

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ISIRGAN OTU (*Urtica dioica L.*) VE ISIRGAN TOHUMU
(*Fructus urtica piluliferae*) EKSTRAKTLARININ HÜCRE
KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yunus YÜKSELTEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

ŞANLIURFA

2012

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ISIRGAN OTU (*Urtica dioica L.*) VE ISIRGAN TOHUMU
(*Fructus urtica piluliferae*) EKSTRAKTLARININ HÜCRE
KÜLTÜRÜ ORTAMINDA GENOTOKSİSİTE VE
OKSİDATİF DURUM ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yunus YÜKSELTEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığı Tarafından **12069** nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2012

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yunus YÜKSELTEN'in hazırladığı "Isırgan Otu (*Urtica dioica L.*) Ve Isırgan Tohumu (*Fructus Urtica piluliferae*) Ekstraktlarının Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite Ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması." konulu çalışma, 19.07.2012 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

Harran Üniversitesi

BAŞKAN

Doç. Dr. Şahabettin SELEK

Harran Üniversitesi

ÜYE

Prof. Dr. Nurten AKSOY

Harran Üniversitesi

ÜYE

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

19/07/2012
Prof. Dr. Nurten AKSOY
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince, benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, beni bu çalışmaya teşvik edip yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim. Eğitimim süresince her türlü desteklerini esirgemeyen, ilgi ve anlayış ile eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten AKSOY ve Doç.Dr. Şahabettin SELEK 'e teşekkür ederim. Bu tez ile ilgili desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Necmettin AKTEPE ve Yrd. Doç. Dr. Cumali KESKİN'e teşekkür ederim. Ayrıca benimle tecrübe ve birikimini paylaşan, benden yardımlarını esirgemeyen Halil Badem ve Öğr. Gör Abdullah TAŞKIN'a da teşekkür ederim. Bu tezin yapılmasında maddi destek veren Harran Üniversitesi Bilimsel Akademik Kurulu kurumuna teşekkür ederim. Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Sevgilerimle...

Yunus YÜKSELTEN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Genotoksisite Tanımı	3
2.2. Genetik Toksikoloji (Kimyasal Mutajenezis)	4
2.2.1 Genotoksisite, Genotoksik Etkiler ve Değerlendirme Yöntemleri	5
2.2.2 DNA Hasarı Oluşum Nedenleri	9
2.2.3 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	9
2.2.4 DNA Tamiri	12
2.2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	16
2.2.6. Başlıca serbest radikal oluşum kaynakları	20
2.2.7.Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler	21
2.2.8.Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	22
2.2.9. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	23
2.3. Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Risk Faktörleri	23
2.3.1. Genetik Faktörler	23
2.3.2. Yaş	24
2.3.3. Çevresel Faktörler	24

2.3.4. Coğrafi Faktörler	24
2.3.5. Beslenme	24
2.3.6. İlaçlar Ve Medikal Tedaviler	24
2.3.7. İnfeksiyonlar	25
2.3.8. İnflamatuvar Hastalıklar	25
2.3.9. Genotoksisitenin Karsinojenezisle İlişkisi	25
2.4.Genotoksik Etkinin Belirlenmesinde Biyogöstergeler	27
2.4.1. Kromozomal Aberasyon	28
2.4.2. Comet Assay Tekniği ve Kullanım Alanları	31
2.4.3. <i>Salmonella</i> /Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi	36
2.4.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi	38
2.4.5.Mikronükleus (MN)	39
2.5. Antioksidanlar	45
2.5.1. Antioksidan Enzimlerin Sınıflandırılması	46
2.5.2.Enzim Karakterli Antioksidanlar	47
2.5.3. Enzimatik olmayan antioksidanlar	49
2.5.4. Polifenoller	51
2.6. Bitkilerin Geleneksel Halk Tıbbında Kullanımı	57
2.7. Çalışmada Kullanılan Bitki;	57
2.7.1. Isırgan otu (<i>Urtica dioica L.</i>)	57
2.8. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	62
2.8.1.Hücre Kültür Tipleri	62
2.8.2.Hücre Kültür Koşulları	66
2.8.3.Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri	63
2.8.4. Dondurularak saklama	63

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	67
3.1. Gereçler	67
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	67
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	68
3.2. Bitkilerin Toplanması	69
3.2.1. Örnek Hazırlanması ve Ekstraksiyonu	69
3.3. Heparinize Kan Örneği	70
3.4. Hazırlanan Besiyeri	70
3.4.1. DMEM Besiyeri	70
3.5. Hazırlanan Tampon	70
3.5.1. PBS (Fosfat) Tamponu	70
3.6. Yöntem	70
3.6.1. Toplam Fenolik Madde Analizi	70
3.6.2. Toplam Flavonoid Madde Analizi	71
3.7. Mononükleer Lökositlerin Separasyonu ve İnkübasyonu	72
3.7.1. Mononükleer Lökositlerin Separasyonu	72
3.7.2. Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnkübasyonu	72
3.7.3. Mononükleer Lökositlerin Sayımı	72
3.8. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi	73
3.8.1. Yöntemin Prensipleri	73
3.9. Comet Assay Yöntemi ile DNA Tamiri Tayini	75
3.10. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS)	76
3.10.1. Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar	76
3.11. Total Oksidan Seviye (TOS)	77
3.11.1. Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar	77

3.12. Yapılan İstatistiksel Analizler	77
4-ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	78
5- KAYNAKLAR	93

ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Mutasyonların yol açtığı zararlar.....	5
Şekil 2: Genotoksik maddelerin yol açtığı moleküler değişimler.....	8
Şekil 3: 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'in oluşum mekanizmaları.....	12
Şekil 4: DNA Hasarı sonucu oluşan süreç.....	13
Şekil 5: Fotoreaktivasyon mekanizması.....	14
Şekil 6: Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması.....	16
Şekil 7: Serbest radikal oluşumu.....	20
Şekil 8: Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat vdi2002).....	21
Şekil 9: Normal İnsan kromozomu	29
Şekil 10: Didentrik Kromozom	30
Şekil 11: Down sendromu	31
Şekil 12: Comet yöntemi ile hasarlı, az hasarlı ve hasarsız hücre örnekleri.....	33
Şekil 13: Comet yöntemi ile “hasarlı” hücre örneği	33
Şekil 14: Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler-1	37
Şekil 15: Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler -2.....	37
Şekil 16: Kardeş kromatid değişimleri ve Kromatidler arasında oluşan değişimler.....	39
Şekil 17: Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	40
Şekil 18: Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	41

Şekil 19: sitokinezi bloke edilmiş Nükleuslarda bir nukleus oluşturmaya aday	44
Şekil 20: Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre bulunan hücre.....	44
Şekil 21: İki mikronükleus ve iki kromozom görülen hücre	44
Şekil 22: Antioksidan gruplar ve görevleri	46
Şekil 23: Glutatyon döngüsü.....	49
Şekil 24: Polifenolik bileşikler.....	52
Şekil 25: Polifenol kimyasal yapısı.....	55
Şekil 26: <i>Urtica dioica L</i>	59
Şekil 27: Erkek ısırgan otu ve Dişi ısırgan otu.....	59
Şekil 28: Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.....	76
Şekil 29: Farklı konsantrasyonlarda ve çözücülerdeki fenol miktarlarına göre absorbans eşdeğerleri.....	78
Şekil 30: <i>Urtica dioica L</i> .Total fenol miktarı standart grafik eğrisi	79
Şekil 31: <i>Urtica dioica L</i> .Total flavonoid miktarı standart grafik eğrisi.....	81
Şekil 32 : Comet Assay yöntemi ile görüntülenen hasar dereceleri A-4,B-3,C-2,D-1,E-0....	83
Şekil 33: <i>Urtica Dioica L.</i> 'nin konsantrasyona göre farklı inkübasyon saatlerinde DNA hasarı miktarları	85
Şekil 34: <i>Fructus urtica pilulifera</i> 'nın konsantrasyona göre farklı inkübasyon saatlerinde DNA hasarı miktarları	86
Şekil 35: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen <i>Urtica dioica</i> 'nın total antioksidan seviye üzerine etkisi.....	87
Şekil 36: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen ısırgan tohumu (<i>fructus urtica pilulifera</i>) 'nun total antioksidan seviye üzerine etkisi.....	87

Şekil 37: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen <i>Urtica dioica</i> 'nın total oksidan seviyeleri üzerine etkisi.....	88
Şekil 38: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen ısırgan tohumu (<i>Urtica fructus pilulifera</i>) 'nun total oksidan seviyeleri üzerine etkisi.....	89

TABLULAR

Tablo 1 : Reaktif oksijen partikülleri.....	17
Tablo 2 : Bazı Önemli Genotoksik Kimyasal Karsinojenler.....	27
Tablo 3 : Polifenoller ve sınıfları.....	53
Tablo 3 : Total fenol gallik asit standart eğrisi.....	74
Tablo 4 : Farklı çözücülerdeki ısırgan otu yaprağının GAE/g KM cinsinden toplam fenolik madde içerikleri.....	79
Tablo 5 : Isırgan otu tohumunun farklı çözücülerdeki toplam fenolik madde içeikleri.....	80
Tablo 6 : Farklı çözücülerdeki ısırgan otu yaprağının QE/g KM cinsinden toplam flavonoid madde içerikleri.....	81
Tablo 7 : Farklı çözücülerdeki ısırgan otu tohumunun QE/g KM cinsinden toplam flavonoid madde içerikleri.....	82
Tablo 8 : Farklı konsantrasyonlarda ısırgan otu yaprak ekstrelerinin DNA hasarı oluşumuna karşı oluşturduğu direnç seviyeleri.....	84
Tablo 9 : Farklı konsantrasyonlarda ısırgan tohumu ekstrelerinin DNA hasarı oluşumuna karşı oluşturduğu direnç seviyeleri.....	84

KISALTMALAR

A	Adenin
BER	Baz Eksizyon Tamiri
BHT	Büttilemiş hidoksitoluen
C	Sitozin
Cl	Klor
DADS	Diallil disülfür
DAS	Diallil sülfür
DATS	Diallil trisülfid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
EM	Ekstraselüler matriks
ETS	Elektron transport sistemi
FBS	Fetal Bovin Serum (Fetal sığır serumu)
FCS	Fetal Calf Serum
FD	Folin Dennis
Fe	Demir
G	Guanin
GAE/gKM	Gallik asit eşdeğerliği gram kuru madde oranı
GC	Guanilat Siklaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutation-S-Transferaz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
KA	Kromozomal Aberasyon
KDD	Kardeş Kromatid Değişimi
LMP	Low melting point (Agaroz Jel)
Nm	nanometre

MDA	Malondialdehit
mG	O6-Metilguanin
MN	Mikronükleus
mRNA	Messenger (Mesajcı) RNA
NER	Nucleotide Excision Repair (Nükleotid Çıkarma Onarımı)
PBS	Phosphat Buffer Solution (Tuzlu Fosfat Tamponu)
PCE	Polikromatik eritrosit
PPH	Polifenol
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit distumulaz
tRNA	Translation (taşıyıcı) RNA
T	Timin
TAS	Total Antioksidan Seviye
TOS	Total oksidan seviye
U	Urasil
UV	Ultraviyole
QE/gKM	Quaersetin eşdeğerliği gram kuru madde oranı
5-OH-Cyt	5-hidroksisitozin
5-OH-Ura	5-hidroksi urasil
8-OH-dGua	8-hidroksideoksiguanozin

ÖZET

Çalışmamızda ısırgan otu ve tohumunun farklı ekstraksiyonlardaki total fenol, flavonoid ve antioksidan seviyeleri ölçülerek ve en güçlü antioksidan özellik gösteren çözücü ekstraktını tespit etmek, farklı konsantrasyonlardaki ısırgan otu ve tohumunun ekstraktının hücre kültürü ortamında H₂O₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı göstermiş olduğu direncin etkinliğini alkalen tekli hücre jel elektroforezis yöntemi (Comet Assay) ile ölçerek, oluşan direnç ile oksidatif durum arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmada, insan mononükleer lokosit hücrelerinin bulunduğu hücre kültür ortamında H₂O₂'nin indüklediği DNA hasarına karşı en güçlü aktivite gösteren metanol ekstraktının potansiyel hasar önleyici etkileri alkalik tek hücre elektroforezi (Comet Assay) ile, total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) hazır ticari kitler kullanılarak analiz edildi. Hazırlanan hücre kültür flasklarından 1. 2. ve 3. saatlerde Comet Assay yöntemi ile mononükleer lokosit DNA hasar düzeyleri incelendi. En yüksek anti-genotoksik etkinin 3-6,25 µg/ml konsantrasyonlarda görüldüğü, bu seviyenin altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda anti-genotoksik etkinin giderek azaldığı tespit edildi. Sadece aynı konsantrasyonlarda H₂O₂ nin ortama konulduğu pozitif kontrollerde genotoksik etkinin göstergesi olan DNA hasarı 190 Arbitrary Unite (AU) tespit edilirken, negatif kontrollerde 4 AU tespit edildi. En yüksek anti-genotoksik etkinin görüldüğü 3 mg/ml lik konsantrasyonda ısırgan otu yaprağında DNA hasarı 32 AU seviyesinde iken, ısırgan tohumunda 104 AU seviyesindedir. Ancak, bu konsantrasyonun altındaki ve üstündeki dilüsyonlarda anti-genotoksik etkinin azaldığı tespit edildi. ısırgan otu ekstraktı konsantrasyon artışı ile TAS aktivitesi arasında pozitif, TOS arasında negatif ilişki tespit edilirken, oksidatif durum ile DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Sonuçlarda göstermektedir ki ısırgan otu tohum ve yaprağı optimum dozlarda anti-genotoksik etkiye sahiptir ve bu etki ısırgan otu yaprağında tohumuna göre daha güçlüdür. Anti-genotoksik etkinin ısırgan otu yaprağı ve tohumunda bulunan güçlü antioksidan etkiye sahip fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: ısırgan otu , ısırgan otu tohumu, DNA Hasarı, Total Antioksidan Seviye (TAS), Total Oksidan Seviye (TOS), Hücre Kültürü, Total Fenol, Total Flavonoid

ABSTRACT

In this study, measuring total phenol, flavonoid and antioxidant levels in different extraction of the nettle stinging leaf and seed the most powerful antioxidant solvent and extract were detected and measuring effectiveness of the resistance which have been formed by the nettle stinging leaf and seed extraction in different concentrations to H₂O₂ induced DNA damage in cell culture media with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay) method, it has been investigated that whether there is a relationship between this resistance and oxidative stress.

In the study, in cell culture media containing human mononuclear leukocyte cells the most powerful preventive effects of the methanol extract of stinging nettle against to H₂O₂ induced DNA damage with a single cell alkaline gel electrophoresis (comet Assay), the total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) were analyzed by using commercially available kits. In the prepared cell culture flasks 1,2 and 3 hours mononuclear leukocyte DNA damage levels were analyzed with the method of Comet Assay. The highest anti-genotoxic effects were seen between 3 and 6.25 mg/ml concentrations. At the concentrations below and above this levels anti-genotoxic effect were decreased. In the positive controls that has only H₂O₂ in the environment at the same concentrations of DNA damage as an indicator of genotoxic effects were 190 Arbitrary Unit (AU), whereas in negative controls the damage was 4 AU. The highest level of anti-genotoxic effects were seen at 3mg/ml concentration in that the damage was 32AU with the nettle leaf and 104 AU with the nettle seed. However antigenotoxic effect has been decreased at the above and below of this concentration. TAS activities were positively correlated with the concentration nettle extract and TOS negatively. There was no a significant relationship between oxidative status and DNA damage.

The results show that the optimum doses of stinging nettle seed and leaf have a strong anti-genotoxic effect and this effect is more powerful in the stinging leaf than in the seed. It has been thought that the anti-genotoxic effect of stinging nettle seed and leaf depends on its phenolic contents.

Key Words: *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, DNA damage, total antioxidant level (TAS), Total Oxidant Level (TOS), Cell Culture, Total Phenol, Total Flavonoid

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevremizde insan sağlığı bakımından tehlike oluşturan kimyasal maddelerin sayısı her geen gn artmaktadır. eşitli farmasötik ürünler, gıdalarda ve temizlik malzemelerinde bulunan kimyasal maddeler, pestisitler, petrol ürünleri, hava kirliliği ve sigara bunlardan bazılarıdır. Genelde oral, cilt ya da solunum yoluyla maruz kalınan bu tür toksik maddelerin yol açtığı genetik bozukluklar ve hastalıklar, ilgili toksik etkene maruziyetin artışına paralel olarak artmaktadır (1).

Mutajen maddelerin bu tür sorunların oluşumuna katkısı ve aralarındaki ilişki günümüzde daha iyi bilinmektedir. Gündelik hayatta sürekli karşı karşıya geldiğimiz byolesi etkiye sahip maddelerin insanlarda oluşturabilecekleri genotoksik etkinin kontrolü büyük önem taşımaktadır (1). Genotoksik etkinin kontrolünün öneminin yanında genotoksicitye karşı anti genotoksik etkenler ile ilgili araştırmalar son zamanlarda büyük önem kazanmıştır ve genotoksik ajanlara karşı anti genotoksik etkisi olduğu bilinen bitkiler fitoterapotik ajanlar olarak tercih edilir duruma gelmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, antioksidan aktiviteye sahip organik bileşiklerin, bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir. Bu bileşiklerin, çeşitli dejeneratif hastalıkları engellemedeki rolü gösterilmiştir (2). Özellikle polifenolik fitokimyasalların antibakteriyel (3), bağışıklığı düzenleyici, karaciğer hasarını önleyici (4), antitümör (5) ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu (6) gösterilmiştir.

Epidemiyolojik alışmalar, antioksidan bileşiklerin büyük bir kısmında anti-inflamatr, anti-aterosklerotik, anti-tümör, anti-mutagenik, antibakteriyel veya anti-viral aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Doğal antioksidanların vücuda alınması; kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi hastalıkların riskinin azalmasıyla doğrudan ilişkilidir (7). Tıbbi bitkiler; çoğunluğu yüksek antioksidan aktivite gösteren polifenoller, flavonoidler, C vitamini, E vitamini ve karotenoidler (8), kinonlar, kumarinler, lignanlar, alkaloidler, aminler gibi serbest radikalleri temizleyen birçok antioksidan çeşitine sahiptir (7).

Yapılan alışmalar fitokimyasal bileşiklerin kanser oluşumunu önlemede proflaktik olarak kullanımları yanında, oluşan kanseri tedavi etmeye yönelik olarak ta kullanıldığı bilinmektedir. Fitokimyasal bileşiklerden örneğin alkaloidler ve fenolik bileşiklerin özellikle

kanser veya tümörü tedavi edici etki göstermeleriyle, karotenoidler ise kanser engelleyici etkileriyle ön plana çıkmaktadırlar. Soya fasulyesi ve legümenlerde bulunan isoflavonoidler, kanser hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olduğu ve aynı zamanda angiogenez olayını da inhibe ettiği ve endotelial büyüme faktörünü durdurarak tümör büyümesini engelleyerek, apoptozise yol açtığı gösterilmiştir. Alkaloidlerin, hücrede DNA ya etki ederek kanserli hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini engellediği, bunun dışında fenolik bileşiklerin, daha çok hücre döngüsü kontrol proteinleri ve apoptozis mekanizmasının uyarılması üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Doğal ürünlerin giyim, gıda ve tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Organik kimya, endüstriyel devrim, ilaç ve tekstil sanayinin gelişimi ile sentetik ürünler ön plana çıkmıştır. Günümüz koşullarında sentetik ürünlerin sakıncalarının ortaya çıkması ile yeniden organik kökenli tedavi, gıda ve tekstil konusunda arayışlar başlamıştır. Bu arayışların en önemli doğal kaynaklarından biri olan ısırgan otu (*Urtica spp.*) her iki yarım kürenin subtropik ve tropik bölgelerinde yetişmektedir. Bünyesindeki çok yönlü kimyasal zenginliklerden dolayı tüm bitki kısımları geçmişten günümüze halk hekimliği, boya, sanayi, lif, gıda, kozmetik ve gübre amaçlarla kullanılmaktadır (8).

Isırgan otu *Urtica dioica L.*, *Urticaceae* (nettle) ailesinden uzun ömürlü bir ottur. Yaprakları ve gövdesi yakıcı tüylerle kaplanmış, tohumlu, çoğunda sütsü öz bulunmayan, basit yapraklı ve yabancı tozlaşma gösteren, küçük çiçekli, ılıman bölgelerde yetişen yabancı bir bitkidir. Aynı bitki üzerinde yaprak koltuklarında meydana gelen çiçekler ya erkek ya da dişidir. Kök ve tohumdan çoğalır, yavaş yayılır ve yıl boyunca sürekli olarak bulunur. Isırgan otu her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir. *Urtica*, —yakmak anlamına gelen Latince —*urere* kelimesinden gelmektedir. *Dioica* kelimesi —iki evli" demektir. Isırgan otunun yakıcı tüyelerine dokunulduğunda asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) salmasından dolayı (Fu ve ark., 2006) yakıcı etki gösterir ve adı da buradan gelmektedir (9).

Son yıllarda, *Urtica dioica* (ısırgan otu) üzerinde çok sayıda biyolojik aktivite çalışması yapılmış olması, bu bitkiden elde edilen ürünlerin de artmasını ve kullanımlarının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bitkisel ilaçların yanı sıra, gıda desteği şeklinde çok sayıda ürün değişik kullanım alanları sağlamak üzere piyasada bulunmaktadır(10).

Bu çalışmada Isırgan otu (*Urtica dioica*) ve tohumunun (*Urtica pilulifera*) çeşitli çözücülerdeki ekstraktlarının toplam fenol miktarlarının ve toplam flavonoid miktarlarının tespit edilerek en güçlü antioksidan özellik gösteren çözücü ekstraktının farklı konsantrasyonlarının hücre kültürü ortamında H₂O₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı direncini alkalen tekli hücre elektroforezis yöntemi (Comet Assay) ile ölçerek, oksidatif durum arasından bir ilişkinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Genotoksisite Tanımı

Genetik materyalin yapı ve özellikleri: Gen, canlıların tüm özelliklerinin kuşaktan kuşağa geçişini sağlayan maddeler bütünüdür. Fonksiyonel olarak tanımlamak gerekirse gen, özgül bir polipeptit zincirinin aminoasit sırasını belirleyen nükleotidler dizisidir (11).

Temelde canlılar prokaryot ve ökaryot olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ökaryotları, bakteri gibi tek hücreden oluşan prokaryotik canlılardan ayıran en önemli özellik, genetik materyallerini oluşturan kromozomların bir çekirdek zarı ile çevrili olmasıdır. Ökaryotik hücreler her kromozomun iki kopyasını taşıdıkları için diploid, tek kromozom kopyası taşıyan prokaryotik hücreler ise haploid olarak adlandırılırlar. Bir insan genomu 22 çift otozomal ve bir çift (XX ya da XY) cinsiyet kromozomundan oluşur (11,12).

Ökaryotik hücrelerin genetik materyali, hücre döngüsünün mitoz evresinde ışık mikroskobu altında incelenebilir. Mitotik bölünmenin amacı sitogenez ile iki yavru hücre meydana gelirken, yeni hücrelere eşit ve ana hücre ile aynı miktar genetik materyal aktarmaktır. Bir hücre döngüsü G1 (gap 1), S (sentez), G2 (gap 2) ve M (mitoz) evrelerinden oluşur. Mitoz dışındaki evrelerin tümü interfaz olarak adlandırılır ve hücre döngüsünün yaklaşık %90'ını oluşturur. Genomun kendini eşlediği (replikasyon) evre S evresidir. S evresinde genetik materyal iki katına çıkar ve mitoz bölünme sonucu yavru hücrelere aktarılır. Mitoz evresi, kendi içinde profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere dört evreye ayrılır. Kromozomların en iyi gözlenebildiği an, hücrede ekvatoryal plağa yerleştikleri metafaz evresidir(11).

Nükleik asitler, kalıtsal bilgi taşıma yeteneğine sahip, proteinler gibi polimerik yapıya sahip moleküllerdir. Protein yapı taşı aminoasitlerdir. Nükleik asitler ise nükleotid adı verilen

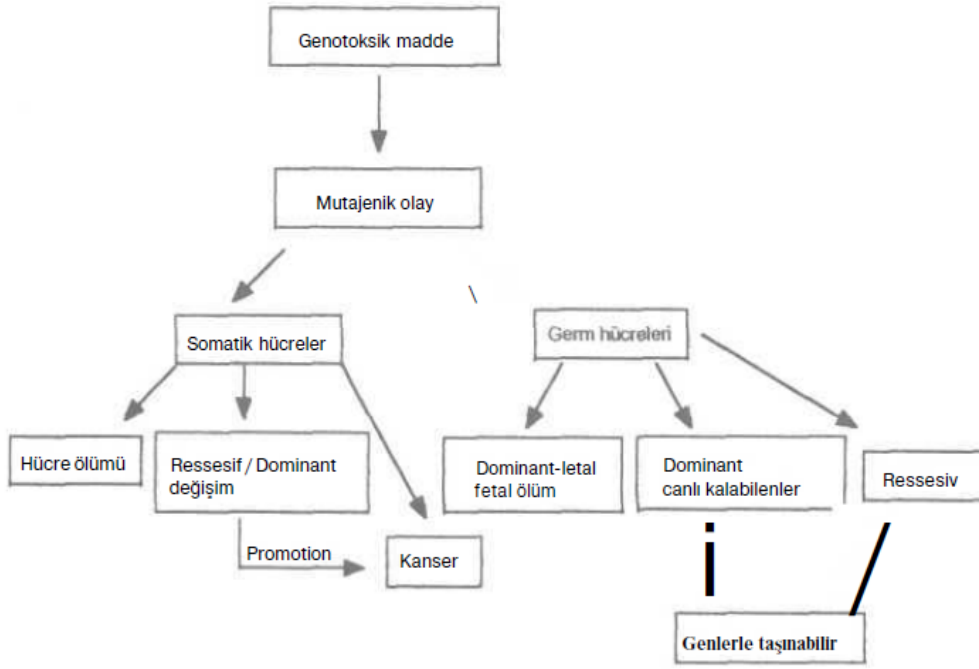
yapı taşlarından oluşur. Nükleotid, bir fosfat grubu, riboz (RNA) veya deoksiriboz (DNA) diye adlandırılan beş karbonlu şeker ve şekerlerin birinci karbonuna glikozidik bağla tutunmuş bazlardan oluşur. Karbon ve azot atomu taşıyan halkasal bazlar pürin ve primidin yapısındadır. Bunlardan urasil, timin yerine sadece RNA 'da bulunur. Nükleik asitler, polimerik yapılarını şekerler arası (üçüncü ve beşinci karbon arasında) fosfodiester bağları ile kazanırlar (13).

2.2. Genetik Toksikoloji (Kimyasal Mutajenezis)

Bir organizmanın genetik işaretlerinde, kalıtsal (herediter) bir farklılaşma oluşturan maddelere genel olarak *-genetik zehirler-* denir. Genetik zehir, gonadların gamet hücrelerini etkileyerek ya gametlerin sayıca azalmasına neden olur veya gametlerdeki genetik bilgiyi (informasyonu) değiştirir. Böylece iki aynı cinsiyete ait gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot (döllenen yumurta) ölmezse anne ve babadan farklı döller oluşur.

Kimyasal ajanların ya da radyasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere genel olarak *mutasyon* adı verilir. Mutasyona neden olan etkenlere ise mutajen denir. Kromozomal aberasyona neden olan ajanlara klastojen, anöploidiye neden olanlara ise anojen denir.

Mutasyonlar somatik doku hücrelerinde de olabilir, bu takdirde diğer (gelecek) nesillere geçmez. Bu değişim daha çok karsinogenezise zemin olması açısından önem taşır. Mutasyon her zaman zararlı olmaz. Çünkü genelde mutasyon devamlı değişen çevreye uyum sağlayan bir gelişmedir. Mutasyonların zararlı etkileri ise üreme bozuklukları, embriyojenik ve perinatal ölüm, malformasyonlar, genelde hastalıklar ve kanser şeklinde görülür.



Şekil-1 : Mutasyonların yol açtığı zararlar

2.2.1 Genotoksisite, Genotoksik Etkiler ve Değerlendirme Yöntemleri

Çevremizdeki çeşitli kimyasal maddeler, çeşitli canlılardaki hücre DNA'sının yapısını bozarak genotoksisiteye bağlı karsinojen etkilere neden olmaktadır. Genotoksik etki, etkilenen hücre tipine göre değerlendirilir. Gamet hücrelerinde oluşan genotoksik etki kalıtsal özelliktedir ve sonraki nesillere aktarılabilir. Somatik hücrelerdeki genotoksik etki ise etkilenen birey ile sınırlı kalır ve kalıtsal özellik göstermez.

Genotoksisite mekanizmasının aydınlatılması ve genotoksisite saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve genotoksisitenin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar toksikoloji'nin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. DNA'nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması, kanser oluşumunda çok önemli bir faktördür. Bilhassa somatik hücrelerdeki mutasyonların kanser oluşumuna zemin hazırlayıcı rollerinin bulunması, genotoksisitenin klinik önemini

artırmaktadır (14-25).

Genotoksisite, gen hücreleri üzerindeki etkilerine göre sitotoksik, sitostatik ve mutajenik etkenler olmak üzere sınıflandırılabilir. Sitotoksik maddeler, hücreleri anoksi, protein koagülasyonu veya membran permeabilitesinin artmasına neden olarak öldürürler. Sitostatik etki ise, daha çok kromozom yapısı ve sayısındaki değişimleri gösterir. Genlerdeki DNA üzerindeki değişimler ise "*nokta mutasyonu*" veya "*gen lokus mutasyonu*" olarak isimlendirilir. Genlerdeki nokta mutasyonuna neden olan "*mutajenik etkenler*"; virüsler, fiziksel etkenler ve kimyasal maddeler olabilir.

Genotoksisite, DNA'da yapısal değişiklikler oluşturarak, ya da DNA sarmalında kırılmalara yol açarak meydana getirilen mutasyonlardır. Genel anlamıyla genotoksisite hücre DNA'sında hasara yol açabilen her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir. Esasen DNA yapısında değişiklikler oluşturabilen ya da kırıklara neden olabilen çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların bu yolla oluşturdukları hücresel disfonksiyonları kapsar. Bu mutasyonlar sıklıkla kanser gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklara eşlik eder. Mutasyonun bir toksisite türü olarak algılanması kimyasallara veya radyasyona normalden daha fazla dozda ve çeşitlilikte yoğun bir şekilde maruz kalınması ve DNA ile etkileşme sonucu gerçekleşir. Bu yönüyle mutasyon, genotoksik etki olarak da adlandırılabilir (26,27). Genotoksik etki iki kategoride sınıflandırılabilir (26,28).

1. Mikrolezyonlar

- Baz çifti değişimi
- Çerçeve kayması

2. Makrolezyonlar

- Sayısal makrolezyonlar
- Yapısal makrolezyonlar

Mutajenlerin ve karsinojenlerin oluşturduğu DNA hasarının saptanmasında geliştirilen kısa süreli yöntemler arasında Sister Cromatid Exchange (SCE- Kardeş Kromozom Değişimi), Kromozom aberasyonu, Comet Assay, Mikronükleus testi, UMU test, SOS test, Ames testi gibi testler yer almaktadır. İnsan kromozomlarını daha yakından tanıyabilme ve birbirinden kolayca ayırabilme çabaları sürdürülürken araştırmacılar tarafından comet analiziyle, DNA hasarının bir göstergesi sayılan kuyruktaki DNA yüzdesi ölçümü tekniği, risk artışı ve hasar konusunda doğru tarama olanağına kavuşmuştur (24,25,29).

Genotoksisiteye bağlı hastalıkların veya maruziyetin değerlendirilmesinde uygun biyogösterge kullanımı, sonuçların doğru yorumlanması bakımından hayati önem arz eder. Biyogöstergeler deneysel ve epidemiyolojik araştırmalar ile saptanabilen biyomoleküler değişiklikler arasında bağ kurmada yardımcı olan biyolojik sistemde oluşan değişikliklerdir. Biyogöstergeler; maruziyet, duyarlılık ve etki biyogöstergeleri olmak üzere 3 farklı kategoriye ayrılır.

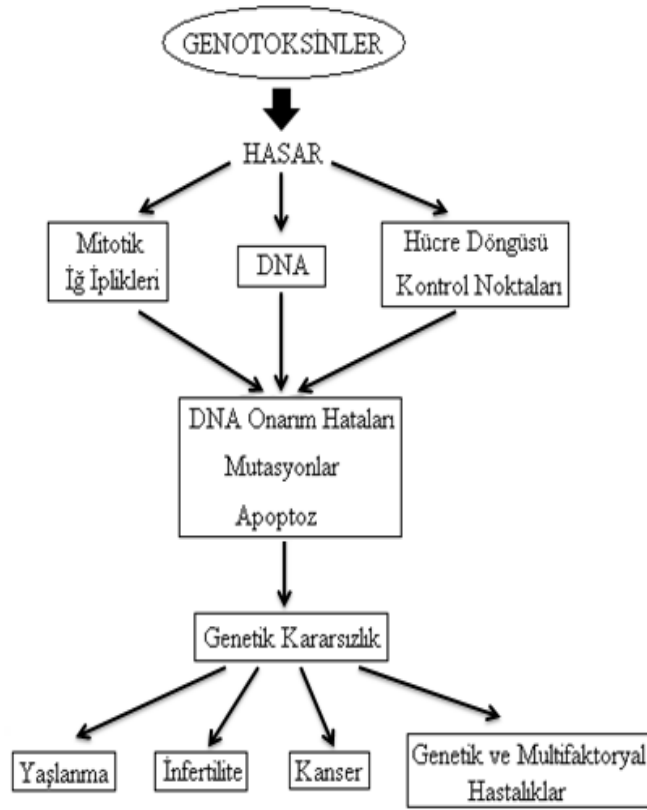
Karşılaşılan sonuca yol açtığı düşünölen (neden sonuç ilişkisi) maruziyet etkenlerinin rolünü değerlendiren, maruziyet biyogöstergesidir. Genetik yatkınlık veya diğer etkenlere bağlı maruziyetin doğrudan muhatabı riskli bireyler ile toplumun diğer kesimleri arasındaki farkı ve riskli grubun teşhisini kolaylaştırıcı olan biyogösterge, duyarlılık biyogöstergeleri olarak tanımlanabilir. Etkinin doğrudan sonuçlarını yansıtanlar ise etki biyogöstergeleridir. Klasik epidemiyolojik metotlar kullanılarak yapılan çalışmalar genellikle etkene maruziyetin uzun dönemli sonuçlarını tespit etmek ya da değerlendirmek konusunda yardımcı olurken, moleküler epidemiyolojik teknikler ise, hastalık oluşmadan çok önce risk değerlendirmesinde yardımcı bilgiler sunar. Bu temel farklılık, moleküler epidemiyolojik incelemelerin koruyucu sağlığa sunduğu hizmet bakımından üstün yanını oluşturur. Dolayısıyla moleküler epidemiyoloji günümüzde kanser oluşum ve tespit sürecini incelemede yaygın olarak yararlanılan bir uğraş alanıdır (19,24,29,30,31).

Genotoksisite kimyasal fiziksel veya biyolojik ajanın genetik materyalde hasar oluşturabilme özelliği olarakta tanımlanabilir. Bir ajanın genotoksisitesi birçok değişik hastalıkla sonuçlanabilir ancak, kanser en sık rastlanılanıdır. Birçok insan karsinojeninin genotoksik olduğu, sağlam verilere dayanmaktadır. Bundan dolayı kimyasal genotoksisite ve karsinogenesis arasındaki ilişki iyi bağdaştırılmıştır ve genotoksisitenin, kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır.

Genotoksisite ve karsinogenesis arasında çok yakın bir ilişkinin ve genotoksik testlerin karsinojenleri tespit etmede etkinliğinin olması, genotoksisite araştırmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır (32).

DNA molekülündeki kalıtsal değişme, gen mutasyonuna neden olmaktadır. Bireyin yapı, fonksiyon ve gelişmesi ile ilgili tüm genetik şifre DNA molekülü üzerinde işaretilenmiştir. Genetik kodda herhangi bir nedenle olan değişme, DNA replikasyonu

sırasında diğer moleküllere de geçecektir(32).



Şekil 2: Genotoksik maddelerin yol açtığı moleküler değişimler

DNA mutasyonlarına neden olan kimyasal maddeler dört ana grup oluştururlar:

1. Baz analogları; standart bazlara (adenin, timin, guanin, sitozin) benzerler fakat baz eşleşmesini tam yapamazlar (5bromo urasil).
2. Alkilleyici ajanlar; bazı alkil gruplarını ekler ve böylece baz eşleşmesinin doğru olarak yapılmasına engel olurlar (nitrojen mustard, etil metan sülfat).
3. İnterkalasyon ajanlar; DNA molekülüne eklemeler yaparak yapısını bozarlar (akrolin boyaları, proflavin, akridin, etidyum bromid).
4. Diğer ajanlar; DNA molekülüne doğrudan etkiyen ajanlardır (hidroksilamin). X ışınları nadiren nokta mutasyonuna yol açarken sıklıkla kromozom kırıklarına da neden olurlar. Hasarlanmış DNA molekülünde onarım yapan deaminasyon, depürinasyon gibi bir mekanizma olmasa DNA molekülü çok kısa zamanda işlevsiz hale gelir.

2.2.2 DNA Hasarı Oluşum Nedenleri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler “DNA hasarı” olarak adlandırılır. Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Ekzojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötüğü sayabiliriz. Endojen kaynaklara örnek olarak, oksidatif metabolizma, DNA’nın spontan değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V,D ve J şeklinde üç kısımdan oluşur ve bu kısımların birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir) verebiliriz.

2.2.3 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

1. Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları

2. Çevresel faktörler

- Ultraviyole Işık
- İyonize radyasyon
- Elektromanyetik dalgalar
- Kimyasal ajanlar: Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, v.b
- Sigara alkol kullanımı
- Hava kirliliği
- Kötü beslenme alışkanlığı

3. Doğal hücrel metabolizmadan kaynaklanan faktörler

- Mitokondriden enerji üretim esnasında oluşan Serbest Radikaller

- Enflamasyon

- Detoksifikasyon işlemleri

Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA hasarı ikileşme sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir.

DNA Hasarı sonunda DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. Küçük hasarlar çoğunlukla DNA onarım sistemleri tarafından onarılabilirken, orta derecedeki hasarların birikimi ise mutasyon ve kanser ile sonuçlanabilir. Yüksek düzeydeki hasarlar ise apoptozisi uyarak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

2.2.3.1 DNA Hasarı Tipleri

DNA çeşitli farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutajenler arasında, yükseltgen (oksitleyici) etmenler, alkilleyici etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (morötesi ışık ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutajenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık timin ikilileri (timin dimerleri) oluşturarak DNA'ya hasar verir (33). Buna karşın, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler farklı türden hasar oluşturabilirler. Baz değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi (34). Her bir insan hücresinde günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür (35,36). Bu yükseltgeyici hasarlardan en zararlısı çift zincirli kırılmalardır. Çünkü bunların onarımı zordur. Bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir (37).

Başlıca hasar tipleri;

1. Deaminasyon
2. Depurinasyon
3. Alkilasyon
4. T-T and T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları (DSB)
7. Oksidatif hasardır.

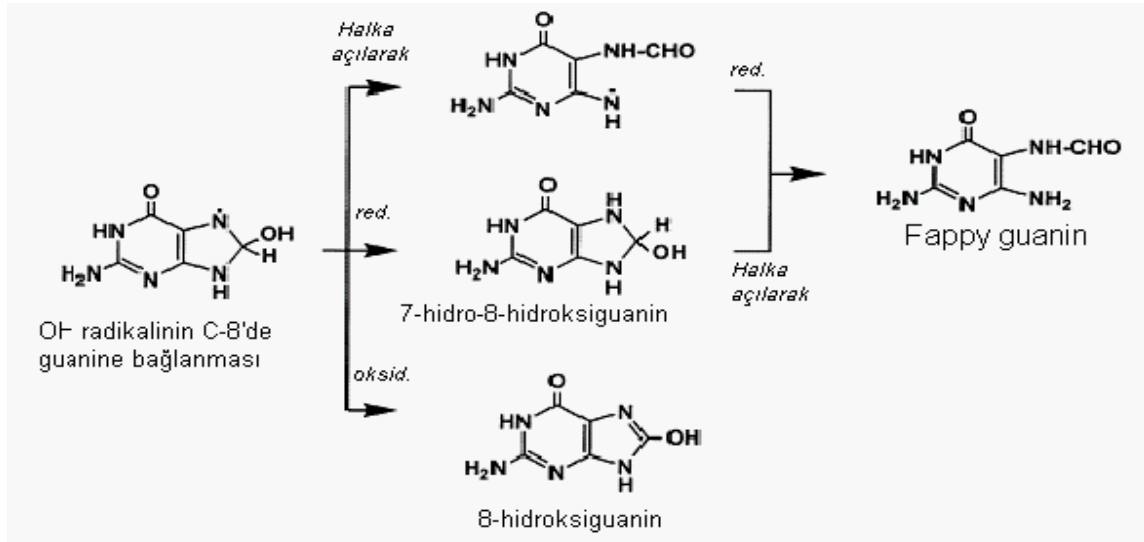
2.2.3.1.1 Oksidatif Stresin Neden Olduğu DNA Hasarı

Endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı tahmin edilmektedir. Serbest radikaller, DNA atakları, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür (38,39).

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) ile, DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir (40). DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; Oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2), peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrikasid (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS türleri farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar. Örneğin O_2 ve H_2O_2 hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH radikali DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır (41). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (38,39).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır. C4-OH- ve C5-OH- pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin

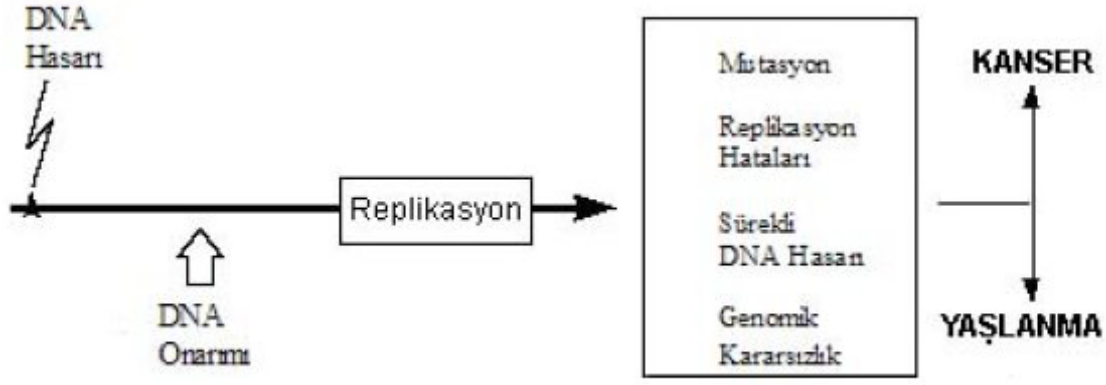
radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxopürinler) ve formamidopirimidinler oluşur (39). Şekil 3'te 8-hidroksiguanin (7,8-dihidroksi-8-oxoguanin:8-OH-Gua) ve 2,6- diamino-4- hidroksi-5-formamidopirimidin (FapyGua) oluşum mekanizmaları görülmektedir. Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin oluşumunu arttırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kullanılmaktadır. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir (40).



Şekil 3-. 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'in oluşum mekanizmaları

2.2.4 DNA Tamiri

DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (41).



Şekil 4: DNA Hasarı sonucu oluşan süreç

DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar.

2.2.4.1 DNA Tamir Mekanizmaları

2.2.4.1.1 Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)

A- Fotoreaktivasyon

B- O6-metilguanin tamiri

C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

2.2.4.1.2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

A-Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

2.2.4.1.3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

2.2.4.1.4 SOS Tamiri

2.2.4.1.5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

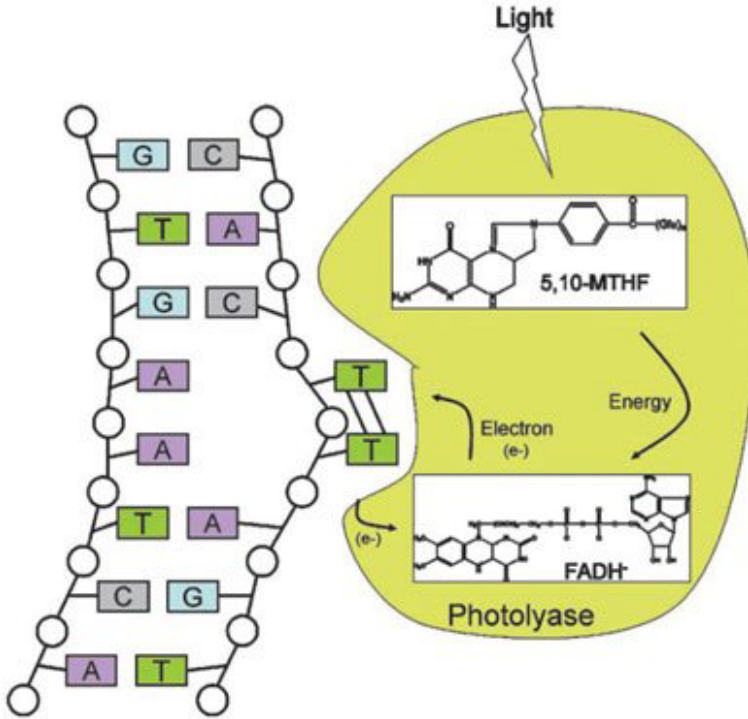
A- Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması (NHEJ)

B- Homolog Rekombinasyon (HR)

2.2.4.1 Direkt Tamir Mekanizmaları

A- Fotoreaktivasyon

UV-ışığın etkisiyle meydana gelen pirimidin (veya pürin) dimerleri, görünür ışıkla aktif hale geçirilen bir enzim (*fotolizaz*) tarafından yok edilmesi olayıdır. Fotolizaz ışık enerjisini tutar ve örneğin timin dimerlerinin bulunduğu bölgede DNA'ya bağlanıp dimerler arasındaki kovalent bağları kırmakta kullanır; zarar görmüş bazıları doğrudan eski biçimine döndürür (41,42).



Şekil 5. Fotoreaktivasyon mekanizması

B- O6-Metilguanin Tamiri

O6-Metilguanin (mG) alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O6-Metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA'daki yanlış metillenen bazların CH₃ gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal Guanin oluşumunu

sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır.

C- Basit Tek Zincir Kırıklarının Ligasyonu

X ışını ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde olan basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen tamir edilmektedir. DNA ligaz; enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5' fosfat grubu ile 3'OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturur.

2.2.4.1.2Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri

DNA'daki hasarlı bazı oligonükleotid parçaları olarak çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir. Tamir sistemi 3 temel basamak içerir:

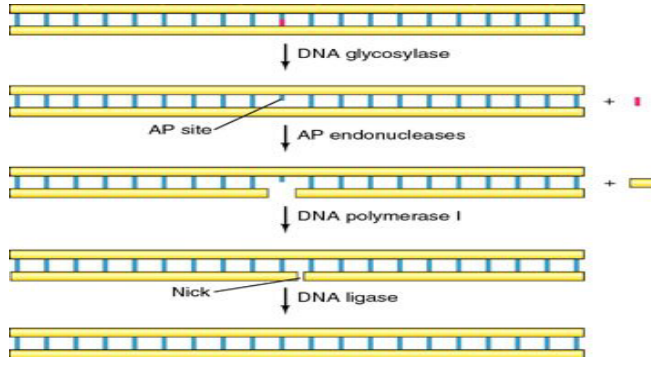
1-Hasar veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip çıkarılır.

2- DNA polimeraz oluşan boşlukları doldurur.

3- DNA ligaz son bağı kurar ve boşluk tamamen kapanır.

A- Baz Eksizyon Tamiri (BER)

DNA bazlarının spontan hidrolizi veya kimyasal ajanlar nedeni ile oluşan uygun olmayan bazların tamiri ile ilgilidir. Bu sistem DNA glikozilazlar tarafından yürütülür. Enzim şeker-baz arasındaki bağı keser ve apuridik ya da apirimidinik bölge oluşturur. AP endonükleaz denilen başka bir enzim, bazını kaybeden bölgede şeker-P arasındaki bağı keser. Deoksiribofosfodiesteraz denilen başka bir enzim bazı kaybedildiği yerin çevresini temizleyerek DNA polimeraz enziminin rahat çalışmasına olanak verir. Bu enzim de boşluğu kalıp zinciri kullanarak doldurur. Zarara uğramış DNA ipliğinin kusurlu bölgenin iki tarafında kesen bir *endonükleaz* tarafından iplikte bir kırık meydana gelir. 5'-3' *eksonükleaz*ın iplikteki kusurlu bölgeyi yok edilir. Boşluğun bir tarafında oluşan 3'-OH grubunu primer olarak, tamamlayıcı dizileri taşıyan zinciri de kalıp gibi kullanan *DNA polimeraz* tarafından yeni bir iplik sentez edilir ve *DNA ligaz*ın yeni sentez edilen parçanın 3'ucunu eski ipliğe kovalent biçimde bağlanır (41).



Şekil -6. Baz eksizyon tamiri (BER) mekanizması

B- Nükleotid Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair / NER)

Bilinen en genel ve etkili onarım mekanizmasıdır. Yeterince işlev görememesi yaşlanma, kanser oluşumu, çeşitli kalıtsal ve nörodejeneratif bozukluklar ile sonuçlanır. Nükleotid eksizyon onarım mekanizmasının bozuk olduğu genetik geçişli nadir görülen üç sendrom tanımlanmıştır:

Kseroderma pigmentosum,

Cockayne sendromu,

Trikotiyodistrofi (41).

2.2.4.1.5 Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

Çift zincir kırıkları spontan oluşur ve genellikle hücrenin reaktif oksijene yanıtı olarak ortaya çıkar ve iki ayrı mekanizma bu potansiyel ölüm lezyonlarını düzeltir. Çift zincir kırıkları düzeltilmediğinde kromozom aberasyonlarına ve kanser öncesi evreye geçişe neden olabilir.

DNA çift zincir kırıkları iki şekilde tamir edilir. Bunlar serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (non-homolog end joining) (NHEJ) ve homolog rekombinasyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşebilir.

2.2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksidatif stres artışı büyük biyomoleküllere (DNA, lipidler ve proteinler vb.) zarar verir, kanser ve kalp hastalıkları riskini artırır. Oksidatif zedelenme değişik mekanizmalar ile

tümör oluşumunda rol alır. Bu zedelenme onarılmazsa; DNA zedelenmesine, mutasyonlara, tek veya çift zincir kırıklarına, kromozom kırıkları ve kopan parçalarda farklı yerlere yapışmaya neden olabilmektedir. Serbest radikaller tarafından oluşturulmuş oksidatif stres etkisinin en aza indirilmesi ve önlenmesi için yeterli miktarda antioksidan tüketilmelidir (43).

Serbest radikaller bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler. Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğerine). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar (43,44,45).

Bilindiği gibi, oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1- 3'ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur (46).

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyon radikali($O_2^{\bullet -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (HO^{\bullet})	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil (ROO^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit (NO^{\bullet})	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon radikali (HQ^{\bullet})	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller R^{\bullet}	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksit radikali $RCOO^{\bullet}$	Hipohalöz asit (HOX)

Serbest radikallerin birçoğu reaktif oksijen türleri olup en önemlileri aşağıdadır.

1. Hidrojen peroksit
2. Süperoksit radikali
3. Hipokloröz asit
4. Singlet oksijen
5. Hidroksil radikali
6. Alkil radikali
7. Peroksil radikali
8. Organik peroksit radikali
9. Perhidroksil radikali
10. Alkoksil radikali

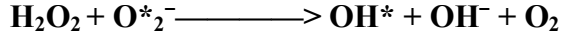
2.2.5.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır (47).

2.2.5.2. Süperoksit radikalleri ($O^*_2^-$)

Süperoksit radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının oksidasyonu ile üretilmektedir. Süperoksit oluşumu elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir (49). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O_2 ve H_2O_2 demir varlığında

etkileşerek oldukça reaktif olan HO⁻ radikalini oluşturmaktadır.



Üretilen bu OH* radikalleri oldukça reaktif olup hücrede önemli hasarlara yol açar. O₂ radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H₂O₂ ve O₂ oluştururlar.

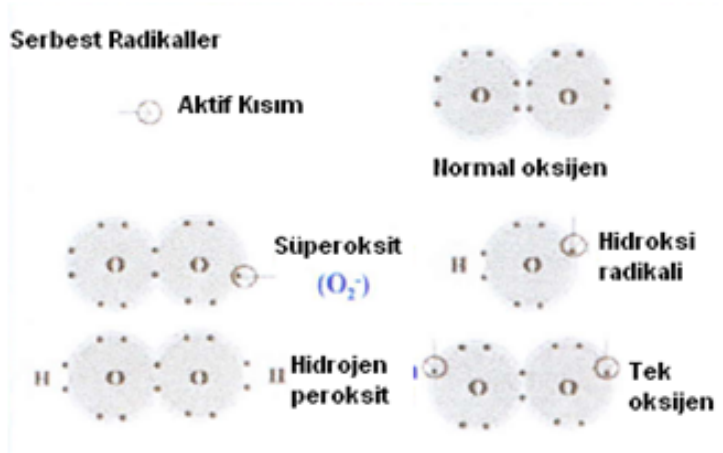
2.2.5.3. Singlet O₂

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal olarak değil ancak serbest radikal reaksiyonları başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonunda da oluşabilir (50).

2.2.5.4 Hidroksil radikali (OH*)

Hidroksil radikali, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (X-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan OH, su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler, OH'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. Hücre zarı su içermediğinden OH'ın başlıca hedefi yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (51,52,57).



Şekil 7 –Serbest radikal oluşumu

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur:

- 1- Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında bir ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması
- 2-Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi
- 3-Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi

Serbest radikaller pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Elektron transferi ile radikal oluşumu: $A + e^- \rightarrow A^-$

Homolitik füzyonla radikal oluşumu: $X:Y \rightarrow X+Y$

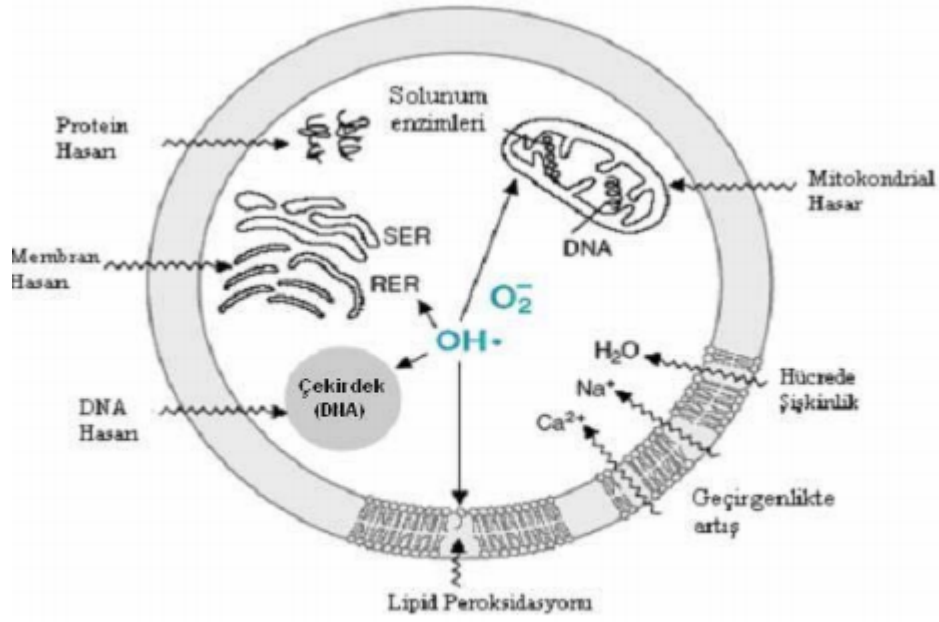
Heterolitik füzyonla radikal oluşumu: $X:Y \rightarrow X^- + Y^+$

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunmadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (53).

2.2.6. Başlıca serbest radikal oluşum kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerin etkisiyle de

oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini artırır. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiyol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluşturur (54,55).



Şekil 8 -Serbest radikallerin hücrel hedefleri (Onat ve ark.2002)

2.2.7.Serbest Radikal Oluşumunu Artıran Faktörler

A. Eksojen Faktörler

1. Diyetel faktörler: Çok doymamış yağ asitlerince beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obesite), hayvansal proteinlerce zengin beslenme, az sebze ve meyve yenmesi, yiyeceklerin uygun olmayan ortam ve koşullarda hazırlanması.

2. Çevresel faktörler: Sigara dumanı, hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, Hidrokarbonlar), radyasyon

diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler, vs.)

3. İlaçlar: Antikanser ilaçlar, glutatyon tüketen ilaçlar.

B. Endojen Faktörler

1. Fiziksel egzersiz / sedanter yaşam

2. Stres

3. Yaşlılık

4. Doku hasarı ve kronik hastalıklar (Ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi)

5. DiyetSEL antioksidan alımını etkileyen koşullar (iştahsızlık, malabsorbsiyon, kolestaz) (58).

2.2.8.Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

a) DNA 'nın tahrip olması,

b) Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,

c) Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,

d) Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,

e) Protein ve lipidlerle kovalan bağlantılar yapması,

f) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,

g) Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi

h) Proteinlerin tahrip olması ve protein ' turnover' nin artması

i) Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının

tiol/disülfid oranının değişmesi

j) Kollagen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterosklerotik değişikliklerin oluşması

k) Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir (58)

2.2.9. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA'nın kimyasal modifikasyonu ile mutagenik etkilerini göstermektedir. Özellikle OH radikali, serbest radikallerin sebep olduğu bir takım değişimlere (DNA ayrılması, DNA-protein çapraz bağlanması, pürinlerin oksidasyonu gibi) sebep olmaktadır. DNA onarım sistemi hemen DNA'yı rejenere etmezse replikasyon sırasındaki yanlış baz çifti mutasyonla sonuçlanacaktır. Bu mekanizma oksidatif strese maruz kalmış kişilerdeki artmış kanser prevalansını açıklamaktadır. Serbest radikal vasıtasıyla oluşan apoptozis bazı vakalarda serbest radikale bağlı DNA hasarının bir parçasıdır (63).

2.3. Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Risk Faktörleri

Birçok bireysel ve çevresel faktör kanser gelişim riskini artırır. Ancak karsinojenlere maruz kalan veya diğer risk faktörlerini taşıyan her insanda kanser gelişmez (58-63).

2.3.1. Genetik Faktörler

Genetik faktörlere bağlı olarak bazı ailelerde kanser gelişme riski daha yüksektir. Bu risk bazı durumlarda tek bir gendeki değişime bağlı iken, bazı durumlarda ise birkaç genin etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkar.

Kromozom aberasyonları da kanser gelişim riskini artırır. Örneğin 21. kromozomdaki aberasyona bağlı olarak gelişen Down sendromlu kişilerde akut lösemi gelişim riski 12-20 kat daha fazladır (58-63).

2.3.2. Yaş

Retinoblastoma ve nöroblastoma gibi bazı tümörler çocuklarda görülür. Ancak

kanserlerin büyük bir kısmı ileri yaşlarda ortaya çıkar (58-63).

2.3.3. Çevresel Faktörler

Sigara dumanı, hava kirliliği, çalışma ortamında maruz kalınan kimyasal maddeler radyasyon gibi birçok çevresel faktör gelişim riskini artırır (58-63).

2.3.4. Coğrafi Faktörler

Coğrafi faktörlerin kanser riskini neden artırdığı çok anlaşılamamış olmakla birlikte, insanın yaşadığı coğrafya kanser riskini arttıran bir faktördür. Örneğin japonyada yaşayan Japonlarda kolon ve göğüs kanseri gelişme riski düşük iken Amerika'ya göç etmiş japonlarda risk diğer Amerikalılar düzeyindedir (58-63).

2.3.5. Beslenme

Besinlerle alınan maddeler kanser riskini arttırabilir. Örneğin fazla yağlı beslenme kolon, göğüs ve muhtemelen prostat kanseri gelişim riskini arttırır. Aşırı alkol tüketenlerde özefageal kanser gelişme riski yüksektir. Mangalda pişirilmiş etler veya dumana maruz kalmış yiyecekler mide kanseri gelişim riskini arttırmaktadır (58-63).

2.3.6. İlaçlar Ve Medikal Tedaviler

Bazı ilaçlar ve medikal tedavi yöntemleri kanser gelişim riskini arttırabilir. Örneğin oral kontraseptifler göğüs kanseri gelişimini arttırır, ancak bu risk zamanla azalır. Menepoz döneminde verilen östrojen ve progestin hormonlarında göğüs kanseri riskini arttırır. Antikanser ilaçlarla ve radyasyonla kanser tedavisi yapılan insanlarda yıllar sonra bu tedavilere bağlı ikinci bir kanser gelişme riski vardır (58-63).

2.3.7. İnfeksiyonlar

Birçok virüsün insanlarda kanser gelişimine neden olduğu bilinmektedir ve daha

birçok virüsünde kansere neden olabileceği düşünülmektedir. İnsan papilloma virüsü (HPV) kadınlarda rahim ağzı kanserine neden olur. Hepatit B ve C virüsleri karaciğer kanserine yol açar. Mide ülserine yol açan *Helicobacter pylori* mide kanseri ve lenfoma gelişim riskini arttır. *Scbistosoma baematobium* paraziti idrar kesesi kanserine rol açabilir. *Opisborcbis sinensis* paraziti ise pankreas ve safra yolu kanserine neden olabilmektedir (58-63).

2.3.8. İnflamatuvar Hastalıklar

İnflamatuvar bozukluklar genetik değişikliklere neden olabilen önemli faktörlerdendir. Örneğin ülseratif kolit kolon kanseri gelişimine neden olabilir. Özellikle bitki üretiminde kullanılır. Hayvanlarda ise letal mutasyona yol açar (58-63).

2.3.9. Genotoksisitenin Karsinojenezisle İlişkisi

Bir maddenin genotoksik potansiyeli mutajenik kapasitesi ile yakından ilgilidir. Karsinojenezis başlangıcında DNA en son hedef olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda, karsinojenik olan birçok maddelerin genotoksik; benzeri şekilde genotoksik olan birçok maddelerin de karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişkinin olması, genotoksisite testlerinin, kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında, tarama testleri olarak kullanılması, sonucu doğurmuştur. Kimyasal maddelerin kanser oluşturmasında;

- Mutasyon ve DNA onarımı yanı sıra, ikinci bir etkenin hücrel çoğalmayı uyarması,
- T lenfositlerinin baskılanması sonucunda bu T lenfositlerinin vücutta doğal olarak gelişen kanser hücrelerini yok etme fonksiyonlarının bozulması
- Normal hücre çoğalmasına katkıda bulunan büyüme faktörlerinin ve mitozda rol oynayan diğer etkenlerin sentezini kontrol eden genlerin aktive edilmesi gibi mekanizmalar rol oynar.

2.3.9.1. Genotoksik Kimyasal Maddelerin Taranması ve İnsan Sağlığı Açısından Değerlendirilmeleri

Kimyasal maddelerin insanda neden olabileceği genotoksisitesi, kantitatif olarak değerlendirmek çok güçtür. Gerçekte herhangi bir kimyasal maddenin insanda genetik defekt

oluşturabileceği henüz gösterilememiştir. Radyasyonun (kuvvetli fiziksel mutajen) bile ancak hayvanlarda genotoksik olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan kimyasal bir maddenin veya radyasyonun genotoksik etkisi varsa bile maruz kalan kişide değil, hatta yavrusunda da görülmeyebilir. Ancak ressesif (çekinik) bir alelin, nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır.

Bugün çevremizdeki çok çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarları genotoksik veya karsinojen olabilir. Ayrıca endüstride çalışanlar birçok organik kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Bugün bu maddelerin genetik açıdan zararlarını değerlendirmek henüz mümkün değildir. İnsanlar arasında, genetik defektlerin de gün geçtikçe artması tıpta gittikçe önem kazanmaktadır. 2000'den fazla genetik hastalık bilinmektedir. Oldukça yüksek insidanslı bu genetik defekt veya hastalıklar daha çok spontan (kendiliğinden oluşan) mutasyonlara bağlanmaktadır. Ancak çevremizde devamlı maruz kalınan ve aşağı sınıf hayvanlarda mutajen olan bir dış kaynaklı kimyasal maddelerin de etkisi olabileceği çok muhtemeldir. Bu konudaki çalışmaların ilerlemesi ile insanlara yorumlanabilmesi yapılacaktır.

Somatik hücrelerde mutasyon oluşması kanser olayı ile sonuçlanır. Döllenme hücrelerindeki genotoksik değişimler ise insan neslini, ilgilendirdiği için daha ciddi sonuçlar doğurur. Döllenme hücrelerindeki letal ve dominant bir mutasyon düşüklere neden olurken, letal olmayan bir mutasyon ise daha sonraki nesillere geçerek bireylerde istenmeyen fenotipler şeklinde ortaya çıkmasına neden olabilir. İnsanların mutajenlere maruz kalması ile etkileri arasında uzun bir süre vardır. genotoksisite sonucu oluşabilen karsinogenezis için latent bir dönem vardır. Genotoksisite sonucu oluşacak diğer etkilerin ise daha sonraki nesillerde görülmesi ise daha uzun süreyi gerektirir.

Kimyasal maddelerin insan üzerindeki etkilerini değerlendirmede, çevrede doğal olarak oluşan fiziksel ve kimyasal genotoksik maddeleride tanımak gerekir. Radyasyon günlük yaşantıda karşılaştığımız önemli bir fiziksel genotoksiktir, güneş ışığı başlıca kaynaktır. Kimyasal maddelerin tam yanmaması ile oluşan benzo (a) piren gibi genotoksikler, besinlerin islenmesi veya pişirilmesi sırasında, suların klorlanması sonucu birçok kimyasal genotoksisitelerin oluştuğu gösterilmiştir. Bugün endüstride üretilen kimyasal maddelerin sayısı 60 000 'ı geçmiştir. Her yıl da 1000-2000 tanesi bu sayıya eklenmektedir. Böylece gerek günlük kullanımdaki bu kimyasal maddeler ve gerekse çevrede oluşan diğer maddelerin toksikolojik etkilerini bilmek gerekir. Bu nedenle de toksikolojik profil analizlerini yaparak, potent advers etkileri olanların üzerinde daha çok durulmalıdır. Özellikle kimyasal

genotoksiklerin tanınmasında çabuk, pahalı olmayan tarama testlerine gereksinim vardır.

Tablo 2: Bazı Önemli Genotoksik Kimyasal Karsinojenler

Organik Yapılı Maddeler		İnorganik Maddeler
PAHlar	Nitrozaminler	Arsenik
Benzantrasen türevleri	N-nitrozonomikotin	Krom
Metilkolantren	Alkil nitrozaminler	Kadmiyum
Benzo(a)piren	Nitrozopiperidin	Nikel
Krizen	Dimetilnitrozamin	Berilyum
Perilen	Azo boyaları	Kobalt
Poliklorlu bifeniller (PCB)	Dimetilaminoazobenzen	Demir
Aromatik Aminler	o-Aminoazotoluen	Kurşun
Anilin	Alkilleyici Ajanlar	Titanyum
Benzidin	Antikanser ilaçlar	Çinko
2-Naftilamin	Mustard gazı	
Toluen-2,4-diamin	Doğal Bileşikler	
o-Toluidin	Pirolizidin alkaloidleri	
2-Antramin	Aflatoksinler	
Sakarın	Serbest Radikaller	

2.4.Genotoksik Etkinin Belirlenmesinde Biyogöstergeler

Biyogösterge, ksentobiyotiklerin hücrel ya da biyokimyasal oluşumların yapılarında ya da fonksiyonlarında oluşturduğu ve biyolojik sistemde ya da örnekte ölçülebilen değişikliklerdir. Biyogöstergeler biyokimyasal ve moleküler değişimleri yansıttıklarından deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar arasındaki boşluğu dolduran bir köprü görevi görürler. Genotoksik kimyasal maddeler ile teması olan kişilerde genotoksik riskin belirlenmesinde biyogöstergeler oldukça yararlıdır (64).

İnsan verileri kullanıldığında karsinojenite için güçlü kanıtlar sağlayan epidemiyolojik çalışmalar, bazen incelenen ajan ile etki arasındaki veri eksikliklerinden kaynaklanan “yanlış negatif sonuçlar” verebilirler. Bu durumun nedenleri olarak etkinin belirlenmesinde karşılaşılan güçlükler, maruz ve kontrol grubunun uygun seçilmemesi ve etkinin ortaya çıkabilmesi için uzun süreye gereksinim olması sayılabilir. Halbuki moleküler yöntemler sayesinde hastalık ortaya çıkmadan risk değerlendirilmesinin yapılabilmesi olasıdır.

Biyogöstergeler; maruz kalmanın biyogöstergeleri, duyarlılığın biyogöstergeleri ve etkinin biyogöstergeleri olarak sınıflandırılabilir. Maruz kalmanın biyogöstergeleri bir ksantobiyotik ya da metabolitin ya da ksantobiyotik ile hedef molekül/hücre arasındaki etkileşim sonucunda oluşan ürünlerin bir organizmada ölçülmesini içerir. Genel olarak maruziyetin göstergeleri bir birey tarafından alınan dozun belirlenmesini ve bu dozun herhangi bir hastalığın oluşmasına neden olan değişikliklerle ilişkisini kavramak için kullanılır.

Duyarlılığın biyogöstergeleri, genetik özelliklerden ya da diğer yatkınlıklardan kaynaklanan ve genel popülasyona göre daha büyük risk altında olmasına neden olan bireylerin belirlenmesinde kullanılır. Bu biyogöstergeler, kimyasal maddelerin aktivasyonunda ya da detoksifikasyonunda yer alan enzimlerin aktivitelerini ya da bazı DNA hasarları için onarım kapasitesini içerebilir. Etkinin biyogöstergeleri ise bir organizmada meydana gelen ve şiddetine bağlı olarak potansiyel bir hastalığın habercisi kabul edilen ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik ve diğer değişikliklerdir. Etkinin biyogöstergeleri toksisitenin, karsinogenezin ya da hastalığın oluşmadaki erken etkileri belirleyebilmemizi sağlar (65).

Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiğinden risk grubundaki farklı DNA hasarları kontrol grubu ile karşılaştırılır. Bu amaçla uygulanabilen pek çok genotoksisite testi bilinmektedir. Bu testler, genotoksik ajanlara maruz kalmayla oluşan riskin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik biyogöstergelerdir.

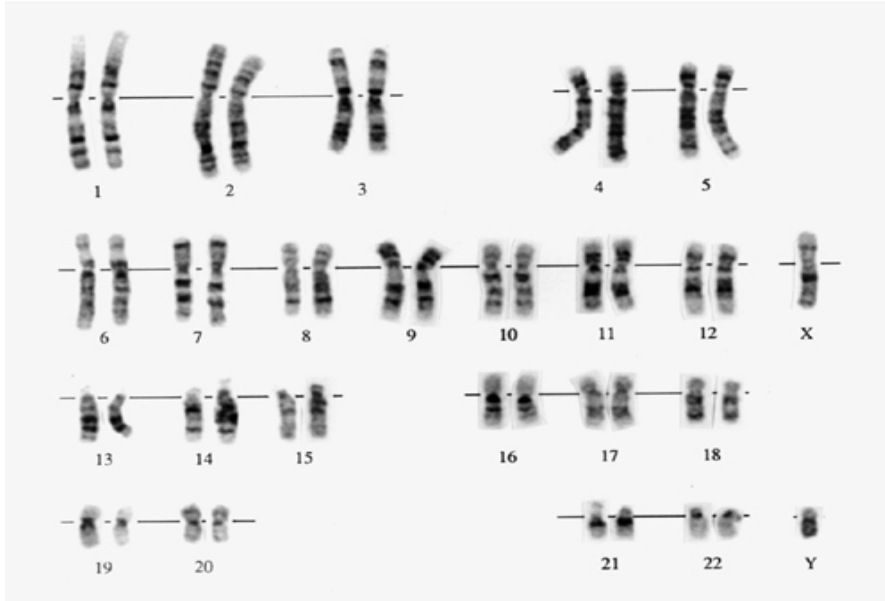
Genetik sistemler ile genotoksisite testi edilmek istenen maddelerin karsinogenik ve genotoksik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart in vitro ve in vivo genotoksisite testleri; Kromozom aberasyonları testi, Comet Assay testi, Ames testi, Kardeş Kromatit değişimi testi ve Mikronükleus testidir.

2.4.1. Kromozomal Aberasyon

Kromozomal aberasyonlar, genotoksisite çalışmalarının validasyonu için geliştirilmiş yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin sonuçlarının dikkate alınması kanser riskinin erken tanısına yardımcı olabilir. Teknik tüm genomdaki hasarın izlenmesine imkan tanınması ve maruziyetin değerlendirilmesinde büyük ölçüde uluslararası geçerli standartlara erişmiş olması bakımından önemlidir. Karl Sax tarafından 1930 yılında somatik hücrelerdeki

mutasyonun kansere neden olabileceği belirtilmiştir. Bu tespitin ardından mutojenezisin yol açtığı sorunlar ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılmıştır. Etkene maruziyetin kromozomal anomaliye yol açma riskinin saptanmasında, kimyasalların klastojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde ve biyo gösterge çalışmalarında kromozomlarda görülen değişiklikler oldukça önemlidir. Nitekim Hagmar L. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada yüksek sıklıkta kromozomal aberasyonlu kişilerde kanser gelişme riskinin daha fazla olması arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (66).

Kültüre alınmış periferik kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyon sıklığının incelenmesi ve genotoksik hasarın boyutunun tespiti, kromozomların en rahat gözlenebildiği metafaz evresinde yapılır. Bu aşamada hücrelerin tutulabilmesi için hücre kültürüne kolsemid eklenir ve kromozomlardaki makrolezyonlar ve yapısal kromozomal değişiklikler değerlendirilebilir.



Şekil 9: Normal İnsan kromozomu

En sık rastlanan kromozomal aberasyonların; kromatid açıklığı (gap) kromatid kırığı (break), asentrik ve disentrik fragment, ring kromozom, kromatid değişimi, inversiyonlar ve translokasyon şeklinde olduğu söylenebilir DNA sarmal kırılmaları veya baz değişiklikleri onarım kusurlarına bağlı olarak kromozomlarda görülen primer hasarlardır. DNA kırılmaları tek sarmalı veya birbirini tamamlayan çift sarmalı aynı anda etkileyebilir (65,66).

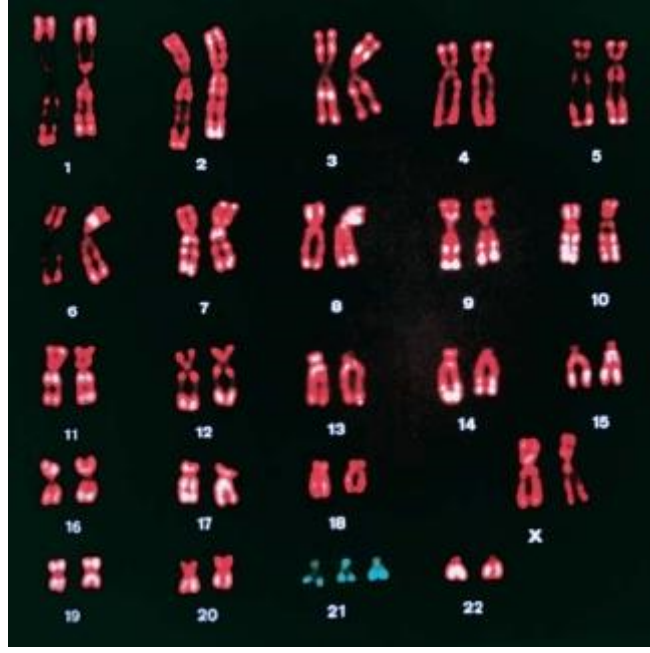
Kromozomlara katılma, eksilme veya farklı sıralama sonucu oluşan ve ışık mikroskobu ile görülen lezyonlara "klastojenezis" denir.



Şekil10 :Didentrik Kromozom

Kromozomda DNA kaybı sonucu olduğu düşünülen boşlukların (akromatid lezyonlar) boyutu değişebilir. Kromatid uçlarının kırılması ile oluşan kırılmalar yer değiştirir ve halen metafaz dönemini kapsar. *Bloom sendromu* ve *Fanconi anemisi* gibi genetik hastalıklar kromozom kırılmaları ile ilgilidir. Ancak bu kırılmaların mı hastalığa neden olduğu, yoksa hastalığın semptomu olarak mı ortaya çıkan mekanizmalar olduğu belli değildir.

İyonizasyon radyasyonu, alkilendirici etkenler gibi birçok kimyasal maddelerin kromozom kırılmalarına neden olduğu gösterilmiştir. Kromozom kırılmalarının düzensiz ve yanlış kaynaması (birleşmesi.) sonucu olan değişmelere "*kromozomal mutasyonlar*" denir. Bu değişimler, başlıca *çıkartma*, *yer değiştirme*, *ikiye katlatma* veya *ters dönme* şeklinde olabilir. Kromozomların eşitsiz bölünmeleri ve sonuçta hücredeki kromozom sayısının normale göre artması veya eksilmesi ile birçok anomaliler görülür. Birçok genetik hastalıklar kromozomların düzensiz bölünmeleri sonucudur. Örneğin *Down sendromu* (mongolizm: kromozom 21'in trisomisi ile ilgili; yani kromozom 21'in 2 yerine 3 tane olması), *Klinefelter sendromu* (XXY cinsiyet kromozomu konsititüsüyonu; 47 kromozom) ve *Turner sendromu* (XO cinsiyet kromozomu konsititüsüyonu; 45 kromozom) gibi genetik hastalıklar anormal çocukların doğumuna neden olur.



Şekil 11: Down sendrmu

Bazı kimyasal maddelerin poliploid'i (temel haploid sayılarının katlan) indükledikleri gösterilmiştir. Örneğin kolisin spesifik bir "spindle" zehirdir. Spindle protein *tubiline* bağlanarak polimerizasyonu inhibe eder. Böylece kolisin mitozis olayını metafaz safhasında durdurur, kromozom materyali ağırlıkça ikiye katlanır ve sonuçta "poliploid" hücre oluşur. *Vinca* alkaloidleri (*vincristine* ve *vinblastin*) de kolşisin gibi poliploidi indükler.

2.4.2. Comet Assay Tekniği (Single Cell Gel Electrophoresis Technique) ve Kullanım Alanları

İnsan popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel genotoksinlere maruz kalmayla sonuçlanan endüstriyel etkinliklerden dolayı giderek artan bir tehdit altındadır. Genetik hasarı etkileyen diğer faktörler ise yaşam biçimi, çeşitli ilaçlarla uygulanan tedaviler ve iklim değişiklikleridir. Genlere hasar veren ajanların etkilerini ortaya koymak için kolay test yöntemleri aranmıştır. Sitogenetik yöntemler mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Metabolizma ürünleri mutajen ve karsinojen olabileceğinden ayrıca çeşitli örneklerde biyotransformasyonları farklı olduğundan inhalasyon ajanları veya diğer potansiyel mutajenik ajanlar için kullanılacak testler insan hücrelerinin analizi şeklinde olmalıdır (67).

Biyozleme çalışmalarında giderek artan şekilde sitolojik yöntemler kullanılmaktadır. İnsan çalışmalarında sitogenetik olarak gelinen son aşamalardan biri de insan lenfositlerinin incelenmesidir (68,69).

DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin kullanıldığı testlerden en sık başvuru olan Sister Chromatid Exchange (SCE) ve Microgel Electrophoresis (MGE) olarak da adlandırılan Comet Assay yöntemidir. Bu yöntemlerle DNA sarmal kırıklarının saptanması hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (69). Genotoksik taramalarda comet yöntemi giderek daha fazla kabul görmektedir. Comet yönteminin, yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji alanında uygulamaları vardır (40,69).

DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyozlem testidir (70,71,72).

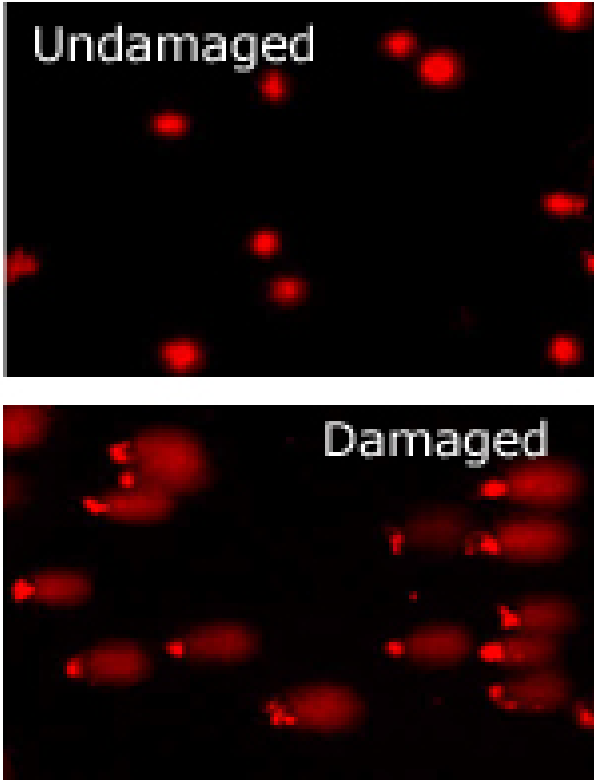
Comet yöntemi aşağıda belirtilen avantajlara sahiptir; (73,74,75)

- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Hızlı bir yöntemdir, çabuk sonuç alınır.
- Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.
- Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar.
- Maliyeti düşüktür.
- Araç-gereç gereksinimi azdır.

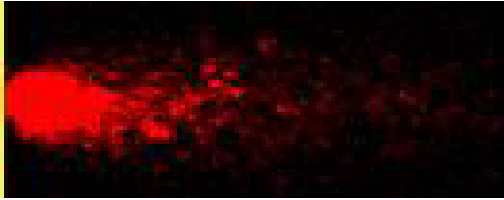
Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozaya yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır.

Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü

oluşturmaktadırlar (Şekil 12 ve Şekil 13).



Şekil 12: Comet yöntemi ile hasarlı, az hasarlı ve hasarsız hücre örnekleri



Şekil 13: Comet yöntemi ile "hasarlı" hücre örneği

Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir. Comet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında; kuyruk moment, kuyuktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır

İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki *lysing* şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmede kullanılmıştır. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokole birtakım değişiklikler yapılarak yöntem *alkali lysing* koşullarında uygulanmıştır. Singh ve

arkadaşlarının *comet* yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır (21,39,76).

Comet yönteminde hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılırlar. *Lysing* aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilirler. *Comet* tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanı sıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıması sebebiyle tercih edilmektedir (21,39,76).

2.4.2.1.Comet Yönteminde DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Comet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü (çekirdek) vardır. Bu hücrelerin görünümü nonmigration (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (stretch ya da yeni adı ile low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comethigh migration) şeklini alırlar. Son aşama ise apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu comet (kuyruk) uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (74).

Comet yönteminde lamaların değerlendirilmesi comet görüntü analiz sistemi (comet software) ile yapılabileceği gibi gözle değerlendirme gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilmektedir.

Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlı hücreler ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler; hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak üç sınıfa ayrılabilirdiği gibi, Kobayashi ve arkadaşları hücreleri daha detaylı bir şekilde değerlendirerek 5 kategoriye ayırmışlardır. Ayrıca mikroskobun okülerine yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanılabilir. Gözle değerlendirme; 5 dakikada 1 000 hücre sayılabilecek kadar hızlı olduğundan ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu konuda yapılan değerlendirmeler, gözle değerlendirmenin software kullanımı kadar etkili ve kullanılabilir

olduğunu göstermektedir (77).

Hasarın değerlendirilmesinde “Tail Moment” denilen bir başka ölçüm yönteminden de yararlanılmaktadır. “Tail Moment” kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde “Tail Moment” kuyruktaki DNA yoğunluğunu göstermektedir (74).

Comet yöntemi pek çok tipte memeli hücrelerinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun saptanmasını amaçlayan in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır.

DNA kırıklarının saptanması ilkesine dayanan bu yöntem, pek çok DNA hasarının ve onarımının saptanmasında biyoizlem çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA hasarının indüklendiği çalışmalar, comet yöntemi ile çeşitli hücre tiplerinde ve hedef organlardan alınan hücrelerde yapılabilmektedir. Comet yöntemi, duyarlılığı ve DNA hasarını tek hücre seviyesinde ölçmeye olanak sağlaması nedeniyle genotoksik etkisi merak edilen bileşiklerin toksisitelerini hızlı olarak önceden belirlemede kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu yöntem aynı zamanda DNA onarımının belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda da uygulanmaktadır. Bu amaçla Gedik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hücreler önce DNA hasarı oluşturan kimyasal maddeye maruz bırakılmış daha sonra da onarım basamağı inhibe edilerek, onarımı gerçekleşemeyen bölgelerde oluşan kırıklar aracılığı ile hücresel onarım kapasitesi hakkında bilgi edinilmiştir (75).

Comet yöntemi, bazı patolojik koşulların ya da kimyasal maddelere terapötik olarak maruz kalmanın ardından oluşan sonuçların araştırılması amacıyla pek çok klinik çalışmaya uygulanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda; kötü beslenme, parazitik enfeksiyonlar, diyabet, mesane kanseri, düşük yapma gibi etkenlerin DNA hasarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur.(76-79,80,81) Ayrıca radyoterapi ya/ya da kemoterapi alan hastalarda, anestezi ilaçlara maruz kalanlarda, siklofosfamid ve sisplatin alan meme kanseri hastalarında bu yöntem ile anlamlı olarak artmış DNA hasarı saptanmıştır. Comet yöntemi ile yapılan çalışmalar sadece somatik hücrelerle sınırlı kalmamış, infertil olan ve olmayan erkeklerin spermelerinde DNA hasarı araştırıldığında anlamlı bir artış bulunmamıştır (79).

Comet yönteminin düşük hasar seviyelerinde de duyarlı olduğu gösterildikten sonra, mesleki, yaşamsal ve çevresel maruziyetlerin biyoizlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Pestisitlere, benzene, anestezi gazlarına, radyasyona ve sitirene maruz kalan bireylerde DNA hasarının arttığı gösterilmiştir. Ek olarak sigara içenlerde ve çocuklarda da DNA hasarını

belirlemeye yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Hava kirliliğinin DNA hasarı yapıp yapmadığının araştırıldığı bir çalışmada ise lenfositlerin dışında, bukkal ve nazal epitelyum hücreleri çalışılmıştır (82).

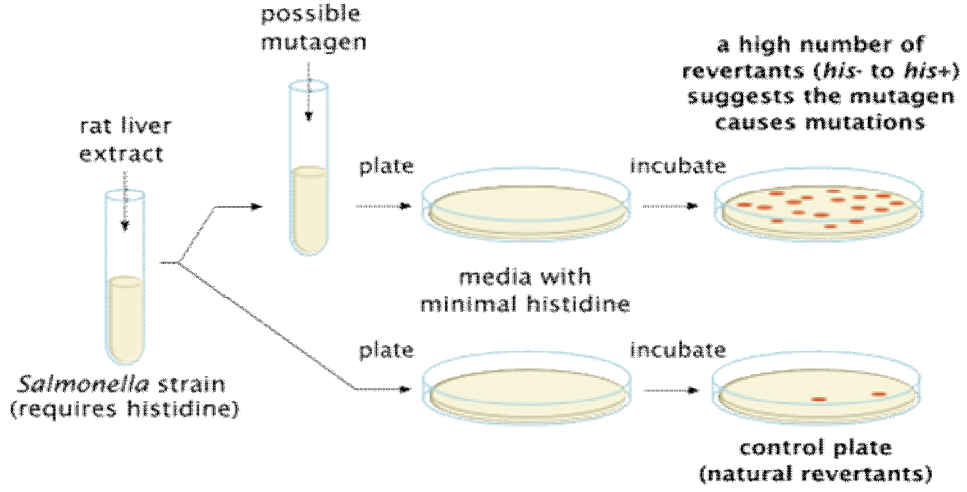
Comet yöntemi ile DNA apraz bağları da belirlenebilmektedir. Bu amaçla uygulanan yöntemin temel prensibi, DNA apraz bağ sayısının artması sonucunda, DNA migrasyonunun engellenmesidir. Collins ve arkadaşlarının geliştirdiği bir diğer yöntem ise oksidatif DNA hasarının spesifik enzimler kullanılarak belirlenmesi olmuştur (80). Comet yöntemi; dşuk hasar düzeylerini bile saptayabilen duyarlı bir yöntem olması, az miktarda hücre rneği gerektirmesi, her tür ökaryotik hücreye uygulanabilmesi, hızlı, basit ve ucuz olması, kolay uygulanabilir olduğu için geniş popülasyonlara uygulanabilmesi gibi nedenlerle yaygın olarak kullanımı giderek artmaktadır.

2.4.3. *Salmonella*/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş bakteriyel test sistemlerinden biridir.

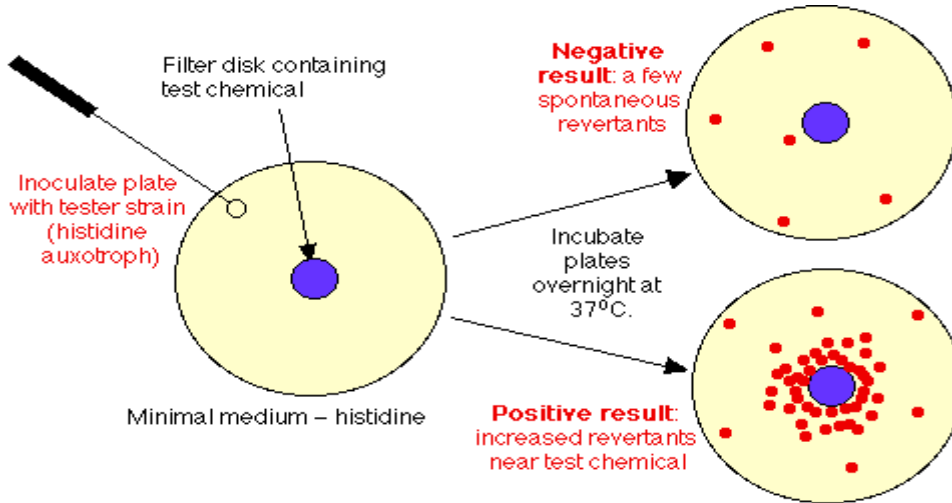
Ayrıca hızlı, ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu test, insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de sıklıkla kullanılmaktadır (82,83,84).

Ames testinde, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları kullanılmaktadır. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un yapay mutasyonla oluşturulmuş olan histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanır.



Şekil 14: Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler- 1

Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyona uğrayan koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir (Şekil 14-15).



Şekil 15- Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler- 2

Ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmaktadır (82-87).

2.4.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

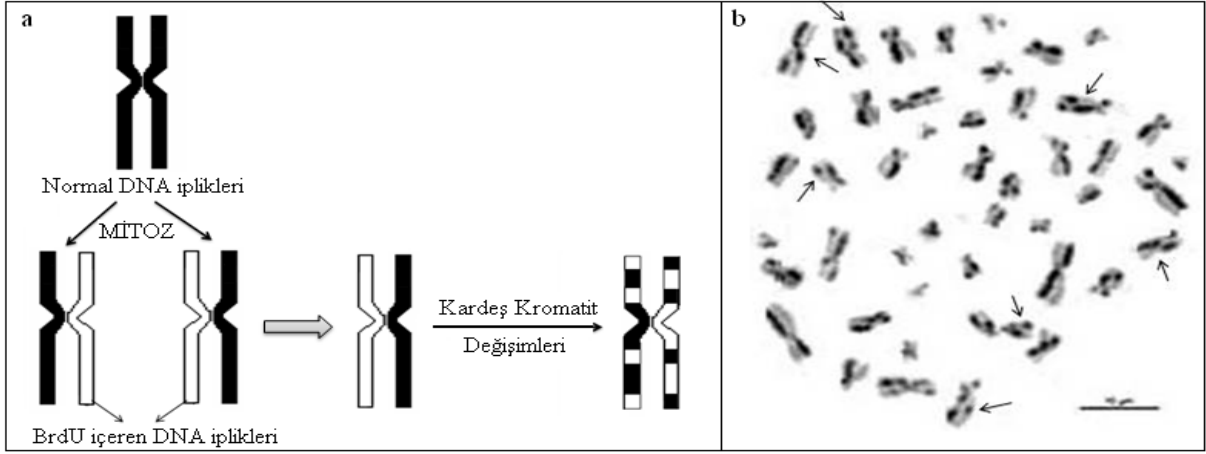
KKD, kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişimidir ve DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını göstermektedir. Ayrıca KKD'ler nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile yakından ilişkilidir (88-93). Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında önemli bir yere sahiptir.

Mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD frekansının arttığı ve artmış KKD frekansı ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişkinin olduğu saptanmıştır (94,98). KKD testi ile özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptanmaktadır.

KKD testinde, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesinin eklenmektedir ve bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlardaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi gösterilmektedir.

Kültürlerdeki hücreler çoğalırken DNA'ların replikasyonu sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri geçmektedir. Ultraviyole lambası ile ışınlanmaya maruz bırakıldığında DNA içine yerleşmiş olan BrdU daha açık renkte boyanmış bölgeler olarak görülmektedir (Şekil 16a).

Kromatitlerin farklı boyanmasına neden olan bu boyanma farkı ile DNA'da kardeş kromatitler arasında oluşan değişimler gözlenebilmektedir (Şekil 16b) (99).



Şekil 16a: Kardeş kromatid değişimleri

Şekil 16b: Kromatidler arasında oluşan değişimler

2.4.5. Mikronükleus (MN)

Günümüzde insan sağlığına, biyolojik yapı ile fiziksel ve kimyasal faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerinde çok önemli etkisi olduğu şiddetle vurgulanmaktadır. Ciddi kusurlara neden olan ve hastalıklara zemin hazırlayan dış etkenlerin başında, günlük yaşantımızda farkında olarak ya da olmayarak karşı karşıya kaldığımız doğal ya da sentetik kimyasal maddeler gelmektedir.

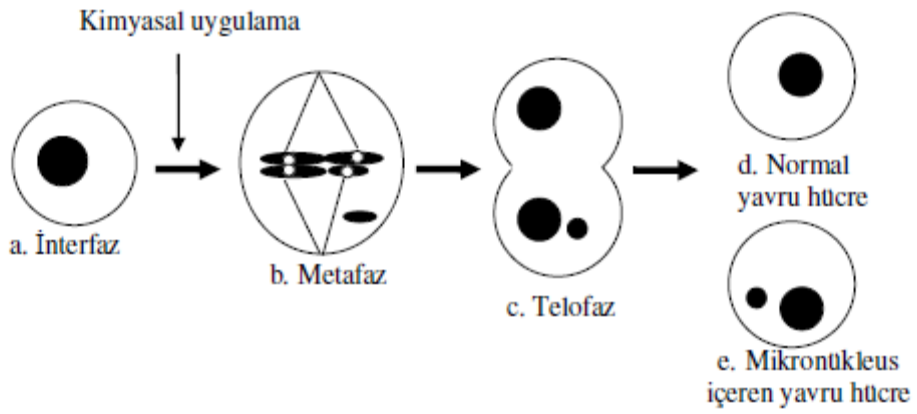
Günümüzde hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmaktadır. Dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu faktörlerin, insanlar ve diğer canlılar üzerinde genotoksik ya da mutajenik etkilerinin incelenmesinde çeşitli sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır. Sitogenetik yöntemler içerisinde günümüzde en yaygın olarak kullanılan testlerden biriside mikronükleus (MN) testidir. MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (100).

2.4.5.1 Mikronükleus (MN) Testi

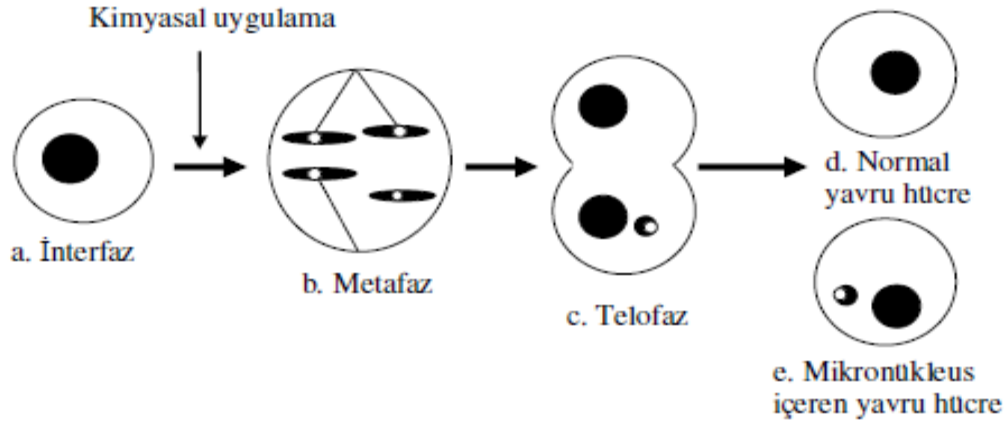
Mikronükleus, asentrik kromozom parçalarının oluşmasına neden olan yapısal

kromozom hasarlarından (Şekil 17) veya tam bir kromozom kaybına neden olan mitotik hedeflerdeki hasardan oluşan (Şekil 18), hücrenin ana çekirdeğinden ayrı, büyüklüğü ana çekirdeğin 1/3-1/16'sı arasında değişebilen oluşumlardır. Mikronükleusları oluşturan kromozom parçaları, DNA'da doğrudan çift zincir kırılmaları, tek zincirdeki kırıkların hücre replikasyonundan sonra çift zincir kırıklarına dönülmesi veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu ortaya çıkabilir.

Kromozomdaki kırıkların yanlış tamir edilmesi, bir disentrik kromozom ve bir asentrik kromozom parçasının olduğu asimetrik kromozom düzenlenmelerine neden olabilir. Genel olarak bir hücre içinde bir MN oluşmasına karşın, genotoksinin etkisine bağlı olarak bazen bu sayı iki ya da daha fazla olabilir (101,103).



Şekil-17. Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Asentrik kromatid parçasının oluşumu ile sonuçlanan interfaz evresindeki (a) yapısal kromozom hasarının uyarılması, kromozomlar mitozun metafaz evresinde (b) yoğunlaştığı zaman gözlenebilir. Kromatid parçasının etrafında çekirdek zarının yeniden oluşması ile hücrenin bölünmesinden (e) sonra ortaya çıkan yavru hücrelerde bir mikronükleus (c) gözlenir (103).



Şekil -18 Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Mitotik aygıtı hasarlı bir hücre, mikrotübüllere bağlanamamış tam bir kromozom içerebilir (b). Hücre bölündüğü zaman, bu kromozom anafaz sırasında geri kalacaktır ve yavru hücre çekirdeğine düzgün bir şekilde ayrılamayacaktır. Bu geri kalan kromozomun etrafında çekirdek zarının da oluşması ile yavru hücrelerden birinde ortaya çıkacak olan (e) mikronükleus meydana gelir (c). Sentromerler için özel boyama teknikleri, bu mikronükleustaki sentromerin varlığını tanımlamada kullanılabilir. Bu durum, asentrik bir kromatin parçasından oluşan mikronükleus (Şekil 16) ile tam bir kromozomdan (sentrik parça) oluşan mikronükleus arasındaki farkı ifade eder (103).

Mikronükleus, hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun (DNA hasarı veya mitotik hedeflerdeki hasar), hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir ve metafazda gözlenen kromozom aberasyonlarının özel tipleri, DNA hasarının G₀/G₁ (kromozom tipi aberasyonlar) veya S/G₂ (kromatid tipi aberasyonlar) fazında ortaya çıkışı hakkında bilgi verir (103).

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'lar ya klastojenlerin neden olduğu kromozom kırığı sonucu asentrik kromozom fragmentlerinden, ya da aneujenlerin neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iç ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşurlar (75,76).104,105 Mikronükleus analizi için mutajen muamelesi görmüş hücrelere sitokalasin-B uygulanarak sitoplazma bölünmesi engellenir ve bu yolla 2 yavru nükleusun birlikte bulunduğu iki nükleuslu hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronükleuslar değerlendirilir.

Sitokalazin B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikrofilamentleri oluşturacak aktin polimerizasyonuna neden olan plazma membranındaki molekül ağırlığı büyük yapılara bağlanarak sitokinezi inhibe eder. Çekirdekli hücrelerdeki mikronükleusların sayılması ile

araştırıcılar hücrenin bir kez bölünmüş olduğunu ispatlamış olurlar. Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücreler/iki çekirdekli hücrelerin oranı, mikronükleuslu hücrelerin frekansının doğru ölçülmesini sağlar. Frekans şöyle hesaplanabilir: mikronükleus içeren hücreler/toplam hücre sayısı (bölünmemiş ve MN oluşturma olasılığı olmayan hücreleri içerir) (103).

Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır (106,109).

MN'li hücrelerin frekansını etkileyebilecek faktörler:

1. MN'li hücrelerin daha fazla bölünmesi. Yavru hücrelere MN ayrılması rastgele olduğu için, bir MN bulunduran ana hücrenin bölünmesi ile sadece bir yavru hücre mikronükleusu alacaktır ve diğer yavru hücre bir MN alamayacaktır. Bu da MN'li hücrelerin frekansını düşürecektir. Aksine, çok sayıda MN içeren ana hücre varsa, her iki yavru hücre de MN alacaktır, bu da MN içeren hücrelerin frekansını artıracaktır.

2. MN yapısındaki DNA, hücre fonksiyonları için esansiyel ise, MN'li hücrelerin tekrar tekrar bölünmesi öldürücü olabilir. Hücre ölümleri de gözlenen hasarın frekansını düşürür.

3. Mikronükleusun ana çekirdekle yeniden birleşmesi, sonraki bölünmeler süresince, MN'den kromozom veya kromozom parçalarının sonraki telofaz boyunca ana çekirdek ile birleşme olasılığı vardır. Bu da popülasyondaki MN'li hücre frekansını düşürür.

4. Bir hücreden mikronükleusun çıkarılması. Bazı MN'ler, özellikle tam bir kromozom içeren daha büyük MN'ler, hücreden çıkarılabilir; bu da MN frekansını düşürür. Çoğalan DNA içeren MN, hücreden uzaklaştırılabilir. Bu faktörlerden dolayı, MN'li hücrelerin frekansı, metafazdaki aberasyonlu hücrelerin frekansından daha az bulunabilir. Bu durum, metafaz testleri ile MN testlerinin sonuçları karşılaştırılmak istendiğinde önemli bir sorun ortaya çıkarır

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve

istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (110-119).

2.4.5.2 Mikronükleus tekniğinin gelişimi

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde (120,121) ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bazı araştırmacılar (122,123) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir.

Eastmond ve Tucker (124) aynı amaçla antikinotokor antikorları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır.

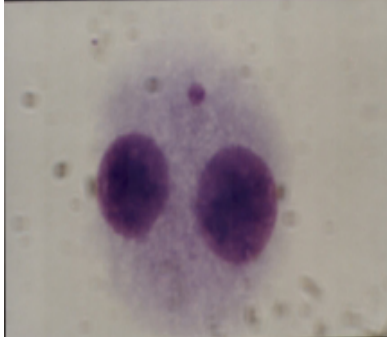
Daha sonraları Fenech ve Morley (125,126) geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır.

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (94) 123 kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın (123) kriterlerine göre:

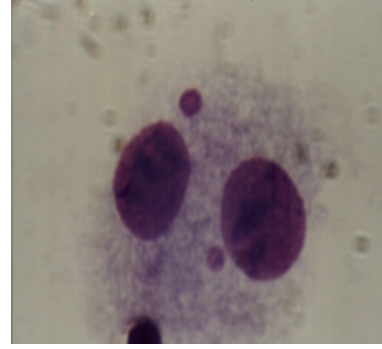
1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;

2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;

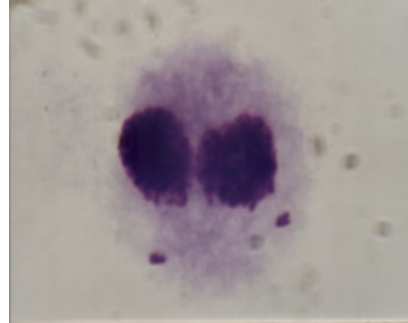
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır(Şekil 19, 20 ve 21).



Şekil 19: sitokinezi bloke edilmiş Nükleuslarda bir nukleus oluşturmaya aday



Şekil 20. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre bulunan hücre



Şekil 21:İki mikronükleus ve iki kromozom görülen hücre

2.4.5.3. Mikronükleus Elde Edilen Hücre ve Dokular

MN bölünme yeteneğine sahip olan bütün hücre ve dokularda meydana gelebilir. MN'lar genel olarak birkaç tip hücrede görülürler (124). Bunlar miyeloblastlar, miyelositler ve eritrositlerdir. Az sitoplazmalı ve büyük nükleuslu olan miyeloblast ve miyelositlerde MN'lar kolay ayırt edilemediği için, bu hücreler tercih edilmezler (125). MN analizi için en uygun hücre grubu, çekirdeğini yeni atmış genç eritrositlerdir (126). Olgun eritrositlerden biraz daha büyük olan bu hücreler, retikulosit veya polikromatik eritrosit (PCE) olarak adlandırılırlar (127). Tam olarak olgunlaşmış eritrositler ise kırmızı kan hücreleri veya

normokromatik eritrosit (NCE) olarak adlandırılmaktadır (128).

Çeşitli çalışmalarda, kemik iliği ve periferik kanın yanı sıra karaciğerde, fetüste, insan yanak mukoza hücrelerinde, keratinositlerde, spermatidlerde, solungaç ve hepatoma hücrelerinde, değişik kimyasal ajanların genotoksik etkileri MN testi ile değerlendirilmiştir. (129,130-132). Bu testin yardımı ile çok sayıdaki kimyasal, fiziksel ve biyolojik faktörlerin mutajenik aktiviteleri incelenmiştir (133,136).

2.4.5.4. MN ve Kanser İlişkisi

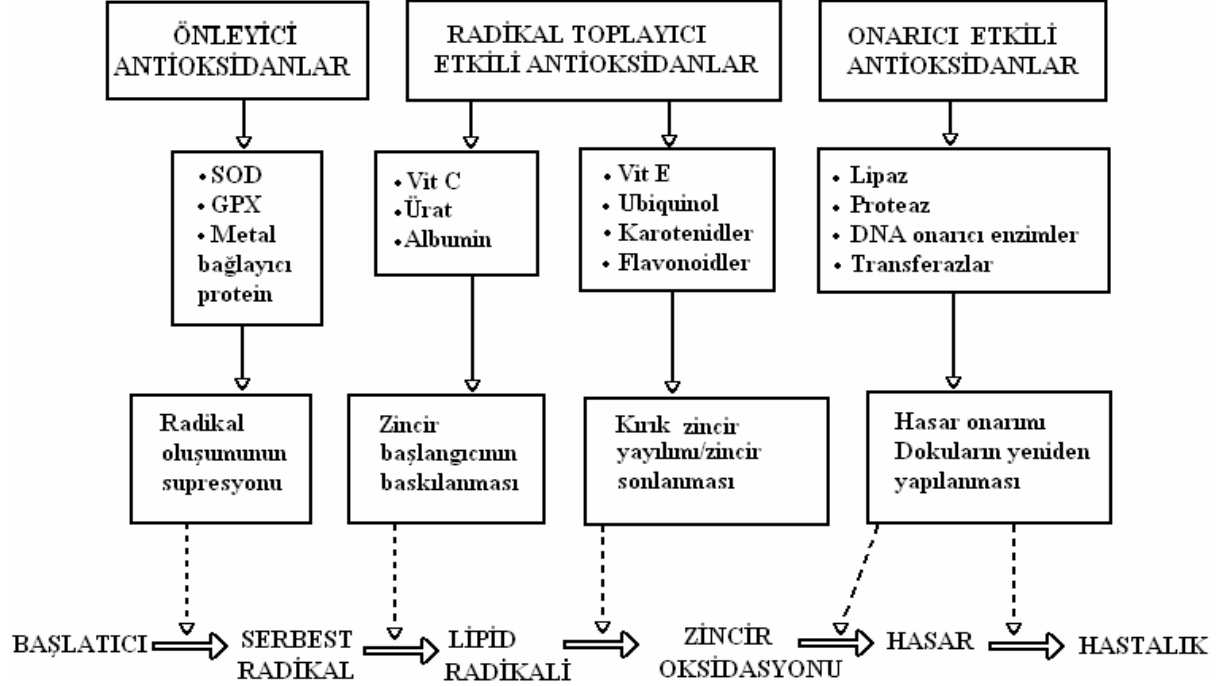
MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki direk ilişki birçok bulgu ile desteklenmektedir. Cheng vd. 1996'da, Duffaud vd. 1997'de yaptıkları çalışmalara göre; kanser hastalarında periferik lenfositlerde olduğu gibi hedef dokuda da MN frekansı artmaktadır (137). Rudd vd. 1988'te, Rosin ve German 1985'teki bildirimlerine göre; Bloom sendromu veya ataxia telangiectasia gibi hastalıklardan etkilenen bireyler, yüksek MN frekansı ve kanser riski taşımaktadırlar (138) Sorsa vd. 1992 yılında yaptıkları araştırmaya göre; bazı ajanlar insan ve hayvanlarda MN frekansını arttırabilmekte, kanserojenite ve genotoksisite arasında bir ilişki bulunmaktadır ve bu ajanlar; iyonize radyasyon, benzen, sigaradır (38).

Fenech ve Rinaldi 1995'te, Fenech vd. 1997'de, Blount vd. 1997'de, Fenech vd. 1998'de, MN'un kandaki vitamin ve folate konsantrasyonu ile çok kuvvetli ilişkisi bulunduğunu, bunların azlığı bazı kanser tiplerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular açıkça MN ve kanser arasında bağ olduğunu göstermektedir. KA ile kanser sıklığı arasında anlamlı ilişki vardır. Ancak bu ilişki KKD de bulunmamıştır. MN için henüz veriler yeterli sayıda değildir (138).

2.5. Antioksidanlar

Vücutta serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif strese korumak için antioksidan sistem devreye girer. Birinci savunma hattını, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin süpresyonu ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlar oluşturur. İkinci savunma hattını, Vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincir oksidasyonunun başlamasını inhibe etmesi ve zincirleme

reaksiyonların yayılımını önlemesi oluşturmaktadır. Üçüncü olarak hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışan onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve tranferazlar gibi) savunmada rol alırlar (139).



Şekil 22-. Antioksidan gruplar ve görevleri (139).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

2.5.1. Antioksidan Enzimlerin Sınıflandırılması

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplandırılabilirler:(140)

1. Yapılarına göre

- a.Enzim karakterli antioksidanlar
- b.Enzim karakterli olmayan, küçük moleküller

2. Kaynaklarına göre

- a.Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
- b.Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

3. Çözünürlüklerine göre

- a.Suda çözünenler
- b.Lipidlerde çözünenler

4. Yerleşimlerine göre

- a.Hücre içinde bulunanlar
- b.Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

2.5.2.Enzim Karakterli Antioksidanlar

2.5.2.1.Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.)

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, süperoksidin peroksit H_2O_2 dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (141). SOD'ın diğer bir görevi de serbest radikalleri inaktive ederek dehidratazları korumasıdır.

Dört çeşit SOD tanımlanmıştır.

1- Mangan içeren dismutaz (Mn SOD): Homotetramer yapıdadır. Mitokondrideki solunum zinciri ve oksijen radikalinin major kaynağıdır. Mn-SOD süperoksit radikalini uzaklaştıran primer antioksidan enzimdir. Fe-SOD ile homologtur. 2- Bakır ve çinko içeren dismutaz (Cu/Zn SOD): 32 kDa ağırlığında dimerik yapıdadır. Sitoplazmada bulunur.

3- Ekstraselüler dismutaz (EC-SOD): İnterstisyel alanda ve plazma, lenf ve sinovial

sıvılarda bulunan tetramerik yapıda bakır ve çinko içeren bir enzimdir.

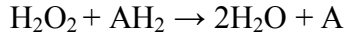
4- Nikel içeren dismutaz (Ni-SOD): Streptomyces sp ve Streptomyces coelicolor'un sitozolik fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Aminoasit kompozisyonu diğer SOD'lardan farklıdır. Siyanid ile inhibe olmaktadır (142).

2.5.2.2. Katalaz (EC, 1.11.1.6)

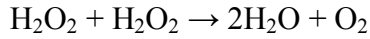
Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hemenzimdir. 240 kDa molekül ağırlığında her molekülde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (142).

Katalaz, peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, müköz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır.

Katalaz düşük hızlarda hidrojen peroksinin olduğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif tepkime ile



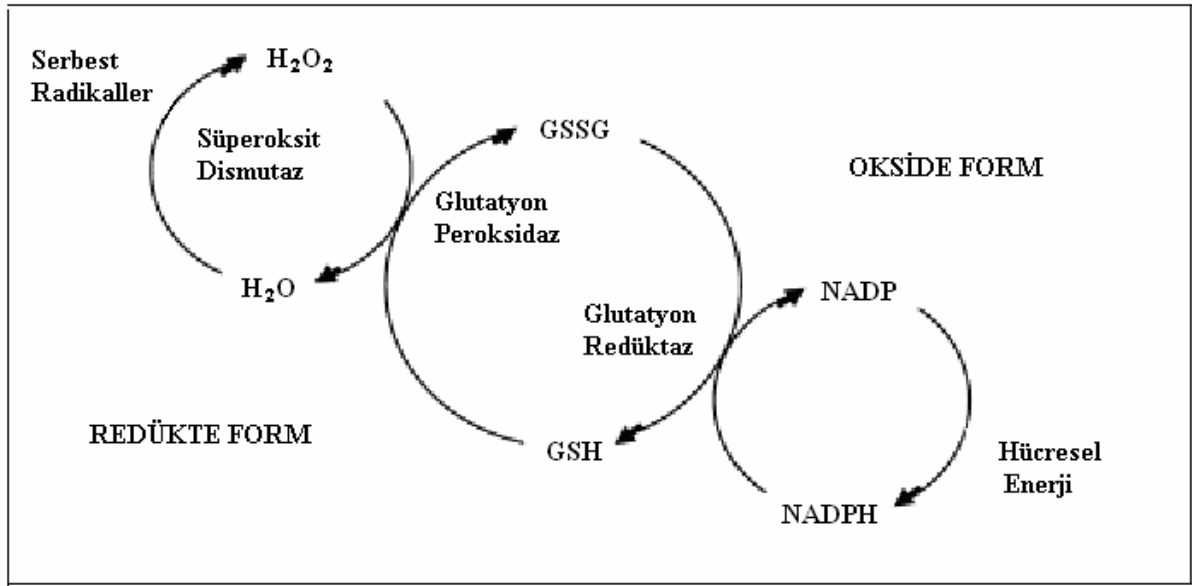
Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırmaktadır (141).



2.5.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) ve Glutasyon Redüktaz

Glutasyon peroksidaz, glutasyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimdir (142).

Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız 2 izomeri bulunmaktadır. Selenyuma bağlı izoenzimi selenosistein formunda bulunmaktadır. Bu enzim hem hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri (örneğin, kümen hidroperoksit) kullanabilir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px ise, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup, yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir (143).



Şekil 23: Glutatyon döngüsü.

H_2O_2 , suya indirgenirken glutatyon (GSH), glutatyon disülfide (GSSG) yükseltgenir. Antioksidan savunma sistemini normal işleyişi sırasında indirgenmiş GSH, hidrojen peroksiti GSH-Px ile detoksifiye eder. Ayrıca Glutatyon redüktazda, hidrojen peroksiti GSH'a dönüştürerek hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna katkıda bulunmasından dolayı önemlidir.

Glutatyon redüktaz oksitlenmiş NADPH'nin elektronunu kullanarak GSSG'yi GSH'ye çevirir. H_2O_2 'nin detoksifikasyonunun devamı için NADPH'nin sağlanması gereklidir (144).

2.5.3. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.5.3.1. Askorbik Asit

C vitamini, suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. C vitamini, antiroteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur.

C vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin antibakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan,

oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlenmiştir. C vitamini, antioksidan etkileri yanında organizmada Fenton reaksiyonunda ferridemiri ferro demire indirgeyerek, hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu etkisi sebebiyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak kabul edilmektedir; fakat bu tip etkisi sadece düşük konsantrasyonlarda görülmektedir.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve superoksit, hidroren peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir. C vitamini lipid peroksidasyonunu başlatmadan peroksit radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur (146).

2.5.3.2. β -Karoten

β -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler. Genel olarak havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur.

Karotenoidler insanda ince barsakta %5-50 oranında pasif diffüzyon ile emilir. Bu emilim oranı diyetdeki yağ miktarıyla ilişkilidir. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korur (146,147).

2.5.3.3. Vitamin E (α -Tokoferol)

α -Tokoferol yağda çözünen ve zincir kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α - tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır.

Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ

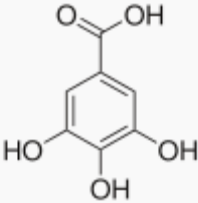
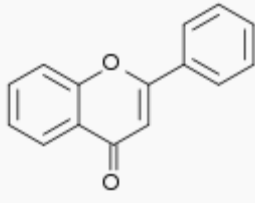
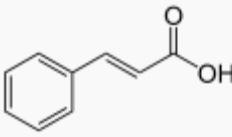
asidindeki serbest peroksit radikaline aktarırlar. Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır(148). Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (148).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipid yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (149,150).

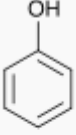
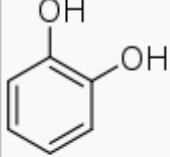
2.5.4. Polifenoller

Polifenoller her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşiklerdir. Antioksidan polifenollerin oksidatif stresi (reaktif oksijen ile meydana gelen stres) azaltmalarından dolayı kardiyovasküler hastalık ve kanser risklerini de azalttığına dair bulgular vardır.

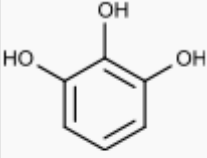
Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

Baz Ünite:			
	Gallik asit	Flavon	Sinamik asit
Sınıf/Polimer:	hidrolize taninler	flavonoid, yoğun taninler	ligninler

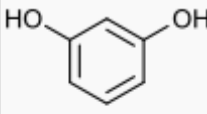
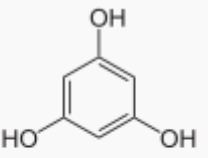

Şekil 24 . a)Polifenolik bileşikler

	
fenol	prokateşol
Ör: kumank asit türevleri, ligninler, kamferol	Ör: kateşin, kuersetin, kafeik ve ferulik asit türevi ligninler

Şekil 24 . b) Polifenolik bileşikler


pirogallol
Ör: gallokateşinler (EGCG), taninler, mirisetin, sinapil alkol türevi ligninler

Şekil 24 . c) Polifenolik bileşikler

		
resorsinol	floroglusinol	hidrokinon
Ör: resveratrol	Ör: Hemen hemen tüm flavonoidler	Ör: arbutin

Şekil 24 d) Polifenolik bileşikler

Laboratuar araştırmaları, aydaki polifenollerin kanser oluşumunu önlemeye yardımcı olabildiğini ve var olan kanserin ilerlemesini engelleyebildiğini veya kanseri azaltıp yayılmasını önleyebildiğini göstermektedir. Bu etkinin, polifenollerin, DNA'nın zarar görmesine ve normal hücrelerin kanserli hücelere dönüşmesine neden olan oksidasyonu engelleme ve kanserojik bileşimlerin etkisini artıran enzim aktivitelerini kısıtlama yetisinden kaynaklandığı sanılmaktadır. İnsanlarda bulgulara yönelik belirli bir sonuç bulunmamaktadır;

ancak gözleme dayanan kanıtlar, arada bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Aradaki bağlantı kanserde olduğu kadar güçlü olmasa da çayın kalp hastalığına karşı koruma sağladığını gösteren kanıtlar da mevcuttur. Bunun nedeni, çay polifenollerinin kan kolesterolünü ve tansiyonu düşürüp kalp krizine veya felce yol açabilecek pıhtıların oluşmasını engellemesi olabileceği düşünülmektedir.

Bitki metabolitlerinin bu sınıfında basit fenollerden tanenlere kadar değişen geniş aralıkta bilinen 8000 den fazla bileşik mevcuttur (Tablo 3).

Tablo 3: Polifenoller ve sınıfları

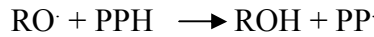
Sınıf	İskelet Yapısı	Örnek	Temel Kaynağı
Fenolik Asitler	C6-C1	Gallik asit, vanilik asit, tannik asit	Yüksek bitki ve çayırılarda
Hidroksisinamik asitler	C6-C3	Ferulik asit, p kumarik asit, kafeik asit	Yüksek bitkilerde ve bitki hücre duvarı bileşenlerinde
Kumarinler izokumarinler	C6-C3	Umbelliferone, aeskuletin, skopoletin	
Stilbenler	C6-C2-C6	Resveratrol	Özellikle siyah üzüm
Antrakınonlar	C6-C2-C6		
Flavanoidler	C6-C3-C6	Apigenin, genistein, kaempferol, miriketin, rutin, kuerketin	Deniz yosunu ve mantar hariç bütün bitkilerde
Diarilheptanlar	C6-C7-C6	Kurkumin	Kurkumin zerdaçalının sarı rengidir
Ligninler, neoligninler	(C6-C3) ₂		Keten tohumu
Ligninler	(C6-C3) _n		Bitki hücre duvarı(lifli yiyecek)

Yiyecek katkısı olarak kullanılan polifenollik bileşiklere vanilin, vanilik asit, resveratrol, ellagik asit, kurkumin, gallik asit ve katekin örnek verilebilir. p-Hidroksibenzoik, 3,4 dihidroksibenzoik, vanillik, syringic, p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, klorojenik ve rosmarinik asit gibi fenolik asitlere bitkiler aleminde sıklıkla rastlanmaktadır. Pozisyon ve hidroksilasyon derecesi antioksidatif aktiviteyi belirlemede öncelik taşımaktadır.

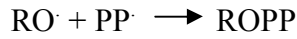
2.5.4.1.Polifenollerin Antioksidan Aktivitesi

Polifenoller antioksidan olarak insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlama konusunda polifenoller oldukça etkilidirler. Diğer deyişle polifenoller çeşitli reaktif oksijen türlerini hücrelerden uzaklaştırarak organizmayı zinde tutarlar.

Birçok antioksidan polifenol (PPH) zincir reaksiyonlarını sonlandırıcı olarak fonksiyon gösterir ve lipitlerin oksidasyonunu engeller.



Oluşan fenol radikalleri kararlıdır ve diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek farklı yönlerde sonuçlandırıcı etki gösterir.



Genellikle, oksidatif strese karşı korumada polifenollerin ve fenollerin etkisi, kritik biyomoleküller üzerinden fenol radikallerinin aktivitesi veya serbest radikaller üzerinden spesifik aktivitesine bağlıdır (151).

2.5.4.2.Flavonoidler

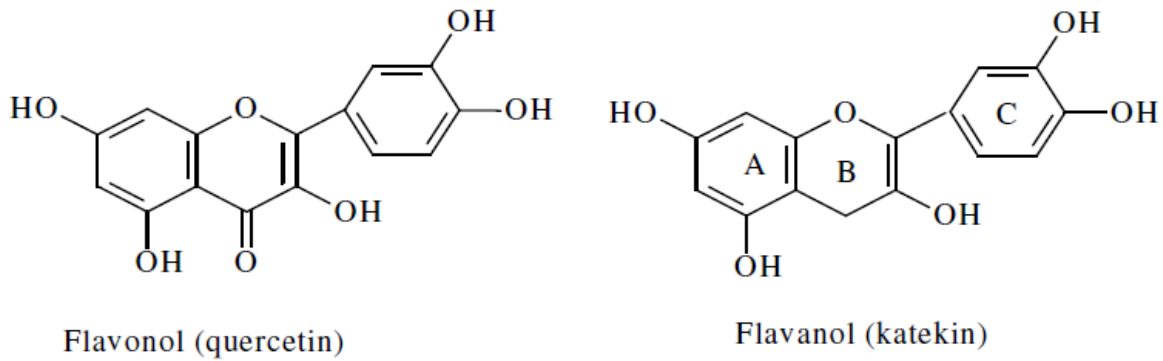
Genellikle bitkilerde bulunan ve günlük diyetle sıklıkla tüketilen difenilpropanlardır. En önemli flavanoid kaynakları sebzeler, meyveler ve içeceklerdir. Flavonoidler, C6-C3-C6 karbon iskeleti ile karakterize edilmektedir. İki aromatik halka, üç karbonlu bir alifatik zincir ile birbirine bağlanmaktadır. Flavon, flavanol, izoflavon ve çalkonları içeren flavonoidler tüm bitki dokularında bulunmaktadır.

Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek ve süperoksit anyonları, lipit peroksit radikalleri gibi

serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler (152).

Polifenollerin önemli bir kolu olan flavonoidler, süperoksit ve hidroksil radikallerini gidermede, lipid peroksit radikallerini indirgemedede ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmede etkilidir (Şekil 25). Flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan katekinler, insan besininin genel bileşeni olarak tanınmaktadır.

Katekinler antimutajenik ve antikanserojenik aktivite gibi biyolojik özelliklere sahiptirler. Bu bileşiklerin antioksidatif etkileri, kansere yol açan proseslerin oksijen radikallerini ve lipid peroksidasyonunu önlemek açısından önemlidir (153,154).



Şekil 25: Polifenol kimyasal yapısı

2.5.4.3 Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

2.5.4.4. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın Fe(II)'yi Fe(III)'e oksitler. Seruloplazmin demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

2.5.4.5. Albümin

Albümin, kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir

ve radikalin serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler (155).

2.5.4.6. Antioksidanların Sınıflandırılması, Biyoyararlılıkları ve Etki Mekanizmaları

Bu bileşikler doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılabilir. A, C ve E gibi vitaminler, fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler gibi), tokoferoller, karotenoidler ve peptitler (sistin, glutatyon) gibi bazı bileşikler doğal antioksidanları oluşturmaktadır. Ayrıca gıdalardan gelen peroksit dismutaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler ve melatonin gibi hormonlar da sindirim sisteminde serbest radikalleri indirgeyen doğal biyokimyasal antioksidan'lardır.

Çinko, selenyum, magnezyum, bakır ve mangan gibi bazı mineraller de hem vücut tarafından üretilen hem de gıdalardan gelen antioksidan enzimlerin aktivatörü ve katalizörü olarak dolaylı antioksidan etki göstermektedir. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Bütillenmiş hidroksianizol (BHA) ve propil gallat (PG) gibi yapay antioksidanlar ise endüstriyel üretimlerde gıdaların raf ömrünü uzatmak ve oksidasyonunu önlemek için kullanılan sentetik maddelerdir. Her antioksidan bileşiğin kendine has bir etki mekanizması vardır. Bu mekanizma ile vücudun antioksidan kapasitesini artırır. Bu işlem iki temel şekilde gerçekleşir.

Birincisi hidrojen peroksit gibi başlatıcı reaktif bileşiklerin ve serbest demir gibi radikal üreten reaksiyonları katalizleyen metallerin uzaklaştırılması ve oksijen konsantrasyonunun olabildiğince azaltılması gibi önleyici mekanizmaları içermektedir. İkincisi oluşan serbest radikalleri toplama, serbest radikallere proton ekleyerek aktivitelerini baskılama, radikalleşmiş olan antioksidan'ları veya biyomolekülleri yenileme ve tamir etme ve otooksidasyonu kırma gibi doğrudan mekanizmaları içermektedir. Bazı antioksidan özellikli vitaminler de serbest radikalleri indirgeyerek görev yapabilmektedir. Örnek olarak, E vitamini lipid oksidasyonu sırasında oluşan peroksil radikallerini yakalayarak etkisiz hale getirmektedir. Böylece otooksidasyon engellenmiş olmaktadır. Fakat kendileri bir radikale dönüşür. Bu radikal de C vitamini tarafından indirgenerek yeniden E vitaminine

dönüştürülmektedir. Oluşan C vitamini radikali de vücut mekanizmaları tarafından özellikle askorbat peroksidazca etkisizleştirilmektedir.

Fenolik maddeler ise antioksidan etkilerini yapılarında bulunan OH gruplarında bulunan hidrojeni radikale vererek, serbest radikal üreten lipoksigenaz enzimini inaktive etmektedir. Böylece serbest radikal üreten reaksiyonlardaki metal katalizörleri ile şelatlar oluşturarak bunu gerçekleştirmektedir. Enzimatik antioksidan sistemler, reaktif bileşikleri ve serbest radikalleri biyokimyasal olarak etkisizleştirmektedir. Örnek olarak, süperoksit radikali (O_2^*) süperoksit dismutaz enziminin reaktif bileşik olan hidrojen perokside dönüştürülmektedir. Hidrojen peroksit ise peroksit dismutaz ve katalaz enzimlerince suya dönüştürülerek etkisizleştirilmektedir.

Gıdalardan gelen antioksidan enzimler, sindirim sisteminde serbest radikalleri indirgeyerek yararlı olurken, antioksidan bileşikler sindirim sistemine faydalı olabildiği gibi diğer vücut sistemlerine faydalı olabilmesi için absorbe edilebilmesi gerekmektedir. Askorbik asidin biyoyararlılığı düşük dozlarda (<100mg) %100 olmakta iken, yüksek dozlarda (>10g) %15 oranlarına kadar düşmektedir. E vitamini etkisi gösteren tokoferollerin biyoyararlılığı, %95'e kadar çıkabilirken karotenoidlerdeki tam olarak bilinmemekle birlikte %15'in altına kadar inebilmektedir.

Flavonoidlerin absorpsiyonu alındığı forma ve doza bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Yapılan çalışmada, cevizlerde melatonin bulunduğu ve bu bileşiklerin ceviz tüketen deney hayvanlarının sindirim sistemlerinden absorbe olarak kanlarında melatonin seviyesinin ve buna bağlı olarak da antioksidan kapasitenin yükseldiği tespit edilmiştir (156).

2.6. Bitkilerin Geleneksel Halk Tıbbında Kullanımı

Bitkiler insanlar tarafından geçmişten günümüze kadar çeşitli amaçlarla kullanılmışlardır. Bunların başında yiyecek olarak kullanımları gelir. Bunun dışında, yakıt, barınak ve yapı malzemesi, giysi, dokuma ürünleri ve alet yapımında da kullanılırlar. Ayrıca tarih boyunca sosyal ve dinsel aktivitelerde de bitkiler önemli bir yer tutmuştur. Ancak şüphesiz ki bitkilerin en önemli kullanım alanı ilaç olarak tüketilmeleridir. Bitkilerin halk arasında tedavi amacıyla kullanılması insanlık tarihiyle başlar (157).

Bitkisel kökenli droglar, kimyasal dönemin açılması ve ilerlemesi ile eski değerini kaybetse de farmakolojik tedavi ajanlarının en büyük bölümlerinden olmayı devam ettirmiştir.

Sentetik ilaçların yan etkilerinin, doğal kaynaklılara göre fazla olması, insanları tekrar bitkilerle tedaviye yöneltmiştir. Bugün hastalıkların tedavisinde doğal olmayan maddelerin kullanımını büyük yer tutmaktadır. Yöresel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin araştırılması ve bunlar üzerinde daha ileri araştırmaların yapılması ilaca ulaşmada önemli olabilmektedir

2.7. Çalışmada Kullanılan Bitki;

2.7.1. Isırgan otu (*Urtica dioica L.*)

2.7.1.1. Genel Bilgi

Birçok kanser hastası medikal tedaviye ek olarak tamamlayıcı veya alternatif tedavileri de kullanmaktadır. Alternatif tedavi sekiz kategoride özetlenmiştir:

- 1-Diet,
- 2- Beslenme,
- 3-Zihin-vücut teknikleri,
- 4-Bioelektromagnetikler,
- 5-Geleneksel halk ilaçları,
- 6-Farmakolojik ve biyolojik tedaviler,
- 7- Elle iyileştirme metotları ve
- 8- Şifalı bitkiler.

Şifalı otlar bazı kültürlerde yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Şifalı ot kombinasyonları geleneksel tedavilerin can alıcı kısmını oluşturmaktadır. Değişik rahatsızlıkların tedavisinde bitkilerin kullanılabildiği ilk yazılı kaynaklardan bu yana bilinmektedir. Bu kullanım son yıllarda daha çok artış göstermiştir.

Ülkemizde ise bitkiler hem halk ilacı hem de bitkisel ilaç olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım içinde *Urtica dioica L.* (Şekil 26). Kökleri ve yaprakları genellikle kaynatıldıktan sonra kullanılmaktadır



Şekil 26 - *Urtica dioica* L

Isırgan otu *Urtica dioica* L., *Urticaceae* (nettle) ailesinden uzun ömürlü bir ottur. Yaprakları ve gövdesi yakıcı tüylerle kaplanmış, tohumlu, çoğunda sütsü öz bulunmayan, basit yapraklı ve yabancı tozlaşma gösteren, küçük çiçekli, ılıman bölgelerde yetişen yabancı bir bitkidir. Aynı bitki üzerinde yaprak koltuklarında meydana gelen çiçekler ya erkek ya da dişidir (Şekil 28).



Şekil 27: a) Erkek ısırgan otu

b) Dişi ısırgan otu

Kök ve tohumdan çoğalır, yavaş yayılır ve yıl boyunca sürekli olarak bulunur. Isırgan otu her iki yarım kürenin tropik ve subtropik bölgelerinde yetişmektedir. *Urtica*, —yakmak

anlamına gelen Latince —*urere* kelimesinden gelmektedir. *Dioica* kelimesi —iki evli" demektir. Isırgan otunun yakıcı tüylerine dokunulduğunda asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) salmasından dolayı (Fu ve ark., 2006) yakıcı etki gösterir ve adı da buradan gelmektedir (158).

Son yıllarda, *Urtica dioica* (ısırgan otu) üzerinde çok sayıda biyolojik aktivite çalışması yapılmış olması, bu bitkiden elde edilen ürünlerin de artmasını ve kullanımlarının yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bitkisel ilaçların yanı sıra, gıda desteği şeklinde çok sayıda ürün değişik kullanım alanları sağlamak üzere piyasada bulunmaktadır (159).

2.7.1.2. Isırgan Otu Bileşenleri

Isırgan otu yapraklarının yüzeyinde bulunan yakıcı tüylerde çeşitli kimyasal maddeler bulunmaktadır. Bu yakıcı özelliğin serotonin, formik asit, kolin ve histaminden kaynaklandığı bildirilmektedir. Isırgan otu yaprakları amino asitler, mineraller, lesitin, klorofil, steroller, karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler ve taninlerce zengindir. Bitki kökleri steroller, izolektin, yağ asitleri, skopoletin ve polisakkaritler gibi kimyasal maddeler bulundurmaktadır (158).

2.7.1.3. Isırgan Otunun Etkileri Ve Kullanım Alanları

Anti-inflamatuar etki: Deneysel çalışmalarda ısırgan otunun anti-enflamatuar etkisi gösterilmiştir. Ekstrakt kısmen 5-lipooksijenazın aktivitesini inhibe etmekte ve siklooksijenaz sentez reaksiyonlarında doz bağımlı inhibisyon göstermektedir (160).

Isırgan otunun hem yaprakları hemde köklerinin, TNF α , IL-1 β gibi proenflamatuar sitokinlerin aşırı stimülasyonunu önlediği gösterilmiştir. Sitokinler immun sistemin mesajcıları olarak düşünülebilir. Gerçektende hemen hemen bütün immun bozukluklarda (HIV'dan, kansere ve otoimmun hastalıklara kadar) alerjik durumlarda (astım gibi) ve obezite/insülin rezistansında metabolik düzeyde fonksiyonel düzensizliğin bir parçası olarak karakteristik olarak sitokin düzeylerinde dengesizlik vardır (161).

Anti-viral ve immun denge: Isırgan otu kökünden UDA (*Urtica dioica* agglutinin) süper lektin denen küçük molekül ağırlıklı lektin elde edilmiştir. UDA N-asetilglukozamin spesifik lektin olarak kabul edilmektedir. Bu süper lektinin HIV, soğuk algınlığı ve influenzadan sorumlu virusleri inhibe ettiğine dair kanıtlar mevcuttur (162).

Ayrıca UDA T hücre sitümulanıdır. CD4+ ve CD8+ T-hücrelerinin her birini ayırt edebildiği gibi T hücre aktivasyonu ve sitokin üretimine neden olabilme kapasitesinden dolayı diğer klasik T hücre stimulanlarından farklıdır. Isırgan otundaki süper lektin dengeyi korumak için immun sistemi stimüle etmektedir .(163) UDA süper lektinin deneysel oluşturulan sistemik lupus erimatosuslu ratlarda progresyonu önlediği gösterilmiş ve çalışmada UDA-lektinin lupus ve nefritin açık klinik belirtilerinin gelişmediği gözlenmiştir (164).

Aköz kök ekstraktından izole edilen polisakkaritler in vivo olarak hem T lenfositleri hem de kompleman sistemi sitümüle etmektedirler. T lenfositler üzerine izolektin karışımının doz bağımlı immunmodülatör aktivitesi ve ısırgan otu aglutininin direkt hücre proliferasyonunu inhibisyonu antiproliferatif aktivitenin görülmesine sebep olmaktadır (165).

Antioksidan etkileri: Isırgan otu yaprak ekstraktlarının lipid peroksidasyonu üzerine belirgin inhibitör etkileri gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada ısırgan otunun, serbest radikal oluşumunun bir belirleyicisi olan MDA'nın, yükselmiş düzeylerini azaltması bir antioksidan adayı olabileceğini göstermiştir. Yine bir çalışmada ısırgan otu ekstraktının serbest radikal oluşumu üzerine etkili azaltıcı gücü ve metal şelatör aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Linoleik asit peroksidasyonunda ısırgan otu ekstraktlarının ilaç olarak verilmesi α -tokoferolden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Isırgan otunun aköz ekstraktından çok sayıda flavanol glikozidler izole edilmiştir. (165) Flavonoidler; antioksidan, antikanser (kuersetin p53 mutant geninde downregülasyon yapar), antiinflamatuvar, antibakteriyel, immun stimulan, antialerjik, östrojenik, antifosfolipaz A₂, siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitör görevleri vardır (168).

Bazı araştırmacılar birçok bitki türündeki total fenol ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir bağlantı olduğunu açıklamışlardır. Fenoller hidroksil gruplarından dolayı temizleme yeteneğine sahiplerdir. Isırgan otu ekstraktında fenollere denk olan pirokatekol varlığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada fenolik komponentlerin antioksidan aktivitesinin olduğunu ve lipid peroksidasyonunu durdurduğunu belirtmişlerdir (167) .

Polifenollerin günlük 1gr'ın üzerinde sebze ve meyvelerden zengin diyetlerle alınmasının mutagenез ve karsinogenezi inhibe ettikleri savunulmaktadır (169). Isırgan otu yaprak ekstraktı etkili bir şekilde transkripsiyon faktör NF- κ B'yı inhibe eder. Bunu ısırgan otu ekstraktının T hücreleri, makrofajlar fibrosarkoma ve epitelyum hücreleri gibi değişik hücre tiplerindeki inhibitör etkilerinin NF- κ B yolundaki ortak hedefi engelleyerek ortaya

çıkardığı sanılmaktadır. Isırgan otu ekstraktı lipooksijenazdan kaynaklanan enflamasyon ürünlerinin oluşumunu önleyerek inhibitör IκB-α 'yı stabilize etmektedir. Ayrıca ısırgan otunun antiinflatuar etkilerinin NF-κB aktivasyonunun üzerine inhibitör etkilerinden dolayı olduğu sanılmaktadır. Ek olarak NF-κB aktivasyonunun önlenmesi antioksidan etkilerin ortaya çıkışından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (170).

Isırgan otu ekstraktının, primer antioksidanlar gibi serbest radikallere karşı serbest radikal inhibitörü ve temizleyicisi olarak görev yaparak vücudu zararlı etkilerden koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca ekstraktın belirgin indirgeme kapasitesinin olması potansiyel antioksidan aktivitesini sağlamaktadır (169).

2.8. *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

2.8.1. Hücre Kültür Tipleri

Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda, tanı veya araştırma ve üretim amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Hücre kültürünün amacı, bir grup hücreyi yaşatmak, ileri çalışmalar için çoğaltmak, gerektiğinde kullanmak için dondurarak saklamaktır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir. Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini gösterilmiştir. 1952'de insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli (continuous) serisini ortaya konmuştur ki, bu bugün iyi bilinen HeLa hücre serisi olmuştur. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin ve Evans ile arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998'de de Thomson ve Gearhart ile yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır.

Hücre kültürleri primer doku eksplantlarından, sürekli hücre serilerinden veya kök hücrelerinden türetilir. Primer hücre kültürleri tipik olarak sınırlı bir yaşam süresine sahipken (belli bir bölünme sayısından sonra çoğalma durur), sürekli hücre serileri (hücre

soyları) anormal (kanser hücreleri gibi) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileridir. Kök hücreler ise vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir.

Günümüzde kültürler çoğunlukla dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonlarından yapılmaktadır. Ancak çoğu doku hücreleri süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu değildir ve bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye gereksinim duyarlar. Hücre kültürleri için bu gereksinim plastik doku kültür kaplarının yüzeyi ile karşılanır. Kandan türemiş hücre serileri (lösemi ve lenfoma hücre serileri gibi) süspansiyon besiyerlerinde üremeye eğilimliken, akciğer ve böbrek gibi *solid* dokulardan türemiş hücre serileri tutunarak tabaka şeklinde üreme eğilimindedirler. Hücrelerin türlerine göre gereksinimleri farklılıklar göstermekle birlikte çoğu hücreler, kültür kapları kollajen ya da laminin gibi özel ekstrasellüler matriks yapılarıyla kaplanmazsa çoğalmaz ve farklılaşmazlar.

Hücre Kültürleri primer hücre kültürleri, hücre soyları ve kök hücreler olmak üzere üçe ayrılır. Klonlama çalışmaları da diğer hücre kültürü yöntemlerindedir.

A- Primer Hücre Kültürü : Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan kültüre **primer kültür** denir. Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlere de **sekonder kültür** denir. Böylece elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Örneğin, fibroblastlar kollajen salgılamaya, embryonik kas hücrelerinden türetilen hücreler kültür ortamında kas lifleri oluşturarak kendiliğinden kasılmaya, sinir hücreleri aksonlarını uzatarak diğer sinir hücreleriyle sinapslar yapmaya, epitel hücreleri de sağlam bir epitelin özelliklerini taşıyan tabakalar oluşturmaya devam ederler.

Primer hücre kültürleri “sonlu (finite) ‘dir. Yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneylerin bu dönemde yapılması gereklidir. Primer hücrelerle çalışabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz (immortalize) olabilirler, bu durumda, bir hücre soyu (cell line) elde edilmiş olur.

Örnek: Primer aortik, mikrovasküler ya da göbek kordonu endotel hücreleri, primer

hepatositler, primer düz kas hücreleri vs.

Bir dokudan mekanik ya da enzimatik yöntemlerle izole edilen primer hücreler için 4 farklı gelişme aşaması belirlenmiştir.

- a- Hücrelerin dokunun dışındaki in vitro ortama alışmaları
- b- Ekspansiyel çoğalma aşaması
- c- Hücrelerin giderek çoğalma hızının yavaşladığı durum
- d- Hücrelerin yaşlandığı, çok zor bölündüğü ve ölmeye başladıkları aşamadır.

Deneylek ekspansiyel büyüme döneminde planlanmalı, bu hücrelerin bir kısmı dondurularak, ilerideki çalışmalar için saklanmalıdır.

Primer hücre kültürlerinde tek bir hücre tipi hakkında elde edilebilecek en iyi bilgiyi edinmek için o hücrenin dokudan diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (besiyeri, *medium*) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir. Farklı hücre türleri doku süspansiyonundan değişik yöntemlerle ayrılarak (izole edilerek) tipleri belirlenebilir. Değişik hücre türlerinden oluşan bir dokudan tek bir (*uniform*) tip hücreleri ayırmak için yapılması gereken ilk işlem, tüm hücreleri bir arada tutan ekstrasellüler matriksi ayırmaktır. Bunun için doku örneği, proteini parçalayan tripsin ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler ve hücre adezyonunda rol oynayan kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) bağlayan EDTA gibi ajanlarla muamele edilir.

Farklı hücre türlerini ayırmak için değişik yöntemler uygulanabilir. Hücrelerin fiziksel özelliklerine göre, örneğin büyük olanlar küçük olanlardan, ağır olanlar hafif olanlardan santrifüj edilerek ayrılabilir. Bir başka yaklaşımın temeli, bazı hücre türlerinin cam ya da plastikten yapılmış yüzeye daha sıkı yapışması özelliğine dayanır. Bu yöntem antikolar kullanarak özellikle istenen hücre türünün yüzeye yapışması ve daha sonra da uygun işlemlerle o hücrelerin elde edilmesini sağlayabilir.

En gelişmiş hücre ayrıştırma yöntemlerinden birinde özel hücreleri işaretlemek için antikor bağlanmış bir floresan boya kullanılır. Böylece işaretlenmiş hücreler işaretlenmemiş olanlardan elektronik bir floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı kullanılarak ayrılabilir. Bu metotla çalışan cihazla saniyede binlerce hücre ayırabilir ve 1000 tane işaretlenmemiş

hücrenin içinden bir tane floresanla işaretlenmiş hücreyi ayırabilecek kadar seçicidirler.

İnfrared lazer kullanarak da mikroskop altında belli bir hücre topluluğu mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilebilir. Bu yöntem özellikle bir tümör dokusunun çeşitli yerlerinden alınan hücrelerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Hangi yöntem kullanılmış olursa olsun belli bir tipteki (*uniform*) hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre kültürü için başlangıç materyalini oluştururlar ve koşulları belirlenmiş bir kültür ortamında (besiyeri) sayıları hızla artarak bir çok analiz yapılması için kullanılabilirler. Biyokimya dilinde hücre kültüründe yapılan çalışmalar canlı hücre ortamında gerçekleştiği için *in vivo* olarak tanımlanır.

Çoğu omurgalı hücreler kültürde sınırlı sayıda bölünmeden sonra hücre ölümü (*cell senescence*) denilen bir sürece girerek bölünmeyi durdururlar. Örneğin, insan fibroblastları kültürde sadece 25-40 kez kadar bölünürler. Bu olay telomerlerin kısalmasına bağlıdır. İnsan somatik hücreleri telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kısalmakta ve hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır. Bu hücrelere telomeraz enziminin katalitik alt birimini kodlayan bir gen katılmasıyla sonsuz çoğalmaları sağlanabilir ve böylece ölümsüz (*immortalized*) hücre serisi olarak kullanılabilirler.

B- Sürekli Hücre Serileri (Hücre Soyları): Primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulan soylardır. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kültürlerden farkı,

- a-Kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri
- b-Büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri
- c-Çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin az olması
- d-Sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir.

Örnek: 3T3 fibroblastlar, L929, CHO, HL60 v.s.

Hücre soyları, başka araştırmacılardan, Türkiye de Şap enstitüsü Hücre kültür koleksiyonundan, Amerika hücre kültür koleksiyonundan veya National Institute of Health

servislerinden elde edilebilir.

2.8.2.Hücre Kültür Koşulları

Hücre kültürü çalışmalarında, kültür koşulları hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde anlamlı etkiye sahiptir. Hava-sıvı ara yüzeyinde (air-liquid interface) ya da hücre kültürü çalışma besiyerine daldırılmış (submerged) kültür koşulları altındaki hücreler, kültür vasatı bileşimi, hücre ekim yoğunluğu, ekimin yapıldığı Transwell geçirgen hücre kültürü destek kabı kaplama materyali, kültürde geçen süre, pasaj sayısı ve epitel bariyerin her iki tarafındaki hücre vasatı hacmi gibi faktörlerden etkilenmektedir (171).

2.8.3.Hücre Kültür Ortamının Genel Özellikleri

Hücre kültürü besiyeri çalışma ortamında inorganik tuzların birçok görevi vardır, sodyum, kalsiyum ve potasyum iyonları ile hücrenin osmotik basıncını sağlarlar. Çoğu hücreler 7,2 -7,4 pH aralığında gelişebilirler.

Fibroblastlar daha yüksek pH ya, sürekli dönüşen hücreler ise, daha asidik ortama ihtiyaç duyarlar. Yeni kültür oluşturulması sırasında pH çok önemlidir ve iki ayrı sistem ile dengelenir. Bunlar; doğal tampon sistemi CO₂ gazı CO₃/HCO₃ ile dengelenir, yine HEPES adı verilen özel bir kimyasal tampon kullanılarak dengelenebilir. Doğal bikarbonat (HCO₃)⁻ CO₂ tampon sistemleri; CO₂ inkübatörde % 5-10' luk CO₂ atmosfer ile birlikte kullanılır.

Bikarbonat- CO₂ maliyetsizdir ve hücreler için toksik değildir. HEPES ise, çok yüksek tampon kapasitesine sahip olmasına rağmen; 7,2 – 7,4 pH değerindedir ve yüksek konsantrasyonları toksik etki yapabilir. Bu tampon sisteminde, ayrıca gaz atmosfere gerek yoktur.

2.8.4. Dondurularak saklama

Hücreler sıvı azot içinde -196 °C'de, bu düşük sıcaklığa dayanacak özel plastik tüpler ya da cam vialler içinde saklanır. Hücreler, büyüme çözeltileri % 10–20 serum ve % 5-10 gliserol ya da DMSO içeren bir çözelti içine alınarak dondurulurlar. Bu sırada konsantrasyonları, 1:10 sulandırılarak çözüldüklerinde normal ekilme konsantrasyonunun “örneğin 105 hücre/ml” 5 katı olacak biçimde ayarlanmalıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu araştırma; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Laminar Flow Güvenlik Kabini (Heraeus)
2. CO₂ inkübatörü (%5 CO₂, %95 nem ve 37°C) (LaboTect)
3. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
4. Spektrofotometre (Shimadzu RF-1501 MODEL, Japon)
5. Floresan invert mikroskop (Olympus)
6. Işık mikroskobu (Olympus CK X41)
7. Dijital Fotoğraf Makinesi (Olympus C 5050 Z)
8. ±4°C Buzdolabı (Profilo)
9. -20°C derin dondurucu (New Brunswick Scientifi, C54285 model)
10. -80°C derin dondurucu (Revco)
11. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
12. Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
13. Pipet pompası (Boeco)
14. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson)
15. Hassas Terazî (Sartorius marka 0,0001 g'a duyarlı)
16. Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF)
17. Distile Su Cihazı (Nüve)
18. Elektroforez (Biolab Midi Cell)
19. Hot plate (Thermolyne)
20. Vortex (Nüve)
21. Manyetik karıştırıcı
22. Su banyosu (Nüve, BM 402 model, Türkiye)
23. pH metre (Hanna, pH 211 model Japon))
24. Thoma lamı (IsoLab)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65 °C) agaroz jel (Sigma)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37 °C) agaroz jel (Sigma)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
4. Sodyum klorür (Merck)
5. Potasyum Klorür (KCl) (Merck)
6. Tris base (Sigma)
7. Triton X-100 (Sigma)
8. Sodyum hidroksid (Merck)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
11. Etidyum bromit (Sigma)
12. Hidrojen peroksit (Merck)
13. Tris HCl (Sigma)
14. Histopaque-1077 (Sigma)
15. Giemza boyası (Merck)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Carlo Erba)
17. DMEM (Sigma),
18. Gallik Asit (Sigma)
19. Quarsetin (Sigma)
20. Aluminyum Nitrat
21. Folin Dennis Reaktif (Sigma)
22. Sodyum Karbonat
23. Etil Alkol (%96'lık)
24. İmmersiyon Yağı (Merck)
25. Lam (Isolab)
26. Plastik Pastör Pipet (Isolab)
27. Pipet ucu (Beyaz, 0.1-10 µL)
28. Pipet ucu (Sarı, 1-200 µL)
29. Pipet ucu (Mavi, 100-1000 µL)
30. Kurutma Kağıdı
31. Cam Malzemeler (Mezür, Beher, Erlen, Şale)

32. Eppendorf Tüpü

3.2.Bitkilerin Toplanması

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri Bursa - Uludağ Soğukpınar Köyü mevkisinden Nisan-Mayıs 2012 döneminde toplandı. Toplanan *Urtica Dioica L.* Bitkisi en kısa sürede yaprak ve gövde kısımları ayrıldı serin ve gölge bir ortamda 1 haftada kurutuldu. Kurutulan örnekler çalışmalarda kullanılmak üzere kilitli poşetlerde muhafaza edildi.

3.2.1.Örnek Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

Kurutulan bitki örnekleri bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilerek ekstraksiyon işlemine hazır hale getirildi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol, etanol,etil asetat ve su kullanıldı.

3.2.1.1.Metanol eksrakıtı

Öğütülerek toz haline getirilmiş ısırgan otu yaprak ve tohum örneklerinden 20 gr tartılarak 200 ml (1/10 w/v) metanol çözücüsünde manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı. 24 saat sürenin sonunda süzme işlemine geçildi, buncher hunisi yardımıyla 0,2 mm Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek katı faz ve sıvı faz birbirinden ayrılması gerçekleştirildi, seramik goach krozesi yardımıyla ince filtre seramikten geçirilerek evaporatöre hazır hale getirildi. Evaporatöre hazır hale gelen süzüntü 40 °C sıcaklıkta ve basınç altında çözücüsünden uzaklaştırılarak kuru ekstrakt elde edildi. Kuru ekstrakt ışık görmeyecek şekilde +4 °C de kullanılmak üzere bekletildi.

Yapılan işlem basamakları etanol ve etil asetat çözücüleri için de aynı şekilde gerçekleştirilerek kuru ekstraktları +4 °C de kullanılmak üzere bekletildi.

3.2.1.2.Su ekstraktı

Su ekstraksiyonu için 20 gr toz haline getirilmiş bitki öncesinde kaynatılmış ve 60 °C ısıya getirilmiş 200 ml distile suda 2 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. 0.2 mm filtre kâğıdından geçirilerek katı faz ve sıvı faz birbirinden ayrıldı. Sonrasında Whatman paper No. 1 filtre kâğıdından geçirilen sıvı ekstraktı rotary evaporatora yerleştirerek sıcaklık 60 °C alınan süzüntünün hacmi 1/6'ya inene kadar içindeki su uçuruldu ve kalan volume

çalışmalara hazır hale getirildi (172).

3.3. Heparinize Kan Örneği

Deney boyunca kullanılan heparinize kan örnekleri, gönüllü bir kişiden çalışmaların yapıldığı günlerde onam formu imzalatılarak alındı.

3.4. Hazırlanan Besiyeri

3.4.1.DMEM Besiyeri

13,4 gr/L DMEM, 0,37 gr/L sodyum bikarbonat (NaHCO_3) deiyonize su içinde çözüldü. 0,1 N sodyum hidroksit (NaOH) ve 0,1 N HCl ile pH: 7,2 olacak şekilde hazırlandı. 0,22 μm 'lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı.

3.5. Hazırlanan Tampon

3.5.1.PBS (Fosfat) Tamponu:

800 ml distile su içerisinde 10mM (1.44 gr) Na_2HPO_4 ve 1,76mM (0.24 gr) KH_2PO_4 çözdürülerek üzerine 8 gr NaCl ile 0,2 gr KCl ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlanarak 0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH pH'sı 7,4'e ayarlandı.

3.6. Metot

3.6.1 Toplam Fenolik Madde Analizi

Kurutulmuş ısırgan otunun tohum ve yaprak ekstraksiyonunun total fenolik bileşik miktarı Singleton and Rossi (1965) (177) tarafından önerilen Folin-Ciocalteu (FC) yöntemine göre tayin edilmiştir. Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin ayıracını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin ayıracı ile muamele edildikten sonra oluşan mavi renk, spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda okunmuştur. Standard olarak gallik asit kullanılmıştır. Örnekte ölçülecek absorbans değerinin gallik asit cinsinden eşdeğeri olan fenolik bileşik miktarı, gallik asit ile hazırlanmış olan standart kurvenin denkleminde hesaplanmıştır. Örnekteki toplam fenolik bileşik miktarı "mg gallik asit/Kuru madde" cinsinden ifade edilmiştir. Bu analiz için kullanılan çözeltiler;

- Folin- Dennis (FD) Reaktifi:

- % 25 lik Na_2CO_3

Distile suda hazırlanmış gallik asit standart çözeltileri (200 $\mu\text{g/L}$ 100 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 25 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$)

Metot;

Kuru bitki ekstraktından stok solüsyon 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı

- Hazırlanan bitki stok solusyonundan 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ değişik konsantrasyonlarda numuneler hazırlandı.
- Hazırlanan numunelerden veya standart çözeltilerden 100 μl alındı ve üzerine 200 μl FD Reaktif eklendi.
- FD reaktif eklendikten sonra 10 dk karanlıkta bekletildi.
- Bu sürenin sonunda üzerine 100 μl %25 lik Na_2CO_3 çözeltisi eklendi.
- Bu şekilde fenolik hidroksil gruplarının hidrojenlerini suya vermeleri sağlandı.
- Bu karışım saf su ile 1,1 ml ye tamamlandı.
- Karışım 2 saat boyunca oda ısısında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
- Örnek ve standartların 725 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.
- Kör çözelti olarak 100 μl Na_2CO_3 çözeltisi ve 1ml distile su ilave edilerek hazırlandı.

3.6.2. Toplam Flavonoid Madde Analizi

Isırgan otu örneklerinden elde edilen ekstraktlarda toplam flavonoid madde miktarı analizi Alüminyum kompleksi metodu Park et al. 1995 (173) ile quersetin cinsinden hesaplanmıştır.

Bu analiz için kullanılan çözeltiler

- %10 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$
- 1M CH_3COOK
- Etanol içerisinde çözünerek hazırlanmış quersetin standart çözeltileri (25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$)

Metot ;

- Kuru bitki ekstraktından stok solüsyon 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı
- Hazırlanan bitki stok solusyonundan 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ değişik konsantrasyonlarda numuneler hazırlandı

- Hazırlanan numunelerden veya standart çözeltilerden 100 µl alındı
- Alınan numune veya standart çözeltiler üzerine 20 µl %10 Al(NO₃)₃ ve 20 µl 1M CH₃COOK ilave edildi.
- Bu karışımın son hacmi 1 ml olacak şekilde 860 µl %100 etanol ilave edilerek 40 dk karanlık ortamda inkubasyona bırakıldı.
- Bu sürenin sonunda numune ve standartların 415 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.

3.7. Mononükleer Lökositlerin Separasyonu ve İnkübasyonu:

3.7.1. Mononükleer Lökositlerin Separasyonu:

Sağlıklı, gönüllü ve sigara içmeyen 26 yaşında erkek bir kişiden çalışmaların yapılacağı gün 20 ml heparinli kan örneği alındı. Boş steril 4 tüp içine 5' er ml Histopaque-1077 solüsyonu eklendi. Bunun üzerine 5' er ml taze heparinize kan yavaşça konuldu. Tüpler 25°C ve 2100 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana geldi. En alt tabakada lökositler eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü Histopaque solüsyonu ve en üst tabakada ise plazma yer aldı. Santrifügasyon sonrası orta tabakada biriken lenfositler 1 ml'lik pipet yardımıyla boş bir tüpe alındı. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lökosit içeren histopaque üzerine 5 ml, 1 M tuzlu fosfat tamponu (PBS) (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 25°C, 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atıldı ve lökosit pelleti elde edildi.

3.7.2. Mononükleer Lökositlerin Sayımı ve Tripan Blue ile Canlılık Testi:

Elde edilen lökosit süspansiyonundan hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı üzerine uygun lamel konulduktan sonra bir damla belirli lökosit hücre süspansiyonu lamın yan kenarlarından Thoma lamı üzerine yaydırılarak hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına yayılması sağlandı. Lam üzerinde 25 mm²'ye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formülden toplam lökosit hücre sayısı belirlendi.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{10^4 \times \text{ml} \times \text{lamdaki hücre sayısı} \times \text{dilüsyon katsayısı}}{10^4}$$

(Sabit katsayı) (Hacim)

Heparinize kandan separe edilen PBS içersinde hazırlanmış lökosit süspansiyonu ile tripan blue boyası (% 0,4) 1:1 oranında karıştırıldı. 5 dk inkübasyon süresinden sonra 1 damla boyanmış lökosit hücrelerinin lam üzerine yaydırılmasıyla hücre süspansiyonunun lam ve lamel arasına iyice yayılması sağlandı. Işık mikroskobu altında boyanmış ve boyanmamış hücreler sayıldı.

3.7.3. Mononükleer Lökosit Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnkübasyonu:

Elde edilen lökosit pelleti hücre kültür flaskına aktarılarak üzerine 10 ml DMEM ve %10 fetal calf serum (FCS) ve 5 µg/mL gentamisin) hücre kültür süspansiyonu eklendi. Daha sonra hazırlanan hücre kültür flaskları 37 °C'de %5 CO₂ ortamında 1,2 ve 3 saat inkübasyona bırakıldı.

3.8. Alkali Tek Hücre Elektroforez (Comet Assay) Yöntemi ile DNA Hasarının Ölçülmesi:

3.8.1.Yöntemin Prensibi:

Mononükleer lökosit DNA hasarı Singh ve ark. (174) tarafından geliştirilen Alkali Tek Hücre Elektroforez (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklıklara göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler agaroz jele yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmayacak şekilde yürürler. Oysa DNA zincirinde herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Elektroforezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

3.8.1.1.Yönteminin Uygulanışı:

3.8.1.1.1.Slaytların Hazırlanması;

% 1,0'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanıp eritildikten sonra 80 µl alınarak kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı. Lamaların üzeri lamel ile kapatılarak

buzdolabında ($2-4^{\circ}\text{C}$) 5 dakika bekletildikten sonra lameller kaldırıldı. Hazırlanan lamalar nemli kutularda bekletildi. PBS tamponu ile mm^3 te 10^4 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden $10\ \mu\text{l}$ alınarak $80\ \mu\text{l}$ %0,6'lık low melting point (LMP) agaroz jel (37°C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi ve ardından lameller kaldırılarak slaytların hazırlanma işlemi tamamlandı.

3.8.1.1.2.Lizis aşaması;

Hazırlanan slaytlar 50 dakika yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

Hücre zarlarının parçalanması için önce 2,5 M Sodyum klorür, 100 mM EDTA ve 10 mM trizma base distile suda çözülerek stok lizing solüsyonu hazırlandı ($\text{pH}=10$).Çalışmadan hemen önce stok lizing solüsyonuna %1 oranında Triton X-100 ve %10 oranında DMSO eklendikten sonra slaytlar 50 dakika bu taze soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

3.8.1.1.3.Elektroforez tamponu

Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Alkali elektroforez tamponu 1mM Na_2EDTA ve 300 mM NaOH 'tan oluşmaktadır ($\text{pH} < 13$).

3.8.1.1.4.Elektroforezde yürütme

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, elektrik akımında ve $5-25^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika yürütüldü.

3.8.1.1.5.Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) ile yıkandı.

3.8.1.1.6.Boyama

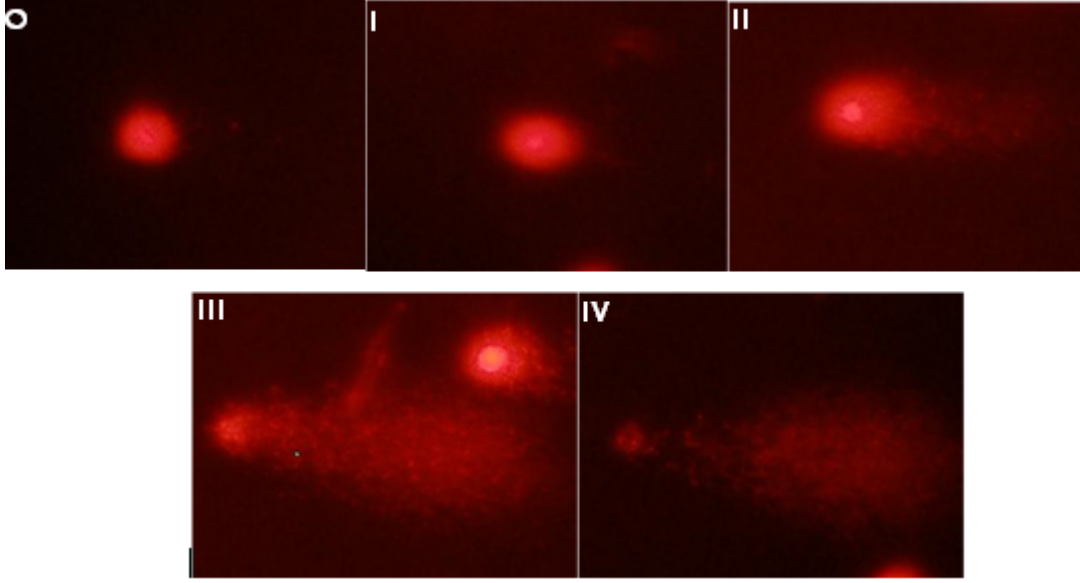
Nötralizasyon işleminden sonra boyama yapılarak cometler sayıldı. Boyama işlemi için floresan bir boya olan etidyum bromit boyası ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) kullanıldı. Her bir slayt için 80

μ L boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop (Olympus CKX41 Japan) ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme işlemi için DNA'lar hasar düzeyine göre 5 evreye (0, 1, 2, 3 ve 4) ayrıldı(Şekil 32).

3.9. Alkali Tek Hücre Elektroforez (Comet Assay) Yöntemi ile DNA Hasarına Karşı Oluşturulan Direnç Tayini

Hücreler 1 saat aralıklı inkubasyon süreleriyle hücre kültür flasklarında [DMEM+Hücre], [Isırgan otu + DMEM+ H₂O₂], [H₂O₂ + Hücre] ile maruz bırakılarak Comet Assay yöntemiyle kontrol grubu ile karşılaştırılarak DNA hasarına karşı oluşturmuş olduğu direnç değerlendirildi.

Isırgan otu yaprak ve tohum ekstraktının H₂O₂ ile oluşturulan DNA hasarına karşı gerçekleştirmiş olduğu direnci araştırmak için lenfositler kültür ortamında gruplara ayrılarak 50-0,36 μ g/ml konsantrasyon aralığında farklı dozlardaki ısırgan otu ekstraktı ve her konsantrasyona ilave edilen sabit hacimdeki 50 μ M H₂O₂ 'ye maruz bırakıldı. Pozitif kontrol grubu oluşturmak için hücreler üzerine sadece 20 μ mol H₂O₂, negatif kontrol grubuna ise herhangi bir genotoksik madde verilmedi. Daha sonra hücreler bu inkübasyon ortamlarından 1 saat arayla alınıp PBS tamponu ile yıkandıktan sonra Comet Assay yöntemi ile DNA hasarı çalışılmak üzere kültür ortamlarından çıkarıldı. Hasarlanan hücre DNA'ları hasarın derecesine göre beş kategoride değerlendirildi. Dairesel şeklide hiç kuyruk oluşturmamış DNA görüntülerinden hiç hasarlanmamış DNA lar "O", çok az hasarlanmış DNA lar "I", az hasarlı DNA lar "II", hasarlı DNA lar "III" ve çok hasarlı DNA lar "IV." derece hasar olarak değerlendirildi (Şekil 28).



Şekil 28: Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA.

3.10. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur.(175).

3.10.1. Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayırıcılar

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözdürülerek hazırlanır. 240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

3.10.1.1. Prensip

Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz odianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de

spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir (175).

3.11. Total Oksidan Seviye (TOS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

3.11.1.Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM ksilenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır. 560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır

3.11.1.1. Prensip

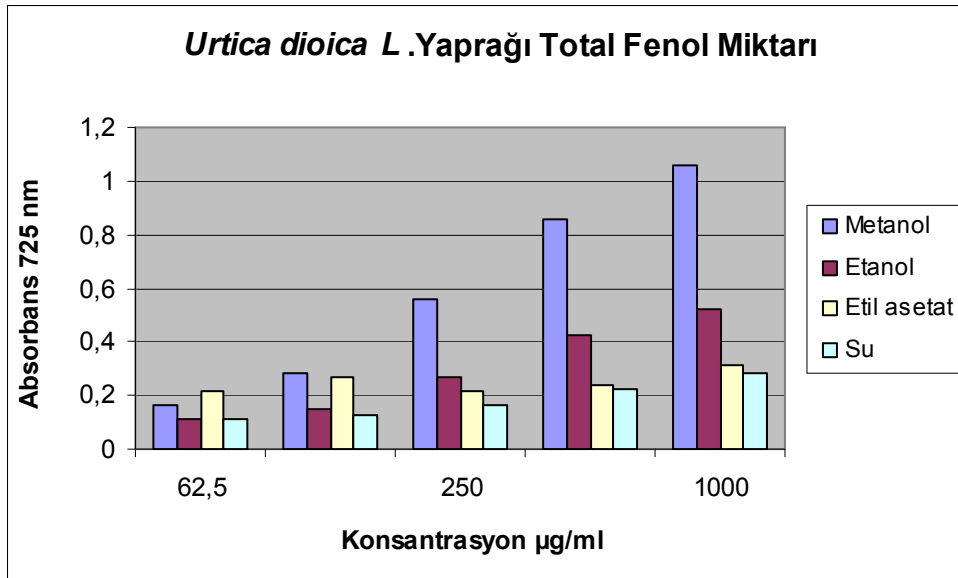
Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equivalent/L olarak ifade edilir (176).

3.12. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak elde edildi. Ekstraktların oluşturduğu DNA hasarı direnç durumu bar charts grafiği çizilerek analiz edildi.

4.ARAŞIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

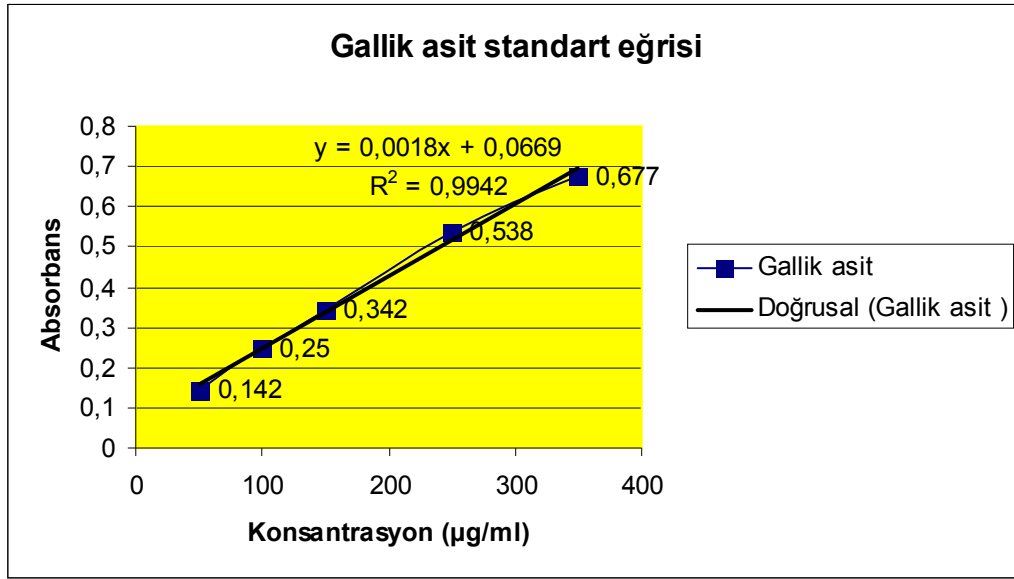
Yapmış olduğumuz çalışmada metanol, etanol, etil asetat ve su çözücülerinde hazırlanan ısırgan otu yaprak ve tohum ekstraktlarının çözücü içerisine geçen fenol ve flavonoid miktarlarına göre göstermiş oldukları toplam antioksidan seviye, total fenol ve total flavonoid miktarları açısından değerlendirildiğinde en güçlü antioksidan özelliği gösteren metanol çözücüsü olmuştur (Şekil 29). Diğer çözücülere göre daha yüksek antioksidan özellik göstermesinden dolayı hücre kültürü ortamında lenfositlerde DNA hasarına karşı oluşturulan direnci ölçmek için hücre kültüründe kullanılmak üzere metanol ekstraktı seçilmiştir.



Şekil 29: Farklı konsantrasyonlarda ve çözücülerdeki fenol miktarlarına göre absorbans eşdeğerleri

4.1. Toplam fenolik madde analizi

Total fenol bileşikleri ölçümünde standart olarak Gallik asit kullanılmış ve farklı konsantrasyonlarda standart eğrisi Şekil 30'da gösterilmiştir. Şekil 30'dan da görüleceği üzere standart grafiğinde $y=mx$ grafiğine göre R^2 değeri 0,9942 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 30: *Urtica dioica L.* Total fenol miktarı standart grafik eğrisi

Yapılan ölçümler 3'lü tekrarlar halinde 725 nm dalga boyunda alınan absorbanslar $y=0,0018x+0,0669$ denklemine göre Gallik Asit Eşdeğerliği / gram Kuru Madde (GAE/gKM) cinsinden Tablo 4'te ortalamaları ve standart sapmaları alınarak gösterilmiştir.

Tablo 4 : Farklı çözücülerdeki ısırgan otu yaprağının GAE/g KM cinsinden toplam fenolik madde içerikleri

Konsantrasyon n (ug/ml)	Metanol	Etanol	Etil Asetat	Su
	GAE/g KM n=3 Mean± SD	GAE/g KM n=3 Mean±SD	GAE/g KM n=3 Mean± SD	GAE/g KM n=3 Mean± SD
62,50	2,54 ± 0,27	1,358 ± 0,13	4,52 ± 0,36	1,35 ± 0,11
125,00	5,54 ± 0,36	2,53 ± 0,366	6,58 ± 0,38	1,74 ± 0,13
250,00	13,11 ± 0,61	3,71 ± 0,24	9,28 ± 0,61	2,79 ± 0,18
500,00	28,71 ± 2,45	9,41 ± 0,39	11,34 ± 0,82	4,53 ± 0,27
1000,00	37,98 ± 0,94	18,45 ± 0,47	15,49 ± 0,59	6,10 ± 0,13
Ortalama	17,58	7,10	9,44	3,31

Tablo 4'te görüleceği üzere yapılan çalışmada çözücüler arasında toplam fenolik madde miktarları farklılık göstermektedir. Metanol çözücüsünde toplam fenolik madde miktarı $2,54\pm 0,27$ ile $37,98\pm 0,94$ GAE/g KM arasında değişirken etanol çözücüsünde $1,35\pm 0,13$ ile $18,45\pm 0,47$ GAE/g KM arasında değişmekte, etil asetat çözücüsü $4,52\pm 0,36$ ile $15,49\pm 0,59$

GAE/g KM arasında değişmekte ve bu durum su çözücüsünde $1,35 \pm 0,11$ ile $6,10 \pm 0,13$ GAE/g KM arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre yaprak ekstraksiyonunda en fazla fenolik madde toplam $17,58$ GAE/g KM ile metanol çözücüsünde en az fenolik madde ise toplam $3,31$ GAE/g KM ile su çözücüsünde olduğu tespit edilmiştir.

Isırgan otu tohum ekstraktları metanol, etanol ve etil asetat çözücülerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlar aynı yöntem prensibine göre GAE/gKM olarak Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: Isırgan otu tohumunun farklı çözücülerdeki toplam fenolik madde içeikleri

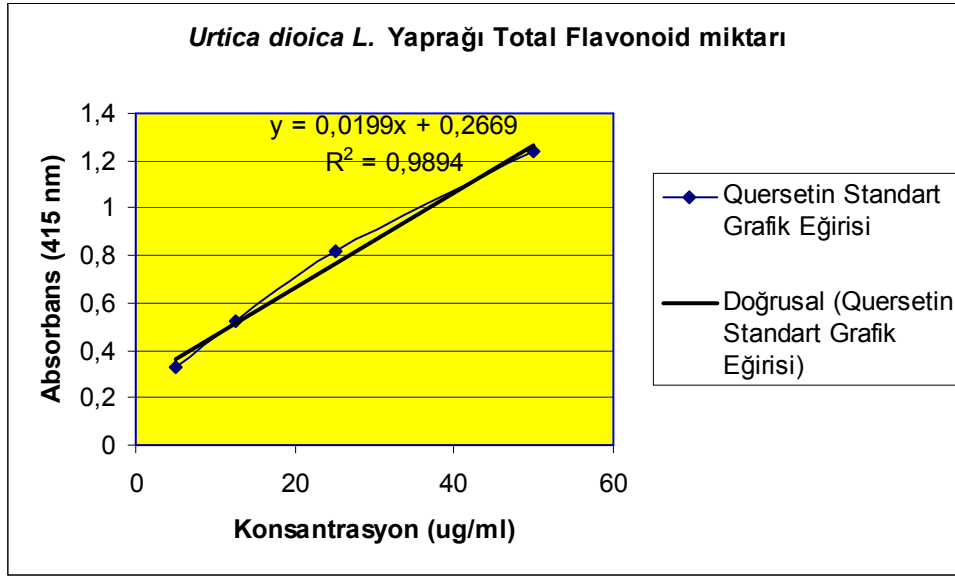
Konsantrasyon (ug/ml)	Metanol GAE/g KM n=3 Mean± SD	Etanol GAE/g KM n=3 Mean±SD	Etil Asetat GAE/g KM n=3 Mean± SD
62,50	$6,64 \pm 0,45$	$6,14 \pm 0,10$	$4,35 \pm 0,45$
125,00	$7,99 \pm 0,24$	$8,48 \pm 0,20$	$6,47 \pm 0,23$
250,00	$10,54 \pm 0,41$	$10,41 \pm 0,17$	$7,30 \pm 0,32$
500,00	$12,45 \pm 0,77$	$11,57 \pm 0,12$	$9,47 \pm 0,35$
1000,00	$14,80 \pm 0,16$	$12,6 \pm 0,33$	$10,71 \pm 0,22$
Ortalama	10,4883	9,8606	7,6651

Tablo 5 te hesaplanan değerlere göre metanol çözücüsünde $6,64 \pm 0,45$ ile $14,80 \pm 0,16$ GAE/g KM olarak en fazla fenol içeriğine sahip oldu gösterilmiştir.

Tablolardan da görüleceği üzere farklı çözücülerdeki ekstarktlara göre ölçülen toplam fenolik madde miktarları Isırgan otu yaprak > Isırgan otu tohum ve Metanol > Etanol > Etil asetat > Su şeklinde sıralanmaktadır.

4.2. Toplam flavonoid ölçümü

Yapmış olduğumuz çalışmada total flavonoid ölçümlerinde standart olarak quersetin eşdeğerlik olarak hesaplanmıştır. Standart ölçümlerinde alınan absorbans değerlerine öre çizilen grafikte R^2 değeri $0,9094$ olarak bulunmuş ve Quersetin Eşdeğerliği / gram Kuru Madde (QE/gKM) olarak metanol, etil asetat ve etanol şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 31: *Urtica dioica* L. Total flavonoid miktarı standart grafik eğrisi

Tablodan da görüleceği üzere denklem grafiği $y=0,0199x+0,2669$ şeklinde hesaplanmış ve bu göz önünde bulundurularak Quersetin eşdeğerliği olarak total flavonoid miktarı hesaplanmıştır.

Tablo 6: Farklı çözücülerdeki ısırgan otu yaprağının QE/g KM cinsinden toplam flavonoid madde içerikleri

Konsantrasyon (ug/ml)	Metanol	Etanol	Etil Asetat	Su
	QE/g KM n=3	QE/g KM n=3	QE/g KM n=3	QE/g KM n=3
	Mean± SD	Mean±SD	Mean± SD	Mean± SD
62,50	7,31 ± 0,18	3,22 ± 0,05	3,50 ± 0,05	2,26 ± 0,06
125,00	6,23 ± 0,13	4,14 ± 0,12	4,41 ± 0,22	3,40 ± 0,21
250,00	8,98 ± 0,23	6,75 ± 0,24	7,43 ± 0,16	4,31 ± 0,21
500,00	10,44 ± 0,38	7,67 ± 0,19	8,74 ± 0,29	6,31 ± 0,044
1000,00	18,65 ± 0,12	16,90 ± 0,32	15,36 ± 0,11	9,53 ± 0,027
Ortalama	10,3251	7,7396	7,8942	5,1669

Tabloda gösterilen toplam flavonoid miktarı fenolik madde miktarında olduğu gibi metanol çözücüsünde $7,31\pm 0,18$ ile $18,65\pm 0,12$ QE/g KM olarak hesaplanmıştır. Etanol ve etil asetat çözücülerindeki toplam flavonoid miktarı birbirine yakın çıkmış $3,22\pm 0,56$

ile $16,90 \pm 0,32$ QE/g KM etanol, $3,50 \pm 0,05$ ile $15,36 \pm 0,11$ QE/g KM etil asetat ve su çözücüsündeki flavonoid miktarı $2,26 \pm 0,06$ ile $9,53 \pm 0,027$ QE/g KM değeri ile diğerlerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Isırgan otu tohumu aynı yöntemle göre toplam flavonoid miktarı açısından hesaplandı. Sonuçlara göre ısırgan otu tohumunda yaprağa göre daha az flavonoid miktarı ölçüldü çıkan sonuçlar çözücüler arasında birbirine yakın iken yine en fazla miktar $4,81 \pm 0,13$ QE/gKM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7: Farklı çözücülerdeki ısırgan otu tohumunun QE/g KM cinsinden toplam flavonoid madde içerikleri

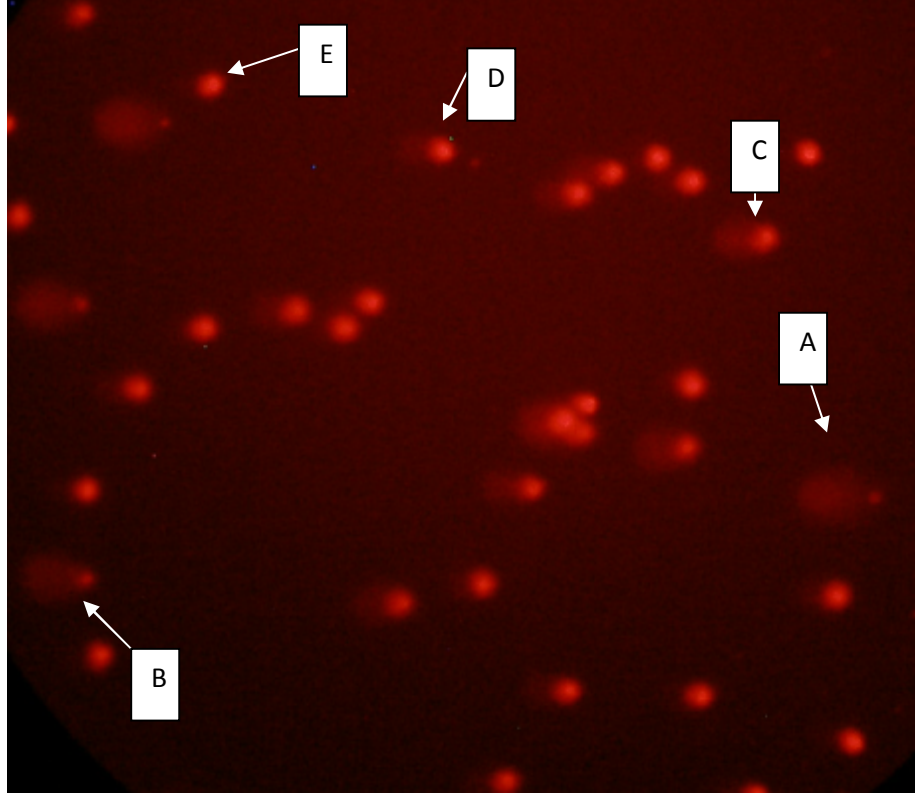
Konsantrasyo n (ug/ml)	Metanol QE/g KM n=3 Mean± SD	Etanol QE/g KM n=3 Mean±SD	Etil Asetat QE/g KM n=3 Mean± SD
62,50	$2,93 \pm 0,05$	$2,66 \pm 0,08$	$2,22 \pm 0,11$
125,00	$3,29 \pm 0,05$	$2,88 \pm 0,018$	$2,51 \pm 0,11$
250,00	$3,75 \pm 0,24$	$3,32 \pm 0,28$	$2,77 \pm 0,07$
500,00	$3,77 \pm 0,09$	$3,70 \pm 0,04$	$2,81 \pm 0,20$
1000,00	$4,81 \pm 0,13$	$4,30 \pm 0,16$	$3,53 \pm 0,25$
Ortalama	3,7137	3,3749	2,7739

4.3. Mononükleer Lökosit Hücre Canlılığı Tespiti

Araştırmamızda kullanılan mononükleer lökosit hücrelerinin ısırgan otu tohum ve yaprak ekstraları ile maruz bırakılmadan önce ve sonra Tripan Blue boyası ile yapılan canlılık testinde %95 in üzerinde canlılık tespiti yapılmıştır.

4.4. Mononükleer Lökosit DNA Hasarı bulguları

Yapılan çalışmada comet assay yöntemiyle belirlenen DNA hasarı görüntüleri hücrelerin baş çapı ve kuyruk uzunluğu göz önünde bulundurularak 0,1,2,3,4 dereceye ayrılarak (Arbitrary Unit) hesaplanmıştır (Şekil 32).



Şekil 32 : Comet Assay yöntemi ile görüntülenen hasar dereceleri A-4,B-3,C-2,D-1,E-0

Yapılan çalışmamızda hidrojen peroksitin oluşturmuş olduğu oksidatif DNA hasarını önleme amacıyla ısırgan otunun yapraklarından ve tohumundan elde edilmiş metanol ekstraktının farklı dozları kullanılmıştır.

Hücre kültürü ortamında sağlıklı bireyden alınan kandan separe edilen lökosit hücrelerinin primer kültürü yapılmış ve 1 saat aralıklarda verilen dozlara karşı DNA hasarını önleme düzeyleri incelenmiştir. Çalışma 3 gruba ayrılmıştır ve ayarlanan her doz 3'lü tekrar halinde yapılarak hesaplama yapılırken ortalaması alınmıştır;

1.Grup: 1 saat inkübasyon 50- 25- 12,5- 6,25- 3 – 1,5-0,75-0,36 µg/ml

2.Grup: 2 saat inkübasyon 50- 25- 12,5- 6,25- 3- 1,5- 0,75- 0,36 µg/ml

3.Grup: 3 saat inkübasyon 50- 25- 12,5- 6,25- 3- 1,5- 0,75- 0,36 µg/ml konsantrasyonlarında ısırgan otu tohum ve yaprak ekstrelerinin hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Isırgan otunun metanol ekstraktı genotoksik hasarın oluşumunu önlemede yüksek dozlarda 50-25 µg/ml gibi konsantrasyonlarda hücreler üzerinde hasar sayısı çok yüksek çıkarken, yapılan optimum doz ayarlaması sonucunda 3-12,5 µg/ml konsantrasyonlarında tam tersine hasar

seviyeleri çok düşük çıkmış ve 1,5-0,36µ/ml konsantrasyonlarında DNA hasarı sayısı pozitif kontrole yakın çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum ısırgan tohumunun metanol ekstraktında farklılık göstermektedir. Isırgan tohumu hücre kültürü ortamında 3 µg/ml konsantrasyonunda en düşük hasar sayısı ortalama 104 AU ile DNA hasarına karşı oluşturmuş olduğu direnç düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Isırgan otu yaprağı ve tohumu karşılaştırılacak olursa ısırgan otu yaprağı DNA hasarına karşı direnç oluşturmakta daha etkili olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 8-9).

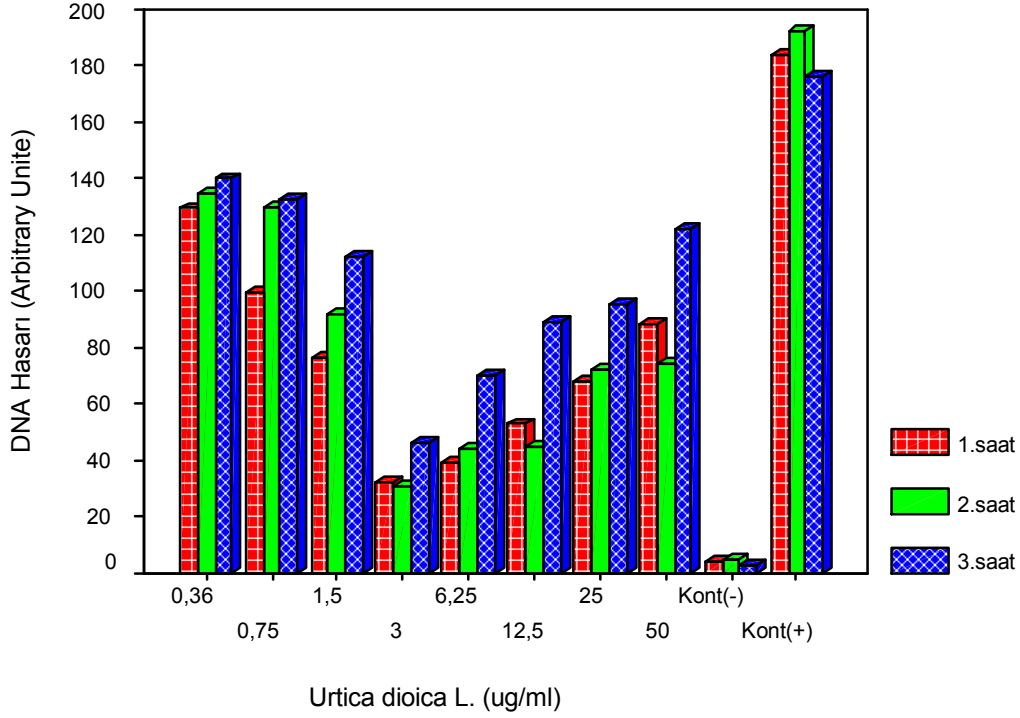
Tablo 8: Farklı konsantrasyonlarda ısırgan otu yaprak ekstrelerinin DNA hasarı oluşumuna karşı oluşturduğu direnç seviyeleri

Konsantrasyon n (ug/ml)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3
	Mean± SD 1.saat	Mean± SD 2.saat	Mean± SD 3.saat
0,36	131,33 ± 11,93	179,33 ± 5,00	140,33 ± 8,50
0,75	100,15 ± 4,00	161,66 ± 5,56	134,33 ± 7,23
1,50	76,22 ± 4,58	89,00 ± 7,00	57,21 ± 8,00
3,00	32,66 ± 0,57	41,00 ± 11,74	46,33 ± 4,50
6,25	39,66 ± 5,50	44,33 ± 0,57	70,36 ± 2,00
12,50	53,66 ± 11,06	50,00 ± 4,58	87,66 ± 9,29
25,00	110,26 ± 4,00	54,66 ± 11,37	95,66 ± 1,52
50,00	88,66 ± 9,71	61,00 ± 8,71	122,02 ± 2,00
Ortalama	79,00	85,00	94,16

Tablo 9: Farklı konsantrasyonlarda ısırgan tohumu ekstrelerinin DNA hasarı oluşumuna karşı oluşturduğu direnç seviyeleri

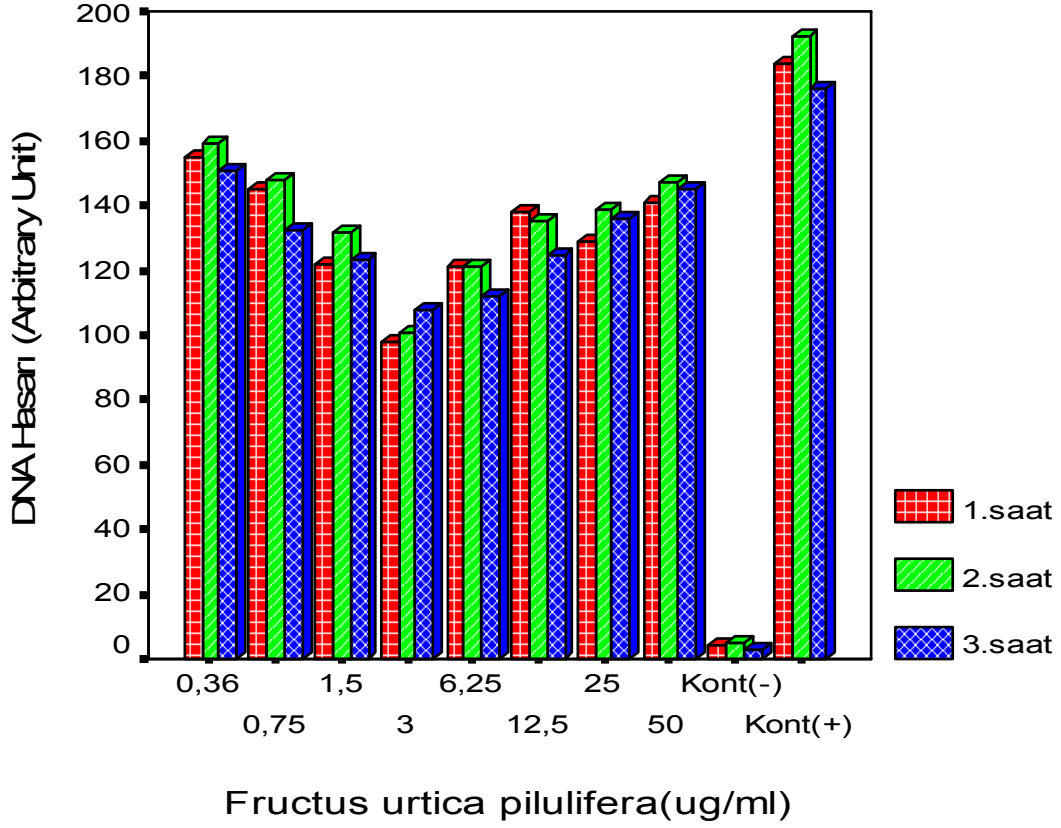
Konsantrasyon (ug/ml)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) n=3
	Mean± SD 1.saat	Mean± SD 2.saat	Mean± SD 3.saat
0,36	155,33 ± 8,93	159,33 ± 3,60	151,33 ± 6,51
0,75	145,15 ± 3,50	148,66 ± 2,58	132,33 ± 6,33
1,50	122,22 ± 4,65	132,00 ± 6,55	123,21 ± 3,25
3,00	98,66 ± 2,77	101,00 ± 8,75	108,33 ± 6,50
6,25	121,66 ± 4,50	120,33 ± 2,57	112,36 ± 8,57
12,50	138,66 ± 12,06	135,00 ± 4,68	125,66 ± 9,29
25,00	129,26 ± 6,00	139,66 ± 10,27	136,66 ± 1,52
50,00	141,66 ± 7,51	147,00 ± 9,71	145,02 ± 2,00
Ortalama	123,00	127,00	121,00

Ektraktardan hücreler üzerinde en etkili dozun 3 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. İnkubasyon süreleri göz önünde bulundurulacak olursa, 3. saatteki oksidatif DNA hasarı 1. saat ve 2. saate göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır bu da DNA hasarı skorlaması yapıldığı zaman inkubasyon sürelerine göre hasar sayısındaki farklılığı ortaya çıkarmıştır. (Şekil 33)



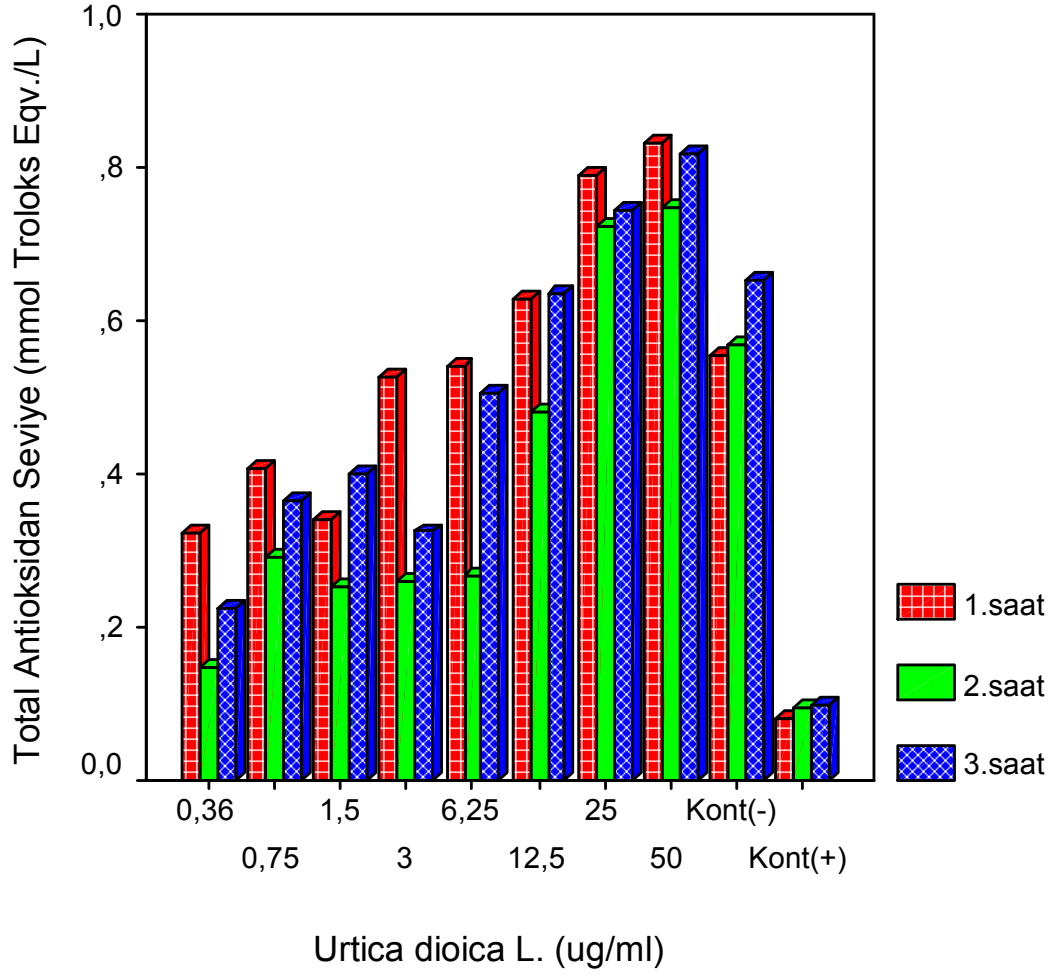
Şekil 33: Urtica Dioica L. 'nin konsantrasyona göre farklı inkübasyon saatlerinde DNA hasarı miktarları

Isırgan tohumu ekstraktlarında DNA hasarına karşı oluşturduğu en yüksek direnç genel ortalama 124 AU ile 3-6,25 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Verilen diğer dozlarda ısırgan tohumunun herhangi bir etkili direnç göstermediği gözlemlenmiştir(Şekil 34).

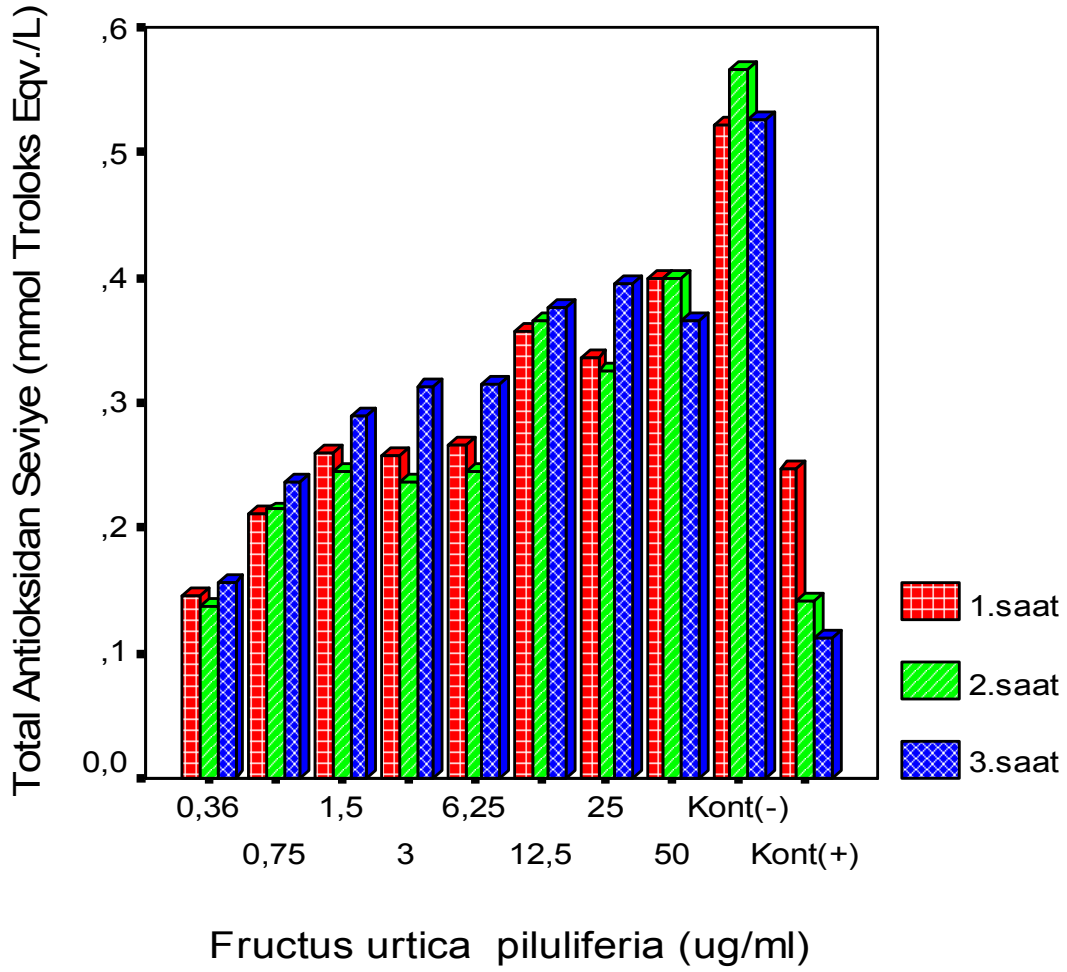


Şekil 34: *Fructus urtica pilulifera* 'nın konsantrasyona göre farklı inkübasyon saatlerinde DNA hasarı miktarları

Tohum ve yaprak ekstraktların minimum DNA hasarı oluşturan dilüsyonlarındaki flasklardan alınan numunelerden yapılan TAS ve TOS seviyelerinin ölçümünden elde edilen sonuçlara göre; ortamda yalnızca hücrelerin bulunduğu, ekstraktların bulunmadığı numunede TAS'ın düşük seviyede olduğu, ortama ısırgan ekstraktları eklendiğinde 1. saatin sonunda TAS seviyesinin yükseldiği görüldü. Ortamlara H₂O₂ eklendiğinde ise TAS seviyelerinin hızla düşüşe geçtiği ve TOS seviyelerinin artışa geçtiği gözlenmiştir. Pozitif kontrolde TAS seviyelerinin çok düşük olduğu ve TOS seviyelerinin ise çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tohum ekstraktının yaprak ekstraktına göre TAS seviyeleri daha düşük iken, TOS seviyeleri ise daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 35-36)

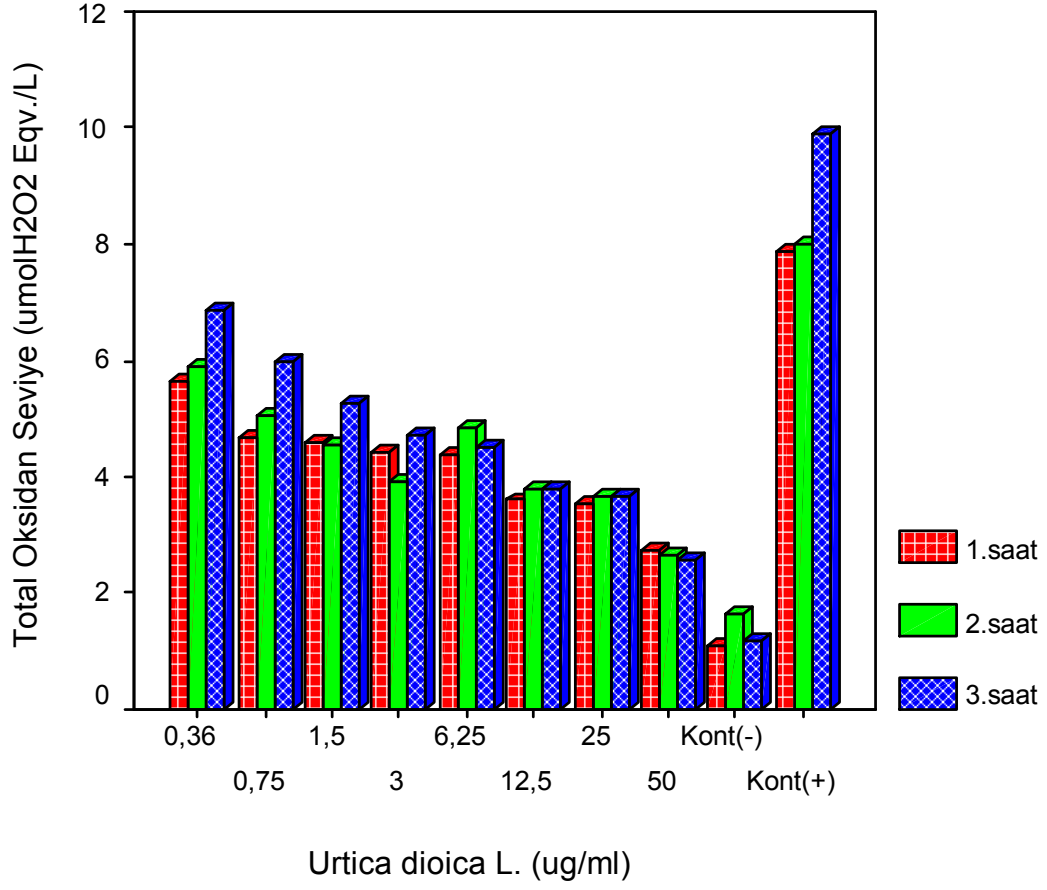


Şekil 35: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen Urtica dioica'nın total antioksidan seviye üzerine etkisi

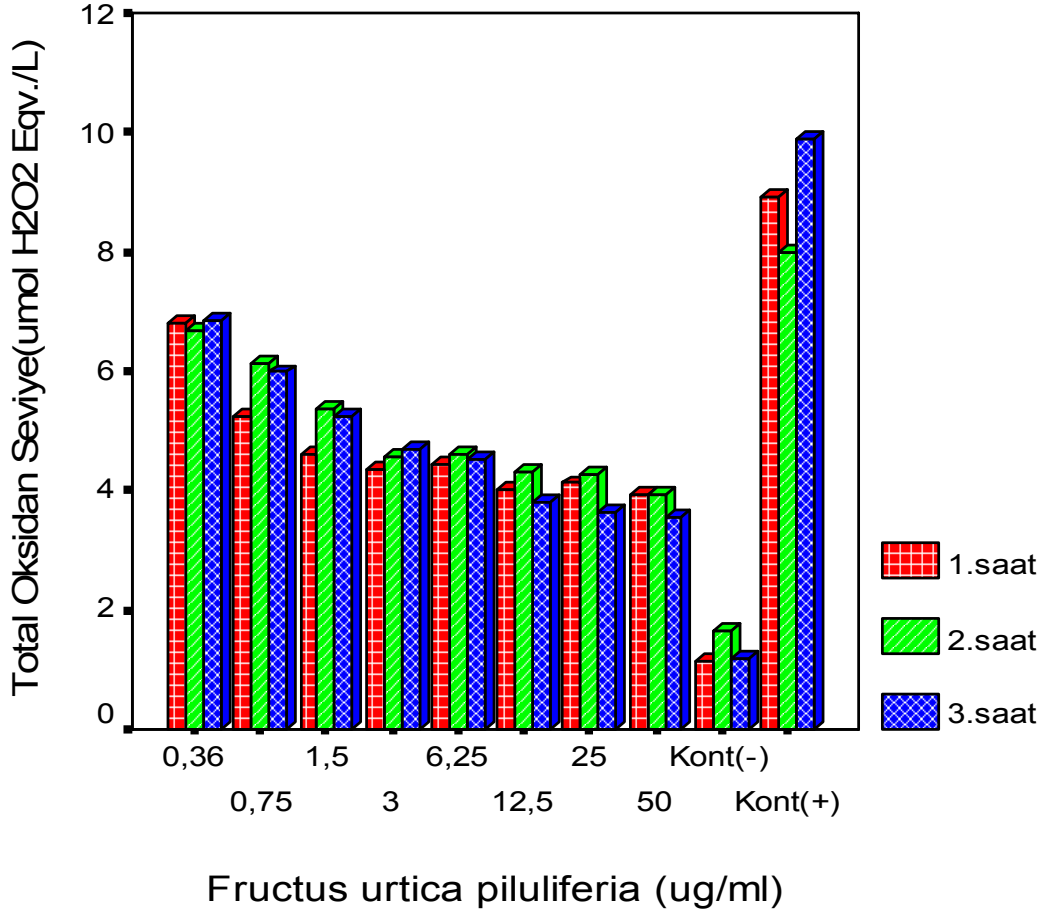


Şekil 36: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen ısırgan tohumu (*fructus urtica piluliferia*)'nun total antioksidan seviye üzerine etkisi

Isırgan otu tohum ve yaprak ekstralarının farklı dozlarda hücreler üzerindeki etkisinde düşük doz ısırgan otu ve ortamlara H₂O₂ eklendiğinde ise TAS seviyelerinin hızla düşüşe geçtiği ve TOS seviyelerinin artışa geçtiği gözlenmiştir. Pozitif kontrolde TAS seviyelerinin çok düşük olduğu ve TOS seviyelerinin ise çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 37-38).



Şekil 37: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen Urtica dioica'nın total oksidan seviyeleri üzerine etkisi



Şekil 38: Farklı konsantrasyonlarda ortama ilave edilen ısırgan tohumu (*Urtica fructus piluliferia*) 'nun total oksidan seviyeleri üzerine etkisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki ekstraktlarında bulunan etken maddeler, kronik birçok hastalığın riskini azaltan ve bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyolojik olarak aktif bitki bileşikleri olarak tanımlanmaktadır. Bitki ekstraktları çeşitli etkilerle anti- genotoksik aktivite gösterebilmektedirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasallardan özellikle alkaloidler ve fenolik bileşikler anti-genotoksik aktivite açısından ön plana çıkmaktadır. Bitki kimyasallarının etki mekanizmaları, hücre kültürleri ve moleküler hedefler düzeyinde (reseptörler, reseptör proteinleri, matriks proteinleri, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri vb. gibi) araştırılabilmektedir. Özellikle genotoksisite çalışmalarında bu bitki kimyasalları hücre modelleri üzerinde etkili bir biçimde araştırma olanağı sağlayabilmektedirler (182).

Yapılan çalışmamızda anti-genotoksik aktivitenin belirlenmesinde alkalen tekli hücre elektroforezis yöntemi (Comet Assay) kullanılmıştır.

DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin kullanıldığı testlerden en sık başvuru olan Sister Chromatid Exchange (SCE) ve Microgel Electrophoresis (MGE) olarak da adlandırılan Comet Assay yöntemidir. Bu yöntemlerle DNA sarmal kırıklarının saptanması hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (69). Genotoksik taramalarda comet yöntemi giderek daha fazla kabul görmektedir. Comet yönteminin, yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji alanında uygulamaları vardır (40,69). DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir (70,71,72).

Comet yöntemi aşağıda belirtilen avantajlara sahiptir; (73,74,75)

- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Hızlı bir yöntemdir, çabuk sonuç alınır.
- Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.
- Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar.
- Maliyeti düşüktür.
- Araç-gereç gereksinimi azdır

Tüm bu avantajlar göz önünde bulundurularak çalışmamızda comet assay yöntemi uygulanmış ve sağlıklı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda Total Antioksidan Seviyeleri ve Total Oksidan Seviyeleri tespitinde otomatize edilmiş spektrofotometrik bir yöntem olan Erel yöntemi tercih edilmiştir. Erel yönteminde güçlü serbest radikallere karşı total antioksidan kapasiteyi ölçebilen bir metottur.

Bu ölçüm yönteminde 2,2 '-azinobis-3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radikali (ABTS kökü) kullanılmıştır. Bu ölçüm yönteminin esası hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün ABTS+ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. ABTS kökü, antioksidan miktarına ve antioksidan kapasiteye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, emilim değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır (175).

Reaksiyon hızı, bilinen bir yöntem olan Trolox ile ayarlanabilmektedir. Birimi Trolox equivalent/L'dır. Toplam oksidan seviye (TOS) ölçümü, Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemle yapılmıştır (176). Birim $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv. / L}$ 'dir. TAS ve TOS ölçümlerinde kullanılan Erel yöntemleri spektrofotometrik bir yöntem olmasından kolay uygulanabilir ve kısa zamanda sonuç alınabilir olduğundan tercih edilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada metanol-etanol-etilasetat-su gibi farklı çözücüler kullanılarak ısırgan otu tohumu ve ısırgan otu yaprağının anti-genotoksik etkisi araştırılmıştır.

Fitoterapotik çalışmalar için bitkilerin kök, yaprak, meyva veya tohumlarından farklı yöntem ve solventler kullanılarak elde edilen ekstraktlar tercih edilmektedir. Çalışmamızda ısırgan otu yaprağı tohumundan hangi ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktta en yüksek total antioksidan, total fenol ve flavonoid içeriğinin elde edildiğini saptamak amacıyla farklı solventler ve su kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmış, analiz sonucunda en etkili ekstraksiyonun metanol ile yapılan ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir. Dolayısı ile çalışmaya metanol ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlarla devam edilmiştir. Nitekim literatürde Hudec ve ark. yapmış oldukları çalışmaların birinde in vitro ortamda hücreler üzerinde ısırgan otu ekstraktlarından metanol çözücüsünde hazırlanmış ekstraktı seçerek en güçlü antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (178).

Yapılan toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan ölçümlerinde çözücüler arasında en yüksek aktivite gösteren, metanol ekstraktı olmuştur(Şekil 29). Bu sonuçta gösteriyor ki metanol polar bir çözücü olduğu için, bitkide bulunan etkili bileşiklerin de polar özellik taşıması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Polar bileşik daha fazla olduğundan metanole daha fazla madde geçebildiğinden biyoaktif maddelerin geçişi daha fazla olmaktadır. Bundan dolayı hücre kültürü ortamında metanol ekstraktı tercih edilerek mononükleer lökosit hücrelerde H_2O_2 'nin oluşturduğu DNA hasarını önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Direkt genotoksik özelliği olmamakla birlikte geçişli metallerin varlığında Fenton reaksiyonu ile OH^\cdot radikali oluşturması ve oluşan OH^\cdot radikalının en güçlü genotoksik radikal olması nedeni ile DNA hasarı oluşturmak için H_2O_2 kullanıldı. Negatif kontrol olarak da sadece hücre kültür besiyeri kullanılmıştır.

Çalışmamızda, hücre kültür ortamında heparinize kandan gradient oluşturarak elde ettiğimiz mononükleer lökosit hücreler hücre kültür ortamına konup, bir taraftan, DNA hasarı

oluşturmak amacıyla 50µM H₂O₂ ilave edilirken, aynı zamanda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ısırgan otu ve tohumu ekstraktları ortama ilave edildi. Hazırlanan hücre kültür flasklarından 1. 2. ve 3. saatlerde Comet Assay yöntemi ile mononükleer lokosit DNA hasar düzeyleri incelendi. Şekil 33-34'te de görüldüğü gibi en yüksek anti-genotoksik etkinin 3-6,25 µg/ml konsantrasyonlarda görüldüğü, bu seviyenin altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda anti-genotoksik etkinin giderek azaldığı tespit edildi. Sadece aynı konsantrasyonlarda H₂O₂ nin ortama konulduğu pozitif kontrollerde genotoksik etkinin göstergesi olan DNA hasarı 190 AU tespit edilirken, negatif kontrollerde 4 AU tespit edilmiştir. En yüksek anti-genotoksik etkinin görüldüğü 3 mg/ml lik konsantrasyonda ısırgan otu yaprağında DNA hasarı 32 AU seviyesinde iken , ısırgan otu tohumunda 104 AU seviyesindedir. Ancak, bu konsantrasyonun altındaki ve üstündeki dilüsyonlarda anti-genotoksik etkinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç ölçülen total fenol ve flavonoid miktarları ile doğru orantılı olarak tohum ekstresinde daha az direnç olduğunu göstermiştir.

Bulgularımıza göre, hücre kültür ortamı süpernatantlarında ölçülen total fenol, flavonoid ve antioksidan aktivite seviyeleri ortama ilave edilen ısırgan otu ekstraktlarının konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak artarken, anti-genotoksik etkinin konsantrasyona bağımlı olarak azalmadığı, optimum doz olan 3 mg/ml lik konsantrasyonda maksimum anti-genotoksik etki gösterdiği, bu dozun altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda anti-genotoksik etkinin azaldığı tespit edilmiştir.(Şekil 31 ve 32).

Bulgularımızdan, kültür ortamına konulan optimum konsantrasyonun altındaki dozlarda ısırgan otu ve tohum ekstaktında bulunan ve DNA hasarına karşı direnç oluşturan antioksidan bileşik seviyelerinin hasar oluşturan oksidantlara karşı savunmada yetersiz kaldığı, optimum dozda savunmanın yeterli seviyede olduğundan maksimum anti-genotoksik etkinin görüldüğü, artan dozlarla birlikte antioksidan seviyedeki artışın oksidantlara karşı savunmada etkili olmadığı düşünülmektedir. Çalışmamız ısırgan otunun anti-genotoksik etkisini *in vitro* ortamda gösteren ilk çalışmadır. Dolayısı ile diğer literatür bulguları ile karşılaştıma olanağı bulunamamıştır.

Urtica dioica hidroalkolik yaprak ekstresinin, kanserin başlamasını engelleyici, seyirini yavaşlatıcı veya durdurmaya yönelik etkilerini değerlendirmek amacıyla, belirli organlar (karaciğer, akciğer, böbrek ve mide) üzerindeki biyolojik aktivitesinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, ekstrenin fare karaciğeri ve midedeki glutatyon-S-transferaz ve DT-

diaforaz aktivitesinin önemli ölçüde yükselttiği görülmüştür. Yine aynı çalışma U. Dioicann bazı ilaçların metabolizasyonunda rol alan, detoksifikasyonu sağlayan veya hücreleri korumada önemli rolleri olan enzim sistemlerini etkilediği tespit edilmiştir. U. dioica' nın reaktif serbest radikallerin eliminasyonunda da biyolojik farklılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bitkinin aktif bileşikleri, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalazın reaktif serbest radikalleri temizlemesini regüle edebilmektedir(194) .

Isırgan otunun anti-genotoksik etkisi yanında anti-kanserojen etkiye sahip olduğunu gösteren çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da yapılmıştır. Bir çalışmada, araştırmacılar insan prostatik epitelyum hücreleri üzerinde proliferatif etkiyi ısırgan otunun metanolik eksresi üzerinde araştırmışlardır. Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) özütlerinin LNCaP prostat epitel kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi bildirilmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağımlı olarak antiproliferatif etki minimal dozlarda 4 ve 6 günün sonunda 1.0-8 mg/m olarak bildirilmiştir(192).

Telo S. Ve ark. Yapmış olduğu bir çalışmada N-Metil-N-nitroso-Urea ile meme kanseri oluşturulmuş ratlarda ısırgan ekstresi kullanılarak antioksidan enzimleri üzerine etkilerine bakılarak sitotoksitesi incelenmiştir. palpasyonla tespit edilen tümör sayılarını grup 2 ve grup 3 ile karşılaştırdıklarında; 5,5 ayın sonunda grup 2'de %46.15 oranında palpe edilebilen tümör saptanırken grup 3'te %13.33 oranında tespit edilmiştir. Buna göre ısırgan otunun palpe edilebilen meme tümör insidansını yaklaşık olarak %70 gerilettiğini görülmüş. Ancak palpasyonla tespit edilemeyen grup 2 meme dokularını incelediğinde ise hiperplazinin başladığını görürken, grup 3'ten aldıkları çoğu meme dokusunda hiperplazi bile gözlemlenmediği görülmüştür. Eş zamanlı olarak N-Metil-N-nitroso-Urea uygulayıp ısırgan otuna takviyesine başlandığından dolayı bu sonuçlar araştırmacılara ısırgan otunun meme kanseri başlangıcını geciktirdiği ya da gerilettiği kanısını oluşturmuştur (185).

Turan ve ark. Yapmış olduğu diğer bir çalışmada Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) özütlerinin LNCaP prostat epitel kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi bildirilmiştir. *Urtica dioica*'dan elde edilen özütün prostat kanserli dokularda adenosine deaminase aktivitesini inhibe ettiği bu etkinin bu özütün antitümöral potansiyelinin bir mekanizması olabileceği belirtilmiştir. (*Urtica dioica* 14,4 µg/mL 17,4 µg/mL) (186).

Yapılan tüm bu çalışmalar özetlenecek olursa ısırgan otu içerdiği güçlü antioksidan

bileşiklerden dolayı hücreler üzerinde serbest radikallere karşı kuvvetli bir direnç oluşması ve oluşan DNA hasarı seviyelerini de bazı apoptotik yolları indükleyerek, tümörü küçültücü etkileri ile kanser tedavisinde, kemoterapide ve radyoterapide destekleyici ve yan etkileri azaltıcı etkileri nedeniyle tamamlayıcı tedavide önemli bir yeri olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar arasında bir takım farklılıklar olduğu gözlemlenmektedir. Bunun nedeni vücut içinde farklı reaksiyonların, aynı anda gerçekleşmesi ve bunların birbirleriyle de bir takım farklı reaksiyonlar vermesiyle etki mekanizmalarının değişebileceği yönünde açıklanmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışma *in vitro* hücre kültürü ortamında yapılmış olduğundan ısırgan otunun insan metabolizmasında göstereceği etki tam yansıtılmamıştır bu nedenle bu çalışma *in vivo* ortamda deney hayvanları ile desteklenerek, genotoksisite testlerinin yanı sıra sitotoksisite testleri ile yapılması daha aydınlatıcı sonuçlar doğuracaktır.

Sonuç olarak; Isırgan otu tohum ve yaprağı ekstrelerinin optimum dozlarda güçlü bir anti-genotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Isırgan otu ekstraktı konsantrasyon artışı ile TAS aktivitesi arasında pozitif, TOS arasında negatif ilişki tespit edilirken, oksidatif durum ile DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda ısırgan otunun içerdiği antioksidan bileşik miktarlarına bağlı olarak değişen total fenol, total flavonoid ve total antioksidan seviyeleri ile ilişkilendirildi. Sonuçlarda göstermektedir ki ısırgan otu tohum ve yaprağı optimum dozlarda anti-genotoksik etkiye sahiptir ve bu etki ısırgan otu yaprağında tohumuna göre daha güçlüdür. Anti-genotoksik etkinin ısırgan otu yaprağı ve tohumunda bulunan güçlü antioksidan etkiye sahip fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar da göstermektedir ki ısırgan otu üzerinde daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalardan sonra bu bitkilerden elde edilecek ajanların anti-genotoksik etkilerinden yararlanılabileceği, ancak maksimum anti-genotoksik aktivitenin tespit edilebilmesi için mutlaka *in vivo* olarak optimum doz çalışmaları ile desteklenmesi gerektiği, anti-kanser özellikleri ile ilgili olarak ta hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Couladis,M., O.Tzakou., E.Verykokidou., C. Harvala. 2003. Screening Of Some Grek Aromatic Plants For Antioxidant Activity. *Phytotherapy Research*. 17: 194-195.
- 2- Capecka, E., A.Mareczek., M.Leja., 2004. Antioxidant Activity Of Fresh And Dry Herbs Of Some Lamiaceae Species. *Food Chemistry*. 93: 223-226.
- 3- Chung,K.T., Lu,Z., Chou,M.W. 1998. Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 36:1053-160.
- 4- Bhattacharya, A., M. Kumarm., S. Ghosal., S.K. Bhattacharya. 2000. Effect of Bioactive Tannoid Principler of *Emblica officinalis* on Iron-induced Hepatic Toxicity in Rats. *Phytomedicine*. 7: 173-175.
- 5- Galı-Muhtasıb, H.U.,Younes,I.H., Karchesy, J.J., El-Sabban, M.E. 2001. Plant Tannins Inhibit the Induction of Aberrant Crypt Foci and Colonic Tumors by 1,2-dimethylhydrazine in Mice. *Nutrition Cancer*. 39: 108-116.
- 6- Nagakawa,T., T.Yokozawa. 2002. Direct Scavenging of Nitric Oxide and Superoxide by Gren Tea. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1745-1750.
- 7- Cai,Y., Q.Luo., M. Sun., H. Corke. 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sciences*. 74: 2157-2184.
- 8- Ayan, A. K., Çalışkan, Ö., Çırak, C. 2006. Isırgan Otu (*Urtica spp.*) Ekonomik Önemi ve Tarımı, *OMÜ Ziraat Fakültesi*, 21 (3): 357-363.
- 9- Fu, H.Y., , S.J. Chen, Chen R.F., Ding, W. H., Kuo-Huang, L. L, Huang, R. N. (2006). Identification of Oxalic Asit and Tartaric Asit as Major Persistent Pain-inducing Toxins in the Stinging Hairs of the Nettle, *Urtica thunbergiana*. *Annals of Botany*. 98: 57–65
- 10- Hoşbaş, S. 2008. *Urtica dioica L.* Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, *T.C. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı / İzmir, Yüksek Lisans Tezi*
- 11- Singeer, M., Barg, B.: *Genes and Genomes*. California Blackwell Scientific Publications, (1991)
- 12-Strachan, T., Read, A.P.: *Human Molecular Genetics*, Bios. Scientific Pub. Ltd., Oxford, (1996)
- 13- Luzio, J.P., Thompson, R.J.: *Molecular Medical Biochemistry*, First Published, Cambridge University Press, Cambridge, (1990)

- 14- Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health*. 2007;6:1-7
- 15- Akbaş E, Çelik A, Derici E, Silemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatry* 2001;4(1):15-18.
- 16- Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutat Res*. 1999;445(2):139-45.
- 17- Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1846-55.
- 18- Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Sr RJ. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*. 2005;113(5):517-20
- 19- Phillips D.H.: Smoking- related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):1979-2004.
- 20- Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res*. 1993;298(4):285-9.
- 21- de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA*. 2005;293(10):1212-22.
- 22- Sasikala K, Rosalin FR, Jude ALC, Kumar RA, Sudha S, Devi MV, Balachandar N, Beegam KAS, Meenakshi NM, Begum A. Active and passive smokers – a haematobiochemical and cytogenetic study. *Int J Hum Genet*. 2003;3(1):29-32.
- 23- Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res*. 2000;465(1-2): 101-11
- 24 Debeleş B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg*. 2006;35(2):149-170
- 25- Albers AB, Siegel M, Cheng DM, Rigotti NA, Biener L. Effects of restaurant and bar smoking regulations on exposure to environmental tobacco smoke among Massachusetts adults. *Am J Public Health*. 2004;94(11):1959-64.
- 26- Klaassen, C.D., AMDUR, M.O., DOULL, J.: Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science for Poisons, Fifth edition, McGrawHill, (1996)
- 27- Lu, F.C., Kacew, S. Lu's Basic Toxicology. Fourth edition, Taylor & Francis, London, (2002)
- 28- Brusick, D.: Principles of Genetic Toxicology, Second edition, Plenum Pres, New York, London, (1987)

- 29- Preston RJ, Hoffman GR. Genetic toxicology. Chapter:3/9. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; p:321-350. 2001.
- 30- Aitio A. Biomarkers and Their Use in Occupational Medicine, Human Monitoring After Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents. D. Anderson et al. Ios Pres, 12-21.2000.
- 31- Dizdaroğlu M, Karakaya AE: Advances in DNA Damage and Repair, Plenum Pub. 181-191, 1997
- 32- Kurtulmuş Sevcan, Aydın Kevser Dental döküm alaşımlarının genotoksisite,mutajenisite ve karsinojenisite SÜ Diş hek Fak Derg, 2007;16:73-8
- 33- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation". Biochemistry 42 (30): 9221–6.
- 34- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage". Mutat Res 424 (1–2): 9–21.
- 35- Shigenaga M, Gimeno C, Ames B (1989). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage". Proc Natl Acad Sci USA 86 (24): 9697–701.
- 36- Cathcart R, Schwiers E, Saul R, Ames B (1984). "Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage". Proc Natl Acad Sci USA 81 (18): 5633–7.
- 37- Valerie K, Povirk L (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair". Oncogene 22 (37): 5792–812
- 38- Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H. Retel J. Mutat. Res. 1994; 309: 45–52.
- 39- Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. J. Chem. Rev. 1989; 89(24):503–520.
- 40- Dizdaroğlu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. J. Mutat. Res. 1992; 275(35): 331–342
- 41- What is DNA repair?, <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>
- 42- Chu G., Biochemistry 201: DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>.
- 43- Meister A. Glutathione Ascorbate and cellcycle regulation FEBBS letters 1994 1,4.

- 44- Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *J. Annals. int.Med.* 1987;107(6): 526 – 45
- 45- Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988; 63 (3): 381 – 8.
- 46- Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 1996; 46:15–32
- 47- Tappel AL, Dillard JC. *invivo* lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings* 1981; 40(3):174– 8.
- 49- Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology.* 1993; 49(4): 481– 93.
- 50-Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.*1995; 42(6):18–19.
- 51- Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. invest.* 1985; 75(3):35 – 7.
- 52- Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984; 222: 1–15
- 53- Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik gelişim* 1998; 11: 342 –334.
- 54- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.*1995; 42(6):18–19.
- 55- Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62
- 56- Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik gelişim.*1998; 11: 336–341.
- 57- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:1287–1312
- 58- Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *J. Mutat. Res.* 1992; 275(35): 331–342.
- 59- Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK. *J. Cancer Res.* 1994; 54(6): 12–15.
- 60- Aruoma OI, Halliwell B. DNA and Free Radicals: Techniques Mechanisms and Applications. *OICA International* 1998; 3–26.
- 61- Totter JR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77: 1763–7.

- 62- What is DNA repair?, <http://www.nih.gov/sigs/dna-rep/whatis.html>
- 63- Chu G., Biochemistry 201: DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>.
- 64- Dızdaroğlu, M., Karakaya A.E.: Advances in DNA Damage and Repair. Plenum Publishers, 181191, (1997)
- 65- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice., R., Waters, M.D., Aitio, A.: IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. International Programme on Chemical Safety, Mutat. Res., 463, 11172, (2000)
- 66- Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. Cancer Res. 1994;54(11):2919-22
- 67- Baden, J.M., Simmon, V.F.: Mutagenic Effect of Inhalation Anesthetics, Anesthesiology, 75, 16989, (1980)
- 68- Betti, C., Davini, T., Gianessi, L., Loprieno, N., Baral, E.R.: Comparative Studies by Comet Tests and SCE Analysis in Human Lymphocytes From 200 Healthy Subjects, Mutat. Res., 343, 2017, (1995)
- 69- Martin, V.J., Gren, M.H.L., Schmezer, P.: The Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A European Review, Mutat. Res., 288, 4763, (1993)
- 70- Eger, E.I., Laster, M.J., Winegar, R., Han, C., Gong, D.: Compound A Induces Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamsters Ovarial Cells, Anesthesiology, 86, 91822, (1997)
- 71- Morgan, G.E., Mikhail, S.M.: The Practice of Anesthesiology. In “Clinical Anesthesiology”, Third edition, 114, Appleton & Lange, Stanford, Connecticut, (2002)
- 72- Jaloszynski P. , Kujawski M., Wasowich M., Szulc R., Szyfter K.: Genotoxicity of Inhalation Anesthetics Halothane and Isoflurane in Human Lymphocytes Studied in Vitro Using The Comet Assay, Mutat. Res., 19, 439, 199206, (1999)
- 73- Olive, P.L., Banath, J.B., Durand, R.E.: Heterogeneity in Radiation Induced DNA Damage and Repair and Tumor and Normal Cells Measured Using The “Comet” Assay, Radiat. Res., 122, 8694, (1990)
- 74- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O’neill, K.L.: The Comet Assay: A Comprehensive Review, Mutat. Res., 339, 3759, (1995)
- 75- Gedik, C.M., Evren, S.W.B., Collins, A.R.: Single Cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UVC Damage and its Repair in Human Cells, Int. J. Radiat. Biol., 62, 31320,

(1992)

76- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S.: Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A New Technique for Human Biomonitoring Studies, *Mutat. Res.*, 463, 1331, (2000)

77- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R., Dusinska, M.: DNA Damage in Diabetes Correlation with Clinical Marker, *Free Radic. Biol. & Med.*, 25, 37377, (1998).

78- Sardas, S., Yilmaz, M., Oztok, U., Cakır, N., Karakaya, A.E.: Assesment of DNA Strand Breakage by Comet Assay in Diabetic Patients and the Rol of Antioxidant Supplementation, *Mutat. Res.*, 490, 1239, (2001)

80- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R., Dusinska, M.: DNA Damage in Diabetes Correlation with Clinical Marker, *Free Radic. Biol. & Med.*, 25, 37377, (1998).

82- Binkova, B., Lewtas, J., Miskova, I., Rossner, P., Mrackova, M.C., Mumford, S.M.: Biomarker Studies in Northern Bohemia, *Environ. Health. Perspect.*, 104, 5917, (1996)

83- W.N. Choy, "Genetic toxicology and cancer risk assessment", *Marcel Dekker*, New York, 29-187, (2001).

84- K. Mortelmans, E. Zeiger, "The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay", *Mutat Res*, 455: 29-60, (2000).

85- N. Vural, "Toksikoloji", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129, (2005).

86- D.R. Maron, B.N. Ames, "Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test", *Mutat Res*, 113: 173-215, (1983).

87- U.K. Alekperov, B.N. Ames, T. Kada, L.W. Wattenberg, "Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens", *Mutat Res*, 168: 47-65, (1986).

88- S.A. Latt, R.R. Sehrek, K.S. Loveday, C.P. Dougherty, C.F. Schuler, "Sister chromatid exchange", *Adv Hum Genet*, 10: 267-331, (1980).

89- S. Wolff, "Sister chromatid exchange", *Advances in Human Genetics*, 10: 183-201, (1980).

90- P.E. Perry, E.J. Thompson, "The methodology of sister chromatid exchanges", In: Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., eds. *Handbook of mutagenicity test procedures*, *Elsevier Science*, Amsterdam, 495-529, (1984).

91- E. Sonoda, M.S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata, S. Takeda, "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells", *Mol Cell Biol*, 19 (7): 5166-69, (1999).

- 92- T. Helleday, "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells", *Mutat Res*, 532: 103-15, (2003).
- 93- D.M. Wilson, L.H. Thompson, "Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange", *Mutat Res*, 616: 11-23, (2007)
- 94- R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hugmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E.G. Suhaker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans". *Mutat Res*, 463: 11-172, (2000).
- 95- A. Karaman, F. Keskinler, "Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar", *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 29 (6): 1392-97, (2009).
- 96- A.V. Carrano, L.H. Thompson, P.A. Lindl, J.L. Minkler, "Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis", *Nature*, 271: 551-53, (1987).
- 97- M. Cheng, M.K. Conner, Y. Alaria, "Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom's syndrome lymphocytes", *Cancer Res*, 71: 4508-12, (1981).
- 98- M. Topaktaş, G. Speit, "Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn", *Tr J Biol*, 14: 69-78, (1990).
- 99- M. Topaktaş, E. Rencüzoğulları, "Sitogenetik", *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 87-91, (2010).
- 100- Demirel, S., Zamani, A.G., Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları, Genel Tıp Dergisi, 12(3), 123-127, 2002.
- 101- Mateuca, R., et al., Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 2006, in press.
- 102- Fenech, M., Morley, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat Res* 147: 29-36, 1985
- 103- Aardema, M.J. , Kirsch-Volders, M., The In Vitro Micronucleus Assay, Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Choy, Wai Nang (Editor), New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, 2001. p. 163.
<http://site.ebrary.com/lib/hacettepe/Doc?id=10051304&ppg=178>
- 104- Fenech, M., Morley, A.A., 1985, Measurement of Micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147, 29-36.
- 105- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999, The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428, 271-283

- 106- Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic* 1994;32:159-63.
- 107-. Ford JH, Schultz CJ, Correll AT. Chromosome elimination in micronuclei: A common of hypoploidy. *Am J Hum Genet* 1988;43:733-40.
- 108- Vanderkerken K, Vanparys P, Verschaeve M, Volders K. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis* 1989;4:6-11.
- 109- Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990;244:95-103
- 110- Labay K, Ould-Elhkim M, Kles V, Guffroy M, Poul JM, Sanders P. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001;21:441-51.
- 111-Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 2001;489:147-72.
- 112- Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001;16:539-45.
- 113-Schweickl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-20.
- 114- Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Grobmair S, Sautter I, et al. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugsevaluation by the micronucleus assay. *Mutat Res* 2001;497: 101-9.
- 115- Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem* 1993;17:206-12.
- 116- Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124-5.
- 117- Schneider M, Diemer K, Engelhart K, Zankl H, Trommer WE, Biesalski HK. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res* 2001;34:209-19.
- 118- Rozgaj R, Kasuba V. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000;51:361-8.
- 119- Naccarati A, Molinu S, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci* 2000;21:963-5
- 120- Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek- Zwierzycka K, Swierniak A. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical

carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol* 2001;77:631-6.

121 - Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 2001;491:9-16

122- Von Ledebur MM, Schmid W. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res* 1973;19:109-17.

123- Heddle JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976;41:321-32.

124-Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 1989;13:34

125- Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985;43:233-46.

126- Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986;161:193-8

127- Heddle, A.J., Stuart, E., Salomone, M.F., *The Bone-Marrow Micronucleus Test: Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Kilbey, B.J. Elsevier Science Publ. BV Second Edition, 20, 441-457, 1984.

128- Aaron, C.S., Sorg, R., Zimmer, D., *The Mouse Bone Marrow Micronucleus Test: Evaluation of 21 Drug Candidates*, *Mutat. Res.*, 223(2), 129-140, 1989

129- Emecen, G., Ünlü, H., *Memelilerde Pestisitlerin Sitogenetik Etkilerinin Mikronükleus Testi ile Araştırılması*, *Tr. J. of Biology*, 19, 1-9, 1995

130- Agarwal, D.K., et al., *Cytogenetic Effects of Deltamethrin on Rat Bone Marrow*, *Mutat. Res.*, 311(1), 133-138, 1994.

131- Degrassi, F., Tanzarella, C., *Immunofluorescent Staining of Kinetochores in Micronuclei: A New Assay for the Detection of Aneuploidy*, *Mutat. Res.*, 203(5), 339-345, 1988.

132- Haynes, P., Lambert, T.R., Mitchell, I.D., *Comparative *In vivo* Genotoxicity of Antiviral Nucleoside Analogues; Penciclovir, Acyclovir, Ganciclovir and the Xanthine Analogue, Caffeine, in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay*, *Mutat. Res.*, 369(1-2), 65-74, 1996.

133-Catena, C., et al., *Micronuclei and 3AB Index in X-Irradiated Human Lymphocytes in G₀ and G₁ Phases*, *Mutat. Res.*, 311(2), 231-237, 1994.

134 - Fracasso, M.E., et al., *Mutagenic Activity in Wastewater Concentrates from Dye Plants*, *Mutat. Res.*, 298(2), 91-95, 1992.

- 135 - Chu, S., et al., Induction of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Misgurnus anguillicaudatus* by Polychlorinated, B. Environ. Contam. Tox., 57(2), 179-82, 1996.
- 136 - Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P., Induction of Micronuclei in Haemocytes and Gill Cells of Zebra Mussels, *Dreissena polymorpha*, Exposed to Clastogens, Mutat. Res., 371, 47-55, 1996.
- 137- Fenech, M., Morley, A.A., 1985, Measurement of Micronuclei in lymphocytes. Mutation Research, 147, 29-36
- 138- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999, The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutation Research, 428, 271-283
- 139- Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim.1998; 11: 336–341
- 140- Agarwal, D.K., et al., Cytogenetic Effects of Deltamethrin on Rat Bone Marrow, Mutat. Res., 311(1), 133-138, 1994.
- 141- Maier, P., Schmid, W., Ten Model Mutagens Evaluated by the Micronucleus Test, Mutat. Res., 40(4), 325-337, 1976.
- 142- Jensen, C.G., et al., Primary Cilia Cycle in PtK1 Cells: Effect of Colcemid and Taxol on Cilia Formation and Resorption, Cell Motil. Cytoskel., 7, 187-197, 1987
- 143- Duran, A., Akseki (Antalya) İlçesindeki Bazı Bitkilerin Yerel Adları ve Etnobotanik Özellikleri, Ot Sistemik Botanik Dergisi, 5(1), 77-92, 1988
- 144- Sezik, E., Türkiye’de Halk İlacı Araştırmaları ve Önemi, 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskisehir, 1-9, 16-19 Mayıs, 1992.
- 145- Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. J. Nutr. 1989; 119(6): 109-11.
- 146- Anderson ME, Meister A. Glutathione moesters. J. Anal. Biochem. 1989;183: 16-20.
- 147- . Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. J. Med Lab Sci. 1984; 41(3):157-62.
- 148- Berger SJ, Gosky D, Zberowska E. Sensitive enzymatic cycling in diabetes. J. Diabetes 1991; 46(4): 405 – 12.
- 149- Burton G, Traber M. Vitamin E : antioxidant activity biokinetics and bioavailability. J. Annu. Rev. Nutr. 1990; J. 10: 357–82.
- 150- Pabo’n A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with noncomplicated malaria. J. Clinical Biochemistry 2003; 36(5): 71–78.
- 151- Ferguson, R.L.,2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutation

Research, 475, 89-111

152- Disilvestro, R.A. 2001. Flavanoids as Antioxidants. In R.E.C. Wildman(ed), Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Pres, USA

153-. Bilaloglu, G.V. ve Harmandar, M.,2000. Flavanoidler. Aktif Yyamevi, _stanbul.

154- Evans, R.C., 1995. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants, Biochemical Society Symposium, No:61, 103-116, London

155- Canbas A. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78, Ç. Ü. Adana.1983.

156- Erbaş, M., Gül, S., Şekerci, H. 2008. Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar, *Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum*

157- Duran, A., Akseki (Antalya) Đlçesindeki Bazı Bitkilerin Yerel Adları ve Etnobotanik Özellikleri, *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 5(1), 77-92, 1988.

158- Ayan A. K., Çalışkan, Ö., Çırak, C.T (2006). Isırgan otu (*Urtica Spp.*)'nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*. 21(3): 357-363.

159- Hoşbaş, S. 2008. *Urtica dioica L.* Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, *T.C. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı / İzmir, Yüksek Lisans Tezi*

160- Obertreis B, Giller K, Teucher T, Behnke B, Schmitz H. Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46: 52–56.

161- Obertreis B, Ruttkowski T, Teucher T, Behnke B, Schmitz H. Ex-vivo in-vitro inhibition of lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta secretion in human whole blood by extractum *urticae dioicae foliorum*. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46: 389–394.

162- Balzarini J, Neyts J, Schols D, Hosoya M, Van Damme E, Peumans W, De Clercq E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res*. 1992; 18:191–207

163- Galelli A, Delcourt M, Wagner MC, Peumans W, Truffa-Bachi P. Selective expansion followed by profound deletion of mature V beta 8,3+ T cells in vivo after exposure to the superantigenic lectin *Urtica dioica* agglutinin. *J Immunol*. 1995; 154: 2600–2611

164-. Musette P, Galelli A, Chabre H, Callard P, Peumans W, Truffa-Bachi P, Kourilsky P, Gachelin G. *Urtica dioica* agglutinin, a V beta 8,3-specific superantigen, prevents the development of the systemic lupus erythematosus-like pathology of MRL lpr/lpr mice. *Eur J Immunol*. 1996; 26: 1707–1711.

- 165- Cetinus E, Kilinc M, Inanc F, Kurutas EB, Buzkan N. The role of *urtica dioica* (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 205: 215–221.
- 166- Fijalek Z, Soltyk K, Lozak A, Kominek A, Ostapczuk P. Determination of some micro- and macroelements in preparations made from peppermint and nettle leaves. *Pharmazie.* 2003; 58: 480–482
- 167- Cetinus E, Kilinc M, Inanc F, Kurutas EB, Buzkan N. The role of *urtica dioica* (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 205: 215–221
- 168- Tanakol R.. Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. *Klinik gelişim.* 1998; 11: 347–356
- 169- Gulcin I, Kufrevioglu OI, Oktay M, Buyukokuroglu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 2004; 90: 205–215
- 170- Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NFkappaB. *FEBS Lett.* 1999; 442: 89–94
- 171- Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an *in vitro* model for bronchial drug absorption studies. *Cell Tissue Res* 2002; 308: 391-400.
- 172- Durdi Q, Saied D, Zoleika M and Soleiman M Effect of *Urtica dioica* leaf extract on activities of nucleoside diphosphate kinase and acetyl coenzyme, a carboxylase, in normal and hyperglycemic rats .*African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(6), pp. 792-796, June 2011
- 173- Park, Y K; Koo, M H; Sato, H H; Contado, J L (1995) Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 38: 1253-1259.
- 174- P.N. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell. Res.* 175 (1988) 184–191
- 175- Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112– 9.
- 176- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
- 177- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with

phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144- 158.

178- Hudec, J., Burdova, M., Kobida, L., Komora, L., Macho, V., Kogan, G., Turianica, I., Kochanova, R., Lozek, O., Haban, M., Chlebo, P. 2007. Antioxidant Capacity Changes and Phenolic Profile of *Echinacea purpurea*, Nettle (*Urtica dioica L.*), and Dandelion (*Taraxacum officinale*) after Application of Polyamine and Phenolic Biosynthesis Regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5689-5696.

179- Lage, H., Duarte, N., Coaburger, C., Hilgeroth A., Ferreira M.J.U. (2009). Antitumor activity of terpenoids against classical ve atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*.

180- Kavtaradze N, Alaniya MD Anthocyan Glucosides from *Urtica dioica*. *Chem Nat Comp* 2003;39:315

181-Harput, U. S.; Saracoglu, I.; Ogihara, Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytother. Res.* 2005, 19, 346- 348

182- Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J., Sampson J.H. and Raman A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 90; 33-38.

183- Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey IX. Folk medicine in North-West Anatolia. *J Ethnopharmacol* 1999;63:195-210

184- Ching S, Ingram D, Hahnel R, Beilby J, Rossi E. Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study. *J Nutr.* 2002; 132: 303–306.

185- Tello, S., Halifeoğlu, I., Bozkurt, M., Bulmuş Ö. (2008). Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda İsrırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*. 22(4): 179-183

186- Turan, M., Sökmen, A., Karadayı K., Polat Z.A. (2010). Sivas yöresine özgü bazı bitki özütlerinin anti neoplastik etkileri. *Cumhuriyet Tıp Derg.* 32: 9-18.

187- Abu-Dahab, R., Afifi, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*. 75: 121-136.

188- Sokeland J, Albrecht J. Combination of Sabal and *Urtica* extract vs. finasteride in benign prostatic hyperplasia (Aiken stages I to II). Comparison of therapeutic effectiveness in a one year double-blind study. *Urologie A* 36(4);327-333,1997

189- Harput, U. S.; Saracoglu, I.; Ogihara, Y. Stimulation of lymphocyte proliferation and inhibition of nitric oxide production by aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytother. Res.* 2005, 19, 346-348

190- 35 Le Moal, M.A., Colle, J.H., Galelli, A., Truffa-Cachi, P., 1992b. Mouse T-lymphocyte activation by *Urtica dioica* agglutinin: II.— original pattern of cell activation and cytokine production induced by UDA. *Res. Immunol.* 143, 701-9.

191- Lichius JJ et al, Antiproliferative effect of a polysaccharide fraction of a 20% methanolic extract of stinging nettle roots upon epithelial cells of the human prostate (LNCaP). *Pharmazie.* 1999 Oct;54(10):768

192- Konrad L et al, Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* 2000 Feb;66(1): 44-7

193- Özen T, Korkmaz H. Modulatory effect of *Urtica dioica* L.(Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems,antioxidant enzymes,lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine* 2003;10:405-15

194- Başaran A,Eritoğlu I,Ündeğer Ü,Başaran N. Immunomodulatory activities of some Turkish medicinal plantç *Phytother Res* 1997;11:609-11.