildi ve bundan sonraki aşamalar mümkün olduğu kadar karanlıkta gerçekleştirildi. Önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış lamalar çıkarılıp numaralandırılarak, bu aşamaya kadar olan her şey laboratuvar defterine kaydedildi. Farklı gruptaki hücreleri içeren falkonlardan 40 μL hücre süspansiyonu alınarak 0.5 mL' lik eppendorf tüplere dağıtıldı. Bu esnada çalışma sabahı hazırlanan LMP agaroz, mikrodalga fırının orta ısı ayarında 30 saniye kaynatıldı ve bir müddet bekletilerek 37 $^{\circ}\text{C}$ ' ye gelmesi sağlandı. LMP agarozdan 80 μL alınarak eppendorfa aktarıldı ve pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu ile homojen bir şekilde karışması sağlandı. Bu karışımdan 80 μL alınarak daha önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış ve uygun numaradaki lama otomatik pipet ile yayılarak üzerine lamel kapatıldı. 5 lam da bu şekilde hazırlandıktan sonra lamalar 4 $^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda buzdolabından çıkarılan lamalar üzerindeki lameller hafifçe çekilerek uzaklaştırıldı ve lamalar tekrar 4 $^{\circ}\text{C}$ ' de 5 dakika bekletildi. Daha sonra liziz çözeltisi içine son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 ilave edildi ve karıştırıldı. Hazırlanan çözelti 4 $^{\circ}\text{C}$ ' de bekleyen hücreler üzerine

hafifçe tatbik edildi ve hücreler liziz çözeltisi içinde 1 saatlik inkübasyona bırakılarak, lizize uğratıldı.

Bir saatlik lizizden sonra, lamlar liziz çözeltisinden çıkarılarak hepsi aynı yöne bakacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı lamların üzerini kapayacak seviyeye kadar elektroforez tamponuyla (pH 13.1) dolduruldu. Elektroforeze tabi tutulmadan önce hücrelerin nukleuslarındaki DNA, pH 13.1' de 30 dakika süreyle alkali muameleye uğratıldı. Böylece, DNA denatüre edilerek, tek zincir haline gelmesi sağlandı.

Alkali muamelenin bitiminde elektroforez tankının üzerine ve kenarlarına buz aküleri yerleştirildi. Güç kaynağı açılarak volt değeri 22 V (1V/cm), akım değeri 300 mA olacak şekilde ayarlandı ve hücreler 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

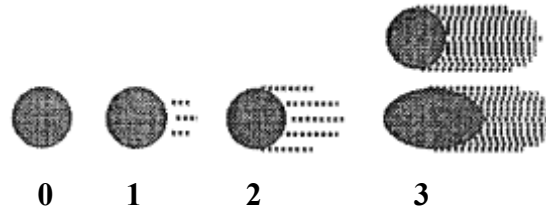
Elektroforezden sonra lamlar, elektroforez tankından çıkarılarak pH 7.4' de nötralizasyon tamponu içerisinde 20 dakika nötralize edildi. Nötral pH değerinde DNA' nın renatürasyonu sağlanmış oldu.

40 mL PBS içerisine 16 µL etidyum bromür ilave edilerek karıştırıldı. Nötralize edilen DNA' ları içeren lamlar bu boyanın içinde 20 dakika bekletildi. Bu sayede DNA' nın floresan boya ile boyanması sağlandı.

Boyanan jellerdeki DNA' lar, fotoğraf makinesi ile bağlantılı olan floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E800) etidyum bromürün dalga boyuna uygun olarak (G-2A, Eksitasyon 510-565 nm, DM 575, BA 590) 40 kat büyütmede değerlendirildi. Skorlamada görsel analiz metodu kullanıldı. Tüm jel taranarak üst üste gelen ve aşırı kuyruk oluşturmuş hücreler dikkate alınmadan rastgele 100 hücre seçildi, seçilen hücreler kuyruk uzunluğuna göre en hasarsız 0 ve en çok hasarlı olan 3 olmak üzere, 0-3 arasında sınıflandırıldı. Baş yapısı kaybolmuş ve aşırı uzamış kuyruğa sahip, skorlamada +4 derecesine girebilecek DNA görüntüleri değerlendirme dışı bırakıldı (92). Çalışmada kullanılan skala Şekil 12' de gösterilmiştir.

Cometlerin Skorlanması:

- 0 → hasarsız, kuyuksuz DNA
- 1 → baş yapısı korunmuş, kuyruk uzunluğu baş çapından küçük DNA
- 2 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 1 ile 2 katı kadar uzun DNA
- 3 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 2 kattan daha uzun DNA



Şekil 12. Çalışmada DNA'ların skorlanmasında kullanılan skala (91)

Maksimum hasar 300 olabilecek şekilde bütün lamalar aşağıdaki formüle göre skorlandı (92).

$$\text{Skor} = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) \quad (\text{n: her skor için sayılan hücre sayısı})$$

Genotoksik ajan (H_2O_2) ile indüklenmiş DNA hasarının propolisle giderilme oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (92).

$$\% \text{Azalma} = (A-B) / (A-C)$$

A: Pozitif kontrol skoru

B: Ekstraktla muamele skoru

C: Negatif kontrol skoru

3.2.6. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun H_2O_2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Denemelerde pozitif kontrol olarak H_2O_2 kullanıldı. H_2O_2 ; hücre membranını kolayca geçebilen ve sitoplazmada Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında enzimatik olmayan Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonlarıyla oldukça radikal özellik gösteren hidroksil radikaline dönüşebilen, kendisi radikal olmayan bir moleküldür. Oluşan hidroksil radikali tek ve çift zincir kırıklarının, alkali labil bölgelerin ve çeşitli tipte okside pürin ve pirimidin bazlarının oluşumunu indükleyebilir (93).

Bu çalışmada hücrelerde; hücre canlılığını azaltmadan, maksimum DNA hasarı verecek H_2O_2 konsantrasyonunun bulunması amaçlandı (94). Flasklara son konsantrasyonu 20, 30, 40, 50 μM olacak şekilde stok H_2O_2 ' den ilave edilerek, hücreler genotoksik ajana 5

dakika maruz bırakıldı. Daha sonra hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapıp ardından comet protokolü başlatıldı.

3.2.7. Fibroblast Hücre Serisinin H₂O₂ İle Muamele Süresinin Belirlenmesi

Hücre canlılığını azaltmadan, maksimum oksidatif DNA hasarı oluşturan H₂O₂ konsantrasyonu belirlendikten sonra, hücrelerin bu konsantrasyondaki H₂O₂ ile ne kadar süre muamele edilmesi gerektiği araştırıldı. Belirlenen konsantrasyondaki H₂O₂' den her bir flaska 40' ar µL ilave edilip 5 dakika, 1, 2 ve 4 saatlik sürelerde hücreler genotoksik ajana maruz bırakıldı. Süreler sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapılarak ardından comet protokolü başlatıldı.

3.2.8. Etanolün Fibroblast Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada propolisin etanolik ekstraktları kullanıldı. Ana stok konsantrasyonu 25 000 µg/mL' idi. Bu ana stoktan 1:4 dilüsyonla 5000 µg/mL' lik ara stok hazırlandı ve çalışmada hücrelere uygulanan bütün konsantrasyonlar bu ara stoktan kullanıldı. Dolayısıyla başlangıçta ekstrakt hazırlarken kullanılan %100' lük etanol, ara stok hazırlarken 1:4 oranında dilüe olduğundan buradan gelebilecek toksik etkiyi gözlemleyebilmek adına %20' lik etanolden flaslara 50' şer µL ilave edildi. Hücreler bu konsantrasyondaki etanol ile 1 saat inkübe edildi ve bu süre sonunda tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapılarak ardından comet protokolü başlatıldı.

3.2.9. H₂O₂ Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerde toksik etki yaratmadan, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek propolis konsantrasyonunun belirlenmesi için flastaki son konsantrasyonu 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 400 µg/mL olacak şekilde propolis ekstraktları, belirlenen konsantrasyondaki H₂O₂

aynı anda flasklara ilave edilerek, hücreler bu bileşiklerle 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapılarak ardından comet protokolü başlatıldı.

3.2.10. Fibroblast Hücre Serisinde Propolisin Uygulanma Protokolüne Göre Etkinliğinin Karşılaştırılması

Propolisin antigenotoksik etkisini değerlendirebilmek amacıyla hücreler 3 farklı gruba ayrıldı:

Birinci grupta, hücreler önce belirlenmiş konsantrasyondaki propolis ile 1 saat inkübe edildi, süre sonunda ortama belirlenen konsantrasyonda H_2O_2 ilave edilip 5 dakika sonra hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapıldıktan sonra comet protokolü başlatıldı.

İkinci grupta, hücreler belirlenen konsantrasyonda H_2O_2 ve propolis ile aynı anda ortama verilip, hücrelerin bu bileşiklere 1 saat maruz kalması sağlandı. Süre sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapıldıktan sonra comet protokolü başlatıldı.

Üçüncü grupta ise hücreler önce belirlenen konsantrasyonda H_2O_2 ile 5 dakika inkübe edildi, süre sonunda ortama belirlenen konsantrasyonda propolis ilave edilip 1 saat sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip canlılık sayımı yapıldıktan sonra comet protokolü başlatıldı.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama \pm standart sapma ($x \pm S.D$) olarak ifade edildi. Veriler SPSS 11.3 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. Comet skoru ve hücre canlılığı verilerinin negatif kontrol grubu ile H_2O_2 ve propolis muamelesine maruz bırakılan hücreler grubunda karşılaştırılması yapıldı ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

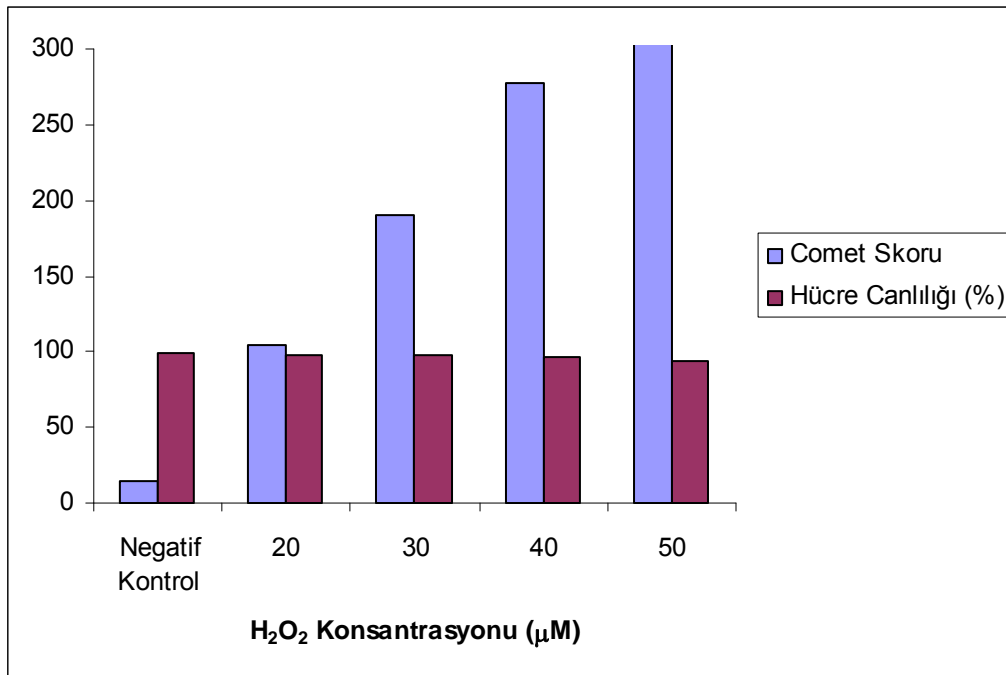
4.1. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun H₂O₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Primer fibroblast hücrelerinde, hücre canlılığını azaltmadan maksimum DNA hasarı oluşturacak H₂O₂ konsantrasyonunun bulunması için yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 13' de verilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre bundan sonraki çalışmalarda istenilen düzeyde oksidatif hasar yaratmak için, maksimum comet skoru olan 300 değerine en yakın comet skorunu veren 40 µM' lık H₂O₂ konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi. Tablo 7' de verilen comet skorlarından 20 ve 30 µM H₂O₂ için elde edilen değerlerin istenilen düzeyin altında olduğu görülmektedir. Öte yandan 50 µM H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerin comet görüntülerinde 100 tane 3. derece hasarlı DNA sayılamadığı için comet skorlaması yapılamadı. Bu preparatlarda maksimum 70 tane 3. derece hasarlı DNA sayılabildi. Geri kalanlarını ise baş yapısı tamamen kaybolmuş, oldukça uzun kuyruklu DNA yapıları oluşturmaktaydı. Şekil 14' te, çalışmada değerlendirmeye alınmayan kimi otoritelerce 4. derece hasarlı olarak kabul edilen baş yapısı tamamen kaybolmuş DNA fragmanları gösterilmiştir (91).

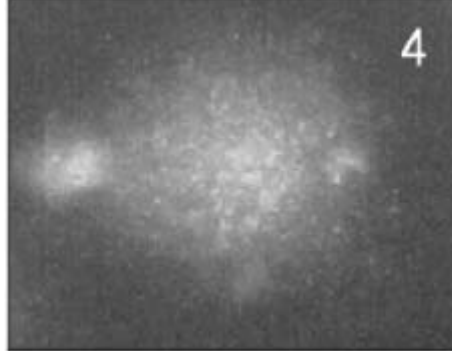
Tablo 7. Primer fibroblast hücrelerinde kademeli konsantrasyonlarda verilen H₂O₂' ye karşılık comet skorları ve hücre canlılığı

	Negatif Kontrol (n=3)	20µM H₂O₂ (n=3)	30µM H₂O₂ (n=3)	40µM H₂O₂ (n=3)	50µM H₂O₂ (n=3)	p
Comet Skoru (x ± SD)	14 ± 2.8	105 ± 7.1 ^a	190 ± 12.0 ^a	278 ± 2.8 ^a	—	0.0001
Hücre Canlılığı(%) (x ± SD)	98.7 ± 1.9	98.4 ± 2.2	98.3 ± 2.4	96.3 ± 5.3	94.3 ± 8.0	0.869

^a Negatif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p < 0.05).



Şekil 13. H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi



Şekil 14. 4. derece hasarlı, baş yapısı tamamen kaybolmuş DNA fragmanları

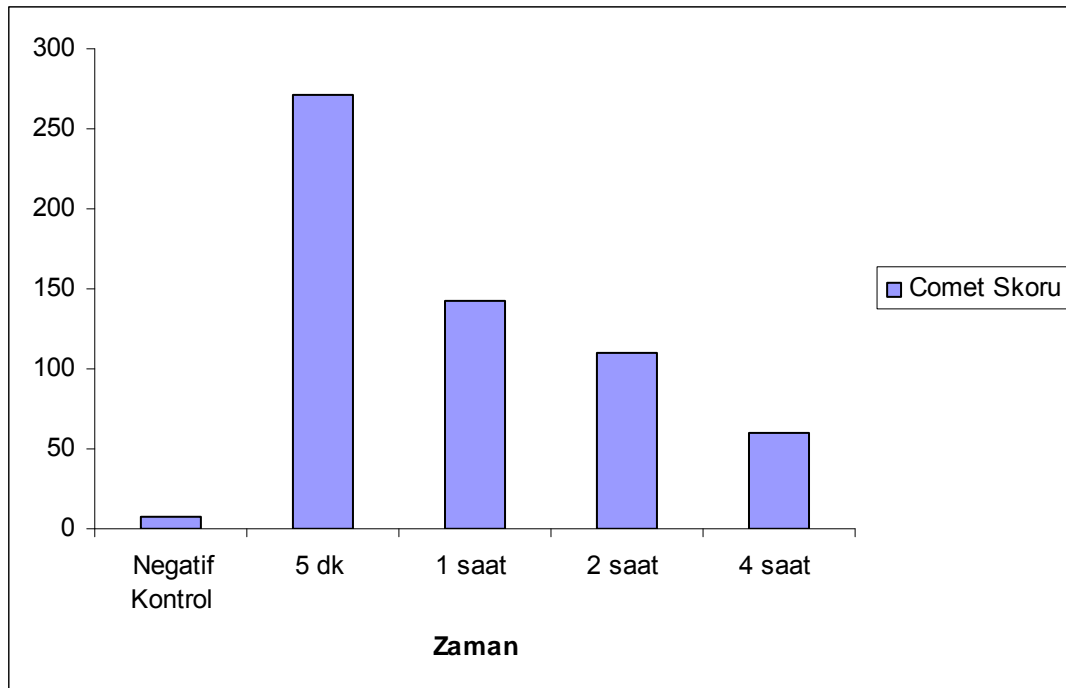
4.2. Fibroblast Hücre Serisinin H₂O₂ İle Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Hücre canlılığını azaltmadan, maksimum oksidatif DNA hasarı oluşturan H₂O₂ konsantrasyonu 40 µM olarak belirlendikten sonra, hücrelerin bu konsantrasyondaki genotoksik ajana ne kadar maruz bırakılması gerektiğine dair çalışma sonuçları Tablo 8 ve Şekil 15' de verilmiştir. Genotoksik ajana maruz bırakılan hücrelerde, zamanla artan DNA tamir hızı nedeniyle, muamele süresi arttıkça ölçülecek DNA hasarında azalma olduğu bu çalışmayla ortaya konuldu. Hücre canlılığı değerlerinde anlamlı farklılık olmamasına rağmen 1, 2 ve 4 saatlik H₂O₂ uygulamalarında comet skorlarında azalma görüldüğü için, bundan sonraki çalışmalarda istenilen düzeydeki hasarın, 5 dakika boyunca 40 µM konsantrasyondaki H₂O₂ ile sağlanmasına karar verildi.

Tablo 8. 40 μM H_2O_2 ile muamele edilen hücrelerde uzayan muamele süresine bağlı olarak elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı

	Negatif kontrol (n=3)	40μM H_2O_2 (5 dakika) (n=3)	40μM H_2O_2 (1 saat) (n=3)	40μM H_2O_2 (2 saat) (n=3)	40μM H_2O_2 (4 saat) (n=3)	p
Comet Skoru ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	7.5 \pm 0.7	271 \pm 4.2 ^a	142 \pm 9.2 ^a	110 \pm 6.3 ^a	59.5 \pm 4.9 ^a	0.0001
Hücre Canlılığı (%) ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	98.0 \pm 1.7	98.6 \pm 2.3	98.6 \pm 2.3	98.3 \pm 1.5	97.6 \pm 2.1	0.964

^a Negatif kontrole göre anlamlı fark görüldü ($p < 0.01$).



Şekil 15. 40 μM H_2O_2 ile muamele sonucu zamana bağlı comet skoru değişimi

4.3. Etanolün Fibroblast Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Propolis ekstraktı hazırlamak için kullanılan etanolden dolayı oluşabilecek DNA hasarını belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucu elde edilen değerler Tablo 9’ da verilmiştir. Elde edilen bu verilerden comet skoru ve hücre canlılığı değerlerinde negatif kontrole göre anlamlı fark olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla fibroblast hücre serisi üzerinde %20’ lik etanolden kaynaklanan ilave bir hasar olmadığı bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Tablo 9. %20’ lik etanolün DNA hasarı ve hücre canlılığı üzerine etkisi

	Negatif Kontrol (n=3)	% 20’ lik Etanol muamelesi (n=3)	p
Comet Skoru (x ± SD)	16 ± 1.4	22 ± 2.8	0.115
Hücre Canlılığı (%) (x ± SD)	99.3 ± 1.1	98.7 ± 1.2	0.519

4.4. H₂O₂ Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonu

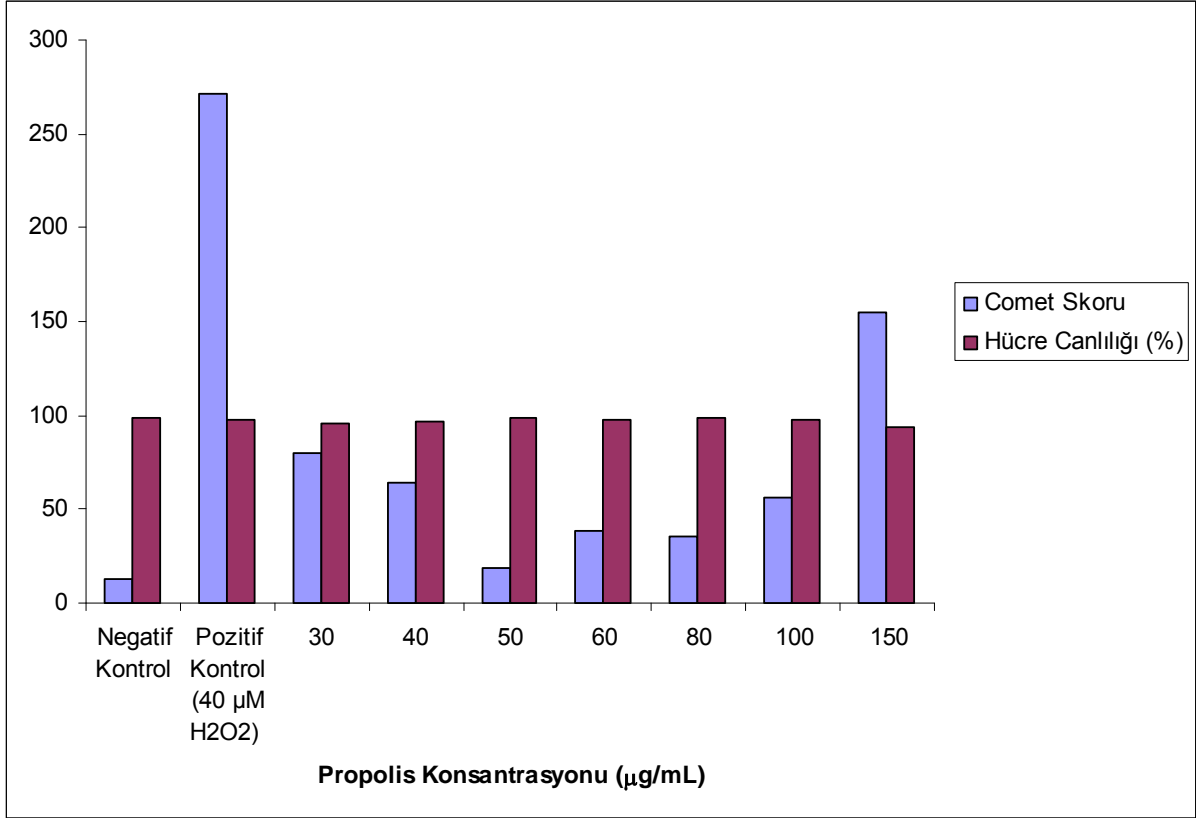
Hücrelerde toksik etki yaratmadan, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek propolis konsantrasyonunun belirlenmesine ilişkin çalışma sonuçları Tablo 10 ve Şekil 16’ da verilmiştir.

Tablo 10. Propolis konsantrasyonuna bağlı olarak comet skoru ve hücre canlılığı değişimi

	Comet Skoru (n=3) (x ± SD)	p	Hücre Canlılığı (%) (n=3) (x ± SD)
Negatif Kontrol	12.5 ± 0.7 ^a	0.0001	99.3 ± 1.1
Pozitif Kontrol (40 µM H ₂ O ₂)	271 ± 4.2		98.6 ± 2.3
30 µg/mL propolis	79.5 ± 6.3 ^a	0.0001	98.0 ± 2.0
40 µg/mL propolis	64 ± 5.7 ^a	0.0001	98.0 ± 2.0
50 µg/mL propolis	18.3 ± 4.0 ^a	0.0001	99.3 ± 1.1
60 µg/mL propolis	32.5 ± 10.6 ^a	0.0001	99.3 ± 1.1
80 µg/mL propolis	35.5 ± 6.3 ^a	0.0001	98.6 ± 1.1
100 µg/mL propolis	56 ± 2.8 ^a	0.0001	98.0 ± 2.0
150 µg/mL propolis	155 ± 7.1 ^a	0.0001	94.3 ± 2.5
400 µg/mL propolis	—		—

^a Pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p < 0.01).

Bu çalışmada 30-150 µg/mL etanolik propolis konsantrasyon aralığında H₂O₂ kaynaklı DNA hasarında pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü. Bu konsantrasyonlar içinden negatif kontrole en yakın comet skoru değeri 50 µg/mL propolis ekstraktı konsantrasyonunda elde edildiği için ve propolisin hücre serisinde ekstra yük oluşturmaması adına bundan sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi. Çalışmada kullanılan maksimum propolis konsantrasyonu 400 µg/mL olup, bu propolis konsantrasyonunda canlı hücre sayılmadığı ve comet görüntülerinde de sadece hücre kalıntıları görülebildiği için 400 µg/mL propolis konsantrasyonunun fibroblast hücre serisi için toksik doz olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 16. Propolis konsantrasyonuna bağlı comet skoru ve hücre canlılığı değişimi

4.5. Fibroblast Hücre Serisinde Propolisin Uygulanma Protokolüne Göre Etkinliğinin Karşılaştırılmasına İlişkin Sonuçlar

Propolisin farklı muamele protokollerindeki antigenotoksik etkinliğini karşılaştırabilmek için, hücreler propolisle 3 farklı muamele protokülüne maruz bırakıldı. Hücrelerin, 50 µg/mL etanolik propolis ekstraktıyla; genotoksik ajandan önce, genotoksik ajanla aynı anda ve genotoksik ajandan sonra muamelesi sonucu elde edilen comet sayıları Tablo 11' de, comet skorları ve hücre canlılığı değerleri Tablo 12 ve Şekil 17' de gösterilmiştir. Propolisin muamele protokolüne göre DNA hasarındaki % azalma Tablo 13' te verilmiştir.

Tablo 11. Propolisin uygulanma protokolüne göre elde edilen comet sayıları

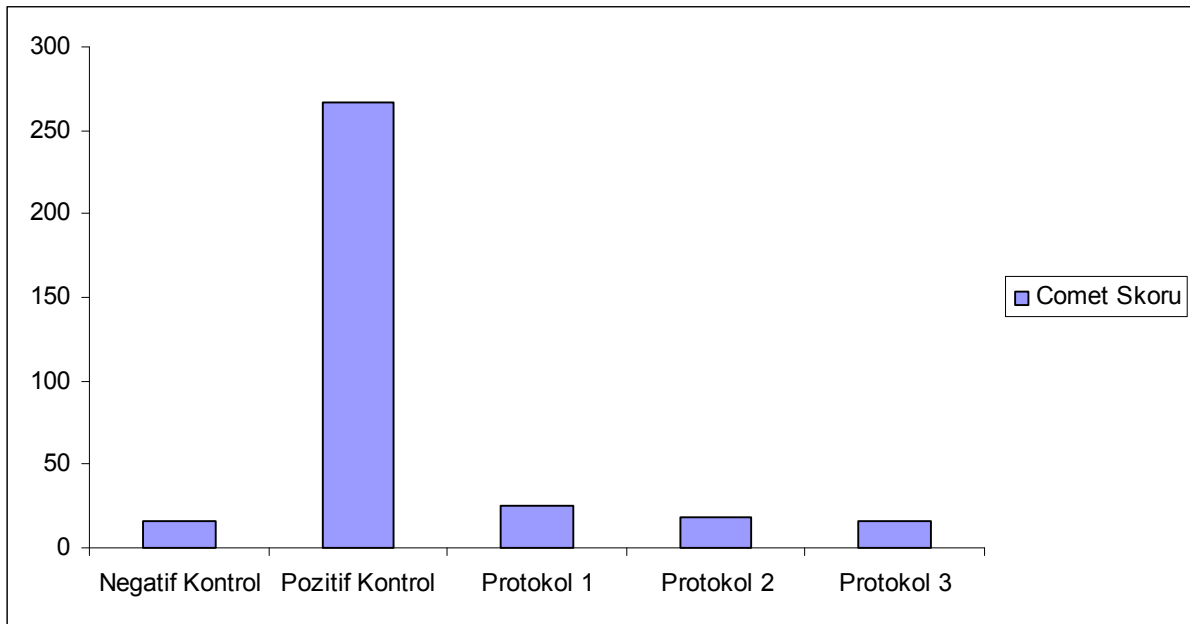
	0 (Hasarsız Hücre Sayısı) (n=3) (x ± SD)	1. Derece Hasarlı Hücre Sayısı (n=3) (x ± SD)	2. Derece Hasarlı Hücre Sayısı (n=3) (x ± SD)	3. Derece Hasarlı Hücre Sayısı (n=3) (x ± SD)
Negatif Kontrol	86.3 ± 3.2	12.3 ± 3.8	0.6 ± 0.5	0.6 ± 1.1
Pozitif Kontrol (40µM H ₂ O ₂)	5.0 ± 4.3	10.0 ± 4.6	2.0 ± 2.0	83.0 ± 7.0
Protokol I (Ön Muamele)	78.6 ± 3.0	19.0 ± 2.6	1.3 ± 1.5	1.3 ± 0.6
Protokol II (Anlık Muamele)	83.6 ± 2.9	15.0 ± 2.6	0.6 ± 0.6	0.6 ± 1.1
Protokol III (Sonradan Muamele)	84.0 ± 2.9	16.0 ± 2.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Tablo 11’ de propolisin uygulanma protokolüne göre kontrol gruplarındaki ve propolisle muamele gruplarındaki comet görüntülerinde sayılan 100 hücrenin hasar derecesine göre sınıflandırılması görülmektedir. Her üç muamele protokolünde de pozitif kontrole göre 2. ve 3. derece hasarlı hücre sayısı oldukça azalmış, hatta sonradan muamele protokolünde 2. ve 3. dereceden hücreye rastlanmamıştır. Her 3 muamele protokolünde de hasarlı hücrelerin büyük çoğunluğunu 1. derece hasarlı hücreler oluşturmaktadır. Bu comet sayılarından yola çıkılarak her grup için hesaplanan comet skoru değerleri Tablo 12’ de görülmektedir.

Tablo 12. Propolisin uygulanma protokollerine göre elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı

	Comet Skoru		Hücre Canlılığı (%)
	(n=3) (x ± SD)	p	(n=3) (x ± SD)
Negatif Kontrol	15.6 ± 1.5 ^a	0.0001	99.3 ± 1.2
Pozitif Kontrol (40 µM H ₂ O ₂)	266.3 ± 14.5		98.3 ± 1.5
Protokol I	25.6 ± 4.0 ^a	0.0001	98.0 ± 2.0
Protokol II	18.3 ± 4.0 ^a	0.0001	98.6 ± 2.3
Protokol III	16.0 ± 2.8 ^a	0.0001	99.3 ± 1.2

^a Pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p < 0.01).



Şekil 18. Propolisin uygulanma protokolüne göre comet skorları

Protokol 1: Hücrelerin 50 µg/mL' lik etanolik propolis ekstraktıyla 1 saat ve ardından 40 µM H₂O₂ ile 5 dakika muamelesi (Ön Muamele)

Protokol 2: Hücrelerin 50 µg/mL' lik etanolik propolis ekstraktıyla ve 40 µM H₂O₂ ile 1 saat muamelesi (Anlık Muamele)

Protokol 3: Hücrelerin 40 µM H₂O₂ ile 5 dakika ve ardından 50 µg/mL' lik etanolik propolis ekstraktıyla 1 saat muamelesi (Sonradan Muamele)

Protokol 1 için hesaplanan DNA hasarındaki azalma;

$$\% \text{ Azalma} = (266.3 - 25.6) / (266.3 - 15.6) = 0.96 \times 100 = \% 96$$

Protokol 2 için hesaplanan DNA hasarındaki azalma;

$$\% \text{ Azalma} = (266.3 - 18.3) / (266.3 - 15.6) = 0.9892 \times 100 = \% 98.92$$

Protokol 3 için hesaplanan DNA hasarındaki azalma;

$$\% \text{ Azalma} = (266.3 - 16) / (266.3 - 15.6) = 0.9984 \times 100 = \% 99.84$$

Tablo 13. Propolisin muamele protokolüne göre DNA hasarındaki % azalma

	% Azalma
Protokol 1	% 96
Protokol 2	% 98.92
Protokol 3	% 99.84

Propolisin uygulanma protoküne göre etkinliğinin incelendiği bu çalışmada hücre canlılığı değerlerinde anlamlı fark görülmemekle birlikte etanolik propolis ekstraktlarının her üç muamele protokolünde de H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellediği görüldü. Propolisin DNA hasarındaki azaltıcı etkisinin matematiksel ifadesi için her protokolde DNA hasarındaki % azalma hesaplandı ve elde edilen sonuçlara göre protokoller arasında DNA hasarını azaltma bakımından çok büyük fark olmamakla birlikte en iyi sonucun sonradan muamele protokolünde elde edildiği görüldü.

5. TARTIŞMA

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir (1). İnsanoğlu arı ürünlerinden biri olan propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır fakat insanlık için bu reçinemsî yapının keşfedilen yararları henüz çok az aydınlatılabilmektedir (8). Propolisin polifenoller yönünden zengin olduğu ve bu polifenollerin antioksidan, antimutajenik, tümörisidal, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar özellikler taşıdığı bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı hastalıklardan korunma ve genom kararlılığının sürdürülmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (35). Bu açıdan bakıldığında doğal ürünlerin güvenilirliği ve etkinliği, yapılacak mutajenite ve antimutajenite çalışmalarıyla ortaya konulmalıdır (31). Yaptığımız çalışmada propolisin etanolik ekstraktlarının anlık muamele protokünde en iyi iyileştirmeyi 50 µg/mL konsantrasyonda göstermekle birlikte, 30-150 µg/mL konsantrasyon aralığında, fibroblast hücre serilerinde genotoksik etki yaratmadan, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellediği görüldü.

Propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşenler; polifenolik bileşikler ve esas olarak flavonoidlerdir (35). Artık günümüzde birçok flavonoid türü ile bu tür antimutajenite ve antigenotoksisite çalışmaları yapılmaktadır. Çalışmamızda propolis içeriğinde bulunan flavonoidlerden sadece birisini izole edip çalışmak yerine, total propolis ekstraktı kullanıp hem doğal ve yöresel bir ürünümüz olan propolisin, bugüne kadar ortaya konmamış olan muhtemel antigenotoksik özelliğini ortaya koymayı hem de DNA hasarının önlenmesinde propolisin sinerjik etkisini görmeyi tercih ettik

İn vitro antigenotoksisite çalışmalarında; DNA hasarı yaratmak için, metil metansülfonat (MMS), H₂O₂, ferroz sülfat, tersiyer bütül hidroperoksit (t-BHP), formaldehit,

1,2-dimetilhidrazin, doksorubisin gibi kimyasallar kullanılmaktadır (31, 92, 95, 96, 97, 98). Çalışmamızda fibroblast hücre serilerinde oksidatif stres oluşturmak için bu kimyasallar arasından H_2O_2 ' yi seçtik. H_2O_2 , hücre membranını kolayca geçebilen ve sitoplazmada Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında enzimatik olmayan Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonlarıyla oldukça radikal özellik gösteren hidroksil radikaline dönüşebilen kendisi radikal olmayan bir moleküldür. Oluşan hidroksil radikali tek ve çift zincir kırıklarının, alkali labil bölgelerin ve çeşitli tipte okside pürin ve pirimidin bazlarının oluşumunu indükleyebilir (93).

Oksidatif strese karşı hücre direnci; hücre tipleri arasında farklılık gösterebileceği gibi aynı tipteki hücrelerde bile farklı direnç tablolarıyla karşılaşılmaktadır. Bu nedenle deneysel olarak aynı derecede hasar yaratılan hücrelerde dahi, tamamen aynı cevabın alınması beklenmemelidir. Hücrelerin aşırı H_2O_2 ' ye maruz bırakılması DNA' yı parçalara ayıracak ve oluşan parçalar comet yöntemiyle görülemeyeceği için hücreleri parçalamadan, maksimum hasar verebilecek doz seçilmelidir (94). Yapılan çalışmalarda, DNA hasarı yaratmak için kullanılan H_2O_2 konsantrasyonunun, kullanılan hücre tipine göre oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Farklı orjinli fibroblast hücre serilerinde 10-100 μM konsantrasyon aralığında H_2O_2 kullanıldığı görülmüştür (96, 99, 100, 101, 102). Bu açıdan bakıldığında yaptığımız çalışmada kullandığımız fibroblast hücre serileri için belirlediğimiz 40 μM hasarlayıcı konsantrasyonu literatürle uyumlu bir değerdir.

Genotoksisite testleri 1970' lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. *In vitro* bakteriyel reverse-mutasyon testi (Ames Testi), kromozomal hasar için *in vitro* timidin kinaz testi, *in vivo* mikronukleus testi, kromozom aberasyon testi, floresans *in situ* hibridizasyon (FISH) ve comet analizi bu yöntemler arasında sayılabilir. Bu yöntemlerden comet analizi özellikle kimyasal bileşiklerin genotoksisite üzerine etkisinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir (62, 99). Biz çalışmamızda hem çalışma prensibine uygun olması, hem de kolay, hassas, hızlı, ekonomik, güvenilir olması (85, 89) gibi diğer yöntemlere olan üstünlüklerinden dolayı comet analizini tercih ettik.

In vitro genotoksisite çalışmalarında genotoksik ajanlar tarafından yaratılan DNA hasarının engellenmesinde, propolis ve onun botanik orjinlerinin etil asetatlı ve çeşitli oranlarda hazırlanmış etanolik ekstraktları kullanılmaktadır. Bu şekilde gerçekleştirilen çalışmalarda, propolis ekstraktları ile DNA hasarının engellendiği ortaya konmuştur (4, 37, 92, 97). Biz çalışmamızda propolis etanolik ekstraktlarını kullanmayı tercih ettik ve yaptığımız

çalışmada propolis ekstraktı hazırlamada kullanılan etanolün, hücreler üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermediğini ortaya koyduk.

Propolisin antijenotoksik ve antimutajenik aktivitesinin ortaya konabilmesi için gerek *in vivo* gerekse *in vitro* pek çok çalışma yapılmıştır. Munari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yeşil propolisin ana botanik kaynaklarından biri olan *Baccharis dracunculifolia*'nın etil asetat ekstraktlarının, V79 (Chinese hamster lung fibroblast) hücre serisinde metil metansülfonat (MMS) ile indüklenmiş DNA hasarına karşı, anlık ve sonradan muamele protokollerinde koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu etkinin *Baccharis dracunculifolia*'nın polifenolik içeriğinin hem serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapması hem de DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini attırmak suretiyle ortaya çıktığını savunmuşlardır. *Baccharis dracunculifolia* ekstraktlarıyla mutajenden önce muamele protokolünde, DNA hasarında herhangi bir azalma görülmemiştir. Yine aynı çalışmada *Baccharis dracunculifolia*'nın etil asetat ekstraktlarının 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda hücreler için toksik etki gösterdiği ortaya konmuştur (92). Bizim çalışmamızda da H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif baz hasarına karşı, propolisin hangi muamele protokünde en iyi iyileştirme göstereceği ortaya konuldu. Hücrelerin 50 µg/mL'lik etanolik propolis ekstraktıyla, 40 µM H₂O₂'den önce, aynı anda ve sonradan 1 saat muamelesi sonucu elde edilen comet skorlarında pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p < 0.01). Propolisin etanolik ekstraktlarının 400 µg/mL'lik konsantrasyonda primer fibroblast hücre serisi için toksik etki gösterdiği belirlendi.

Propolisin düşük konsantrasyonlarda kimyasalların zararlı etkilerini önleyici, yüksek konsantrasyonlarda ise mutajenik etki göstermesi onun karakteristik bir janus bileşiği olmasıyla açıklanabilir. Janus bileşikleri; mutajenik iken şartlar değiştirildiğinde antimutajenik etki gösterebilen bileşiklerdir. Janus cevabın ortaya çıkmasını hücre çeşidi ile hücrelerin bu ajana maruz kaldığı konsantrasyon ve maruz kalma süresi belirler. Von Borstel ve Higgins' e göre kimyasal bileşiklerin Janus aktivite göstermesinde pek çok moleküler mekanizma görev alır. Bu genellikle hem antimutajenik sistemdeki bir enzimin spesifik indüksiyonu, hem de DNA tamir mekanizmasında görev alan enzimatik sistemlerin doyumluğu ile sağlanır. Propoliste bulunan flavonoidler de janus bileşikleri grubunda değerlendirilmektedir ve konsantrasyonlarına göre pro-oksidant ya da radikal toplayıcı olarak görev yaparak mutajenik veya antimutajenik etki gösterebilirler (4, 103, 104). De Flora' ya göre biyopolifenoller; antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerini sadece radikallerin yayılmasını engellemekle değil, aynı zamanda ortamdaki geçiş metallere şelatlayarak ve

radikal üretici reaksiyonları inhibe ederek, dolayısıyla radikal oluşumunu önleyerek gösterirler (92).

Çalışmamızda, propolisle ön muamele ve anlık muamele protokollerinde görülen iyileştirici etki onun desmutajen özelliğiyle, mutajenden sonra muamele protokünde görülen iyileşme onun biyoantimutajen özelliğinden kaynaklanıyor olabilir. Desmutajenler; mutajenler ya da onların öncülleriyle doğrudan etkileşirler, onlara geri dönüşümsüz olarak bağlanarak inaktif olmalarını, böylelikle ortamdaki biyomolekülün korunmasını sağlarlar. Biyoantimutajenler ise, DNA' nın korunmasında ve tamirindeki fizyolojik mekanizmalarda rol alırlar, mutajenik etkinin geri döndürülmesinde görev alıp, mutasyonların birikmesini engellerler (92).

Lima ve arkadaşları yaptıkları çalışmada rat kolon hücrelerinde 1,2-dimetilhidrazin ile indüklenmiş DNA hasarını, propolisin antimutajenik özelliğiyle giderdiklerini comet analizi ile ortaya koyarken, Tavares ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yeşil propolisin etanolik ekstraktlarının CHO (Chinese hamster ovary cells) hücre serisinde bir kemoterapötik ajan olan ve DNA bazları arasına interkalasyon yaparak çift zincir kırıkları oluşturan doksorubisin ile indüklenmiş kromozom hasarını 12,5 µg/mL konsantrasyonda, anlık muamele setinde önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşlardır ve bu iyileşmenin propolisteki flavonoidlerin antioksidan kapasitesine bağlı olarak radikal toplama özelliğinden ileri geldiğini öne sürmüşlerdir. Yine aynı çalışmada yeşil propolisin etanolik ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonda CHO hücre serisinde mutajenik etki gösterdiği de ortaya konmuştur (95, 97).

Gao ve arkadaşları, LNCaP (insan prostat kanser) hücre serisi üzerinde yaptıkları çalışmada bir flavonoid olan naringenin; ferroz sülfat ile yaratılan DNA hasarını engellemede baz eksizyon tamir mekanizmasında görevli olan 8-oksoguanin-DNA-glikosilaz ve DNA polimeraz beta enzimlerinin ekspresyonunu arttırmak suretiyle etki gösterdiğini ve DNA hasarını engellediğini ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada baz eksizyon tamir mekanizmasında görevli olan apürinik/apirimidinik endonükleazın (APE/Ref-1) ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmemiştir. Bunun nedeni APE/Ref-1' in mRNA ekspresyonunun stabilitesinin, DNA' ya bağlanan çok sayıda transkripsiyon faktörü için sinyal transdüksiyonunda merkezi bir rol teşkil etmesinden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır (31).

Chen ve arkadaşları NIH3T3 fare fibroblast hücre serisinde yaptıkları çalışmada *Scutellaria baicalensis* bitkisinin köklerinden izole edilen bir flavonoid olan baicalinin H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını incelemiştir. Hücrelerin 24 saatlik baicalin ile ön muamelesi sonrası 15 dakikalık H₂O₂ muamelesine karşı

baicalin ile muamele edilmeyen pozitif kontrol grubuna göre DNA hasarında anlamlı bir azalmanın olduğunu ve bunun baicalinin antioksidan özelliğinin yanı sıra DNA tamir sistemini stimüle etmesinden kaynaklandığını bildirirlerken; Lee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada propolisteki aktif komponentlerden biri olan CAPE' nin HepG2 hepatosit hücre serisinde tersiyer-bütül hidroperoksit (t-BHP) ile indüklenmiş DNA hasarını doza bağımlı olarak engellediğini comet analizi ile ortaya koymuşlardır. Bu durumu CAPE' nin iyi bir serbest radikal toplayıcı bileşik olmasıyla açıklamışlardır (96, 98).

Silva ve arkadaşları PC 12 hücre serisinde yaptıkları çalışmada polifenolik bileşiklerden luteolin, kuersetin ve rosmarinik asidin, t-BHP ve ışığa duyarlı bileşik olan Ro19-8022 ile uyarılmış DNA hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar; luteolin ve kuersetinin yüksek radikal toplayıcı özellikleri ile, rosmarinik asidin ise doğrudan DNA tamirinde görevli OGG1 enziminin ekspresyonunu arttırmak suretiyle DNA hasarını engellediklerini tespit ederlerken; Horvathova ve arkadaşları yaptıkları çalışmada K562 insan miyelojenöz lösemi hücre serisinde, aralarında yapısal farklılıklar olan flavonoid çeşitlerinden kuersetin, rutin, luteolin ve apigeninin, H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar; luteolin ve kuersetinin çok kuvvetli, rutin ise zayıf antijenotoksik etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Yine aynı çalışmada apigeninin, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellemede etkisiz olduğu ve flavonoidlerin antijenotoksik özelliklerinin yapılarıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (46, 105).

Min ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Caco-2 hücre serisinde H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarının engellenmesinde, kuersetinin muhtemel etki mekanizmasını araştırmışlar ve kuersetinin, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını hem radikal toplayıcı özelliğiyle hem de DNA tamir enzimlerinden hOGG1 ekspresyonunu modüle etmek suretiyle DNA tamir kapasitesini arttırarak ortaya koyduğunu bildirmişlerdir (106).

Delgado ve arkadaşları HepG2 insan hepatoma hücre serisinde N-nitrozodibütülamın (NDBA) ve N-nitrosopiperidin (NPIP) ile indüklenmiş DNA hasarının giderilmesinde mirisetin, kuersetin, (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin etkinliğini incelemişlerdir. Bu flavonoidlerden; (+)-kateşin ve (-)-epikateşinin hem NDBA hem de NPIP kaynaklı, mirisetinin sadece NDBA kaynaklı ve kuersetinin ise sadece NPIP kaynaklı DNA hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu farklılığı; flavonoidlerin halka yapılarındaki hidroksil gruplarının, farklı yerleşiminden kaynaklandığına bağlamışlardır. Dolayısıyla flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinin, kimyasal yapılarıyla yakın ilişki içerisinde olduğunu bildirmişlerdir (107).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda propolisin flavonoid ve polifenolik içeriğine bağlı olarak gösterdiği biyolojik etkilere paralel olarak çalışmamızda Trabzon yöresinden temin edilen propolisin etanolik ekstraktlarını kullanarak, fibroblast hücre serisindeki H₂O₂ kaynaklı DNA hasarınının engellendiğini ortaya koyduk. Yöremiz propolisinin gösterdiği bu antigenotoksik aktivitenin, onun yüksek oranda flavonoid türevleri içermesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Propolis ilavesinden sonra görülen, DNA yapısındaki iyileşme şu muhtemel mekanizmalarla açıklanabilir: Propolis ve onun polifenolik içeriği; ortamdaki geçiş metallerini bağlayarak, oluşması muhtemel Fenton reaksiyonunu engelleyerek DNA' yı korumuş olabilir. Propolis ve onun flavonoid içeriği enzimatik olmayan tamir mekanizmasına hizmet ederek DNA' yı olası hidrate elektron ataklarından koruyor olabilir. Özellikle anlık ve önceden muamele protokollerinde görülen iyileşme bu mekanizmalar üzerinden ilerlemiş olabilir. Propolis ve onun flavonoid içeriğinin 8-oxoguanin DNA glikosilaz 1, apürinik/apirimidinik endonükleaz ve DNA polimeraz beta gibi DNA tamir enzimlerinin indüklenmesini sağlaması da olasıdır. Sonradan muamele protokünde görülen iyileşme, muhtemelen DNA tamir enzimlerinin gerek aktivitelerinin gerekse ekspresyon seviyelerinin artırılması yoluyla gerçekleşmektedir. Flavonoidlerin; hemoksijenaz-1, mitokondrial süperoksit dismutaz ve γ -glutamil sisteinil sentetazın regülatör alt biriminin antioksidan etkilerini arttırdığı da çalışmalarla ortaya konmuştur (37).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Çalışmada kullanılan fibroblast hücre serisinde yüksek ölüm oranı yaratmadan maksimum DNA hasarı oluşturacak H₂O₂ konsantrasyonu 40 µM, bu konsantrasyondaki H₂O₂ ile uygun muamele süresi 5 dakika olarak bulundu.
2. %20' lik etanole maruz kalan hücrelerin, kontrol grubuna göre hücre canlılığı ve comet skorları değerlerinde anlamlı fark görülmedi (p > 0.05).
3. Hücrelerde toksik etki yaratmadan, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek propolis konsantrasyonları 50-60-80 µg/mL olarak bulundu. Bu konsantrasyonlar içinden hücrelerde ekstra yük oluşturmayacak en düşük konsantrasyon olan 50 µg/mL seçildi ve çalışma bu konsantrasyondaki etanolik propolis ekstraktıyla sürdürüldü. 400 µg/mL propolis konsantrasyonunun fibroblast hücre serisi için toksik doz olduğu ortaya konuldu.
4. Fibroblast hücrelerinin 50 µg/mL' lik etanolik propolis ekstraktıyla, 40 µM H₂O₂ den önce, aynı anda ve sonradan 1 saat muamelesi sonucu elde edilen comet skorları ve hücre canlılığı değerlerinde pozitif kontrole göre anlamlı fark görüldü (p < 0.01).
5. Hücrelerin, 50 µg/mL etanolik propolis ekstraktıyla; genotoksik ajandan önce, genotoksik ajanla aynı anda ve genotoksik ajandan sonra muamelesi sonucu DNA hasarındaki % azalma sırasıyla; % 96, % 98.92 ve % 99.84 olarak saptandı.

6.2. Öneriler

1. Bu çalışma farklı çözücülerde hazırlanmış propolis ekstraktlarıyla, farklı hücre serilerinde de yapılabilir.

2. Propolisi çözümede kullanılan farklı çözücüler, farklı molekülleri ekstrakte edeceği için, kullanılan ekstraktın, kalitatif ve kantitatif içeriği HPLC ve GC-MS gibi ileri kromatografik yöntemlerle ortaya konabilir.
3. Bu şekilde yapılacak propolis karakterizasyonu ile propolisin antigenotoksik etkisini hangi etken bileşiklerle yaptığı, literatür karşılaştırması ile ortaya konabilir.
4. Propolisin desmutajen özelliğinin ortaya konması için, H₂O₂ ile muamele öncesi propolise maruz bırakılan grup ile negatif ve pozitif kontrol grubunda ortamdaki metal iyonu konsantrasyonu ölçülerek, bu etkide propolisin metal şelatörü özelliğinin rolü değerlendirilebilir.
5. Propolisin endojen antioksidan sistemde görevli enzimlerin (katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz gibi) aktivitesi üzerinden etki gösterip göstermediği, bu enzimlerin aktivitesi ölçülerek ortaya konabilir.
6. Hücrelerin bulunduğu ortamda total antioksidan ve total oksidan kapasite ölçülerek, propolis ilave edilen grupta antioksidan ve oksidan kapasitenin değişimi incelenebilir.
7. Propolisin biyoantimutajen özelliğinin ortaya konması için H₂O₂ ile muamele sonrası propolise maruz bırakılan grup ile negatif ve pozitif kontrol grubu arasında RT-PCR ile DNA tamir enzimlerinin ekspresyonuna bakılabilir.
8. Deneysel hayvan çalışmaları ile propolisin aynı etkileri *in vivo* koşullarda gerçekleştirip gerçekleştirmediği incelenebilir.

7. ÖZET

Propolis, polifenolik bileşikler ve flavonoidler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre kompozisyonu değişebilen, antibakteriyel, antitümöral, antiinflamatuvar, antioksidatif, antimutajenik ve diğer faydalı aktiviteleri ile doğal bir ilaç olarak kullanılan önemli bir arı ürünüdür. Propolisin biyolojik etkisi, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir. Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması, oksidatif DNA hasarı oluşumuna yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da; tek ve çift zincir kırıkları, alkali labil bölgeler, baz modifikasyonları ve şeker-fosfat omurga hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Günümüzde genotoksisite çalışmalarında birçok yöntem kullanılmakla birlikte; basit, ucuz ve tekrarlanabilir bir metot olan comet analizi diğer yöntemlerden bir adım öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, fibroblast hücre serileri kullanılarak Trabzon propolisinin etanolik ekstraktlarının 50 µg/mL' lik konsantrasyonda, H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı üzerine etkisi comet analizi ile incelendi. Hücrelerin, 50 µg/mL etanolik propolis ekstraktıyla; genotoksik ajandan önce, genotoksik ajanla aynı anda ve genotoksik ajandan sonra muamelesi sonucu DNA hasarındaki % azalma sırasıyla; % 96, % 98.92 ve % 99.84 olarak saptandı. Sonuç olarak propolisin etanolik ekstraktlarının; fibroblast hücre serilerinde, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engellediği ve antigenotoksik aktiviteye sahip olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Propolis, DNA comet analizi, Genotoksisite, Antigenotoksisite, Primer fibroblast hücre serileri.

8. SUMMARY

Investigation of effect of propolis extract on H₂O₂-induced DNA damage in fibroblast cell lines by comet assay

Propolis is an important bee product, rich of polyphenolic compounds and flavonoids, it has antibacterial, antitumoral, antienflamatuar, antioxidative, antimutagenic properties and changeable composition according to climate and geography of harvest region, and is used as a natural drug with other useful activites. Biological effect of propolis is predominantly attributed to its content of flavonoids. Increased reactive oxygen species, decreased antioxidant enzyme levels and/or defects in DNA repair mechanisms result in oxidative DNA damage. As a result of oxidative damage, single or double strand breaks, alkali-labile sites, base modifications and sugar-phosphate backbone damage can occur or cross-links between DNA and proteins may form. However many methods have been used in genotoxicity studies, comet analysis, a cheap, simple and repeatable method, steps forward other techniques. In the recent study the effect of ethanolic extracts of Trabzon propolis at the concentration of 50 µg/mL to H₂O₂-induced DNA damage was investigated in fibroblast cell lines using comet analysis. Cells were treated with 50 µg/mL ethanolic extracts of propolis before, simultaneous and after the genotoxic agent and the % decline of DNA damage was determined as % 96, % 98.92, % 99.84, respectively. It was concluded that ethanolic extracts of propolis prevent H₂O₂-induced DNA damage in fibroblast cell lines and might have antigenotoxic activity.

Key Words: Propolis, Comet assay, Genotoxicity, Antigenotoxicity, Primary fibroblast cell lines.

9. KAYNAKLAR

1. Hamdy, M.H., El Bandy, M.A., Khakifa, K.I., Gad, E.M., Hassanein, E.M.: The antimicrobial effect of honey in the management of septic wounds. Forut International Conferance of Apiculture in Tronical Climates, Cairo, International Bee Research Association, London, 1989, pp. 61-67.
2. Zumla, A. and Lulat, A. : Honey-a remedy rediscovered. Journal of the Royal Society of Medicine, 82: 384-385, 1989.
3. Kumazawa, S., Hayashi, K., Kajiya, K., Ishii, T., Hamasaka, T., Nakayama, T.: Studies of the constituents of Uruguay propolis. Agricultural and Food Chemistry, 50: 4777-4782, 2002.
4. Pereira, A.D., de Andrade, S.F., de Oliveira Swerts, M.S., Maistro, E.L.: First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. Food and Chemical Toxicology, 46: 2580-2584, 2008.
5. Öztürk, F., Kurt, E., İnan, Ü.Ü., Emiroğlu, L., İlker, S.S., Sobaci, G.: Effects of propolis on endotoxin-induced uveitis in rabbits. Japanese Journal of Ophthalmology, 43: 285-289, 1999.
6. Freshney, R.I.: Culture of animal cells. A manuel of basic technique, Wiley- Liss fourth edition, 2000, p. 1-8.
7. 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: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206-221, 2000.
8. Ghisalberti, E.L.: Propolis: a review. Bee World, 60: 59-84, 1979.
9. Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., Bruni, A.: Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. Phytotherapy Research, 10(4): 335-336, 1996.
10. Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguilar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y.: Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1100-1103, 2004.

11. Costa, C.C. and Pereina, R.G.: The influence of propolis on the rheological behaviour of pure honey. *Food Chemistry*, 76: 417-421, 2002.
12. Burdock, G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363, 1998.
13. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73, 2002.
14. Marcucci, M.C., Rodriguez, J., Ferreres, F., Bankova, V., Groto, R., Popov, S.: Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo State. *Zeitschrift für Naturforschung*, 53: 117-119, 1998.
15. Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci, M.C.: Propolis; recent advantages in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15, 2000.
16. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R.: The composition and plant origins of propolis: A report of work at Oxford. *Bee World*, 71(3); 107-118, 1990.
17. Bonvehi, J. and Coll, V.: Study on propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift für Naturforsch*, 55: 778-784, 2000.
18. Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M., Tsvetkova, I., Kujungiev, A.: Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforsch*, 55: 785-789, 2000.
19. Park, J. S. and Woo, K.S.: The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds.) New York Plenum Press, 1997, pp. 121-124.
20. Rodriguez, E.G., Abellan, G.B., Villanueva, M.T.: Macroelements in dietetic products containing propolis. *Food Chemistry*, 66: 15-19, 1999.
21. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Andyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S.: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, Netherlands and Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 239-246, 2000.
22. Woo, K.S. and Park, J.S.: Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds) New York Plenum Pres, 1997, pp. 125-128.
23. Çolak, M.: Arı poleni ve propolisin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
24. Campos, M.G., Cunha, A., Markham, K.R.: Bee products chemical composition and application. In *Bee-Pollen composition, Properties and Applications*. Mizrahi, A. and Lensky, Y.(Eds), New York Plenum Press, 1997, pp. 93-100.

25. Çolak, M.: Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
26. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235-240, 1999.
27. Duran, G.G.: *In vitro* koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leyişmanyasidal etkilerinin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Hatay, 2007.
28. Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S.: Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19: 1479-1484, 1996.
29. Lairon, D. and Amiot, M.J.: Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology*, 10: 23-28, 1999.
30. Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B.: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213-217, 2002.
31. Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seram, N.P., Xu, A., Heber, D.: The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 89-95, 2006.
32. Pietta, P.G.: Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042, 2000.
33. Heo, M.Y., Sohn, S.J., Au, W.W.: Antigenotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, 448: 135-150, 2001.
34. Metodiewa, D., Kochman, A., Karolczak, S.: Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N- diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41: 1067-1075, 1997.
35. Ferguson LR.: Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89-111, 2001.
36. Eser, B.: Ratlarda metotreksatın yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, 2009.
37. Benkovic, V., Orsolc, N., Knezevic, A., 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: 167-172, 2008.

38. Benguedouar, L., Boussenane, H.N., Wided, K., Alyane, M., Rouibah, H., Lahouel, M.: Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46: 112-119, 2008.
39. Kismet, K., Sabuncuoglu, M.Z., Kilicoglu, S.S., Kilicoglu, B., Devrim, E., Erel, S., Sunay, A.E., Erdemli, E., Durak, I., Akkus, M.A.: Effect of propolis on oxidative stress and histomorphology of liver tissue in experimental obstructive jaundice. *European Surgical Research*, 41: 231-237, 2008.
40. Fischer, G., Leite, F.P., Conceicao, F.R., Dummer, L.A., Vargas, G.D., Hübner Sde, O., Dellagostin, O.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vidor, T.: Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25: 1250-1256, 2007.
41. Trusehva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci M.C., Miorin, P.L., Pasin, F.R., Tsvetkova, I.: Bioactive constituents of Brazilian red propolis. Evidence based *Complementary and Alternative Medicine*, 3: 249-254, 2006.
42. Gregory, S.R., Piccolo, N., Piccolo, M.T., Piccolo, M.S., Heggers, J.P.: Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8: 77-83, 2002.
43. Aliyazıcıoğlu, Y., Değer O., Ovalı, E., Barlak, Y., Hoşver, I., Tekelioğlu, Y., Karahan, S.C.: Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology*, 5: 1652-1657, 2005.
44. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
45. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomiğine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
46. Silva, J.P., Gomes, A.C., Coutinho O.P.: Oxidative damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601: 50-60, 2008.
47. Dinçer, Y. ve Akçay T.: DNA Hasarı. *Türk Biyokimiya Dergisi* 25(2): 73-79, 2000.
48. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*, 23(3): 1396-1397, 1984.
49. Hochstein, P. and Atallah, A.S.: The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutation Research*, 202(5): 363-375, 1988.

50. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T.: Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(6): 526-545, 1987.
51. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB Journal*, 1: 358-364, 1987.
52. Toka, D.: Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri, Hacettepe Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
53. Halliwell B.: Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265, 1994.
54. Halliwell B.: Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91: 14-22, 1991.
55. Southorn, P. and Powis, G.: Free radical in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, 63(3): 381-388, 1988.
56. Özden S.: Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması, İstanbul Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2006.
57. Dizdaroglu M.: Mechanisms of oxidative DNA damage; lesion and their measurement. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 302: 67-87, 1999.
58. Brent, J.A. and Rumack, H.H.: Role of free radicals in toxic hepatic injury I. free radical chemistry. *Journal of Clinical Toxicology*, 49(4): 481-493, 1993.
59. Dizdaroglu M.: Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Journal of Free Radical Biology & Medicine*, 61(3): 225-242, 1993.
60. Akyol, M.A.: Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Afyonkarahisar, 2007.
61. Cohen, M.V.: Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: Is this the time for clinical trials? *Annals of Internal Medicine*, 111: 918-931, 1989.
62. Bilgici, B.: Behçet hastalığında genotoksisite, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Samsun, 2005.
63. Allen, R.G. and Tresini, M.: Oxidative stres and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 463-499, 2000.
64. Dizdaroglu M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research*, 275(35): 331-342, 1992.
65. Abraham, R.T.: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 2: 225-231, 2001.

66. Collins, A.R. and Horvathova, E.: Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: Applications of the comet assay. *Biochemical Society Transaction*, 29: 337-341, 2001.
67. Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Attardi, S.G.: Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region on replication. *Science*, 286(5440): 774-779, 1999.
68. Sorg, O.: Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662, 2004.
69. Randerath, K., Zhou, G.D., Monk, S.A., Randerath, E.: Enhanced levels in neonatal rat liver of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis*, 18: 1419-1421, 1997.
70. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J.: Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17: 1195-1214, 2003.
71. Evans, M.D. and Cooke, M.S.: Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, 26: 533-542, 2004.
72. Milligan, J.R. and Ward, J.F.: Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiation Research*, 137: 295-299, 1994.
73. Halliwell, B. and Aruoma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19, 1991.
74. Winyard, P.G., Perrett, D., Blake, D.R., Haris, G., Chipman, J.K.: Measurement of DNA oxidation products. *Analytical Proceedings Articles*, 27: 224-227, 1990.
75. Halliwell, B.: Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*, 443: 37-52, 1999.
76. Halliwell, B.: Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutrition Reviews*, 57: 104-113, 1999.
77. Lee, I.M.: Antioxidant vitamins in the prevention of cancer. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111: 10-15, 1999.
78. Breinholt, V.M., Molck, A.M., Svendsen, G.W., Daneshvar, B., Vinggaard, A.M., Poulsen, M., Dragsted, L.O.: Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazole (4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food Chemical Toxicology*, 41: 1315-1323, 2003.
79. Halliwell, B.: Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews*, 55: 44-49, 1997.

80. Azqueta, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R.: DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*, 674: 101-108, 2009.
81. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.: A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191, 1988.
82. Tice, R.R., Andrews, P.W., Singh, N.P.: The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science*, 53: 291-301, 1990.
83. Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E.: Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiation Research*, 122: 86-94, 1990.
84. Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Catherine, C.S., Stetina, R.: The Comet Assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23, 3: 143-151, 2008.
85. Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinka, M., Kennedy, G., Stetina, R.: The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research*, 375, 183-193, 1997.
86. Collins, A.R., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslova, K., Vaughan, N.: Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146, 1997.
87. Lee, R.F. and Steinert, S.: Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64, 2003.
88. Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Sundermann, V.M.: The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566: 209-229, 2004.
89. Hartmann, A., Agurell, A., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A.R., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R.: Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18(1): 45-51, 2003.
90. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O' Neill, K.L.: The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59, 1995.
91. Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Awadhesh, N.J.: Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 53-64, 2007.
92. Munari, C.C., Alves, J.M., Bastos, J.K., Tavares, D.C.: Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 30(1): 22-28, 2009.

93. Joenge, H.: Genetic toxicology of oxygen. *Mutation Research*, 219: 193-208, 1989.
94. Panayiotidis, M., Tsolas, O., Galaris, D.: Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca⁺²-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 548-556, 1999.
95. Lima, R.O.A., Bazo, A.P., Said, R.A., Sforcin, J.M., Bankova, V., Darros, B.R., Salvadori, D.M.F.: Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 8-16, 2005;
96. Chen, X., Nishida, H., Konishi, T.: Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H₂O₂ in cultured NIH3T3 fibroblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26: 282-284, 2003.
97. Tavares, D.C., Barcelos, G.R.M., Silva, L.F., Tonin, C.C.C.T., Bastos, J.K.: Propolis induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*, 20: 1154-1158, 2006.
98. 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: 2445-2450, 2008;
99. Riberio, D.A., Carlin, V., Fracalossi, A.C.C., Oyama, L.M.: Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: An *in vitro* study. *International Endodontic Journal*, 42: 987-991, 2009.
100. Shirai, M., Yamanishi, Y., Moon, J.H., Murota, K., Terao, J.: Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(5): 1015-1021, 2002.
101. Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T., Ouchi, Y.: Hydrogen peroxide induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: Protective roles of glutathione. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 79: 33-40, 1999.
102. Lim, C.K., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R.: Protection against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in Friedreich's Ataxia fibroblasts using novel iron chelators of the 2-pyridylcarboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class. *Molecular Pharmacology*, 74: 225-235, 2008.
103. Von Borstel, R.C. and Higgins, J.A.: Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 402: 321-329, 1998.

104. Munari, C.C., Resende, F.A., Alves, J.M., de Sousa, J.P.B., 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: 1363-1367, 2008.
105. Horvathova, K., Novotny, L., Tothova, D., Vachalkova, A.: Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, 51: 395-399, 2004.
106. Min, K. and Ebeler, S.E.: Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2716-2722, 2009.
107. Delgado, M.E., Haza, A.I., Garcia, A., Morales, P.: Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*, 23: 1292-1297, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Selim DEMİR, 1983 yılında Rize’ de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rize’ de tamamladı. 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’ nden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’ nda başlamış olduğu yüksek lisans çalışmalarını bu bitirme tezi ile sonuçlandırmaktadır.