



**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO*
SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF
ETKİLERİ**

Selçuk ÇEKER

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Güleray AĞAR

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO*
SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF
ETKİLERİ

Selçuk ÇEKER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO* SİTOTOKSİK GENOTOKSİK VE
OKSİDATİF ETKİLERİ**

Prof. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Selçuk ÇEKER tarafından hazırlanan bu çalışma 18 / 03 / 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Esen TAŞĞIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 24/03/2016 tarih ve 13/30 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO* SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF ETKİLERİ

Selçuk ÇEKER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Bitkilerden elde edilen, özellikle fenolik yapıdaki kimyasal maddeler, antioksidan özellikleri sayesinde reaktif oksijen türlerini inaktive ederek oksidatif hasarın önlenmesinde ve giderilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Buna karşın günümüzde, bitkisel ürünlerin çoğunun yapıları ve biyolojik etkinlikleri yeterince aydınlatılmamış olup, birçok bitkisel antioksidan maddenin toksisitesi ve insan sağlığına olan zararlarına dair çalışmalar da mevcuttur. Mevcut bu tez çalışmasında, diyetimizdeki birçok gıdada bulunan fenolik bileşiklerden; Apigenin, Baicalin, Ellajik Asit, Luteolin, Naringenin ve Tannik Asit'in, *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve oksidatif etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Fenolik bileşiklerimizin, insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) üzerine sitotoksik etkileri, laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı ve hücre proliferasyon (WST-1) yöntemleriyle; insan lenfosit hücrelerinde karbon tetraklorüre (CCL4) karşı oksidatif özellikleri katalaz, süperoksit dismutaz ve malondialdehit ölçümleriyle, genotoksik etkileri ise tek hücre jel elektroforez (Komet) ve mikroçekirdek (MÇ) yöntemleriyle araştırıldı. Çalışmalarımız sonucunda Apigenin, Baicalin ve Luteolin'in antigenotoksik ve antioksidan özellikte oldukları, sitotoksik etki sergilemedikleri gözlenmiş, en etkili konsantrasyonlar ise; Apigenin ve Baicalin için 100 µM, Luteolin için 200 µM olarak belirlenmiştir. Ellajik asit, Naringenin ve Tannik Asit ise, özellikle yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 200 µM), sitotoksik ve genotoksik özellik göstermişlerdir. Antigenotoksik ve antioksidan etkileri açısından en etkili sonuçlar ise; Ellajik Asit, Naringenin ve Tannik Asit için sırasıyla 12.5 µM, 8 µM ve 4 µM'lık konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Sonuç olarak, belirli konsantrasyonlarda, antioksidan ve antigenotoksik özellik sergileyen fenolik bileşiklerimizin optimum doz ve sürede kullanılmalarıyla birçok hastalığın tedavisinde klinik açıdan yararlı olabilecekleri düşünülmektedir.

2016, 119 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apigenin, Baicalin, Ellajik Asit, Naringenin, Tannik Asit, Sitotoksisite, Genotoksisite, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IN VITRO CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND OXIDATIVE EFFECTS OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS

Selçuk ÇEKER

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Güleray AĞAR

Particularly the chemicals in phenolic structure obtained from plants play an important role in preventing and eliminating the oxidative damage by inactivating the reactive oxygen species due to their antioxidant properties. However, today the structures of most herbal products and their biological activities have not been illuminated adequately; studies on the toxicity of the many herbal antioxidants and damage to human health are also available. In this thesis, it is aimed at the investigation of *in vitro* cytotoxic, genotoxic and oxidative effects of some phenolic compounds such as Apigenin, Baicalin, Ellagic acid, Luteolin, Naringenin and Tannic Acid, which are found in many foods in our diet. The cytotoxic effects of phenolic compounds on human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were analysed with the lactate dehydrogenase (LDH) release and cell proliferation (WST-1) methods; in human lymphocytes the oxidative properties against carbon tetrachloride (CCL₄) were examined with the measurement of catalase, superoxide dismutase and malondialdehyde; genotoxic effects were investigated with single cell gel electrophoresis (Comet) and micronuclei (MN) methods. As a result of the study, Apigenin, Baicalin and Luteolin were observed to have antigenotoxic and antioxidant properties but not to have cytotoxic effects; the most effective concentrations were determined as 100 µM for Apigenin and Baicalin, 200 µM for Luteolin. Ellagic Acid, Naringenin and Tannic Acid revealed cytotoxic and genotoxic properties especially at high concentrations (100 and 200 µM). The most effective results in terms of antigenotoxic and antioxidant effects for Ellagic acid, Naringenin and Tannic acid were observed respectively in 12.5, 8 and 4 µM concentrations. As a result, at certain concentrations, the use of phenolic compounds showing antioxidant and antigenotoxic properties at optimal dose and duration, they are thought to be clinically useful in the treatment of many diseases.

2016, 119 pages

Keywords: Apigenin, Baicalin, Ellagic Acid, Luteolin, Naringenin, Tannic Acid, Cytotoxicity, Genotoxicity, Oxidative Stress

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren, engin bilgi, tecrübe ve hoşgörülerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a saygı ve şükranlarımı arz ederim.

Bilgi ve deneyimleri ile tezime katkı sağlayan, tez izleme komitesindeki hocalarım Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ ile Sayın Doç. Dr. Turgay şİşMAN'a; tezimin hazırlanma sürecinde fikirlerinden yararlandığım ve bazı analizlerin yapılmasında katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Lokman ALPSOY ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince samimi ve güler yüzlü tutumlarıyla bana yardımcı olan, ekip ruhuyla hareket eden, aynı çalışma ortamını paylaşmakla mutlu olduğum Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına müteşekkirim.

Uzun soluklu, zorlu bir süreç olan doktora öğrenimim boyunca kendilerinden görmüş olduğum destek ve güvenden dolayı sevgili aileme minnettarım.

Selçuk ÇEKER

Mart, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELER.....	12
2.1. Test Edilen Fenolik Bileşikler.....	12
2.1.1. Apigenin (AP).....	12
2.1.2. Baicalin (BA).....	14
2.1.3. Ellajik Asit (EA).....	16
2.1.4. Luteolin (LU).....	18
2.1.5. Naringenin (NA).....	20
2.1.6. Tannik Asit (TA).....	23
2.2. Karbon Tetraklorür (CCl ₄).....	24
2.3. Antioksidanlar.....	27
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	28
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	29
2.4. Kullanılan Yöntemler.....	30
2.4.1. RTCA– SP (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) Sistemi.....	30
2.4.2. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Salınımı Yöntemi.....	32
2.4.3. WST-1 Yöntemi.....	33
2.4.4. Komet Yöntemi.....	34
2.4.5. Mikroçekirdek Yöntemi.....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	40
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	41

3.2. Yöntem	43
3.2.1. Sitotoksisite Testleri	43
3.2.1.a. Hücre Kültürleri	43
3.2.1.b. Fenolik Bileşiklerin Eklenmesi	43
3.2.1.c. RTCA – SP (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi).....	44
3.2.1.d. WST-1 Analizi	44
3.2.1.e. LDH Analizi	45
3.2.2. Genotoksisite Testleri.....	46
3.2.2.a. Komet Yöntemi	46
3.2.2.b. Mikroçekirdek Yöntemi	51
3.2.3. Biyokimyasal analizler	54
3.2.3.a. Katalaz (KAT) aktivitesi ölçümü	54
3.2.3.b. Superoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü	55
3.2.3.c. Malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçümü.....	55
3.2.4. İstatistiksel değerlendirme.....	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1. LHD ve WST -1 Bulguları	57
4.2. Mikroçekirdek (MÇ) Bulguları	63
4.3. Komet Bulguları	68
4.4. Biyokimyasal Analizler	75
4.4.1. KAT, SOD ve MDA bulguları	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	80
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	120

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AP	Apigenin [4',5,7-trihydroxyflavone]
BA	Baicalin [7-D-Glucuronic acid-5,6-dihydroxyflavone]
BisGMA	Bisfenol-A-Glycidylmethacrylate
BSA	Sığır Serum Albümini
Ca	Kalsiyum
CCL ₄	Karbon Tetraklorür
Caco-2	Kolon Kanseri Hücreleri
Cd	Kadmiyum
CHCl ₂	Diklorometil
COX-2	Siklooksijenaz-2
Cu	Bakır
CuCl ₂	Bakır(II)klorür
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EA	Ellajik Asit[2,3,7,8-tetrahydroxybenzopyrano (5,4,3-cde) benzopyran-5-10-dione]
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FB	Fenolik Bileşik
FBS	Fetal Sığır Serumumu
Fe	Demir
g	Gravite
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-Transferaz
HaCaT	İnsan Keratinosit Hücre Hattı
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Damar Endotel Hücreleri
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
İnos	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

KA	Kromozomal Anormallikler
KAT	Katalaz
KCl	Potasyumklorür
KH ₂ PO ₄	Potasyumfosfat Monobazik
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LMA	Düşük Kaynama Dereceli Agar
LPO	Lipid Peroksidasyonu
LU	Luteolin [3', 4', 5,7-tetrahidroksiflavon]
M	Molarite
Ma	Miliamper
MÇ	Mikroçekirdek
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
NA	Naringenin [4',5,7-Trihydroxyflavanone]
Na ⁺	Sodyum
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NaOH	Sodyum Hidroksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NBT	Nitrotetrazolium Blue klorür
nm	Nanometre
NMA	Normal Kaynama Dereceli Agar
NO	Nitrik Oksit
OH	Hidroksil
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
Pb	Kurşun
PBS	Fosfat Tamponu
PHA	Fitohemaglutinin
PS	Penisilin + Streptomisin

ROS	Radikal Oksijen Süpürücü
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RTCA-SP	Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
SOD	Süperoksit Dismutaz
TA	Tannik Asit [C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆]
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör
t-BHP	Tert Butil Hidroperoksit
V79	Çin Hamster Fibroblast Hücreleri
WST-1	Water Soluble Tetrazolium
UV	Ultraviyole Işınları
UVB	Ultraviyole B
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
μ mol/L	Litre Başına Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. AP'ın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu.....	14
Şekil 2.2. BA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	16
Şekil 2.3. EA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	18
Şekil 2.4. LU'nun kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	20
Şekil 2.5. NA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	22
Şekil 2.6. TA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	24
Şekil 2.7. CCl ₄ 'ün kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu	26
Şekil 2.8. Antioksidanların Sınıflandırılması	28
Şekil 2.9. RTCA SP [®] sistemi	30
Şekil 2.10. Empedansa dayalı hücre canlılığı ve hareketliliği ölçümü	31
Şekil 2.11. LDH salınımı yöntemi prensibi	33
Şekil 2.12. WST-1 tuzunun formazana dönüştürülmesi	34
Şekil 2.13. Komet yönteminin basamakları	35
Şekil 2.14. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MÇ'ler	37
Şekil 2.15. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MÇ içeren binükleat hücrenin oluşumu	38
Şekil 3.1. Görsel skorlama tekniği ile hücrelerin sınıflandırılması	51
Şekil 4.1. AP'ın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri.....	58
Şekil 4.2. BA'nın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri	59
Şekil 4.3. EA'nın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.4. LU'nun sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri.....	61
Şekil 4.5. NA'nın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri	62
Şekil 4.6. TA'nın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri.....	63
Şekil 4.7. Mikroçekirdek içeren hücreler	64
Şekil 4.8. BA uygulandığında gözlemlenen Kometler	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi	40
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi	42
Çizelge 4.1. AP uygulandığında belirlenen MÇ frekansları	64
Çizelge 4.2. BA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları.....	65
Çizelge 4.3. EA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları.....	66
Çizelge 4.4. LU uygulandığında belirlenen MÇ frekansları.....	67
Çizelge 4.5. NA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları	67
Çizelge 4.6. TA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları.....	68
Çizelge 4.7. AP uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri.....	69
Çizelge 4.8. BA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri	70
Çizelge 4.9. EA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri.....	72
Çizelge 4.10. LU uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri.....	73
Çizelge 4.11. NA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri	74
Çizelge 4.12. TA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri.....	75
Çizelge 4.13. AP'ın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri	76
Çizelge 4.14. BA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri.....	77
Çizelge 4.15. EA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri.....	77
Çizelge 4.16. LU'nun KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri.....	78
Çizelge 4.17. NA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri	79
Çizelge 4.18. TA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri.....	79

1. GİRİŞ

Günümüzde farklı hastalıkların tedavisinde bitkisel ürün ve bitkisel kaynaklı etken maddelerin “Doğadan gelenin zararlı olmadığı” düşüncesi ile bilinçsiz kullanımı artmaktadır. Özellikle kronik hastalığı olan insanlar modern tıbbın dışında farklı tedavi yolları aramaya başlamıştır. İnsanlar modern tıpta bulamadığı şifayı alternatif tıpta aramaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) insanların %80'inin doğal tedaviye inandığını açıklaması bu durumun iyi bir göstergesidir (Sasidharan *et al.* 2010). Ancak burada temel sorun milyonlarca insanın bitkilere bu kadar rahatça güvenmesidir. Bu güven sonucu bitkilerin bilinçsiz ve yaygın kullanımı toplum sağlığını tehlikeye atacak pek çok soruna yol açabilir. Bitkisel ürünler doğal oldukları için sıklıkla güvenli olarak algılanır. Oysa doğal olan her zaman güvenli olan demek değildir. Örneğin, akrep zehiri de doğaldır, ama zehirlidir. Bu nedenle modern tıpçılar, alternatif tıp tedavisinde kullanılan bitkilerin yan etkilerinin tam olarak araştırılmamış olmasından dolayı alternatif tıpi kabul etmemektedir (Maroyi 2011).

Aslında modern tıbbın bugünkü seviyeye ulaşmasında, eski çağlardan beri kullanılan alternatif tıbbın katkısı fazladır. Alternatif tıpta hekimler, hastalarına muayeneden sonra tedavi amaçlı olarak faydasının olacağını düşündükleri bitkileri ve suları öneriyorlardı. İnsanoğlunun bilgi ve deneyimi arttıkça, yeni teşhis araçlarının da (mikroskop, radyografi, manyetik rezonans, tomografi, elektron mikroskopisi, biopsi, kan, dışkı ve idrar tahlilleri vb.) yardımıyla hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler daha kapsamlı olacak şekilde geliştirildi (Sarışen ve Çalışkan 2005). Hastaya herhangi bir bitki yaprağı vermek yerine, yaprak içerisinde hastalığa iyi geldiği düşünülen etken madde damıtılıp ilaç haline getirildi. Etken maddelerin insan dokularında iyileşmeyi nasıl sağladığı araştırılıp, etken maddeden farklı, daha az yan etkisi olan ilaçlar sentezlendi (Sarışen ve Çalışkan 2005). Kimya ve biyokimya bilimlerindeki çalışmalar ilaç üretimine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuvarlarda tıbbın ihtiyaçlarına karşılık veren pek çok ilaç üretilmiştir. Elde edilen ilaçlar genellikle bitki metabolitlerinden türevlenmiştir (Cemeroğlu 2004).

Bütün bitkiler metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak, bitkileri bazı zararlılara karşı korumada görevleri olduğu düşünölen, çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı 2007). Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın bulunan maddeler olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğın yapısı tanımlanmıştır. Bunlara sürekli yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir (Cemeroğlu 2004).

Tüm fenolik bileşikler, yapısal olarak bir aromatik halka, bir veya daha fazla hidroksil (OH) grubu içerebilirler ve basit bir fenolik yapıdan, yüksek oranda polimerize olan bileşiklere kadar çok sayıda yapı çeşitliliğine sahiptirler. Yapılarından dolayı polifenoller olarak da adlandırılabilirler (Balasundram *et al.* 2006).

Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Coşkun 2006). Fenolik bileşikler, fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanlarına göre çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır. Fenolik bileşikler, bitkisel kaynaklı maddelerin en çok çalışılan grubunu oluşturmaktadır (Aydın ve Üstün 2007). Bitkilerdeki fenolik bileşikler; fenolik (fenolkarbonik) asitler, flavonoidler ve fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Bunlardan, gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır (Aydın ve Üstün 2007). Diğer taraftan fenolik bileşiklerle ilgili farklı kaynaklarda çok çeşitli sınıflandırmalar yapılmış olmasına rağmen fenolik asitler ve flavonoidler en fazla incelenen genel iki gruptur (Nizamlioğlu ve Nas 2010).

Fenolik bileşiklerin birçoğunun en önemli özelliklerinin antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu antioksidan aktivite esas olarak metal şelatlama, tekli oksijen giderme, hidrojen verici ve indirgeyici ajan olarak davranmalarını sağlayan redoks özelliklerinden kaynaklanır. Ayrıca fenollerin ROS (radikal oksijen süpürücü) özelliği, fenolik molekülün aromatik halkası üzerindeki hidrojen verici hidroksil grupların pozisyonuna ve sayısına, fenolik hidrojenlerin mevcudiyetine ve hidrojen vererek oluşan fenoksi radikallerinin kararlı hale geçebilmesine bağlıdır. Fenolik bileşiklerin

yapılarında bulunan –OH sayısı arttıkça antioksidan etkileri de artmaktadır (Nizamlioğlu ve Nas 2010).

İnsanlarda diyetin önemli bir bileşeni olan fenolik bileşikler doğal kaynaklı antioksidanlar olarak tanımlanmalarının yanı sıra yapılan birçok araştırmada, antienflamatuar, antiviral ve antitümör gibi pek çok etki gösterdikleri ve bu sayede çok çeşitli dejeneratif hastalıklara karşı terapötik ve koruyucu etkilere sahip oldukları rapor edilmiştir (Manach *et al.* 2005; Russo 2007).

Fenolik bileşiklerin özellikle antikarsinojen aktiviteleri dikkat çekicidir. Fenolik bileşikler karsinogenik kimyasal maddelerin yan etkilerini; karsinojenleri detoksifiye ederek, karsinojenlerin alınımını inhibe ederek, aktivasyonlarını ve yapılarını bozarak, DNA'ya bağlanmasını önleyerek ve DNA tamir mekanizmasının doğruluğunu artırarak önlemektedirler (Ramos *et al.* 2011).

Fenil alaninden türevlenen fenolik bileşikler grubu içerisinde yer alan ve genel yapı itibari ile C6-C3-C6 yapı biçiminde gösterilmekte olan flavonoidler, C15 karbon yapısında düşük moleköl ağırlıklı polifenolik maddelerdir. Flavonoidler sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almışlardır (Saldamlı 2007). Flavonoidler, bitkilerde özellikle çiçeklerdeki renklenmeyi sağlayan sekonder bileşiklerdir. Flavonoidler insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturan meyvelerde, sebzelerde, kabuklu yiyeceklerde, tohumlarda ve çayda yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Saldamlı 2007).

İnsan hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda flavonoidlerin antikanser özellikleri, DNA hasarını azaltıcı etkileri, serbest radikalleri temizleyici özellikleri ile apoptoz ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan hücre sinyal yollarını değiştirebilme gibi biyolojik etkileri gösterilmiştir (Watson and Preedy 2010). Bazı araştırmacılar, sıklıkla tükettiğimiz meyve ve sebzelerin kansere karşı koruyucu etkilerinin flavonoid içeriklerinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir (Aherne and O'Brien 2000).

Başka bir çalışmada, 8 hafta boyunca her gün mor üzüm suyu içen kişilerin lenfositlerinde endojen kaynaklı DNA hasarının azaldığını ve DNA hasar seviyesinin düşmesiyle serbest oksijen radikallerinin salınımının da azaldığı gözlenmiştir (Park *et al.* 2003). Zengin flavonoid içerikli besinlerle yapılan *in vitro* çalışmalarda bu gıdaların DNA hasar düzeylerini azalttığı ve oksidatif stresi düşürdüğü gösterilmiştir (Yeh *et al.* 2005). Ayrıca, Wiesel *et al.* (2006), flavonoid bakımından içeriği yüksek olan karışık meyve sularının içilmesinin oksidatif DNA hasarını azalttığını tespit etmişlerdir.

Bazı flavonoidlerin, bağışıklık sistemini ve antiinflamasyon hücrelerini büyük oranlarda etkilediği, immün cevapta inflamasyon ilerlemesini ve enzim sistemini doğrudan etkilediği bilinmektedir. Flavonoidlerin çarpıntı üzerinde önleyici etkisi yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Michelle *et al.* 2007).

Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar ile antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antitümör, antifungal, antimikrobiyal, antiviral, antiallerjik, antitrombotik özelliklerinin de olduğu gösterilmiştir (Stavric 1994; Mazid *et al.* 2011; Prabakaran *et al.* 2011).

Farklı çalışmalarla yine flavonoidlerin ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O[·]), lipid alkoksil (RO[·]) ve peroksil (ROO[·]), nitrik oksit (NO) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, alfa-tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimülan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve rhinovirüslere karşı) etkilerinin olduğu (Chen *et al.* 1990; Rice-Evans *et al.* 1996), antiinflamatuvar özelliğe (fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile) sahip oldukları gösterilmiştir (Yen *et al.* 1997; Prabakaran *et al.* 2011).

Flavonoid içerikleri bakımından zengin farklı bitki ailelerinin güçlü hipoglisemik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Patel *et al.* 2012). Bu sebeple birçok bitki, diyabetli hastalarda alternatif tedavi olarak kullanılmaktadır. Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada alloksan ile teşvik edilen diyabetin sıçanlara zengin flavonoid içerikli

Derris reticulata köklerinin sulu ekstraktlarının verilmesiyle iyileştiği gösterilmiştir (Kumkrai *et al.* 2014).

Bununla birlikte faydalı etkilerine zıt olarak flavonoidlerin mutajenik oldukları hakkında da *in vitro* veriler bulunmaktadır. Flavonoidlerin yüksek konsantrasyonlarda DNA delesyonlarını teşvik ettikleri, reaktif metabolitleri üretmesi için DNA topoizomeraz II'ye zarar verdikleri ve enzim aktivitelerini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Czczot and Bilbin 1991). Flavonoidlerin biyolojik ve farmakolojik etkileri antioksidan ve prooksidan davranışlarına bağlıdır (Cao *et al.* 1997; Moran *et al.* 1997). Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) testi kullanılarak bazı flavonoidlerin konsantrasyon ve serbest radikal kaynağına bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan gibi davranabileceği ifade edilmektedir. Flavonoidler serbest radikallere karşı antioksidan olarak davranırlar ama bir geçiş metali varlığında prooksidan aktivite gösterirler. Bu flavonoidlerin antioksidan özellikleri ve bakırın indüklediği prooksidan aktiviteleri kendi yapılarına bağlıdır (Cao *et al.* 1997; Moran *et al.* 1997).

Flavonoidlerin, bakteri ve memeli sistemlerinde mutajen ve genotoksik özellik gösterdiği belirlenmiştir (Moskaug *et al.* 2004). Bir flavonoid olan Kuersetin'in prooksidan etki göstererek DNA'ya zarar veren serbest radikal oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir (Moskaug *et al.* 2004). Ayrıca, replikasyon sürecinde DNA'nın birbiri üstüne dönerek gerginliğinin artmasını önleyen topoizomeraz enzimlerini de inhibe ettiği ifade edilmiştir (Moskaug *et al.* 2004). Benzer bir çalışmada, CuCl₂ ile indüklenen düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu C vitamini ile flavonoidlerin arttırabildiği gözlenmiştir (Bonet *et al.* 1996). Bundan dolayı, bazı araştırmacılar biyolojik moleküllerde fenolik antioksidanların, prooksidan etkilerinin mutlaka göz önüne alınması gerektiğini bildirmektedirler (Cao *et al.* 1997; Yen *et al.* 1997).

Fenolik bileşiklerin diğer bir grubu olan fenolik asitler genellikle bitkilerin meyve, yaprak, kök, gövde ve tohumlarında bulunmaktadırlar. Fakat özellikle bitkilerin doku ve organlarında bol miktarda birikirler. Fenolik asitler grubunda yer alan, tanenler suda

çözünebilen polifenollerdir. Tanenler gıda maddelerinde de örneğin çilek, fındık, ceviz, çay, ahududu, mango ve üzümde bulunurlar (Mingshu *et al.* 2006).

Tanenler temel olarak yapı ve özelliklerine göre, hidrolizlenebilir tanenler, kondanse tanenler ve kompleks tanenler olmak üzere 3 temel gruba ayrılmaktadır. Hidrolizlenebilir tanenler çekirdek merkezi olarak poliols (genellikle D-glukoz) içeren moleküllerdir. Bu poliollerin hidroksi grupları kısmen veya tümüyle gallik asit veya ellajik asit gibi fenolik gruplarla esterleşmiştir. Hidrolizlenebilir tanenler oldukça toksiktir. Eğer yüksek miktarda tanen içeren bitki tüketilirse zehirlenmelere neden olacağı düşünülmektedir (Bhat *et al.* 1998). Hidrolizlenebilir tanenler, gallotanenler ve ellajitanenler olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Gallotanenlerin en bilineni tannik asit (Mingshu *et al.* 2006), ellajitanenlerin en iyi bilineni ise ellajik asittir (Khadem and Marles 2010).

Tanenlerin de flavonoidler gibi oksidatif hasarı önleyebildiği, serbest radikalleri temizleyerek antioksidan özellik gösterebildiği bilinmektedir. Bazı tanenlerin stres uygulanmış balıkların eritrositlerindeki oksidatif stresi azaltmada pozitif rol oynadığı bildirilmiştir (Fedeli *et al.* 2004).

Tanenlerin mikroorganizma, hayvanlar ve çevre üzerindeki etkileri oldukça fazladır. Örneğin, birçok mikroorganizmanın enzim aktivitesini inhibe ederek mikroorganizmaların gelişmesini önlemektedirler (Goel *et al.* 2005).

Fenolik bileşiklere olan ilgi devam etmekte olup özellikle literatürde farklı farmakolojik etkileri olduğu belirtilen Apigenin, Baicalin, Ellajik Asit, Luteolin, Naringenin ve Tannik Asit üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar giderek artmaktadır.

Apigenin'in (AP) antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antienflamatuar ve antiproliferatif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Birt *et al.* 1986).

AP anti tümör özellikleriyle kanser araştırma toplulukları için cazip bir bileşik haline gelmiş olup (Fotsis *et al.* 1997), araştırmacılar AP'in meme kanseri (Yin *et al.* 2001), kolon kanseri (Wang *et al.* 2004) ve prostat kanseri (Shukla and Gupta 2004) gibi birçok insan kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra AP'in, seçici özellik göstererek sağlıklı hücreleri etkilemeden kanser hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (Gupta *et al.* 2001).

Farklı çalışmalarda AP'in, *in vitro* ve *in vivo* şartlarda metal şelasyonunu teşvik ettiği, serbest radikalleri temizlediği ve Faz II detoksifikasyon enzimlerini uyardığı gösterilmiştir (Middleton *et al.* 2000). Bununla birlikte AP'in, yüksek antioksidan aktivitelerine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Singh *et al.* 2004). Ayrıca, Begum *et al.* (2012) AP'in radyasyona bağlı sitogenetik değişikliklerden insan lenfosit hücrelerini koruduğunu rapor etmişlerdir.

AP'in, Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde nitropiren tarafından teşvik edilen genotoksisiteye karşı antimutajenik özellik gösterdiği (Kuo *et al.* 1992) ve benzo [a] piren ve 2-aminoanthracene kaynaklı bakteriyel mutajeniteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Middleton *et al.* 2000). Buna karşın Snyder and Gillies (2002) araştırmaları neticesinde AP'in, Çin hamsteri V79 hücrelerinde 100 µM'lık konsantrasyonunun klastojenik etki gösterdiğini ve AP'in, bu etkisinin DNA'ya interkalasyon yapabilme özelliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Baicalin'in (BA); antioksidan, antitoksin ve ateş düşürücü özelliklere sahip olduğu (Shi *et al.* 1995), antitümör (Fukutake *et al.* 1998), antiviral (Kitamura *et al.* 1998), hepatoprotektif, antibakteriyel, antienflamatuar ve antidiyareik (Lu *et al.* 2007; Guo *et al.* 2013) etkiler sergileyebileceği rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmada, BA'nın antienflamatuar, antioksidan ve antikanser gibi biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Ahmed *et al.* 2000).

Hwang *et al.* (2005) yaptıkları çalışmada, BA'nın fare karaciğer sisteminde, tert butil hidroperoksit (t-BHP) kaynaklı sitotoksisteyi ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, BA'nın t-BHP tarafından oluşturulan glutasyon (GSH) eksikliğini giderdiği ve DNA sentezini onardığı bildirilmiştir (Hwang *et al.* 2005). Ayrıca fareler üzerine yapılan bir çalışmada, BA'nın hepatositleri CCL₄'ün neden olduğu oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (Park *et al.* 2008a).

Ellajik asit'in (EA) diğer fenolik bileşikler gibi antioksidan özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Abdallah *et al.* 2011). *Salmonella* mutajenite testiyle yapılan çalışmalarda EA'nın antimutajenik etkisi gösterilmiştir (Šmerák *et al.* 2002). Ayrıca EA'nın DNA'yı modifiye eden birkaç enzimi (topoizomeraz I-II, giraz ve polimeraz) inhibe ettiği ve bu şekilde kanser hücrelerinin büyümesini önlediği rapor edilmiştir (Thulstrup *et al.* 1999). EA'nın, prostat, boyun, kolon ve ağız kanseri hücreleri üzerine antitümör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Papoutsis *et al.* 2005; Seeram *et al.* 2005).

EA'nın, *in vitro* da hidroksi anyonu ve süperoksit anyonuna karşı koruyucu potansiyeli olduğu, mide içinde de EA'nın etanola karşı mukosal korunumunu sağladığı tespit edilmiştir (Vasconcellos 2000). EA'nın antioksidan özelliğine ilaveten antikarsinogenik, antiöstrojenik ve antimutajenik etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Aviram *et al.* 2000; Gil *et al.* 2000; Papoutsis *et al.* 2005). EA'nın, antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliğinden dolayı, sigara dumanının neden olduğu DNA kırılmalarını engellediği bildirilmiştir (Moktar *et al.* 2009).

EA'nın belirtilen olumlu etkilerinin yanında, Labieniec *et al.* (2007) çalışmalarında EA, TA ve gallik asitin, 60 µM üzerindeki konsantrasyonlarının DNA hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir.

Diğer bir fenolik bileşimiz olan luteolin (LU) ilgili yapılan bir çalışmada insan miyelojen lösemi hücrelerinde (K562) H₂O₂ tarafından uyarılan DNA hasarına karşı; quercetin, rutin, LU ve AP'nin koruyucu etkileri Komet testi ile gösterilmiştir. Bu araştırma sonucunda H₂O₂'in teşvik ettiği DNA hasarına karşı, en güçlü inhibisyonun

LU (%44) tarafından yapıldığı belirlenmiştir (Horvathova *et al.* 2003). LU'nun Caco-2 hücrelerinde hem DNA'yı oksidatif hasardan koruduğu hem de tamir aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Ramos *et al.* 2010). Benzer bir çalışmada LU'nun, H₂O₂ tarafından teşvik edilen oksidatif DNA hasarına karşı güçlü bir koruyucu özellik gösterdiği belirlenmiş ve LU'nun bu etkisi, antioksidan kapasitesi ile radikal süpürücü aktivitesine bağlanmıştır (Rusak *et al.* 2010). Bununla birlikte, Rusak *et al.* (2010) bu araştırmasında AP, LU ve kaempferolün konsantrasyon ve süreye bağlı olarak DNA hasarı oluşturduklarını da bildirmiştir.

LU'nun, süperoksit radikalleri için süpürücü özellikler gösterdiği ve güçlü bir tekli oksijen giderici olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Wölfle *et al.* 2011; Tsai *et al.* 2013). Ayrıca, RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerine bisfenol-A-glycidyl dimethacrylate (BisGMA)'nın neden olduğu DNA hasarı ve genotoksisiteye karşı LU'nun etkisinin araştırıldığı çalışmada LU'nun, BisGMA'nın sebep olduğu genotoksisite ve sitotoksisiteye karşı makrofajları koruduğu gözlenmiştir (Shen *et al.* 2013).

Naringenin (NA), antioksidan, antikanserojen, antiülser, antiproliferatif, nefroprotektif ve antimutajenik aktivitelerinin bulunduğu bildirilmiştir (Ekambaram 2008; Renugadevi 2009). Bunun yanı sıra, NA'nın hepatoprotektif, antienflamatuar, antitümör gibi birçok farmakolojik özelliklere de sahip olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Kannappan 2010; Jain 2011).

Ekambaram (2008) NA'nın fenton reaksiyonunu engelleyerek hidroksil radikali oluşumunu azalttığı ve bu sayede hücre zarını koruduğunu rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada, NA'nın kadmiyuma maruz bırakılmış farelerde enzim aktivitelerini yükselttiği ve antioksidan özellikleri sayesinde hücre ölümünü önlediği gözlenmiştir (Renugadevi 2009). Ayrıca, NA'nın, ksenobiyotiklerin neden olduğu böbrek hasarı modelinde ortamdaki oksidanları azaltma yolu ile dokuyu koruduğu belirtilmiştir (Renugadevi 2009). NA'nın arsenikle muamele edilen karaciğer hücrelerinde yükselen MDA ve ROT seviyelerini (Jain 2011), kadmiyum ile oksidatif stres oluşturulan farelerde ise lipid peroksidasyonunu (Renugadevi 2009) azalttığı bildirilmiştir.

Buna karşın NA'nın, DNA'yla interkalasyon yaparak bağlanabildikleri ve sitotoksik özellik gösterebildikleri de bilinmektedir (Wang *et al.* 2006; Li *et al.* 2007).

Tannik asit'in (TA), Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde, 1-nitropyren- (1-NP) tarafından indüklenen kardeş kromatid değişimleri sıklığında azalmaya neden olduğu (Kuo *et al.* 1992) ve *Salmonella* suşlarında 4-aminobifenil, 3,30-4,40-tetra aminobifenil ile N, N-N0, N0-tetrametilbenzidine karşı antimutajenik etki gösterdiği (Chen and Chung 2000) bildirilmiştir.

Zhao *et al.* (2005) TA'nın, antioksidan, antikanser ve antimutajenik özellikler sergilediğini bildirmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda TA'nın, ilaç toksisitelerinden kaynaklanan reaktif oksijen türlerini önlediği rapor edilmiştir (Tikoo *et al.* 2008). Bunun yanı sıra TA'nın, lipid peroksidasyonu, ksantin oksidaz, hidrojen peroksit üretimini ve karaciğer hasarını azalttığına dair bulgular da mevcuttur (Sehrawat *et al.* 2006). Fakat TA'nın bu olumlu etkilerinin yanında, mutajenik ve genotoksik özellikte olduğunu (Kevekordes *et al.* 2000; De Carvalho *et al.* 2003), mutajen madde ile sinerjistik etki yaparak mutajeniteyi artırdığına (Knasmuller *et al.* 1992) dair bulgular da bulunmaktadır.

Bitkilerdeki antioksidan özellikteki bileşiklerin çoğunun yapı ve etkinlikleri tam olarak aydınlatılmamış olup, fenolik fitokimyasallar başta olmak üzere pek çok etken maddenin hem prooksidan hem de antioksidan özellikleri olabilmektedir. Bitkisel ürünlerin toksisiteleri ve insan sağlığına olası riskleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bazı bitkisel ürünlerin *in vitro* bakteri sistemlerinde ve hücre kültürlerinde mutajenik olabildikleri, DNA hasarını indükleyebildikleri bildirilmişse de tersini belirten bulgular da bulunmaktadır.

Bu bilgilerin ışığında, fenolik bileşikler için her ne kadar prooksidan aktivitelerinden söz edilse de antioksidan özelliklerinin daha ağırlıklı olarak rol oynadığı görülmektedir. Dolayısıyla radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada etkin rol oynayabilecekleri düşünülmektedir.

Fenolik bileşiklerin belirtilen pek çok olumlu özelliklerine rağmen, bilinçsizce ve aşırı tüketilmesi insan sağlığı için tehlike oluşturabilmektedir. Buradan hareketle çalışmamızda; hem prooksidan hem de antioksidan özellik sergileyebilmeleri, apoptotik ve antiapoptik aktiviteye sahip olabilmeleri, antimutajen özelliklerinin yanı sıra mutajen madde varlığında mutajen madde ile sinerjistik etki göstererek mutajeniteyi artırabilmelerinden dolayı tartışma konusu olan fenolik bileşiklerin, insan sağlığına olası etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, alternatif tıbbı da katkı sağlamak niyetiyle en az toksisite ile daha etkin bir tedavi yöntemi geliştirmek niyetiyle doğal ürünlerde bulunan ve son yıllarda önemi artan fenolik bileşiklerden AP, BA, EA, LU, NA ve TA'nın sitotoksik, genotoksik ve oksidatif etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla; iki aşamada yürütülen çalışmamızın 1. aşamasında, RTCA (Real-Time Cell Analyzer) – SP (Single Plate) (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) sistemi ile insan sağlıklı endotel hücrelerinde fenolik bileşiklerin optimum konsantrasyonları ve uygulama süreleri ayarlanarak, WST-1 ve LDH testleriyle sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi; 2. aşamasında ise insan lenfosit hücrelerinde Komet ve mikroçekirdek yöntemleri ile genotoksik özelliklerinin; katalaz, superoksit dismutaz ve malondialdehit ölçümleri ile de oksidatif etkilerinin belirlenmesi planlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELER

2.1. Test Edilen Fenolik Bileşikler

2.1.1. Apigenin (AP)

Flavanoidlerin flavon alt grubunda yer alan AP; maydanoz, papatya, kereviz portakal, çay gibi gündelik olarak tükettiğimiz fazla sayıda meyve ve sebze de bulunur (Sak 2014). AP'ı içeren besinlerin alınmasından sonra AP'ın farklı dokulara dağıldığı ve yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (Gradolatto *et al.* 2005). Örneğin, AP'ın hem insan prostat hem de meme kanser hücrelerinde kazein kinaz-2'nin ekspresyonunu inhibe ettiği (Hessenauer *et al.* 2003), akciğer kanserinde anjiyogenezi engellediği (Liu *et al.* 2005), bir karsinogen madde olan pirenle mutasyona uğratılmış Çin hamster ovaryum hücreleri üzerinde antimitotik özellik gösterdiği, detoksifikasyon faz II enzimlerini uyardığı, UV sonucu oluşmuş kanser yatkınlığını azalttığı, hücre sinyal yollarını değiştirerek antikanser etki gösterdiği, Na/Ca pompasını düzenlediği bildirilmiştir (Patel *et al.* 2007).

Fare derisinde ultraviyole ışınlarıyla uyarılan tümörlerin AP'la bastırıldığı belirtilmiştir (Nijveldt 2001). Araştırmacılar tarafından AP'ın, stres şartları altındaki farelerde meydana gelen serotonin değişikliklerini inhibe ederek antidepresan etki gösterdiği açıklanmıştır (Yi *et al.* 2008). Ayrıca fareler üzerinde yapılan başka bir deneyde ise oksidatif stres sonucunda aort endotelinde meydana gelen gevşemeye karşı AP'ın koruyucu etki gösterdiği (Jin *et al.* 2009) belirlenmiştir.

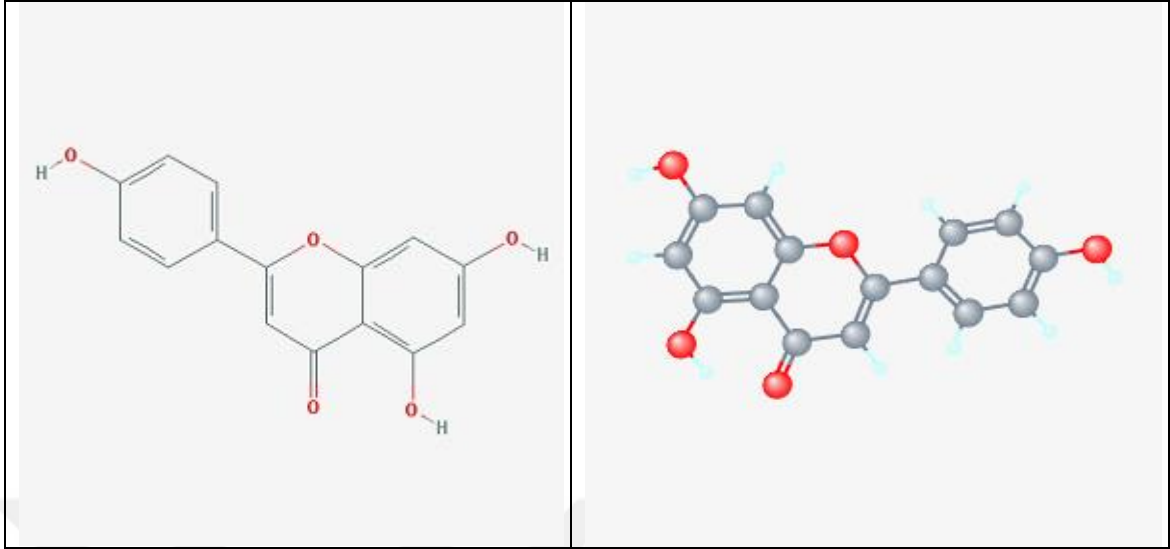
Farklı araştırmalarda AP'ın, prostat, göğüs, lösemi ve kolon kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Gupta *et al.* 2001; Yin *et al.* 2001). AP'ın, sahip olduğu antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanserojen özelliklerin yanında yüksek dozlarda böcek ve yumuşakça öldürücü olarak ta kullanıldıkları belirtilmiştir

(Shahi and Singh 2010). Ancak diğer flavanoidlerle karşılaştırıldığında AP'nin toksisitesi çok düşük olarak ifade edilmektedir (Nijveldt 2001).

İnsan lenfosit hücreleri (Siddique *et al.* 2008) ve fare kemik iliği hücreleriyle yapılan çalışmalarda AP, antikanser ilaçlara karşı antigenotoksik etki göstermiştir (Siddique *et al.* 2008; Siddique and Afzal 2009).

Yapılan birçok çalışmada AP'nin antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antienflamatuar, antiproliferatif ve antiprogresyon özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Shukla and Gupta 2006; Li *et al.* 2010; Estruch *et al.* 2013; Choi *et al.* 2014a). Farklı bir çalışmada AP'nin miyokardiyal iskemi / reperfüzyon hasarına karşı kardiyoprotektif özelliğinin olduğu belirlenmiştir (Testai *et al.* 2013).

Araştırmacılar, farklı biyolojik sistemlerde AP'nin antiproliferatif özelliğinin olduğunu; insan ya da hayvan kaynaklı farklı kanser hücre hatlarında AP'nin hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi teşvik ettiğini rapor etmişlerdir (Chung *et al.* 2007; Jayasooriya *et al.* 2012). Yapılan farklı çalışmalarda AP'nin amiloid-beta proteininin teşvik ettiği nörotoksositeyi azaltmak için redoks dengesizliğini düzenleyerek bariyer bütünlüğünü güçlendirdiği ve mitokondriyal fonksiyonu koruduğu gözlenmiştir (Liu *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2013). *İn vivo* ve *in vitro* olarak yapılan farklı araştırmalarda AP'nin, parkinson (Patil *et al.* 2014), alzheimer (Zhao *et al.* 2013) ve iskemik felç (Yamagata *et al.* 2009) hastalıklarına karşı nöroprotektif etkiyi önemli derecede uyardığı tespit edilmiştir. Ayrıca AP'nin, oksidatif stresten kaynaklanan kardiyovasküler ve nörolojik bozukluklar gibi hastalılarda da koruyucu etki gösterebileceği bildirilmiştir (Shukla and Gupta 2010). AP'nin, kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. AP'in kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015a)

2.1.2. Baicalin (BA)

Genellikle Çin'de yetişen bir bitki olan *Scutellaria baicalensis*, kardiyovasküler, enflamatuar hastalıklar, bakteriyel kaynaklı hastalıklar ve kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lin *et al.* 2011; Khanal *et al.* 2012; Pan *et al.* 2012; Shiau *et al.* 2014). Bu bitkinin kökü flavonoid bakımından çok zengin olup 50'nin üzerinde farklı bileşik belirlenmiştir (Takahashi 2011). Bu flavonoidlerden biri olan ve kurutulmuş bitki kökünden izole edilen BA, yüzyıllardır geleneksel Çin bitki ilacı olarak alerjik ve iltihapsal rahatsızlıklarının tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (Tarrago *et al.* 2008).

BA'nın beyin ödemi ve beyinsel iskemi hasarlarına karşı koruyucu etkisiyle ilgili araştırmalar yapılmıştır. Li *et al.* (2003) BA'nın, aminoasit nörotransmitterlerin belirli seviyelerine beyinsel iskemi sırasında farmakolojik etkisinin olup olmaması üzerine yaptıkları çalışmada beyin korteksindeki glutamat (Glu), aspartat (Asp), gama aminobütirik asit (GABA) ve glisin (Gly) önemli oranda arttığını ve BA'nın muamelesiyle Glu ve Asp'li beyinsel iskeminin yükselmesinin azaldığını belirlemişlerdir. Tarrago *et al.* (2008) merkezi sinir sistemi hastalıklarında BA'nın, terapötik madde olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bununla ilgili yapılan farklı çalışmalarda, beyin iskemisi (Cheng *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2014), omurilik

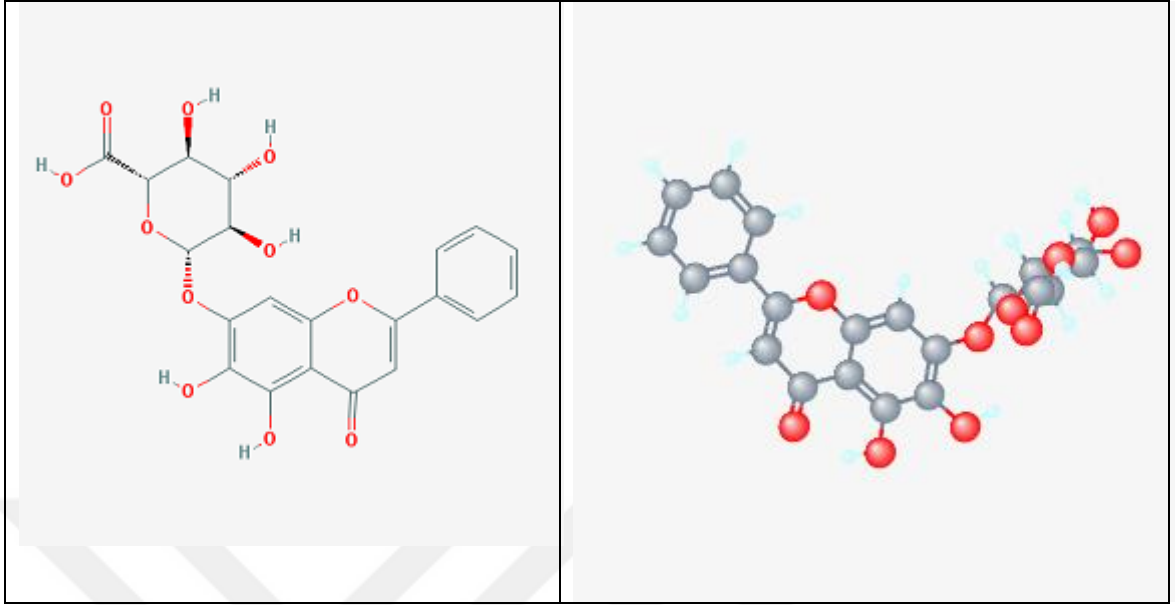
yaralanması (Cao *et al.* 2010), epilepsi (Liu *et al.* 2012), öğrenme ve hafıza noksanlıkları (Lee *et al.* 2014) üzerine BA'nın nöroprotektif etkileri gösterilmiştir.

Son yıllarda, yapılan birçok çalışmada BA'nın, insan kanser hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezi, akciğer kas hücresi çoğalması ve farklılaşmasını inhibe ettiği, apoptoza karşı duyarlılığı artırdığı rapor edilmiştir (Dong *et al.* 2010; Chen *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014).

BA güçlü antioksidan, antienflamatuar ve antikanser özellikleri gösterir (Srinivas 2010). Ayrıca BA'nın, insan mukozal doku (Zhang *et al.* 2012), yaşlı fare böbrekleri (Lim *et al.* 2012), sigara dumanı kaynaklı iltihaplı modeller (Li *et al.* 2012) gibi farklı *in vivo* ve *in vitro* kültür ortamlarında antienflamatuar aktiviteyi artırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar BA'nın, farelerde yüksek ateşi düşürdüğünü ve antioksidan özellikleriyle serbest oksijen radikallerini giderebildiğini rapor etmişlerdir (Guo *et al.* 2015).

BA'nın antiinflamasyon, antioksidasyon ve antiapoptotik gibi birçok farmakolojik etkileri olduğu gösterilmiştir (Hou *et al.* 2012; Yang *et al.* 2012; Wen *et al.* 2013; Guo *et al.* 2014a).

BA'nın farklı hastalık grupları üzerinde yararlı etkilerinin olduğu bilimektedir. Örneğin; hipoksi ya da reoksijenasyonun neden olduğu kardiyomiyositler yaralanmalarda (Liou *et al.* 2012), hepatik sitotoksisite durumlarında (Wen *et al.* 2013), eklem iltihaplarında (Lee *et al.* 2010) ve buna benzer hastalıklar üzerinde BA'nın faydaları gözlenmiştir. BA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.2'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. BA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015b)

2.1.3. Ellajik Asit (EA)

Polifenol bir bileşik olan EA, antioksidanlar bakımından zengin bir kaynak olup böğürtlen, ahududu, çilek, kıvılcık, ceviz, nar başta olmak üzere çok sayıda meyve ve sebze de bulunmaktadır (Mutanen *et al.* 2008). EA'nın bir hücre tarafından algılanması ve kullanılabilmesi için uygun bir yapıda bulunması gerekir. Bu form, şeker molekülleriyle birleşmesi sonucunda oluşmaktadır (Vasconcellos 2000).

Araştırmacılar, EA'nın E vitaminiyle kıyaslandığında lipid peroksidasyonu olayında daha fazla antioksidan etki gösterdiğini, suda çözünürlüğünün düşük olması, organik çözücülerde (metanol, dimetil sülfoksit vb.) daha iyi çözünmesinden dolayı EA'nın lipofilik antioksidan olarak davranabileceğini rapor etmişlerdir (Gil *et al.* 2000). Diğer bir çalışmada serbest oksijen radikallerinin DNA zincirinin ayrılmasına sebep olarak mutasyonlar oluşturduğu; EA'nın bu süreci önleyebilen güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Hannum 2004).

Labieniec (2003), EA üzerine Çin hamster hücreleriyle yaptığı *in vitro* deneyde MTT ve Komet testlerini kullanarak EA'nın sitotoksik ve genotoksik etkilerini göstermiştir (Labieniec and Gabryelak 2003).

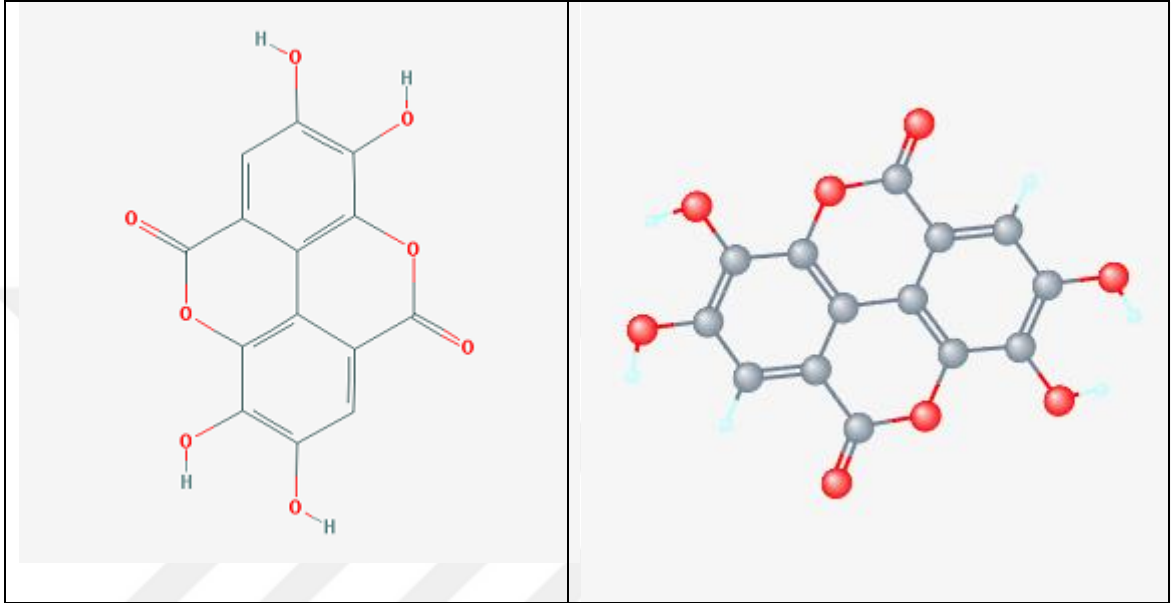
In vivo ve *in vitro* yapılan birçok deneyde EA, diğer fenolik bileşikler gibi güçlü kemoprotektif etki sergilemiştir (Vattem and Shetty 2005). Ayrıca EA'nın antimutajenik etkisi *S. Typhimuriumun* TA98 ve TA100 suşları üzerine (Šmerák *et al.* 2002), koruyucu etkisi ise mikroçekirdek testi kullanılarak fare kemik iliği üzerine yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Berni *et al.* 2012). Yapılan farklı bir çalışmada, EA'nın bakteri membranının önemli fonksiyonlarını engelleyerek mikroorganizmaların gelişmesini önlediği ifade edilmiştir (Vattem *et al.* 2006).

EA'nın, DNA replikasyonu ve rekombinasyonunda aktif rol alan topoizomeraz I ve II enzimlerinin çalışmasını engelleyerek tümör hücrelerinin gelişimlerini engelledikleri rapor edilmiştir (Hurley 1998). Bu bağlamda, EA'nın antikanserojen etkisiyle ilgili yapılan bir araştırmada EA ile DNA arasında kovalent bağlarının olduğu görülmüş ve bu sayede DNA'nın, kanserojen madde ile bağlanmasının engellendiği bildirilmiştir (Huetz *et al.* 2005).

Ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve EA'nın polisiklik aromatik hidrokarbonlarının (PAH) kanserojen etkilerini inhibe etme açısından kıyaslandığı bir çalışmada en yüksek antikanser özelliğin yaklaşık 80 ila 300 kat daha fazla bir şekilde EA tarafından sergilendiği gösterilmiştir (Watzl and Leitzmann 2005).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda EA'nın, insan deri hücreleri ve tüysüz farelerde UVB ışınlamasının neden olduğu kolajen yıkımı ve enflamatuar tepkileri önlediği gösterilmiştir (Bae *et al.* 2010). Abdallah *et al.* (2011), Pekan kabuklarından izole ettiği EA ve gallik asitin farelerde streptozotosinle teşvik edilen diyabete karşı hipoglisemik ve antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Bazı araştırmacılar, EA'nın serbest radikalleri giderebildiğini ve bu sayede hücreyi lipid peroksidasyonu ve oksidatif

hasardan koruyabildiğini ifade etmişlerdir (Kannan and Quine 2012). EA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. EA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015c)

2.1.4. Luteolin (LU)

Flavonoidlerin önemli üyelerinden biri olan LU ve glikozid formları birçok bitki ailesinde doğal olarak mevcut olup özellikle havuç, karabiber, nane, kekik, zeytinyağı, adaçayı, biberiye, kereviz gibi birçok bitkide bol miktarlarda bulunmaktadır (Miguel 2009). LU'nun kimyasal yapısı ve üç boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Araştırmacılar, LU'nun enginar yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesine katkıda bulunarak, Cu^{+2} iyonları tarafından uyarılan LDL oksidasyonunu önlediğini rapor etmişlerdir (Brown and Rice-Evans 1998). Farklı bir çalışmada ise, LU'nun DNA topoizomeraz I ve II'yi, triozin kinazı inhibe etmesi ve apoptozisi teşvik etmesi nedeni ile kanser tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Chowdhury *et al.* 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarda LU'nun antikanser etkisi de gösterilmiştir (Johnson and De Mejia 2013).

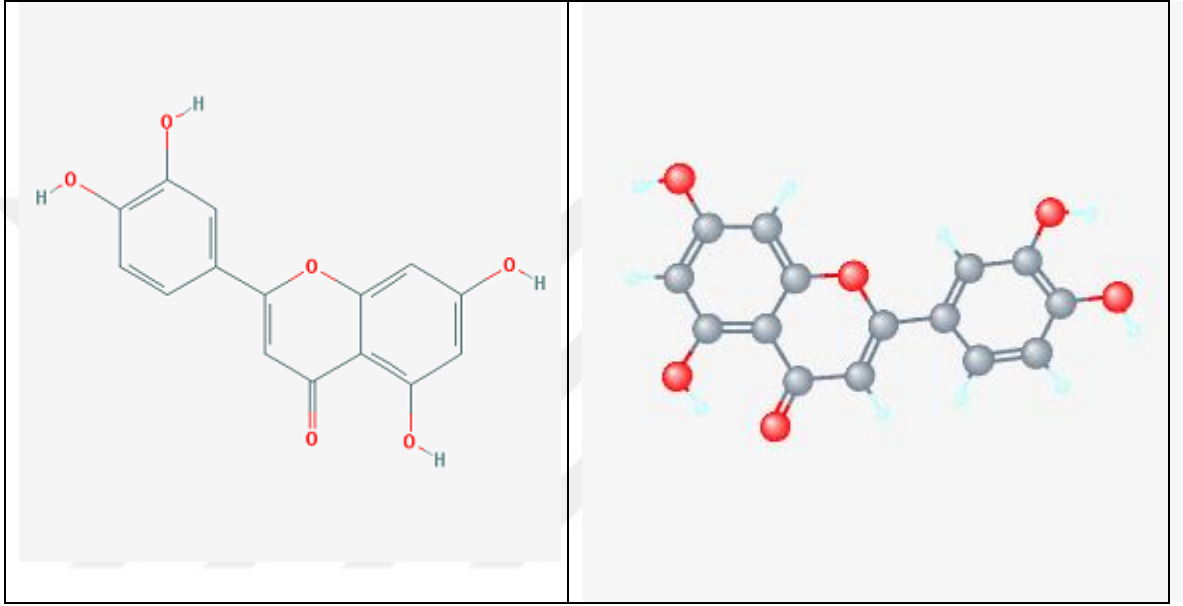
LU'nun kuvvetli bir serbest radikal süpürücü olduğu ve antienflamatuar ve antialerjik etkileri de içeren geniş farmakolojik özellikler gösterdiği rapor edilmiş olup, buradan hareketle LU ile ilgili yapılan çalışmalar antioksidan özellikleri ve antiproliferatif etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Michelsa *et al.* 2005). Örneğin LU, inflamasyon yanıtının başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynayan birtakım sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) salınmasını sağlayan nükleer faktör kappa beta transkripsiyonel sisteminin ekspresyonunu azaltmış ve bu yolla hücre kültürlerinde antienflamatuar aktivite göstermiştir (Kim and Jobin 2005).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada LU'nun selektif olarak indüklenabilir COX- 2 inhibisyonu yaptığı gözlenmiştir (Ziyan *et al.* 2007). Bazı araştırmacılar tarafından LU'nun, anksiyolitik etkisinin (Coleta *et al.* 2007) ve hafızayı kuvvetlendirici özelliğinin olduğu (Xu *et al.* 2010) iddia edilmiştir. Yine farklı çalışmalarda LU'nun antimitojenik, tümör oluşumunu engelleyici, pıhtılaşmayı önleyici, antioksidan ve antienflamatuar özelliklerinin yanında antibakteriyel etkilere de sahip olduğu rapor edilmiştir (Lv *et al.* 2009).

Araştırmacılar ratlarda koroner arter oklüzyonu öncesi uygulanan LU'nun miyokardiyal enfarkt alanını küçülttüğü, doku laktat dehidrogenaz ile NO seviyelerini azalttığı ve antiaritmik etkisi sayesinde mortaliteyi büyük ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (Liao *et al.* 2011). Benzer bir çalışmada LU'nun miyokardiyal enfarkt alanını küçülttüğü ve ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarında hücre ölümünün önemli sebeplerinden biri olan apoptozisi engellediği rapor edilmiştir (Fang *et al.* 2011). Diğer bir önemli çalışmada ise LU'nun ratlarda MDA miktarını azaltması, SOD aktivitesini arttırması sayesinde karaciğer dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2011).

Farklı bir çalışmada ise, hücre kültürlerinde LU'nun mikroglyal inflamasyonu engellediği ve nöroprotektif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Zhu *et al.* 2011). LU'nun bu etkilerini iNOS, COX-2, TNF- α , interlökin -1 β inhibisyonu aracılığıyla yaptığı bildirilmiştir (Zhu *et al.* 2011). LU'nun nörodejeneratif hastalıkların modelleri ve

ROT'a maruz kalmış nöronlarda koruyucu ve antioksidan etkileri gözlenmiştir (Blaylock and Maroon 2012; Yan *et al.* 2014). Benzer bir çalışmada LU'nun, amiloid beta proteininin neden olduğu nöron ölümlerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Choi *et al.* 2014b).



Şekil 2.4. LU'nun kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015d)

2.1.5. Naringenin (NA)

Naringenin bir aglikonu ve doğal bir flavonoid olan NA; turunçgiller, domates, çilek, greyfurt ve kakaoda bol miktarlarda bulunur (Prasetyo *et al.* 2011). Zayıf bir antioksidan olarak bilinen NA'nın, fenil halkasında C3 pozisyonunda hidroksil grubu yoktur. Bu konumdaki hidroksil grubu flavonol oksidasyonunun başlama safhaları için önemlidir. Yapı-fonksiyon ilişkisi değerlendirildiğinde bu durumun NA'nın, antioksidan aktivitesinin düşük olmasına sebep olduğu ifade edilmiştir (Prasetyo *et al.* 2011). NA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

Araştırmacılar NA'nın antioksidan, antiülser, antiproliferatif özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir (Ekambaram 2008). NA'nın farklı ksenobiyotiklerin neden olduğu

böbrek hasarı vakasında ortamdaki oksidanları azalttığı gözlenmiştir (Renugadevi 2009). Ayrıca, ratların kadmiyuma maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilen *in vivo* bir çalışmada NA'nın ratlarda SOD, KAT, GPx ve GST enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir (Renugadevi 2009).

Araştırmacılar tarafından NA'nın, HaCaT insan keratinositlerini UVB ile indüklenmiş yaşlanma ve kanser oluşumuna karşı koruduğu rapor edilmiştir (El-Mahdy *et al.* 2008). Yapılan bir çalışmada NA'nın kalp damar sistemi üzerindeki olumlu etkileri gözlenmiştir (Lee *et. al* 2009).

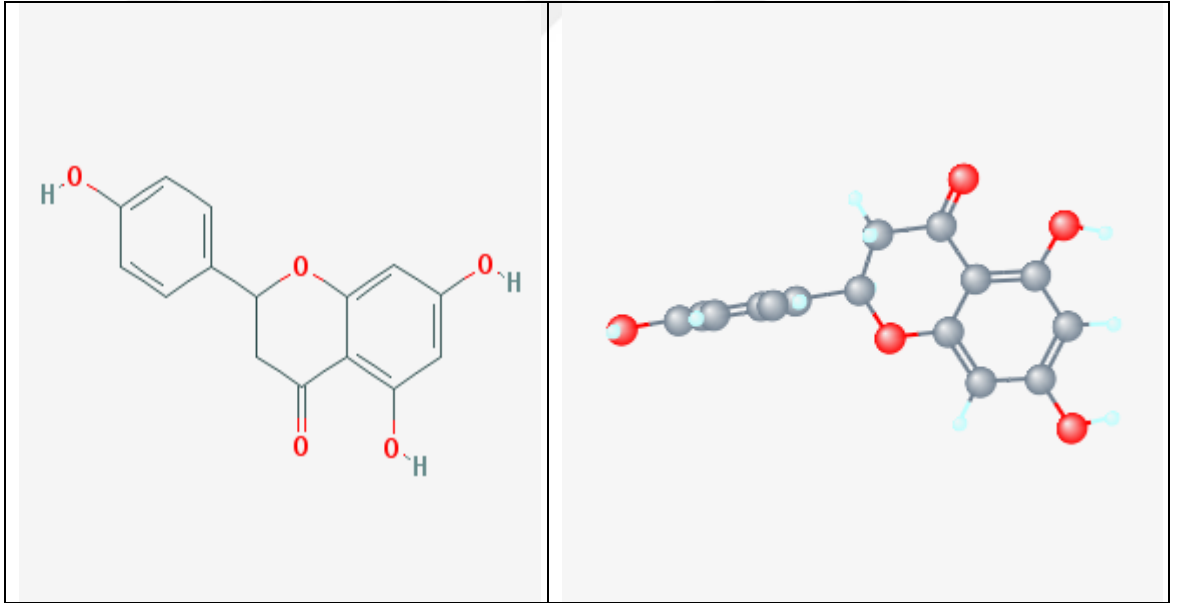
Halkasındaki 4'-OH grubunun elektron verici ve radikal bağlayıcı özelliğinden dolayı NA'nın, hidroksil radikali oluşumunu azaltabildiği ve etkili bir şekilde serbest radikalleri giderebildiği gösterilmiştir (Kannappan 2010). Ayrıca NA'nın lipofilik doğası sayesinde lipid bilayere (ikili lipit tabakası) bağlanmasını kolaylaştırdığı ve serbest radikal oluşumunu azalttığı, bu etkisiyle lipid peroksidasyonunu engellediği belirtilmiştir (Kannappan 2010).

Yapılan bir çalışmada NA'nın, ratlarda kan-beyin bariyerini geçebildiği ve bu sayede merkezi sinir sistemine etki edebilmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Yi 2010). Diğer bir çalışmada ise NA'nın karaciğer hücre sızmasını, lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engellediği, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerini arttırdığı, DNA hasarını önlediği belirtilmiştir (Kannappan 2010).

Araştırmacılar tarafından NA'nın; antitümör, antienflamatuar ve hepatoprotektif gibi farmakolojik özellikleri farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Kannappan 2010; Jain 2011). Ayrıca NA'nın yüksek yağ diyetiyle beslenmiş hayvanlarda hepatik steatozisi önlediği ve insülin hassasiyetini arttırdığı da ifade edilmiştir (Kannappan 2010). Bunların yanında, fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, NA'nın barsaklardaki karbonhidrat emilimine etki ederek antidiyabetik etki meydana getirdiği, beslenme sonrası kan glukoz düzeyi artışını da azalttığı belirlenmiştir (Fallahi *et al.* 2012).

Silymarin ve Kuersetin'e olan yapısal benzerliği nedeniyle NA, arsenik toksisitesine karşı antioksidan ve şelat ajanı olarak kullanılmaktadır (Jain 2011). Nitekim kurşun ve arsenik kaynaklı oksidatif hasara karşı NA'nın koruyucu etkisi rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2012; Mershiba *et al.* 2013).

NA'nın sağlık açısından birçok faydasının olduğu özellikle karsinogenezi baskılama ve hücre apoptozisini uyarma özelliklerinden dolayı kanseri önleyebilecekleri bildirilmiştir (Meiyanto *et al.* 2012). Benzer çalışmalarda; NA'nın antienflamatuar, antioksidan, anti-kanser, DNA koruyucu ve antiaterojenik gibi birçok farmakolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Lee *et al.* 2001; Yılma *et al.* 2013). Bununla birlikte NA'nın, antioksidatif ve antienflamatuar özellikleri sayesinde solunum yolu inflamasyonu ve nörooksidatif stres kaynaklı hastalıklarda faydalı etkiler sergileyeceği bildirilmiştir (Yang *et al.* 2011a; Assini *et al.* 2013).



Şekil 2.5. NA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015e)

2.1.6. Tannik Asit (TA)

TA'nın elde edildiği en önemli kaynak çaydır. Meşe palamudunda da bol miktarda bulunan tanenler aynı zamanda antiseptik bileşiklerdir. TA, bitkinin sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle (çayın demlenmesi gibi) suya çekilir. Bundan sonra çözelti buharlaştırmaya tabi tutulur ve TA elde edilir (Okuda and Yoshida 1993).

Bitkilerin sekonder metabolitleri olan TA, gallotanenlerin ticari formu olup, gerçek bir asit değildir (Andrade 2005). TA bazı durumlarda organizma için toksik özellik gösterebilir. TA, tripsin ve α -amilazların sindirimdeki aktivitelerini; substratlarıyla kompleks oluşturmak veya enzimlerin kendilerine bağlanmak suretiyle inhibe edip böylece protein ve nişasta sindirimini önler (Khan *et al.* 2000). TA'nın diğer olumsuz etkilerinden biri ise TA'nın, B vitaminiyle kompleks oluşturarak emilimini önlemesidir (Makkar *et al.* 1988).

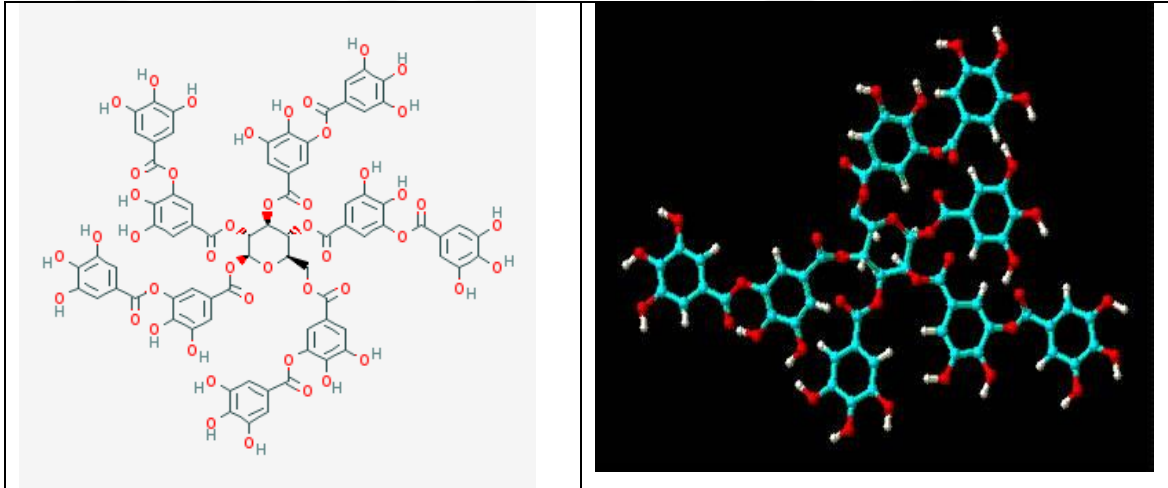
Diğer taraftan TA'nın, faydalarına dair birçok çalışmada bulunmaktadır. TA'nın antimitojenik, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Srivastava 2000; Nakamura *et al.* 2003). Ayrıca, TA'nın, singlet oksijen ve hidroksil radikallerince oluşturulan plasmid DNA kırıklarını önlediği (Khan *et al.* 2000), *in vitro* insan lenfositlerinde H₂O₂ tarafından uyarılan DNA zincir kırıklarını Fe, Cu gibi iyonları ve serbest radikalleri süpürerek onardığı da ifade edilmiştir (Wu *et al.* 2004).

TA'nın, ilaç geri alım yollarını değiştiren bir mekanizmayla seçilen kemoterapötik ilaçlarla sinerjistik etkileşiminin olduğu ve bu sayede TA'nın, kolon kansinomların tedavisindeki kemoterapötik ajanların etkinliğini artırmada etkin bir rol oynayacağı bildirilmiştir (Peter *et al.* 2007).

TA'nın; antimitojenik, antimikrobiyal (Kim *et al.* 2010a; Božič *et al.* 2012), antiviral, antikarsinojenik, antienflamatuar (Zhang *et al.* 2013), homeostatik (Gómez *et al.* 2002) ve antioksidan (Bouki *et al.* 2013) özellikler gibi birçok çekici biyolojik fonksiyonları vardır.

TA, oral yoldan Cd ve Pb'e maruz bırakılmış olan ratların dokularını (beyin, kalp) bu metallerin kötü etkilerine karşı korumuştur. Bu koruyucu etkisiyle öncelikle SOD ve KAT aktivitelerini artırmış sonrasında ise dokulardaki Cd ve Pb düzeylerini düşürmüştür (Winiarska *et al.* 2013; Winiarska 2013).

Son zamanlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda TA'nın, farklı tümör tiplerinde antikanser fonksiyonları gözlenmiştir (Ngobili *et al.* 2015). Önceki çalışmalarda TA ve benzer yeşil çay fenolik bileşiklerinin, fare meme tümörü virüsü promotörünü inhibe ettiği bildirilmiştir (Sun *et al.* 2012). Benzer çalışmalarda TA'nın, kanser ve diyabet üzerine yararlı biyolojik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Chen *et al.* 2003; Chang *et al.* 2013). Ayrıca *in vitro* yapılan farklı çalışmalarda TA'nın, farklı kanser hücre hatlarının proliferasyonunu engellediği ve kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Wang *et al.* 2000a; Yang *et al.* 2000). TA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. TA'nın kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015f)

2.2. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

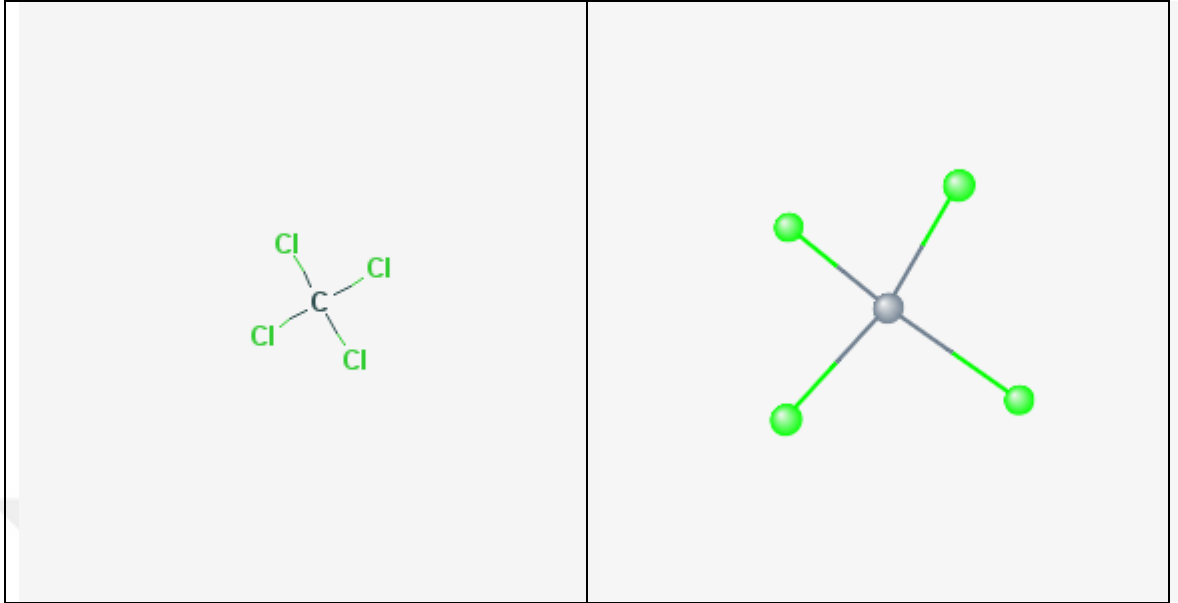
Moleküler formülü CCl₄ olan karbon tetraklorürün, karakteristik bir kesif kokusu vardır. Ksenobiyotik olan karbon tetraklorür (CCl₄) renksiz, berrak, akıcı, yoğun, yanıcı

olmayan, iletken olmayan uçucu bir sıvıdır. CCl_4 -23°C 'de katılaştır ve kaynama sıcaklığı 77°C 'dir (Micromedex 2010). CCl_4 demir varlığında karbondisülfidin klorin ile karşılıklı etkileşimi ile yani hidrokarbonların klorlanması ile elde edilir. CCl_4 'ün stabilitesi oldukça güçlü olan bir madde olup, 50 yıl yarılanma ömrüne sahiptir (Göksu 2012). CCl_4 'ün kimyasal yapısı ve üç boyutlu konfigürasyonu Şekil 2.7'de verilmiştir.

CCl_4 iyi bir yağ temizleyici olduğu için kuru temizlemede kullanılmaktadır. Önceleri yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır (Kitiz 2011).

Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak CCl_4 'ü insan için olası kanserojen sınıfına (Grup B2) dâhil etmiştir (Thrall *et al.* 2000). Solunan hava, su, gıda alımı ve deriden temas yoluyla vücuda girebilen CCl_4 tipik bir toksik ajandır ve toksik etkisi serbest radikal üretimi ile olmaktadır. CCl_4 yağda çözünebildiği için hücre membranından geçebilir. CCl_4 verildiğinde karaciğer, böbrek, kalp dokusu gibi organlara dağılır ve depo edilir (Weber *et al.* 2003). CCl_4 'ün alım ve eliminasyon süresi dokudaki yağ oranına ve dokudaki kan perfüzyonuna bağlıdır. Beyin ve karaciğer tarafından hızla alınır (Kanter *et al.* 2003).

CCl_4 karaciğerde sitokrom P450 tarafından triklorometil ($\text{CCl}_3\cdot$) serbest radikale dönüştürülür. Triklorometil radikali çok aktif olup, CCl_4 'ün karaciğerde özellikle sentrolobüler bölgede neden olduğu nekrozdan sorumludur. Triklorometil radikali, makro moleküllerle dayanıklı bileşikler oluşturduğu gibi, oksijenle de birleşmesi sonucunda triklorometilperoksi ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) radikali meydana gelir. Bu radikal kuvvetli bir lipid peroksidasyonu başlatıcısıdır (Erdoğan vd 2004; Simeonova *et al.* 2015).



Şekil 2.7. CCl₄'ün kimyasal yapısı ve 3 boyutlu konfigürasyonu (Anonymous 2015g)

CCl₄ radikalleri, hücresel lipidler ve proteinlerin ikisine de bağlanabilir. Bu, lipoprotein sekresyonunun durdurulmasındaki ilk adım gibi görünmektedir. CCl₄ ile oluşan karaciğer hasarının gelişim basamakları şöyledir: Redüktif dehalojenasyon, radikallerin kovalent bağlanması, protein sentezinin (özellikle de apolipoproteinlerin) inhibisyonu, yağ birikimi, kalsiyum sekestrasyonunda kayıp, apoptozis ve fibrozis (Gasso *et al.* 1996).

In vivo ve *in vitro* yapılan çalışmalarda, CCl₄ deneysel olarak karaciğer hasarı oluşturulmasında en çok kullanılan bir ksenobiyotiktir (Kitiz 2011). Daha önce yapılan istatistiksel bir çalışmada akut CCl₄ zehirlenmesi durumlarında gerçekleşen ölümlerin en sık nedeninin akut karaciğer yetmezliği olduğu belirlenmiştir (Gasso *et al.* 1996).

CCl₄ ile oluşan hepatotoksisitenin seyri bir dereceye kadar dokulardaki parsiyel oksijen basıncıyla ilişkilidir. Düşük basınçta kovalent metabolit bağlanması ve CCl₃ ile CHCl₂ radikalleri meydana gelmektedir. Bunun sonucunda sıklıkla lipid metabolizması etkilenmektedir. Bu etkilenme sonucunda lipid sentezinde artış, hepatosit dışına transportta azalma ve steatozis (yağlı karaciğer) durumları gözlenmektedir (Güzel

2009). Yüksek oksijen basıncında ise $CCl_3\text{-OO}$ radikali oluşur, bu da hücrede steatozisten apoptozise kadar giden değişikliklere neden olmaktadır (Güzel 2009).

2.3. Antioksidanlar

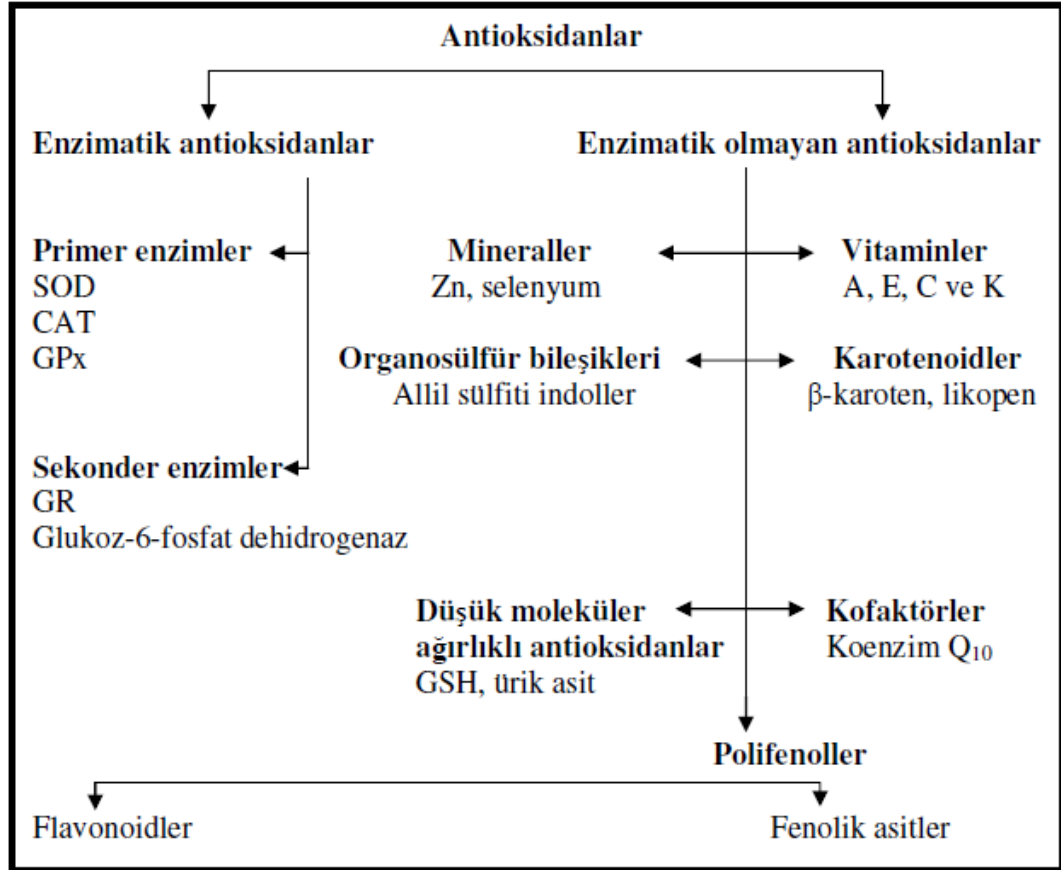
Canlı organizmalar, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında etkili olan çok sayıda korunma mekanizması geliştirmektedirler. Bu mekanizmalar gerek radikal üretimini engelleyerek, gerekse oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak etki gösterirler. Canlıların kendi vücut bütünlüklerini, serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabilmek için oluşturduğu bu koruma sistemine antioksidan savunma sistemi denir (Sağlam 2013).

Organizmanın oksidan /antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi açısından çok önemlidir. Fakat bazen oksidanlar belirli bir düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olup, denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Bu zararlı etkilerin bütünü, oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu nedenle vücuda dışardan koruyucu, engelleyici, iyileştirici özelliklere sahip antioksidanların alınması gerekir (Valko *et al.* 2007).

ROT'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan antioksidan savunma mekanizması; temizleme (scavenging) etkisi, baskılama (quencher) etkisi, onarma etkisi ve zincir koparma etkisi olmak üzere dört farklı şekilde etki gösterir (Şener ve Yeğen 2009).

Canlıların kendilerini koruyacak antioksidan savunma mekanizmaları bazı durumlarda yeterli gelmez ve eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulur. Antioksidan savunma KAT, SOD vb. enzimler aracılığıyla olursa enzimatik antioksidan savunma; tokoferol, askorbik asit vb. maddelerle olursa enzimatik olmayan antioksidan savunma olarak tanımlanır (Valko *et al.* 2007). Bu bağlamda; antioksidanlar Şekil 2.8'de de görüldüğü

gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki büyük grupta sınıflandırılabilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Antioksidanların Sınıflandırılması (Ratnam *et al.* 2006)

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

ROT'u reaktif olmayan oksijen moleküllerine dönüştüren antioksidan enzimlerin en önemli üyeleri SOD, KAT ve GPx'tir (De Zwart *et al.* 1999).

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-ZnSOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerlerdir (MnSOD). Enzimin fizyolojik fonksiyonu;

oksijeni metabolize eden hücrelerde süperoksit düzeyini düşük tutmak ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır (Valko *et al.* 2007).

Katalaz ise peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Hidroksil radikali oluşumunu hidrojen peroksiti, su ve oksijene parçalayarak engellemektedir (Valko *et al.* 2007).

SOD ve KAT, dismutazdır ve kofaktöre gereksinim duymazlar. Ayrıca reaksiyon sırasında herhangi bir enerji kaybı söz konusu değildir (Chaudière and Ferrari-Iliou 1999). Membranda yer alan en önemli hidrojen peroksit uzaklaştırıcı enzim GPx'tir (Lee *et al.* 2004). GPx, bir redüktazdır ve kofaktöre gereksinim duymaktadır (Chaudière and Ferrari-Iliou 1999).

Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Biyolojik sistemlerde LPO başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikal olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asiti zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır (Kotan 2010). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon göstermektedir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Kotan 2010).

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

ROT'a karşı antioksidan enzimlerle yapılan primer savunma yanında sekonder savunma, radikallerle reaksiyona girerek süpürücüler oluşturan küçük moleküllerle

sağlanmaktadır. Bu süpürücüler, daha az zararsız radikal türler üretirler ve antioksidan olarak davranmaktadırlar. Örneğin tokoferol, askorbat ve GSH hücresele antioksidan olarak birlikte hareket etmektedirler (Atagün 2011).

GSH önemli bir intraselüler antioksidandır. Okside edilmiş şekli, serbest radikallerinin inhibisyonunda, indirgenmiş sülfidril gruplarının stabilizasyonunda ve tokoferol ile askorbatın rejenerasyonunda görevlidir. Ayrıca GPx'in kofaktörü olarak da görev yapmaktadır (Kotan 2010).

2.4. Kullanılan Yöntemler

2.4.1. RTCA– SP (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) Sistemi

ROCHE ve ACEA biyosistem ortaklığıyla üretilmiş olan RTCA SP[®] sistemi, xCELLigence[™] adıyla ve bir önceki modeli olan Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES[®]) sistemi yerine üretilmiş sistemdir (Şekil 2.9).

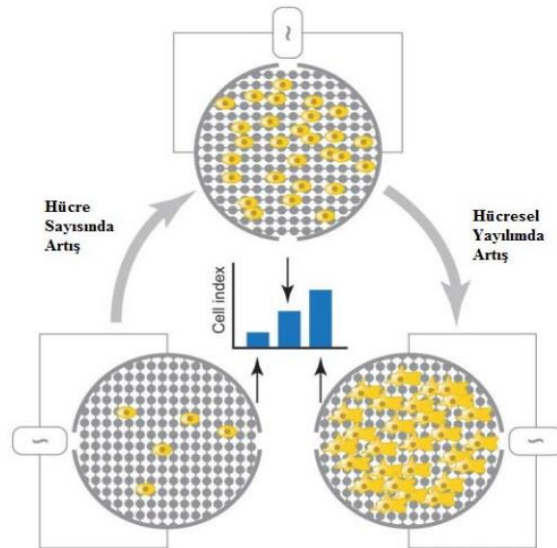


Şekil 2.9. RTCA SP[®] sistemi (Anonymous 2015h)

xCELLigence sistemi; RTCA analiz cihazı, RTCA–SP aygıtı, lisanslı yazılıma sahip bilgisayar ünitesi ve 96'lık e-pleyt olmak üzere 4 ana bileşenden meydana gelmektedir.

RTCA–SP aygıtı, standart doku kültürü inkübatörü içerisinde yer alırken, diğer bileşenler ise dışardadır. xCELLigence sisteminin özü 96’lık e-pleyt parçasında bulunmaktadır. 96’lık e-pleyt, yaygın olarak kullanılan standart pleyt yapısından tabanında bulunan altın kaplama ile farklılık göstermektedir. Ayrıca 96’lık e-pleyt kuyucukları, $5,0 \text{ mm} \pm 0,05 \text{ mm}$ çapında, $243 \pm 5 \text{ } \mu\text{l}$ toplam hacme sahip olup, içerisinde yer alan reaktif veya sıvı maddeleri düşük buharlaştırma oranı ile bilinmektedir (Urcan *et al.* 2010).

Şekil 2.10’da görüldüğü gibi sistemde hücre sayısı ve canlılığını, e-pleytlerin zeminine yerleştirilmiş mikro elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçmektedir. Empedans ölçümü, zemini altın nanopartiküllerle döşenmiş plakların, canlı hücelere elektrik iletimi yardımı ile hücre sayısı, hücre canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi vermektedir. xCELLigence sisteminin temeli mikro elektrotlar ile hücresel akım direncinin ölçülmesine dayanır. Bu cihazla, hücreler üzerine uygulanan toksik bir maddenin; sitotoksik ve genotoksik etkisinin belirlenmesinin yanı sıra hücrelerin sayısı, hücrelerin fiziksel özellikleri ve büyümenin hangi fazında olduklarıyla ilgili bilgiler elde edilmektedir (Çapık 2014).



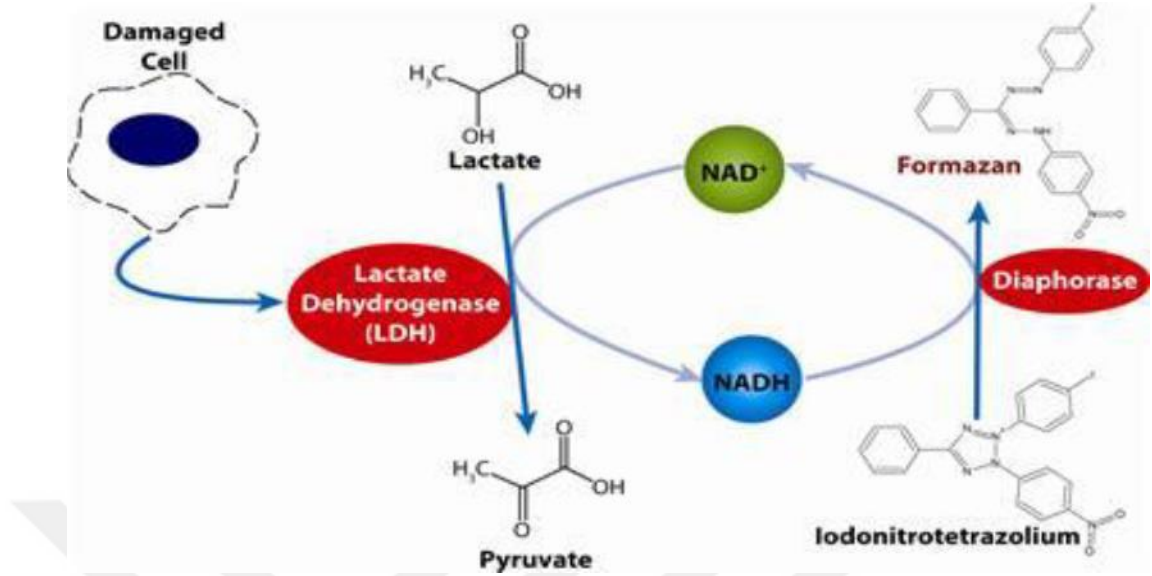
Şekil 2.10. Empedansa dayalı hücre canlılığı ve hareketliliği ölçümü (Limame *et al.* 2012)

2.4.2. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Salınımı Yöntemi

Hücre ölümünü tanımlayan en önemli yöntemler arasında, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerden hücresel içeriklerin kültür ortamına geçtiği enzimatik yöntemler bulunmaktadır. Bu testlerin hassasiyeti uygulanabilirliği güvenilirliği birbirinden farklıdır. *In vitro* modellerde kullanılan enzim salınmasına dayanan sitotoksosite testleri arasında LDH testi tercih edilmektedir. LDH testi kolay uygulanabilen ve güvenilirliği olan bir testtir. LDH testinin temel ilkesi ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarının kolorimetrik saptanmasıdır (Karadeniz 2011).

Laktat dehidrogenaz enzimi bütün hücrelerde sitoplazmalarda bulunan bir enzimdir. Pirüvatı laktik asite, laktik asiti pirüvata katalizleyen enzimdir. Normal şartlarda bu enzim hücre dışına çıkamaz. Hücre zarında bir hasar olduğu zaman enzim hızlıca hücre dışına sızar. Hücre kültürü süpernatantlarında LDH miktarı ölçümüne bağlı olarak hücrenin ne kadar hasar gördüğü belirlenebilmektedir (Fotakis and Timbrell 2006).

LDH yönteminin prensibiyle ilgili olarak sunulan Şekil 2.11'de görüleceği gibi birinci basamakta NAD⁺, LDH enzimi yardımıyla indirgenir, açığa çıkan NADH ikinci basamakta tetrazolyum tuzunun indirgenmesini sağlayarak kırmızı renkli formazan tuzunun oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan bu renk 490 Nm'de absorbans vermektedir. Bu absorbansın Eliza Okuyucuda okunmasıyla kültür ortamındaki LDH miktarı kantitatif olarak belirlenmiş olmaktadır (Şekil 2.11)(Karadeniz 2011).



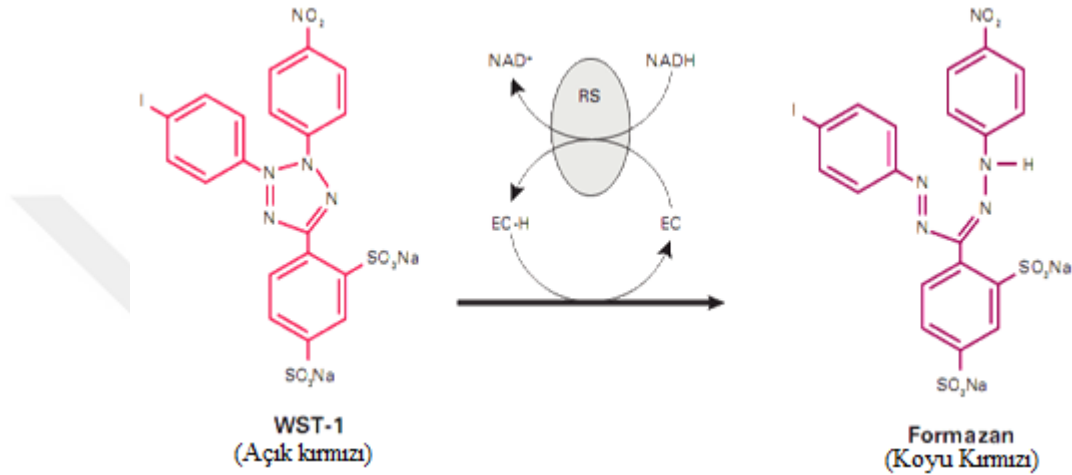
Şekil 2.11. LDH salınımı yöntemi prensibi

2.4.3. WST-1 Yöntemi

MTT testi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mossmann 1983). MTT testinin analogu olan WST-1 [(4-[3-4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3,-benzene disulfonate] testi son dönemlerde sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biridir (Butler 2004).

Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Çalışmada hedef krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrilerin matriksinde (mitokondriyal iç membranın içe bakan yüzeyinde) bulunan süksinat dehidrogenazdır. Bir tetrazolyum tuzu olan açık kırmızı renkli WST -1 boyası süksinat dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu kırmızı renkte kristaller oluşur (Şekil 2.12). Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler koyu kırmızı renkte boyanırken ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır (Ülker 2011). DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri,

konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmekte, alınan değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Butler 2004).

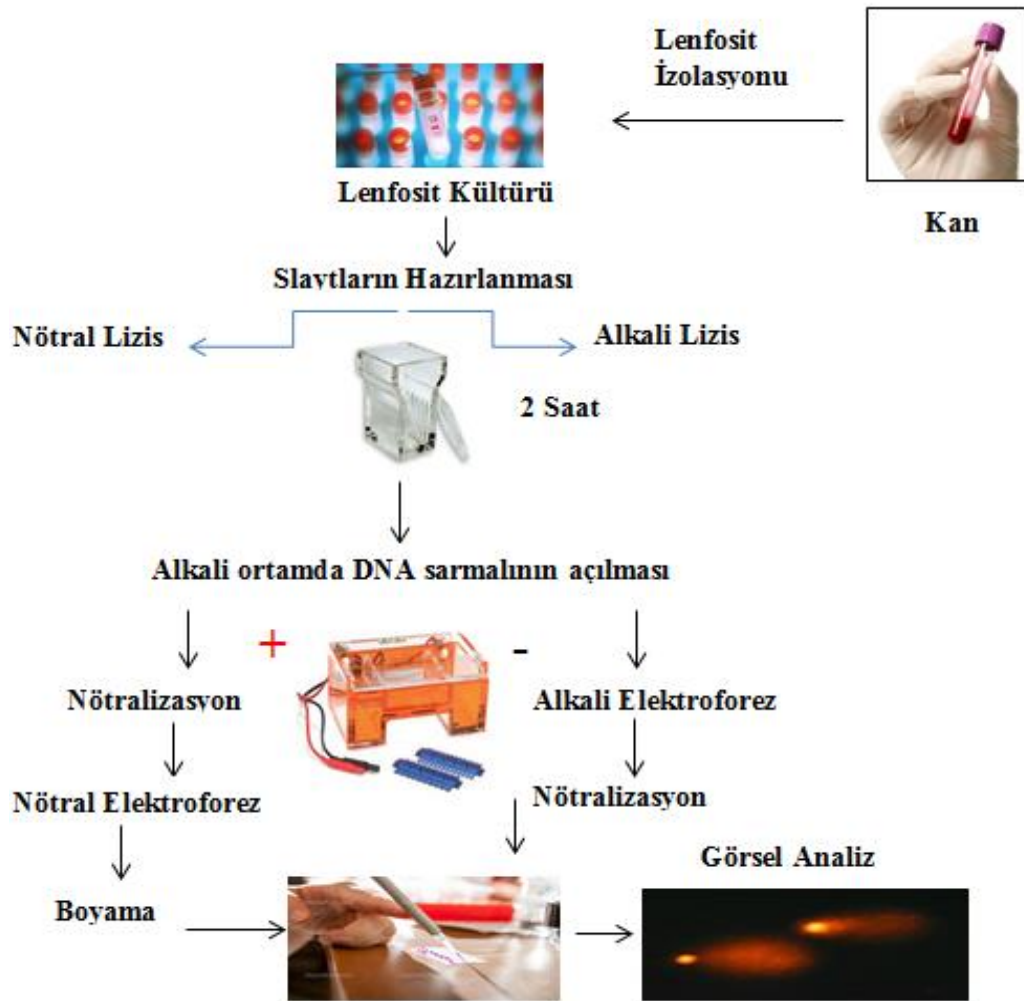


Şekil 2.12. WST-1 tuzunun formazana dönüştürülmesi

2.4.4. Komet Yöntemi

Son yıllarda ökaryotik hücrelerde farklı fiziksel ve kimyasal bileşiklerin neden olduğu DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, basit, ucuz, güvenilir ve hassas bir teknik olan tek hücre alkali jel elektroforez (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) yöntemi genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir test sistemidir. İnsan periferik lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı kuyruklu yıldız görünümünde olduğu için yöntem “Komet” ismiyle de anılmaktadır. Komet yönteminin amacı; kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA’larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Komet yöntemi hasar görmüş DNA’nın elektroforez ile çekirdekte salınması prensibine dayanmaktadır (Kurtulmuş ve Aydın 2007). Komet yönteminin uygulama basamakları Şekil 2.13’te gösterilmiştir.

Komet testinin tarihçesi incelendiğinde, ilk kez 1984 yılında Östling ve Johanson (1984) tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek üzere tek hücre jel elektroforezi olarak geliştirildiği görülmektedir. Sonraki yıllarda, Singh *et al.* (1988), DNA çift iplik kırılmalarının tespitini sağlayan nötral şartların tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermediğini gözlemlediler. Aslında, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmekteydi. Ancak nötral şartlarda proteinler DNA sarmalından tam olarak uzaklaşmadığından tek sarmal kırılmaları belirlenemiyordu. Bu gözlemlerinden sonra Singh ve arkadaşları, alkali şartlar altında ($\text{pH} > 13$) DNA tek sarmal kırılmalarının tespitine imkan veren yöntemle Komet testini daha da geliştirdiler (Singh *et al.* 1988).



Şekil 2.13. Komet yönteminin basamakları

Komet testi ökaryotik hücrelerde DNA hasarının analizi için güçlü bir genetik test olarak kullanılmaktadır (Tice *et al.* 2000). Komet testi; DNA tek ve çift sarmal kırıkları, abazik bölgeler, tamamlanmamış DNA tamir bölgeleri ve genomik DNA'daki yapısal değişiklikler gibi birçok DNA hasarının saptanmasında kullanılan hassas bir genotoksisite testidir (Tice *et al.* 2000).

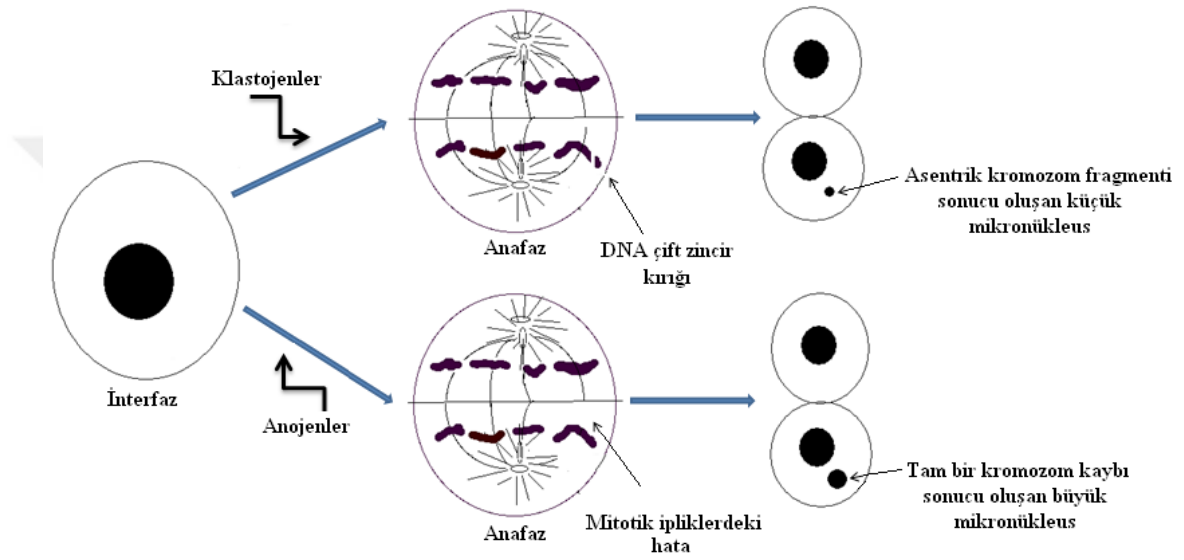
Son yıllarda Komet testi insan gözlem çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Komet, insanlarda hücre seviyesinde DNA'da farklı bileşiklerin hasar etkilerinin bulunmasında kullanılan hızlı ve oldukça duyarlı bir testtir. İnsan popülasyonlarından hazırlanan lenfositlerde gıda katkı maddelerinde lezzet verici olarak kullanılan bazı benzil türevleri (Demir vd 2010), insektisitlere maruz kalmış bitki yapraklarından izole edilen hücrelerde (Demir vd 2011), arsenik bileşikleri (Guillamet *et al.* 2004), pestisitler (Bhalli *et al.* 2009) ve ağır metaller (Hartmann and Speit 1994) tarafından indüklenen genetik hasarın taranmasında Komet testi başarı ile uygulanmıştır.

Kısaca bu yöntem, bakteriler, funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler, omurgalılar ve hayvanlar üzerinde çok rahat uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından izleyebilme hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir yöntemdir (Dhawan *et al.* 2009).

2.4.5. Mikroçekirdek Yöntemi

Mikroçekirdek (MÇ)'ler hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Bu oluşumlar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır (Demirel ve Zamani 2002). MÇ sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde

fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MÇ oluşumuna neden olmaktadır. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MÇ'ler Şekil 2.14'te gösterilmiştir (Şekil 2.14). MÇ'ler; hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun, hücre bölünmesi esnasında oluşmaktadır (Demirel ve Zamani 2002).

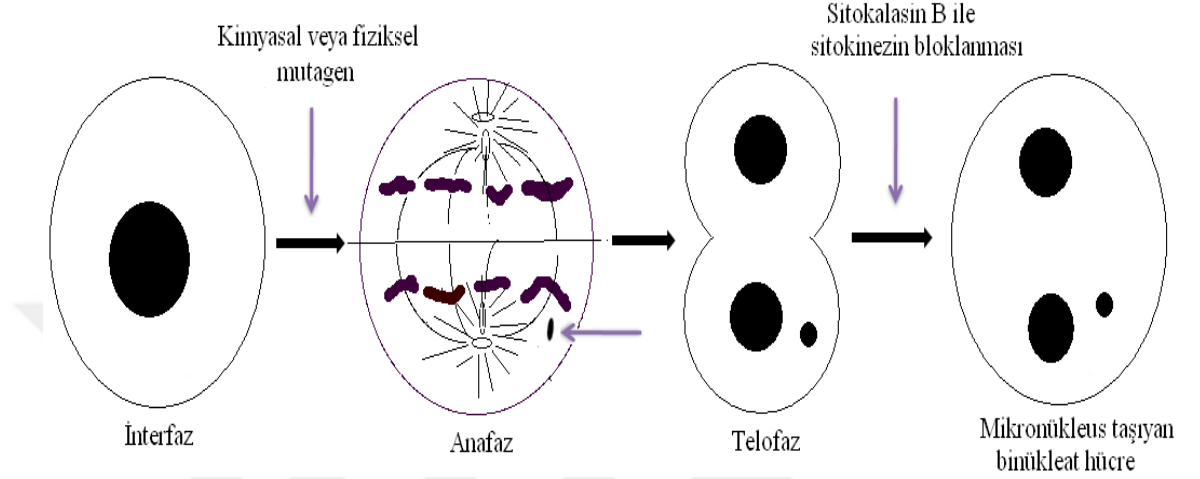


Şekil 2.14. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MÇ'ler

MÇ testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve *in vivo* ile *in vitro* olarak uygulanabilir. Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Fenech 2000; Widel *et al.* 2001).

MÇ test sisteminde özetle; lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda sitokalazin B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MÇ bulunduran hücrelerin oranı tespit

edilmektedir (Demirel ve Zamani 2002). Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MÇ içeren binükleat hücrenin oluşumu Şekil 2.15'te gösterilmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MÇ içeren binükleat hücrenin oluşumu

Sitokinezi bloklanmış hücrelerde binükleat hücreler ve MÇ sayımında şu kriterlere dikkat edilmesi gerekmektedir (Heddle and Countryman 1976).

- Hücreler çift çekirdeğe sahip olmalı ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
- MÇ çapı ana çekirdeğin 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
- MÇ'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.
- MÇ'ler ana çekirdekten açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.
- Boya alma yoğunluğu ana çekirdek ile aynı olmalıdır.
- Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler sayılmalıdır.

MÇ testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların; hücre genomu ve canlılığı üzerine etkilerinin analizinde başarıyla kullanılmaktadır (Demirel ve Zamani 2002). MÇ testi başlıca; kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin ve her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, kanserden korunmada

ve kanserin izlenmesinde bir biyoizlem testi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Choy 2001; Demirel ve Zamani 2002). MÇ testi sigara, pestisitler, nanomateryaller, gıda katkı maddeleri ve diğler birçok kimyasal madde, parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerdendirebilmek için de kolaylıkla kullanılan tekniklerden birisidir (Seligmann *et al.* 2003; Huang *et al.* 2010).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda genel olarak kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal materyaller Markaları	
Apigenin	SIAL, A3145
Asetik Asit	Merck, 100063.2511
Baicalin	SIAL, 94121
Sığır Serum Albumini	Merck, 810037
Dimetilsülfoksit	Merck, K25358243
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium	Gibco ^R
Düşük Kaynama Dereceli Agar	Sigma, A4018
Etilendiamin tetraasetik asit	Sigma, ED2SS
Ellajik Asit	SIAL, 14668
Etidyum Bromür	Sigma, 1239458
Fetal Sığır Serumu	Biochrom, S0113
Fitohemoglutamin	Bio. Industries, 12-006-1H
Fosfat Tampon Tabletleri	Sigma, D5652
Giemsa Boyası	Merck, 109204
Hidroklorik Asit	Merck, 139-43-7
Hidrojen Peroksit	Merck, 138-43-6
Histopaque	Sigma 1077-1
İnsan Göbek Kordonu Damar Endotel Hücreleri	*ATCC (PCS 100010™)
L-Glutamin	Bio. Industries, 03-020-1B
Luteolin	SIAL, 72511

Çizelge 3.1. (devam)

Kimyasal materyaller Markaları	
Karbon Tetraklorür	SIAL, 289116
Ksantin	Sigma, X0626
Ksantin Oksidaz	Sigma, X1875
Kromozom Medyum B	Biol. Industries, 01-198-1B
Metanol	SIAL, 322415
Naringenin	Aldrich, W530098
Nitrotetrazolium Blue klorür	SIAL, N6876
Normal Kaynama Dereceli Agar	Sigma, A7174
Penisilin+Streptomisin	Gibco, 15140
Potasyumklorür	SIAL, 746436
Potasyumdihidrojenfosfat	SIAL, P5655
RPMI-1640	Bio. Industries,01-106-1B
Sitokalazin B	Sigma, C6762
Sodyumfosfatdibasik	SIAL, S7907
Sodyumkarbonat	SIAL, 791768
Sodyumklorür	Merck, 101540
Sodyumhidroksit	Sigma, ED2SS
Sodyum Lauril Sarcosinat	Sigma, L5125
Tannik Asit	SIAL, 403040
Tiyobarbitürik Asit	SIAL, T5500
Tripan Mavisi	Sigma, T6146
Trisma Base	Sigma, T1503
Triton X-100	Sigma, 9002931
WST-1 Kit	Roche (Germany)

* Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve model bilgileri Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların listesi

Cihazlar Modelleri	
Azot Tankı	Termo, Electron Corporation
Buzdolabı	Arçelik, 5223 NHEY A
Cam Mezür	Isolab, 015.01.100
Cam Şale	Isolab, 073.01.001
CO ₂ İnkübatörü	CO ² Incubator Thermo
ELISA Mikroplaka	Reader BioTek-Power Wave, Winooski,
Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific, Owl EasyCast B1A
Etüv	Memmert, UN55
Flask	Sigma, C7231
Faz Kontras İvert Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100
Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat, INFINITY-1000
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica / AREC
Hassas Terazi	AND GR-200
Hemositometre	Marienfeld, C350000
Kuyucuklu Lam	Cell Biolab, STA-353
Kültür Tüpleri	Cellstar, 164160
Mikrodalga Fırın	Altus, MD 564
Mikrosantrifüj Tüpü	Eppendorf, 078.03.003
Mikroskop	Leica, DM 5500 B
pH Metre	Crison, MM 41
Saf Su Cihazı	mpMINIpure DEST up
Santrifüj Cihazı	Thermo Scientific, SL 16R
Su Banyosu	Jenotech, BS - 11
Steril Kabin	Esco, Sentinel-Gold
Vortex	Velp Scientifica, F202A0173
xCELLingence	Roche ve ACEA Biosciences
96 Kuyucuklu Levha	Sigma, C3606

3.2. Yöntem

3.2.1. Sitotoksisite Testleri

3.2.1.a. Hücre Kültürleri

Fenolik bileşiklerin (Apigenin, Baicalin, Ellajik Asit, Luteolin, Naringenin ve Tannik Asit) sağlıklı hücre hattı üzerindeki etkilerini kontrol etmek için insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) seçildi. Azot tankında -196°C 'de saklanan stok hücreler çıkarıldı ve çözümleri sağlandı. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süzüntü kısmı atılan hücreler 25 ml'lik flaslara %10 luk FBS ile birlikte aktarıldı. %5'lik CO_2 bulunan ışiksiz ortamda 24–48 saat pasajlama yapıldı. Daha büyük flaslara aktarım yapıldıktan sonra 8 ml PBS ile yıkama yapılmak suretiyle ölü ve atık hücreler uzaklaştırıldı. Polilizin tabakasına sahip flaskların hücreleri bırakması için 2–3 ml tripsin eklendi ve 2–3 dk bekletildi. Flaskta yer alan hücreler ters mikroskopta incelendikten sonra tripsinin toksik etkisini ortadan kaldırmak için 3 ml FBS eklendi ve hücreler falkon tüpüne alındı. 5 dk 2000'rpm de santrifüjden sonra süzüntü atıldı ve tüpe 1 ml'ye kadar DMEM eklendi. 20 μl hücre ile 20 μl tripan mavisi karışımı hemositometreye yüklenip hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sonrası 96 kuyucuklu pleytlerin her kuyucuğuna 1×10^6 hücre/ml hücre aktarıldı. Bu sayının 2 katına ulaşması için 24 saat inkübasyon yapıldı ve mikroskopta gelişim gözlemlendi.

3.2.1.b. Fenolik Bileşiklerin Eklenmesi

Her bir kuyucuğa kuyucuktaki son derişimi 25, 50, 100 ve 200 μM olacak şekilde fenolik bileşiklerden (AP, BA, EA, LU, NA, TA) ilave edilerek 37°C 'de %5'lik CO_2 'li ortamda 3 gün inkübe edildi. Kültür ortamlarına eklenen fenolik bileşiklerin konsantrasyonları daha önce yapılan araştırmalarda çalışılan konsantrasyonlar esas alınarak hesaplandı (Leung *et al.* 2005; Hwang *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Noel *et al.* 2006; Kim *et al.* 2009; Soyocak vd 2011).

3.2.1.c. RTCA – SP (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi)

Hemositometre yardımıyla hesaplanan hücre sayısı/ml bilgileri esas alınarak hücreler 3 tekrarlı olarak seyreltilmiş sayılarda e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 µL hacminde ekildi. Ekim işlemi esnasında plakanın solundan sağına doğru 200 µL hacmindeki hücrelere seri seyreltme uygulandı. Besiyerinden kaynaklanan hücre endeksi değişiminin kontrolü için hücre içermeyen besiyeri kuyusu kontrol olarak kullanıldı. RTCA-SP cihazı, yazılımı aracılığıyla 72 saat boyunca her 15 dakikada bir hücre endeksini ölçecek şekilde ayarlandı. 72 saat sonunda hücre büyüme profili elde edildi.

3.2.1.d. WST-1 Analizi

Fenolik bileşiklerin (AP, BA, EA, LU, NA, TA) HUVEC üzerinde hücre proliferasyonunun artış veya azalışını belirlemek için ticari WST-1 kiti kullanıldı (Sulic *et al.* 2005).

Kit İçeriği;

- WST-1 ve elektron bağlama solüsyonları
- Dilüe edilmiş PBS solüsyonu

Uygulama

- 1) 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ oranına sahip inkübatörde 24 saat inkübe edilmiş ve içerisinde 2x10⁶ hücre/ml şeklinde hücre yoğunluğuna sahip 96 kuyucuklu mikroyeğit inkübatörden alınarak kuyucuklardaki süpernatantlar uzaklaştırıldı.
- 2) Kuyucuklara negatif kontrol grubu hariç belirlenen konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µM) fenolik bileşikler eklendi.
- 3) Negatif kontrol kuyucuklarına ise 100µl %10'luk FBS (9ml DMEM 1ml FBS) eklendikten sonra maddelerin hücreler üzerindeki etkisini görmek için 24 ve 48 saat

inkübasyonda bekletildi. 24 saat ve 48 saat sonra inkübasyondan alınan hücreler ters mikroskopta morfolojik olarak incelenerek uygulama yapılacak optimum zaman dilimi belirlendi.

4) Bu aşamada sarı renkli WST-1 boyası, tetrazolium halkasının parçalanması sonucu mavi mor formazona dönüştü. İnkübasyondan çıkarıldıktan sonra ELISA’da 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri hesaplandı.

5) Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Kapuci vd 2014).

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örneklere ait absorbans değeri}}{\text{Kontrole ait absorbans değeri}} \times 100$$

3.2.1.e. LDH Analizi

Fenolik bileşiklerin (AP, BA, EA, LU, NA, TA) HUVEC üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için “Sitotoksosite Belirleme Kiti (LDH; Roche)” kullanıldı. Bu yöntemde ölü hücrelerden açığa çıkan LDH miktarı kolorimetrik olarak ölçüldü. İnkübasyon süresinin ardından kültür kaplarından süpernatantlar toplanarak ELISA plağına aktarıldı. Her bir süpernatant örneğinden 100'er ml hacimde örnek 96 kuyucuklu ELISA plağına aktarıldı. Her bir kuyucuğa 100 ml LDH reaksiyon karışımı eklendi. Pozitif kontrol olarak %2'lik Triton X-100 çözeltisi kullanıldı. ELISA okuyucusuna yerleştirilen plaktan 490 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Referans dalga boyu olarak 620 nm seçildi. Her bir kuyucuğa ait absorbans değerleri yazdırıldı. Bulunan değerlerden background absorbans değeri çıkarılarak her kültür koşuluna ait LDH salınımını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Örnekler alındıktan sonra kültür plağı santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her kuyucuğa 100 ml %1'lik Triton-X100 solüsyonu eklendi. Bir saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyon sonunda her bir kuyucuktan alınan 100'er ml örnek ile LDH testi tekrarlandı ve her kültür koşuluna ait hücre içi LDH miktarını gösteren absorbans değerleri elde edildi. Her bir kültür koşulu için hücre ölümü yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Kapuci vd 2014).

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{\text{Örneklere ait absorbands değeri} - \text{Negatif kontrole ait absorbands değeri}}{\text{Pozitif kontrole ait absorbands değeri} - \text{Negatif kontrole ait absorbands değeri}} \times 100$$

3.2.2. Genotoksisite Testleri

3.2.2.a. Komet Yöntemi

Komet test sistemi için Singh ve arkadaşlarının (Singh *et al.* 1988) protokolü alınıp modifiye edilerek kullanıldı.

a. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Boyama çözeltisinin hazırlanması

Önce stok etidyum bromür çözeltisi hazırlandı. Bunun için, 10 mg etidyum bromür 50 mL distile suda çözündürülüp, çözelti şişesi alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklandı. Stok boyama çözeltisi kullanılacağı zaman 1/9 oranında distile su ile seyreltildi. Hazırlanan seyreltik boyama çözeltisi de folyoya sarılarak karanlıkta saklandı.

Elektroforez tamponunun hazırlanması

200 g NaOH'u 500 mL distile suda çözerek stok NaOH çözeltisi hazırlandı. Buna ilave olarak, 14.89 g EDTA 200 mL distile suda çözülerek stok EDTA çözeltisi hazırlandı. Bu iki stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Bir ölçek elektroforez tamponu için 30 mL NAOH çözeltisi, 5 mL EDTA çözeltisi karıştırılarak son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Tampon pH'ının 13'ten fazla olması sağlandı.

Fosfat hamponunun hazırlanması

PBS tableti 990 mL distile suda çözümlenip, pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında bekletildi.

Nötralizasyon tamponunun hazırlanması

48.5 g Tris (0.4 M) tartılıp 800 mL distile su içerisinde çözümlendi. Çözeltinin pH'ı HCL ile 7,5'a ayarlandı ve son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Stok lizis çözeltisinin hazırlanması

146.1 g NaCl (2.5 M), EDTA 37.2 g (100 mM) ve Tris 1.2 g (10 mM) 900 mL distile suya konuldu ve çözünmesi için karıştırıldı. Çözeltinin pH'ı 10 M NaOH ile pH= 10'a ayarlanarak oda sıcaklığında saklandı. Stok lizis çözeltisi kullanılmadan önce her 100 mL hacim için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edildi.

b. Donör Seçimi

Sağlıklı 25 ile 30 yaş arasında 2 erkek ve 2 kadından oluşan gönüllü olarak deneye katılmak isteyen toplam 4 donör seçildi. Donörler sigara kullanmayanlar arasından seçildi. Son 6 ay içerisinde herhangi bir nedenle antibiyotik, X-Ray almadıkları, bilinen veya tanımlanan akut veya kronik bir rahatsızlıklarının olmadığı sözlü beyanları ile kabul edildi. Donörlerden deneye başlanacağı saatte kan alındı. Komet ve MÇ test sistemlerinde aynı donörlerden alınan kan örnekleri çalışıldı.

c. Lenfosit İzolasyonu

Lenfositler fikor fansite fantrifüjleme yöntemiyle heparize kandan izole edildi. İlk olarak 1 ml periferik kan heparinize tüp içine alındı. Bir santrifüj tüpü kullanılarak PBS ile eşit miktarda kan seyreltilti. Üzerine 600 µL histopaque eklendi. Tüp 800 g'de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. En üstteki serum tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra bir alttaki bulutumsu görünümde olan tabaka dikkatli şekilde boş falkon tüpüne alındı ve 5 mL PBS ile karıştırıldı. Tüp 2500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün altında kalan hücre pelleti tüpün alt kısmına sertçe vurularak tekrar çözüldü. Daha sonra tüp 1 ml RPMI-1640 medium ile dolduruldu. Tüp yavaşça karıştırıldı. Steril pipet kullanılarak 10 µL (yaklaşık 10.000 lenfosit) örnek bir tüpe alındı. Bu tüpe 20 µL tripan mavisi solüsyonu eklendi ve hemositometreye yüklenerek hücre sayısı hesaplandı.

d. Slaytların Hazırlanması

Slaytlar çalışmadan 1 gün önce hazırlandı. Lamlar sabunlu suyla iyice steril edildi. Lamlar durulandıktan sonra metanolden geçirildi. 50 ml PBS çözeltilisinde %1,0'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) hazırlandı. NMA tam çözünmesi amacıyla mikrodalga fırında kısa bir süre bekletildi. Mikrodalga fırından çıkartılan NMA'dan lam üzerindeki her bir kuyucuğa 80 µl damlatıldı. Bu haliyle çalışmada kullanılmak üzere oda sıcaklığında neme maruz kalmayacak şekilde kapalı ortamda bekletildi. 50 ml PBS çözeltilisinde %1,0'lik düşük erime dereceli agaroz (LMA) hazırlandı. Hazırlanan LMA çözeltilisi 5 ml'lik hacimlerle falkon tüplerine konuldu ve +4°C'de saklandı.

e. Deney Düzeneginin Oluşturulması ve Lenfosit Kültürü

Her bir konsantrasyon için 1 mL fetal sığır serumu (FBS) içermeyen besiyeri hazırlandı ve ependorflara konuldu. Daha sonra besiyeri içerisine aşağıda belirtilen maddeler eklendi. Bu deney düzenegi 4 donör için tekrarlandı. Fenolik bileşiklerden EA, NA ve

TA'nın sitotoksik etkilerinden dolayı belirtilen konsantrasyonlara ilave olarak 4, 8 ve 12.5 μM 'lık konsantrasyonlar da çalışıldı.

Kültür 1: Besiyeri + Lenfosit

Kültür 2: Besiyeri + Lenfosit + 5 μM CCL_4

Kültür 3: Besiyeri + Lenfosit + 50 μM FB

Kültür 4: Besiyeri + Lenfosit + 5 μM CCL_4 + 25 μM FB

Kültür 5: Besiyeri + Lenfosit + 5 μM CCL_4 + 50 μM FB

Kültür 6: Besiyeri + Lenfosit + 5 μM CCL_4 + 100 μM FB

Kültür 7: Besiyeri + Lenfosit + 5 μM CCL_4 + 200 μM FB

Ependorflar 37°C 'de 3 saat kapalı hücre kültürüne alındı. Lenfositler inkübasyondan çıkarıldıktan sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları atıldı. Pellet 100 μL PBS içerisinde süspanse edildi.

5 ml'lik hacimlerle falkon tüplerine konmuş olan %1,0'lik LMA çözeltisi buzdolabından çıkartılıp mikrodalga fırında çözünmesi sağlandı. Çözünen LMA 37°C 'lik etüvde bekletildi. Daha sonra LMA çözeltisinden 100 μL alınarak 100 μL PBS içerisinde süspanse edilen pellete eklendi. Agar katılaşmadan hemen pipetaj yapılarak lenfositlerle karıştırıldı. Bu son karışımdan 80 μL alınarak önceden hazırlanmış olan slaytlara yayıldı. Üzeri lamelle kapatılıp 10 dakika buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkartılan slaytların üzerinden lamel yavaşça kaldırıldı ve 90 μL LMA eklendi. Tekrar lamelle kapatılan slaytlar 25 dakika kurumaya bırakıldı. Tüm bu işlemlerin sarı ışıktaki yapılmasına özen gösterildi.

Slaytlar kurduktan sonra lameller dikkatlice kaldırılıp dikey cam şaleye yerleştirildi. Tüm slaytları kaplayacak şekilde lizis (çözündürme) çözeltisi eklenerek şalenin ağzı parafilmle kapatıldı. Bu şekliyle buzdolabında 3 saat bekletildi. Bu işlemle, hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı.

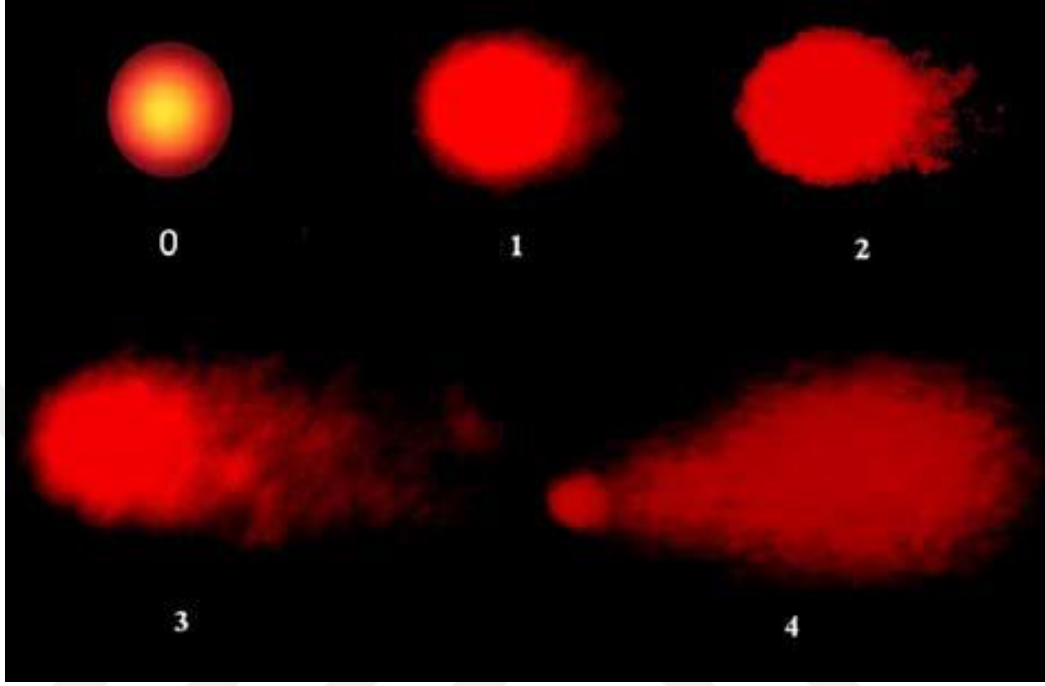
Lizis aşamasından sonra buzdolabından çıkartılan slaytlar elektroforez tankında yan yana yerleştirildi. Tank daha önceden hazırlanmış ve pH'ı 13'ten fazla olan elektroforez çözeltisiyle dolduruldu. Tüm slaytların çözeltiyle kaplanmış olması ve hava kabarcığının oluşmamış olmasına dikkat edildi. Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika bekletildi. Sonrasında DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 24 voltluk elektriksel alanda 30 dakika boyunca yürütüldü. Bu işlemlerin tamamı sarı ışıkta yapıldı.

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve alkali tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 5 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı.

f. Boyama

Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama yapılarak Kometler sayıldı. Sayımı o anda yapılamayan slaytlar oda sıcaklığında kurutularak nemli ortamda en fazla bir hafta bekletilebildi. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromür boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 40 büyütme floresan mikroskop ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

g. Komet Analizi ve DNA Hasarının Belirlenmesi



Şekil 3.1. Görsel skorlama tekniği ile hücrelerin sınıflandırılması

Bu yöntemde DNA hasarı floresan mikroskopla değerlendirildi. DNA’da oluşan hasarın derecesi kuyruk oluşumuna göre her bir okumada 100 hücre DNA’sı incelenerek beş kategoride sınıflandırıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA’lar 0 maksimum hasar olan DNA’lar 4 olarak değerlendirildi. Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermekte idi (Şekil 3.1)(Collins *et al.* 2004).

3.2.2.b. Mikroçekirdek Yöntemi

MÇ yöntemi için Stich ve arkadaşlarının (Stich *et al.* 1982) kullandıkları protokol alınıp modifiye edilerek kullanıldı.

a. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**Tespit solüsyonunun hazırlanması**

1/3 oranında asetik asit ile metanolun karıştırılmasıyla hazırlandı.

Hipotonik solüsyonun hazırlanması

0,560 gr KCl 100 mL distile suda çözülerek 0,0075M KCl çözeltisi hazırlandı.

Boya solüsyonunun hazırlanması

9,08 gr/L KH_2PO_4 , 14,8 gr/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$ hazırlandı. 30 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$ alınıp üzerine 40 mL KH_2PO_4 solüsyonu eklenerek pH 6,8'e ayarlandı.

Lenfosit besi yerlerinin hazırlanması ve saklanması

100 mL Kromozom Medyum B

20 mL FBS

5 mL PHA

2 mL L-Glutamin

1 mL PS

Steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış besiyerinden 6 mL konuldu.

Kullanım zamanına kadar -20°C 'de saklandı.

b. Deney Düzenekinin Oluşturulması

Daha önce hazırlanan besi yerleri -20°C 'den çıkarılarak oda ısısına gelmeleri sağlandı.

Oda ısısına gelen besi yerlerine aşağıda verilen kimyasallar, belirlenen oranlarda steril

(filtre) edilerek eklendi. Bu işlemler sonrasında belirlenen donörden alınan kan örneklerinden (her bir tüp için) 0,5 mL eklendi. Bu deney düzeneği toplam 4 donör için tekrarlandı. Fenolik bileşiklerden EA, NA ve TA'nın sitotoksik etkilerinden dolayı belirtilen konsantrasyonlara ilave olarak 4, 8 ve 12.5 μM 'lık konsantrasyonlar da çalışıldı.

Kültür 1: Besi yeri + Kan + Sitokalazin B

Kültür 2: Besi yeri + 5 μM CCL_4 + Kan + Sitokalazin B

Kültür 3: Besi yeri + 50 μM FB + Kan + Sitokalazin B

Kültür 4: Besi yeri + 5 μM CCL_4 + 25 μM FB + Kan + Sitokalazin B

Kültür 5: Besi yeri + 5 μM CCL_4 + 50 μM FB + Kan + Sitokalazin B

Kültür 6: Besi yeri + 5 μM CCL_4 + 100 μM FB + Kan + Sitokalazin B

Kültür 7: Besi yeri + 5 μM CCL_4 + 200 μM FB + Kan + Sitokalazin B

c. Lenfosit Kültürü

Donörlerden alınan periferik kan örneği ve ilgili kimyasallar ile hazırlanan 7 mL'lik hücre kültür tüpünü 72 saat 37°C 'de kapalı hücre kültürüne alındı. Kültürün 44. saatinde her bir tüpe 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sitokalazin B ilave edildi.

73. saatte kültüre edilen tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı. Pellet üzerine hipotonik solüsyonu (0,075 M KCl) eklendi ve tüpler 25 dakika 37°C 'lik etüvde bekletildi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 1/3 oranında soğuk asetik asit metanol karışımı eklenerek tespit işlemi gerçekleştirildi.

Tespit işlemi toplam üç kez tekrarlandı. Tespit işlemi sonunda süpernatantın 1–1,5 mL'lik alt kısmı hariç diğer bölümü atıldı. Dipte kalan pellet çalkalanarak resüspanse edildikten sonra soğuk tespit içinde bekleyen lamaların her birine 5–6 damla bu süspansiyondan damlatılarak 5 lam hazırlandı. Hazırlanan preparatlar kurumaları için, üç gün oda sıcaklığında bekletildi.

d. Boyama

Üç gün oda ısısında kurutulan preparatlar giemsa boyası ile 10 dakika boyandı. Boyama işleminden sonra preparatlar distile sudan geçirilerek fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı.

e. MÇ Sayımı ve Değerlendirilmesi

Mikroçekirdek frekansının belirlenmesinde çekirdek bölünmesini tamamlamış, fakat sitoplazma bölünmesini gerçekleştirememiş 'binükleer' denilen çift çekirdekli hücreler değerlendirilmeye alındı. MÇ sayısını belirlemek amacıyla her bir dönöre ait preparatlarda tüm uygulama grupları ve kontrollerinde sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan binükleer toplam 1000 hücre incelenerek mikroçekirdekli olanlar saptandı. Preparatlar ışık mikroskopunda incelenirken önce 10'luk objektifte sayım yapılacak alan belirlendi sonra 40'luk objektif ile hücreler tek tek sayıldı. Binükleer hücre ile mikroçekirdek ayırımı Fenech (2000)'e göre yapılarak bir çekirdekli, üç çekirdekli veya daha fazla çekirdekli hücreler değerlendirme dışı bırakıldı. MÇ frekansı (MÇ/1000 hücre) hesaplandı.

3.2.3. Biyokimyasal analizler

KAT, SOD ve MDA ölçümü için 72 saat kültüre edilen tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı analiz için kullanıldı.

3.2.3.a. Katalaz (KAT) aktivitesi ölçümü

Katalaz (KAT) enzim aktivitesinin ölçümü Aebi'nin yöntemine göre çalışıldı (Aebi 1984). Hidrojen peroksit (H_2O_2) maksimum absorbansı 240 nm'de vermektedir. KAT ölçümü; H_2O_2 'in katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması esasına dayanır ve bu da kendini UV spektrofotometrede absorbans azalması şeklinde gösterir. Absorbanstaki

bu azalma katalaz enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Numune ilavesi ile absorbans azalması her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile okundu. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

3.2.3.b. Superoksit Dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü

Cu, Zn-SOD aktivitesi hücre kültürü süpernatantında Sun ve arkadaşlarının tarif ettiği metod kullanılarak ölçüldü (Sun *et al.* 1988). 100 ml numune üzerine 2.45 mL assay reaktifi (0.3 mM xanthine, 0.6 mM Na₂EDTA, 0.15 mM NBT, 0.4 M Na₂CO₃ (sodyum karbonat), 1 g/L sığır serum albumin (BSA) katıldı. Ksantin oksidaz (50 ml, 167 U/L) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksit anyon radikalleri tarafından NBT'nin indirgenmesi ile oluşan absorbans değişimi 560 nm de ölçüldü. NBT'nin indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesi 1 enzim ünitesi olarak tanımlandı. Cu, Zn-SOD aktivitesi mg proteinde SOD ünitesi olarak ifade edildi.

3.2.3.c. Malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçümü

MDA seviyesi hücre kültürü süpernatantında Ohkawa tarafından tanımlanan metoda göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Ohkawa 1979). Toplam hacim 4 mL olacak şekilde %8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), %20 asetik asit, %0.9 tiyobarbitürik asit karışımına 0.2 mL numune eklenerek 1 saat 95°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve üzerine 1 mL distile su ile 5 mL n-butanol/piridin (15:1, v/v) eklendi. Numuneler 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 532 nm'de absorbansı ölçüldü ve standart grafik yardımı ile MDA konsantrasyonu hesaplandı. 1.1.3.3-tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. MDA konsantrasyonu µmol/L olarak ifade edildi.

3.2.4. İstatistiksel değerlendirme

RTCA-SP'nin istatistiksel değerlendirilmesi, xCELLigence cihazındaki grafiklerin kullanılması suretiyle belirlendi. Zaman, konsantrasyon ve madde arasındaki istatistiksel farklılıklar ($\bar{x} \pm SE$) analiz edildi.

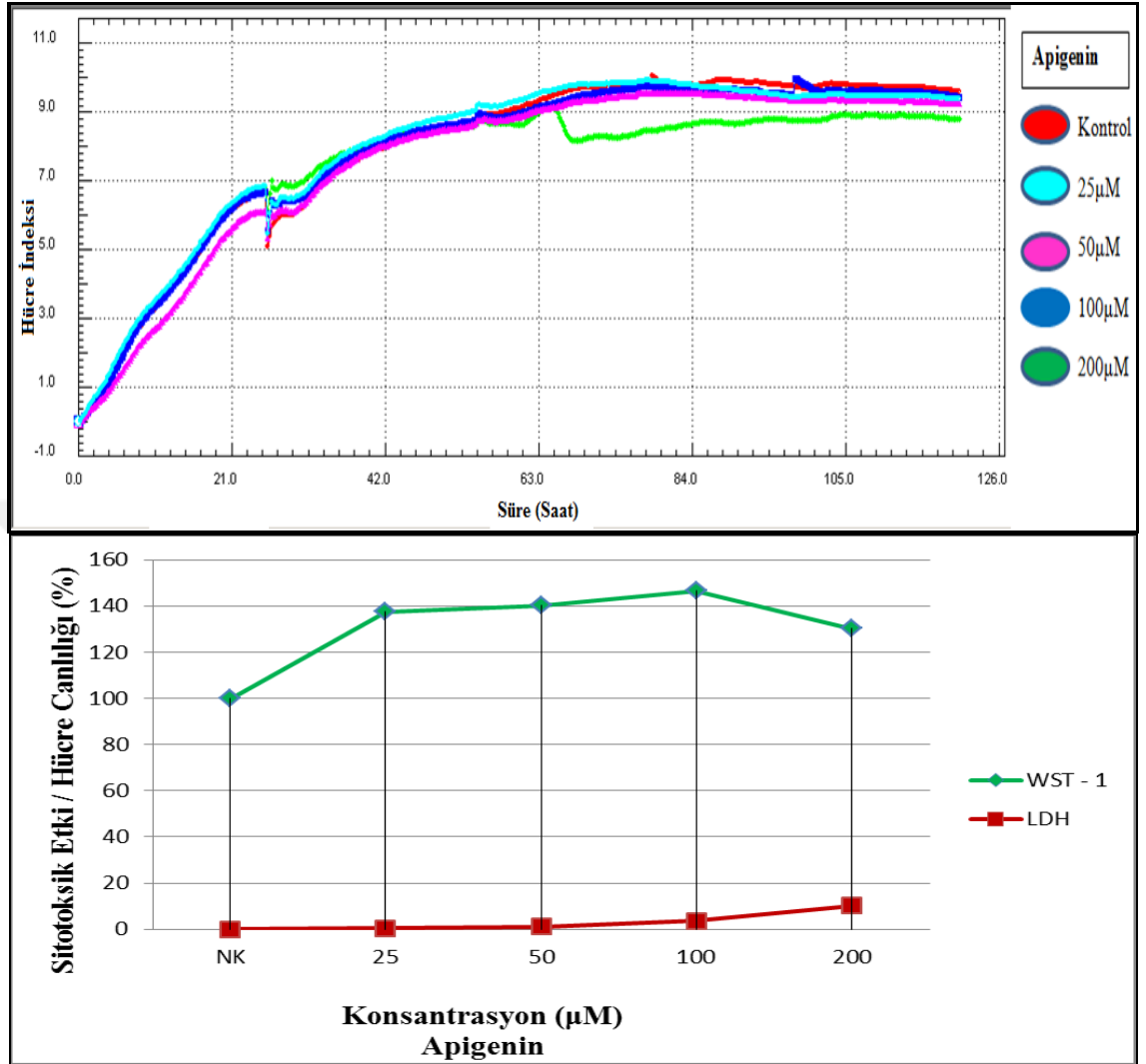
MÇ, Komet, LDH, WST-1 ve Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirilmesi Duncan testi kullanılarak hesaplandı. Fenolik bileşiklerin ve CCL₄'ün dört farklı test sisteminde (MÇ, Komet, LDH ve WST-1'in) etkilerini belirlemek için SPSS 18,0 analiz programında varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Fenolik bileşiklerin konsantrasyonları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem seviyesinde belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. LHD ve WST -1 Bulguları

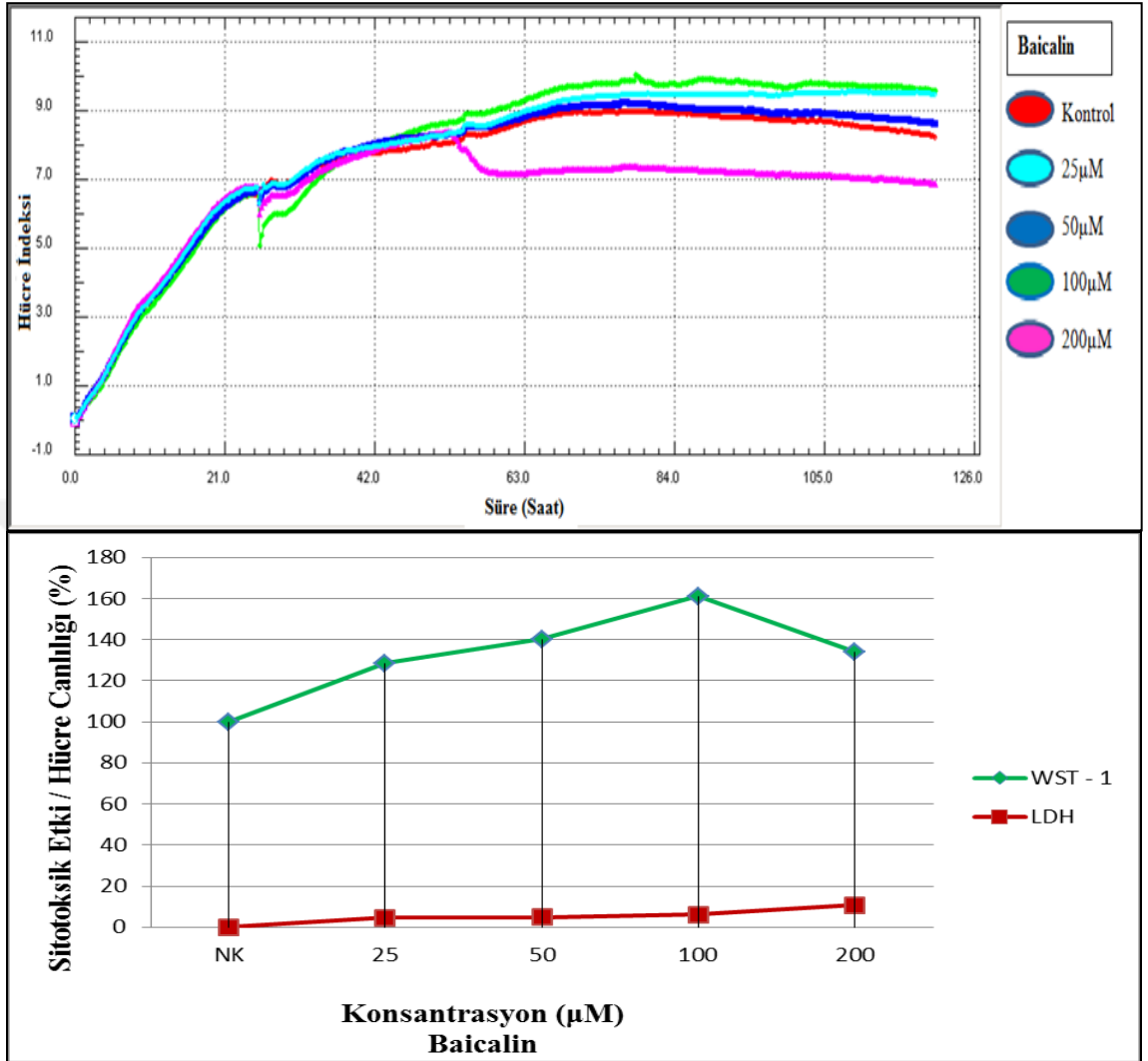
LHD ve WST -1 testlerini uygulamadan önce RTCA – SP (Tekli Plaka Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) sistemi ile insan sağlıklı endotel hücreleri üzerinde (HUVEC) fenolik bileşiklerin (Apigenin, Baicalin, Ellajik Asit, Luteolin, Naringenin, Tannik Asit) optimum konsantrasyonları ve uygulama süreleri belirlenmeye çalışıldı. RTCA-SP testi sonucunda HUVEC hücrelerinin optimum uygulama süresi 48. saat ve hücre sayısı 2×10^6 hücre/ml olarak belirlendi. Bu çalışmadan sonra LHD, WST -1 ve RTCA test sistemleri kullanılarak fenolik bileşiklerin 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarının sitotoksosite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri belirlendi. Fenolik bileşiklerin sitotoksosite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine olan etkileri aşağıdaki grafik ve şekillerde gösterilmiştir.

HUVEC hücrelerinde RTCA– SP sistemi kullanılarak AP'ın farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi gözlenmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra HUVEC hücrelerine farklı konsantrasyonlarda ve 3'er tekrar şeklinde AP eklenmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi AP proliferatif etki sergileyerek kullanılan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığını artırmıştır (Şekil 4.1).



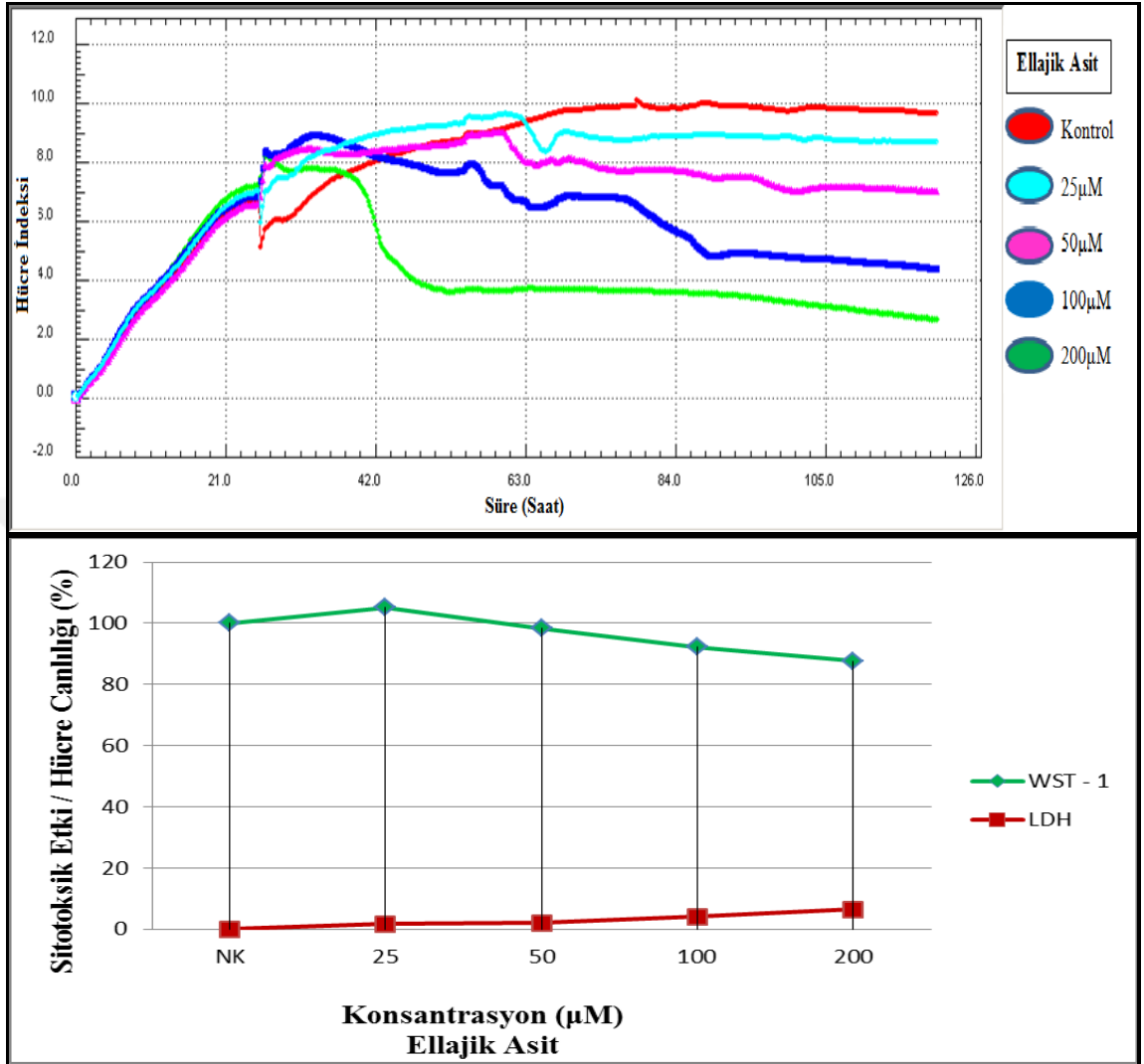
Şekil 4.1. AP'nin sitotoksosite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

HUVEC üzerine BA ile yaptığımız uygulamalarımızda, RTCA sonuçlarına göre kontrole kıyasla BA'nın 25, 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının proliferatif etki göstererek hücre indeksi ve canlılığında artışa neden olduğu, 200 µM'lık uygulamanın ise konsantrasyon artışına bağlı olarak LDH salınımını artırdığı ve hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2).



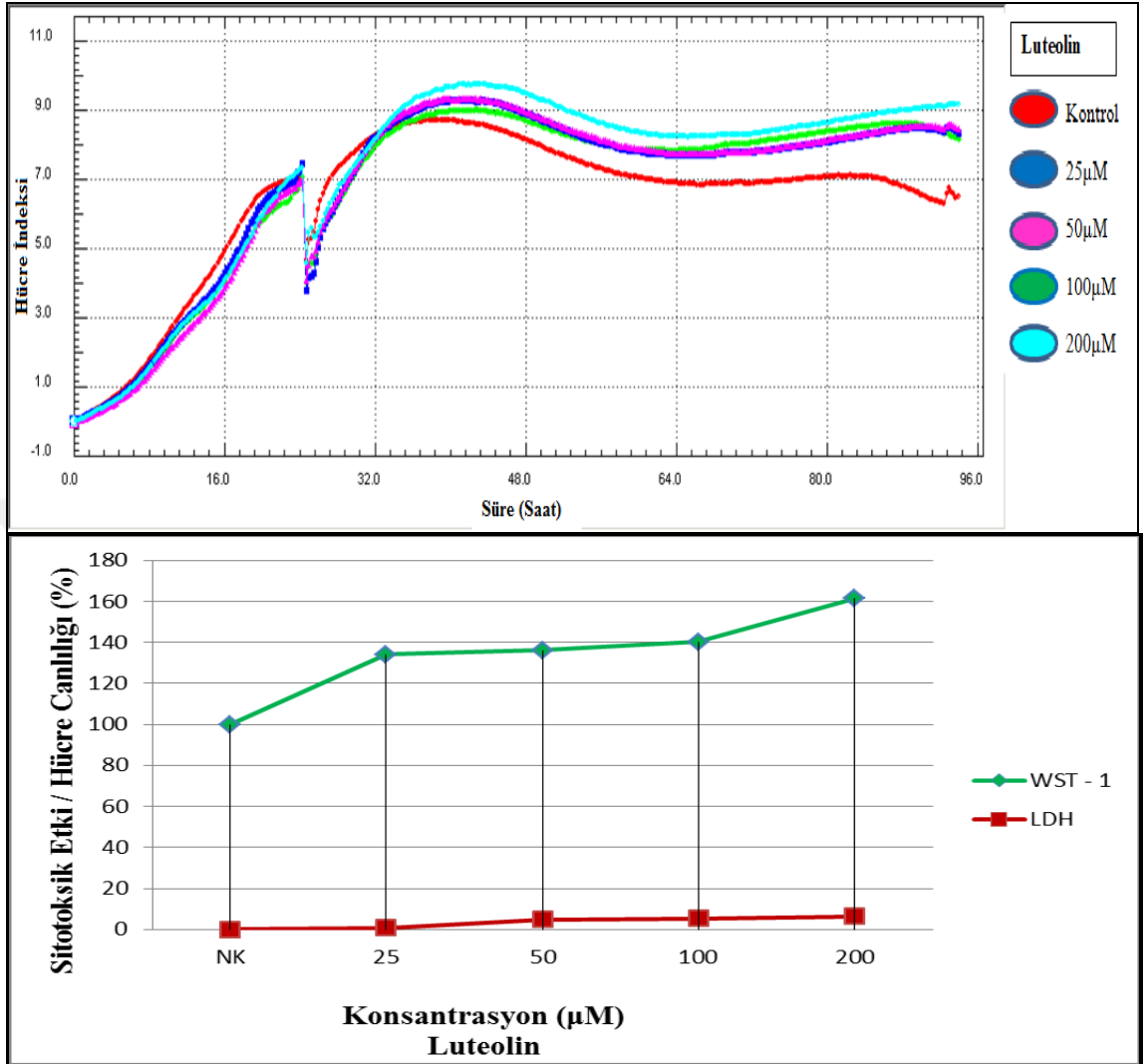
Şekil 4.2. BA'nın sitotoksikite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

EA'nın farklı konsantrasyonlarının HUVEC üzerine proliferatif ve sitotoksik etkileri incelendiğinde; 25, 50, 100 ve 200 µM'lık uygulamalarında mitokondriyal aktivite de zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde bir azalma belirlenmiştir. EA'nın 25 µM'lık konsantrasyonu dışında diğer uygulamalarında (50, 100 ve 200 µM) hücre sayısı ve canlılığında düşüş meydana getirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.3).



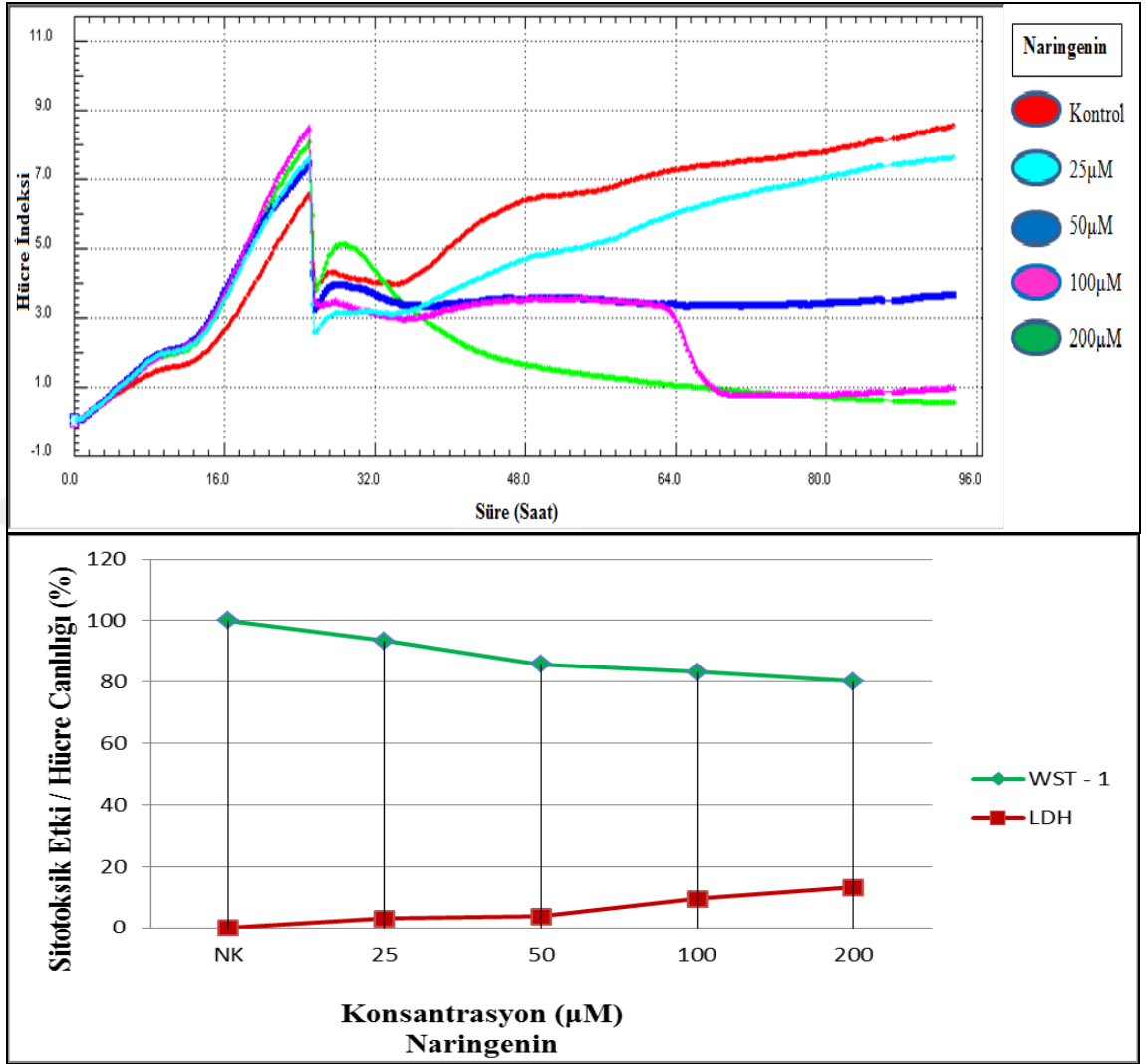
Şekil 4.3. EA'nın sitotoksiste, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

LU'nun hücre canlılığına olan etkisinin değerlendirildiği çalışmamız da, LU'nun proliferatif etki göstererek kullanılan tüm konsantrasyonlarında hücre sayısı ve canlılığında artış sağladığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).



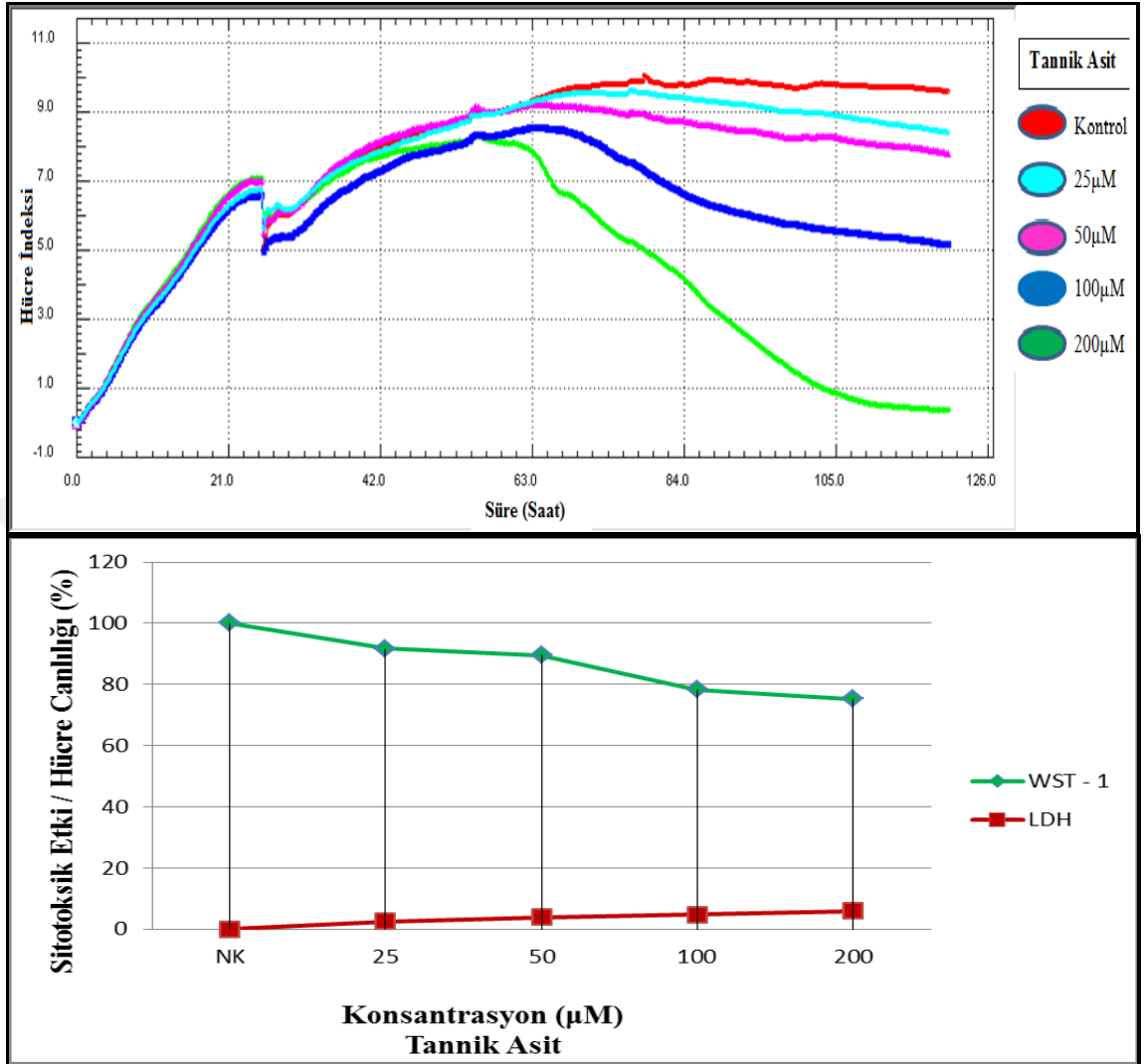
Şekil 4.4. LU'nun sitotoksikite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

NA ile yaptığımız uygulamalarımızda, RTCA verilerine göre kontrolle karşılaştırıldığında, NA'nın HUVEC üzerine artan konsantrasyonlarına bağlı olarak sitotoksik etki sergilediği, LDH salınımını artırdığı, hücre sayısı ve canlılığında ise düşüş meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. NA'nın sitotoksosite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

İnkübasyon ortamına TA'nın ilave edilmesiyle, NA'da olduğu gibi artan konsantrasyon uygulamalarına paralel bir şekilde bütün konsantrasyonlar hücre indeksinde ve hücre canlılığında azalmaya sitotoksitede ise artmaya neden olmuştur (Şekil 4.6).

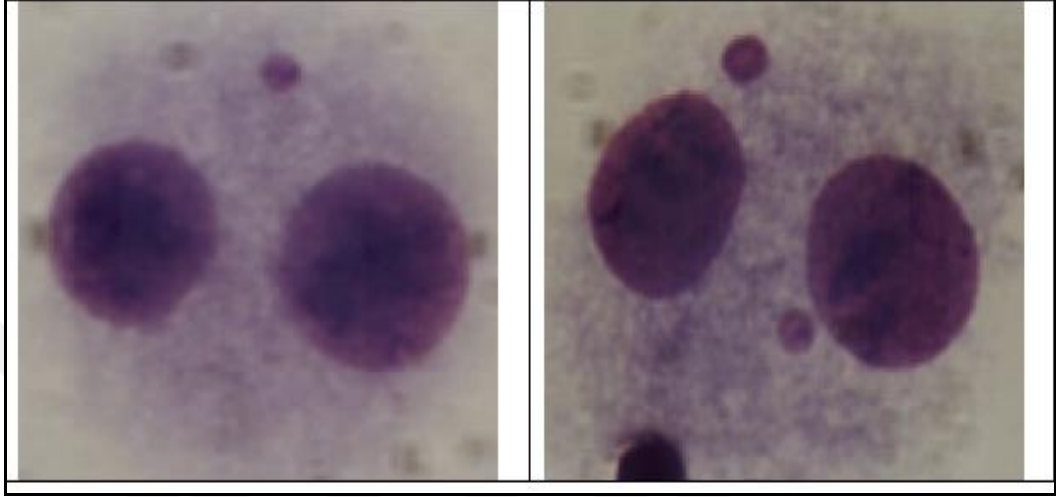


Şekil 4.6. TA'nın sitotoksisite, hücre canlılığı ve hücre sayısı üzerine etkileri

4.2. Mikroçekirdek (MÇ) Bulguları

Bu test sisteminde, fenolik bileşiklerden AP, BA ve LU'nun 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarının; EA, NA ve TA'nın ise 4, 8, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarının antijenotoksik ve antimutajenik etkileri belirlenmeye çalışıldı. Fenolik bileşiklerin antijenotoksik ve antimutajenik etkileri aşağıdaki çizelgelerde gösterilmiştir. Kültür ortamlarına CCL₄ eklendiğinde MÇ frekansı 4.53±0.19 bulunmuş olup bu değer kontrol (2.34±0.03) ile kıyaslandığında CCL₄'ün MÇ'yi indüklediği görülmüştür. MÇ frekansları CCL₄'e bağlı olarak artmış ve bu değer (4.53±0.19)

istatistiksel açıdan anlamlı görülmüştür ($p<0.05$). Şekil 4.7’de mikroçekirdek içeren binükleer hücrelerin mikroskop görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Mikroçekirdek içeren hücreler

Sadece CCL₄ eklenen kültürlerin, AP’ın 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarındaki MÇ frekansları karşılaştırıldığında sırası ile 4.10 ± 0.47 ; 3.64 ± 0.43 ; 2.71 ± 0.62 ve 2.90 ± 0.41 olarak bulunmuştur. CCL₄’ün MÇ frekansını arttırıcı etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, AP’ın 100 µM’lık konsantrasyonundaki uygulamalarının istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. AP uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03^a
CCL ₄ (5 µM)	4.53 ± 0.19^e
AP (50 µM)	2.36 ± 0.38^a
AP (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	4.10 ± 0.47^d
AP (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.64 ± 0.43^c
AP (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.71 ± 0.62^{ab}
AP (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.90 ± 0.41^b

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.

Fenolik bileşiklerden BA ile yapılan çalışma sonuçlarını değerlendirdiğimizde BA'nın, CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellediğini görebiliriz. CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından konsantrasyonlar arasında kıyaslama yapıldığında, BA'nın 100 µM konsantrasyonundaki uygulamalarında en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (p<0.05)(Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. BA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03 ^a
CCL ₄ (5 µM)	4.53 ± 0.19 ^e
BA (50 µM)	2.50 ± 0.14 ^a
BA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	4.10 ± 0.13 ^d
BA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.56 ± 0.23 ^c
BA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.63 ± 0.21 ^{ab}
BA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.82 ± 0.33 ^b

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, CCL₄ beraber ile EA'nın 4, 8, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarındaki uygulamalarında, 200 µM'lık uygulama sitotoksik etki göstermiştir. Diğer konsantrasyon uygulamalarında ise sadece CCL₄ ile muamele edilen kültür ortamına nazaran MÇ oranının azaldığı gözlenmiştir. EA'nın 12.5 µM'lık konsantrasyonundaki MÇ oranı düşüşü anlamlı bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. EA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03 ^a
CCL ₄ (5 µM)	4.53 ± 0.19 ^e
EA (50 µM)	3.20 ± 0.24 ^b
EA (4 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.41 ± 0.11 ^c
EA (8 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.37 ± 0.17 ^{bc}
EA (12.5 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.14 ± 0.15 ^b
EA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.91 ± 0.36 ^{cd}
EA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	4.11 ± 0.28 ^d
EA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	4.23 ± 0.26 ^c
EA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	-----

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

LU ile yaptığımız çalışmalarımızda, MÇ frekansı CCL₄'e bağlı olarak artmıştır. LU'nun tüm uygulamalarında, CCL₄'ün MÇ frekansını arttırıcı etkisinin engellendiği görülmektedir (Çizelge 4.4). Elde edilen sonuçlar arasında MÇ frekansları birbiriyle oranlandığında LU'nun CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini azaltması açısından en etkili sonucun 200 µM'lık uygulamalarında olduğu tespit edilmiştir. LU'nun 100 µM'lık konsantrasyonu ile kontrol grubu arasında MÇ değeri ortalamaları birbirine yakın ve farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu gözlenmiştir (p<0.05)(Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. LU uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03 ^a
CCL ₄ (5 µM)	4.53 ± 0.19 ^e
LU (50 µM)	2.35 ± 0.36 ^a
LU (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.11 ± 0.22 ^d
LU (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.70 ± 0.52 ^{bc}
LU (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.32 ± 0.17 ^a
LU (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.21 ± 0.49 ^a

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Fenolik bileşiklerden NA'nın çalışılmasıyla ilgili Çizelge 4.5'te çıkan sonuçlar dikkate alınarak, CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından karşılaştırma yapıldığında, NA'nın 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarının sitotoksik etki gösterdiği, diğer uygulamalarının ise CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle 8 µM'lık konsantrasyonunun MÇ sayısındaki azaltıcı etkisi anlamlı bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. NA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03 ^a
CCL ₄ (5 µM)	4.53 ± 0.19 ^e
NA (50 µM)	2.85 ± 0.09 ^{bc}
NA (4 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.72 ± 0.14 ^b
NA (8 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2.51 ± 0.16 ^a
NA (12.5 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.23 ± 0.23 ^c
NA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.84 ± 0.06 ^{cd}
NA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	3.93 ± 0.04 ^d
NA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	-----
NA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	-----

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

TA'nın 200 μM 'lık konsantrasyon uygulanmasında sitotoksik etki görülmüştür. 4, 8, 12,5, 25, 50 100 μM 'lık uygulamalarındaki MÇ frekansları karşılaştırıldığında ise sırası ile 2.71 ± 0.09 , 2.81 ± 0.13 , 2.92 ± 0.08 , 3.26 ± 0.05 , 3.52 ± 0.14 ve 4.32 ± 0.35 olarak bulunmuştur. Bu sonuçları değerlendirdiğimizde TA'nın, CCL_4 'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellediğini belirtebiliriz. CCL_4 'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellemesi açısından konsantrasyonlar arasında karşılaştırma yapıldığında, TA'nın 4 μM 'lık konsantrasyonlarındaki uygulamalarında diğer konsantrasyonlardan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. TA uygulandığında belirlenen MÇ frekansları

Uygulama Grupları	MÇ / 1000 Hücre
Kontrol	2.34 ± 0.03^a
CCL_4 (5 μM)	4.53 ± 0.19^e
TA (50 μM)	2.97 ± 0.06^{bc}
TA (4 μM) + CCL_4 (5 μM)	2.71 ± 0.09^{ab}
TA (8 μM) + CCL_4 (5 μM)	2.81 ± 0.13^b
TA (12.5 μM) + CCL_4 (5 μM)	2.92 ± 0.08^b
TA (25 μM) + CCL_4 (5 μM)	3.26 ± 0.05^c
TA (50 μM) + CCL_4 (5 μM)	3.52 ± 0.14^{cd}
TA (100 μM) + CCL_4 (5 μM)	4.32 ± 0.35^e
TA (200 μM) + CCL_4 (5 μM)	-----

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

4.3. Komet Bulguları

Bu test sisteminde, fenolik bileşiklerden AP, BA ve LU'nun 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarının; EA, NA ve TA'nın ise 4, 8, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarının DNA hasarı üzerine olan etkileri belirlenmeye çalışıldı. Fenolik bileşiklerin DNA hasarı üzerine olan etkilerinin istatistiksel analizi aşağıdaki çizelgelerde gösterilmiştir.

AP ile yaptığımız Komet testinde insan periferel kan lenfositlerine AP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarını, negatif kontrol olarak saf su ile pozitif kontrol olarak CCL_4 'ün uygulanmasından sonra insan periferel kan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarı Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, pozitif kontrol olarak kullanılan CCL_4 için, insan periferel kan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından kontrol grubu saf suya oranla istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir. CCL_4 'ün DNA hasarına sebebiyet veren etkisini engellemesi açısından değerlendirildiğinde, AP'nin 100 ve 200 μM konsantrasyonlarındaki uygulamalarında olumlu sonuçların alındığı ve bunun istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$)(Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. AP uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	6.80 ± 0.28^a
CCL_4 (5 μM)	115.21 ± 3.02^c
AP (50 μM)	6.90 ± 0.03^a
AP (25 μM) + CCL_4 (5 μM)	90.32 ± 4.63^d
AP (50 μM) + CCL_4 (5 μM)	71.17 ± 2.14^c
AP (100 μM) + CCL_4 (5 μM)	42.28 ± 1.75^b
AP (200 μM) + CCL_4 (5 μM)	43.19 ± 2.23^b

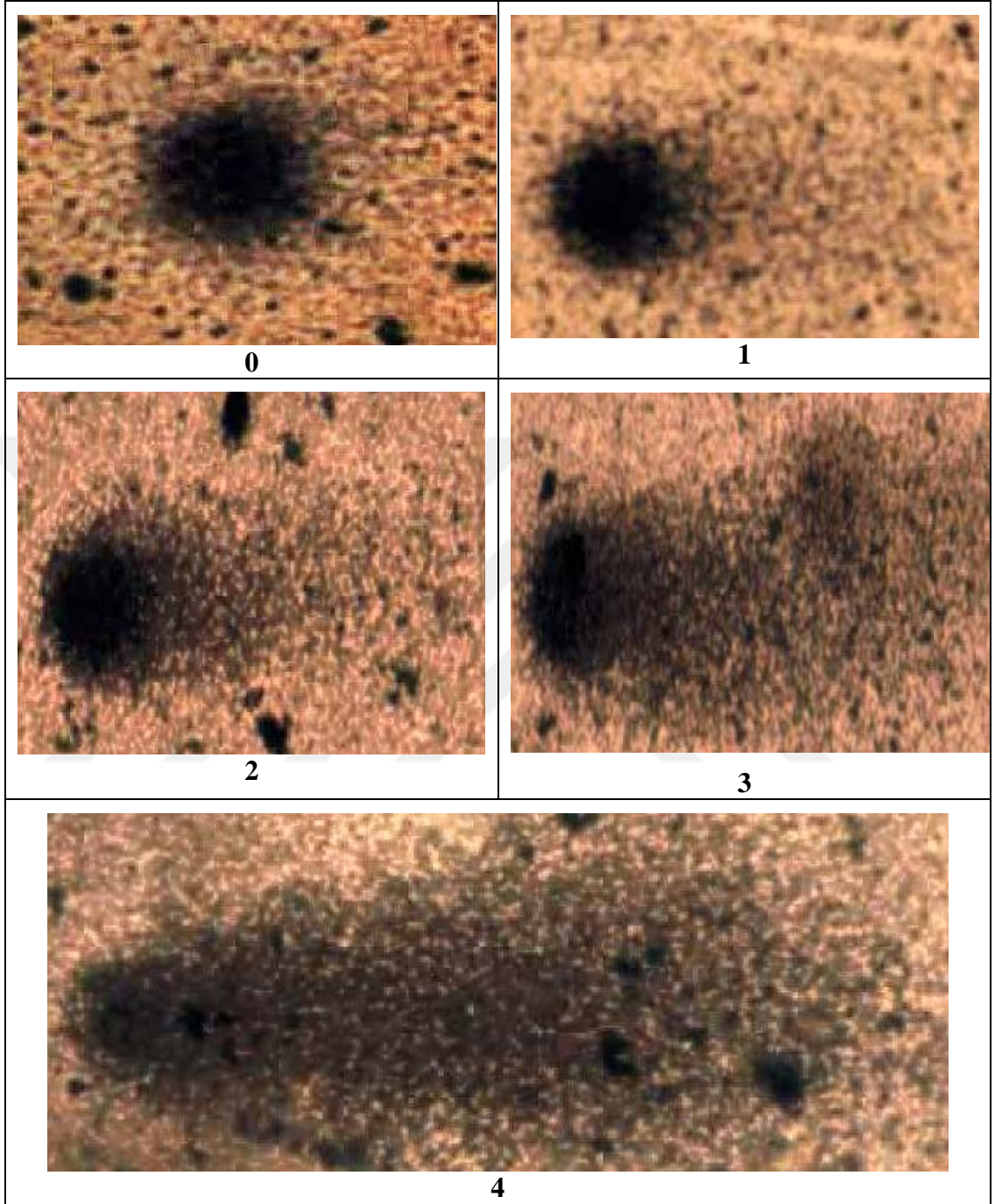
* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.

İnsan periferel kan lenfositlerine CCL_4 ile birlikte BA'nın; 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarının uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre lenfosit DNA hasar parametreleri, sadece CCL_4 'e maruz kalan grupta kontrol grubuna göre yüksek olup, BA'nın eklenmesiyle DNA hasarı düzeyleri azalmıştır. Ancak 200 μM 'lık konsantrasyon uygulamasında 100 μM 'lık konsantrasyona göre DNA hasar düzeyinde tekrar artış olmuştur. Sonuç olarak; CCL_4 'ün sebep olduğu DNA hasar düzeyini düşürmesi açısından konsantrasyonlar arasında değerlendirme yapıldığında, BA'nın 100 μM konsantrasyonundaki uygulamalarında en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir ($p < 0.05$)(Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. BA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	7.45 ± 0.38^a
CCL ₄ (5 µM)	122.10 ± 4.52^e
BA (50 µM)	9.21 ± 0.72^a
BA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	86.17 ± 3.92^d
BA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	74.43 ± 1.98^{cd}
BA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	38.62 ± 2.10^{ab}
BA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	43.19 ± 1.45^b

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.8. BA uygulandığında gözlemlenen Kometler

EA ile yapılan deneylerimizde Çizelge 4.9’da belirtilen sonuçlar elde edilmiştir. EA’nın 50, 100 ve 200 μM ’lık konsantrasyonlarında pozitif kontrole kıyasla DNA hasar seviyelerinde artış olmuştur. Bu artış EA’nın sitotoksik etkisinden kaynaklanmış olabilir. Diğer konsantrasyonları ise (4, 8, 12.5 ve 25 μM) CCL_4 ’ün neden olduğu DNA

hasar düzeylerini pozitif kontrole oranla düşürmüştür. DNA hasar düzeylerini azaltması açısından konsantrasyonlar arasında değerlendirme yapıldığında, EA'nın 12.5 µM konsantrasyonunun sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$)(Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. EA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	7.65 ± 1.14 ^a
CCL ₄ (5 µM)	109.25 ± 3.80 ^{de}
EA (50 µM)	28.13 ± 2.17 ^a
EA (4 µM) + CCL ₄ (5 µM)	63.50 ± 0.70 ^{bc}
EA (8 µM) + CCL ₄ (5 µM)	62.18 ± 0.82 ^{bc}
EA (12.5 µM) + CCL ₄ (5 µM)	60.44 ± 1.14 ^{bc}
EA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	76.05 ± 2.19 ^c
EA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	113.40 ± 3.70 ^{de}
EA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	116.25 ± 4.35 ^e
EA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	120.32 ± 2.14 ^e

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, $p<0.05$ düzeyinde önemlidir.

CCL₄ ile teşvik edilerek DNA hasarının oluşturulduğu kültür ortamlarına LU'nun farklı konsantrasyonlarının 25, 50, 100 ve 200 µM muamelesiyle elde edilen bulgular Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. LU'nun artan konsantrasyonlarına maruziyetle Komet parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($p<0.05$). CCL₄'ün neden olduğu DNA hasar düzeyini azaltması açısından konsantrasyonlar arasında karşılaştırma yapıldığında, LU'nun en güzel sonucu 200 µM konsantrasyonundaki uygulamalarında verdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$)(Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. LU uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	6.90 ± 2.72 ^a
CCL ₄ (5 µM)	118.40 ± 2.12 ^c
LU (50 µM)	6.92 ± 1.54 ^a
LU (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	76.38 ± 3.27 ^d
LU (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	59.18 ± 1.36 ^c
LU (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	35.40 ± 2.58 ^b
LU (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	32.80 ± 2.15 ^b

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Fenolik bileşiklerden NA'nın Komet test sisteminde denenmesi sonucu ortaya çıkan sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde; CCL₄'ün insan periferel kan lenfositlerinde meydana getirdiği DNA hasarlarının NA'nın 4, 8, 12.5, 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonlarının muamelesiyle azaldığı; 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarında ise DNA hasar seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. DNA hasar düzeylerini düşürmesi bakımından 8 µM'lık konsantrasyonda alınan sonuçlar önemli bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. NA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	7.40 ± 2.62 ^a
CCL ₄ (5 µM)	116.32 ± 2.13 ^e
NA (50 µM)	42.20 ± 4.16 ^b
NA (4 µM) + CCL ₄ (5 µM)	86.13 ± 4.16 ^d
NA (8 µM) + CCL ₄ (5 µM)	81.18 ± 4.16 ^c
NA (12.5 µM) + CCL ₄ (5 µM)	98.12 ± 4.16 ^d
NA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	105.24 ± 1.82 ^d
NA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	108.73 ± 0.40 ^d
NA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	118.10 ± 0.03 ^e
NA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	120.50 ± 1.20 ^e

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

TA'nın uygulanmasıyla gözlemlenen DNA hasar düzeyleri incelendiğinde, TA'nın 200 µM'lık konsantrasyonunun DNA hasarını artırdığı, diğer konsantrasyonlarının ise pozitif kontrole oranla DNA hasarını düşürdüğü belirlenmiştir. Özellikle TA'nın 4 µM'lık konsantrasyonundan alınan sonuçlar DNA hasar seviyesini düşürmesi açısından önemli bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. TA uygulandığında gözlemlenen DNA hasar düzeyleri

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri
Kontrol	8.10 ± 1.70 ^a
CCL ₄ (5 µM)	124.30 ± 2.45 ^e
TA (50 µM)	39.92 ± 3.26 ^b
TA (4 µM) + CCL ₄ (5 µM)	78.30 ± 1.42 ^{bc}
TA (8 µM) + CCL ₄ (5 µM)	82.23 ± 2.13 ^c
TA (12.5 µM) + CCL ₄ (5 µM)	86.16 ± 1.19 ^d
TA (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	96.63 ± 1.82 ^d
TA (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	115.35 ± 3.80 ^e
TA (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	118.45 ± 2.35 ^e
TA (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	130.50 ± 3.51 ^e

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

4.4. Biyokimyasal Analizler

4.4.1. KAT, SOD ve MDA bulguları

Yapılan çalışmalarda sadece CCl₄ verilen grup kontrol grubuyla, CCl₄ ile birlikte fenolik bileşik verilen gruplar ise sadece CCl₄ verilen grupla karşılaştırılarak sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde sadece CCl₄ verilen grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan kontrole göre önemli ölçüde (p<0.05) KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin azaldığı, ancak MDA seviyesinin ise artış gösterdiği gözlenmiştir. Kültür ortamlarına fenolik bileşiklerin eklenmesinden sonra ise KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin artmasına karşın MDA seviyesinin düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.13 – 4.18).

Kültür ortamına CCL₄'ün mutajen madde olarak eklenmesiyle KAT ve SOD aktivitelerinin azaldığı MDA seviyesinin de arttığı gözlemlenmiştir. CCL₄ ile birlikte AP'nin 4 farklı konsantrasyonunun (25, 50, 100 ve 200 µM) muamele edilmesiyle KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerini önemli derecede artırdıkları MDA seviyesinin ise

düştüğü tespit edilmiştir. AP'ın, uygulanan konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak KAT ve SOD enzimleri de aktivitelerini artırmıştır. AP'ın, CCL₄ ile birlikte kullanılan 4 farklı konsantrasyonunun KAT ve SOD aktivitesi ile MDA seviyesi üzerine olan etkisi p<0.05 seviyesinde önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. AP'ın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (µmol / mL)
Kontrol	2385.0 ± 65.8 ^a	5,23 ± 3,34 ^a	1,73 ± 0,18 ^a
CCL ₄ (5 µM)	2004.2 ± 16.2 ^d	4,07±1,27 ^d	3,14 ± 3,12 ^d
AP (50 µM)	2382.0 ± 13.4 ^a	5,30 ± 0,12 ^a	1,70 ± 0,21 ^a
AP (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2128.1 ± 17.5 ^c	4,40 ± 2,36 ^c	2,76 ± 1,26 ^{cd}
AP (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2164.3 ± 14.7 ^c	4,59 ± 1,29 ^c	2,49 ± 1,37 ^c
AP(100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2182.5 ± 2.4 ^{bc}	4,84±2,23 ^b	2,18 ± 1,42 ^b
AP(200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2187.4 ± 1.2 ^b	4,80±1,08 ^b	2,24 ± 0,16 ^b

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14'te BA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine olan etkisi ifade edilmiştir. Verilerden anlaşılacağı üzere BA'nın artan konsantrasyon uygulamalarında; CCL₄'ün neden olduğu KAT ve SOD aktivitelerindeki azalma ile MDA seviyesindeki artışı engelleyerek KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerini artırmış MDA seviyesini ise düşürmüştür. BA'nın enzimler üzerindeki bu etkisinin p<0.05 seviyesinde önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. BA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (μ mol / mL)
Kontrol	1207.1 \pm 27.2 ^a	1,34 \pm 0,07 ^a	0,84 \pm 0,21 ^a
CCL ₄ (5 μ M)	986.3 \pm 34.7 ^d	0,72 \pm 0,02 ^d	1,20 \pm 0,08 ^d
BA (50 μ M)	1240.8 \pm 26.9 ^a	1,38 \pm 0,03 ^a	0,80 \pm 0,07 ^a
BA (25 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1178.3 \pm 22.3 ^b	1,22 \pm 0,04 ^c	1,10 \pm 0,12 ^{cd}
BA (50 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1184.6 \pm 32.7 ^{ab}	1,25 \pm 0,02 ^b	0,92 \pm 0,21 ^c
BA (100 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1189.2 \pm 1.3 ^{ab}	1,29 \pm 0,03 ^{ab}	0,86 \pm 0,02 ^{ab}
BA (200 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1175.2 \pm 1.6 ^c	1,36 \pm 0,01 ^a	0,89 \pm 0,08 ^a

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

EA'nın kullanılan tüm konsantrasyonlarında pozitif kontrole kıyasla KAT ve SOD aktivitelerini artırdığı MDA seviyesini ise düşürdüğü ve bununda istatistiksel olarak (p<0.05) önemli olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.15'te görüldüğü gibi EA'nın en etkili konsantrasyonunun ise; 12.5 μ M olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. EA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (μ mol / mL)
Kontrol	1180.2 \pm 13.6 ^a	1,28 \pm 0,12 ^a	0,89 \pm 0,16 ^a
CCL ₄ (5 μ M)	972.4 \pm 12.3 ^e	0,68 \pm 0,14 ^e	1,28 \pm 0,02 ^e
EA (50 μ M)	1070.2 \pm 11.8 ^c	1,08 \pm 0,22 ^b	0,97 \pm 0,16 ^b
EA (4 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1160.8 \pm 14.1 ^{ab}	1,19 \pm 0,22 ^{ab}	0,92 \pm 0,13 ^a
EA (8 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1174.8 \pm 10.2 ^a	1,22 \pm 0,22 ^a	0,92 \pm 0,21 ^a
EA (12.5 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1205.8 \pm 13.7 ^a	1,24 \pm 0,22 ^a	0,90 \pm 0,12 ^a
EA (25 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1140.8 \pm 10.8 ^{bc}	1,14 \pm 0,03 ^b	0,95 \pm 0,24 ^b
EA (50 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1032.3 \pm 21.4 ^d	1,05 \pm 0,05 ^{bc}	1,04 \pm 0,14 ^c
EA (100 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	980.5 \pm 10.5 ^e	0,93 \pm 0,07 ^{cd}	1,16 \pm 0,17 ^d

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

CCL₄'ün KAT ve SOD aktivitelerini azaltması MDA seviyesini artırmasına karşın, CCL₄ ile birlikte LU'nun 4 farklı konsantrasyonunun ilavesiyle KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin artırıldığı MDA seviyesinin ise düşürüldüğü belirlenmiştir. LU'nun artan konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. LU'nun KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (µmol / mL)
Kontrol	2360.2 ± 56.4 ^a	4,15 ± 1,25 ^a	1,90 ± 1,05 ^a
CCL ₄ (5 µM)	1982.8 ± 19.8 ^d	3,40 ± 0,13 ^d	2,92 ± 1,28 ^d
LU (50 µM)	2425.0 ± 18.6 ^a	4,23 ± 0,36 ^a	1,92 ± 0,06 ^a
LU (25 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2101.4 ± 32.3 ^c	3,52 ± 0,44 ^d	2,57 ± 1,08 ^c
LU (50 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2132.9 ± 25.5 ^c	3,65 ± 0,74 ^c	2,68 ± 0,15 ^{cd}
LU (100 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2148.2 ± 12.6 ^c	3,86 ± 1,16 ^b	2,76 ± 1,21 ^d
LU (200 µM) + CCL ₄ (5 µM)	2153.2 ± 2.3 ^{bc}	3,90 ± 1,23 ^b	2,74 ± 1,07 ^d

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

NA'nın çalışıldığı kültür ortamlarında ise benzer şekilde CCL₄'ün KAT ve SOD aktivitelerini azalttığı MDA seviyesini ise arttırdığı gözlenmiştir. NA'nın muamele edilmesiyle KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerini arttırdıkları MDA seviyesinin ise düştüğü belirlenmiştir. Özellikle 8 µM'lık uygulamadan en etkili sonuçlar alınmış olup, bu durum kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05)(Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. NA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (μ mol / mL)
Kontrol	1974.5 \pm 40.2 ^a	5,12 \pm 1,16 ^a	2,32 \pm 0,54 ^a
CCL ₄ (5 μ M)	1657.3 \pm 14.2 ^e	3,28 \pm 1,46 ^e	5,34 \pm 1,72 ^e
NA (50 μ M)	1890.4 \pm 22.7 ^b	4,81 \pm 0,17 ^b	2,70 \pm 1,24 ^{ab}
NA (4 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1873.4 \pm 17.7 ^b	4,96 \pm 0,17 ^{ab}	2,92 \pm 1,17 ^b
NA (8 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1904.4 \pm 28.7 ^{ab}	5,01 \pm 0,17 ^a	2,61 \pm 1,19 ^a
NA (12.5 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1821.4 \pm 23.7 ^c	4,95 \pm 0,17 ^{ab}	2,83 \pm 1,32 ^b
NA (25 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1756.2 \pm 36.8 ^d	4,38 \pm 0,10 ^c	3,60 \pm 1,14 ^c
NA (50 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	1710.4 \pm 2.3 ^{de}	4,10 \pm 0,13 ^{cd}	3,80 \pm 2,32 ^{cd}

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

CCL₄ ile birlikte kültür ortamlarına TA'nın farklı konsantrasyonları verildiğinde ise TA'nın, KAT ve SOD aktivitelerini artırdığı MDA seviyesini ise düşürdüğü tespit edilmiştir. Meydana gelen değişiklikler p<0.05 seviyesinde önemli görülmüş olup en etkili konsantrasyon 4 μ M olarak belirlenmiştir (p<0.05)(Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. TA'nın KAT ve SOD aktiviteleri ile MDA seviyesi üzerine etkileri

Uygulama Grupları	KAT (k/g protein)	SOD (U / mL)	MDA (μ mol / mL)
Kontrol	2864.2 \pm 23.5 ^a	1,18 \pm 0,16 ^a	2,03 \pm 1,12 ^a
CCL ₄ (5 μ M)	2425.6 \pm 23.8 ^e	0,56 \pm 0,32 ^e	2,78 \pm 1,15 ^e
TA (50 μ M)	2876.2 \pm 73.1 ^a	1,25 \pm 0,23 ^a	2,03 \pm 1,35 ^a
TA (4 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2745.2 \pm 26.9 ^b	1,10 \pm 0,15 ^{ba}	2,20 \pm 1,32 ^{ab}
TA (8 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2712.2 \pm 35.3 ^b	1,02 \pm 0,19 ^b	2,24 \pm 1,17 ^b
TA (12.5 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2696.2 \pm 18.7 ^{bc}	0,99 \pm 0,27 ^{bc}	2,35 \pm 1,21 ^c
TA (25 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2680.7 \pm 12.1 ^c	0,97 \pm 0,28 ^c	2,40 \pm 0,97 ^c
TA (50 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2623.8 \pm 7.5 ^{cd}	0,86 \pm 0,18 ^{cd}	2,45 \pm 1,05 ^{cd}
TA (100 μ M) + CCL ₄ (5 μ M)	2590.6 \pm 12.3 ^d	0,74 \pm 0,14 ^d	2,60 \pm 0,85 ^d

* Aynı sütunda farklı üstel harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar, p<0.05 düzeyinde önemlidir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastalıkların tedavisinde ilaç olarak bitkilerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir (Ramawat 2009). Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı sentetik ilaçların hızlı gelişimine rağmen önemini hala korumaktadır. Doğal kaynaklı ilaçların kullanım oranı gelişmiş ülkelerde %60, gelişmekte olan ülkelerde ise %4 civarındadır (TKB 2008). Halk arasında bu kadar fazla kullanılmalarıyla bilim dünyasının da dikkatini çeken bitkisel ilaçların; kanser dâhil çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir. Buna bağlı olarak günümüz antikanser ilaçlarının %60'ından fazlası ve bulaşıcı hastalıklarda kullanılan ilaçların %75'i direk veya dolaylı olarak doğal kaynaklardan üretilmektedir (Georgiev *et al.* 2009). Diğer taraftan Ülkemizin florasında 9000'in üzerinde bitki türü olduğu ve bu bitkilerin yaklaşık 1000 tanesinin ilaç ve baharat bitkileri olduğu belirtilmiştir (TKB 2008). Bu bitkilerin etkinliklerinin araştırılması; hem ülkemiz ekonomisi hem de halk arasındaki kullanımalarının güvenilirliğinin değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Bitkilerden elde edilen, *in vitro* ve *in vivo* aktiviteleri belirlenmiş farklı molekül grupları (polisakkaritler, fenolik bileşikler, terpenler, alkaloidler ve amino asitler) bulunmaktadır (Akinpelu *et al.* 2008). Diyetle alınan fenolik bileşiklerin potansiyel serbest radikal süpürücü etkili antioksidan ve antiproliferatif özellikleriyle sağlık üzerine önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Yañez *et al.* 2004; Lacikova *et al.* 2009).

Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri yapılarındaki; B – halkalı katekol grubu ile C4'ün okso grubuyla etkileşen C2 ve C3 çift bağından kaynaklanmaktadır (Miguel 2009). B – halkalı katekol grubu serbest radikallere hidrojen/elektron donörü olarak, C2 ve C3 çift bağı ise metal iyonlara yani geçiş metallerine bir bağlanma noktası olarak işlev görmektedir (Rice-Evans *et al.* 1996; Mira *et al.* 2002). Bu antioksidan özelliklerine bağlı olarak hücrel bileşenleri oksidatif hasara karşı koruyabilmekte ve bu sayede oksidatif stresle ilişkili birçok dejeneratif hastalığın riskini azaltabilmektedirler (D'Archivio *et al.* 2007). Farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar; fenolik bileşiklerin kalp damar hastalıkları, kanser ile osteoporozun engellenmesindeki

rollerini ve diyabet ile nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalıktaki koruyucu etkilerini göstermektedir (Scalbert *et al.* 2005).

Günümüzde bitkisel ürünlerin birçoğunun yapı ve etkinlikleri halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Dahası, pek çok bitkisel antioksidan maddenin toksik özellikleri ve insan sağlığına muhtemel zararlarıyla ilgili literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Her ne kadar bazı bitkisel ürünlerin *in vitro* bakteri sistemlerinde ve hücre kültürlerinde mutajenik olabildikleri, DNA hasarını teşvik ettikleri bildirilmişse de tersini belirten sonuçlar da bulunmaktadır.

Bitkilerden elde edilen fenolik bileşikler antioksidan aktiviteleri sayesinde reaktif oksijen bileşiklerinin zararlı etkilerine karşı organizmanın korunmasında ve radikal hasarına bağlı bozuklukların tedavisinde görev almaktadırlar. Bununla birlikte bitkilerde sık bulunan fenolik bileşiklerin hem antioksidan hem de prooksidan etkileri olabileceğinden dolayı bu bileşiklerin kimyasal özelliklerinin ve aktivitelerinin çok iyi bilinmesi gerektiği bildirilmiştir (Hadi vd 2007).

Yukarıda belirtilenlerden hareketle bu tez çalışmasında Komet, mikroçekirdek, LDH ve WST -1 yöntemleri kullanılarak, doğal ürünlerde bulunan ve son yıllarda önemi ile kullanımları artan fenolik bileşiklerden AP, BA, EA, LU, NA ve TA'nın antijenotoksik, antioksidan ve sitotoksik özellikleri belirlenmiştir.

Araştırmalarımızda kültür ortamlarına pozitif kontrol olarak CCL₄'ün uygulanmasından sonra insan periferik kan lenfositlerinde MÇ yönteminde kontrol gruplarına kıyasla CCL₄'ün MÇ sayısını artırdığı belirlenirken, Komet yönteminde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametreleri açısından CCL₄'ün kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir (Çizelge 4.1 - 4.12). Ayrıca kültür ortamına CCL₄'ün eklenmesiyle KAT ve SOD aktivitelerinin azaldığı MDA seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13–4.18).

CCL₄ ile birlikte AP'in farklı konsantrasyonlarının uygulanmasıyla CCL₄'ün olumsuz etkileri giderilmiştir. AP'in Komet, MÇ ve biyokimyasal analizlerinde CCL₄'ün olumsuz etkilerini giderme açısından en etkili konsantrasyonunun 100 µM'lık uygulaması olduğu belirlenmiştir. AP'in sitotoksik etkileri sağlıklı HUVEC hücrelerinde RTCA– SP sistemi kullanılarak LDH ve WST -1 yöntemleriyle belirlenmiştir. Araştırmamızda AP'in artan konsantrasyon uygulamalarıyla alınan yüzde sitotoksosite cevapları arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir. Genel anlamda konsantrasyonlara alınan cevaplar bakımından Komet ve MÇ yöntemlerinde paralellik ve LDH ile WST -1 yöntemleri arasında korelasyon bulunmuştur. AP'in 25, 50, 100 ve 200 µM'lık uygulamalarında; 200 µM'lık uygulama hücre canlılığını diğer konsantrasyonlara oranla düşürürken 25, 50 ve 100 µM'lık uygulamalar proliferatif özellik göstermiştir (Şekil 4.1). Çalışmamızda, proliferatif özellik açısından en etkili AP uygulamasının 48. saatte 100 µM konsantrasyonda olduğu bulunmuştur (p<0.05).

AP'in etinil estradiolün indüklediği KA ve KKD oranlarını önemli bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (Siddique *et al.* 2010). Sharma (2013) insan lenfosit hücrelerinde mitomisin C tarafından artırılan KKD ve MÇ sayılarını AP'in düşürdüğünü ve AP'in, hücreleri mitomisin C'nin genotoksik etkilerine karşı koruduğunu bildirmiştir. Ali *et al.* (2014) çalışmalarında AP'in karaciğerde ROS'ları temizleme özelliği ile lipid peroksidasyonunu azalttığını belirterek AP'in antigenotoksik ve hepatoprotektif madde olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, AP'in antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antienflamatuar, antiproliferatif ve antiprogresyon özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Shukla and Gupta 2006; Li *et al.* 2010; Estruch *et al.* 2013; Choi *et al.* 2014a).

Bununla birlikte; Rithidech *et al.* (2005) AP'in, insan lenfosit hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarının genotoksik olmadığını ancak kontrol grubuna oranla MÇ frekanslarında artışa neden olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada AP'in Çin hamsteri V79 hücrelerinde 100 µM'lık uygulamalarının klastojenik etki sergilediği ve AP'in, klastojenik etkisinin DNA'ya interkalasyon yapabilme özelliğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Snyder and Gillies 2002). Literatürde çoğu ökaryotik ve

prokaryotik sistemde birçok flavonoidin genetik hasarı indüklediği (Stopper *et al.* 2005) ve flavonoidlerin tüketim seviyelerine bağlı olarak pro-apoptotik aktivite sergileyebilecekleri bildirilmiştir (Noel *et al.* 2006). Bizim deneylerimizde ise; AP'ın 200 μM 'luk uygulaması 100 μM 'lık konsantrasyona kıyasla MÇ sayısında artış sağlamış, LDH testinde düşük miktarlarda sitotoksik özellik göstermiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Farklı çalışmalarda AP'ın, hücre canlılığına olan etkisi değerlendirilmiş olup, Farah *et al.* (2003) 24. saatte 40 μM , Wang *et al.* (2000b) 48. saatte 40 μM , 60 μM ve 80 μM , Kuntz *et al.* (1999) 72. saatte 130.6 μM , Chung *et al.* (2007) ise 48. saatte 60 μM ve 80 μM AP konsantrasyonlarında, hücre canlılığındaki azalmayı anlamlı bulmuşlardır. Bulgularımızı destekler nitelikte AP'ın düşük sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Tsuji and Walle 2008; Zhang *et al.* 2009).

Sharma (2013), AP'ın mutajenik aktivitesinin olmadığını, seçici özelliğe sahip olduğunu, normal hücreleri etkilemeden kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini ve apoptozisi başlattığını bildirmiştir.

Araştırmacılar, insan endotel hücrelerinde yapılan bir deney sonucunda AP'ın, TNF'yi önlediğini (Panes *et al.* 1996), tümör hücresi çoğalmasını ve metastazını inhibe ettiğini (Lindenmeyer *et al.* 2001) bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, AP'ın muamele edilmesiyle, tümör nekroz faktörü (TNF) ile Nükleer Faktör kappa B (NF)- κB 'nin baskılandığı rapor edilmiştir (Choi *et al.* 2004).

AP insan mide kanser hücre hatlarında (SGC -7901) apoptozisi teşvik ederek hücrelerin büyümesini ve kolon oluşumunu engellemiştir (Wu *et al.* 2005). Bunun yanı sıra, nöroblastoma (SH-SY5Y) (Das *et al.* 2006), lösemi (THP-1, U937, HL60, Jurkat, K562, NIH3T3) (Vargo *et al.* 2006) ve insan meme kanseri (MDA-MB-453) (Choi and Kim 2009) gibi farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, AP'ın muamele edilmesiyle kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Yine son çalışmalarda, AP'ın farklı hücre tiplerinde sitokin üretimini inhibe ettiği ve apoptozisi

uyardığı gösterilmiştir (Guo *et al.* 2014b). Liu *et al.* (2005) AP'ın, normal hücre kültürlerinde apoptozisi uyarmayıp tümör dokularında apoptozisi teşvik ettiğini gözlemlemişler ve bunu AP'ın, tümör hücrelerinde anjiyogenezi inhibe etmesiyle açıklamışlardır.

İnsan periferel kan lenfositlerine CCL₄ ile birlikte fenolik bileşiklerden BA'nın muamelesinin, CCL₄'ün MÇ'yi arttırıcı etkisini engellediği, DNA hasar düzeylerini düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.8). Biyokimyasal analizlerde de BA, antioksidatif özelliği sayesinde CCL₄'ün indüklediği oksidatif stresi gidererek KAT ve SOD aktivitelerini arttırmış, MDA seviyesini düşürmüştür (Çizelge 4.14). Uygulanan konsantrasyonlar arasında kıyaslama yapıldığında en etkili sonucun 100'µM'lık uygulamadan alındığı tespit edilmiştir (p<0.05). BA'nın, sitotoksik etkileri HUVEC hücreleri üzerine RTCA- SP sistemi kullanılarak LDH ve WST -1 yöntemleriyle belirlenmiş, BA'nın da AP'ta olduğu gibi HUVEC üzerinde 200 µM'lık uygulamasının hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüş olup diğer konsantrasyonların sağlıklı hücreler üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Liu *et al.* (2007) BA'nın, serbest radikalleri temizlediğini, reaktif oksijen türlerinin oluşmalarını engellediğini ve enflamatuvar karaciğer rahatsızlıklarında sitotoksik özellik sergilediğini rapor etmişlerdir. BA'nın trombosit yığılmalarını engelleyerek serbest oksijen türlerini temizleyebileceği, dahası *in vivo* yapılan çalışmalarda endotoksin üretimini azaltabileceği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2007). CCL₄ verilerek oluşturulmuş karaciğer toksisitesine karşı CCL₄'ün uygulanmasından 30 dakika önce ve 120 dakika sonra 25, 50, 100 ve 200 mg/kg konsantrasyonlarında BA verilen gruplarda serum alanin aminotrasferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktivite düzeyleri üzerinde 100 mg/kg konsantrasyonunun en etkili azalmayı sağladığı, yükselmiş MDA düzeyini azalttığı, GSH düzeyini ise arttırdığı gözlenmiştir (Park *et al.* 2008a). Araştırmacılar, BA'nın hepatositleri CCL₄'ün sebep olduğu oksidatif hasara karşı koruduğunu ve BA'nın oksidanları temizleyici etkisiyle beyin ve kardiyomistleri iskemi / reperfüzyon hasarından koruduğunu bildirmişlerdir (Kim *et al.* 2010b). Kim *et al.*

(2010a) ise BA'nın GSH seviyesinde artmaya, MDA seviyesinde azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Farelere yüksek oranlarda demir verilmesiyle yapılan bir çalışma modelinde BA'nın, KAT aktivitesini artırdığı, lipid peroksidasyon seviyeleri ile protein oksidasyonunu düşürdüğü belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2011). Belirtilen bu veriler bizim biyokimyasal analizlerden elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir (Çizelge 4.14).

Bol miktarda BA içeren *Scutellaria lindbergii* Rech. f. (*Lamiaceae*) özütünün antigenotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bitki özütünün H₂O₂ tarafından indüklenen DNA zararını engellediği belirlenmiş ve bu durum bitki özütünün içerdiği antioksidan özelliklere sahip fenolik bileşiklerle açıklanmıştır (Ehtesham-Gharaee *et al.* 2015). Ding *et al.* (2015) BA'nın antioksidan etkisini, gen indüksiyonunu düzenleyen ve önemli bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinen Nrf2'nin aktivasyonunu yapabilmesine bağlamıştır.

BA'nın antigenotoksik özelliğiyle yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Hwang *et al.* (2005) BA'nın 2, 22 ve 220 M'luk konsantrasyonlarının fare hepatositleri üzerinde sitotoksik etki göstermediğini, LDH seviyesini ise düşürdüğünü belirlemiştir. Zhang *et al.* (2007) ise fare böbreklerinde yaptığı çalışma sonucunda; BA'nın yarılanma ömrünün kısa olmasından dolayı BA'nın yüksek konsantrasyonlarda ve tekrarlı uygulamalarıyla tedavide daha başarılı sonuçlar alınabileceğini rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada, toksik ve karsinojen özellik göstermeyen BA'nın klinik uygulamalarında önemli bir bileşik olduğu bildirilmiştir (Wang *et al.* 2015).

BA'nın antikanser özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, prostat kanser hücrelerinde BA'nın proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozisi teşvik ettiği belirtilmiştir (Chan *et al.* 2000). Diğer bir çalışmada BA'nın, sitokin üretimiyle [interlökin(IL)-1b, IL-6, TNF-a, IFN-g, makrofaj enflamatuar protein (MIP)-1a ve MIP-1b] teşvik edilen ekzotoksinleri ve T-hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Liu *et al.* 2007).

Min *et al.* (2008) BA'nın, UVB ile indüklenen sitotoksiteyi ve apoptozisi inhibe ettiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, BA'nın insan keratinositlerinde UVB ışınlama ile uyarılan apoptozis oranı ve IL-6 salgılanması düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir (Zhou *et al.* 2008). Benzer bir çalışmada BA'nın, UVB ışınlarının sebep olduğu hasarlara karşı koruyucu etkiler sergilediği ve koruyucu etkilerinin antioksidan ve DNA tamir mekanizması üzerine olan özelliğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Zhou *et al.* 2011).

BA'nın, antioksidan, antialerjik, antitümör, antiproliferatif ve antienflamatuar gibi birden çok farmakolojik özelliğe sahip olduğu ve hepatit ile alerjik gibi hastalıkların tedavilerinde kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Baumann *et al.* 2008; Yang *et al.* 2011b). Araştırmacılar BA'nın, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1 / 2) sinyal yolunu düzenleyerek vasküler yumuşak kas hücresi çoğalmasını inhibe ettiğini (Dong *et al.* 2010) ve bunu apoptozisi indükleme özelliği sayesinde yaptığını (Chao *et al.* 2007) ifade etmişlerdir. Ayrıca BA'nın, farklı sinyalizasyon yollarına etki ederek akciğerlerde patolojik hasarı ve inflamasyonu azalttığı rapor edilmiştir (Hao *et al.* 2012; Wan *et al.* 2014).

BA'nın, alzheimer hastalığı modelinde amiloid beta (A β) proteininin teşvik ettiği mitokondriyal apoptotik yolu inhibe ederek antiapoptotik özellik gösterebileceği ifade edilmiştir (Ding *et al.* 2015). Diğer taraftan BA'nın, insan kanser hücrelerinin proliferasyonunu, anjiyogenezi, akciğer kas hücresi çoğalması ve farklılaşmasını inhibe ettiği, apoptozise karşı duyarlılığı artırdığı da rapor edilmiştir (Dong *et al.* 2010; Chen *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014).

EA'nın, HUVEC hücreleriyle yapılan çalışmalarında ilk konsantrasyonlarından (25 μ M) itibaren hücre canlılığı üzerinde azalma ve konsantrasyona bağımlı sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.3). EA'nın yüksek konsantrasyonlardaki sitotoksik etkisinin gözlemlenmesinden dolayı MÇ ve Komet test sistemlerinde ilave konsantrasyonlar (4, 8 ve 12.5 μ M) çalışılmıştır. EA'nın düşük konsantrasyonları antimitojenik ve antioksidan özellik sergilerken yüksek konsantrasyonları ise LDH ve WST-1 test sistemleriyle paralellik göstermiştir (Çizelge 4.3 ve 4.9)($p < 0.05$).

Khanduja *et al.* (1999) EA'nın antioksidan özelliğinin, GSH seviyesini arttırmasından kaynaklandığını ifade etmiştir. Priyadarsini *et al.* (2002) ise EA'nın, serbest radikalleri temizleyerek kanser gibi hastalıklara karşı canlıyı koruduğunu bildirmiştir. EA'nın, DNA zincirinin ayrılması ve mutasyonlara sebep olan serbest oksijen radikallerini önleyen güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmiştir (Hannum 2004). Yine farklı araştırmacılar EA'nın, antioksidan, antikanserojen, antiöstrojen ve antimutajenik özelliklere sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Papoutsis *et al.* 2005; Larrosa *et al.* 2006).

Salmonella test sisteminde EA'nın aflatoksin B₁'e karşı antimutajenik etkisi belirlenmiştir (Loarca-Piña *et al.* 1998). Farklı deneysel modellerde, EA'nın serbest radikalleri temizleme özelliğiyle çeşitli genotoksinlerin etkilerini azalttığı ifade edilmiştir (Hwang *et al.* 2010; Landete 2011). Fakat farklı araştırmacılar bu antigenotoksik özelliğinin EA'nın mutajen maddeye direkt ve indirekt etki etmesiyle ya da çok farklı ve kompleks mekanizmalarla gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Zahin *et al.* 2010). Varshney *et al.* (2015) çalışmalarında EA'nın, benzo(a)pirene karşı antigenotoksik özellik sergilediğini belirlemiş ve EA'nın bunu; B(a)P aktivasyonundan sorumlu olan enzimleri inhibe etmesi, farklı fonksiyonları olan sitokrom P4501A1'in oksidasyonu ve DNA ile etkileşim yaparak B(a)P'nin DNA'ya bağlanabileceği yerlerin sayısını azaltma gibi mekanizmalarla gerçekleştirdiğini ifade etmişlerdir.

Diğer taraftan Gupta *et al.* (2002) fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda toksisiteye neden olacaklarını bildirmiştir. Ayrıca EA, TA ve gallik asit ile yapılan bir çalışmada bu fenolik bileşiklerin 60 µM üzerindeki konsantrasyonlarında genotoksik özellik göstererek DNA hasarı oluşturdukları rapor edilmiştir (Labieniec *et al.* 2007). Sharma *et al.* (2001) ve Varshney *et al.* (2015) ise EA'nın düşük konsantrasyonlarında MÇ sayılarını düşürerek antigenotoksik özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlarımız bu çalışmalarla paralellik göstermektedir (Çizelge 4.3).

EA antioksidan aktivitesinin yanında prokanserojenlerin aktivasyonunu önleyerek antikanser özellikte sergileyebilmektedir (Watzl and Leitzmann 2005). Watzl and Leitzmann (2005) EA'nın, Faz II enzimlerini uyararak kanserojen maddelerin emilimini

engellediğini bildirmişlerdir. EA'nın 10–100 µmol/L'lik konsantrasyonlarıyla fibroblast hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği, kolon, meme ve prostat kanserli hücre hatları üzerinde de güçlü antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Losso *et al.* 2004).

Kim *et al.* (2009) insan meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231, MCF-7) üzerine EA'nın farklı konsantrasyonlarını (10, 25, 50, 100 ve 250 µM) uyguladıkları çalışmalarında, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde EA'nın antiproliferatif etkiye sahip olduğunu ve sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Birçok araştırmacı tarafından EA'nın, hücre döngüsünü durdurduğu, apoptotik ve antioksidan etkileriyle antiproliferatif özellik sergilediği rapor edilmiştir (Papoutsis *et al.* 2005; Li *et al.* 2005; Larrosa *et al.* 2006). Ho *et al.* (2014) EA'nın, mitokondriyal işlev bozukluğu olan TSGH8301 hücrelerinin G0 / G1 safhasında durmasını indüklediğini belirlemiş ve bunu EA'nın apoptotik ve sitotoksik özelliğine bağlamıştır.

LU ile yaptığımız çalışmalarımızda, CCL₄'e bağlı olarak artan MÇ frekansı ve DNA hasar düzeylerini LU'nun artan konsantrasyon uygulamalarıyla önlediği ve olumlu yönde etkidiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve 4.10)(p<0.05). Ayrıca biyokimyasal analizlerde de LU'nun farklı konsantrasyonlarının ilavesiyle KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerinin artırıldığı MDA seviyesinin ise düşürüldüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.16)(p<0.05).

Qiao *et al.* (2012) ratlarda deneysel iskemik serebrovasküler olay modelinde orta serebral arter oklüzyonunun hemen sonrası intraperitoneal 10 ve 25 mg /kg dozlarda uygulanan LU'nun, nöroprotektif ve antioksidan etkilerini incelemişler, LU'nun SOD-1, KAT, bcl-2 ve claudin-5 aktivitelerini arttırdığını, MDA ve Bax düzeylerini ise azalttığını rapor etmişlerdir. Yine farelerde karbon tetraklorürle oluşturulan karaciğer fibrozisi modelinde LU'nun matriks metalloproteinaz ve metallothionein seviyelerini arttırarak ekstrasellüler fibrinöz depozitleri azalttığı, karaciğer yapısını histolojik olarak düzelttiği ifade edilmiştir (Domitrovic *et al.* 2009). Çalışmamız, LU'nun kronik

hastalıklara karşı savunulan koruyucu etkileriyle uyum göstermiş ve bu savlara desteklemektedir.

Fang *et al.* (2010) primer kùltùre edilmiş hipokampal nöronlarda LU'nun; nöronal sağ kalımını arttırdığını, apoptozisi ise azalttığını ve bu etkilerinin doz bağımlı olduğunu rapor etmişlerdir. İnsan melanom HMB-2 hücrelerinde H₂O₂'ye karşı LU'nun koruyucu etkisi en düşük konsantrasyon (20 µmol/L) için %59; en yüksek konsantrasyon (100 µmol/L) için %75 olarak belirlenmiştir (Horváthová *et al.* 2005).

Rusak *et al.* (2010) insan lenfosit hücrelerinde AP, LU ve kaempferolün H₂O₂'ye karşı antigenotoksik etkilerini belirlemiş ve bu flavonoidler arasında en iyi koruyucu etkiyi LU'nun, gösterdiğini ifade ederek bunu LU'nun DNA tamir mekanizmalarını indüklemesiyle açıklamıştır. Benzer bir çalışmada LU ve ursolik asitin, fotosensitizör Ro 19-8022 ve görünür ışığın indüklediği 8-OxoGuanine karşı koruyucu etkilerinin olduğu, koruyucu etkilerinin DNA'yı oksidatif strese karşı korumalarından ve tamir mekanizmasının teşvik edilmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Ramos *et al.* 2010). Son çalışmalarda da LU'nun Bisfenol-A-glycidyl dimethacrylate (BisGMA)'nın sebep olduğu genotoksik etkilere karşı koruyucu özelliğinin olduğu gösterilmiştir (Shen *et al.* 2013).

LU'nun antigenotoksik özelliklerinin yanı sıra kolon, prostat, akciğer, karaciğer, göğüs ve cilt kanseri modellerinde antikanser özelliklerinin olduğu rapor edilmiş ve bu özellikleri; kanser hücrelerinin proliferasyonunu önleyen ve metastaz ile anjiyogenezi baskılayan redoks regülasyonu, DNA hasarı ve protein kinazları içine alan apoptozis teşviki ile açıklanmıştır (Hwang *et al.* 2011; Pandurangan and Ganapasam 2013; Pandurangan and Esa 2014).

Ayrıca LU, sitotoksitenin uyarılması amacıyla hücrenin hayatta kaldığı yolları baskılama ve apoptozis yollarını uyarma yoluyla da kanser hücrelerini duyarlı hale getirmektedir (Lin *et al.* 2008). Farklı çalışmalarda, LU'nun topoizomeraz I ve topoizomeraz II'yi inhibe ettiği bildirilmiştir (Chowdhury *et al.* 2002; Bandele and

Osheroff 2007). LU'nun, topoizomeraz II aracılığı ile DNA hasarını teşvik etmesi ve hücre ölümüne yol açması, LU'nun antikanser çalışmaları için yararlı olduğunu düşündürse de LU'nun seçici özellik gösterdiğine dair net bir bilgi bulunmadığı ifade edilmiştir (Orhan vd 2013).

HUVEC üzerinde NA'nın, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının sitotoksik etkisinin görülmesi üzerine lenfosit hücrelerine NA'nın ilave konsantrasyonları (4, 8 ve 12.5 µM) uygulanmıştır. Çalışılan düşük konsantrasyonlarda NA'nın antimutajenik ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve 4.11). NA'yı de içine alan flavonoidlerin mutajenik aktivitelerinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, flavonoidlerin çalışmada kullanılan mutajen maddelerinin aktivasyonundan sorumlu enzimleri uyarması, DNA'yla interkalasyon yapmaları ve P450 sitokrom enzimiyle etkileşimi sonucunda oluşan bir ara ürünle mutajenik etki sergilemiş olabilecekleri iddia edilmiştir (Snijman *et al.* 2007).

Diğer taraftan biyokimyasal analizlerimizde ise NA, pozitif kontrole göre antioksidan aktivite sergileyerek KAT ve SOD enzimlerinin aktivitelerini artırmış, MDA seviyesini ise düşürmüştür (Çizelge 4.17) ($p < 0.05$). Araştırmacılar tarafından, antioksidan aktivite açısından önemli olan hidroksil grubunu, NA'nın C3 pozisyonunda bulundurmadığından antioksidan aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (Prasetyo *et al.* 2011). Ancak, NA'nın antioksidan özelliklerine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Cd ile oksidatif stres oluşturulmuş rat karaciğeri ve serumunda NA'nın antioksidatif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; Cd maruziyetiyle MDA seviyesinin arttığı, SOD ve KAT aktiviteleri ile GSH seviyesinin ise düştüğü belirlenmiştir. Aynı çalışmada NA'nın ilavesiyle MDA seviyesinin düşmeye başladığı, SOD ve KAT aktiviteleri ile GSH seviyesinin ise arttığı ve bu parametlerin kontrol grubu seviyesine geldiği rapor edilmiştir (Renugadevi 2009). Benzer bir çalışmada NA'nın karaciğer hücre sızmasını, lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engellediği, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivitelerini yükselttiği, DNA hasarını önlediği bildirilmiştir (Kannappan 2010).

Genel olarak birçok bitkisel ürünün antioksidan aktivitesi ile antigenotoksik özellikleri arasında yakın bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Zegura *et al.* 2011). Kemoterapi ilacı olan idarubicinin sebep olduğu DNA hasarına karşı NA'nın antigenotoksik etkisi bildirilmiştir (Çelik ve Koşar 2012). Benzer bir çalışmada, H₂O₂ tarafından indüklenen DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir (Kocyigit vd 2015). Ayrıca NA'nın düşük insülin dozları uygulamalarında hücre içi sinyal yantılarını güçlendirerek hepatositlerin insüline karşı duyarlılaştırıldığı bildirilmiştir (Mulvihill *et al.* 2009).

Diğer taraftan Wang *et al.* (2006) ve Li *et al.* (2007) çalışmalarında NA'nın, DNA'yla interkalasyon yaparak bağlandığını ve sitotoksik özellik sergilediklerini belirlemişlerdir. Ayrıca NA'nın yer aldığı flavonoidlerin, konsantrasyon ve süreye bağlı olarak DNA hasarını teşvik edebilecekleri ve genotoksik etkilerinin prooksidan aktivitelerinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Rusak *et al.* 2010). Sharma (2013) ise flavonoidlerin yüksek konsantrasyonlarda genotoksik zararlarının olmasını; DNA'ya interkalasyon yapabilme, DNA topoizomerez II ile anahtar enzimleri inhibe edebilme ve reaktif metabolitleri üretebilme özellikleriyle açıklamıştır. Çalışmalarımızda NA'nın, özellikle 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarında sitotoksitenin görülmüş olması, NA'nın yüksek konsantrasyonlarında yukarıda belirtilen mekanizmaları kullanarak genotoksik özellik sergilemesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Bu etkilerinin yanı sıra NA'nın, HMEC ve MCF-7 kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hakimuddin *et al.* 2004). Araştırmacılar NA'nın; antiaterojenik, apoptotik ve nöroprotektif etkilerinin de olduğunu ifade etmişlerdir (Park *et al.* 2008b; Chanet *et al.* 2012; Arul and Subramanian 2013; Raza *et al.* 2013). Bununla birlikte farklı çalışmalarda, insan kanser hücre hatları üzerinde NA'nın, AP ve rhamnetin gibi flavonoidlerden daha az antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir (Manthey and Guthrie 2002; Frydoonfar *et al.* 2003; Yoshimizu *et al.* 2004).

Antikanser çalışmalarında kullanılan ilaçlarda, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptotik etki arzu edilen iki önemli özelliktir (Schwartz and Dickson 2009). El-Mahdy *et al.* (2008) yaptığı çalışma sonucunda; UVB ışınlanmasıyla uyarılan kaspaz

aktivitesinin NA'nın uygulanmasıyla inhibe edildiğini, bununda NA'nın antiapoptotik özelliği ile p53'e etki etmesiyle gerçekleşmiş olabileceğini bildirmiştir. Diğer önemli bir çalışmada ise NA'nın, insan göğüs ve barsak kanseri hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücreleri, hücre döngüsünün S ve G2/M safhalarında durdurarak kanserli hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ve apoptotik hücre ölümlerini de artırdığı rapor edilmiştir (Abaza *et al.* 2015).

TA'nın HUVEC hücreleriyle yapılan çalışmalarında 200 µM'lık konsantrasyonunun hücre canlılığı ve hücre indeksini azalttığı, LDH salınımını artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). TA'nın yüksek konsantrasyonlarındaki sitotoksik etkisinden dolayı lenfosit hücrelerinde TA'nın ilave konsantrasyonları (4, 8 ve 12.5 µM) çalışılmıştır. TA'nın düşük konsantrasyonlarında antijenotoksik ve antioksidan özelliklerinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve 4.18) ($p < 0.05$).

Sonuçlarımız bu konuda yapılmış az sayıda çalışma ile kısmen uyumluluk göstermektedir. Araştırmacılar alabalık eritrositlerinde Komet yöntemi ile TA'nın, DNA hasarına olan etkilerini araştırmışlar ve 100 µM konsantrasyon altında TA'nın DNA'da hasar oluşturmadığı ancak 100 µM konsantrasyon ve üzerinde H₂O₂ kadar hasar meydana getirebileceğini bildirmişlerdir (Fedeli *et al.* 2004). Benzer bir çalışmada *in vitro* lenfositlerde 0.1-10 µg/ml konsantrasyonlarda TA'nın DNA kırıklarına neden olmadığı ancak 100 µg/ml konsantrasyonda zayıf DNA hasarı ($p < 0.05$) oluşturduğu ve yüksek konsantrasyonlarda TA'nın prooksidan özellik gösterebileceği rapor edilmiştir (Wua *et al.* 2004). TA bizim çalışmalarımızda yüksek konsantrasyonlarında özellikle 200 µM'lık uygulamasında prooksidan aktivite göstererek sitotoksisiteyi artırmıştır.

Cd ve Pb'nin genotoksik etkilerine karşı yeşil çayın antagonistik etkisinin olduğu belirlenmiş ve bu etkinin yeşil çayın içeriğindeki TA'dan kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Winiarska 2015). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda TA'nın, Cd ve Pb metallerini bağlayarak birikmelerini önlediği ve bu toksik metallerin dokular tarafından emilimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Winiarska *et al.* 2013; Winiarska 2013). Yine fareler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada da TA'nın, azidotimidinin indüklediği

hepatotoksisiteyi ve lipid peroksidasyonunu düşürdüğü, glutasyonu ise artırdığı gözlemlenmiş olup; TA'nın bu antioksidan aktivitesi demir iyonlarıyla kompleks yapması ve fenton reaksiyonlarına etki etmesiyle açıklanmıştır (Tikoo *et al.* 2008). Andrade *et al.* (2005) ise TA'nın, düşük konsantrasyonlarda hepatotoksisiteye karşı etkili olmasını serbest hidroksil iyonlarını (*OH) yakalayabilme özelliğiyle açıklamışlardır. TA bizim çalışmalarımızda da en etkili sonucu, en düşük konsantrasyonumuz olan 4 µM'lık uygulamasında vermiştir.

TA'nın, antimutajenik özelliklerinin yanında antimikrobiyal (Kim *et al.* 2010a; Božič *et al.* 2012), antiviral, antiinflamatuvar, antikanserojen (Zhang *et al.* 2013), homeostatik (Corominas *et al.* 2005) ve antioksidan (Gülçin vd 2010; Bouki *et al.* 2013) gibi birçok biyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, TA'nın belirtilen bu olumlu özelliklerinin dışında mutajenik ve genotoksik etkileri de rapor edilmiştir (Kevekordes *et al.* 2000; De Carvalho *et al.* 2003). Paralel bir çalışmada, Knasmuller *et al.* (1992) TA'nın, sinerjistik etki yapmasıyla X – Ray ışınlarının mutajenik ve genotoksik etkilerini artırdığını belirtmiştir. Dahası, Büyükleyla vd (2012) TA'nın, etil metansülfonat (EMS) ile sinerjistik etki yaparak EMS'nin genotoksik etkisini artırdığını göstermiş ve TA'nın mutajenik etkisini, TA'nın mutajen maddelerin metabolik detoksifikasyon kataliz enzim sistemi ile etkileşim içerisinde olması ve reaksiyona girmesiyle açıklamıştır.

Ayrıca tanenlerin topoizomeras enzimlerini inhibe ettiğine dair *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (Cassidy and Setzer 2010; Zheng *et al.* 2010). Jain and Andsorbhoy (1988) TA'nın sitotoksik etkisinin, adenosin trifosfat (ATP) seviyesinin düşmesi ve bu düşüşün mitotik indeksi baskılaması ya da enerji azlığından dolayı DNA sentezinin inhibe edilmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Yapılan *in vitro* bir çalışmada TA'nın, farklı kanser hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği ve kanserli hücrelerde apoptozisi uyardığı gözlenmiştir (Ahmad and Sultana 2012). Ayrıca içme sularına TA, karıştırıldığında singeneik tümörleri taşıyan farelerin hayatta kalma oranının arttığı belirlenmiştir (Chen *et al.* 2003). Ahmad and Sultana

(2012) TA'nın, hem hücrel hasarı azalttığını hem de DNA parçalanması nedeniyle oluşan nekrozu baskıladığını rapor etmiştir. Son zamanlarda TA, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak farklı tümör tiplerinde antikanser fonksiyonlarıyla ön plana çıkmıştır (Chu *et al.* 2015; Ngobili *et al.* 2015). TA ve diğer yeşil çay fenolik bileşiklerinin fare meme tümörü virüsü promotörünü inhibe ettikleri gösterilmiştir (Sun *et al.* 2012).

Araştırmacılar, TA ve diğer fenolik bileşikler bakımından zengin meyve ve sebzelerin tüketilmelerinin, farklı kanser ve kalp damar rahatsızlıklarını engelleyebileceğini rapor etmişlerdir (Andrade *et al.* 2005). TA'nın farklı kimyasal ajanların toksik ve karsinogenik etkilerini azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (Ahmad *et al.* 2011; Ahmad and Sultana 2012). Majed *et al.* (2015) araştırmasında, TA'nın oksidatif stres ve enflamatuvar hasarı azaltarak, 7,12-dimetilbenz [a] antrasenin uyardığı cilt kanserine karşı koruma sağlayabileceğini belirtmiştir.

Soyocak vd (2011) meme kanseri hücrelerine (MCF-7) farklı konsantrasyon (0, 25, 50 and 100 µM) ve saatlerde (24, 48, 72) TA muamelesinde TA'nın pro-apoptotik aktivite sergileyerek, Bax proteini yüzdesini zamana bağımlı olarak artırdığını ifade etmişlerdir. Ayrıca TA'nın, 50 ve 100 ug/ml uygulamalarında konsantrasyon bağımlı olarak apoptotik hücre ölümünü artırdığı rapor edilmiştir (Nam *et al.* 2001).

Çalışmalarımız sonucunda, test edilen fenolik bileşiklerin belirli konsantrasyonlarda yararlı sonuçlar verdiği ancak özellikle gündelik diyetimizde yer alan ceviz, nar, domates, turunçgiller ve yeşil çay gibi gıda maddelerinde bol miktarlarda bulunan EA, NA ve TA'nın yüksek konsantrasyonlarda prooksidan, genotoksik ve sitotoksik etki sergiledikleri görülmüştür. Bu bağlamda; fenolik bileşikleri yüksek düzeylerde içeren gıdaların bilinçsizce tüketilmemesine dikkat edilmeli, uygulanan tedavilerde bireysel konsantrasyon ayarlaması yapılmalıdır. Bu sayede fenolik bileşiklerin prooksidan ve genotoksik özellikleriyle insanlarda sebep olabileceği organ toksisitesi engellenebilir.

Bununla birlikte, elde ettiğimiz sonuçlar ve literatürde yapılan farklı çalışmalar dikkate alındığında fenolik bileşiklerin birçok hastalık için alternatif tedavi etmeni veya

koruyucu ya da destek etmeni olarak kullanılabilir; fenolik bileşiklerin optimum konsantrasyon ve sürelerde kullanılmasıyla, kanser başta olmak üzere çeşitli birçok hastalığın tedavisinde başarılı sonuçlar alınabileceği ön görülmektedir.

Ayrıca bu fenolik bileşiklerin hastalık durumlarında kullanılan diğer ilaçlarla olan etkileşimlerinin araştırılması amacıyla *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarının yapılmasıyla, insan sağlığına olası etkilerinin belirlenmesine odaklanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abaza, M. S. I., Orabi, K. Y., Al-Quattan, E. and Raja'a, J., 2015. Growth inhibitory and chemo-sensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer. *Cancer cell international*, 15(1), 1.
- Abdallah, H.M., Salama, M.S., Abdelrahman, E.H. and El-Maraghy, S.A., 2011. Antidiabetic activity of phenolic compounds from Pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytochem. Lett*, 4, 337-341.
- Aebi, Y., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126.
- Aherne, S.A. and O'Brien, N.M., 2000. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med*, 29, 507-514.
- Ahmad, S.T. and Sultana, S., 2012. Tannic acid mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Human & experimental toxicology*, 31(2), 145-156.
- Ahmad, S.T., Arjumand, W., Seth, A., Nafees, S., Rashid, S., Ali, N. and Sultana, S., 2011. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology*, 290(1), 69-81.
- Ahmed, S., Rahman, A., Alam, A., Saleem, M., Athar, M. and Sultana, S., 2000. Evaluation of the efficacy of *Lawsonia alba* in the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *J Ethnopharmacol*, 69, 157-164.
- Akinpelu, D.A., Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I., 2008. In vitro antimicrobial and phytochemical properties of crude extract of stem bark of *Azelaia africana*, *Afr. J. Biotechnol*, 7(20), 3665-3670.
- Ali, F., Naz, F., Jyoti, S. and Siddique, Y.H., 2014. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 767, 13-20.
- Andrade, R.G.Jr., Dalvi, L.T., Silva, J.M.C. Jr., Lopes, G.K.B., Alonso, A. and Hermes-Lima, M., 2005. The antioxidant effect of tannic acid on the vitro copper-mediated formation of free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 437, 1-9.
- Anonymous, 2015a. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280443> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015b. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64982> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015c. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281855> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015d. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280445> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015e. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/932> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015f. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129778> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015g. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5943> (20.01.2016).
- Anonymous, 2015h. http://www.rocche.com/media/store/releases/med_dia_2009-04-01.htm (20.01.2016).

- Arul, D. and Subramanian, P., 2013. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathology & Oncology Research*, 19(4), 763-770.
- Assini, J.M., Mulvihill, E.E., Sutherland, B.G., Telford, D.E. and Sawyez, C.G., 2013. Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in Ldlr *-/-* mice. *J Lipid Res* 54, 711-724.
- Atagün, G., 2011. Akrolein Verilmiş Ratlarda (*Wistar albino*) Karaciğerde Beta-glukan'ın Apoptozis Mekanizmaları Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. and Fuhrman, B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1062-1076.
- Aydın, S.A. ve Üstün, F., 2007. Tanenler 1 kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemler. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 33 (1), 21-31.
- Bae, J.Y., Choi, J.S., Kang, S.W., Lee, Y.J., Park, J. and Kang, Y.H., 2010. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp Dermatol*, 19, e182-e190.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, Samir., 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bande, O. J. and Osheroff, N., 2007. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β . *Biochemistry*, 46(20), 6097-6108.
- Baumann, S., Fas, S.C., Giaisi, M., Müller, W.W., Merling, A., Gülöw, K. and Li-Weber, M., 2008. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC γ 1- and Ca $^{2+}$ -dependent apoptosis. *Blood*, 111, 2354-2363.
- Begum, N., Prasad, N. R. and Thayalan, K., 2012. Apigenin protects gamma-radiation induced oxidative stress, hematological changes and animal survival in whole body irradiated Swiss albino mice. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(1), 45.
- Berni, A., Grossi, M.R., Pepe, G. and Filippi, S., 2012. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. *Mutat Res*, 746, 60-65.
- Bhalli, J.A., Ali, T., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M. and Khan, Q.M., 2009. DNA damage in pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. *Environ Mol Mutagen*, 50, 37-45.
- Bhat, T. K., Singh, B. and Sharma, O. P., 1998. Microbial Degradation of tannins; a current perspective. *Biodegradation*, 9, 343-357.
- Birt, D.F., Walker, B., Tibbel, M.G. and Bresnick, E., 1986. Antimutagenesis and antipromotion by apigenin, robinetin, and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, 7, 959-963.
- Blaylock, R.L. and Maroon, J., 2012. Natural plant products and extracts that reduce immunoexcitotoxicity-associated neurodegeneration and promote repair within the central nervous system. *Surg Neurol Int*, 3, 19.

- Bonet, B., Otero, P., Viana, M. and Herrera, E., 1996. Antioxidant and prooxidant effects of vitamin C and flavonoids on LDL oxidation. Abstracts of papers, VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, University of Barcelona, Spain.
- Bouki, E., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M. and Dailianis, S., 2013. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. *Mar Environ Res*, 85,13-20.
- Božič, M., Gorgieva, S. and Kokol, V., 2012. Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydr Polym*, 89, 854-864.
- Brown, J.E. and Rice-Evans, C.A., 1998. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radical Research*, 3, 247-255.
- Butler, M., 2004. *Animal cell culture and technology*. Taylor & Francis, 32-33 p, New York, USA.
- Buyukleyla, M., Azirak, S., Rencuzogullari, E., Kocaman, A. Y., Ila, H. B., Topaktas, M. and Darici, C., 2012. The genotoxic and antigenotoxic effects of tannic acid in human lymphocytes. *Drug and chemical toxicology*, 35(1), 11-19.
- Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure- activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Cao, Y., Li, G., Wang, Y.F., Fan, Z.K., Yu, D.S., Wang, Z.D. and Bi, Y.L., 2010. Neuroprotective effect of baicalin on compression spinal cord injury in rats. *Brain Res*, 1357, 115-123.
- Cassidy, C. E. and Setzer, W. N., 2010. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: a molecular docking analysis. *Journal of molecular modeling*, 16(2), 311-326.
- Cemeroğlu, B., 2004. *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, 77-88 s, Ankara.
- Chan, F.L., Choi, H.L., Chen, Z.Y., Chan, P.S.F. and Huang, Y., 2000. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett*, 160, 219.
- Chanet, A., Milenkovic, D., Deval, C., Potier, M., Constans, J., Mazur, A. and Bérard, A.M., 2012. Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(5), 469-477.
- Chang, T.L. and Wang, C.H., 2013. Combination of quercetin and tannic acid in inhibiting 26S proteasome affects S5a and 20S expression, and accumulation of ubiquitin resulted in apoptosis in cancer chemoprevention. *Biological chemistry*, 394(4), 561-575.
- Chao, J., Su, W.C. and Liu, HF., 2007. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol Cancer Ther*, 6, 3039–3048.
- Chaudière, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 949-962.

- Chen, J., Li, Z., Chen, A.Y., Ye, X., Luo, H., Rankin, G.O. and Chen, Y.C., 2013. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6012-6025.
- Chen, S. and Chung, K., 2000. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 1-5.
- Chen, X., Beutler, J.A., McCloud, T.G., Loehfelm, A., Yang, L. and Dong, H.F., 2003. Tannic acid is an inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res*, 9(8), 3115-23.
- Chen, Y.T., Zheng, R.L., Jia, Z.J. and Ju, Y., 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 9(1), 19-21.
- Cheng, F., Lu, Y., Zhong, X., Song, W., Wang, X., Sun, X., Qin, J., Guo, S. and Wang, Q., 2013. Baicalin's therapeutic time window of neuroprotection during transient focal cerebral ischemia and its antioxidant effects in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 120261.
- Choi, E.J. and Kim, G.H., 2009. Apigenin induces apoptosis through a mitochondria/caspase-pathway in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 44(3), 260-265.
- Choi, J. S., Choi, Y. J., Park, S. H., Kang, J. S. and Kang, Y.H., 2004. Flavones mitigate tumor necrosis factor- α -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- κ B. *The Journal of nutrition*, 134(5), 1013-1019.
- Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.M. and Jung, H.A., 2014a. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food Chem Toxicol*, 64, 27-33.
- Choi, S.M., Kim, B.C., Cho, Y.H., Choi, K.H., Chang, J., Park, M.S., Kim, M.K., Cho, K.H. and Kim, J.K., 2014b. Effects of flavonoid compounds on b-amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Med J*, 50, 45-51.
- Chowdhury, A. R., Sharma, S., Mandal, S., 2002. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal*, 366, 653-661.
- Choy, W.N., 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: Marcel Dekker, 2001163-86.
- Chu, X., Guo, Y., Xu, B., Li, W., Lin, Y., Sun, X. and Zhang, X., 2015. Effects of Tannic Acid, Green Tea and Red Wine on hERG Channels Expressed in HEK293 Cells. *PloS one*, 10(12), e0143797.
- Chung, C.S., Jiang, Y., Cheng, D. and Birt, D.F., 2007. Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol Carcinog*, 46, 773-782.
- Coleta, M., Campos, M.G., Cotrim, M.D., Lima, T.C. and Cunha, A.P., 2008. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behav Brain Res*, 189, 75-82.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Corominas, B.G.T., Mateo, J.G., Zamora, L.L. and Calatayud, J.M., 2002. Determination of tannic acid by direct chemiluminescence in a FIA assembly. *Talanta*, 58(6), 1243-1251.

- Coşkun, F., 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2, 27-33.
- Czeczot, H. and Bilbin, M., 1991. Effect of flavones and their metabolites on induction of SOS repair in the strain PQ37 – E. coli K-12, Acta Biochim. Pol, 38, 71–74.
- Çapık, Ö., 2014. Usnik Asitin Kültürü Yapılmış Huvec ve Üç Farklı Kanser Hücre Hattı (A549, HeLa ve AGS) Üzerine Sitotoksik, Antiproliferatif ve Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çelik, H. and Koşar, M., 2012. Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: Structure–activity relationships. Chemico-biological interactions, 197(2), 103-109.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita, 43 (4), 348-361.
- Das, A., Banik, N. L. and Ray, S.K., 2006. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. International journal of cancer, 119(11), 2575-2585.
- De Carvalho, M.C.R.D., Barca, F.N.T.V., Agnez-Lima, L.F. and de Medeiros, S.R.B., 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environmental and molecular mutagenesis, 42(3), 185-191.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen, N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology & Medicine, 26(1/2), 202-226.
- Demir, E., Kaya, N. and Kaya, B., 2011. Evaluation of dna damage in *Capsicum annuum* L. exposed to spinosad in the comet assay. Fresen Environ Bull, 20(8), 1926-1930.
- Demir, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B., 2010. Assessment of genotoxic effects of benzyl derivatives by the comet assay. Food Chem Toxicol, 48(5), 1239-1242.
- Demirel, S. ve Zamani, A., 2002. MN tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 12(3), 123-7.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Biology Toxicology, 25, 5-32.
- Ding, H., Wang, H., Zhao, Y., Sun, D. and Zhai, X., 2015. Protective Effects of Baicalin on Aβ1–42-Induced Learning and Memory Deficit, Oxidative Stress, and Apoptosis in Rat. Cellular and molecular neurobiology, 35(5), 623-632.
- Domitrović, R., Jakovac, H., Tomac, J. and Sain, I., 2009. Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. Toxicol Appl Pharmacol, Dec 15,241(3). 311-321.
- Dong, L.H., Wen, J.K., Miao, S.B, Jia, Z., Hu, H.J. and Sun, R.H., 2010. Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFRβ-ERK signaling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia. Cell Res, 20,1252–1262.
- Ehtesham-Gharaee, M., Eshaghi, A., Shojaei, S., Asili, J., Emami, S. A., Behravan, J. and Mosaffa, F., 2015. Protective effects of *Scutellaria lindbergii* root extract

- against oxidative-induced cell and DNA damage in mouse fibroblast-like cells. *Drug and chemical toxicology*, 38(3), 293-299.
- Ekambaram, G., Rajendran, P., Magesh, V. and Sakthisekaran, D. 2008. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutrition Research*, 28(2), 106-112.
- El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., Patnaik, S., Zhao, Q. and Wani, A.A., 2008. Naringenin Protects HaCaT Human Keratinocytes Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the Genome. *Photochemistry and photobiology*, 84(2), 307-316.
- Erdoğan. E., Kaya, A., Rağbetli, M.Ç., Özbek, H. ve Cengiz, N., 2004. Anason (*Pimpinella anisum*) ekstresinin deneysel akut karaciğer hasarında karaciğer koruyucu etkisi var mı ? *Van Tıp Dergisi*, 11(3), 69-74.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gomez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V. and Lamuela-Raventos, R. M., 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279-1290.
- Fallahi, F., Roghani, M. and Moghadami, S., 2012. Citrus flavonoid naringenin improves aortic reactivity in streptozotocin-diabetic rats. *Ind J Pharmacol*, 44, 382-386.
- Fang, F., Dongye, L., Huanjun. P., Dan, C., Lingling, Q., Ruiqu, Z., Hong, S., 2011. Luteolin inhibits apoptosis and improves cardiomyocyte contractile function through the P13k/Akt pathway in simulated ischemia/reperfusion. *Pharmacology*, 88, 149-158.
- Fang, L., Zhang, M., Ding, Y., Fang, Y., Yao, C. and Zhang, X., 2010. Protective effects of luteolin on neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury via improving Na⁺/K⁺ -ATPase activity. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, Apr;35 (8), 1051-1054.
- Farah, M., Parhar, K., Moussavi, M., Eivemark, S. and Salh, B., 2003. 5,6- Dichlororibifuranosylbenzimidazole-and Apigenin-induced sensitization of colon cancer cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. *Am J Physiol*, 285, 919-928.
- Fedeli, D., Berrettini, M., Gabryelak, T. and Falcioni, G., 2004. The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutation Research*, 563, 89-96.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455, 81-95.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Fotsis, T., Pepper, M.S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R. and Schweigerer, L., 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, 57,2916–2921.
- Frydoonfar, H. R., McGrath, D. R. and Spigelman, A.D. 2003. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin. *Colorectal Disease*, 5(2), 149-152.
- Fukutake, M., Yokota, S., Kawamura, H., Lızuka, A., Amagaya, S., Fukuda, K. and Komatsu, Y., 1998. Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* on azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colon. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 814-817.

- Gasso, M., Rubio, M., Varela, G., Cabre, M., Caballeria, J. and Alonso, E., 1996. Effects of S adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol*, 25, 2000-2005.
- Georgiev, M.I., Weber, J. and Maciuk, A., 2009. Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 809-823.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. and Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, 48(10), 4581-4589.
- Goel, G., Puniya, A. K. and Singh, K., 2005. Tannic acid resistance in ruminal streptococcal isolates. *Journal of Basic Microbiology*, 45(3), 243-245.
- Gómez-Taylor Corominas, B., García Mateo, J.V., Lahuerta Zamora, L. and Martínez Calatayud, J., 2002. Determination of tannic acid by direct chemiluminescence in a FIA assembly. *Talanta*, 58, 1243-1251.
- Göksu, Ü. Ş., 2012. Farelerde Karbon Tetraklorür İle Karaciğer Hasarı Oluşturulması Üzerine Vitamin E ve N-Asetilsisteinin Koruyucu Etkisinin Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J. and Lamuela-Raventos, R. M., 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1279-1290.
- Gradolatto, A., Basly, J.P., Berges, R., Teyssier, C. and Chagnon, M.C., 2005. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metab Dispos*, 33, 49-54.
- Guillamet, E., Creus, A., Ponti, J., Sabbiani, E., Fortaner, S. and Marcos, R. 2004. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19(2), 129-135.
- Guo, H., Kong, S., Chen, W., Dai, Z., Lin, T., Su, J. and Lai, X., 2014b. Apigenin mediated protection of OGD-evoked neuron-like injury in differentiated PC12 cells. *Neurochemical research*, 39(11), 2197-2210.
- Guo, M., Zhang, N., Li, D., Liang, D., Liu, Z., Li, F. and Yang, Z., 2013. Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor- κ B and p38 phosphorylation in *S. aureus*-induced mastitis. *International immunopharmacology*, 16(2), 125-130.
- Guo, M., Cao, Y., Wang, T., Song, X., Liu, Z., Zhou, E., Deng, X., Zhang, N., Yang, Z., 2014a. Baicalin inhibits *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis by regulating TLR2 and TLR2-related apoptotic factors in the mouse mammary glands. *Eur J Pharmacol*, 723, 481-488.
- Guo, X., Chi, S., Cong, X., Li, H., Jiang, Z., Cao, R. and Tian, W., 2015. Baicalin protects sertoli cells from heat stress-induced apoptosis via activation of the Fas/FasL pathway and Hsp72 expression. *Reproductive Toxicology*, 57, 196-203.
- Gupta, S., Afaq, F. and Mukhtar, H., 2001. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 914-920.
- Gupta, S., Saha, B. and Giri, A.K., 2002. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512(1), 37-65.

- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M. and Aboul-Enein, H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Güzel, A., 2009. *Sesamum indicum* L. Sabit Yağının Hepatoprotektif Etkisinin Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Hadi, S.M., Bhat, S.H., Azmi, A.S., Hanif, S., Sharmim, U. and Ullah, M.F., 2007. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 370-376.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K., 2004. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast cancer research and treatment*, 85(1), 65-79.
- Hannum, S.M., 2004. Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 1-17.
- Hao, H., Gufu, H., Lei, F., Dang, L. and Zhongliang, Y., 2012. Baicalin suppresses expression of TLR2/4 and NF- κ B in chlamydia trachomatis-infected mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 34, 89-94.
- Hartmann, A. and Speit, G., 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ Mol Mutagen*, 23, 299-305.
- Heddle, J.A. and Countryman, R.I., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41, 321-32.
- Hessenauer, A., Montenarh, M. and Gotz, C., 2003. Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 22, 1263-1270.
- Ho, C.C., Huang, A.C., Yu, C.S., Lien, J.C., Wu, S.H., Huang, Y.P. and Chen, P.Y., 2014. Ellagic acid induces apoptosis in TSGH8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress-and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environmental toxicology*, 29(11), 1262-1274.
- Horváthová, K., Chalupa, I., Šebová, L., Tóthová, D. and Vachálková, A., 2005. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565(2), 105-112.
- Horvathova, K., Novotný, L., Tothova, D. and Vachalkova, A., 2003. Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, 51(5), 395-399.
- Hou, J., Wang, J., Zhang, P., Li, D., Zhang, C., Zhao, H., Fu, J., Wang, B. and Liu, J., 2012. Baicalin attenuates pro inflammatory cytokine production in oxygen-glucose deprived challenge in microglial cells by inhibiting TLR4 signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 14, 749-757.
- Huang, Y., Gao, H., Gou, M., Ye, H., Liu, Y. and Gao, Y., 2010. Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials. *Mutat Res*, 696, 101-6.
- Huetz, P., Mavaddat, N. and Mavri, J., 2005. Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(6), 1564-1570.

- Hurley, R.E., 1998. Interactions of N-methyl-N-nitrosourea and ellagic acid in developmental toxicology. Doctor of Philosophy Thesis, Colorado State University, Colorado.
- Hwang, J.M., Cho, J.S., Kim, T.H. and Lee, Y.I., 2010. Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 64, 264–270.
- Hwang, J.M., Wang, C.J., Chou, F.P., Tseng, T.H., Hsieh, Y.S., Hsu, J.D. and Chu, C.Y., 2005. Protective effect of baicalin on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Archives of toxicology*, 79(2), 102-109.
- Hwang, J.T., Park, O.J., Lee, Y.K., Sung, M.J., Hur, H.J., Kim, M.S. and Kwon, D.Y., 2011. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- κ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(1), 25-31.
- Jain, A. K. and Sarbhoy, R.K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. III. Concluding remarks. *Cytologia*, 53(3), 427-436.
- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I. and Flora, S.J., 2011. Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 607-614.
- Jayasooriya, R.G., Kang, S.H., Kang, C.H., Choi, Y.H. and Moon, D.O., 2012. Apigenin decreases cell viability and telomerase activity in human leukemia cell lines. *Food Chem Toxicol*, 50, 2605-2611.
- Jin, B.H., Qian, L.B., Chen, S., Li, J. and Wang, H.P., 2009. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur J Pharmacol*, 616, 200-205.
- Johnson, J.L. and De Mejia, E.G., 2013. Interactions between dietary flavonoids apigenin or luteolin and chemotherapeutic drugs to potentiate anti-proliferative effect on human pancreatic cancer cells, in vitro. *Food Chem Toxicol*, 60, 83-91.
- Kannan, M.M. and Quine, S.D., 2012. Ellagic acid protects mitochondria from β -adrenergic agonist induced myocardial damage in rats; evidence from in vivo, in vitro and ultra structural study. *Food Res Int*, 45, 1-8.
- Kannappan, S., Palanisamy, N. and Anuradha, C.V., 2010. Suppression of hepatic oxidative events and regulation of eNOS expression in the liver by naringenin in fructose administered rats. *European Journal of Pharmacology*, 645(1-3), 177-184.
- Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Gunduz, H., Cemek, M., Ozbek, H. and Uygan, I., 2003. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioksidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄ –treated rats. *J Vet Med A:Physiol Pathol Clin Med*, 50, 264-268.
- Kapuci, M., Ulker, Z., Gurkan, S. and Alpsoy, L. , 2014. Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. *Toxicology and industrial health*, 30(1), 82-89.
- Karadeniz, B., 2011. İnsan Lenfosit Kültürlerinde Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis*) Balzaminin Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kevekordes, S., Spielberger, J., Burghaus, C.M., Birkenkamp, P., Zietz, B., Paufler, P. and Dunkelberg, H., 2000. Micronucleus formation in human lymphocytes and

- in the metabolically competent human hepatoma cell line Hep-G2: results with 15 naturally occurring substances. *Anticancer research*, 21(1A), 461-469.
- Khadem, S. and Marles, R.J., 2010. Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*, 15, 7985-8005.
- Khan, N. S., Ahmad, A. and Hadi, S. M., 2000. Anti-oxidant, prooxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-Biological Interactions*, 125, 177-189.
- Khanal, T., Kim, H.G., Choi, J.H., Park, B.H., Do, M.T., Kang, M.J., Yeo, H.K., Kim, D.H., Kang, W., Jeong, T.C. and Jeong, H.G., 2012. Protective role of intestinal bacterial metabolism against baicalin-induced toxicity in HepG2 cell cultures. *Journal of Toxicological Sciences*, 37, 363-371.
- Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V. and Syal, N., 1999. Prevention of Nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 37(4), 313- 318.
- Kim, H.A., Lee, R.A., Moon, B.I. and Choe, K.J., 2009. Ellagic acid shows different anti-proliferative effects between the MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell line. *J Breast Cancer*, 12(2), 85-91.
- Kim, J.S. and Jobin, C., 2005. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology*, 115(3), 375-87.
- Kim, S.J., Moon, Y. J. and Lee, S.M., 2010b. Protective effects of baicalin against ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Journal of natural products*, 73(12), 2003-2008.
- Kim, T.J., Silva, J.L., Kim, M.K. and Jung, Y.S., 2010a. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chem*, 118, 740-764.
- Kitamura, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, M. and Tokunaga, T., 1998. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. *Antiviral Research*, 37(2), 131-140.
- Kitiz, B., 2011. Karbon Tetraklorür (Ccl4) Verilen Rat Böbrek Dokularında Oksidan/Antioksidan Sistemelerin Araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Knasmuller, S., Kim, T. W. and Ma, T.H., 1992. Synergistic effect between tannic acid and X-rays detected by the Tradescantia-micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 270(1), 31-37.
- Kocyigit, A., Koyuncu, I., Taskin, A., Dikilitas, M., Bahadori, F. and Turkkan, B., 2015. Antigenotoxic and antioxidant potentials of newly derivatized compound naringenin-oxime relative to naringenin on human mononuclear cells. *Drug and chemical toxicology*, 1-8.
- Kotan, E., 2010. İnsan Lenfosit Kültürlerinde Aflatoksin B 1'in Neden Olduğu Genotoksik ve Biyokimyasal Değişiklikler Üzerine Bazı Liken Metanol Ekstraktlarının Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Kumkrai, P., Kamonwannasit, S. and Chudapongse, N., 2014. Cytoprotective and antidiabetic effects of *Derris reticulata* aqueous extract. *J Physiol Biochem*, 70(3), 675-84.
- Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H., 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr*, 38(3), 133 - 42.
- Kuo, M.L., Lee, K.C. and Lin, J.K., 1992. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems. *Mutat Res*, 270, 87-95.
- Kurtulmuş, S. ve Aydın, K.A., 2007. Dental döküm alarimlarinin genotoksisite, mutajenisite ve karsinojenisitesi. *SÜ Dişhek Fak Derg*, 16, 73-78.
- Labieniec, M. and Gabryelak, T., 2003. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutation Research*, 539, 127-135.
- Labieniec, M., Biernat, M. and Gabryelak, T., 2007. Response of digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to phenolic compound exposure in vivo. *Cell biology international*, 31(7), 683-690.
- Lacikova, L., Jancova, M., Muselik, J., Masterova, I., Grancai, D. and Fickova, M., 2009. Antiproliferative, cytotoxic, antioxidant activity and polyphenols contents in leaves of four *Staphylea* L. Species. *Molecules*, 14, 3259-3267.
- Landete, J.M., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44, 1150-1160.
- Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F.A. and Espín, J.C., 2006. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1611-1620.
- Lee, B., Sur, B., Shim, I., Lee, H. and Hahm, D.H., 2014. Baicalin improves chronic corticosterone-induced learning and memory deficits via the enhancement of impaired hippocampal brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression in the rat. *J Nat Med*, 68, 132-143.
- Lee, C. H., Jeong, T. S., Choi, Y. K., Hyun, B. H., Oh, G. T., Kim, E. H., Kim, J. R., Han, J. I., Bok and S. H., 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin, and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*, 284, 681-688.
- Lee, E. J., Kim, D. I., Kim, W. J. and Moon, S. K., 2009. Naringin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and Akt phosphorylation in tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 1582-1591.
- Lee, J. H., Park, C.H., Jung, K.C., Rhee, H. S. and Yang, C.H., 2005. Negative regulation of β -catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(3), 771-776.
- Lee, J., Koo, J.L.N. and Min, D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 3, 21-33.

- Lee, J.H. and Kim, G.H. 2010. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J Food Sci* 75, H212-217.
- Leung, H.W.C., Wu, C.H., Lin, C.H. and Lee, H. Z., 2005. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *European journal of pharmacology*, 508(1), 77-83.
- Li, H., Wang, H., Chen, J., Wang, L., Zhang, H. and Fan, Y., 2003. Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary Electrophoresis-Laser-Induced fluorescence detection. *European Journal of Pharmacology*, 464, 141-146.
- Li, L., Bao, H. and Wu, J.F., 2012. Baicalin is anti-inflammatory in cigarette smoke-induced inflammatory models in vivo and in vitro: A possible role for HDAC2 activity. *Int Immunopharmacol*, 13, 15-22.
- Li, R.R., Pang, L.L., Du, Q., Shi, Y., Dai, W.J. and Yin, K.S., 2010. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma, *Immunopharmacol. Immunotoxicol*, 32(3), 364-370.
- Li, T. M., Chen, G. W., Su, C.C., Lin, J.G., Yeh, C.C., Cheng, K.C. and Chung, J.G., 2005. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Research*, 25(2A), 971-979.
- Li, T.R., Yang, Z. Y. And Wang, B.D., 2007. Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin Schiff base and its Cu (II), Ni (II), Zn (II) complexes. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(1), 26-28.
- Liao, P. H., Hung, L. M., Chen, Y. H., Kuan, Y. H., Zhang, F. B. Y., Lin, R. H. and Huang, S.S., 2011. Cardioprotective effects of luteolin during ischemia-reperfusion injury in rats. *Circulation Journal*, 75(2), 443-450.
- Lim, H.A., Lee, E.K. and Kim, J.M., 2012. PPAR γ activation by baicalin suppresses NF- κ B-mediated inflammation in aged rat kidney. *Biogerontology*, 13, 133-45.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F. and Pauwels, P., 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PloS one*, 7(10), e46536.
- Lin, L., Wu, X.D., Davey, A.K. and Wang, J., 2011. The anti-inflammatory effect of baicalin on hypoxia/reoxygenation and TNF-alpha induced injury in cultured rat cardiomyocytes. *Phytotherapy Research*, 24, 429-437.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X. and Shen, H.M., 2008. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646.
- Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C. and Lu, H., 2001. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutrition and cancer*, 39(1), 139-147.
- Liou, S.F., Hsu, J.H., Liang, J.C., Ke, H.J. and Chen, I.J., 2012. San-Huang-Xie-Xin-Tang protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via inhibition of oxidative stress-induced apoptosis. *J Nat Med*, 66, 311-320.
- Liu, L. L., Gong, L. K., Wang, H., Xiao, Y., Wu, X. F., Zhang, Y. H. and Ren, J., 2007. Baicalin protects mouse from Concanavalin A-induced liver injury through inhibition of cytokine production and hepatocyte apoptosis. *Liver International*, 27(4), 582-591.

- Liu, L. Z., Fang, J., Zhou, Q., Hu, X., Shi, X., and Jiang, B. H., 2005. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: Implication of chemoprevention of lung cancer. *Molecular Pharmacology*, 8, 635-643.
- Liu, R., Zhang, T., Yang, H., Lan, X., Ying, J. and Du, G., 2011. The flavonoid apigenin protects brain neurovascular coupling against amyloid-beta (2)(5)-(3)(5)-induced toxicity in mice. *J Alzheimers Dis*, 24, 85-100.
- Liu, Y.F., Gao, F., Li, X.W., Jia, R.H., Meng, X.D., Zhao, R., Jing, Y.Y., Wang, Y. and Jiang, W., 2012. The anticonvulsant and neuroprotective effects of baicalin on pilocarpine-induced epileptic model in rats. *Neurochem Res*, 37, 1670-1680.
- Loarca-Piña, G., Kuzmicky, P. A., de Mejía, E. G. and Kado, N.Y., 1998. Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B₁ in the *Salmonella* microsuspension assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 398(1), 183-187.
- Losso, J.N., Bansodea, R.R., Trappey, A., Bawadi, H.A. and Truax R., 2004. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 672-678.
- Lu, T., Song, J., Huang, F., Deng, Y., Xie, L., Wang, G. and Liu, X. 2007. Comparative pharmacokinetics of baicalin after oral administration of pure baicalin, *Radix scutellariae* extract and Huang-Lian-Jie-Du-Tang to rats. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3), 412-418.
- Lv, P., Li, H., Xue, J., Shi, L. and Zhu, H., 2009. Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 908-914.
- Majed, F., Rashid, S., Khan, A. Q., Nafees, S., Ali, N., Ali, R. and Sultana, S., 2015. Tannic acid mitigates the DMBA/croton oil-induced skin cancer progression in mice. *Molecular and cellular biochemistry*, 399(1-2), 217-228.
- Makkar, H. P. S., Singh, B. and Dawea, R. K., 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine Rumen. *British Journal of Nutrition*, 60, 287-296.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1-3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 230-342.
- Manthey, J. A. and Guthrie, N., 2002. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5837-5843.
- Maroyi, A., 2011. Traditional use of medicinal plants in South-Central Zimbabwe: Review and perspective. *J Ethnobiol Ethnomed*, 9, 31-43.
- Mazid, M., Khan, T.A. and Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol Med*, 3(2), 232-49.
- Meiyanto, E. and Hermawan, A.A., 2012. Natural products for cancer targeted therapy: Citrus flavonoids as potent chemoprotective agents. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 427-436.
- Mershiba, S.D., Dassprakash, M.V. and Saraswathy, S.D., 2013. Protective effect of naringenin on hepatic and renal dysfunction and oxidative stress in arsenic intoxicated rats. *Mol Biol Rep*, 40, 3681-3691.

- Michelle, L., Fraser, G.S. M. and Andy H. L., 2007. Green tea and stroke prevention: emerging evidence. *Complementary Therapies in Medicine*, 13, 46-53.
- Michelsa, G., Watjena, W., Nieringa, P., 2005. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, 206, 337-348.
- Micromedex (R) Healthcare Series Vol. 146 expires 12/2010.
- Middleton, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-751.
- Miguel, L.N., 2009. Distribution and biological activities of luteolin. *Med Chemistry*, 9(1), 31-59.
- Min, W., Lin, X.F., Miao, X., Wang, B.T., Yang, Z.L. and Luo, D., 2008. Inhibitory effects of Baicalin on ultraviolet B-induced photo-damage in keratinocyte cell line. *Am. J. Chin. Med*, 36, 745-760.
- Mingshu, L., Qiang, H. and Dongying, J., 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology*, 46(1), 68-84.
- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H. and Jennings, K.R., 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res*, 36, 1199-1208.
- Moktar, A., Ravoori, S., Vadhanam, M.V., Gairola, C.G. and Gupta, R.C., 2009. Cigarette smoke-induced DNA damage and repair detected by the comet assay in HPV-transformed cervical cells. *International journal of oncology*, 35(6), 1297-1304.
- Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J. and Becana, M., 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 861-70.
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. and Blomhoff, R., 2004. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of ageing and development*, 125(4), 315-324.
- Mosmann Tim., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mulvihill, E. E., Allister, E. M., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Sawyez, C.G., Edwards, J.Y. and Huff, M.W., 2009. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 58(10), 2198-2210.
- Mutanen, M., Pajari, A.M., Pairarinta, E., Misikangas, M., Rajakangas, J., Martinen, M. and Oikarinen, S., 2008. Berries as chemopreventive dietary constituents- a mechanistic approach with the ApcMin/+mice. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17, 123-125.
- Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y., 2003. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 331-339.
- Nam, S., Smith, D. M. and Dou, Q. P., 2001. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10(10), 1083-1088.

- Ngobili, T.A., Shah, H., Park, J.P., Kwist, K.W., Inskeep, B. and Burg, K.J., 2015. Remodeling of tannic acid crosslinked collagen type I induces apoptosis in ER+ Breast cancer cells. *Anticancer Res*, 35, 1285-1290.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K. and van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418-425.
- Nizamlioglu, N.M. ve Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35.
- Noel, S., Kasinathan, M. and Rath, S.K., 2006. Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay. *Toxicology in Vitro*, 20, 1168-1172.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T., 1993. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, 32, 507-521.
- Orhan, F., Gulluce, M., Özkan, H. and Alpsoy, L., 2013. Determination of the antigenotoxic potencies of some luteolin derivatives by using a eukaryotic cell system, *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 141(1), 366-372.
- Östling, O. and Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-298.
- Pan, T.L., Wang, P.W., Leu, Y.L., Wu, T.H. and Wu, T.S., 2012. Inhibitory effects of *Scutellaria baicalensis* extract on hepatic stellate cells through inducing G2/M cell cycle arrest and activating ERK-dependent apoptosis via Bax and caspase pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 829-837.
- Pandurangan, A. K. and Ganapasam, S., 2013. Luteolin modulates cellular thiols on azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Asia Pacific Journal of Experimental Biological Sciences*, 4(2), 245-50.
- Pandurangan, A.K. and Esa, N.M., 2014. Luteolin, a Bioflavonoid Inhibits Colorectal Cancer through Modulation of Multiple Signaling Pathways: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(14), 5501.
- Panés, J., Gerritsen, M. E., Anderson, D. C., Miyasaka, M. and Granger, D.N., 1996. Apigenin Inhibits Tumor Necrosis Factor-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Upregulation In Vivo. *Microcirculation*, 3(3), 279-286.
- Papoutsis, Z., Kassi, E., Tsiapara, A., Fokialakis, N., Chrousos, G. P. and Moutsatsou, P., 2005. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . *J Agric Food Chem*, 53(20), 7715-7720.
- Park, J.H., Jin, C.Y., Lee, B. K., Kim, G.Y., Choi, Y.H. and Jeong, Y.K., 2008b. Naringenin induces apoptosis through downregulation of Akt and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food and chemical toxicology*, 46(12), 3684-3690.
- Park, S.W., Lee, C.H., Kim, Y.S., Kang, S.S., Jeon, S.J., Son, K. H. and Lee, S.M., 2008a. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *Journal of pharmacological sciences*, 106(1), 136-143.

- Park, Y.K., Park, E. and Kim, J.S., 2003. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutag*, 529, 77-86.
- Patel, D., Shuklaand S. and Gupta S., 2007. Apigenin and cancer chemoprevention: Progress, potential and promise (Review). *International Journal Of Oncology*, 30, 233-245.
- Patel, D.K., Prasad, S.K., Kumar, R. and Hemalatha, S., 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(4), 320-30.
- Patil, S. P., Jain, P. D., Sancheti, J. S., Ghumatkar, P. J., Tambe, R. and Sathaye, S., 2014. Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86, 192-202.
- Peter, J. N., Henson, R., Bleeker, G., Wehbe, H., Meng, F. and Patel, T., 2007. Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways. *Journal of Hepatology*, 46, 222-229.
- Prabakaran, M., Chandrakala, N. and Panneerselvam, A., 2011. Antimicrobial activity of *Indigofera glandulosa* (wild). *Asian J Plant Sci Res*, 1, 18-25.
- Prasetyo, E.N., Nyanhongo, G.S. and Guebitz, G.M., 2011. Enzymatically enriching naringenin with hydroxylated and/or methoxylated phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 46, 1019-1024.
- Priyadarsini, K. I., Khopde, S. M., Kumar, S. S. and Mohan, H., 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(7), 2200-2206.
- Qiao, H., Dong, L., Zhang, X., Zhu, C., Zhang, X., Wang, L., Liu, Z., Chen, L., Xing, Y., Wang, C. and Li, Y., 2012. Protective effect of luteolin in experimental ischaemic stroke: upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. *Neurochem Res*, Sep 37 (9), 2014-2024.
- Ramawat, K.G., Dass, S. and Mathur, M., 2009. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*. Springer, Berlin, 7-32.
- Ramos, A. A., Lima, C. F. and Pereira-Wilson, C., 2011. DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention, what do we know?. *Selected Topics in DNA Repair*, 237-270.
- Ramos, A.A., Pereira-Wilson, C. and Collins, A. R., 2010. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research*, 692, 6-11.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K. and Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.
- Raza, S.S., Khan, M.M., Ahmad, A., Ashafaq, M., Islam, F., Wagner, A.P. and Safhi, M. M., 2013. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- κ B signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience*, 230, 157-171.
- Reiners, J. J., Clift, R. and Mathieu, P., 1999. Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis*, 20(8), 1561-1566.

- Renugadevi, J. and Prabu, S.M., 2009. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, 256(1-2), 128-134.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20(7), 933-56.
- Rithidech, K.N., Tungjai, M. and Whorton, E.B., 2005. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1), 96-104.
- Rusak, G., Piantanida, I., Mašić, L., Kapuralin, K., Durgo, K. and Kopjar, N., 2010. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 181-189.
- Russo, G. L., 2007. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 74, 533-544.
- Sağlam, M.B., 2013. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri ve Anjiotensin Reseptör Blokörlerinin Gastroprotektif ve Gastrotoksik Etkilerinin Oksidan ve Antioksidan Mekanizmalarla İlişkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri, Enstitüsü, Erzurum.
- Sak, K., 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*, 8(16), 122-146.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492 s, Ankara.
- Sarışen, Ö. ve Çalışkan, D., 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat!. *STED*, 14(8),185-187.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundrarn, K.M. and Latha, L.Y., 2010. Extraction isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Comp Altern Med*, 8, 1-10.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schwartz, G. K. and Dickson, M., 2009. Development of cell cycle inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology*, 16(2), 36-43.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G. and Heber, D., 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360-367.
- Sehrawat, A., Sharma, S. and Sultana, S., 2006. Preventive effect of tannic acid on 2-acetylaminofluorene induced antioxidant level, tumor promotion and hepatotoxicity: a chemopreventive study. *Redox Rep*, 11, 85-95.
- Seligmann, I.C., Lima, P.D., Cardoso, P.C., Khayat, A.S., Bahia, M.O. and Buchi, D.F., 2003. The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. *Genet Mol Res*, 2(2), 223-8.
- Shahi, J. and Singh, A., 2010. A Comparative study on the Piscicidal activity of synthetic pesticides and plant origin pesticides, to fish *Channa punctatus*. *World Journal of Zoology*, 5, 20-24.
- Sharma, N., Trikha, P., Athar, M. and Raisuddin, S., 2001. Inhibition of benzo [a] pyrene-and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*.

- Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 480, 179-188.
- Sharma, N.K., 2013. Modulation of radiation-induced and mitomycin C-induced chromosome damage by apigenin in human lymphocytes in vitro. *Journal of radiation research*, 54(5), 789-797.
- Shen, C. H., Kuan, Y.H., Lee, S.S., Yang, M.L., Kuo, H.C. and Chiu, Y.W. 2013. The protective effect of luteolin on cytotoxicity and genotoxicity of bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate in macrophages involved in DNA damage and caspases activation. *Life Science Journal*, 10(4), 3137-3142.
- Shi, H., Zhao, B. And Xin, W., 1995. Scavenging effects of baicalin on free radicals and its protection on erythrocyte membrane from free radical injury. *Biochemistry and molecular biology international*, 35(5), 981-994.
- Shiau, A.L., Shen, Y.T., Hsieh, J.L., Wu, C.L. and Lee, C.H., 2014. *Scutellaria barbata* inhibits angiogenesis through downregulation of HIF-1 in lung tumor. *Environmental Toxicology*, 29(4), 363-70.
- Shukla, S. and Gupta, S., 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical research*, 27(6), 962-978.
- Shukla, S. and Gupta, S., 2004. Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Molecular Carcinogenesis*, 39(2), 114-126.
- Shukla, S. and Gupta, S., 2006. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther*, 5(4), 843-852.
- Siddique, Y.H. and Afzal M., 2009. Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cell. *Food Chem Toxicol*, 47, 536-539.
- Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T. and Afzal, M., 2010. Anticlastogenic effect of apigenin in human lymphocytes treated with ethinylestradiol. *Fitoterapia*, 81(6), 590-594.
- Siddique, Y.H., Beg, T. and Afzal, M., 2008. Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs. *Toxicology in vitro*, 22(3), 625-631.
- Simeonova, R., Bratkov, V. M., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Manov, V. and Krasteva, I., 2015. Experimental liver protection of n-butanolic extract of *Astragalus monspessulanus* L. on carbon tetrachloride model of toxicity in rat. *Redox Report*, 20(4), 145-153.
- Singh, J.P., Selvendiran, K., Banu, S.M., Padmavathi, R. and Sakthisekaran, D., 2004. Protective role of apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine*, 11, 309-314.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- Šmerák, P., Šestáková, H., Polívková, Z. and Bárta, I., 2002. Antimutagenic effect of ellagic acid and its effect on the immune response in mice. *Czech journal of food sciences*, 20, 181-191.
- Snijman, P.W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I.R. and Gelderblom, W.C.A., 2007. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutation Research*, 631, 111-123.

- Snyder, R. D. and Gillies, P.J., 2002. Evaluation of the clastogenic, DNA intercalative, and topoisomerase II-interactive properties of bioflavonoids in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(4), 266-276.
- Soyocak, A., Coşan, D.T., Başaran, A., Güneş, H.V. and Değirmenci, İ., 2011. Evaluation of Bax protein in breast cancer cells treated with tannic acid. *Dicle Medical Journal/Dicle Tip Dergisi*, 38(1).
- Srinivas, N., 2010. Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives. *Xenobiotica*, 40(5), 357-67.
- Srivastava, R. C., Husain, M. M., Hasan, S. K. and Athar, M., 2000. Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Letters*, 153, 1-5.
- Stavric, B., 1994. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin Biochem*, 27(4), 245-248.
- Stich, H.F., Stich, W. and Parida, B.B., 1982. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett*, 17, 125-34.
- Stopper, H., Schmitt, E. and Kobras, K., 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research*, 574,139-155.
- Šulić, S., Panić, L., Barkić, M., Merćep, M., Uzelac, M. and Volarević, S., 2005. Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes & development*, 19(24), 3070-3082.
- Sun, Y. I., Oberley, L. W. and Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Sun, Y., Zhang, T., Wang, B., Li, H. and Li, P., 2012. Tannic acid, an inhibitor of poly(ADP-ribose) glycohydrolase, sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin. *Anticancer Drugs*, 23, 979-990.
- Snyder RD, Gillies PJ. *Environ Mol Mutagen*, 40,266–276.
- Şener, G. ve Yeğen, B.Ç., 2009. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 22(3), 5-13.
- Takahashi, H., Chen, M. C., Pham, H., Angst, E., King, J. C., Park, J. and Hines, O. J. 2011. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(8), 1465-1474.
- Tarrago, T., Kichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixido, M. and Giralt, E., 2008. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg Med Chem*, 16, 7516-7524.
- Testai, L., Martelli, A., Cristofaro, M., Breschi, M.C. and Calderone, V., 2013. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J Pharm Pharmacol*, 65(5), 750-756.
- Thrall, K.D., Vucelick, M.E., Gies, R.A. and Benson, J.M., 2000. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A*, 60(8), 531-548.
- Thulstrup, P.W., Thormann, T., Spangetlarsen, J. and Bisgaard, H.C., 1999. Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichorism UV–vis spectroscopy. *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 265, 416–421.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Tikoo, K., Tamta, A., Ali, I.Y., Gupta, J. and Gaikwad, A.B., 2008. Tannic acid prevents azidothymidine (AZT) induced hepatotoxicity and genotoxicity along with change in expression of PARG and histone H3 acetylation. *Toxicology letters*, 177(2), 90-96.
- TKB (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı), 2008. Aromatik ve Tıbbi Bitkiler. http://www.tarim.gov.tr/uretim/Bitkisel_Uretim,Aromatik_Tibbi_Bitkiler.html. Erişim Tarihi: 28.08.2010.
- Tsai, Y.D., Chen, H.J., Hsu, H. F., Lu, K., Liang, C.L., Liliang, P.C. and Houng, J.Y., 2013. Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 837-845.
- Tsuji, PA. and Walle, T., 2008. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chem Biol Interact*, 171(1), 37 - 44.
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. and Reichl, F. X., 2010. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26(1), 51-58.
- Ülker, Z., 2011. *Datura stramonium* Ekstraktlarının İnsan Lenfosit Kültürleri Üzerine Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Vargo, M. A., Voss, O. H., Poustka, F., Cardounel, A. J., Grotewold, E. And Doseff, A.I., 2006. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC δ and caspases in leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, 72(6), 681-692.
- Varshney, M., Vijayan, V. and Meshram, G.P., 2015. Chemopreventive effects of ellagic acid against genotoxicity induced by benzo (a) pyrene. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(6), 786-798.
- Vasconcellos, J. A. 2000. Functional foods. Concepts and health benefits. <http://www.leatherheadfood.com/>. (10.01.2016).
- Vattem, D.A. and Shetty, K., 2005. Biological functionality of ellagic acid: a review. *J Food Biochem*, 29, 234-266.
- Vattem, D.A., Jang, H.D., Levin, R. and Shetty, K., 2006. Synergism of cranberry phenolics with ellagic acid and rosmarinic acid for antimutagenic and DNA protection functions. *Journal of food biochemistry*, 30(1), 98-116.
- Wan, Q., Wang, H., Han, X., Lin, Y., Yang, Y., Gu, L. and Yang, Y., 2014. Baicalin inhibits TLR7/MYD88 signaling pathway activation to suppress lung inflammation in mice infected with influenza A virus. *Biomed Rep*, 2, 437-441.
- Wang, B.D., Yang, Z.Y. and Li, T.R., 2006. Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of the Ln (III) complexes with 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde-(2'-hydroxy) benzoyl hydrazone. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(17), 6012-6021.

- Wang, C.C., Chen, L.G. and Yang, L.L., 2000a. Cuphiin D1, the macrocyclic hydrolyzable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. *Cancer Lett*, 149, 77-83.
- Wang, G.G., Lu, X.H., Ding, M., Tang, W.T., Li, W., Zhao, X. and Zhang, C., 2011. Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/reperfusion. *Sheng Li Xue Bao*, 63(2),177-83.
- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z. And Liu, X., 2012. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological trace element research*, 146(3), 354-359.
- Wang, K., Feng, C., Li, C., Yao, J., Xie, X., Gong, L. and Ren, J., 2015. Baicalin protects mice from aristolochic acid I-induced kidney injury by induction of CYP1A through the aromatic hydrocarbon receptor. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 16454-16468.
- Wang, W., Heideman, L., Chung, C.S., Pelling, J.C., Koehler, K.J. and Birt, D.F., 2000b Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog*, 28(2), 102 - 110.
- Wang, W., VanAlstyne, P.C., Irons, K.A., Chen, S., Stewart, J.W. and Birt, D.F., 2004. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr Cancer*, 48,106–114
- Watson, R.R. and Preedy, V.R., 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health. Fruits and Vegetables*, Academic Press, Amsterdam, Boston.
- Watzl, B. and Leitzmann, C., 2005. *Bioaktive substanzen in lebensmitteln*. Hippokrates, 254 p, Verlag, Stuttgart.
- Weber, L.W., Boll, M. and Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33, 105-136.
- Weisel, T., Baum, M. and Eisenbrand, G., 2006. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J*, 1, 388-397.
- Wen, Y.F., Zhao, J.Q., Bhadauria, M. and Nirala, S.K., 2013. Baicalin prevents cadmium-induced hepatic cytotoxicity, oxidative stress and histomorphometrical alterations. *Exp Toxicol Pathol Off J Ges Toxikolog Pathol*, 65,189-196.
- Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek- Zwierzycka, K. and Swierniak, A., 2001. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, 77, 631-636.
- Winiarska-Mieczan, A., 2013. Protective effect of tannic acid on the brain of adult rats exposed to cadmium and lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36, 9-18.
- Winiarska-Mieczan, A., 2015. The potential protective effect of green, black, red and white tea infusions against adverse effect of cadmium and lead during chronic exposure—A rat model study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(2), 521-529.
- Winiarska-Mieczan, A., Krusinski, R. and Kwiecien, M., 2013. Tannic acid influence on lead and cadmium accumulation in the hearts and lungs of rats. *Adv Clin Exp Med*, 22, 615 - 620.

- Wölfle, U., Esser, P.R., Simon-Haarhaus, B., Martin, S.F., Lademann, J. and Schempp, C.M. 2011. UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(9), 1081-1093.
- Wu, K., Yuan, L. H. and Xia, W., 2005. Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(29), 4461-4464.
- Wu, L. T., Chub, C. C., Chunga, J. G., Chenc, C.H., Hsud, L.S., Liub, J.K. and Chena, S. C., 2004. Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Research*, 556,75-82.
- Xu, B., Li, X.X., He, G.R., Hu, J.J., Mu, X., Tian, S. and Du, G.H., 2010. Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats. *Eur J Pharmacol*, 627, 99-105.
- Yamagata, K., Kitazawa, T., Shinoda, M., Tagawa, C., Chino, M. and Matsufuji, H., 2009. Stroke status evoked adhesion molecule genetic alterations in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and the apigenin inhibition of their expression. *Stroke research and treatment*, 2010.
- Yan, T., Li, L., Sun, B., Liu, F., Yang, P., Chen, T., Li, T. and Liu, X., 2014. Luteolin inhibits behavioral sensitization by blocking methamphetamine-induced MAPK pathway activation in the caudate putamen in mice. *PLoS One*, 9, 1-6.
- Yañez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Canteras, M. And Teruel, J.A.L., 2004. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines, relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*, 49, 191-199.
- Yang, J., Li, Q., Zhou, X.D., Kolosov, V. P. and Perelman, J. M., 2011a. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- κ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells. *Mol Cell Biochem*, 351, 29-40.
- Yang, J., Yang, X. and Li, M., 2012. Baicalin, a natural compound, promotes regulatory T cell differentiation. *BMC Complement Altern Med*, 12, 64.
- Yang, J., Yang, X., Chu, Y. and Li, M., 2011b. Identification of Baicalin as an Immunoregulatory Compound by Controlling TH 17 Cell Differentiation. *PLoS One*, 6(2), e17164.
- Yang, L.L., Lee, C.Y. and Yen, K.Y., 2000. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Lett*, 157, 65-75.
- Yeh, S.L., Wang, W.Y. and Huang, C.H., 2005. Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVa-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3h10t1/2 cells. *J Nutr Biochem*, 16, 729-735.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. and Peng, H.H., 1997. Antioxidant and Pro-oxidant effects of various tea extracts. *J Agric Food Chem*, 45, 30-34.
- Yılmaz, S. and Ozan S., 2003. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochemistry and Function*, 21(4), 325-330.
- Yi, L.T., Li, J.M., Li, Y.C., Pan, Y., Xu, Q. and Kong, L.D., 2008. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. *Life Sci*, 82, 741-751.

- Yi, L.T., Li, C.F., Zhan, X., Cui, C.C., Xiao, F., Zhou, L.P. and Xie, Y., 2010. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(7), 1223-1228.
- Yilma, A. N., Singh, S. R., Morici, L. and Dennis, V. A., 2013. Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation. *Mediators Inflammation*, 2013, 2013, 102457.
- Yin, F., Giuliano, A.E., Law, R.E. and Van Herle, A.J., 2001. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res*, 21, 413-420.
- Yoshimizu, N., Otani, Y., Saikawa, Y., Kubota, T., Yoshida, M., Furukawa, T. and Sato, T., 2004. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20(s1), 95-101.
- Zahin, M., Aqil, F. and Ahmad, I., 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2), 99-107.
- Žegura, B., Dobnik, D., Niderl, M. H. and Filipič, M., 2011. Antioxidant and antigenotoxic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in *Salmonella typhimurium* TA98 and HepG2 cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(2), 296-305.
- Zhang, J. A., Yin, Z., Ma, L.W., Yin, Z Q., Hu, Y.Y., Xu, Y. and Zhou, B.R., 2014. The protective effect of baicalin against UVB irradiation induced photoaging: an in vitro and in vivo study. *PloS one*, 9(6), e99703.
- Zhang, N., Van Crombruggen, K. and Holtappels, G., 2012. A herbal composition of *Scutellaria baicalensis* and *Eleutherococcus senticosus* shows potent anti-inflammatory effects in an ex vivo human mucosal tissue model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 9.
- Zhang, Q., Zhao, X.H. and Wang, Z.J., 2009. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicol In Vitro*, 23(5), 797 - 807.
- Zhang, X.P., Tian, H., Lai, Y.H., Chen, L., Zhang, L., Cheng, Q.H. and Wang, F., 2007. Protective effects and mechanisms of Baicalin and octreotide on renal injury of rats with severe acute pancreatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(38), 5079-5089.
- Zhang, Y., Gao, Z., Liu, J. and Xu, Z., 2011. Protective effects of baicalin and quercetin on an iron-overloaded mouse: comparison of liver, kidney and heart tissues. *Natural product research*, 25(12), 1150-1160.
- Zhang, Y., Su, Y., Peng, J., Zhao, X., Liu, J., Zhao, J. and Jiang, Z., 2013. Composite nanofiltration membranes prepared by interfacial polymerization with natural material tannic acid and trimesoyl chloride. *J Membr Sci*, 429, 235-242.
- Zhao, L., Wang, J.L., Liu, R., Li, X.X., Li, J.F. and Zhang, L., 2013. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecules*, 18, 9949-65.
- Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T. and Xin, W., 2005. Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochim, Biophys Acta*, 1725, 103-110.

- Zheng, M.S., Lee, Y.K., Li, Y., Hwangbo, K., Lee, C.S., Kim, J. R. and Son, J.K., 2010. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and cytotoxicity of compounds from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *Archives of pharmacal research*, 33(9), 1307-1315.
- Zhou, B. R., Luo, D., Wei, F. D., Chen, X. E. and Gao, J., 2008. Baicalin protects human fibroblasts against ultraviolet B-induced cyclobutane pyrimidine dimers formation. *Archives of dermatological research*, 300(6), 331-334.
- Zhou, B.R., Liu, W.L. and Luo, D., 2011. Protective effect of baicalin against multiple ultraviolet B exposure-mediated injuries in C57BL/6 mouse skin. *Archives of pharmacal research*, 34(2), 261-268.
- Zhou, Q.B., Duan, C.Z., Jia, Q., Liu, P. and Li, L.Y., 2014. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury by inhibition of protease-activated receptor-1 and apoptosis. *Chin J Integr Med*, 20, 116-122.
- Zhu, L.H., Bi, W., Qi, R.B., Wang, H.D. and Lu, D.X., 2011. Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int J Neurosci*, 121(6), 329-36.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara'nın Haymana ilçesinde doğdu. İlköğrenimini ve orta öğrenimini Ankara Altındağ'da tamamladı. 2003 yılında kayıt yaptırdığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Bilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında yüksek lisans öğrenimini tamamlayarak Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda Uzman Biyolog olarak görev aldı. 2012 yılında Moleküler Biyoloji Bilim dalında doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk babası olup, Ocak 2013 tarihinden itibaren Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.