

TC
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARAYEMİŞ'İN (*Laurocerasus officinalis* Roem.)
GENOTOKSİK / ANTİGENOTOKSİK VE ANTIOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Esra YILDIZ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hüseyin AKSOY

Haziran 2021

TC
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARAYEMİŞ'İN (*Laurocerasus officinalis* Roem.)
GENOTOKSİK / ANTİGENOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Esra YILDIZ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.

Doç. Dr.

Doç. Dr.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Doç. Dr.

Doç. Dr.

Üye

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Esra YILDIZ

16.06.2021

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım ilk günden bu yana, bütün bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yanımda olan, hoşgörü ve anlayışı ile manevi desteğini de esirgemeyen çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Hüseyin AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yenilik ve farklılık katan görüşleri ile yanımda olan Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Hayrullah YAZAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşarak gelişmeme yardımcı olan Çanakkale Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet Ali BERBER'e, tez izleme komitemde yer alan ve görüş ve bilgileriyle bana destek olan Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ'a saygılarımı sunar ve teşekkür ederim. Deney aşamasında benden desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Hatice TUNCA'ya ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Öğretim Görevlisi Bekir ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Tez çalışmamda benden bilgi birikimini esirgemeyen ve bana vakit harcayarak yardımcı olan Sakarya Üniversite Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e çok teşekkür ederim.

Önce iş arkadaşım sonra hayat arkadaşım olan ve yaşadığım bütün süreçte her türlü maddi ve manevi destekte elinden geleni yapan Arş. Gör. Fehmi YILDIZ'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Beni hayata başladığım ilk günden bu yana destekleyen, her zorlukta yanımda olan canım aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (proje no: 2018-2-9-342) tarafından desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Sakarya Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karayemiş.....	4
2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem.....	10
2.2.1. Süperoksit dismutaz.....	12
2.2.2. Glutasyon peroksidaz.....	13
2.2.3. Malondialdehit.....	13
2.2.4. Tiyol/Disülfid dengesi.....	14
2.3. Genotoksisite ve Antigenotoksisite.....	15
2.3.1. Kromozomal anormallik testi.....	18
2.3.2. Mikronükleus testi.....	20
2.4. SOD ve GPx mRNA Ekspresyon Analizi.....	22
2.4.1. Ribonükleik asit (RNA).....	22
2.4.2. Komplementer DNA.....	23

2.4.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PCR)...	25
2.5. Çalışmanın Amacı.....	27
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Karayemiş ekstraktı.....	28
3.1.2. Periferal kan.....	28
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	29
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Kromozomal anormallik testi.....	30
3.2.1.1. Mitotik indeks hesaplaması ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi.....	31
3.2.2. Mikronükleus testi.....	32
3.2.2.1. Mikronükleus frekansı belirleme.....	33
3.2.3. Biyokimyasal analizler.....	33
3.2.3.1. Toplam protein tayini.....	34
3.2.3.2. Süperoksit dismutaz tayini.....	34
3.2.3.3. Glutatyon peroksidaz tayini.....	35
3.2.3.4. Malondialdehit tayini.....	35
3.2.3.5. Tiyol/disülfid homeostazı.....	36
3.2.3.6. Toplam Fenolik madde tayini.....	36
3.2.4. SOD ve GPx mRNA ekspresyon analizi.....	37
3.2.4.1. Total RNA izolasyonu.....	37
3.2.4.2. cDNA sentezi.....	38
3.2.4.3. Real-time PCR.....	39
3.2.5. İstatistiksel analiz.....	39
BÖLÜM 4:	
BULGULAR.....	41

4.1. Karayemiş Ekstraktının Genotoksik Etkisi.....	41
4.1.1. Kromozomal anormallik testi bulguları.....	41
4.1.2. Mikronükleus testi bulguları.....	54
4.2. Karayemiş Ekstraktının Antigenotoksik Etkisi.....	57
4.2.1. Kromozomal anormallik testi bulguları.....	57
4.2.2. Mikronükleus testi bulguları.....	66
4.3. Karayemiş Ekstraktının Antioksidan Etkisi.....	68
4.3.1. Toplam fenolik madde tayini.....	68
4.3.2. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit analiz sonuçları.....	68
4.3.3. Tiyol/Disülfid analiz sonuçları.....	71
4.3.4. SOD ve GPX mRNA ekspresyon analiz sonuçları.....	74
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA.....	76
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
BN	: Binükleat
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
C _t / C _q	: Eşik değeri döngüsü (Threshold cycle)
DD	: Disülfid
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Ds	: Disentrik
EDTA	: Etilen diamine tetraasetik asit
F	: Fragment
GPx	: Glutasyon peroksidaz
g	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
KA	: Kromozomal anormallik
KCl	: Potasyum klorür
Kkb	: Kardeş kromatidlerde birleşme
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
Ktd	: Kromatid değişimi
Ktk	: Kromatid kırığı

KYE	: Karayemiş ekstraktı
Kzk	: Kromozom kırığı
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
Mİ	: Mitotik indeks
mL	: Mililitre
MMC	: Mitomisin C
MN	: Mikronükleus
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MTX	: Methotrexate
N	: Normal
NTL	: Doğal tiyol
OTR	: Yükseltgenmiş tiyol oranı
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RTR	: İndirgenmiş tiyol oranı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TORR	: Tiyol yükseltgenme/indirgenme oranı
TTL	: Total tiyol

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Karayemiş meyvesi.....	5
Şekil 2.2. Oksidatif stres.....	11
Şekil 2.3. Süperoksit dismutaz reaksiyonu.....	12
Şekil 2.4. Glutatyon peroksidaz reaksiyonu.....	13
Şekil 2.5. Serbest radikaller ile oluşan lipit peroksidasyon ürünleri.....	14
Şekil 2.6. Tiyo/Disülfid homeostazı.....	15
Şekil 2.7. Binükleat hücrede mikronükleus oluşumu.....	21
Şekil 2.8. cDNA sentezi.....	24
Şekil 2.9. SYBR green ışınması.....	26
Şekil 2.10. Amplifikasyon eğrisi.....	27
Şekil 4.1. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromatid kırığı.....	43
Şekil 4.2. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromozom kırığı.....	43
Şekil 4.3. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen fragment.....	44
Şekil 4.4. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kardeş kromatidlerde birleşme.....	44
Şekil 4.5. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen disentrik kromozom.....	45
Şekil 4.6. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen kromatid kırığı.....	45
Şekil 4.7. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen kromozom kırığı.....	46
Şekil 4.8. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen fragment.....	46
Şekil 4.9. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen disentrik kromozom.....	47
Şekil 4.10. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi	48
Şekil 4.11. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi.....	48
Şekil 4.12. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı.....	49
Şekil 4.13. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında hücre başına düşen anormallik	49

sayısının doza bağı ilişkisi.....	
Şekil 4.14. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	50
Şekil 4.15. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında mitotik indeks yüzdesinin doza bağı ilişkisi.....	50
Şekil 4.16. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi	51
Şekil 4.17. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağı ilişkisi.....	51
Şekil 4.18. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı.....	52
Şekil 4.19. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayısının doza bağı ilişkisi.....	52
Şekil 4.20. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	53
Şekil 4.21. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında mitotik indeks yüzdesinin doza bağı ilişkisi.....	53
Şekil 4.22. KYE uygulaması ile oluşan bir adet mikronükleus.....	55
Şekil 4.23. KYE uygulaması ile oluşan iki adet mikronükleus.....	55
Şekil 4.24. KYE uygulamasında dozlara göre MN frekansı.....	56
Şekil 4.25. KYE uygulamasında mikronükleus yüzdesinin doza bağı ilişkisi.....	56
Şekil 4.26. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromatid değişimi ...	59
Şekil 4.27. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi.....	60
Şekil 4.28. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağı ilişkisi.....	60
Şekil 4.29. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı	61
Şekil 4.30. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında KA/Hücre oranının doza bağı ilişkisi.....	61
Şekil 4.31. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri.....	62
Şekil 4.32. PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında mitotik indeks değerinin doza bağı ilişkisi.....	62

Şekil 4.33. PK+KYE 'nın 48 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi.....	63
Şekil 4.34. PK+KYE 'nın 48 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi.....	63
Şekil 4.35. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı...	64
Şekil 4.36. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında KA/Hücre oranının doza bağlı ilişkisi.....	64
Şekil 4.37. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değeri.....	65
Şekil 4.38. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında mitotik indeks değerinin doza bağlı ilişkisi.....	65
Şekil 4.39. PK+KYE uygulamasında dozlara göre MN frekansı.....	67
Şekil 4.40. PK+KYE uygulamasında mikronükleus yüzdesinin doza bağlı ilişkisi..	67
Şekil 4.41. SOD geninin dozlara göre kat değişim grafiği.....	75

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile karayemiş meyvesinden elde edilen fenolik bileşikler.....	6
Tablo 3.1. Total RNA'dan cDNA sentezi için hazırlanan master karışımı.....	38
Tablo 3.2. Total RNA'dan cDNA sentezi için PCR döngüsü.....	38
Tablo 3.3. mRNA ekspresyonu için hazırlanan RT-PCR karışımı.....	39
Tablo 3.4. mRNA ekspresyonu için RT-PCR Döngüsü.....	39
Tablo 4.1. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde oluşturduğu kromozomal anormallikler ve mitotik indeks değeri.....	42
Tablo 4.2. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen mikronükleus frekansları..	54
Tablo 4.3. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde antigenotoksik ve antisitotoksik etkisi.....	58
Tablo 4.4. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde antigenotoksik etkisi mikronükleus sonuçları.....	66
Tablo 4.5. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit seviyeleri üzerine etkisi.....	69
Tablo 4.6. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda tiyol/disülfid homeostazı üzerine etkisi.....	72
Tablo 4.7. KYE'nin MMC'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı tiyol/disülfid homeostazına etkisi.....	73
Tablo 4.8. SOD geni mRNA'ların deney ve kontrol grupları arasındaki 2 -ΔCt ve kat değişimi.....	74

ÖZET

Anahtar kelimeler: *Laurocerasus officinalis*, Genotoksisite, Antioksidan, Kromozomal Anormallik, Mikronükleus, SOD, GPx, Tiyol/disülfid

Karayemiş (*Laurocerasus officinalis*) meyvesi özellikle ülkemizde Karadeniz bölgesinde yetişen ve halk tarafından şifalı olduğuna inanılan bir meyvedir. Bu çalışmada, tıbbi açıdan koruyucu ya da iyileştirici özelliği olabilecek bu meyvenin muhtemel genotoksik/antigenotoksik etkileri *in vitro* ortamda insan periferik kan lenfosit hücre kültürü yapılarak, kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri ile araştırılmıştır. Ayrıca mitotik indeks değerinin belirlenmesi ile sitotoksik ve antisitotoksik etkisi de yine araştırılmıştır. Diğer yandan, antioksidan özelliğini test etmek amacı ile süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) analizleri yapılmıştır. Bununla beraber, yine antioksidan sistem elemanı olan tiyol/disülfid homeostazına etkisi de test edilmiştir. Karayemiş meyvesinin antioksidan enzimlerin artışının moleküler düzeyde olup olmadığı da real time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. *In vitro* ortamdaki bütün testler için karayemiş ekstraktının (KYE) kullanılan dozları 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL ve bunlara ek olarak mitomisin C (MMC) ekli olan pozitif kontrollü dozlardır. Her iki uygulama periyodu için (24 ve 48 saat) dozlar ve pozitif kontrol (MMC), çözücü kontrol (metanol) ve negatif kontrol (su) grupları kullanılmıştır.

Kromozomal anormallik testi ve mikronükleus testinde, her iki periyotta da KYE'nin hiçbir dozunda çözücü kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Antigenotoksik aktivite analizi için yapılan, MMC ekli dozların hepsi pozitif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuç olarak, karayemiş meyvesinin lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etkili olmadığı, ayrıca MMC maddesinin oluşturduğu genotoksik hasarı önleyici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, mitotik indeks sonuçlarına bakılarak, karayemiş ekstraktının yüksek bir sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüş ve MMC'nin oluşturduğu sitotoksik etkiyi düşürmeye yönelik davranış sergilediği tespit edilmiştir. Bununla beraber, 48 saatlik KYE uygulamasının 500 µg/mL ve PK+ 500 µg/mL dozlarında SOD aktivitesi ile, ve 1000 µg/mL ve PK+1000 µg/mL dozlarında GPx aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. MDA analizinde ise, hiçbir doz uygulamasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ayrıca, PK+125 µg/mL ve PK+250 µg/mL dozlarında tiyol/disülfid dengesini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir. Moleküler çalışmaların sonucunda ise, karayemiş ekstraktının SOD mRNA düzeyinde herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF GENOTOXIC / ANTIGENOTOXIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF CHERRY LAUREL (*Laurocerasus officinalis* Roem.)

SUMMARY

Keywords: Cherry laurel, Genotoxicity, Antioxidant, Chromosomal anormality, Micronuclei, SOD, GPx

Cherry laurel, grown in Black Sea Region in Turkey, is a fruit believed to be healing effect for some diseases. In this study, genotoxic and antigenotoxic effect of cherry laurel was investigated, which could be protective and curative medically. Chromosomal anormality and micronuclei tests were applied with human peripheral blood lymphocyte cell culture *in vitro*. Also, mitotic index was calculated for understanding cytotoxic and anticytotoxic effect. Moreover, the value of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) were analyzed to detect antioxidant activity of extract by using the supernatant of lymphocyte culture. Futhermore, the effect of cherry laurel on thiol/disulfide homeostasis, an antioxidant system element, was added to this study. Cherry laurel has the ability of antioxidant enzyme activity. This increasing may be caused by enzyme activation or mRNA expresion rises. In this study, it was tested by real time PCR method whether cherry laurel increases the enzyme activity at the molecular level. The doses of cherry laurel were determined as 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL for *in vitro* study. For investigation of antigenotoxic and antioxidant effect, MMC (Mitomycin C) was added to all doses. In both application (24 and 48 h), all doses, positive control (MMC) and negative control (sterile water) were used.

In chromosomal anormality and micronuclei tests, there was no significant differences between all doses and solvent control group ($p > 0,05$). In antigenotoxic activity, doses added MMC were significantly lower than positive control ($p < 0,05$). As a result, cherry laurel extract has no genotoxic effect on human lymphocytes and also, has antigenotoxic and protective effect to damage of MMC. According to mitotic index result, there is not cytotoxic effect of cherry laurel extract; in fact, it has a little anticytotoxic effect. Moreover to these results, 500 µg/mL ve PK+ 500 µg/mL doses increases the SOD activity and 1000 µg/mL ve PK+1000 µg/mL GPx activity. There is no significant differences in MDA analyses. Also, positive effect was observed in thiol/disulfide homeostasis for PK+125 µg/mL ve PK+250 µg/mL doses. However, cherry laurel extract has no effect on rising SOD mRNA expression

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Türkiye birçok meyve türünün yetişebildiği ve bu açıdan geniş bir gen havuzuna sahip nadide ülkelerdendir. İklimine ve yöresine göre çok çeşitli ağaçların yetişmesine imkân veren verimli toprakları ile şifa kaynağı olabilen çoğu meyveyi barındırmaktadır. Farklı coğrafyada yaşayan insanlar, kendi beslenme kültürlerine göre ve o coğrafyaya özgü ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde besinlerini tercih ederler. Özellikle, alternatif tıp açısından faydalı olabilecek bitkiler, sadece yöre insanların değil, bilimsel araştırmacıların da odak noktası olmaya başlamıştır. Sentetik ilaçların zararları göz önünde bulundurulduğunda, bazı hastalıklarda koruyucu ve tedavi edici doğal ürünler üzerine yapılacak çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, modern tıpta kullanılan birçok ilacın hammaddesi doğal kaynaklı besinlerdir. Bu durum göz önüne alındığında, bitkisel ekstraktların biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi yeni ilaç geliştirme açısından çok önemlidir.

Alternatif tıp ve beslenme amaçlı kullanılan bir bitkinin, toksik açıdan profilinin değerlendirilmesi, o meyvenin hastalıklara faydasının bilinmesi kadar önem arz etmektedir. Bunun nedeni, ne kadar doğal olsa dahi her maddenin belli bir miktarından fazlasının organizma için toksik etki yaratmasıdır. Fazla alındığında suyun bile toksik olduğu düşünülürse, karayemiş gibi bazı hastalıklarda tedavi ve koruyucu amaçlı tüketilen tüm bitkilerin toksik açıdan değerlendirilmesi elzem bir durumdur. Genotoksikolojinin önemi, genetik materyalin göreceği zararı anlatması ve güven aralığı belirlemesi ile, tüm organizmayı ve bir sonraki kuşağa aktarılan bilgileri etkileyen genetik materyali korumasından gelir. Bu bakış açısı dikkate alındığında, fiziksel ve kimyasal bütün faktörlerin genotoksikolojik profilinin çıkarılması çok önemli bir katkıdır.

Oksidatif stres birçok hastalığın nedeni olabileceği gibi, hastalıkların patofizyolojisinde de ilerlemeyi tetikler. Bu sebepten, oksidatif stres ve antioksidanların hastalıklar ile ilişkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile araştırılmaktadır. Sentetik antioksidanların organizmaya zararlı olmasından ve başta kanser olmak üzere birçok hastalığın oluşmasına ya da tetiklenmesine sebep olmasından dolayı, insanlar doğal antioksidanlara yönelmiştir. Meyve ve sebzeler gibi bol miktarda antioksidan barındırdığı bilinen bitkilerin bu özelliğinin araştırılması bilim insanlarının odak noktası haline gelmiştir. Bu doğal antioksidanların araştırılması, sadece insan hastalıkları üzerine faydası olduğu için değil, gıda sanayinde saklama koşullarını iyileştirmek için de önemlidir (Lindley, 1998). Özellikle fenolik asit açısından zengin olan maddelerde antioksidan özellik de yüksek olduğu için, oksidatif stres kaynaklı semptomları azaltmakta kullanılabilirler. Doğal beslenme ile kardiovasküler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon, kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi birçok kronik hastalığın önüne geçildiği çalışmalar ile ispatlanmıştır (Marchand, 2002; Boer ve ark., 2004). Bunun en önemli nedeninin içerdiği fenolik asit bileşikleri olduğu düşünülmektedir. Geçmişte, doğal bir besinden elde edilen etken maddenin de beslenme ile aynı etkiye sebep olacağı kanısına varılmış ve etken maddenin sentetik yollarla eldesi için çabalanmıştır. Ama yapılan çalışmalar da göstermektedir ki, sadece etken madde değil, az oranda bile olsa diğer fenolik asitlerin tek başlarına ve birlikte reaksiyonları sonucu daha faydalı sonuçlara varılabilmektedir (He ve Giusti, 2010). Bu yüzden total bitki ekstraktını çalışmak da göz ardı edilmemesi gereken bir husustur. Bunun en güzel örneklerinden biri olabilecek karayemiş meyvesinin halk arasında bilinen faydaları, yapılan çalışmalar ile de ispat edilmiştir (Doğu, 2014; Yılmaz, 2014; Aydın ve ark., 2016).

Moleküler düzeyde araştırmalar, güncel bilim dünyasında büyük bir yer tutmaktadır. Moleküler biyoloji bilimi sayesinde, laboratuvar uygulamaları ile canlı yaşamına ışık tutulmaktadır. Canlılığın şifresi olarak tanımlanan genetik materyalin doğru bir şekilde analiz edilmesi ve tanımlanması, başta insan sağlığı olmak üzere, gıda ve tarım sektörü, çevre bilimi, eczacılık gibi birçok alanda fayda sağlar. Bir genin analizi, o genden oluşan RNA'ya ve RNA'dan oluşan protein ve enzimlere kadar uzun bir yolculuğun haritasını önümüze sermektedir. Bu bağlamda, hastalıkların

moleküler temelinin bilinmesi hem sebep ve sonuç açısından hem de doğru tedaviyi belirlemek açısından önemli bir hale gelmiştir. Özellikle son yıllarda moleküler çalışmalarda RNA molekülüne ilgi artmıştır. Bunun sebebi, DNA'dan yazılan RNA molekülünün, bu işlemde sonra birçok değişikliğe uğraması, ekspresyonun artması ya da azalması, oluşturacağı protein ya da enzim yapısını ve bağlantılı olarak da görevli olduğu sistemi direkt olarak etkilemesidir. Sadece mesajcı RNA değil, translasyonu gerçekleştirilmeyen RNA'ların bile birçok hastalıkla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Lu ve ark., 2008; Jansson ve Lund, 2012). Bu bağlamda, moleküler çalışmaların RNA düzeyinde devam etmesi bilim dünyasının literatürüne önemli bir katkı sağlamaktadır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karayemiş

Karayemiş Spermatopyta şubesi, Magnoliatae sınıfı, Rosaceae familyası, Laurocerasus Duhamel. cinsine ait bir tür ağaçtır. Bilimsel adı *Laurocerasus officinalis* Roem. (syn: *Prunus laurocerasus* L.) olan karayemiş, Türkiye’de genelde Doğu Karadeniz Bölgesi’nde deniz seviyesinden 20 ile 1700 metre arasındaki yükseklikte yetişir. Nadir de olsa Hatay ve Balıkesir bölgelerinde de görülür. Dünya genelinde ise, Balkanlarda, Kuzey İrlanda’da, Batı Avrupa’da, Kafkaslarda, İran’da ve bazı Akdeniz ülkelerinde yayılım göstermektedir. Dört mevsim yeşil olması ve yüksek eğimli alanlarda da yetişebilmesi sebebiyle, rüzgâr kırıcı olarak ve toprak kaymasına karşı önlem için de yetiştirilmektedir. Bu faydalarının yanı sıra Karadeniz Bölgesi’nde daha çok meyvesi için yetiştirilen karayemiş, dünya genelinde park ve bahçelerde kullanılan önemli bir süs bitkisidir (Zeybek, 1960; Özbek, 1978; Anşin ve Özkan, 1993; İslam, 2005).

Karayemiş ağacının yabani tiplerinde boyu 6 metre civarında olurken, kültür tiplerinde 20 metreye kadar uzayabilmektedir. Meyveleri yaklaşık 8 mm çapında olan ve küme halinde bulunan karayemişin, kabuk kısmı olgunlaştığında koyu mor siyaha yakın bir renk alır ve etli kısmı açık pembe beyaz arası bir renge dönüşür. Kültür tipinde olan karayemişlerin hem yaprak boyutu daha geniş hem de meyveleri daha iridir (Bostan ve İslam, 1996). Ülkemizde çok yaygın olarak tanınmayan karayemişin meyveleri, yaş ve kuru olarak tüketildiği gibi pekmez de yapılmaktadır (Şekil 2.1.). Yabani olarak yetişen karayemiş meyvelerinin tadı genelde buruktur. Bunun yerine daha büyük ve tatlı meyveler elde edildiği için aşılama yöntemiyle yetiştirilen karayemiş tercih edilmektedir (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991; Ayaz ve ark., 1997a; Kolaylı ve ark., 2003). Karadeniz Bölgesi’nin farklı yörelerinde çeşitli isimler alan karayemiş, Rize’de Laz Kirazı, Ordu’da Taflan olarak

adlandırılmaktadır. Yaprağı ve çekirdeğinden de çeşitli alanlarda faydalanılan karayemiş, en çok meyvesi için yetiştirilmektedir.



Şekil 2.1. Karayemiş Meyvesi

Karayemiş özellikle Karadeniz Bölgesi'nde etnofarmakolojik açıdan çok önemli bir meyvedir. Karayemişin en bilinen faydası diyabet üzerinedir. Halk arasında şeker düzenleyici olarak yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Sindirimi kolay olan karayemiş aynı zamanda uzun süre tok tutma özelliğine sahiptir. Ülser, hemoroit, bağırsak tembelliği gibi birçok gastrointestinal rahatsızlığa karşı koruyucu ve iyileştirici etkisi mevcuttur. Ayrıca özütü egzama gibi cilt hastalıklarında kullanılır. Bunların yanı sıra, diüretik özelliği olduğu da bilinmektedir (Özbek, 1952; Güven ve Geçgil, 1961; Milan, 1984; Çubukçu, 1989; Baytop, 1989). İçerisinde siyanhidrik asit bulunmasından dolayı, ağaç yapraklarının demlenerek içilmesinin bronşit, öksürük ve bulantı gibi rahatsızlıklara iyi geldiği düşünülmektedir (İslam, 2002; Karadeniz ve ark., 2004; İslam, 2005). Yine halk arasındaki inanca göre, böbrek taşının düşmesinde yardımcı olduğu ve idrar söktürme özeliği sayesinde ödem atmaya yaradığı düşünülmektedir. Analjezik, antispazmatik, yatıştırıcı ve uyku düzenleyici etkileri mevcuttur. Yüksek antioksidan özelliği sayesinde, oksidatif stresin neden olduğu ya da patafizyolojisinde etkili olduğu bütün hastalıklarda olduğu gibi, kalp rahatsızlıkları, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkisi olduğuna inanılmaktadır (Yeşilada ve ark., 1999; Baytop, 2001; Kolaylı ve ark., 2003).

Karayemiş meyvesinin kimyasal ve biyokimyasal incelenmesi yapılmış ve magnezyum, sodyum, potasyum, mangan, kalsiyum, demir, bakır, çinko gibi mineralleri yüksek oranda içerdiği ortaya çıkmıştır. Bu meyve sadece mineral açısından değil protein, karbonhidrat, askorbik asit ve fenolik bileşikler açısından da çok zengin bir besin kaynağıdır. Karayemişin şeker içeriğini ise fruktoz, glukoz ve sorbitol gibi kaynaklar oluşturmaktadır (Ayaz ve ark., 1997a; Ayaz ve ark., 1997b). En yüksek oranda içerdiği şekerin ise fruktoz ve glukoz olduğu ortaya çıkmıştır (Yazıcı ve ark., 2011).

Karayemiş meyvesinin fenolik bileşik içeriğine bakıldığında ise, en yüksek oranda klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir (Karabegovic ve ark., 2014). Klasik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan karayemiş ekstraktının içindeki fenolik maddeler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile karayemiş meyvesinden elde edilen fenolik bileşikler (Karabegović ve ark., 2014)

Fenolik Bileşik	mg/g
Klorojenik asit	35,17
Vanilik asit	1,58
Kafeik asit	1,12
Rutin	0,82

Ayrıca, yüksek oranda malik asit ile birlikte, hidroksi benzoik asit, antosiyanin, kumarik asit, siyanidin glikozit, sitrik asit ve kateşinler gibi diğer fenolik birleşikler de karayemiş meyvesinde bulunmaktadır (Ayaz ve ark., 1997a; Ayaz ve ark., 1997b). Fenolik bileşikler, benzen halkasına bağlı hidroksil grubundan oluşan ve genelde bitkilere koku, renk ve tat vermeye yarayan bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde bulunan güçlü antioksidan kaynaklarıdır (Rice-Evans ve ark., 1996) ve antioksidan özellikleri içerdikleri hidroksil grubu sayısına ve nereye bağlandığına göre çeşitlilik göstermektedir (Sroka ve Cisowski, 2003). Karayemiş meyvesinde bol miktarda fenolik bileşik bulunması, meyvenin güçlü antioksidan özelliğe sahip olmasına neden olmaktadır. Karayemiş meyvesine yapılan yağ analizinde sonuç olarak insan sağlığı açısından çok önemli olan linoleik asit miktarının çok yüksek olduğu belirtilmiştir.

Aynı zamanda, oleik asit, palmitik asit ve stearik asit gibi diğer önemli yağ asitlerine de daha az oranlarda rastlanmıştır (Ayaz ve ark., 1997a; Ayaz ve ark., 1997b).

Alternatif tıp açısından önemli bir değere sahip olduğu düşünülen karayemiş bitkisinin hem ağacı hem de meyveleri üzerine birçok çalışma mevcuttur. Karayemiş meyvesinin mineral ve fizikokimyasal içeriği ile ilgili yapılan bir çalışmada, yoğun miktarda bulunan mineralin potasyum olduğu, ondan sonra sırasıyla kalsiyum, fosfor, sodyum, demir, bakır ve çinko geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, protein miktarının %0,29, lif miktarının %6,63 ve yağ miktarının %0,001 olduğu bulunmuştur (Kalyoncu ve ark., 2013).

Karayemiş meyve çekirdeğinin yağ asiti içeriği üzerine yapılan bir çalışmada ise, yüksek oranda oleik asit (%72,92) ve daha sonra palmitik asit, linoleik asit, elaidik asit, araşidik asit tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan antioksidan aktivite testlerine göre, karayemiş meyve çekirdeğinin güçlü bir antioksidan olduğu ortaya çıkmıştır (Genç, 2009). Karayemiş meyvesinde en yüksek oranda bulunan yağ asiti linoleik asit olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada karayemiş meyvesinin antioksidan özelliği ölçülmüş, bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA)'dan bile yüksek olduğu bulunmuştur (Halilova ve Ercişli, 2010).

Olgun karayemiş meyveleri üzerinde yapılan bir çalışmada, vanilik asitin en yüksek oranda bulunan fenolik asit olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karayemişin doymamış yağ asileri içerisinde en yüksek oranda linoleik asit içerdiği belirlenmiştir (Yazıcı ve ark., 2011).

Karayemiş meyvesi ile yapılan pekmezde fenolik asit ve antioksidan aktivitesi arasındaki ilişki araştırılmış ve fenolik madde miktarı arttıkça antioksidan özelliğinin de buna bağlı olarak arttığı kanısına varılmıştır (Alaşalvar ve Shadidi, 2005; Liyana-Pathirana ve ark., 2006).

Karayemiş meyvesi, yaprak ve çekirdekleri ile yapılan bir çalışmada, en yüksek antioksidan özelliğe sahip olan kısmın yaprağı olduğu ve farklı hasat dönemlerine

göre fenolik madde miktarında ve antioksidan kapasitesinde ciddi değişimler olmadığı sonucuna varılmıştır (Engin, 2007).

Karayemişin yaygın kullanım alanı ve sağlık açısından önemli etkileri olması, yüksek antioksidan etkileri ve zengin besin içeriği bu bitkinin üzerinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmasına yönlendirmiştir. Doğu (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabet olan sıçanlar üzerinde karayemiş meyve ekstraktının oksidan-antioksidan sisteme etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu sıçanlar ile kontrol grubuna karayemiş ekstraktı verilen sıçanlar karşılaştırıldığında, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), serum insülin, paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin karayemiş ekstraktı verilen sıçanlarda anlamlı bir şekilde yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Bunun yanı sıra, aynı iki grupta yine karayemiş ekstraktı ile muamele edilen gruptaki sıçanların kan glukoz, kan trigliserit ve malondialdehit düzeylerinde azalma görülmüştür. Bu çalışmada, diyabet olan sıçanlara karayemiş ekstraktı ve diyabete karşı ilaç olarak kullanılan metformin verilmiş gruplar oluşturulmuştur. Yine karayemiş ekstraktı verilmiş olan sıçanlarda GPx ve SOD aktivitelerinde artma ve trigliserit düzeyinde anlamlı azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak, karayemişin tek başına ya da metformin ile diyabetik sıçanlara verildiğinde antioksidan, antihiperlipidemik ve antihiperglisemik etkilerinin olduğu ve diyabetik hastalarda kullanılmasının oksidatif stresi azaltacağı ve kan şekerini düşürerek tedaviye yardımcı olabileceği kanısına varılmıştır (Doğu, 2014). Karayemişin diyabet üzerinde etkili olduğunu gösteren başka bir çalışmada ise, karayemiş ekstraktı uygulanan diyabetik sıçanlarda, beta hücreleri uyarıldığı ve pankreas salgısı artarak, kandaki insülin miktarının yükseldiği gözlemlenmiştir (Şenaylı ve ark., 2012). Yine fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, karayemiş ekstraktının hipoglisemik farelere verildiğinde, kan şekerini yükselttiği ve aynı zamanda da beslemeden sonra yükselen kan şekerini normal seviyeye düşürdüğü tespit edilmiştir. Bunun sonucunda karayemişin antidiyabetik ajan olarak kullanımının hem hiperglisemik hem de hipoglisemik hastalar üzerinde olumlu etkiye sahip olabileceği sonucuna varılmıştır (Turan ve ark., 2013).

Fareler üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada, karayemiş (*Laurocerasus officinalis*) taze yapraklarının ekstraktından izole edilen bileşenlerinin ağrıya ve iltihaplanmaya karşı olan etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda ekstraktın gözle görülür şekilde anti-inflamatuar ve ağrıyı engelleyici etkisi olduğu görülmüştür (Erdemoğlu ve ark., 2003; Akkol ve ark., 2012).

Karayemiş yüksek polifenol içerdiği bilinen bir meyve olmasından dolayı üzerinde antibakteriyel çalışmalar da yapılmıştır. Karayemişte toplam fenolik asit miktarı 1124,91 mg gallik asit/100 g olarak bulunmuştur. *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella Enteritidis* bakteri suşlarına karayemiş ile muamele edilmiş ve sonuç olarak bakteri büyümesinin durduğu gözlenmiştir. Ancak bu antibakteriyel etkinin gram negatif bakteriler üzerinde, bakteriyosidal etkiden ziyade bakteriyostatik etki olduğu kanısına varılmıştır (Kılmanoğlu, 2010).

Karayemiş meyve ekstraktının üreme sistemi üzerinde etkisinin araştırıldığı bir *in vivo* çalışmada, karayemiş meyvesinden su ile ekstrakt hazırlanmış, testislerine Methotrexate (MTX) maddesi ile hasar verilen erkek sıçanlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada kontrol, sadece karayemiş ekstraktı verilen, MTX verilen ve MTX ile birlikte karayemiş ekstraktı verilen 4 grup oluşturulmuştur. Karayemiş ekstraktı 5 gün süre ile uygulamış ve sürenin sonunda testisler çıkarılarak analizi yapılmıştır. Bunun yanı sıra plazma süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) gibi önemli oksidatif stres parametreleri de incelenmiştir. Sonuç olarak, karayemiş ekstraktı uygulanan sıçanların sperm hareketliliğinde anlamlı derecede artma ve SOD, MDA gibi parametrelerde anlamlı derecede azalma olduğu belirlenmiştir (Yılmaz, 2014).

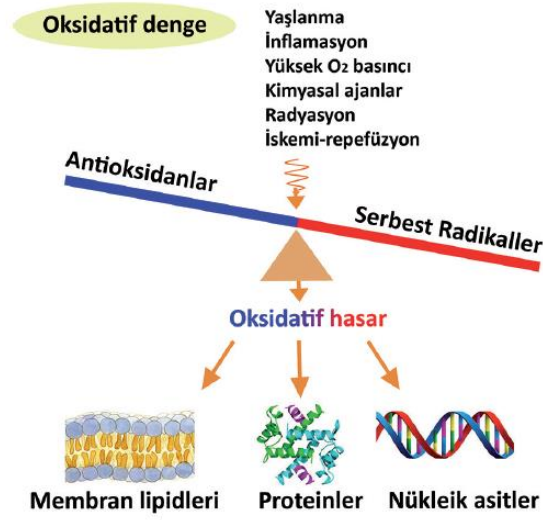
Karayemiş meyvesinin antioksidan aktivitesinin yüksek olması, bu meyvenin kanserli dokular üzerinde olumlu etkiye sahip olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Meyvenin su ile yapılan ekstraktının, etkisi HT29 (İnsan kolon kanser hücreleri), HeLa (İnsan rahim kanser hücreleri), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitelyum) ve C6 (Sıçan beyin tümörü) kanser hücre hatlarına karşı araştırılmış ve az miktarda antiproliferatif etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Aydın ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada ise, karayemişin meyve ve yaprak ekstraktının nöroprotektif etkisi kolinesteraz enzim inhibisyonu vasıtasıyla test edilmiş ve bir dereceye kadar nöroprotektif etkisi olduğu tespit edilmiştir (Orhan ve ark., 2011).

2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Oksijenli solunum yaparak enerji üreten her canlı solunum sırasında havadaki ya da sudaki oksijeni elektron taşıma sisteminden geçirerek kullanır. Oksijen molekülü yapısı gereği, tam indirgenmemiş oksijen metabolitleri olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaya yatkındır. Başlıca ROS'lar arasında sayabileceğimiz moleküller, olağan oksijen mekanizmasında oluşan süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit iyonlarıdır. Süperoksit radikali oksijen molekülünün bir elektron alması sonucu oluşan ve sonrasında hidrojen peroksite dönüşen önemli bir serbest radikaldir. Hidrojen peroksitin oluşumu süperoksit radikalinin, süperoksit dismutaz enzimi ile reaksiyonu sonucunda oluşur. Hidrojen peroksit ise demir gibi metallerin mevcudiyetinde Fenton reaksiyonuna girerek hidroksil radikalini oluşturur. ROS'lar belli bir seviyenin üstünde olduğunda ciddi zararlara yol açabilirler. Organizmalarda, fazla serbest radikal oluşumunu engellemek için, radikalleri nötralize ederek bu seviyenin altında kalmasını sağlayan sisteme, antioksidan mekanizma denir. Yani organizmada serbest radikallerin oluşumu ve bunların sistem tarafından yok edilmesi arasında bir denge mevcuttur. Bu denge bozulup, serbest radikallerin artması yönünde kaydığında ise oksidatif stres denen olay gerçekleşir. Özetle, oksidatif stres, hücre metabolizma sonucunda oluşan serbest radikallerin artması ve organizmada bu radikalleri detoksifiye eden antioksidan sistemin yetersiz kalması olarak tanımlanabilir. Organizmada oksidatif stresin oluşması ile hücre membranları, nükleik asit, lipid, protein ve enzimler gibi birçok yapı tehlike altına girer (Şekil 2.2.). Serbest radikaller, başta hücre membranındaki lipidlerin çift bağları olmak üzere, proteinlerin ve nükleik asitlerin bağlarına saldırırlar. Hücre içinde makromoleküllerin çift bağlarından hidrojen atomu koparak oksidasyon reaksiyonu gerçekleşmesi hücre ölümüne kadar giden bir süreci başlatmış olur. Lipidler başta olmak üzere makromoleküllerin yıkımı ile oluşan malondialdehit artışı organizmanın doku ve sıvılarında tespit edilerek, oksidatif stres ölçülebilir (Özcan ve ark., 2015).

Organizmada oksidatif stres arttığında ve antioksidan sistem bunu tolere etmeye yetiemediğinde başta Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere, ateroskleroz, diyabet, romatid artrit gibi iltihaplı hastalıklar, hipertansiyon ve kanser gibi daha birçok hastalığın patafizyolojisinde ilerlemeler görülür. Bu hastalıklar geliştiğinde oksidatif stres artacağı gibi, artan oksidatif stres de bu hastalıkların ilerlemesini tetikler.



Şekil 2.2. Oksidatif stres (Özcan ve ark., 2015)

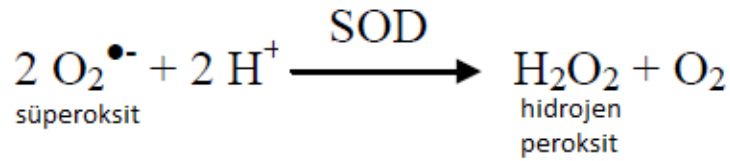
Ancak serbest radikaller her zaman zararlı değildirler. Zararlı mikroorganizmaların fagositozla yok edilmesi ve nöronlarda sinir iletimi gibi organizmada gerçekleşmesi elzem birçok olayda rol alırlar. Antioksidan sistem serbest radikallerin artışını engelleyemediği ve oksidatif stresin arttığı durumlar tehlike olarak düşünülebilir (Halliwell, 1991; Akkuş, 1995; Dawn, 1996). Bu yüzden birçok hastalığın araştırılmasında, oksidatif stres markerleri önem kazanmış ve ayrıca hastalık iyileşmesinde de antioksidan sistemi destekleyecek olan maddeler çalışmaların odak noktası olmuştur.

Antioksidanlar, serbest radikallere bir hidrojen vererek ya da radikallerden elektron çalarak daha az etkili moleküllere çevirebilirler. Ayrıca serbest radikallerin zincirlerini kırarak da yine onları zararsız hale dönüştürebilirler. Organizmadaki antioksidan görevi üstlenen moleküller ya organizma içinde var olan (endojen kaynaklı) ya da dışarıdan beslenme yoluyla alınan (eksojen kaynaklı) maddeler

olabilirler. Endojen kaynaklı olan antioksidanların başında enzimler gelmektedir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, katalaz gibi enzimler bu grupta sayılabilirler. Aynı zamanda, glutatyon, sistein, hemoglobin, bilirubin ve melatonin gibi enzim olmayan endojen kaynaklı antioksidanlar da yine sistemde önemli göreve sahiptir. Eksojen antioksidanlar ise, vitamin E, vitamin C, karoten gibi vitaminler ve ilaç kaynaklı olan bazı inhibitörlerdir (Halliwell, 1991; Akkuş, 1995).

2.2.1. Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksit iyonunu daha az radikal olan hidrojen peroksit iyonuna dönüştüren önemli bir enzimdir (Şekil 2.3.). Süperoksit dismutaz enziminin azlığında antioksidan sistem büyük zarara uğrar. İnsanda iki tip SOD enzimi bulunur: Sitoplâzmadaki bulunan ve bakır- çinko içeren Cu-Zn SOD ve mitokondride bulunan ve mangan içeren Mn SOD. Genelde kanda en çok görülen ve analizi yapılarak aktivitesi hakkında bilgi edinilen SOD bakır çinko içerikli olandır.

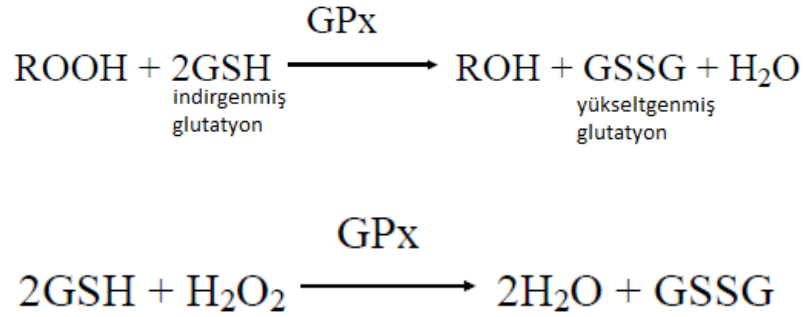


Şekil 2.3. Süperoksit dismutaz reaksiyonu

Süperoksit radikali, lipid peroksidasyonuna sebep olan bir radikaldir. Lipidler, serbest radikallere karşı en hassas yapılardandır. Özellikle hücre zarının yapısında bulunan kolestrolün ve doymamış yağ asitlerinin, bazı hormonların yapısında bulunan steroidlerin yapısı, serbest radikallerle karşılaştığında kolayca ve zincirleme bir şekilde bozulur. SOD enzimi, süperoksit iyonunun yapısını değiştirerek, lipid peroksidasyonunun önüne geçmiş olur. İntrasellüler aktivitesi çok yüksek olan SOD enzimi hemen hemen her dokuda bulunmasının yanı sıra, oksijenli reaksiyonların yoğun gerçekleştiği hücrelerde fazlaca bulunur (Akkuş, 1995).

2.2.2. Glutasyon peroksidaz

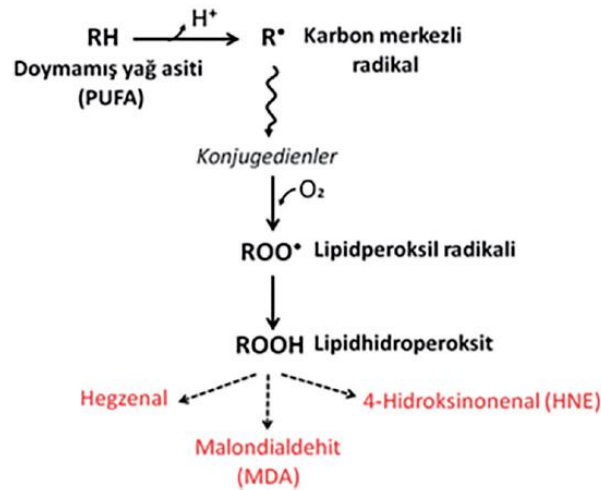
Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi, dört adet selenyum içeren tetramerik yapıda, hücre içinde hidroperoksitlerin ortadan kaldırılmasında rol oynayan önemli bir antioksidan enzimdir (Şekil 2.4.). Böylece hidrojen peroksitin hemoglobin ile reaksiyonunu ve methemoglobin oluşumunun önüne geçmiş olur (Armstrong, 1998; Kalaycıoğlu ve ark., 1998). GPx enzimi, E vitamini ile benzer göreve sahiptir ve yoksunluğunda bu vitaminin yerine hücre zarını koruma görevini üstlenir (Brigelius ve Traber, 1999). Glutasyon peroksidaz enzimi glutasyonu kofaktör olarak kullanarak, lipid peroksitleri daha az zararlı olan yağ asitlerine dönüştürür (Bukan, 1999). GPx enzimi kan hücrelerinde en etkili olan antioksidan enzimdir (Akkuş, 1995).



Şekil 2.4. Glutasyon peroksidaz reaksiyonu

2.2.3. Malondialdehit

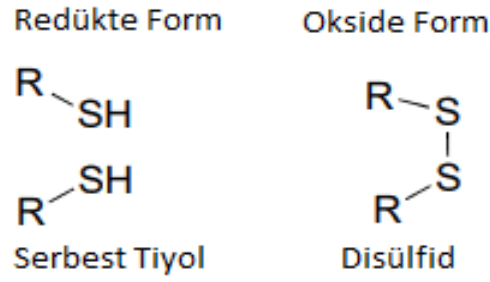
Malondialdehit (MDA) molekülü, serbest radikallerin poliansature yağ asitleri üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarın bir ürünüdür. Özellikle biyolojik membranlarda bulunan yağ asitleri hidrojen atomunun koparılmasına müsait bir yapıdadır. Oksidatif stres durumunda, antioksidan sistem yeterli kalmadığı zaman poliansature yağ asitlerinde lipid peroksidasyonu reaksiyonu başlar (Kanner ve ark., 1987). Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürünler malondialdehit, hegzenal ve 4-Hidroksinonenal (HNE) olarak adlandırılan lipid peroksitleridir (Şekil 2.5.). Bu ürünlerden MDA vücut sıvılarından spektrofotometrik metotla okunarak oksidatif stres hakkında bilgi verir (Esterbauer ve Cheeseman., 1990).



Şekil 2.5. Serbest radikaller ile oluşan lipid peroksidasyon ürünleri (Özcan ve ark., 2015)

2.2.4. Tiyol/disülfid dengesi

Tiyol/disülfid homeostazı, vücutta oksidan/antioksidan dengesinin kurulmasında önemli bir parametredir. Merkaptanlar olarak da bilinen tiyoller, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidanlar arasında sayılabilir. Tiyol molekülü, bir sülfhidril grubuna (- SH) bağlı karbon atomundan oluşan ve oksidatif stres anında tampon görevi üstlenen organik moleküllerdir (Cremers ve Jakob, 2013). Plazmadaki tiyol havuzunun büyük bir kısmını albumin tiyoller ve protein tiyoller, az oranda da sistein gibi proteinler oluşturur (Jones ve Liang, 2009). Organizmada oluşan reaktif oksijen kaynakları (ROS), proteinleri hedef alarak hasara neden olurlar (Topcuoglu ve ark., 2017). Ortamdaki serbest radikaller arttığında, tiyol molekülleri arasında sülfhidril grupları sayesinde kovalent disülfid köprüleri oluşur. Bu durumda, vücutta oksidatif stres anında doğal antioksidan kaynağı olan tiyoller azalırken, disülfid bağları artmış olur. Ancak oksidatif stres tersine döndüğünde, geri dönüşümlü olan disülfid köprüleri azalarak, tiyol grupları tekrar serbest hale gelirler. Oksidatif stres anında denge disülfid yönünde kayıp, tiyoller azalırken, ROS miktarı düşüp stres azaldığında bu denge tiyol yönüne kayarak tekrar organizmada serbest tiyoller artar. Organizmadaki oksidan/antoksidan dengesinin kurulmasındaki bu tiyol ve disülfid dönüşümlerine tiyol/disülfid homeostazı denir (Sen ve Packer, 2000; Jones ve Liang, 2009) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Tiyol/Disülfid Homeostazı

Önemli bir antioksidan sistemi olan tiyol/disülfid homeostazı, enzim aktivitesi regülasyonu, detoksifikasyon, protein yapılarının stabilizasyonu ve regülasyonu, apoptoz ve hücre sinyal mekanizması gibi kritik olaylarda rol oynamaktadır (Circu ve Aw, 2010; Matteucci ve Giampietro, 2010).

Antioksidan mekanizma ile yakından ilişkili olan tiyol/disülfid homeostazındaki bazı bozukluklar tip 1 diyabet, hipertansiyon, kalp hastalıkları ve iltihaplı barsak hastalıkları gibi birçok hastalığın patojenitesinde rol oynadığı ve bir indikatör olabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca diyabet gibi dejeneratif hastalıklarda denge disülfid yönünde kayarken, kanser gibi proliferatif hastalıklarda disülfid değerinin anlamlı azaldığı tespit edilmiştir (Kundi ve ark., 2015; Erkuş ve ark., 2015; Yuvacı ve ark., 2016; Yüksel ve ark., 2016; Dirican ve ark., 2016).

2.3. Genotoksisite ve Antigenotoksisite

Genetik toksikoloji, bir organizmanın biyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarını yerine getirirken veya dışarıdan kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanlara bağlı olarak, genetik materyalde meydana gelen hasarları ve sebeplerini inceleyen bir bilim dalıdır. Toksikoloji biliminin alt dalında yer alan genotoksisite, genlere karşı toksik olabilecek her türlü alanla doğrudan ilişkilidir (Young, 2002). Genotoksisite bu tanıma bağlı olarak, moleküler materyal ile ilgili olan, kromozom, DNA ve çekirdek yapısında oluşabilecek tüm değişiklikleri kapsayan bir kavramdır. Bu değişiklikler arasında, kromozom kırıkları, DNA kırıkları, kromozom anormallikleri, çekirdekteki

bozukluklar, anöploidi, klastojenite ve anojenite sayılabilir. Genotoksik etki ise, herhangi bir etkenin (kimyasal, biyolojik veya fiziksel) DNA, kromozom ve genomun yapısında mutasyon sonucu hasar meydana getirmesi olarak tanımlanabilir (Choy, 2001; Young, 2002). DNA yapısında mutasyonlara yol açan genotoksik ajanlar, direk olarak DNA yapısına saldırarak etki gösterebildiği gibi, DNA'nın yakından ilişkili olduğu enzim ve proteinlere bağlanarak da hasar verebilirler (Kirsch-Volders ve ark., 2003). Bu hasarların bir kısmı tamir mekanizmaları ile onarılarak tolere edilebilirken, bir kısmı onarılamaz ve organizmaya zarar verir.

Kanser etken maddeler üzerinde yapılan genotoksisite çalışmaları ile karsinojen olan çoğu maddenin aynı zamanda genotoksik olduğu ve moleküler materyal üzerinde ciddi hasarlara yol açtığı bilinmektedir. Çağımızın çözülemeyen ve gittikçe yaygınlaşan ciddi bir hastalığı olan kanser, her yaşta ve cinsiyette insanları tehdit etmektedir. Bu bağlamda, kansere sebep olan her türlü etkenin de araştırılması ve sebeplerin bulunması doğrultusunda sonuç ve çözüme gidilmesi çok mühim bir mevzudur. İlaç sektörü, gıda sanayi, kozmetik, konfeksiyon gibi daha sayılabilecek birçok alanda kullanılan her türlü maddenin kanser etkinliğini anlamak üzere genotoksik testlerden geçmesi büyük önem arz etmektedir. Genotoksisite testlerinin kimyasalların karsinojenik potansiyelleri ve kanser riskini değerlendirmesi açısından bilim insanlarının odak noktası haline gelmiştir (Zeiger, 1998; Choy, 2001).

Genlerde meydana gelen herhangi bir hasarın bütün organizmayı etkilemesi, uzun yıllardan beri genotoksik ajanlara olan ilgiyi arttırmıştır. 1970'li yıllardan günümüze kadar *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiş ve maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkilerini değerlendiren çalışmalar yapılmıştır (Zeiger, 1998; Bedir ve ark., 2004). Genotoksisite testleri sayesinde, mutajenlerin ve karsinojenik maddelerin potansiyelleri tanımlanır ve insan ve diğer organizmaların bu maddelerle belli dozlarda maruziyetini engellenmiş olur.

Genotoksisite testlerinin önemli kullanım alanlarından biri, ilaç geliştirmedir. İlaçlar piyasaya sürülmeden önce genotoksik açıdan güvenilirlik testine tabi tutulmalıdır. Ayrıca ilaç kullanılmaya başlandıktan sonrada oluşabilecek genetik hasarın tespiti ve

bunun akabinde kanser riskini belirlemede genotoksik testler rol oynar. Genotoksisite testleri ilaçlarda etken dozun genler açısından güvenilirliğini belirlemesinin yanı sıra, bazı hastalıklarda da artan moleküler materyal bozuklukları da tespit etmek amacıyla kullanılır. Yine genotoksisite testleri, UV gibi çeşitli ışınların, nanomateryallerin, gıda katkı maddelerinin, pestisitlerin ve temizlik maddelerinin insan ve diğer organizmalar açısından hangi dozlarda zararlı olabileceğini belirlemede önemli bir basamaktır (Preston, 1981; Brusick, 1987; Mateuca ve ark., 2006).

Antigenotoksisite herhangi bir fiziksel veya kimyasal etkenin, genotoksik bir ajana karşı koruyuculuğunun test edilmesidir. Genotoksisite testleri ile benzer metotlar kullanılır. Başta kanser olmak üzere, birçok hastalığa neden olan genotoksik maddelerin zararlı etkilerinin engellenmesi de bu maddelerin tespit edilmesi kadar önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, karayemiş meyvesinden elde edilen ekstraktın genotoksik ve antigenotoksik profili incelenmiştir. Günümüzde, doğal kaynaklı ürünlerin kimyasallardan daha az toksik olması ve hatta bir kısmının kimyasalların verdiği toksik etkilere karşı koruyucu görev alması, bitkisel ekstraktlara olan ilgiyi gün geçtikçe arttırmaktadır. Ayrıca bir maddenin doğal olması demek zararsız olduğu anlamına gelmemektedir. Bundan dolayı, bitkisel ürünlerin de hem genotoksik hem de antigenotoksik çalışmaların yapılması elzemdir. Yapılan bazı çalışmalarda, aflatoksin genotoksik ajanının neden olduğu hasar üzerine A, C ve E gibi vitaminlerin, yağ asitlerinin, flavonoidlerin ve fenolik asitlerin antigenotoksik etkileri mevcut olduğu ve bunların bitkisel kaynaklı ekstraktlar ile kolayca elde edilebileceği belirtilmiştir (Badr ve ark., 1998; Ahmad ve ark., 2002; Avani ve Rao, 2007). Yine literatürde bulunan bilgilere göre, bazı mantar, liken ve alg türlerinin de antigenotoksik profili ispat edilmiştir (Zeytinoğlu ve ark., 2004; Geyikoğlu ve Türkez, 2006; Kotan ve ark., 2011). Karayemiş meyvesinin akrabası sayılabilecek kiraz meyvesinin sapından elde edilen ekstraktın insan lenfosit hücreleri üzerinde antigenotoksik ve antisitotoksik etkisi araştırılmıştır. Mitomisin C'nin sebep olduğu sitotoksik ve genotoksik hasara karşı olumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Berber ve ark., 2017).

Bilimsel çalışmalarda genotoksisite ve antigenotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan *in vivo* ve *in vitro* testler mevcuttur. Bu testler içinde en yaygın kullanılan Ames testi, Komet (tek hücre jel elektroforezi) testi, kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozomal anormallik (KA) testi ve mikronükleus (MN) testidir. Bu çalışmada, genotoksisite ve antigenotoksisite profillerinin belirlenmesinde kromozomal anormallik testi ve mikronükleus testi kullanılmıştır.

2.3.1. Kromozomal anormallik testi

Kromozomal anormallik (KA) testi genotoksik profilin belirlenmesinde kullanılan en yaygın metotlardan birisidir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda kullanılabilir. Genotoksik ajanlar tarafından indüklenen kromozom kırıkları gibi yapısal ve endopoliploidi gibi sayısal kromozomal anormalliklerin saptanmasında kromozomal anormallik testi önemli bir metottur. Kromozomlardaki anormallikler, genetik materyal olan DNA molekülünde meydana gelen kırılma gibi bir hasarın onarılmaması ile, kromozomda görülen anormalliklerdir. DNA'da oluşan bu kromozomal anormaliteye sahip hücre frekansının yükselmesiyle çeşitli kanser türlerinde artma gözlenir (Albertini ve ark., 2000; Norppa ve ark., 2006). Bu yüzden, bir etkenin genotoksik ve mutajen olup olmadığını anlamak ve önlem almak genotoksik testlerini daha önemli kılmaktadır.

Kromozomal anormallik testi, kromozomların açık ve net izlenmesine olanak verdiği için ve görülen anormalliklerin de oluşum mekanizmaları tanımlanmış olduğu için, genotoksik ajanların belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu testin bir avantajı da, hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda ve farklı dozlarda maddenin güven aralığını belirleme imkânı vermesidir. Kromozomal anormallik testi ile, tüm genomdaki hasar incelenebildiği için anormallik frekansı ile kanser oluşumu arasında analizler yapılabilmekte ve maruz kalınan mutajenin kanser riski saptanabilmektedir (Ji ve ark., 2001; Albertini, 2004; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2014).

Kromozomal anormallik testinde genelde mitomisin C ve aflatoksin B gibi kromozomlarda anormallik yaratacak kimyasallar pozitif kontrol olarak kullanılır. *In*

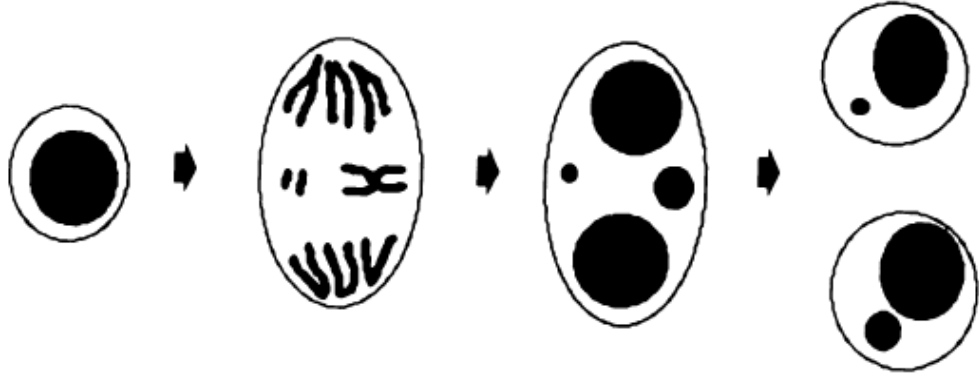
vitro KA testinde, eldesi, üremesi ve preparat hazırlaması kolay olduğu için insan lenfosit hücreleri kullanılırken, *in vivo* çalışmalarda genelde fare ya da sıçanlardan elde edilen kemik iliği hücreleri kullanılır. İncelenen hücrelerde kromozomal anormallikler tespit edilerek, sağlam hücre ile oranlanarak bir frekans belirlenir.

In vitro çalışmalarda, insandan alınan periferik kandan elde edilen lenfosit hücreleri, uygun kültür ortamında inkübe edilerek mitoz bölünme geçirmesi sağlanır. *In vitro* çalışmalarda kültür bitiminden 2 saat önce, *in vivo* çalışmalarda ise denek hayvanın sakrifiye edilmeden 2 ila 4 saat önce kolşisin maddesi uygulanır. Bu madde sayesinde iğ ipliklerinin polimerizasyonu inhibe edilerek, metafaz safhasındaki kromozomların, ekvatora dizilmesi engellenir. Böylece, kromozomlar üst üste binmeden ve açık bir şekilde mikroskop altında görülebilirler (Ford ve Hamerton, 1956; Evans, 1984; Pretson ve ark., 1987). Daha sonra kültürden ya da kemik iliğinden elde edilen ve daimi preparat haline getirilmiş hücrelerde metafaz safhasındaki hücrelerin kromozomları tek tek mikroskop altında incelenir. Analiz sonucunda kromozomlarda en sık görülebilecek olan yapısal anormallikler; kromatid kırığı, kromozom kırığı, disentrik kromozom, kromatid değişimi, fragment ve kardeş kromatidlerde birleşme gibi anormalliklerdir. Sayısal anormalliklere örnek olarak ise endoredüplikasyon verilebilir. Kromatid kırığı, bir kromozomdaki kardeş iki kromatitten birinin herhangi bir yerinde kırık olmasıdır. Kromozom kırığı ise, bir kromozomda her iki kardeş kromatidin aynı yerden kırılması durumudur. Disentrik kromozom oluşumu, iki kromozomun uçlarından kırılması ve sentromer sahibi olan kısımlarının kırılan uçlardan birleşmesi ile oluşur. Böylece, iki sentromeri olan tek bir kromozom gibi görünür. Kromatid değişimi, diğer adıyla haç kromozomu, translokasyon sonucu oluşur. Homolog olmayan kromozom çiftlerinin birbiri ile yaklaşması ve etkileşmesi sonucu temas noktasında bir kopma meydana gelmesi veya kopan kısma homolog olmayan kromozomun yapışarak kuadvivalent (haç kromozomu) yapısı oluşur. Fragment ise bir kromatitten ve kopan ve koptuğu kromozomdan uzağa düşen küçük parçadır. Kardeş kromatidlerde birleşme ise, iki ucu kırılan bir kromozomun kırık yerlerinden birbiri ile kaynaşarak sentromerinin bir kısmında halka görünümü vermesidir. Bu çalışmada analiz edilmeyen inversiyon, izokromozom ve halka kromozom gibi anormallikler de yine yapısal anormalliklere

girmektedir. İnversiyonda, bir kromozomun kendi içinde ilmek gibi katlanması, katlandığı kısımdan kırılma meydana gelip 180 derece ters dönerek tekrar kaynaşması ile oluşan, gen sayısını değil sadece dizilimini değiştiren bozukluk tipidir. İzokromozomlar oluşumu, metafaz safhasında kardeş kromatidlerin sentromerden ayna görüntüsü şeklinde değil, asentrik olarak ayrılması durumudur. Halka kromozom anormalliği ise, bir kromatidin iki ucunun kopması ve kopan uçlardan meydana gelen yapışkan uçların birbirine kaynaşarak yuvarlak şekil almasıdır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010; Kuru ve Ergene, 2011).

2.3.2. Mikronükleus testi

Mikronükleus testi (MN testi) başta insan periferik lenfosit hücreleri ve kemik iliği hücreleri gibi birçok hücrede uygulanabilen, hızlı ve güvenilir bir genotoksisite testidir. Uzun adıyla sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak uygulanabildiği ve mitoz bölünme geçirebilen her hücre tipinde analiz edilebildiği için genotoksikolojide yaygın olarak kullanılmıştır (Stoper ve Müler, 1997). Mikronükleus testinde sitokinezin gerçekleşmesini engellemek için sitokalesin B kimyasalı kullanılır. Bu madde sayesinde aktin polimeraz oluşumu inhibe olur ve sitokinez için gerekli boğumlanma oluşamaz. Böylece, çekirdek bölünmesini sitoplazma bölünmesi takip edemez ve binükleat adı verilen, bir sitoplazmada iki nükleuslu hücreler oluşur. Hücre bölünmesi esnasında, çeşitli fiziksel ve kimyasal maruziyetler sonucunda, iki büyük çekirdek yanında klastojenik ve anojenik etkiden kaynaklanan küçük çekirdek ya da çekirdekler oluşturur. Bu oluşumlara mikronükleus adı verilir (Şekil 2.7.). Klastojenik ajanlar, genetik materyalde kırılmalara yol açarak asentrik kromozom parçaları oluşturur. Anojenik ajanlar ise, kromozomların sentromerlerinde ya da iğ ipliklerine tutunan kinetokor proteinlerinde anormalliklere neden olarak ya da mikrotübül yapısını bozarak bazı kromozomların mikrotübüllere tutunmasına engel olurlar. Bu durumda kromozom anafaz safhasında kutuplara çekilerek ana çekirdeğe katılamaz. Bu kalgın kromozomlar mikronükleus oluştururlar (Fenech, 1993; Bonassi ve ark., 2011).



Şekil 2.7. Binükleat hücrede mikronükleus oluşum (Fenech, 1993)

MN testi kromozomal anormallik testi kadar tüm kromozomlar hakkında ayrıntılı bilgi vermese de bir çok hücre tipinde uygulanabilir olması ve daha çok hücre sayımına imkân sağlayarak istatistiksel olarak doğru sonuçlara ulaştırması MN testini yaygın kullanımlı ve pratik bir metot haline getirmiştir. MN sağladığı avantajlar sayesinde, birçok hastalığın genotoksik ilişkisinin anlaşılmasında kullanılan önemli bir testtir. Kanser hastalarından ve kontrollerden alınan kan örneklerinde MN analizi yapılmış ve kontrol grubuna göre kanserli hastalarda MN frekansının anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür (Cheng ve ark., 1996; Duffaud ve ark., 1997). Yine yapılan bir çalışmada, MN oluşumu ile böbrek yetmezliği oluşma riski arasında doğru orantı tespit edilmiştir (Karaman ve Keskinler, 2009).

MN testinin bilim dünyasında geçerli, hızlı ve güvenilir bir genotoksik analiz olmasından dolayı, çalışmamızda karayemiş ekstraktının hem genotoksik hem de antigenotoksik profilini test etmek amacıyla kullanılmıştır.

2.4. SOD ve GPx mRNA Ekspresyon Analizi

Hücre ve dokularda ifade edilen genlerin araştırılması biyolojik, biyokimyasal, farmakogenomik, patafizyoloji gibi birçok alanda moleküler temelli bilgiler vermektedir. Bazı kimyasalların, bitki ekstraktlarının, ilaçların ya da diğer maddelerin spesifik olarak bazı genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması özellikle mRNA miktarı ile ilintilidir. Araştırılan genlerin normal doku ile hastalıklı doku arasında ya da kontrol grubu doku ile herhangi bir maddeye maruz bırakılmış doku arasında ifade düzeylerinin karşılaştırılması hastalıkların patogenezi veya maddelerin organizmanın biyokimyasına etkisi gibi önemli ipuçları vermektedir (Kömürcü Bayrak ve Erginel Ünaltuna, 2011).

Bu çalışmada, karayemiş meyve ekstraktının bilinen antioksidan enzim aktivitesinin yükseltmesinin nedeninin moleküler temelli olup olmadığı SOD ve GPx mRNA analizi ile belirlenmiştir.

2.4.1. Ribonükleik asit (RNA)

Ribonükleik asit (RNA), temel taşı nükleotit olan tek zincirli bir makromoleküldür. Her bir nükleotitinde, bir azotlu baz (adenin, guanin, sitozin ve urasil), bir riboz şekeri ve bir fosfat molekülü içerir. Biyolojik görevlerine göre sınıflandırılan 3 temel çeşidi bulunur. Mesajcı RNA (mRNA), DNA'dan alınan bilgiyi protein sentez yeri olan ribozomlara taşıyan haberci bir RNA'dır. RNA genleri içerisinde kodlanmayan, yani proteine çevrilmeyen genler de bulunmaktadır. Bunlar protein sentezi sırasında aminoasit taşımakta görevli olan taşıyıcı RNA'lara ya da protein sentezinin gerçekleştiği organel olan ribozomu oluşturan ribozomal RNA'lara dönüştürülürler.

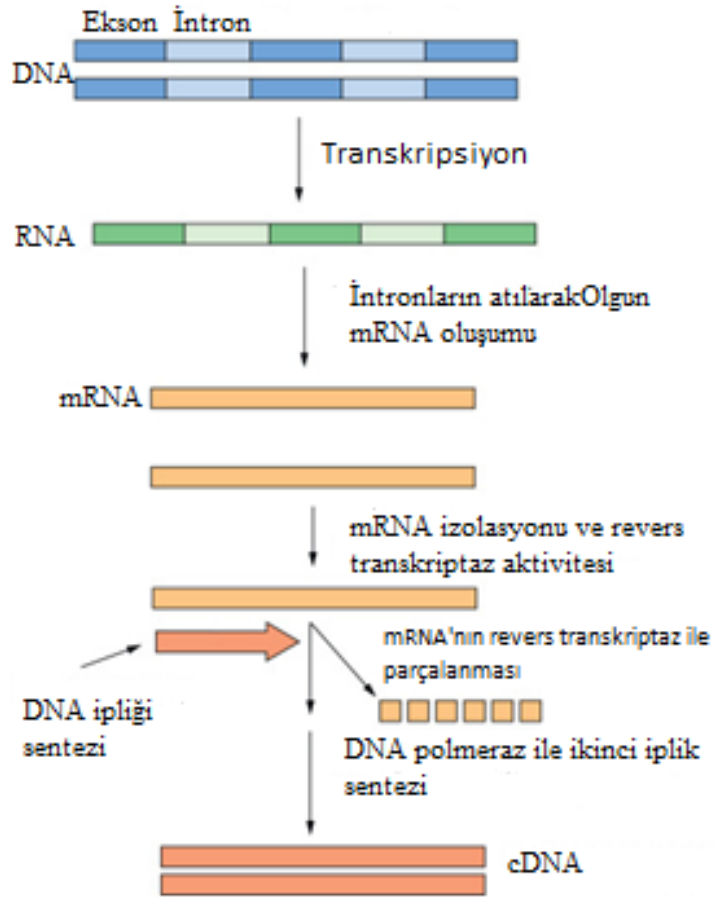
Çalışmalarda RNA ekspresyonunun belirlenmesinin birçok amacı vardır. Hücresel transkripsiyon arttığında ilgili biyolojik faaliyette dengenin nasıl değiştiği belirlenmiş olur. Ayrıca, genlerin transkripsiyon oranların ölçülmesi ve translasyonunun başlama bölgesinin belirlenmesi RNA çalışılması ile mümkündür (Farrel, 2005).

Total RNA miktarının %5' i gibi küçük bir oranını oluşturmaya rağmen, DNA'dan alınan bilgi doğrultusunda protein sentezini üstlenmesi mRNA'yı çok önemli bir molekül haline getirmiştir. Bir enzimin aktivitesinin artması ya da azalmasının nedenleri düşünüldüğünde, bunun enzimatik düzeyde bir nedeni olabileceği gibi, moleküler düzeyde mRNA ekspresyonu ile ilgili olması da muhtemeldir. Bu yüzden birçok protein ya da enzim aktivitesi çalışmalarında mRNA'ya odaklanılmıştır. Yapısal bir proteinin ya da enzimin bir hastalık ile ilgili olabileceği düşünüldüğünde, bu yapıların sentezinde görevli mRNA'nın ekspresyonun bilinmesi, hastalığın sebebine ve tedavi yöntemine büyük katkı sağlayacaktır. Örneğin, şizofren hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, GABAerjik mRNA'ların ekspresyonu incelenmiş ve hastalarda daha düşük oranda olduğu ortaya çıkmıştır (Huang ve Akbarian, 2007). Parkinson hastalarının lenfosit hücrelerinde D3 dopamin reseptörünü oluşturan proteinin sentezinde rol oynayan mRNA molekülünün ekspresyonu sağlıklı bireylere göre düşük seviyededir (Nagai ve ark., 1996). Tümör nekroz faktörü (TNF-a) ve interferon (IFN-g) için mRNA ekspresyonu seviyesi multipl skleroz hastaları üzerinde değerlendirilmiş ve bu hastalıktan kaynaklı bitkinlik nöbetleri yaşayan hastalarda, bu nöbetleri yaşamayanlara göre anlamlı artış bulunmuştur (Flachenecker ve ark., 2004). Yapılan başka bir çalışmada, tiroid kanserli dokularda, glutatyon peroksidaz mRNA ekspresyonunun düştüğü kanıtlanmıştır (Hasegawa ve ark., 2002). Ayrıca, süperoksit dismutaz enzimi mRNA ekspresyon seviyesinin değişmesinin sedef hastalığı ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (Löntz ve ark., 1995). Bu çalışmada odaklandığımız süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi iki önemli antioksidan enzimin aktivitesinin karayemiş ekstraktı muamelesi ile değiştiği bilinmektedir. Ancak bu durumun enzimatik ya da moleküler basamağa dayandığının aydınlatılması için, SOD ve GPx enzimlerinin mRNA ekspresyonuna bağlı olup olmadığı araştırılmıştır.

2.4.2. Komplementer DNA

Komplementer DNA (cDNA), diğer adıyla tamamlayıcı DNA, olgun bir RNA'yı kalıp olarak kullanarak revers transkriptaz enzimi tarafından sentezlenen DNA parçasıdır (Şekil 2.8.). Organizmada, santral dogma reaksiyonunda, DNA kalıp

olarak kullanılır ve RNA polimeraz enziminin katalizörlüğünde mRNA sentezlenir. cDNA sentezi için, kalıbın RNA olması ve sentezlenen nükleik asitin DNA olmasından dolayı kullanılan enzim 'geri döndürme' anlamında olan 'revers' transkriptazdır. RNA'ya bağımlı bir enzim olan reverse transkriptaz enzimi, uygulama çalışmalarında kullanılmak üzere genelde RNA genomuna sahip virüslerden (retrovirüs) elde edilir. Daha sonra elde edilen cDNA, DNA polimeraz enzimi yardımıyla çoğaltılarak çalışmalarda kullanılır (Croy, 1998; Litwack, 2018).



Şekil 2.8. cDNA sentezi (Litwack, 2018)

Çalışmalarda, komplementer DNA kullanılmasının amacı, tek zincirli ve hassas olan RNA molekülünü, çift zincirli (ya da tek zincirli) daha kararlı olan bir DNA molekülüne çevrilerek, *in vitro* çalışmalarda daha kolay ve doğru sonuç elde etmektir. Ayrıca cDNA çalışmanın bir diğer avantajı da çok az mRNA numunesi bile

olsa sonuç alınabilmesi ve ekspresyon miktarının tespit edilebilmesidir (Kocayiğit Bayezit, 2014). RNA çalışmaları için, kalp, beyin, karaciğer, böbrek, kan gibi en çok bulunduğu dokular tercih edilir. Yalnız, saf RNA eldesinde ortaya çıkan sorunlar, lipid, DNA, protein karışması ve dokulardan gelen nükleazların (RNaz gibi) ortamdaki uzaklaştırılmamasıdır. Kaliteli bir cDNA sentezi için, öncelikle yüksek verimde ve saflıkta RNA elde edebilmek çok önemlidir. Ayrıca, cDNA sentezi sırasında, revers transkriptaz enziminin aktivitesini inhibe edecek, SDS ve EDTA gibi herhangi bir kimyasalın ortamda olmaması gerekir.

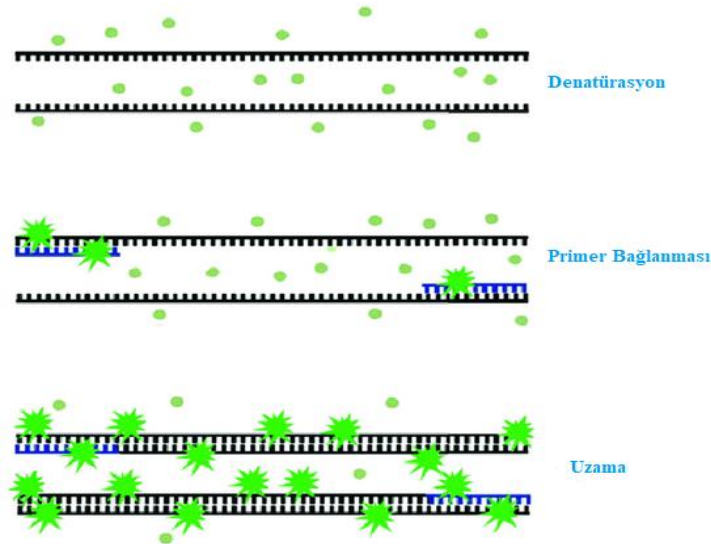
2.4.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PCR), tek bir tüpte nükleik asitlerin çoğalmasıyla eş zamanlı olarak ürünün kantitatif tayinini yapan bir PCR metodudur. Real Time PCR prosesinde sürekli olarak numunedeki örnek miktarı ölçülür. Elektroforeze ihtiyaç duymayan bu PCR sayesinde, aynı tüpte hem çoğaltma hem de miktar tayini yaptığı için, kontamine riski de düşer. Günümüzde popüler olan real time PCR ile, gen analizi ve PCR metodu birleştirilmiştir. Bu teknikte, ışımaya veren floresan işaretli probalar kullanılır. Bu sayede, nükleik asit çoğalması ile birlikte aynı zamanda artan floresan sinyal ölçülür. Floresan sinyali oluşan DNA ile birlikte doğru orantılı artar. Aynı cihazda hem çoğaltma hem de çoğaltılan ürünün miktarının saptanması yapılarak, kantitatif sonuç elde edilmiş olur (Gibson ve ark., 1996).

Real time PCR'in en çok kullanıldığı alan herhangi bir biyolojik materyalden elde edilen DNA molekülünün veya RNA seviyesini sayısal olarak belirlemektir. Ayrıca, DNA hasarı, tek nokta mutasyonlarının tespiti, kromozom bozuklukları, metilasyon analizi gibi birçok alanda da real time PCR metodu kullanılmaktadır (Kubista ve ark., 2006).

Real time PCR yönteminde floresan ışımaya yapılması için kullanılan spesifik ve spesifik olmayan çeşitli boyalar mevcuttur. Spesifik boyalar, belirli bir gen dizisine bağlanarak ışımaya yapabilirken (örneğin; Tag Man), spesifik olmayan boyalar herhangi bir nükleik asit zincirine bağlanabilir. SYBR green en sık kullanılan

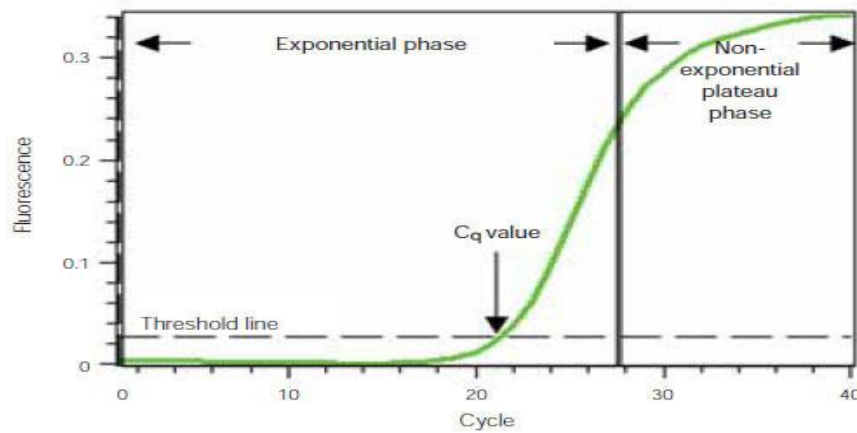
spesifik olmayan boyadır. Bu boyanın en önemli özelliği çift zincirli DNA'ya bağlanabilmesidir. DNA çoğaldıkça bağlanan ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenip 520 nm dalga boyunda indirgenerek ışıma veren ve uzun döngüler sonrasında bile etkinliğini yitirmeyen bir boyadır (Şekil 2.9.) (Kubista ve ark., 2006).



Şekil 2.9. SYBR green ışması (Fraga ve ark., 2008)

SYBR green boyasının, bütün DNA'lar ile kolayca ışıma vermesi, hızlı ve ucuz olması gibi avantajları olmasına rağmen, istenmeyen bir DNA molekülünün ekspresyonu arttığında ya da ortamda primer dimerleri oluştuğunda yine ışıma vermektedir (Van der Velden ve ark., 2003).

Real time PCR sonucunda, elde edilen amplifikasyon eğrisi analizde kullanılan değerleri ve doğru ve verimli bir PCR yapıp yapmadığımızı anlatan grafikdir (Şekil 2.10.). Amplifikasyon eğrisi ışıma (fluorescence) ve döngü sayısı (cycle) gösteren bir grafikdir. Grafikteki eşik değeri (Threshold line) taban çizgisi sinyali üzerinden istatistiksel olarak anlamlı bir artışı gösteren çizgidir. Bu değer, kullanılan materyale (DNA, RNA gibi) ya da cihazın markasına bağlı olarak farklılık gösterir. Yoğun bir PCR ya da düşük düzeyde bir PCR olmasına göre cihaz işlem sırasında anlamlı olan bir eşik değeri belirler. Bu grafikteki en önemli değerlerden biri de C_q (C_t ; threshold cycle) olarak adlandırılan amplifikasyon eğrisinin eşik değerini kestiği noktadır. İstatistiksel olarak analizde kullanılan bu değer, ne kadar düşüğe numunedeki miktar o kadar fazla anlamına gelir.



Şekil 2.10. Amplifikasyon eğrisi (<https://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>)

2.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde Karadeniz Bölgesi' nde yaygın olarak tüketilmekte olan ve sağlık açısından birçok faydası olduğu bilinen karayemişin muhtemel genotoksik/antigenotoksik profilinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri uygulanmıştır.

Genotoksisite profilinin belirlenmesine ek olarak, antioksidan etkisi olduğu çalışmalarla ispatlanmış olan karayemiş ekstraktının, insan lenfosit hücre kültürüne seçilen dozlarda muamele edilerek, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialhedit gibi önemli antioksidan parametreleninin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra, yeni geliştirilmiş ve önemli bir antioksidan parametresi olan tiyol/disülfid homeostazı da çalışılmıştır.

Bu çalışma kapsamında diğer bir amaç, antioksidan sisteme olumlu etkisi olduğu bilinen karayemişin, bu enzim aktivitesini arttırmasının moleküler temelini araştırılmasıdır. Bu bağlamda, farklı dozlarla muamele edilen insan lenfosit hücre kültüründen süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin mRNA düzeyi incelenmiştir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Karayemiş ekstraktı

Bu çalışmada taze karayemiş meyvesinden toplam antosiyanin ve fenolik madde eldesi için klasik ekstraksiyon yöntemi bazı modifikasyonlar ile uygulanmıştır. Ağustos- Eylül aylarında Sakarya ili Karasu ilçesi Yuvalıdere köyünden toplanan karayemiş meyveleri -20 °C'de saklanmıştır. Donmuş karayemiş meyvesinin etli kısmı çekirdeklerinden ayrılıp, 100 gr meyve blender yardımıyla parçalanmıştır. Üzerine 250 mL metanol (%100) eklenip oda sıcaklığında karanlıkta 48 saat beklenmiş, daha sonra karışım Whatman kâğıttan süzülerek tortusu atılmıştır. Elde edilen süzüntüdeki metanol 40 °C'de Heidolph rotary evaporator (HEI-VAP Vallue G1, Schwabach, Germany) yardımı ile uzaklaştırılarak ekstrakt elde edilmiştir (Demir ve ark., 2013).

3.1.2. Periferel kan

Çalışma için donör olarak sigara içmeyen, alkol kullanmayan, kronik hastalığı olmayan, son 2 ay içinde herhangi bir ilaç kullanmamış, son 6 ay içerisinde teşhis ve tedavi amaçlı bir ışına maruz kalmamış, 20-25 yaşları arasında sağlıklı 2 erkek ve 2 bayan birey gönüllülük esasına dayanarak seçilmiş ve periferel kan örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmeye alınmış ve etik ve bilimsel bir açıdan bir sakınca olmadığına karar verilmiştir (Etik kurul no: 16214662/050.01.04/75). Gönüllü donörlere Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalatılmıştır.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Genotoksisite testleri (kromozomal anormallik ve mikronükleus) ve antigenotoksisite testleri için, chromosome medium B (F 5023), mitomisin C ($C_{15}H_{18}N_4O$, kat. no: 50-07-7), kolşisin ($C_{22}H_{25}NO_6$, kat. no: 64-86-8), potasyum klorür (kat. no: 7447-40-7), metanol (kat. no: 67-56-1), asetik asit (kat. no: 64-19-7), giemsa boyası kat. no: (3204-19-00), tampon A (KH_2PO_4 , kat. no: 7778-77-0), tampon B (Na_2HPO_4 , kat. no: 7558-79-04), entellan (kat. no: 3208-20-10), heparin (Nevparin enjektabl) ve sitokalesin B ($C_{29}H_{37}NO_5$, kat. no: 14930-96-2) kullanılmıştır.

Süperoksit dismutaz ölçümü için, ksantin (kat. no: 69-89-6), etilen diamin tetraasetik asit disodyum (Na_2EDTA , kat. no: 6381-92-6), nitroblue tetrazolium (NBT, kat. no: 206-067-4), sodyum karbonat (Na_2CO_3 , kat. no: 497-19-8), bovin serum albumin (BSA, kat. no: 9048-46-8), bakır klorür ($CuCl_2$, kat. no: 10125-13-0), ksantin oksidaz (kat. no: 9002-17-9) ve amonyum sülfat (NH_2SO_4 , kat. no: 7783-20-2) kullanılmıştır.

Glutasyon peroksidaz ölçümü için, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH, 2646-71-1), glutasyon (GSH, kat. no: 70-18-8), sodyum azit (NaN_3 , kat. no: 26628-22-8), glutasyon redüktaz (kat. no: 9001-48-3), hidrojen peroksit (H_2O_2 , kat. no: 7722-84-1), potasyum fosfat (KH_2PO_4 , kat. no: 7778-77-0) ve etilen daimine tetraasetik asit (EDTA, kat. no: 60-00-4) kullanılmıştır.

Malondialdehit ölçümü için, sodyum dodesil sülfat (SDS, kat. no: 151-21-3), asetik asit (kat. no: 64-19-7), N- bütanol (kat. no: 71-36-3), piridin (kat. no: 110-86-1), etilen diamine tetraasetik asit (EDTA, kat. no: 60-00-4), tiobarbütirik asit (TBA, kat. no: 504-17-6) ve sodyum hidroksit (kat. no: 1310-73-2) kullanılmıştır.

Total protein tayini için, sitrik asit (kat. no: 5949-29-1), disodyum fosfat (Na_2HPO_4 , kat. no: 7558-79-4) Coomassie Brilliant Blue (kat. no: 6104-58-1), etil alkol (kat. no: 64-17-5) ve fosforik asit (H_3PO_4 , kat. no: 7664-38-2) kullanılmıştır.

Toplam fenolik madde tayini için, gallik asit ((HO)₃C₆H₂CO₂H₁, kat. no: 49-91-7), sodyum karbonat (Na₂CO₃, kat. no: 497-19-8) ve Folin-Ciocalteu reaktifi (kat. no: F9252) kullanılmıştır.

Tiyol/disülfid homeostazı için, tiyol disülfid analiz kiti (Rel Assay Diagnostics, kat. no: TZ1901N) kullanılmıştır.

Moleküler deneylerde, total RNA izolasyonu için Quick-RNA Miniprep Plus Kit (R1057) kullanılmıştır. Total RNA'dan cDNA sentezi SensiFAST cDNA Synthesis Kit (BIO-56053) ile yapılmıştır. Real Time-PCR prosedüründe ise SensiFAST SYBR No-ROX Kit (BIO-98005) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kromozomal anormallik testi

Kromozomal anormallik testinde kan doku içerisindeki lenfositlerin üremesini tetikleyen besiyeri olarak Chromosome Medium B, genotoksik ve oksidatif stres ajanı olarak Mitomisin C kullanılmıştır. Çalışmamızda, literatür taraması ve ön çalışmalar ile 4 doz karayemiş ekstraktı (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL) belirlenmiştir. Ekstraktın genotoksik etkisini belirlemek için, 4 doz karayemiş ekstraktı, pozitif kontrol (Mitomisin C; MMC), çözücü kontrol (metanol), negatif kontrol olmak üzere 7 adet kan kültürü yapılmıştır. Ayrıca antigenotoksik etkisini belirlemek için de, bütün dozlarla birlikte MMC genotoksik ajanı eklenerek 4 adet kan kültürü yapılmıştır. Bütün konsantrasyonlar için 24 ve 48 saatlik uygulama yapılmıştır.

Kan kültür tüplerine 2,5 mL besiyeri paylaştırılmış ve çalışma zamanına kadar -20 °C'de donmuş şekilde muhafaza edilmiştir. Bireylerden alınan 1/10 oranında heparinli kan, besiyeri bulunan tüplere 0,2 mL eklenmiş, 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültür süresi boyunca, tüpler her gün en az 3 kere çalkalanmıştır. Kültür ortamına, uygulama periyotuna göre, 24 saatlik maruziyet için kültürün 48. saatinde, 48 saatlik maruziyet için kültürün 24. saatinde seçilen 4 konsantrasyon karayemiş ekstraktı ilave edilmiştir. Eş zamanlı olarak, pozitif kontrol MMC (0,2 µg/mL) ve

çözücü kontrol metanol (10 µL) kullanılmıştır. Kültürün 70. saatinde kültür tüplerinin her birine iğ ipliklerinin depolarizasyonu için kolşisin (0,06 µg/mL) eklenmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde tüpler 10 dk boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatantı pastör pipet yardımı ile ependorf tüplere koyulmuş ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Tüplerin konik kısmında kalan ve hücre içeren kültürlerle, daha önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilmiş hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl çözeltisi) 5 mL damla damla ilave edilerek vorteksle homojen hale getirilmiştir. Daha sonra 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Tüpler tekrar santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı atılmıştır. Bütün kültür tüplerine, yine daha önceden hazırlanmış ve 4°C'de bekletilmiş fiksatif (3 metanol: 1 asetik asit) çözeltiden 5 mL damla damla ilave edilip vorteks ile karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra 45 dk 4°C'de buzdolabında bekletilmiş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatantı pastör pipeti ile atılarak konik kısmında kalan hücrelere tekrar soğuk fiksatif çözeltisinden 5 mL eklenmiş, vorteksle karıştırılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar kültür tüplerinin konik kısmına kadar çekilip atılmıştır. Kan hücrelerini içeren dipteki kısım pastör pipeti ile homojenize edilerek, daha önceden saf su ile yıkanan ve -20°C'de bekletilen soğuk lamların üzerine damlatılmıştır. Bir gün süre ile lamların kuruması beklenmiştir. Kurutulan lamlar tampon A ve tampon B kullanılarak pH=6,8 olacak şekilde ayarlanmış %5'lik giemsa boyası ile yaklaşık 15 dk boyanmıştır. Daha sonra 3 kez saf sudan geçirilerek preparatlardaki fazla boya yıkanmıştır. Daimi preparat haline getirmek için entellan ile kapatılan lamlar, mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.1. Mitotik indeks hesaplaması ve kromozomal anormalliklerin incelenmesi

Mitotik indeks hesaplaması için, kontrol grupları ve her bir uygulama için birey başına 3000 hücre ve toplamda her konsantrasyon için 12000 hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde cinsinden değer olarak hesaplanmıştır.

Kromozomal anormallik (KA) incelemesi için, her uygulama dozundan her bir birey için 100, toplamda 400 metafaz safhasında hücre incelenmiştir. Metafaz safhasındaki hücre seçilirken 46 kromozomlu, iyi dağılmış olması ve her bir kromozomun net olarak görülebilmesi dikkate alınmıştır. Toplam incelenen hücre içinde anormallik saptanan hücre yüzde olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hücre başına düşen kromozomal anormallik (KA/Hücre) hesaplanmıştır.

3.2.2. Mikronükleus testi

Mikronükleus testi için kromozomal anormallik testinde kullanılan konsantrasyonlar (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL), pozitif kontrol (Mitomisin C; MMC), çözücü kontrol (metanol), negatif kontrol olmak üzere 7 adet kan kültürü yapılmıştır. Ayrıca antigenotoksik etkisini belirlemek için de, bütün dozlarla birlikte MMC genotoksik ajanı eklenerek 4 adet kan kültürü yapılmıştır.

Bireylerden alınan 1/10 oranında heparinli kan, 2,5 mL besiyeri içeren tüplere 0,2 mL eklenmiştir. Kan kültür tüpleri 37 °C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondaki tüpler her gün en az 3 kez ters düz çevrilerek çalkalanmıştır. Kültürün 24. saatinde 48 saatlik uygulama amacıyla 4 konsantrasyon ekstrakt, pozitif kontrol olarak MMC (0,2 µg/mL), çözücü kontrol olarak metanol (10 µL) eklemesi yapılmıştır. Ayrıca herhangi bir uygulamanın yapılmadığı negatif kontrol grubu da kullanılmıştır. Kültürün 44. saatinde sitokalesin –B eklenerek sitokinez inhibe edilmiştir. Kültür inkübasyonu sonunda tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant pastör pipet yardımı ile atılmıştır. Daha sonra her bir kültür tüpüne, 5 mL hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl çözeltisi) damla damla vorteks ile karıştırılarak eklenmiş ve 5 dk 4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra tekrar santrifüj edilmiş, süpernatant atıldıktan sonra yine daha önceden hazırlanmış ve 4°C'de bekletilmiş fiksatif (3 metanol: 1 asetik asit) çözeltiden 5 mL damla damla ilave edilip vortekste karıştırılmıştır ve 15 dk buzdolabında bekletilmiştir. Tüpler tekrar santrifüj edilip ve bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son fiksatif solüsyonu basamağında, %1' lik formaldehit eklenerek yapılmış ve santrifüj edilerek, süpernatantı tüplerin konik kısmına kadar pastör pipet yardımı ile atılmıştır.

Elde edilen kültür daha önceden temizlenmiş lamalar (1 N nitrik asitte bir gece bekletildikten sonra, 20-30 dk akan çeşme altında yıkanarak saf sudan geçirilip, %70' lik alkol içerisinde -20°C'de saklanan) üzerine cam pastör pipet yardımı ile yaklaşık 5-10 cm yükseklikten damlatılmıştır. Preparatların yaklaşık 24 saat kuruması beklendikten sonra tampon A ve tampon B kullanılarak pH=6,8 olarak şekilde ayarlanmış %5' lik giemsa boyası ile yaklaşık 12-13 dk boyanmıştır. Daha sonra 3 kez saf sudan geçirilerek preparatlardaki fazla boya yıkanmıştır. Daimi preparat haline getirmek için entellan ile kapatılan lamalar, mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.1. Mikronükleus frekansı belirleme

Hazırlanan preparatlardan mikroskop altında, her bir konsantrasyondan her bir birey için 1000 adet binükleat hücre, toplamda her uygulama için 4000 binükleat hücre sayılmıştır. Tespit edilen mikronükleus sayısı ile yüzde cinsinden oran hesaplanmıştır.

3.2.3. Biyokimyasal analizler

Biyokimyasal analizler kapsamında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi, malondialdehit düzeyi ve tiyol/disülfid homeostazı gibi önemli antioksidan sistemler değerlendirilmiştir. Analizler için, kromozomal anormallik testinde elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır. Karayemiş ekstraktının 4 farklı konsantrasyon (1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL ve 125 µg/mL) ile muamele edilmiş 72 saatlik kan kültürleri 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatantları tüplere ayrılmıştır. Enzim çalışması yapılana kadar numuneler -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1. Toplam protein tayini

Total protein ölçümü için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Bu yöntemin prensibi, organik boyaların proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşime girerek renk vermesine dayanmaktadır.

Hücre kültüründen elde edilen numunelerin total protein tayini için, 0,03 M sitrat/fosfat tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan tampondan 1,9 mL, numuneden 0,1 mL ve 5X Coomassie Brilliant Blue (0,5 gr boya, 250 mL %95'lik etanol, 500 mL %85'lik fosforik asit, 1000 mL'ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır) boyadan 1,5 mL eklenerek vortex ile karıştırılmıştır. 20 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilen örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır.

3.2.3.2. Süperoksit dismutaz tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü prensibi, ksantin ve ksantin oksidaz tarafından nitroblue tetrazoliumun (NBT) indirgenmesinin SOD tarafından inhibe edilmesine dayanmaktadır. Sun ve arkadaşlarının (1988) metodu modifiye edilerek uygulanmıştır.

Reaksiyon karışımı, ksantin (0,3 mM), Na₂EDTA (0,6 mM), NBT (150 µM), Na₂CO₃ (400 mM) ve BSA (1 g/L) çözeltilerinden 40/20/20/12/6 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. 25 µL örnek üzerine 1,425 mL reaksiyon karışımı ve 25 µL ksantin oksidaz çözeltisi (167 U/L) eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin her birine 25 µL bakır klorür çözeltisi (0,8 mM) ilave edilerek spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır.

$$\%inhibisyon = \frac{A_{k\ddot{o}r} - A_{\ddot{o}rnek}}{A_{k\ddot{o}r}} \times 100$$

Elde edilen sonuçlar yukarıdaki denkleme göre hesaplanmıştır. %50 inhibisyon bir ünite enzim aktivitesine karşılık gelmektedir.

3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz tayini

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, hücre kültürü süpernatantından elde edilen numuneler üzerinde Paglia ve Valentine (1967) metodu ile ölçülmüştür. Ölçüm prensibi, glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi ile oluşan okside glutasyonun (GSSG) NADPH ile reaksiyona girip NADP' ye dönüşümü ile ortamdaki NADP' nin ölçümüne dayanır.

Kan kültüründen elde edilen numunelerinden 50 µL ayrı spektrofotometre küvetlerine koyulduktan sonra, üzerine 50 µl NADPH (8 mM), 50 µl redükte glutasyon (150 mM), 10 µl glutasyon redüktaz (30 U/mL), 10 µl sodyum azid çözeltisi (0,12 M) ve 1,325 mL potasyum fosfat tamponu (50 mM) (pH: 7,0, 5 mM EDTA) eklenmiştir. 30 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. 50 µl H₂O₂ (2 mM) ilave edilip alt üst edilerek karıştırılarak ve reaksiyon başlatılmıştır. Spektrofotometrede 340 nm'de 5 dk boyunca ölçüm alınmıştır. Enzim aktivitesi, 340 nm dalga boyundaki NADPH'in molar absorbtivite katsayısı ($6,22 \times 10^{-6}$) kullanılarak hesaplanmış ve ünite/gr protein olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.4. Malondialdehit tayini

Çalışmada malondialdehit (MDA) tayini, Ohkawa ve arkadaşlarının (1979) tarafından geliştirilen metot kullanılarak yapılmıştır. Bu testin prensibi, lipid peroksidasyonunun yıkım ürünü olan MDA'nın tiyobarbitirik asit ile oluşturduğu pembe rengin spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmesine dayanır.

50 µL sodyum dodesil sülfata (SDS, %8,1), 100 µL numune eklenip, vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. 375 µL asetik asit (pH=3,5, %20) ve 375 µL tiyobarbitirik asit (TBA, %0,6) ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 60 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örneklere, 1,25 mL bütanol:piridin (15:1) çözeltisinden eklendikten sonra, vorteksle karıştırılmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pembe organik tabaka 532 nm'de ölçülmüş ve standart grafik

kullanılarak MDA düzeyi hesaplanmıştır. Sonuçlar plazma örneği için nmol/mL olarak tanımlanmıştır.

3.2.3.5. Tiyol/disülfid homeostazi

72 saatlik kültür sonunda elde edilen numunelerin tiyol ve disülfid değerleri, Erel ve Neşelioğlu, (2014) tarafından geliştirilen ve klinik kimya analizörü kullanılarak otomatik bir ölçüm yöntemi ile belirlenmiştir (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye). Bu yöntemin prensibi Ellman reaktifi ile 415 nm dalga boyunda ölçüm alarak toplam tiyol ve doğal tiyol değerlerinin belirlenmesine dayanır.

Numune içindeki toplam tiyol seviyesi Ellman reaktifinin sodyum borohidrit (NaBH_4) ile modifiye edilmiş hali olan 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile ölçülmüştür. Reaktif içindeki NaBH_4 disülfid bağlarını (-S-S-) serbest tiyol (-SH) formuna indirger. Ortamdaki fazla NaBH_4 formaldehit ile tüketilerek uzaklaştırılır. Doğal tiyol seviyesi ise klasik Ellman reaktifi ile ölçülür. Total tiyol ile doğal tiyol arasındaki farkın yarısı disülfid değerini vermektedir.

Kit kullanılarak elde edilen total tiyol (-SH+-S-S-) ve doğal tiyol(-SH) değerleri ile 4 parametre hesaplanmıştır.

Dinamik Disülfid durumu (-S-S-): $[(-\text{SH}+-\text{S-S-}) - (-\text{SH})]/2$

İndirgenmiş Tiyol Oranı: $[(-\text{SH}) / (-\text{SH} + -\text{S-S-})] \times 100$

Yükseltgenmiş Tiyol Oranı: $[(-\text{S-S-}) / (-\text{SH} + -\text{S-S-})] \times 100$

Tiyol Yükseltgenme İndirgenme Oranı: $[(-\text{SH}) / (-\text{S-S-})] \times 100$

3.2.3.6. Toplam fenolik madde tayini

Genotoksik, antigenotoksik, antioksidan ve moleküler çalışmalarda kullanılan karayemiş meyvesinden elde edilen ekstrakttaki toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 2017). Hazırlanan ekstraktan alınan 100 μL 'lik numuneler %50 konsantrasyonunda 200

μL 'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 2 dk süre beklenmiştir. Bu işlemde sonra 1mL %2' lik Na_2CO_3 ilave edilmiş ve 1 saat karanlık ortamda inkübasyona tabii tutulmuştur. Daha sonra örnekler spektrofotometrede 760 nm'de ölçüm alınmış ve toplam fenolik madde içeriği gallik asit standartı ile mg GA/100 g cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.4. SOD ve GPx mRNA ekspresyon analizi

3.2.4.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA, karayemiş ekstraktının farklı doz uygulamaları ile hazırlanan lenfosit hücre kültüründen elde edilmiştir. Kan kültür tüplerine 2,5 mL besiyeri paylaştırılmış ve çalışma zamanına kadar $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de donmuş şekilde muhafaza edilmiştir. Bireylerden alınan 1/10 oranında heparinli kan tüplere 0,2 mL eklenmiş, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültür süresi boyunca, tüpler her gün en az 3 kere çalkalanmıştır. Kültür ortamına 48 saatlik maruziyet için kültürün 24. saatinde seçilen 4 konsantrasyon karayemiş ekstraktı (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PK+125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve PK+500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ilave edilmiştir. Aynı anda pozitif kontrol olarak MMC (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), çözücü kontrol olarak metanol kullanılmıştır. Negatif kontrol için herhangi bir ekleme yapılmamıştır. Kültür süresinin sonunda tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra total RNA izolasyonu, Zymo Research Quick-RNA Miniprep Plus Kit (R1057)'i kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kitin prosedürüne göre, elde edilen pelet ile eşit miktarda DNA/RNA shield eklenerek viskotik bir yapı elde edilene kadar pipetleme yapılmıştır. Numunelere 1/10 oranında protein kinaz sindirim tamponu ve 1/20 oranında proteinaz K eklenmiş ve 30 dk $55\text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Sonrasında, vortekslenip ependorflara alınan karışımı 16000 g'de 2 dk sentrifüj edilerek, süpernatant alınıp pellet ortamdan atılmıştır. Süpernatant ile eşit hacimde RNA lizis tamponu ilave edilerek, karışım filtreli ependorf tüplere alınmış ve 1600 g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Filtreden geçen süzüntüye eşit hacimde etanol (%96) eklenerek tekrar 16000 g'de 30 sn

santrifüj edilmiş ve süzüntü atılmıştır. Filtrede kalan kısım RNA yıkama tamponu ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiş ve süzüntü atılmıştır. Her numune için 5 µL DNaz I ve 75 µL DNA sindirme tamponu eklenerek oda sıcaklığında 15 dk beklenmiştir. Daha sonra her bir numune 400 µL RNA Prep tamponu ile yıkanarak santrifüj edilmiş ve süzüntü atılmıştır. En son basamakta RNA yıkama tamponu ile yıkanan numune aynı hız ve sürede santrifüj edilerek süzüntü atılmış ve 100 µL DNaz/RNase free water eklenerek çalışma zamanına kadar -80 °C’de saklanmıştır. Elde edilen total RNA’nın konsantrasyonu nanodrop cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.4.2. cDNA sentezi

Total RNA’dan cDNA sentezi yapmak için Biorad SensiFAST cDNA synthesis kit (BIO-65053) kullanılmıştır. Kitin prosedürüne göre master miks (Tablo 3.1.) oda sıcaklığında hazırlanmış ve PCR döngüsü (Tablo 3.2.) yine kit prosedürüne göre belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Total RNA’dan cDNA sentezi için hazırlanan master karışımı

RT master karışım	Miktar
Total RNA (1 µg)	3 µL
5X TransAmp Buffer	4 µL
Reverse Transcriptase	1 µL
DNase/RNase free water	12 µL
Toplam hacim	20 µL

Tablo 3.2. Total RNA’dan cDNA sentezi için PCR döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Primer bağlanması	25	10
Revers transkriptaz aktivasyonu	42	15
Revers transkriptaz inaktivasyonu	85	5

3.2.4.3. Real-time PCR

Farklı dozlarda karayemiş uygulaması yapılmış lenfosit kültüründen elde edilen numunelerden mRNA analizi için real time PCR uygulamasında SensiFAST SYBR No-Rox Kit (BIO-98005) kullanılmıştır. Hazırlanan RT-PCR karışımı ve PCR döngüsü Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'te verilmiştir. Her bir numune için 3 tekrarlı çalışma yapılmıştır.

Tablo 3.3. mRNA ekspresyonu için hazırlanan RT-PCR karışımı

	Hacim
2X SensiFAST SYBR No-Rox karışımı	10 µL
Forward primer	0,8 µL
Reverse primer	0,8 µL
cDNA	3 µL
RNase-free water	5,5 µL
Toplam hacim	20 µL

Tablo 3.4. mRNA ekspresyonu için RT-PCR Döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Polimeraz aktivasyonu	95	2 dk	1
Denatürasyon	95	5 sn	40
Yapışma	60	10 sn	
Uzama	72	10 sn	

3.2.5. İstatistiksel analiz

Kromozomal anormallik testi ve mikronükleus testinde, genotoksisite değerlendirmeleri için, tüm deney gruplarındaki mitotik indekslerin, kromozomal anormalliklerin ve mikronükleus frekanslarının kontrol grubu ile arasında anlamlı fark olup olmadığı z dağılım testi ile belirlenmiştir. Yine buna benzer olarak, antigenotoksisite değerlendirmeleri için, tüm deney grupları ile pozitif kontrol

arasında anlamlı farka z dağılım testi ile bakılmıştır. Anormal hücre frekansları, hücre başına düşen kromozomal anormallik sayıları, mitotik indeksler, mikronukleus frekansları doz-etki ilişkileri bakımından ortaya koymak için SPSS 20.0 yazılımı ile regresyon katsayıları (r) hesaplanmıştır.

Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit analizlerinde her konsantrasyon için değerler arasında istatistiksel anlam farkı tek yönlü varyans (one-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için Tukey post hoc testi kullanılarak bulunmuştur.

Tiyol/disülfid değerleri her bir konsantrasyon ve periyot için ortalama ve standart hata şeklinde verilmiştir. Tüm değişkenlerin normal dağılımı Kolmogorov Smirnov test ile analiz edilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve değişkenler arasındaki farklılığın belirlenmesi için Tukey post hoc testi kullanılarak bulunmuştur. İstatistik hesaplamalar için SPSS 22.0 istatistik programı (SPSS, Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır.

Moleküler deneylerde her bir örnek için üçer kez real-time PCR yapılmış ve elde edilen C_T değerlerinin ortalaması alınmıştır. Veriler “RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.” ([http:// pcrdataanalysis.sabiosciences.com/ pcr/arrayanalysis.php](http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php)) web tabanlı programda $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile değerlendirilmiştir.

C_T değerlerinin bulunduğu Excel dosyası web portalına göre düzenlenerek, aktarılan verilerden deney ve kontrol grupları seçilmiş ve program bize ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ ve $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ değerlerini vermiştir.

$$\Delta C_T: C_{T(\text{ilgili gen})} - C_{T(\text{kontrol geni})}$$

$$\Delta\Delta C_T: \Delta C_{T(\text{doz uygulanan})} - \Delta C_{T(\text{kontrol grubu})}$$

$$2^{-(\Delta\Delta CT)}: \text{kat değişimini veren değer}$$

Uygulanan dozlar ve kontrol grubundaki mRNA ekspresyon farkı bağımsız t testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4: BULGULAR

4.1. Karayemiş Ekstraktının Genotoksik Etkisi

Karayemiş ekstraktının (KYE) genotoksik etkisini tespit etmek için kromozomal anormallik (KA) ve mikronükleus (MN) testi kullanılmıştır.

4.1.1. Kromozomal anormallik testi bulguları

Kromozomal anormallik testi için sağlıklı 2 bayan 2 erkek donörden alınan periferel kan *in vitro* ortamda 72 saat kültüre bırakılmış ve kültürün 24. ve 48. saatlerinde karayemiş ekstraktı (KYE) ile muamele edilmiştir. Çalışmamızda 4 farklı KYE dozu (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL), negatif kontrol grubu, çözücü kontrol (metanol) ve pozitif kontrol (MMC) kullanılmıştır. Her dozdan bir birey için 100 metafaz plağında hücre (toplamda 4 kişi için bir dozdan 400 hücre) incelenmiş ve anormallikler tespit edilmiştir. Ayrıca mitotik indeks (Mİ) hesaplaması için, her dozdan her birey için 3000 (toplam 4 kişi için her bir dozdan 12000) hücre sayılmıştır. Tablo 4.1.'de uygulama sonucunda gözlenen yapısal anormallikler, anormal hücre yüzdesi, hücre başına düşen kromozomal anormalliklerin oranı (KA/Hücre) ve mitotik indeks sonuçları verilmiştir. 24 ve 48 saatlik her iki uygulamada da en çok görülen yapısal anormallik kromatid kırığı olmuştur. Bunu kromozom kırığı ve fragment takip etmektedir. Ayrıca, 24 saatlik uygulamanın 125 µg/mL'lik dozunda bir adet disentrik kromozom ve 250 µg/mL'lik dozunda bir adet kardeş kromatidlerde birleşme gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamanın 125 µg/mL'lik dozunda ise yine bir adet disentrik kromozom bulunmuştur. Gözlenen anormallikler Şekil 4.1.-Şekil 4.9.'da verilmiştir. Çalışmamızda kromatid değişimi sadece pozitif kontrol grubunda gözlenmiştir. Kromozomal anormallik testi sonucunda sayısal anormalliğe ise rastlanmamıştır.

Tablo 4.1. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde oluşturduğu kromozomal anormallikler ve mitotik indeks değeri

Test Maddesi	Uygulama		Yapısal anormallikler						Anormal Hücre ±SH (%)	KA/Hücre ±SH	Mİ ±SH (%)
	Periyot (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Ktk	Kzk	F	Ktd	Kkb	Ds			
NK			1		1				0,50±0,35	0,005±0,004	5,55± 0,21
ÇK	24		1	2	2				1,25±0,56	0,018±0,007	4,65± 0,19
PK	24		54	66	38	2	9	1	38,00± 2,43	0,620±0,024	2,70± 0,15
KYE	24	125	8	1	1			1	2,75± 0,82*	0,033± 0,009**	4,93± 0,20*
		250	4	1	2		1		2,00± 0,70	0,025± 0,008*	4,49± 0,19***
		500	9	1	2				3,00± 0,85**	0,033± 0,009**	4,40± 0,19***
		1000	7	3	1				2,27± 0,77*	0,035± 0,009**	4,38± 0,19***
K			1		1				0,50±0,35	0,005±0,004	5,55± 0,21
ÇK	48		8	2	2				3,00± 0,85	0,035± 0,009	4,85± 0,20
PK	48		59	56	27	15	3		33,75±2,36	0,585± 0,025	3,45± 0,17
KYE	48	125	6	2	1			1	2,50± 0,78*	0,033± 0,009**	4,13± 0,18***†
		250	6	3	2				2,75± 0,82*	0,035± 0,009**	4,80± 0,20**
		500	6	1	1				2,00± 0,70	0,023± 0,007*	4,46± 0,19***
		1000	3	3	2				2,00± 0,70	0,028± 0,008*	4,40± 0,19***

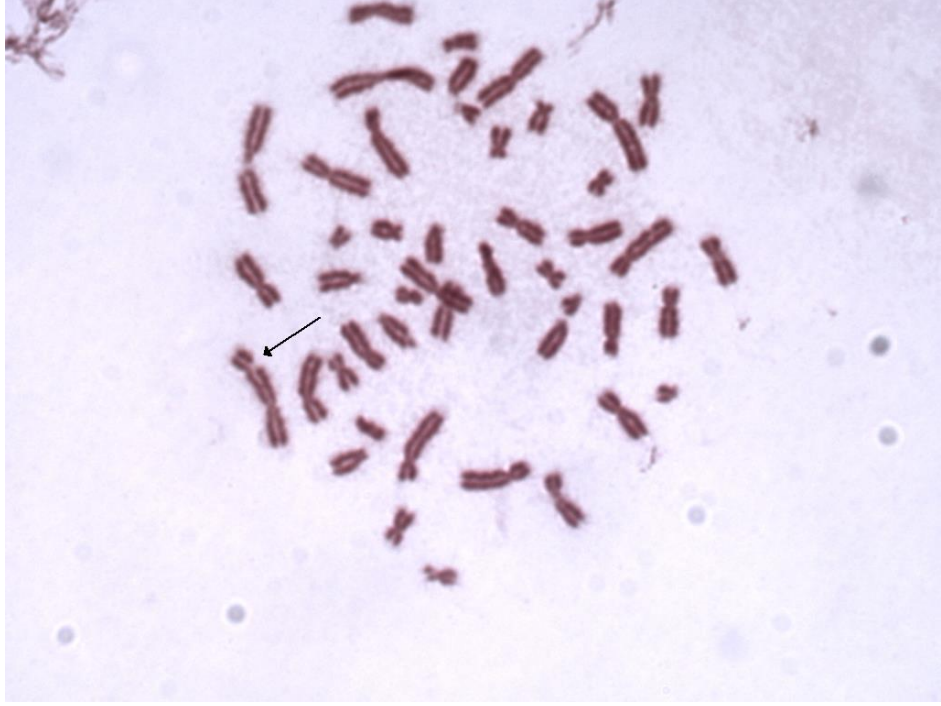
NK: Negatif Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, KYE: Karayemiş Ekstraktı, Ktk: Kromatid Kırığı, Kzk: Kromozom Kırığı, F: fragment, Ktd: Kromatid Değişimi, Kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, Ds: disentrik kromozom, KA: Kromozomal Anormallik, SH: Standart Hata, Mİ: Mitotik İndeks Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.

* Negatif Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

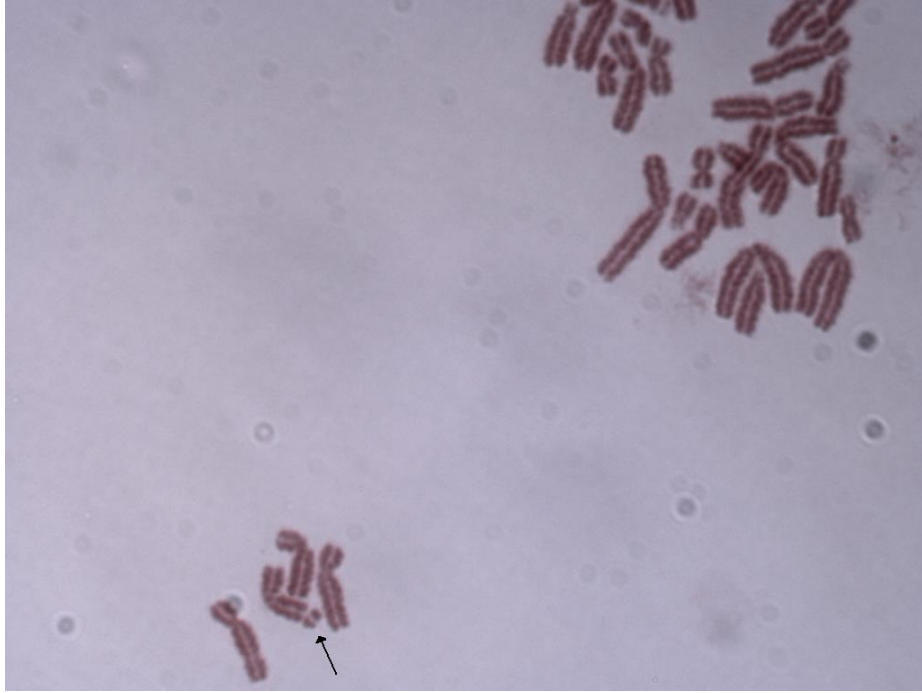
** Negatif Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

*** Negatif Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

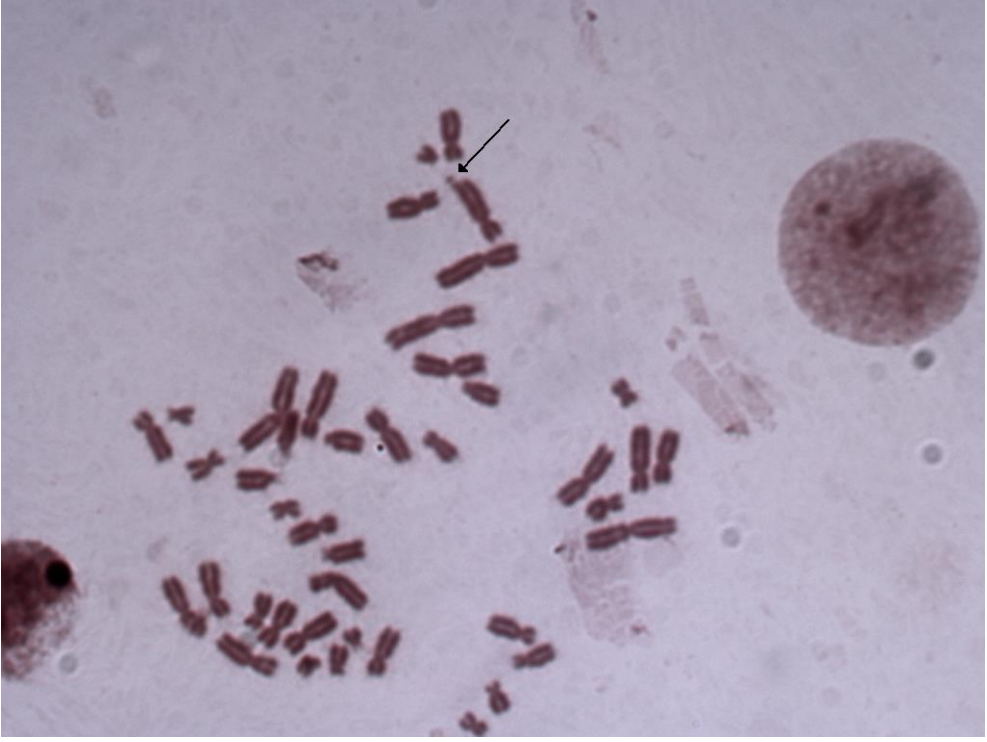
†Çözücü kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)



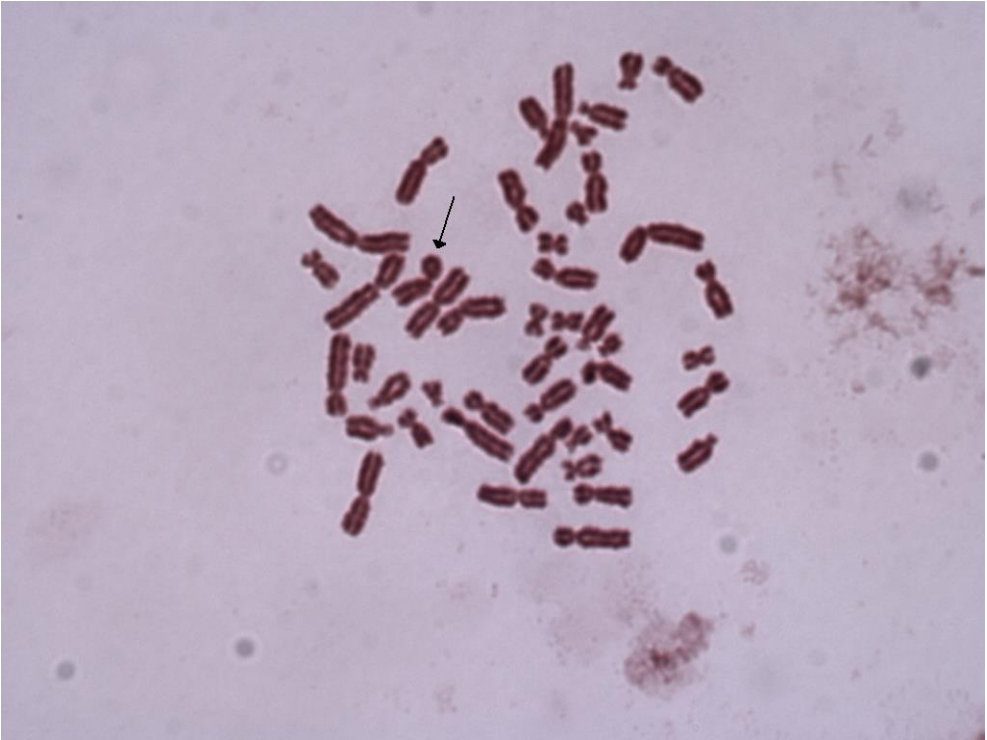
Şekil 4.1. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromatid kırığı



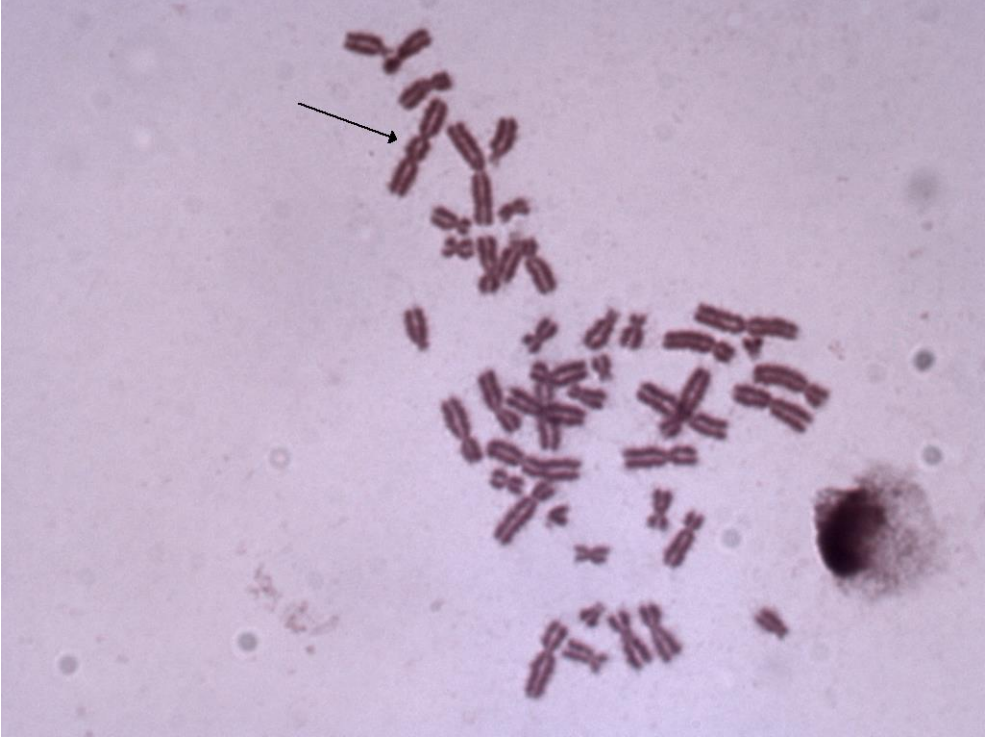
Şekil 4.2. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromozom kırığı



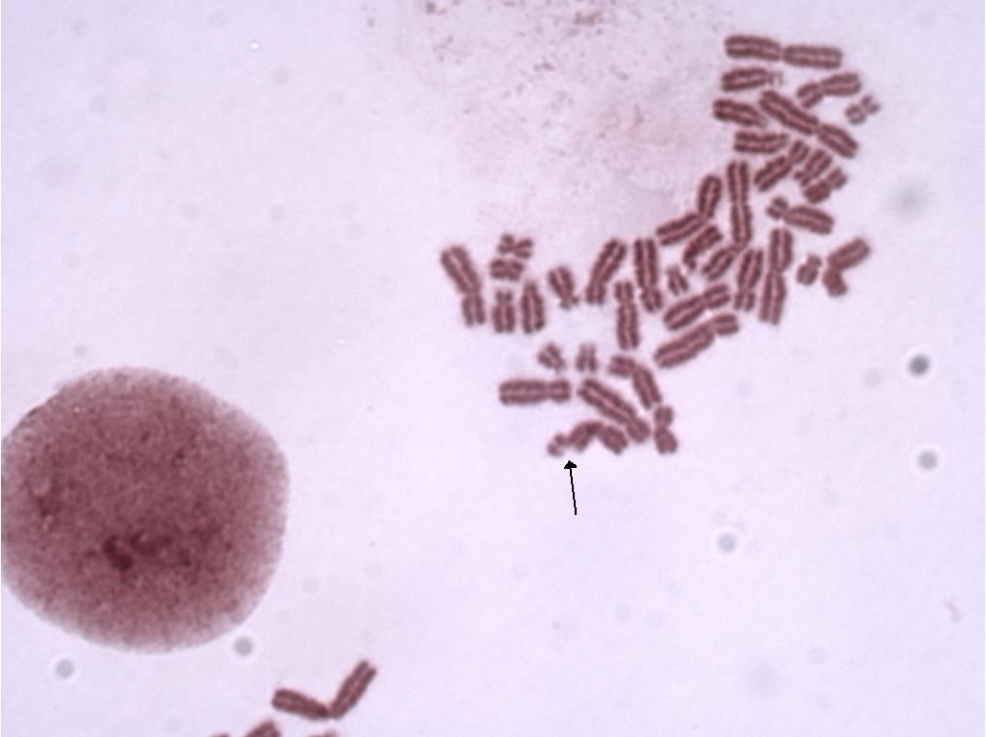
Şekil 4.3. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen fragment



Şekil 4.4. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen kardeş kromatidlerde birleşme



Şekil 4.5. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında görülen disentrik kromozom



Şekil 4.6. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen kromatid kırığı



Şekil 4.7. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen kromozom kırığı

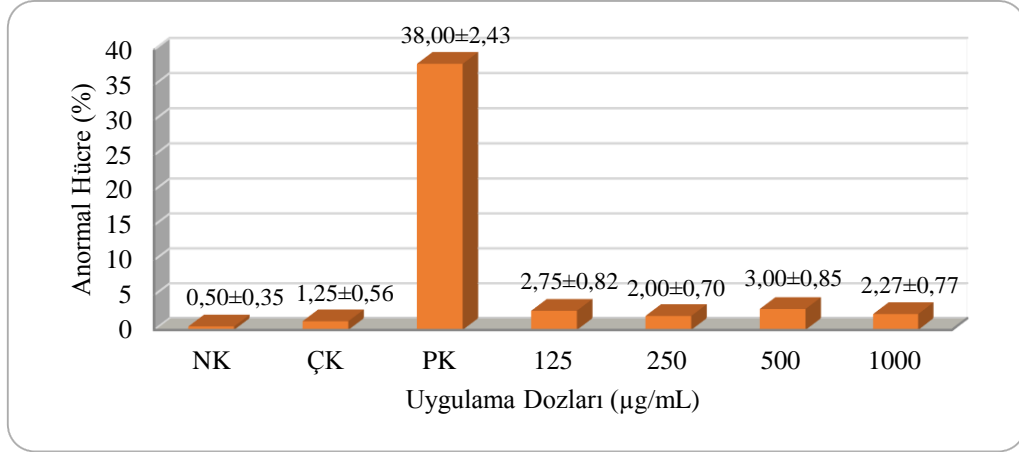


Şekil 4.8. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen fragment

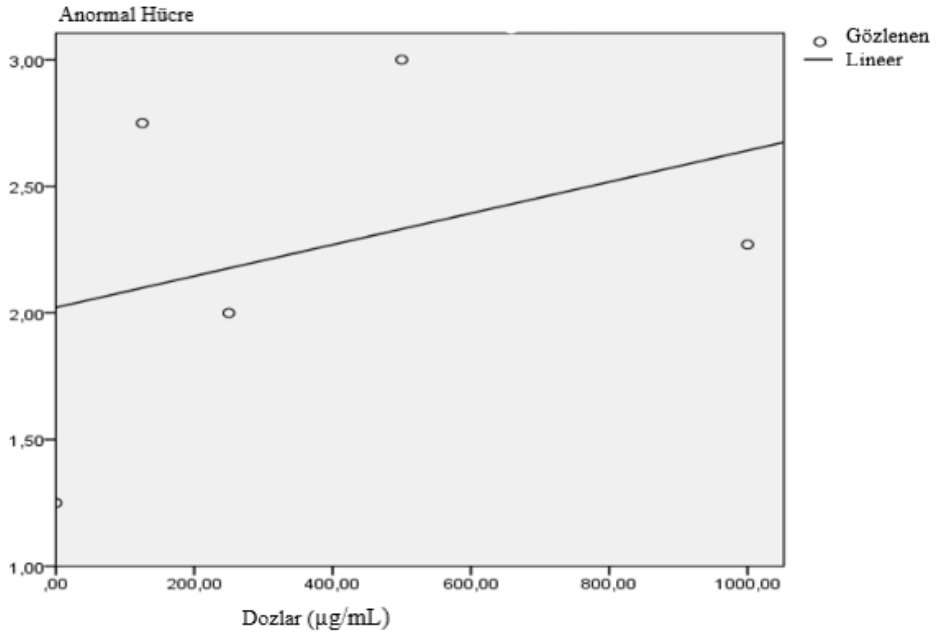


Şekil 4.9. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen disentrik kromozom

KYE ile insan lenfosit hücrelerine 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesi %3,00 ile en yüksek 500 µg/mL'lik dozda, en düşük ise %2,00 ile 250 µg/mL'lik dozda görülmüştür (Şekil 4.10.). Anormal hücre yüzdesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise, hiçbir doz çözücü kontrole göre anlamlı fark göstermezken, 250 µg/mL'lik doz hariç diğer dozlar negatif kontrole göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır (Tablo 4.1.). Aynı zamanda, bu uygulama için, anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında çözücü kontrol ile kıyas edildiğinde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($r=0,358$) (Şekil 4.11.).



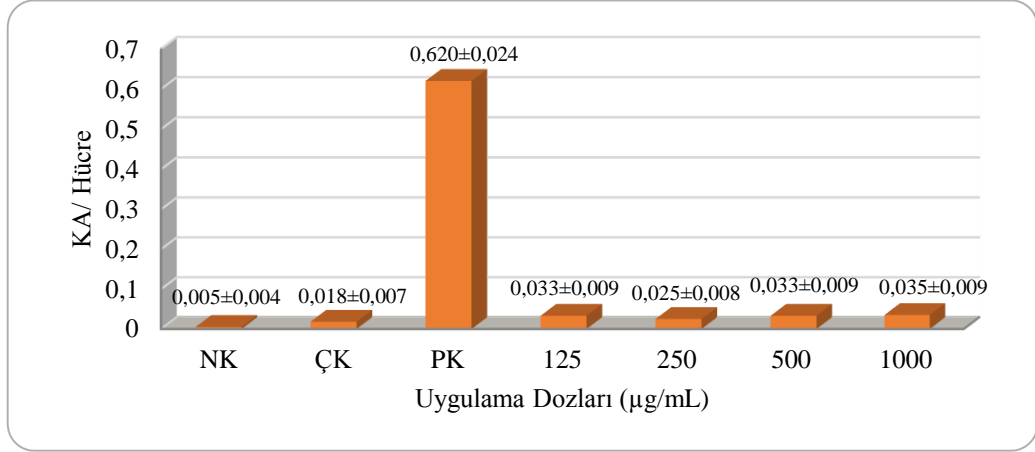
Şekil 4.10. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi



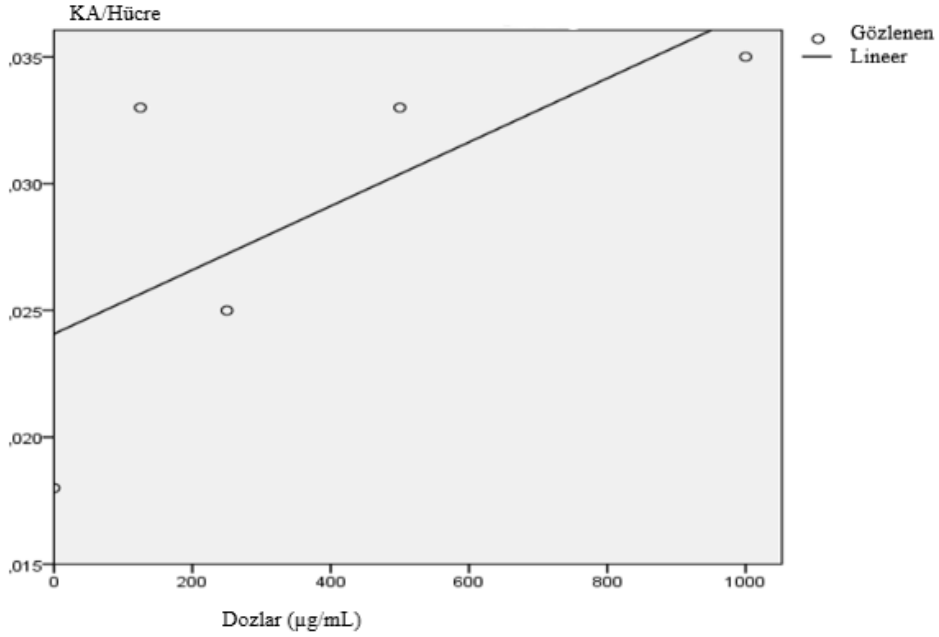
Şekil 4.11. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

24 saatlik KYE uygulamasında, kromozomal anormallik sayısının toplam hücreye olan oranına (KA/Hücre) bakıldığında ise, en yüksek oran 0,035 ile 1000 µg/mL'lik dozda, en düşük oran ise 0,025 ile 250 µg/mL'lik dozda görülmüştür (Şekil 4.12.). Bu oran istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, bütün dozlar negatif kontrole göre anlamlı şekilde yüksek çıkarken, hiçbir dozda çözücü kontrole göre anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.1.). Diğer bir yandan, doz-etki ilişkisine bakılırsa,

kromozomal anormallik sayısı hücre oranı ile çözücü kontrol arasında zayıf bir ilişki tespit edilmiştir ($r=0,696$) (Şekil 4.13.).



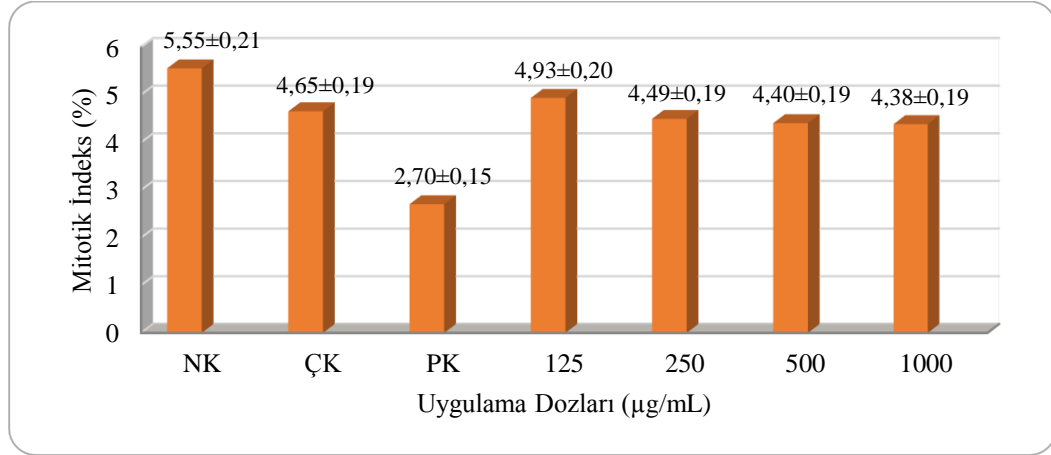
Şekil 4.12. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı



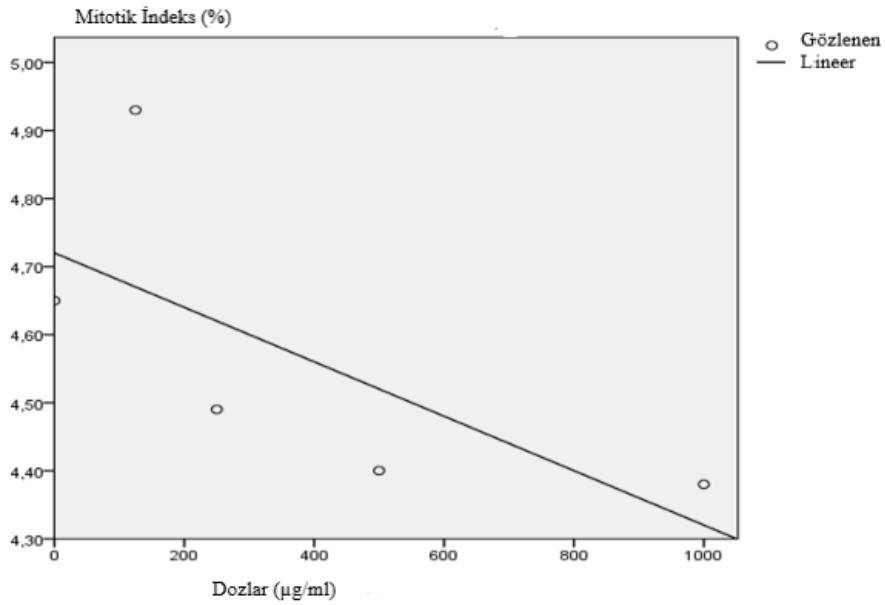
Şekil 4.13. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayısının doza bağlı ilişkisi

KYE ile yapılan 24 saatlik uygulama için mitotik indeks (Mİ) sonuçları değerlendirmeye alındığında, en yüksek Mİ değerinin 4,93 ile 125 µg/mL'lik dozda, en düşük değer ise 4,38 ile 1000 µg/mL'lik dozda olduğu görülmüştür (Şekil

4.14.). Mİ verileri istatistiksel olarak analiz edildiğinde ise, 24 saatlik uygulamada, hiçbir dozun çözücü kontrole göre anlamlı fark göstermediği tespit edilirken, bütün dozların negatif kontrole göre anlamlı olarak düşük olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo 4.1.). Bunlara ek olarak, aynı uygulamada, doz-etki ilişkisi açısından zayıf bir negatif ilişki bulunmuştur ($r=-0,694$) (Şekil 4.15.).

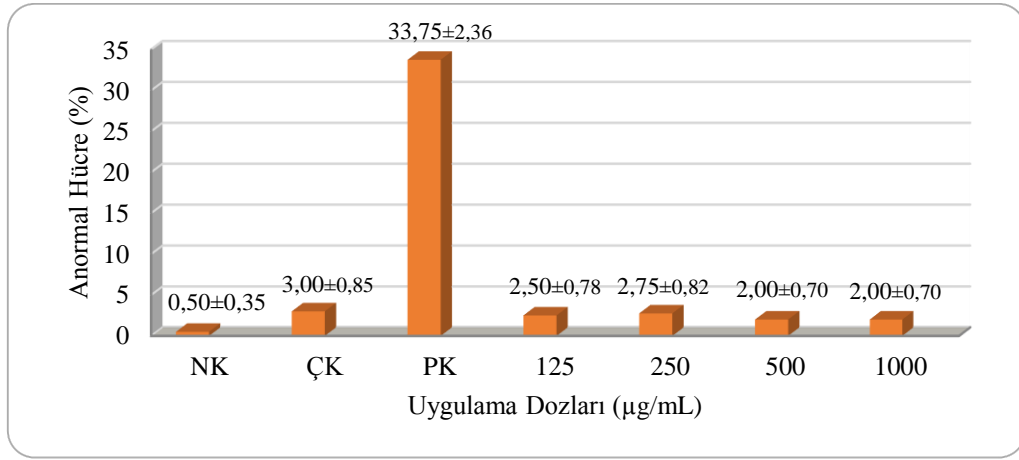


Şekil 4.14. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri

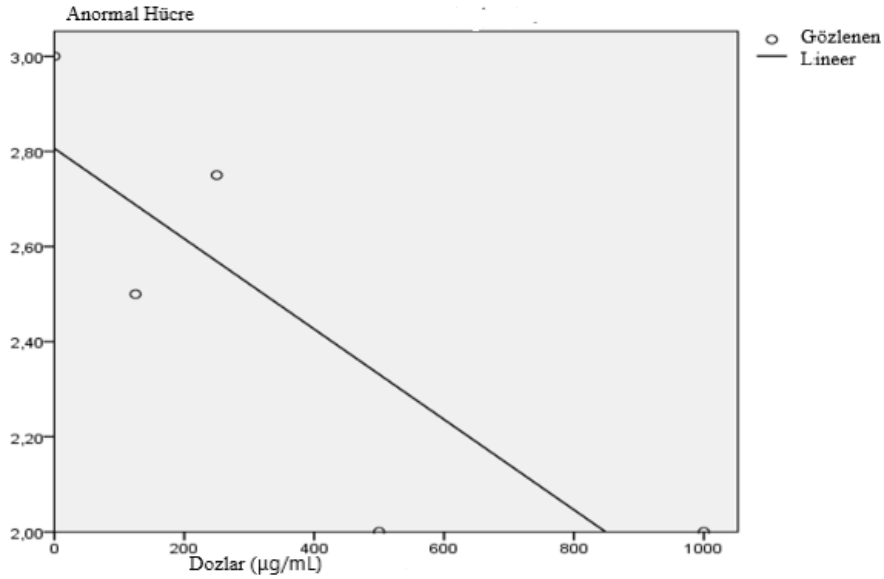


Şekil 4.15. KYE'nin 24 saatlik uygulamasında mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

48 saatlik uygulamaya bakıldığında, anormal hücre yüzdesi %2,75 ile en yüksek 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda ve %2,00 ile en düşük 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda görülmüştür (Şekil 4.16.). Uygulamadaki değerler istatistiksel olarak analiz edildiğinde, hiçbir doz çözücü kontrole göre anlamlı bir fark göstermezken, 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlar negatif kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir (Tablo 4.1.). Doz-etki ilişkisini değerlendirmeye aldığımızda ise, doz artışı ile anormal hücre yüzdesi arasında çözücü kontrole göre kuvvetli bir negatif ilişki mevcuttur ($r=-0,840$) (Şekil 4.17.).

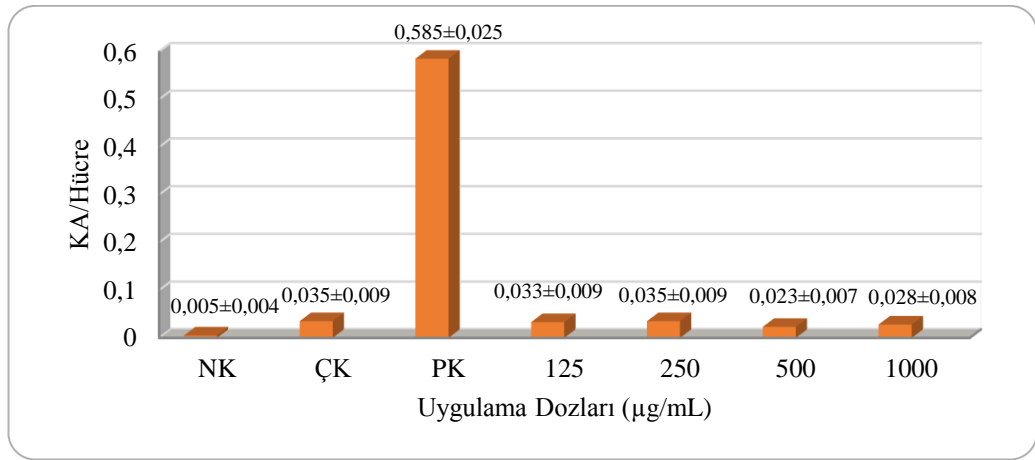


Şekil 4.16. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi

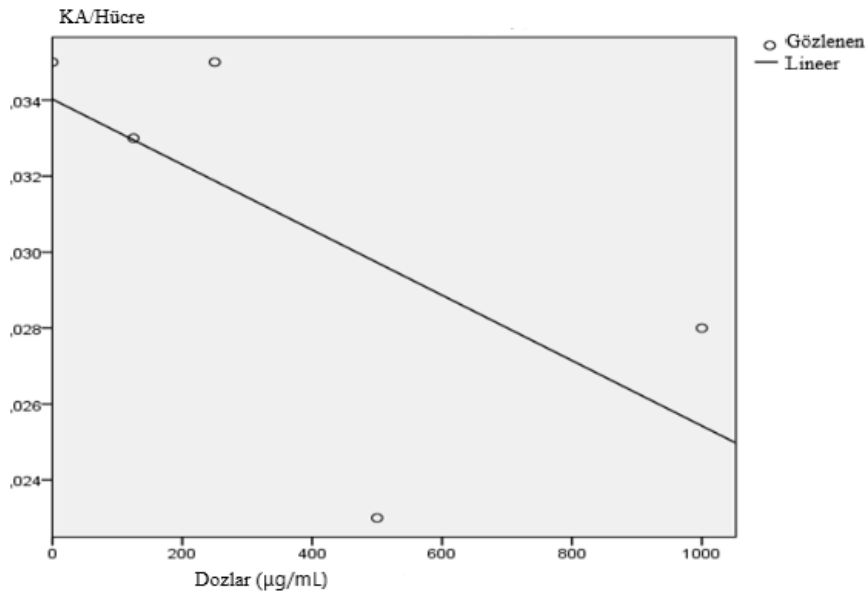


Şekil 4.17. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

KYE'nin kromozomal anormallik testi 48 saatlik uygulamasında, hücre başına düşen anormallik sayısı 0,035 ile 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda en yüksek, 0,023 ile 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda en düşüktür (Şekil 4.18.). Bu değerler istatistiksel olarak analiz edildiğinde, hiçbir dozda çözücü kontrole göre anlamlı fark yokken, bütün dozlar negatif kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4.1.). Aynı uygulama için, KA/Hücre oranı ile doz artışı arasında çözücü kontrole göre zayıf bir ilişki gözlenmiştir ($r=0,652$) (Şekil 4.19.).

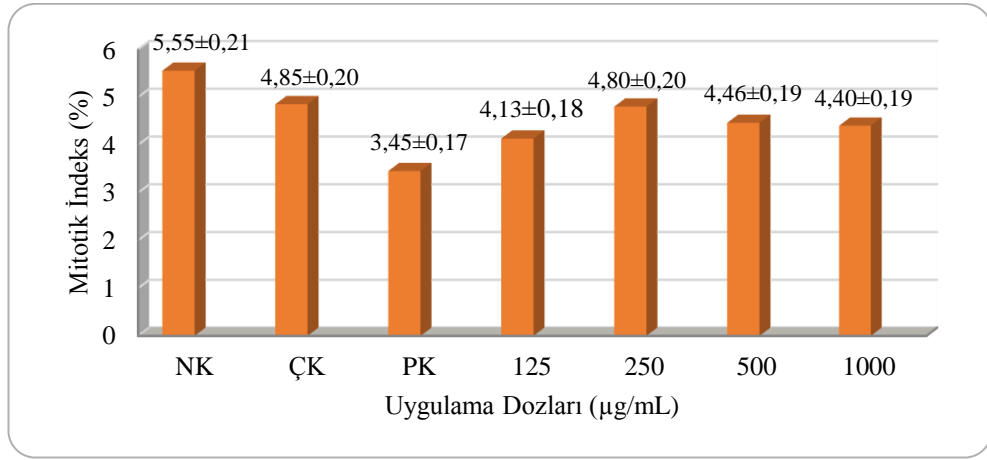


Şekil 4.18. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı

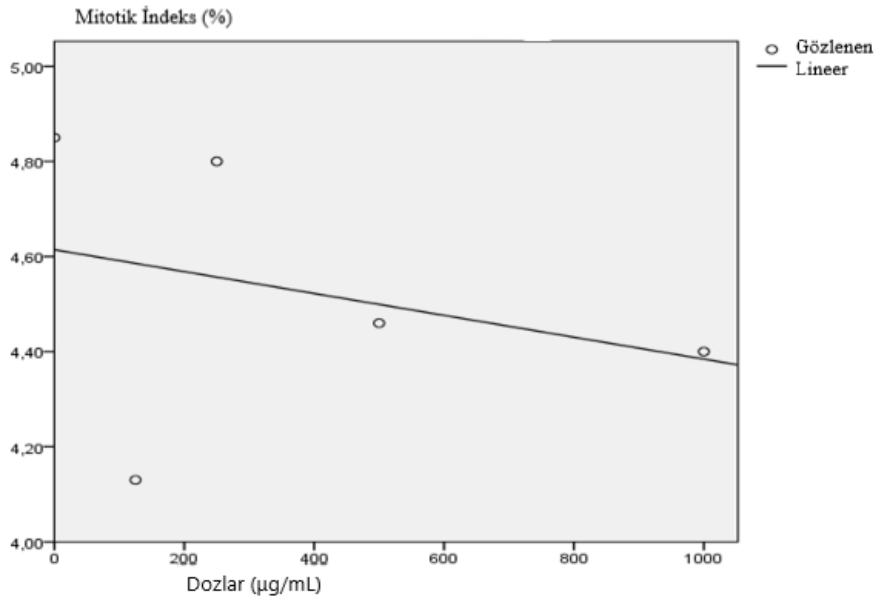


Şekil 4.19. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayısının doza bağlı ilişkisi

KYE ile yapılan 48 saatlik uygulama sonucunda, mitotik indeks 125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 4,13 ile en düşük ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 4,80 ile en yüksektir (Şekil 4.20.). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, mitotik indeks yüzdeleri, bütün dozlarda negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunurken, çözücü kontrole göre sadece 125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik doz anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 4.1.). Bu uygulamada, mitotik indeks ile doz artışı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($r=-0,304$) (Şekil 4.21.).



Şekil 4.20. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



Şekil 4.21. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında mitotik indeks yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

4.1.2. Mikronükleus testi bulguları

Mikronükleus testinde, kromozomal anormallik testinde olduğu gibi 4 sağlıklı bireyden periferal kan alınarak *in vitro* ortamda 72 saat kültüre edilmiş, 48 saatlik uygulama ile KYE'nin 4 farklı dozu (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) negatif kontrol, çözücü kontrol (metanol) ve pozitif kontrol (MMC) grupları oluşturulmuştur. Her bireyden her bir dozdan 1000 (toplamda her bir doz için 4000) binükleat hücre sayılmıştır. Tespit edilen mikronükleus frekansları Tablo 4.2.'de verilmiştir. KYE uygulamasının 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL'lik dozlarının hepsinde bir mikronükleus içeren binükleat hücreler bulunurken, sadece 1000 µg/mL'lik dozda bir adet 2 mikronükleuslu binükleat hücreye rastlanmıştır (Tablo 4.2.). Gözlenen mikronükleuslar Şekil 4.22.- Şekil 4.23.'da verilmiştir.

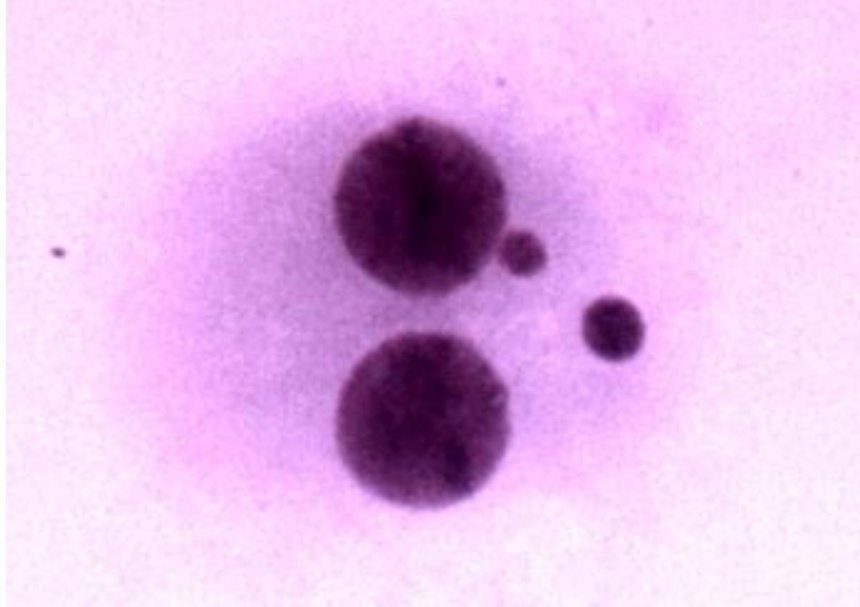
Tablo 4.2. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında görülen mikronükleus frekansları

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan BN Hücre Sayısı	BN Hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları			MN (%) \pm SH
	Periyot (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)	
NK	48	0	4000	7	2	-	0,275 \pm 0,08
ÇK	48	10 µl	4000	9	1	-	0,275 \pm 0,08
PK	48	0,20	4000	130	8	1	3,725 \pm 0,30
KYE	48	125	4000	16	-	-	0,400 \pm 0,09
		250	4000	11	-	-	0,275 \pm 0,08
		500	4000	10	-	-	0,250 \pm 0,07
		1000	4000	6	1	-	0,200 \pm 0,07

NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, KYE: Karayemiş Ekstraktı, BN: Binükleat, MN: Mikronükleus, SH: Stardart Hata

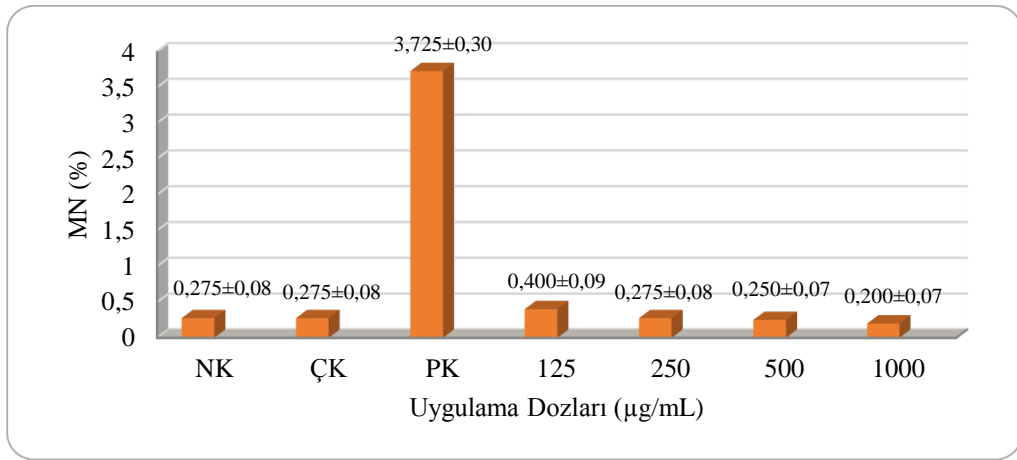


Şekil 4.22. KYE uygulaması ile oluşan bir adet mikronükleuslu binükleat hücre

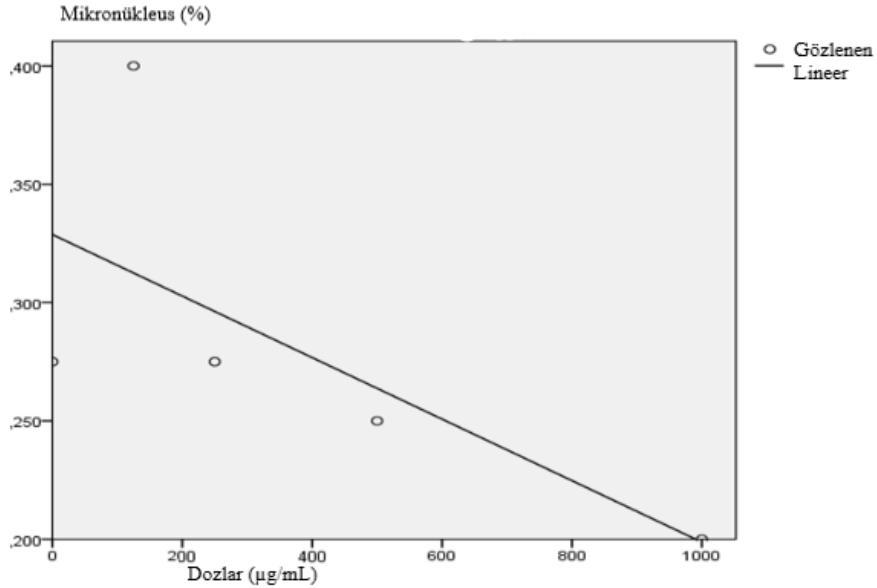


Şekil 4.23. KYE uygulaması ile oluşan iki adet mikronükleuslu binükleat hücre

KYE ile yapılan 48 saatlik muamele sonucunda oluşan MN'lerin yüzde frekansları 0,400 ile en yüksek 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda, 0,200 ile en düşük 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik dozda görülmektedir (Şekil 4.24.). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirmeye alındığında ise, hiçbir dozun hem negatif kontrole ve hem de çözücü kontrole karşı anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür (Tablo 4.2.). Ayrıca, MN oluşumu ve KYE uygulaması arasında doz-etki ilişkisine bakıldığında ise zayıf bir negatif ilişki bulunmuştur ($r=-0,719$) (Şekil 4.25.).



Şekil 4.24. KYE uygulamasında dozlara göre MN frekansı



Şekil 4.25. KYE uygulamasında mikronükleus yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

4.2. Karayemiş Ekstraktının Antigenotoksik Etkisi

KYE'nin antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için kromozomal anormallik (KA) testi ve mikronükleus (MN) testi uygulanmıştır.

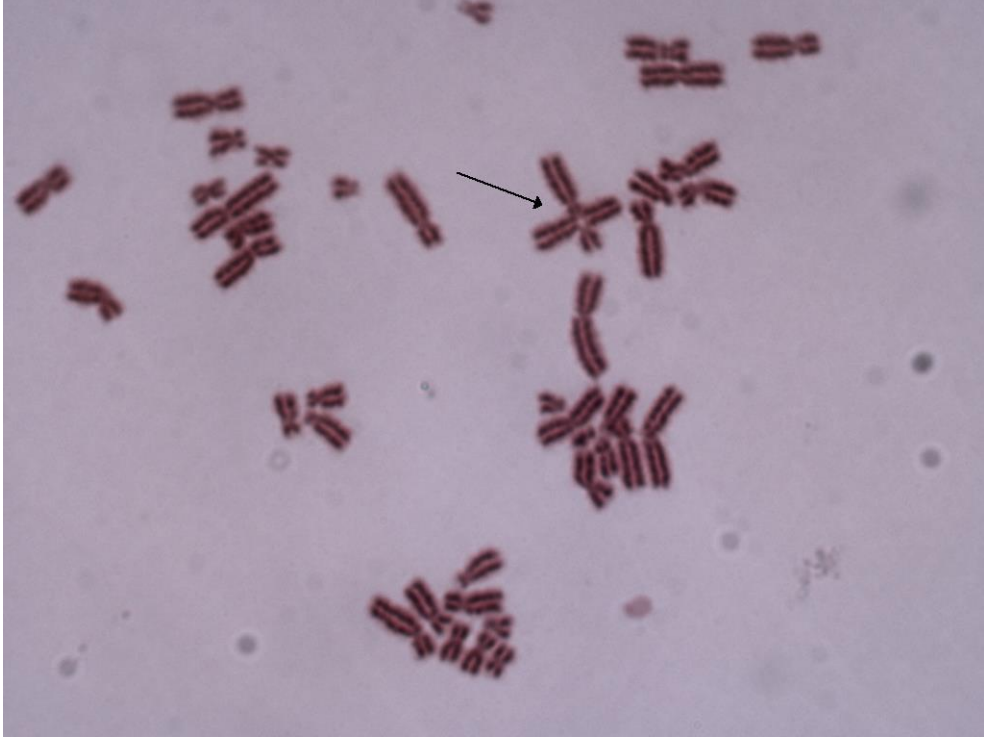
4.2.1. Kromozomal anormallik testi bulguları

Kromozomal anormallik testi için genotoksisite belirlemede olduğu gibi, sağlıklı 2 bayan 2 erkek donörden alınan periferik kan in vitro ortamda 72 saat kültüre bırakılmış ve kültürün 24. ve 48. saatlerinde karayemiş ekstraktı (KYE) ile birlikte pozitif kontrol kimyasal olan mitomisin C (MMC) maddesi eklenerek muamele edilmiştir. Çalışmamızda MMC ve MMC+ 4 farklı KYE dozu (PK+125 µg/mL, PK+250 µg/mL, PK+500 µg/mL ve PK+1000 µg/mL) kullanılmıştır. Her dozdan bir birey için 100 metafaz plağında hücre (toplamda 4 kişi için her bir dozdan 400 hücre) incelenmiş ve anormallikler tespit edilmiştir. Ayrıca mitotik indeks için, her dozdan her birey için 3000 (toplam 4 kişi için her bir dozdan 12000) hücre sayılmıştır. Tablo 4.3.'de uygulama sonucunda gözlenen yapısal anormallikler, anormal hücre yüzdesi, kromozomal anormalliklerin toplam hücreye oranı (KA/Hücre) ve mitotik indeks sonuçları verilmiştir. 24 ve 48 saatlik her iki uygulamada da en çok görülen yapısal anormallik kromatid kırığı olmuştur. Bunu kromozom kırığı, fragment ve kromatid değişimi takip etmektedir. Antigenotoksik değerlendirme için yapılan bu testin 24 saatlik uygulamasında 125 µg/mL'lik ve 250 µg/mL'lik dozlarda kardeş kromatidlerde birleşme de görülmüştür. Yine 48 saatlik muamelenin 500 µg/mL'lik dozda bir adet disentrik kromozom ve 1000 µg/mL'lik dozda disentrik kromozom ve kardeş kromatidlerde birleşme de saptanmıştır. Kromozom anormallik testinin genotoksisite uygulamasında gözlenmeyen kromatid değişimi Şekil 4.26.'da gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada araştırmamızın bu grubunda da kromozomal anormallik testi sonucunda sayısal anormalliğe rastlanmamıştır.

Tablo 4.3. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde antigenotoksik ve antisitotoksik etkisi

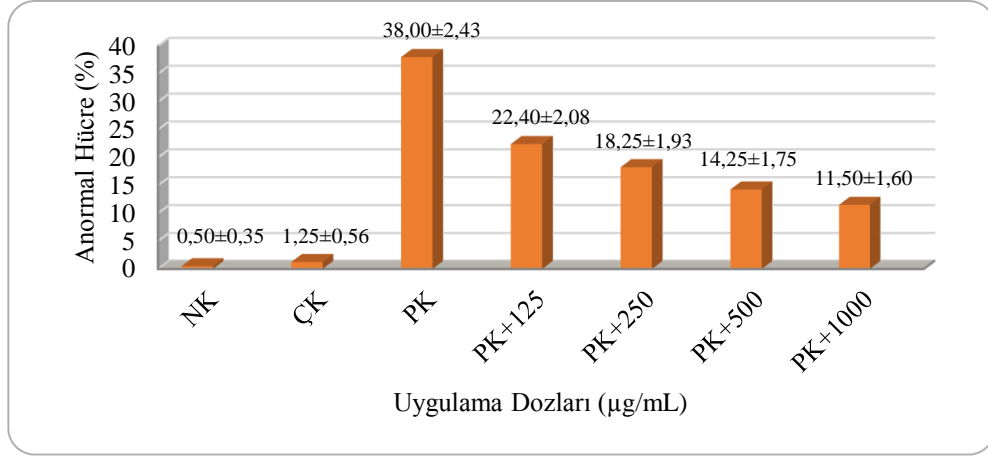
Test Maddesi	Uygulama		Yapısal anormallikler						Anormal Hücre ±SH (%)	KA/Hücre ±SH	Mİ ±SH (%)
	Periyot (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Ktk	Kzk	F	Ktd	Kkb	Ds			
PK	24	0,20	54	66	38	2	9	1	38,00± 2,43	0,620± 0,0242	2,70± 0,15
PK+KYE	24	125+0,20	48	28	14	6	2		22,40± 2,08***	0,335± 0,0236***	3,23± 0,16*
		250+0,20	37	21	12	4	1		18,25± 1,93***	0,253± 0,0217***	3,75± 0,17***
		500+0,20	24	18	13	2			14,25± 1,75***	0,192± 0,0197***	3,69± 0,17***
		1000+0,20	25	13	6	2			11,50± 1,60***	0,153± 0,0180***	3,56± 0,17***
PK	48	0,20	59	56	27	15	3		33,75±2,36	0,585± 0,0246	3,45± 0,17
PK+KYE	48	125+0,20	47	25	21	10			24,25± 2,14**	0,345± 0,0238***	2,92± 0,15
		250+0,20	39	15	14	6			18,00± 1,92***	0,238± 0,0213***	3,38± 0,16
		500+0,20	30	9	12	13		1	15,50± 1,81***	0,220± 0,0207***	3,57± 0,17
		1000+0,20	31	6	4	6	4	1	12,75± 1,67***	0,173± 0,0189***	3,38±0,16

PK: Pozitif Kontrol, KYE: Karayemiş Ekstraktı, Ktk: Kromatid Kırığı, Kzk: Kromozom Kırığı, F: Fragment, Ktd: Kromatid Değişimi, Kkb: Kardeş Kromatidlerde Birleşme, Ds: Disentrik Kromozom, KA: Kromozomal Anormallik, SH: Standart Hata, Mİ: Mitotik İndeks
Kromozomal anormalliklerde her doz için 400 metafaz hücresi, mitotik indeks için 12000 hücre incelenmiştir.
*Pozitif kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
**Pozitif kontrole göre p< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)
***Pozitif kontrole göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

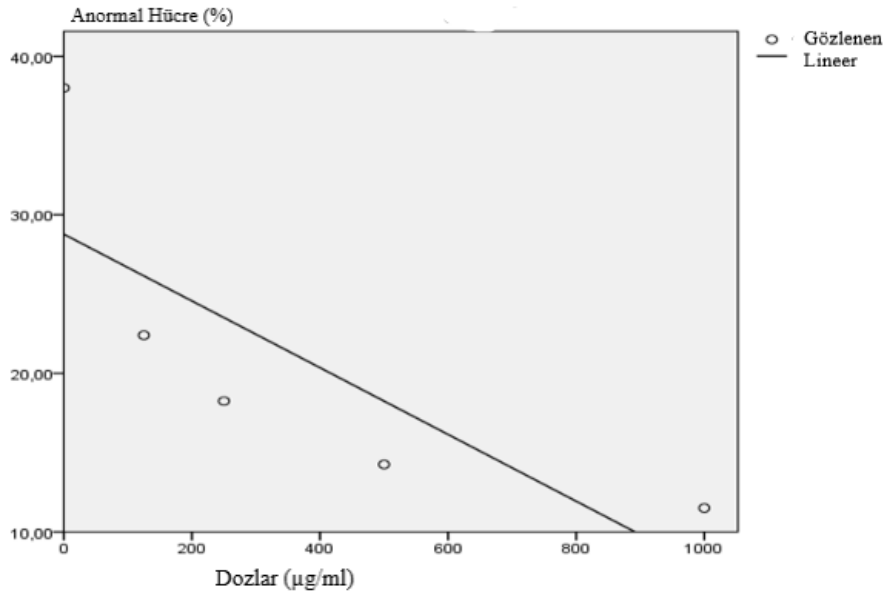


Şekil 4.26. PK+KYE' nin 24 saatlik uygulamasında görülen kromatid değişimi

Antigenotoksik etkinin belirlenmesi için yapılan bu çalışmada 24 saatlik uygulama sonucunda pozitif kontrol grubunun anormal hücre yüzdesi %38,00 olarak belirlenmiştir. Aynı periyotta dozların uygulamasına bakıldığında ise, anormal hücre yüzdesi %11,50 ile en düşük PK+1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda, %22,40 ile en yüksek PK+125 $\mu\text{g/mL}$ ' lik dozda görülmüştür (Şekil 4.27.). Verilerin istatistiksel analizinde, bütün dozlar pozitif kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.3.). Bununla beraber, düşük dozdan yüksek doza doğru bakıldığında anormal hücre yüzdesinde düşüş izlenmektedir. Doz-etki ilişkisine bakıldığında ise, anormal hücre yüzdesi ile doz artışı arasında pozitif kontrole göre kuvvetli bir negatif ilişki saptanmıştır ($r=-0,799$) (Şekil 4.28.).

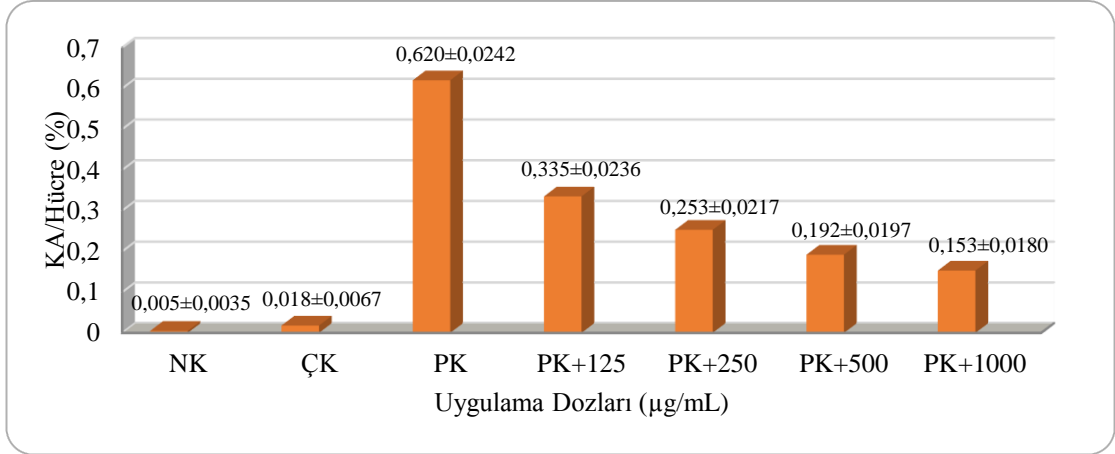


Şekil 4.27. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi

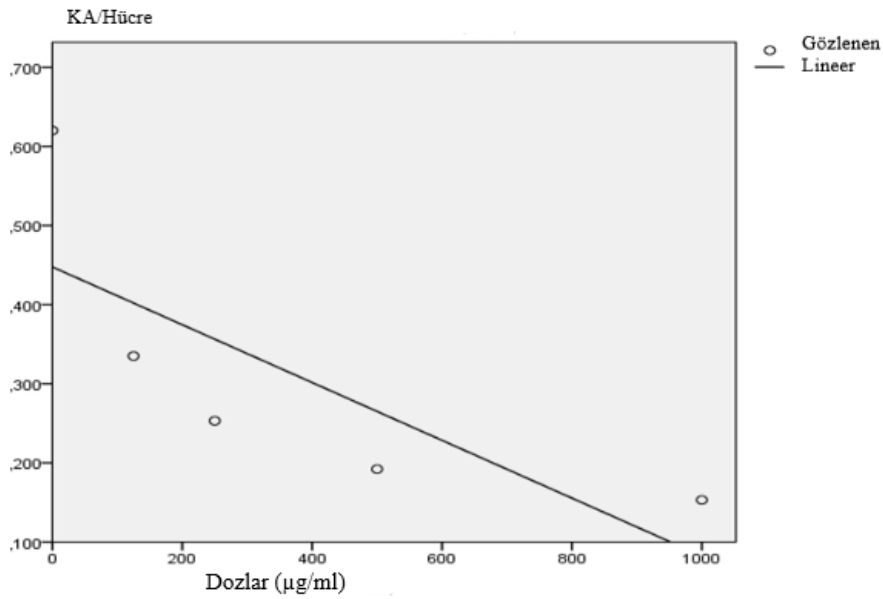


Şekil 4.28. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

PK+KYE'nin 24 saatlik uygulamasında, hücre başına düşen anormallik sayısına bakıldığında %0,335 ile PK+125 µg/mL'lik doz en yüksek, 0,153 ile PK+1000 µg/mL'lik doz en düşük değere sahiptir (Şekil 4.29.). Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, bütün dozlar pozitif kontrole kıyasla anlamlı düşük çıkmıştır (Tablo 4.3.). Ayrıca, doz-etki ilişkisi bakımından doz artışı ile hücre başına düşen anormallik sayısında pozitif kontrole kıyasla kuvvetli bir negatif ilişki bulunmuştur ($r=-0,776$) (Şekil 4.30.).



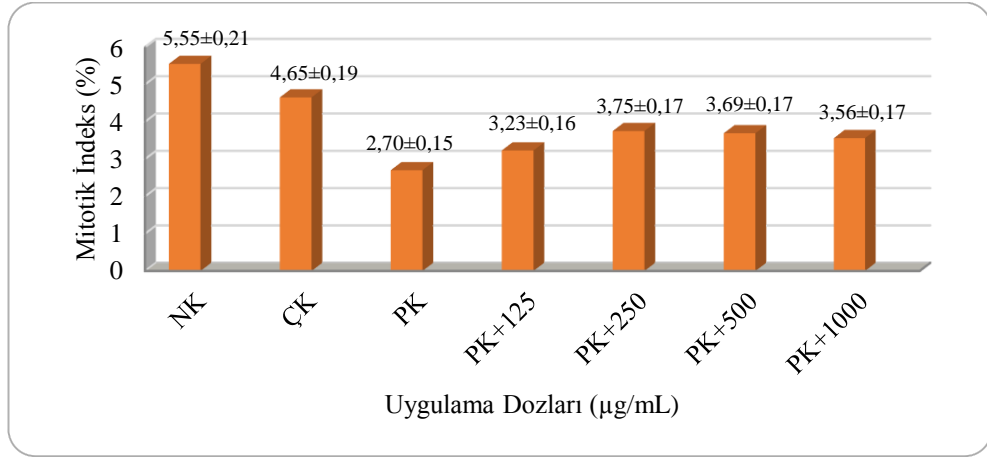
Şekil 4.29. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı



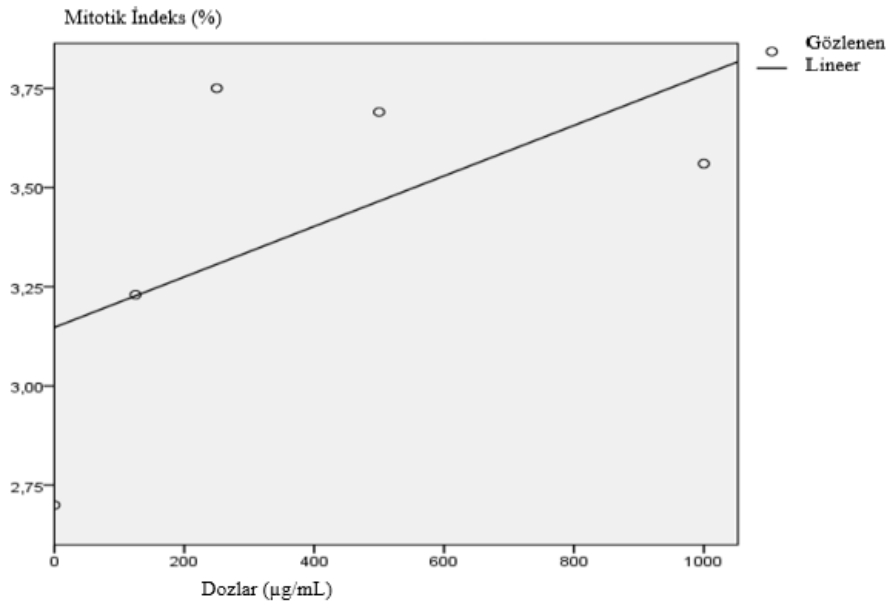
Şekil 4.30. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında KA/Hücre oranının doza bağlı ilişkisi

24 saatlik PK+KYE uygulamasının mitotik indeks değerlerinde, PK+125 µg/mL'lik doz 3,23 ile en düşük, PK+250 µg/mL'lik doz 3,75 ile en yüksektir (Şekil 4.31.). Veriler istatistiksel olarak değerlendirmeye alındığında ise, bütün dozlarda pozitif kontrole göre anlamlı bir artış görülmüştür (Tablo 4.3.). Bununla beraber, bu uygulama doz-etki ilişkisi bakımından değerlendirildiğinde ise, doz artışı ile birlikte

mitotik indeks değerinde pozitif kontrole kıyasla zayıf bir ilişki bulunmuştur ($r=0,581$) (Şekil 4.32.).



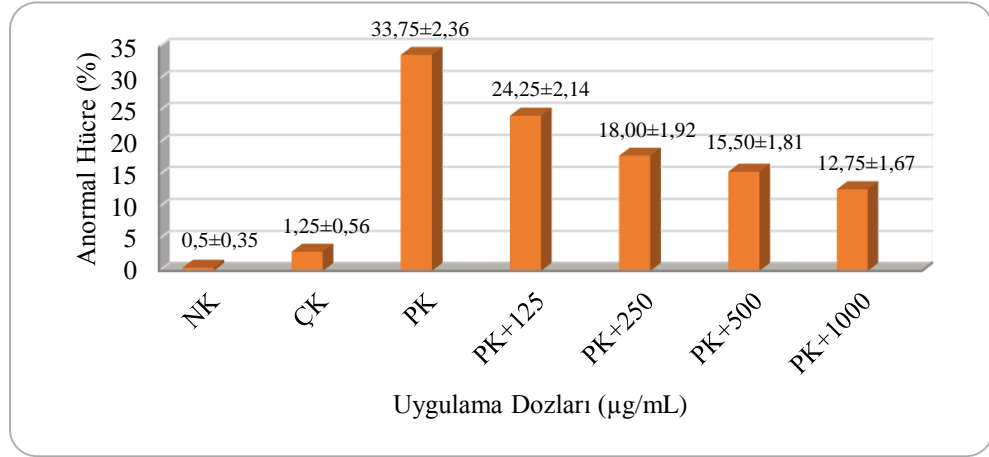
Şekil 4.31. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değerleri



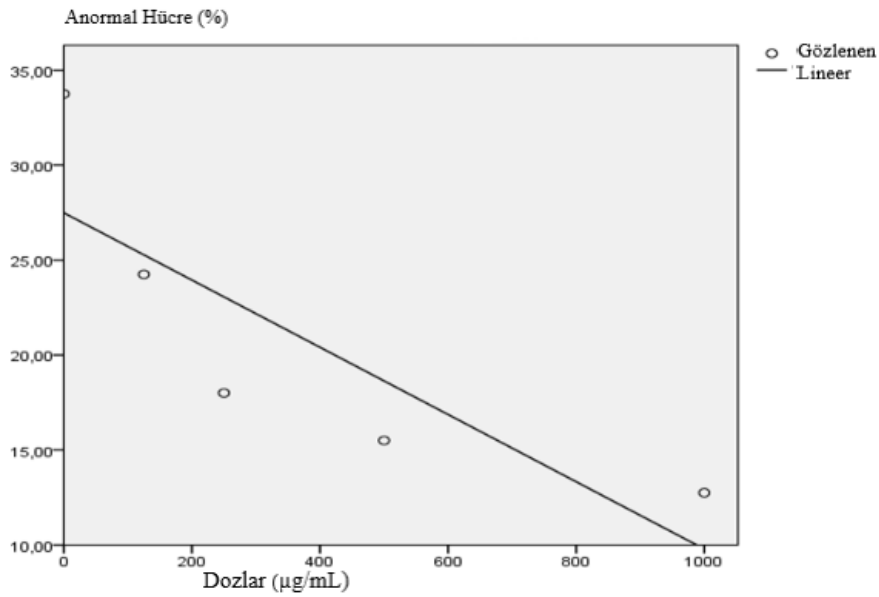
Şekil 4.32. PK+KYE 'nin 24 saatlik uygulamasında mitotik indeks değerinin doza bağlı ilişkisi

48 saatlik PK+KYE uygulamasının anormal hücre yüzdesi değerlendirildiğinde, PK+125 µg/mL'lik doz 24,25 ile en yüksek, PK+1000 µg/mL'lik doz 12,75 ile en düşük değere sahiptir (Şekil 4.33.). Bu değerler istatistiksel değerlendirmeye tabii tutulduğunda, bütün dozlar pozitif kontrole göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır

(Tablo 4.34.). Ayrıca, doz-etki ilişkisi bakımından pozitif kontrole göre kuvvetli bir negatif ilişki tespit edilmiştir ($r=-0,836$) (Şekil 4.34.).



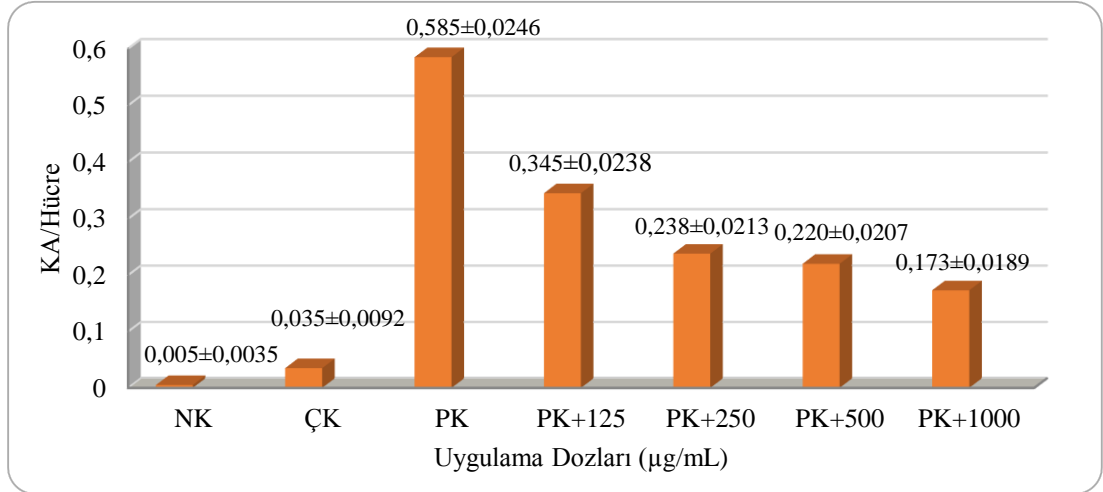
Şekil 4.33. PK+KYE 'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre anormal hücre yüzdesi



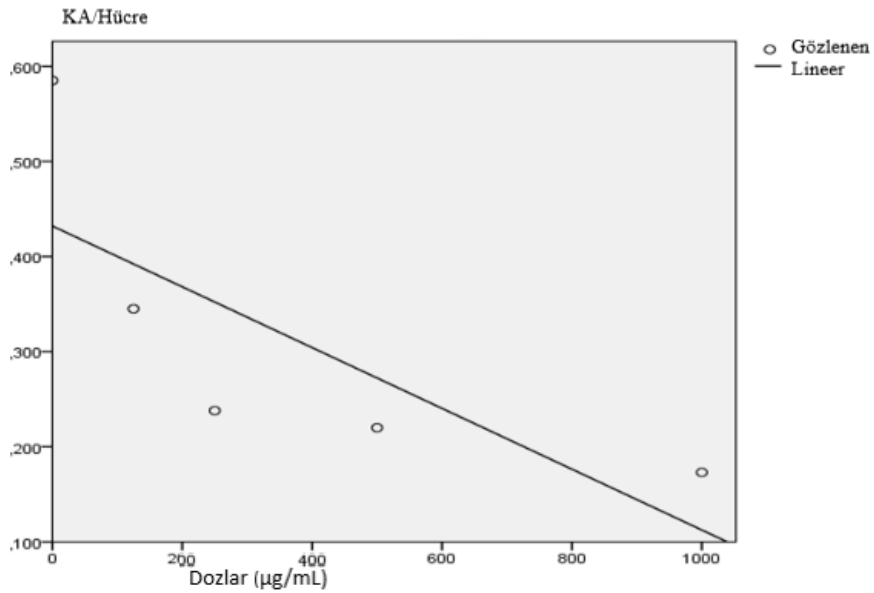
Şekil 4.34. PK+KYE 'nin 48 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında hücre başına düşen anormallik sayısı değerlendirildiğinde, PK+125 µg/mL'lik doz 0,345 ile en yüksek, 0,173 ile PK+1000 µg/mL'lik doz en düşük değeri vermiştir (Şekil 4.35.). KA/Hücre oranı pozitif

kontrole göre kıyaslandığında, bütün dozlar anlamlı olarak düşük çıkmıştır (Tablo 4.3.). Ayrıca, doz-etki ilişkisi bakımından, doz arttıkça KA/Hücre oranı ile pozitif kontrol arasında kuvvetli bir negatif ilişki olduğu görülmüştür ($r=-0,766$) (Şekil 4.36.).

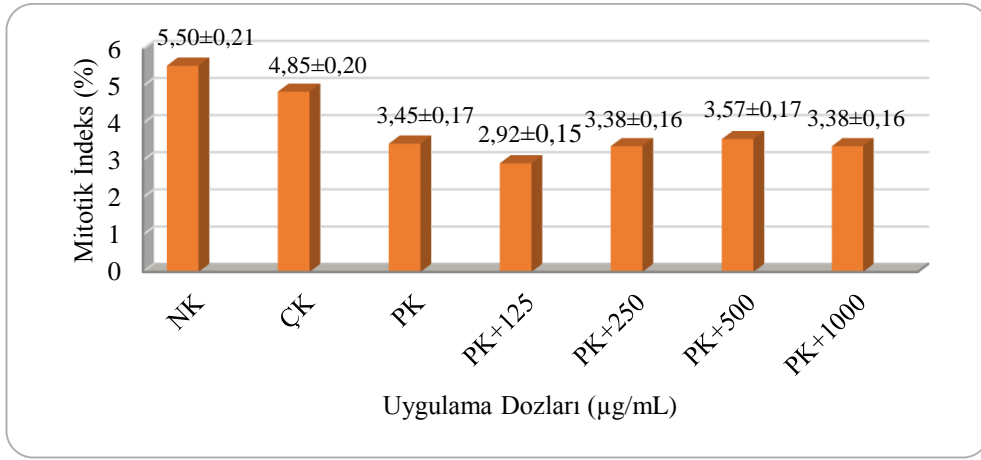


Şekil 4.35. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre KA/Hücre oranı

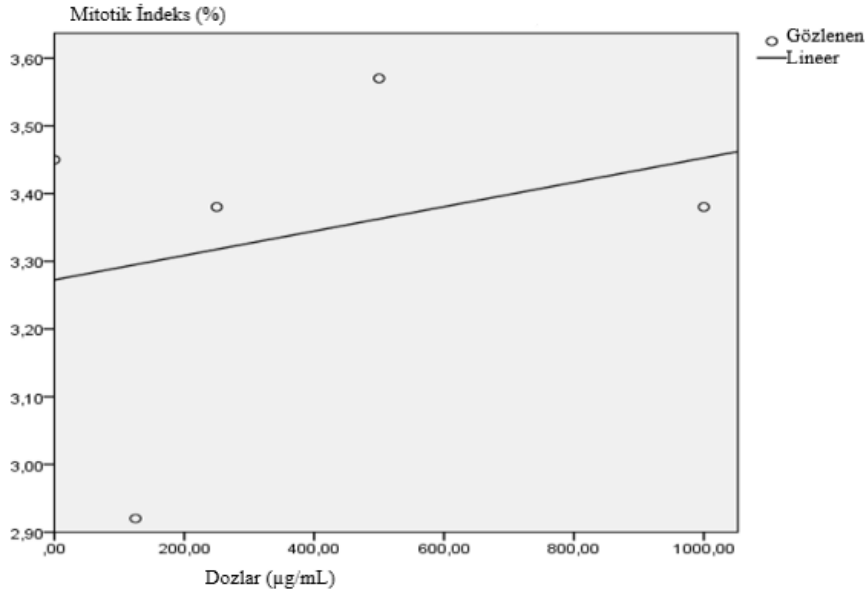


Şekil 4.36. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında KA/Hücre oranının doza bağlı ilişkisi

48 saatlik PK+KYE uygulamasında mitotik indeks yüzdeleri değerlendirildiğinde, PK+125 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 2,92 ile en düşük, PK+500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda 3,57 ile en yüksek mitotik indeks yüzdesi görülmüştür (Şekil 4.37.). Aynı zamanda, bu veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde, hiçbir doz pozitif kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir (Tablo 4.3.). Bununla beraber, doz-etki ilişkisi bakımından, mitotik indeks değeri doz arttıkça pozitif kontrole göre ilişki bulunamamıştır ($r=0,282$) (Şekil 4.38.).



Şekil 4.37. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında dozlara göre mitotik indeks değeri



Şekil 4.38. PK+KYE'nin 48 saatlik uygulamasında mitotik indeks değerinin doza bağlı ilişkisi

4.2.2. Mikronükleus testi bulguları

KYE'nin antigenotoksik etkisini saptamak için kullanılan diğer bir metot mikronükleus testidir. Bu testte, kromozomal anormallik testinde olduğu gibi 4 sağlıklı bireyden periferik kan alınarak in vitro ortamda 72 saat kültüre edilmiş, 48 saatlik uygulama ile KYE'nin 4 farklı dozu (PK+125 µg/mL, PK+250 µg/mL, PK+500 µg/mL ve PK+1000 µg/mL) ile birlikte mitomisin C'nin genotoksik etkisine karşı KYE'nin koruyuculuğu test edilmiştir. Bu grupların yanında pozitif kontrol (MMC) grubu da oluşturulmuştur. Her bireyden her bir dozdan 1000 (toplamda her bir doz için 4000) binükleat hücre sayılmıştır. Tespit edilen mikronükleus frekansları Tablo 4.4.'de verilmiştir. PK+KYE uygulamasının PK+125 µg/mL, PK+250 µg/mL, PK+1000 µg/mL'lik dozlarında 1 ve 2 mikronükleus içeren binükleat hücreler gözlemlenmiştir. PK+500 µg/mL'lik dozda ise sadece 1 mikronükleus içeren binükleat hücreler tespit edilmiştir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. KYE'nin 48 saatlik uygulamasında insan lenfosit hücreleri üzerinde antigenotoksik etkisi mikronükleus sonuçları

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan BN Hücre Sayısı	BN Hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları			MN (%)±SH
	Periyot (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)	
ÇK	48	10 µl	4000	9	1	-	0,275±0,08
PK	48	0,20	4000	130	8	1	3,725±0,30
PK+KYE	48	125+0,20	4000	93	3	-	2,475±0,25*
		250+0,20	4000	83	2	-	2,175±0,23**
		500+0,20	4000	51	-	-	1,275±0,18**
		1000+0,20	4000	25	1	-	0,675±0,13**

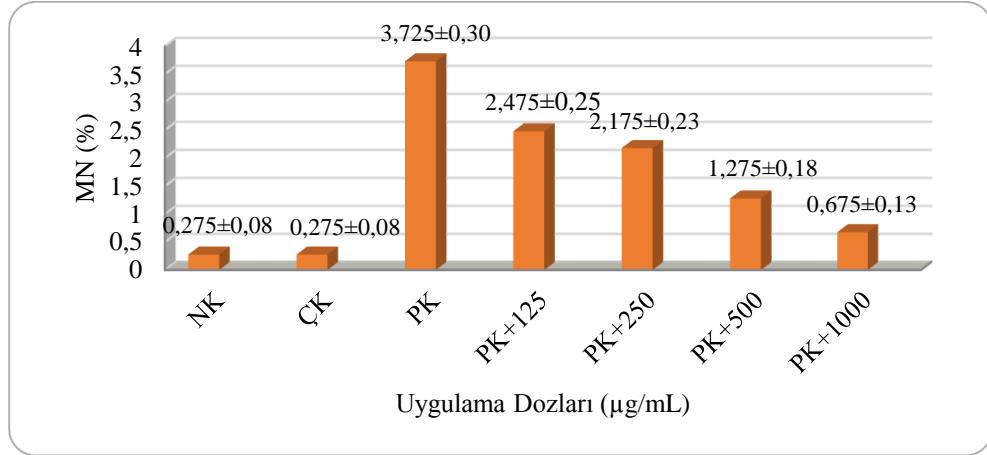
BN: Binükleat, MN: Mikronükleus, SH: Standart Hata, PK: Pozitif Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, KYE: Karayemiş Ekstraktı

*Pozitif kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

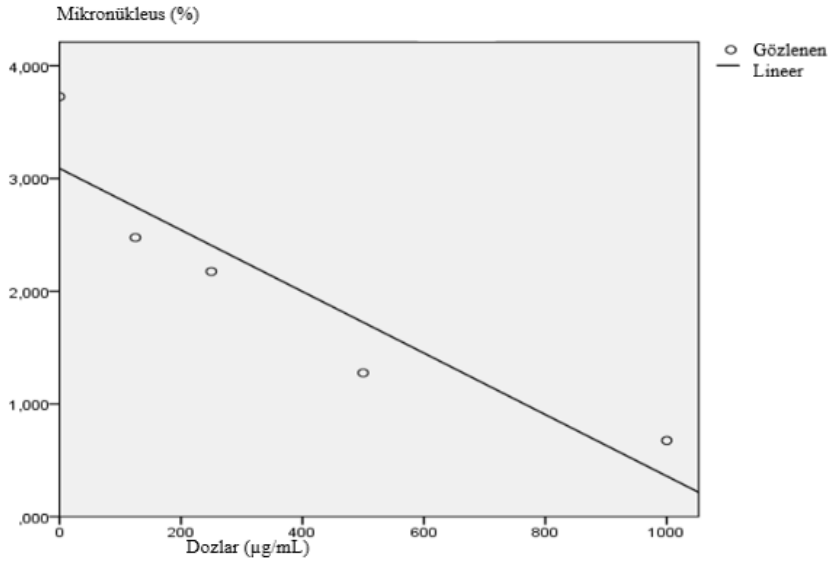
**Pozitif kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)

PK+KYE ile yapılan 48 saatlik muamele sonucunda oluşan MN'lerin yüzde frekansları %2,475 ile PK+125 µg/mL'lik dozda en yüksek, %0,675 ile PK+1000 µg/mL'lik dozda en düşük değeri vermiştir (Şekil 4.39.). Veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bütün dozlarda pozitif kontrole göre anlamlı bir şekilde

azalmanın olduğu görülmüştür (Tablo 4.4.). Ayrıca, doz-etki ilişkisine bakıldığında, doz artışı ile MN frekansı arasında pozitif kontrole göre kuvvetli bir negatif ilişki tespit edilmiştir ($r=-0,925$) (Şekil 4.40.).



Şekil 4.39. PK+KYE uygulamasında dozlara göre MN frekansı



Şekil 4.40. PK+KYE uygulamasında mikronükleus yüzdesinin doza bağlı ilişkisi

4.3. Karayemiş Ekstraktının Antioksidan Etkisi

KYE'nin antioksidan enzimler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) analizleri hücre kültüründen elde edilen süpernatant numuneler kullanılarak yapılmıştır. Aynı zamanda, örneklerdeki total protein düzeyleri doğru enzim aktivitesinin belirlenmesi için analiz edilmiştir.

4.3.1. Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan karayemiş ekstraktı toplam fenolik madde analizinin gallik asit eş değeri 82,75 mg GA/100 g olarak tespit edilmiştir.

4.3.2. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit analiz sonuçları

Bu analiz metotunda da genotoksisite testlerinde kullanılan aynı deney grupları oluşturulmuştur. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit değerlerinde anlamlı fark olup olmadığını anlamak için, dozlar (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL) çözücü kontrol ile kıyaslanmıştır. MMC'nin oksidatif stres oluşturduğunu tespit etmek için pozitif kontrol grubu ile negatif kontrol grubu karşılaştırılırken, KYE'nin MMC'nin oksidatif hasarına karşı koruyucu rolünün belirlenmesi açısından, MMC eklenmiş dozlarla (PK+125 µg/mL, PK+250 µg/mL, PK+500 µg/mL ve PK+1000 µg/mL) pozitif kontrol karşılaştırılmıştır. Farklı periyot ve dozlardaki KYE uygulamasının antioksidan enzim ve parametre olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) analiz sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Tablo 4.5. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve malondialdehit seviyeleri üzerine etkisi

Dozlar (µg/mL)	Uygulama periyodu (saat)	SOD (U/mg protein) ±SH	GPx (U/g protein) ±SH	MDA (µmol/L) ±SH
NK	24	3,231±0,017	0,789±0,247	1,411±0,017
ÇK		2,658±0,247	0,545±0,201	2,386±0,247
PK		2,769±0,097	0,268±0,158	3,287±0,096
125		2,493±0,250	0,464±0,202	2,071±0,251
250		2,711±0,210	0,321±0,174	3,944±0,211
500		2,564±0,256	0,819±0,081	2,132±0,256
1000		2,813±0,162	0,387±0,158	1,754±0,162
125+PK		2,751±0,003	0,592±0,268	1,081±0,004
250+PK		2,911±0,170	0,364±0,152	1,001±0,170
500+PK		2,956±0,200	0,539±0,224	2,228±0,200
1000+PK		2,458±0,150	0,339±0,134	2,183±0,150
NK	48	3,231±0,017	0,789±0,247	1,411±0,017
ÇK		1,576±0,205	0,145±0,046	2,592±0,205
PK		1,710±0,131 ^a	0,244±0,119	3,405±0,131
125		2,267±0,114	1,323±0,048	2,811±0,114
250		2,462±0,277	0,470±0,208	3,278±0,277
500		2,964±0,237 ^b	1,537±0,075 ^b	2,190±0,237
1000		2,667±0,230	1,902±0,569 ^b	2,687±0,230
125+PK		2,538±0,066	0,415±0,192	2,287±0,066
250+PK		2,900±0,047	1,404±0,381	2,788±0,047
500+PK		2,980±0,015 ^c	0,463±0,137	3,748±0,015
1000+PK		2,403±0,483	0,651±0,022	3,068±0,483

K: Negatif Kontrol, ÇK: Çözücü kontrol, PK: Pozitif kontrol, SOD: Süperoksit dismutaz, GPx: Glutatyon peroksidaz, MDA: malondialdehit, SH: Standart hata

^a Negatif Kontrole göre anlamlı fark vardır (p<0,05)

^b Çözücü kontrole göre anlamlı fark vardır (p<0,05)

^c Pozitif kontrole göre anlamlı fark vardır (p<0,05)

SOD enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında, 24 saatlik doz uygulamasında, hiçbir dozda çözücü kontrole göre anlamlı bir artış ya da azalış olmadığı görülmektedir. Pozitif kontrol açısından değerlendirmede ise, pozitif kontrol ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı fark olmadığı gibi MMC eklenmiş hiçbir dozda da yine pozitif kontrole göre anlamlı fark tespit edilememiştir. SOD enzim aktivitesi için 48 saatlik uygulama sonuçlarına bakılırsa, 500 µg/mL'lik doz çözücü kontrole göre anlamlı yüksek çıkarken, diğer dozlarda anlamlı fark bulunamamıştır. Buna rağmen

125 µg/mL'lik ile 500 µg/mL'lik doz arasında sürekli bir artış gözlenmiş, sadece 1000 µg/mL'lik dozda düşüş görülmüştür ve dozların hepsi anlamsız da olsa çözücü kontrolden yüksek çıkmıştır. Yine aynı uygulama için, pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubuna göre anlamlı düşük çıkarken, PK+500 µg/mL dozu pozitif kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Tablo 4.5'te MMC eklenmiş dozlara genel olarak bakıldığında, PK+125 µg/mL ile PK+500 µg/mL arası düzenli bir yükselişin olduğu ve PK+1000 µg/mL dozda düşüş olduğu görülmüştür ve KYE ekli dozların hepsi PK'dan yüksek çıkmıştır.

GPx enzim aktivitesi sonuçlarına bakılırsa, 24 saatlik KYE uygulamasında hiçbir doz çözücü kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir. Aynı zamanda gerek pozitif kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında gerekse, MMC eklenmiş hiçbir doz ile pozitif kontrol arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Aynı enzim aktivitesi için 48 saatlik uygulama sonucuna bakıldığında ise, 500 µg/mL'lik ve 1000 µg/mL'lik dozlarda çözücü kontrole göre anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Bunun yanında, tüm dozlarda GPx enzim aktivitesi anlamlı olmasa bile çözücü kontrole göre yüksektir. MMC eklenmiş uygulamalarda 48 saatlik periyotta ise, pozitif kontrol grubu negatif kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermezken, MMC eklenmiş hiçbir doz da yine pozitif kontrole göre anlamlı düşük ya da yüksek değildir. Buna rağmen, fark anlamsız dahi olsa, MMC eklenmiş dozların hepsi pozitif kontrolden daha yüksek enzim aktivitesi değeri vermiştir.

Malondialdehit seviyesi ölçümüne bakıldığında ise, 24 saatlik KYE uygulamasında hiçbir dozda çözücü kontrole göre anlamlı fark gözlenmemiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubu negatif kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermemesine rağmen, MDA değeri negatif kontrol grubundan yüksektir. MMC eklenmiş dozların hepsi pozitif kontrole göre düşük değer vermiştir, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. 48 saatlik KYE uygulamasında da sonuçlar 24 saat ile benzerdir. Dozların hiçbirisi çözücü kontrole göre anlamlı fark vermemiştir. Pozitif kontrol, negatif kontrol grubundan yüksek değer vermiş olmasına rağmen, yine istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Ayrıca, MMC eklenmiş hiçbir doz da pozitif kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir.

4.3.3. Tiyol/disülfid analiz sonuçları

Sağlıklı bireylerden alınan ve 72 saat hücre kültürü yapılan kan örneklerine 24 ve 48 saatlik karayemiş ekstraktı uygulamasının tiyol/disülfid homeostazına etkisi Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Karayemiş ekstraktı 24 ve 48 saatlik uygulamalar tiyol/disülfid dengesi açısından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hiçbir uygulama dozunda çözücü kontrole göre anlamlı fark bulunamamıştır. Bununla beraber bu uygulamalar negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise hiçbir dozda doğal tiyol ve total tiyol değerleri için yine anlamlı fark bulunamamıştır. Disülfid değeri için, 24 saatlik muamelede 500 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlar negatif kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur. 48 saatlik uygulamada ise, disülfid değeri 250 $\mu\text{g/L}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda negatif kontrole göre anlamlı düşüktür. İndirgenmiş tiyol oranı (RTR), 24 saatlik uygulama için 500 $\mu\text{g/ml}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlar negatif kontrole göre anlamlı yüksek bulunurken, 48 saat için, negatif kontrole göre anlamlı yüksek değerler 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda gözlenmiştir. Yükseltgenmiş tiyol oranı 24 saatlik uygulamada sadece 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda anlamlı düşük değer bulunurken, aynı oran 48 saatlik uygulama için 500 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda anlamlı düşüktür.

Karayemiş ekstraktının oksidatif stres ajanı olan mitomisin C maddesine karşı, tiyol/disülfid homeostazına etkisi ile oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyuculuğu 4 farklı doz için 24 ve 48 saatlik uygulamalar ile test edilmiştir (Tablo 4.7.). 24 saatlik uygulamada hiçbir dozda pozitif kontrole göre anlamlı fark görülmezken, 48 saatlik uygulamada total tiyol değeri 125 $\mu\text{g/mL}$ ve 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda pozitif kontrole göre anlamlı düşük bulunmuştur. Yine aynı uygulama ve aynı dozlarda disülfid değeri de pozitif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İndirgenmiş tiyol oranı ise 48 saatlik uygulamada sadece 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozda pozitif kontrole göre anlamlı yüksek bulunurken, yükseltgenmiş tiyol oranı aynı doz için anlamlı düşük bulunmuştur.

Tablo 4.6. KYE'nin 24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda tiyol/disülfid homeostazı üzerine etkisi

Test Maddesi	Periyot (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	TTL	NTL	DD	RTR	OTR	TORR
NK	24	0	37,5 \pm 0,5	22,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,5	59,9 \pm 2,4	20,7 \pm 1,2	309,9 \pm 106,4
ÇK	24	10 μl	33,5 \pm 2,5	31,0 \pm 2,0	3,3 \pm 0,3	78,2 \pm 0,9	3,7 \pm 0,5	2550,0 \pm 350,0
PK	24	0,20	40,5 \pm 3,5	27,5 \pm 2,5	6,5 \pm 0,5	67,9 \pm 2,2	16,0 \pm 1,1	422,7 \pm 500,0
KYE	24	125	33,0 \pm 1,0	27,5 \pm 2,5	2,8 \pm 0,8	83,2 \pm 5,2	8,4 \pm 2,5	1107,2 \pm 392,9
		250	38,0 \pm 6,0	32,0 \pm 3,0	3,0 \pm 1,5	85,1 \pm 5,6	7,5 \pm 2,8	1355,6 \pm 577,8
		500	34,0 \pm 0,1	31,5 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5*	92,7 \pm 1,5*	3,7 \pm 0,8*	2633,4 \pm 566,7
		1000	32,0 \pm 3,0	25,5 \pm 4,0	1,3 \pm 0,5*	92,6 \pm 4,9*	9,6 \pm 2,5	1813,7 \pm 285,7
ÇK	48	10 μl	33,5 \pm 1,5	28,0 \pm 2,0	2,8 \pm 0,3	83,5 \pm 2,2	8,3 \pm 1,2	1033,4 \pm 166,7
PK	48	0,20	33,5 \pm 0,5	30,5 \pm 1,5	8,5 \pm 0,5	64,2 \pm 3,1	17,9 \pm 1,6	359,5 \pm 875,0
KYE	48	125	47,5 \pm 4,0	29,0 \pm 7,0	4,5 \pm 1,5	75,2 \pm 10,5	12,4 \pm 5,3	783,4 \pm 416,7
		250	38,0 \pm 4,0	33,5 \pm 3,5	1,3 \pm 0,3*	93,2 \pm 0,7*	3,5 \pm 0,4*	2733,4 \pm 266,7
		500	36,0 \pm 3,0	32,0 \pm 4,0	1,5 \pm 0,5	91,1 \pm 3,6	4,5 \pm 1,9	2500,0 \pm 1100,0
		1000	35,0 \pm 2,0	42,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,8*	94,1 \pm 3,9*	2,9 \pm 1,9*	3200,0 \pm 880,0

TTL: total tiyol, NTL: doğal tiyol, DD: Disülfid, RTR: İndirgenmiş tiyol oranı, OTR: Yükseltgenmiş tiyol oranı, TORR: Tiyol yükseltgenme/indirgenme oranı

*Negatif Kontrole ya göre fark var ($p<0,05$)

Tablo 4.7. KYE'nin MMC'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı tiyol/disülfid homeostazına etkisi

Test Maddesi	Periyot (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	TTL	NTL	DD	RTR	OTR	TORR
PK	24	0,20	40,5±3,5	27,5±2,5	6,5±0,5	67,9±2,2	16,0±1,1	422,7±3,9
PK+KYE	24	125+0,20	34,0±2,0	29,5±5,0	2,3±0,8	86,5±5,2	6,8±2,6	1533,4±666,7
		250+0,20	36,5±5,5	27,0±1,0	4,8±2,3	75,3±8,6	12,4±4,3	720,0±320,0
		500+0,20	47,5±4,5	29,5±4,5	9,0±0,1	61,8±2,2	19,1±1,1	337,7±87,3
		1000+0,20	39,0±5,5	23,0±1,0	8,0±2,3	59,4±8,6	20,1±4,3	295,4±42,1
PK	48	0,20	47,5±0,5	30,5±1,5	8,5±0,5	64,2±3,1	17,9±1,6	359,1±3,5
PK+KYE	48	125+0,20	31,5±4,5*	26,5±5,5	2,5±0,5*	83,4±5,6	8,4±2,8	1150,0±450,0
		250+0,20	35,0±3,0*	31,5±3,5	1,8±0,3*	89,8±2,3*	5,1±1,2*	1866,65±466,65
		500+0,20	46,5±8,5	29,5±5,5	8,5±1,5	63,4±3,9	18,3±0,1	346,5±3,5
		1000+0,20	43,0±2,0	28,0±0,0	7,5±1,0	65,3±5,2	17,4±2,6	380,0±50,7

TTL: total tiyol, NTL: doğal tiyol, DD: Disülfid, RTR: İndirgenmiş tiyol oranı, OTR: Yükseltgenmiş tiyol oranı, TORR: Tiyol yükseltgenme/indirgenme oranı
*Pozitif kontrole ya göre fark vardır (p<0,05)

4.3.4. SOD ve GPX mRNA ekspresyon analiz sonuçları

Bu çalışmada moleküler analizler için, 2 gönüllü bireyden periferik kan alınarak lenfosit kültürü yapılmış ve 4 farklı doz karayemiş ekstraktı (125 µg/mL, 500 µg/mL, PK+125 µg/mL ve PK+500 µg/mL) ile 48 saatlik muameleye maruz bırakılmıştır. Ayrıca negatif kontrol (steril su), pozitif kontrol (MMC) ve çözücü kontrol (metanol) grupları da oluşturulmuştur. 72 saatlik kültür sonunda, her doz ve kontrol gruplarından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA sentezi gerçekleştirilerek, elde edilen DNA'dan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile ilgili genleri için özel primerler kullanarak real time PCR ile SYBR green detektörü kullanılarak bu enzimlerin ekspresyonundaki değişikliklerin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen verilerde, glutatyon peroksidaz için yeterli ölçüde ışığa gerçekleşmediğinden sadece süperoksit dismutaz enzimi mRNA ekspresyon sonuçları analiz edilmiştir. İki farklı donörden elde edilen *SOD* geni mRNA'ların real time PCR sonucunda elde edilen delta C_t değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.8.'de farklı dozlara göre $2^{-\Delta C_t}$ kat değişimi ve p değerleri verilmiştir.

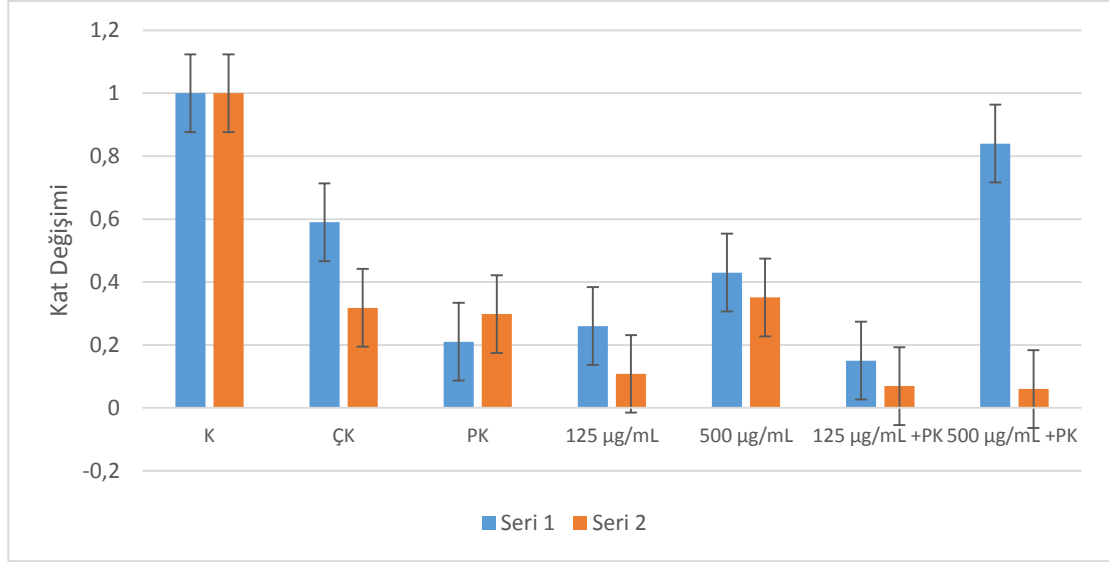
Tablo 4.8. *SOD* geni mRNA'ların deney ve kontrol grupları arasındaki $2^{-\Delta C_t}$ ve kat değişimi

	1.kişi			2.kişi		
	$2^{-\Delta C_t}$	Kat Değişimi	p	$2^{-\Delta C_t}$	Kat Değişimi	p
NK	0,158			0,165		
ÇK	0,093	0,59	0,311	0,015	0,09	0,318
PK	0,033	0,21	0,225	0,022	0,13	0,298
125 µg/mL	0,024	0,26	0,116	0,005	0,33	0,108
500 µg/mL	0,040	0,43	0,316	0,044	2,93	0,351
PK+125 µg/mL	0,005	0,15	0,095	0,005	0,22	0,069
PK+500 µg/mL	0,028	0,84	0,149	0,032	1,45	0,060

NK: Negatif Kontrol, ÇK: Çözücü Kontrol, PK: Pozitif Kontrol

Yapılan analizde, çözücü kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu negatif kontrol grubuna göre kıyaslanmış ve bağımsız t testine göre anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Aynı zamanda dozlara ait gruplar (125 µg/mL ve 500 µg/mL) çözücü

kontrolle ve MMC ekli gruplar (PK+125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve PK+500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pozitif kontrolle karşılaştırılmış ve yine anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.8.). Şekil 4.41.'de KYE muamelesi yapılan lenfosit kültürlerindeki *SOD* geni mRNA kat değişim grafiği verilmiştir.



Şekil 4.41. *SOD* geninin dozlara göre kat değişim grafiği

BÖLÜM 5. TARTIŞMA

Günümüzde birçok kronik ve akut hastalığın yayılması ve çoğunun tedavisinin bilinmemesi medikal alanda bilim dünyasının kanayan bir yarasıdır. Sentetik ilaçların tedavi veya semptomları azaltıcı etkilerinin yanı sıra, birçok yan etkisinin bulunması yeni hastalıklara kapı açmaktadır. İlaç sanayisinin de büyük bir ticaret sektörüne dönüşmüş olması ve hastalıkların tedavisi ile kâr amacı gütmemesinin bir sonucu olarak, gerçekten üretilmesi ve kullanılması gereken ilaçlar ile elzem olmayanların ayırlamaması durumu ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, sadece ilaçlar ile tedavi edilmesi gerekmeyen ya da koruyucu tedaviyi üstlenen doğal bitkiler ile alternatif tıp alanına yönelmek bazı bilim adamlarının ilgi odağı olmuştur. Birçok bitkinin hastalıkları tedavi edebilmesi ya da tedaviye yardımcı rol üstlenmesi, hastalıktan daha az kimyasal ilaç ve daha az yan etki ile kurtulmak anlamına gelebilir. Bunların yanı sıra, bitkiler, hastalıklar hiç başlamadan, doğal beslenme ve düzenli bir diyet ile de koruyucu tıp görevini üstlenebilir.

Karayemiş meyvesi ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi'nde tanınan, yetiştirilen ve şifalı olduğuna inanılan bir bitkidir. Karayemiş meyvesi özellikle kan şekerini düşürmesi ile diyabet hastaları tarafından yoğunlukla tüketilir. Şekeri düşürmesinin yanında, gastrointestinal hastalıklara faydalı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ağrı kesici ve sakinleştirici etkileri de halk tarafından keşfedilmiştir. Bütün bunlar göz önüne alındığında, karayemiş bitkisi bilim adamlarının da ilgisini çekmiş ve üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Karayemiş meyvesi bol miktarda antosiyanin içerir (Rice- Evans ve ark., 1996; Karabegoviç ve ark., 2014). Antosiyaninler fenolik asit grubundan olan flavonoidlerin en önemli grubudur. Antosiyaninler özellikle bitkilerde rengi veren pigmentlerden birisidir. Bitki için patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik

stresleri iyileştirme ve oksinlerin taşınması gibi sinyallerde görev alırlar . Bunun yanı sıra antosiyaninlerin insan sağlığını destekleyici farklı işlevleri bilimsel araştırmalar sonucu ortaya çıkmış ve bundan dolayı bir çok hastalık üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Keleş, 2015). Flavonoid ve antosiyaninler yüksek antioksidan kaynağı olan bileşikler olduğu için, oksidatif stresin yarattığı tüm olumsuzluklara karşı koruyucu rol üstlenirler. Oksidatif stresin arttırdığı semptomların azalmasında ya da oksidatif strese neden olan hastalıkların tedavisinde büyük etkileri mevcuttur. Antosiyanin ve flavonoid içeren tüm besinlerin diyetle alınması, başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere, obezite ve diyabet gibi diğer kronik hastalıklarda fayda sağladığı görülmüştür. Antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkileri de mevcuttur (Büyükbalcı ve El, 2008; Giusti, 2010).

Herhangi bir amaçla kullanılmak üzere sentezlenen bir maddenin, ya da bitki ekstraktının kullanılmadan önce, başta insan olmak üzere bütün canlılara ve doğaya zararı olup olmadığını anlamak çok önemlidir. Toksikoloji çalışmaları bu bağlamda bize büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle hangi dozda toksik etkisi olduğunu belirlemek bir etki-güven aralığı tespit etmeye yaramaktadır.

Bir maddenin genotoksik ajan olduğunun ispatı, o maddenin kanser dahil birçok hastalığa neden olabileceğinin göstergesidir. Somatik hücrelerin genetik materyalinde bozukluğa yol açan bir maddenin, ilgili dokudaki protoonkogenleri uyarmasına ve kanserli dokunun gelişmesini tetikleyeceği bilinmektedir. Aynı şekilde, eşey hücrelerinde meydana gelecek bir hasarın ise gelecek nesillere hastalık olarak aktarılması olasıdır (Mulder ve Dencker, 2013). Bir bitki ekstraktının genotoksik etkisinin olup olmadığını belirlenmesi ya da mutajenlerin genetik materyal üzerinde oluşturduğu hasarı azaltıcı ya da ortadan kaldırıcı etkiye sahip görevi olup olmadığını belirlenmesi yönündeki çalışmalar doğal bitkilerin kullanım alanını genişletecektir. Bu bağlamda düşünülürse, sağlık açısından birçok faydasının olduğu bilinen ve tıbbi bitkiler arasında sayılabilecek olan karayemiş meyvesinin hem genotoksikolojik açıdan değerlendirilerek, toksik bir etkisinin olup olmadığını araştırılması hem de güvenli kullanımı için bir doz aralığının belirlenmesi literatüre büyük katkı sağlayacaktır. Karayemiş gibi antosiyanin ve fenolik bileşikleri içeren

antioksidan özelliği bulunan bitki ekstraktlarının aynı zamanda antigenotoksik etkisinin de araştırılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, karayemiş meyvesinin genotoksik ve antigenotoksik profilinin belirlenmesi için, bilim dünyasında altın standart olarak kabul gören ve yaygın olarak kullanılan kromozomal anormallik ve mikronükleus testi kullanılmıştır. Kromozomal anormallik testi, kromozomların net ve ayrıntılı bir şekilde izlenmesine olanak vermesi ve birçok çeşit kromozom anormallik için değerlendirilmeye alınabilmesi gibi avantajları ile genotoksik ve antigenotoksik profili belirlemede en doğru sonuca ulaştırmaktadır (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2014). Bu çalışmada, insan sağlığına birçok olumlu etkisi olduğu geleneksel tıpta da bilinen karayemiş meyvesinden elde edilen ekstraktın genotoksik ve antigenotoksik profili, insan periferik kan dokusundan elde edilen lenfosit hücreleri üzerinde kromozomal anormallik ve mikronükleus testleri kullanılarak *in vitro* ortamda belirlenmiştir. Deney prosedüründe lenfosit hücrelerinin model olarak tercih edilmesinin birçok nedeni vardır. Öncelikle donörden kolaylıkla elde edilebilmesi, bütün vücudu dolaşan bir hücre çeşidi olması ve uzun ömürlü olması bunlar arasında sayılabilir. Ayrıca lenfositler toksik ajanlara karşı duyarlı hücrelerdir ve kromozom yapılarında bunu açıkça sergilerler. Lenfositlerde oluşan herhangi bir hasar oranı ile vücuttaki başka bir dokuda aynı toksik ajan ile oluşan hasar oranı birbirine çok yakındır. Bu yüzden lenfosit hücreleri kanser çalışmalarında ve diğer toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen ve doğru sonuca yaklaştıran bir dokudur.

Çalışmamızda, genotoksik etkiye bakılırken kromozom anormallik testi için, insan periferik kandan 72 saatlik lenfosit kültürü yapılarak, 4 farklı karayemiş dozu (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) 24 ve 48 saatlik uygulamaya maruz bırakılmıştır. Konu ile ilgili literatürde yer alan *in vivo* yapılan bir çalışmada, denek olarak sıçan kullanılmış ve 10 g/kg karayemiş ekstraktı verilerek testis hasarına karşı koruyuculuğu araştırılmıştır (Yılmaz, 2014). Yine başka bir *in vivo* çalışmada ise, sıçanlara 1000 mg/kg ve 500 mg/kg uygulama yapılarak antidiyabetik etkiye bakılmıştır (Turan ve ark., 2013). Karayemiş ekstraktının antiproliferatif etkisini araştırmak amaçlı, *in vitro* olarak 25, 50, 100, 200, 250, 375, 500 µg/ mL dozlarda

hücre kültürüne uygulanmıştır (Aydın ve ark., 2016). Bu çalışmadaki doz seçimi yapılırken, önceki çalışmalar göz önüne alınarak belli dozlar denenmiş ve 4 doz (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) çalışmamız için uygun görülmüştür.

Karayemiş ekstraktı ile yapılan çalışmamızda, 24 ve 48 saatlik her iki uygulamada da dozlarda en sık görülen anormallik, kromatid kırığı olmuştur. Daha sonra bu anormalliği kromozom kırığı ve fragment takip etmiştir. 24 saatlik uygulamanın 250 µg/mL'lik dozunda bir adet kardeş kromatidlerde birleşme görülürken, 24 ve 48 saatlik 125 µg/mL'lik dozlarda birer adet disentrik kromozom gözlenmiştir. Anormal hücre yüzdesi, 24 saatlik uygulamada 250 µg/mL'lik, 48 saatlik uygulamada ise 500 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik dozlar harici negatif kontrole göre anlamlı bulunmuştur. Çözücü kontrol ile kıyaslandığında, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda hiçbir dozda çözücü kontrole göre anlamlı fark bulunmamıştır. Mikronükleus testi sonucunda, bütün dozlarda bir mikronükleuslu binükleat hücre bulunmuş ve sadece 1000 µg/mL'lik dozda bir adet iki mikronükleuslu binükleat hücre bulunmuştur. Ayrıca, en yüksek son iki dozda ise, çözücü kontrolden daha düşük bir MN frekansı gözlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında KYE'nin genotoksik etkisi olmadığı ve hatta doz arttıkça azalan MN frekansı antigenotoksik bir etkisi olabileceği sonucunu doğurmuştur. Kromozomal anormallik testi sonuçları ile benzer şekilde, mikronükleus testinde de hiçbir uygulama dozunda çözücü kontrole göre anlamlı bir artış yoktur. Bu sonuçlar dâhilinde, karayemiş meyve ekstraktının insan lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etkisinin mevcut olmadığı kanaatine varılmıştır.

Karayemiş ekstraktının antigenotoksik etkisi açısından, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda, yapısal anormallikler içinde en sık görülen yine kromatid kırığı olmuştur. Bunu kromozom kırığı, fragment ve kromatid değişimi izlemiştir. Bazı dozlarda yine kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom gözlenmiştir. Antigenotoksik değerlendirme için pozitif kontrole göre kıyaslandığından, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda bütün karayemiş ekstraktı dozlarında pozitif kontrole göre anlamlı düşüş gözlenmiştir. Yine antigenotoksik profillerinin belirlenmesi için uygulanan mikronükleus testinde, bütün dozlarda bir mikronükleuslu binükleat hücre görülürken, 500 µg/mL'lik hariç diğer dozların hepsinde 2 mikronükleuslu binükleat

hücre gözlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol ile kıyas yapıldığında, karayemiş ekstraktının tüm uygulamalarında, mikronükleus sayısının her dozda anlamlı şekilde düştüğü açıkça görülmüştür. Antigenotoksik çalışmalardan elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, hepsinde genetik materyaldeki hasarın anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, kromozom anormalliklerde ve mikronükleus oluşumunda doz artışına bağlı olarak anlamlı bir azalışın olduğu da görülmektedir. Bu sonuçlara göre, karayemiş ekstraktının MMC'nin oluşturduğu genetik hasara karşı koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılabilir. Elde edilen bu sonuçlar, karayemiş meyvesine yakın akraba olan ya da antosiyanin ve fenolik bileşik içeren diğer bitki ekstraktları ile yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Berber ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, *Prunus avium* (kiraz) sapından elde edilen antosiyaninli bitki ekstraktının antigenotoksik ve antisitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bunun için insan lenfosit hücre kültürüne mitomisin C verilerek kromozom hasarı oluşturulmuştur. Kiraz ekstraktının iyileştirici etkisi kromozomal anormallik, mikronükleus ve komet testleri ile araştırılmıştır. Kromozomal anormallik sayılarında ve mikronükleus oluşumunda ekstrakt ile muamele edilen dozlarda pozitif kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Sonuç olarak, kiraz sapından elde edilen ekstraktın antigenotoksik etkisi olduğu belirtilmiştir. İnsan nöroblastoma ve promiyosit hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, hidrojen peroksit uygulaması ile hücreler üzerinde stres ve DNA hasarı oluşturulmuş ve sonrasında antosiyanin içeren parçacıklar verilmiştir. Deney sonucunda antosiyanin uygulaması ile hücrelerin toksik etkiden ve DNA hasarından korunduğu ortaya çıkarılmıştır (Ghost ve ark., 2006). Antosiyanin açısından zengin olan alıç (*Crataegus monogyna*) meyvesinin ekstraktı ile yapılan genotoksik çalışmada, insan periferik kan hücre kültüründe radyasyon ışını kullanılarak mikronükleus oluşumu tetiklenmiş, daha sonra bu kültürlerle alıç ekstraktı uygulanarak yüksek antioksidan özelliği de bulunan bu meyvenin mikronükleus oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak alıç meyvesinin antigenotoksik etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (Hosseini-mehr ve ark., 2009). Yine başka bir çalışmada, antosiyaninler grubuna giren delfinidin ve siyanidin maddeleri sıçan hepatoma hücre kültürü üzerine uygulanmıştır. Tert-bütül hidroperoksit (TBHP) ve hidrojen peroksit maddelerinin neden olduğu mutajenik etkiye karşı bu antosiyaninlerin koruyucu rol üstlendiği

görülmüştür (Lazze ve ark., 2003). Karayemiş bitkisine yakın olan *Prunus persica* (şeftali) bitkisinin çiçeklerinden yapılan bir ekstraktın, UV ışınına maruz bırakılmış deri fibroblast hücreleri üzerindeki hasara karşı etkisi araştırılmış ve deneyin sonucunda DNA molekülünde oluşan bozuklukları azalttığı bulunmuştur (Heo ve ark., 2001). Yine aynı cinse ait olan *Prunus serrulata* (süs kirazı) meyvesinin ekstraktı ile yapılan başka bir çalışmada DNA hasarını düşürdüğü belirlenmiştir (Lee ve ark., 2007). Eken ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, karayemiş meyvesinin çalışmamızdaki antijenotoksik etki sonuçlarını destekleyen sonuçlar ortaya çıkarılmıştır. Sıçanlarda dimetoat ile oluşturulan hepatoksisite üzerine karayemiş meyvesinden elde edilen ekstraktın koruyucu etkisi komet metodu kullanılarak araştırılmıştır. Oksidatif stres ve DNA hasarına neden olan bir insektisit olarak kullanılan dimetoat, sıçanlara verilmiş ve komet testinde kuyruk uzunluğu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde uzun çıkmıştır. Diğer gruplarda ise karayemiş ekstraktı tek başına ve dimetoat ile birlikte verilmiştir. Tek başına karayemiş ekstraktının verildiği grupta kuyruk uzunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermediği belirtilmiştir. Dimetoat ile birlikte verilen gruplar, dimetot grubu ile karşılaştırıldığında kuyruk uzunluğunda anlamlı bir düşüş görülmüştür. Bu çalışmada karayemişin hem genotoksik hem de antijenotoksik profili komet metoduyla sıçanlar üzerinde denenmiş ve sonuçlar bizim çalışmamız ile uyum göstermiştir. Bütün bu çalışmalar göz önüne alındığında, antosiyanin içeren bitkilerin ekstraktlarının ve aynı zamanda karayemiş meyvesine yakın akraba olan bitkilerin DNA hasarına ve bunun sonucu olarak kromozom anormalliklerine karşı koruyucu etkisi olduğu söylenebilir.

Karayemiş ekstraktının insan periferik hücreleri üzerinde 4 farklı doz (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) ile sitotoksik ve anti sitotoksik etkisi mitotik indeks değerlendirilmesi ile araştırılmıştır. Karayemiş ekstraktının sitotoksik etkisinde, 24 saatlik uygulamada negatif kontrole göre kıyas yapıldığında, bütün dozlar anlamlı olarak düşük çıkmıştır. Bunun yanında doz yükseldikçe mitotik indeks değerlerinin de düştüğü görülmüştür. Aynı uygulamada çözücü kontrole göre, hiçbir dozda anlamlı bir fark görülmemiştir. 48 saatlik uygulamaya baktığımızda, bütün dozların negatif kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük olduğunu ve ayrıca

125 µg/mL'lik dozun çözücü kontrole göre düşük olduğunu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, çözücü kontrole göre genelde anlamlı bir fark bulunmazken, negatif kontrole göre karayemiş muamelesinin hücre bölünmesini yavaşlattığı ve az da olsa sitotoksik etkisi olduğu söylenebilir. Literatürde karayemiş meyvesinin sitotoksik etkisinin araştırıldığı çok az çalışma mevcuttur. Aydın ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, karayemiş meyvesinden su ile ekstraktı hazırlanmış, bu ekstraktın hücre bölünmesi üzerindeki etkisi HT29 (İnsan kolon kanser hücreleri), HeLa (İnsan rahim kanser hücreleri), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitelyum) ve C6 (Sıçan beyin tümörü) kanser hücre hatlarına karşı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, karayemiş ekstraktının az miktarda antiproliferatif etkisinin olduğu açıklanmıştır. Bu deneyin sonucuna bakıldığında çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Antosiyanin içeren maddeler ile yapılan başka çalışmalarda, normal dokulara ve kanserli dokulara maddeler verilerek, antosiyanin ve fenolik bileşiklerin kanserli dokularda büyümeyi inhibe edici etkisi olduğu ortaya çıkarken, sağlıklı dokularda çok etkisi olmadığı görülmüştür (Hakimuddin ve ark., 2004; Galvano ve ar., 2004). Bizim çalışmamız yine bu çalışmaların sonuçlarına paralelidir.

Antisitotoksik profil bakımından, dozlarla birlikte karayemiş ekstrakt uygulamasında, 24 saatlik uygulamanın bütün dozlarında mitotik indeksin pozitif kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise, hiçbir dozda pozitif kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlara göre, karayemiş ekstraktının 24 saatlik uygulamada MMC'nin neden olduğu sitotoksik etkiye karşı antisitotoksik etki gösterdiği fakat 48 saatlik uygulamada bu etkinin olmadığı görülmüştür. Karayemiş bitkisinin yakın akrabası olan *Prunus avium* (kiraz) ile yapılan bir çalışmada, ekstraktın mitomisin C'nin neden olduğu sitotoksik etkiye karşı iyileştirici etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve mitotik indeksin, 24 ve 48 saatlik uygulamaların çoğu dozunda, mitomisin C ile muamele edilen gruba göre anlamlı bir yükseliş olduğu görülmüş ve sitotoksik maddenin etkisini tolere ettiği sonucuna varılmıştır (Berber ve ark., 2017). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında, 24 saatlik uygulamada, benzer sonuçlar görülürken, 48 saatlik uygulamada farklı sonuçların

olduğu görülmektedir. Bu iki çalışma arasındaki uygulama gruplarına göre benzerlik ve farklılıkların nedeni birbirine yakın iki bitki türü olması ancak sahip oldukları etken maddelerdeki farklılıklarından dolayı olabilir.

Sitotoksiste, hücre ölümüne neden olan anlamına gelen bir terimdir. Hücrenin bölünmesini engelleyen ve hatta var olan hücreyi öldüren maddeler sitotoksiktirler. Hücreler sitotoksik özelliği olan bir faktöre maruz kaldıkları zaman, apoptoz, nekroz ya da otofaji gibi olaylarla ölüme gidebilir ya da bölünmesini durdurucu etkiye (sitotoksik) uğrayabilirler (Galluzzi ve ark., 2009). Mitotik indeksteki azalma, hücre bölünmesinin yavaşlamasına işaret eder. Bunun birçok sebebi olabilir. DNA sentezinin gerçekleşmesi için gerekli enzimlerde inhibisyon, bölünme basamakları için gerekli ATP'nin üretilmemesi, safhalar arası geçişteki kontrol noktalarında aksama gibi birçok nedenden dolayı G2 fazının engellenmesi veya uzamasına sebep olabilir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006). Genel olarak bizim çalışmamızdaki mitotik indeks sonuçlarına göre, sağlıklı donörden alınan kan hücreleri üzerinde fazla bir sitotoksik etkisi olmadığını görülürken, ortamda sitotoksik bir maddeye maruziyet söz konusu ise, uygulama periyoduna bağlı olarak, bu maddenin sitotoksik etkisini baskıladığını ve antisitotoksik etki gösterdiğini görülmektedir. Yüksek bir proliferatif etkisi olmayan karayemiş ekstraktının kanserli hücrelerin bölünmesini tetiklemediği ve sağlıklı hücrelerde yine bölünmeyi artırıcı etkisi olmadığı ve bunun yanında, sitotoksik bir ajanı az da olsa inhibe edebildiğidir.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, antosiyanin ve fenolik asit içeren maddeler antikarsinojenik etkiye sahiptir. Karsinojenik maddeleri DNA üzerinde hasarlara yol açarak kanser oluşumunu tetiklerler. Antosiyanin ve fenolik asit içeren ve doğal bitkilerden ekstrakte edilmiş olan maddelerin ise DNA hasarını onarıcı etkiye sahip olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmamızda genel olarak kromozomal anormallik ve mikronükleus sonuçlarına bakıldığında, sağlıklı donörden alınan lenfosit hücreleri üzerine muamele edilen ekstraktın genotoksik etkisi olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda kromozom ve kromatid kırığı miktarı ile oluşan mikronükleus miktarı arasında ciddi bir fark çıkmaması ile KA ve MN sonuçları paralellik göstermektedir. Oluşan MN'lerin anöjenik etkiden ziyade klastojenik etkiden kaynaklandığı düşünülebilir. Bunun aksine mutajenik ajan ile birlikte kullanıldığında ise ajana karşı

anlamli bir farkla anormallikleri düzelttiği görülmüştür. Aynı zamanda, sitotoksik etkisi test edilmek üzere mitotik indeks değerlerine bakıldığında ise, negatif kontrol grubuna kıyasla az bir de neden olurken, sadece 24 saatlik uygulamada antisitotoksik etki göstermiştir.

Çalışmamızda yapılan enzim analizleri sonucunda, 24 saatlik KYE uygulamasında, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin, hiçbir uygulama dozunda, çözücü kontrole göre anlamli bir farklılığı bulunamamıştır. Ayrıca 24 saatlik uygulama için, pozitif kontrol de negatif kontrolden anlamli bir Şekilde d çıkmamıştır. Yine aynı uygulamada MMC ekli dozların hiçbiri pozitif kontrole göre anlamli fark oluturmamıtır. Bu sonuçlara göre, 24 saatlik periyotta, KYE uygulamasının SOD enzim aktivitesine etki edemediği ve MMC'nin antioksidan aktiviteyi baskılayıcı etki göstermediğidir. MMC'nin 24 saatlik periyotta negatif kontrole göre SOD seviyesini anlamli derecede dmemi olması ile MMC ekli dozların da anlamli farka sebebiyet vermemesi paralel bir sonuçtur. 48 saatlik KYE uygulamasının SOD enzimi üzerindeki etkisine bakıldığında ise, dozlardan sadece 500 µg/mL'lik dozun çözücü kontrole göre anlamli yüksek olduğu görülmektedir. Fakat doz artıı ile birlikte enzim aktivitesinde de bir artış gözlenmiş ancak bu artış 1000 µg/mL'lik doza geldiğinde dmtir. Diğer dozlarda da anlamli artış olmamasına rağmen hepsi çözücü kontrolden daha yüksektir. Ayrıca aynı uygulamada pozitif kontrol ile negatif kontrol arasında anlamli bir fark olmuştur. MMC içeren pozitif kontrolde SOD seviyesi d çıkmıştır. Ayrıca 1000 µg/mL'lik MMC ekli bütün dozlarda doz arttıka enzim aktivitesi artış göstermiştir. Bu sonuç da MMC ekli olmayan dozların aynı periyottaki uygulaması ile paralellik göstermektedir. 48 saatlik KYE uygulamasında SOD enzim analizindeki bu değerlere göre, her iki uygulamada da 500 µg/mL'lik dozun SOD enzim aktivitesini anlamli olarak yükselttiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre, 48 saatlik uygulama, MMC'nin antioksidan enzime zarar vermek için yeterli bir süre olduğu ve verilen bu zararın KYE 500 µg/mL'lik dozda tolere edilebildiği söylenebilir.

GPx enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında ise, KYE'nin 24 saatlik maruziyeti sonucunda, hiçbir doz çözücü kontrole göre anlamli bir fark oluturmamıtır. Ayrıca

pozitif kontrol de negatif kontrole göre anlamlı çıkmazken, MMC ekli grupların hiçbirisi pozitif kontrole göre anlamlı fark göstermemiştir. Bununla beraber, linear bir artış ya da azalış da yine görülmemiştir. Bu sonuçlardan, 24 saatlik MMC uygulamasının antitoksidan GPx enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkiye neden olmadığı ve KYE doz uygulamalarının da yine enzim aktivitesini değiştirmedeği söylenebilir. GPx aktivitesi için 48 saatlik KYE uygulaması incelenirse, 500 ve 1000 µg/mL'lik dozlar çözücü kontrol ile kıyaslandığında anlamlı yüksek çıkmıştır. Bununla beraber, 125 µg/mL'lik ve 250 µg/mL'lik dozlar da anlamlı olmasa bile çözücü kontrolden daha yüksektir. Bu uygulamada pozitif kontrol negatif kontrole göre anlamlı bir fark oluşturamamıştır. Ayrıca, MMC ekli dozlardan hiçbirisi pozitif kontrole göre anlamlı yüksek çıkmamıştır. Buna rağmen, anlamlı fark olmasa dahi, MMC ekli dozların hepsi pozitif kontrolden daha yüksek enzim aktivitesi göstermiştir. Analiz sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, yüksek dozlarda çözücü kontrole göre anlamlı fark oluşturması KYE'nin enzim aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca pozitif kontrolün negatif kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermemesi, 48 saatlik uygulamada GPx enzim aktivitesine olumsuz bir etki yapmadığı ve MMC eklenmiş dozlarında enzim aktivitesini arttırmağı yönündedir.

Çalışmadan elde edilen malondialdehit sonuçlarına bakıldığında, 24 saatlik KYE uygulamasında hiçbir doz çözücü kontrole göre anlamlı fark oluşturmamıştır. Pozitif kontrol, negatif kontrole kıyasla anlamlı sonuç vermezken, MMC ekli hiçbir dozda yine anlamlı sonuç vermemiştir. Bunun yanında, 48 saatlik uygulamada da benzer sonuçlar görülmektedir. Bu sonuçlara göre, KYE'nin MDA oluşuma ciddi bir etkisi olmadığı ve buna bağlı olan lipid peroksidasyonunun azalmasında gözle görülür bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Karayemiş ekstraktları ve antioksidan sistemler ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda, karayemiş meyvesinin SOD, GPx ve MDA gibi sistemler üzerinde olumlu etkisinin olduğu bulunmuştur. Doğu (2014) tarafından yapılmış bir çalışmada, karayemiş meyve ekstraktı *in vivo* ortamda sıçanlar üzerinde denenmiş ve sıçanlardan tam kan örneği alınarak SOD, GPx ve MDA ölçümleri yapılmıştır. Karayemiş ile muamele

edilen gruptan alınan kan örneklerinde SOD ve GPx aktivitesi negatif kontrol grubundan anlamlı bir şekilde yüksek çıkarken, MDA değeri düşük çıkmıştır. Bu sonuç ile karayemiş meyvesinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanaatine varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise tüm dozlar ve her iki uygulama periyodunda (24 ve 48 saatlik) SOD ve GPx için anlamlı artış gözlenmese bile, özellikle 48 saatlik uygulamanın 500 µg/mL'lik dozda anlamlı artış bulunmuştur. Bu da yeterli doz ve yeterli zaman muamelesi ile KYE'nin SOD ve GPx üzerindeki olumlu etkisini göstererek, önceki çalışmaları destekler nitelikte olmuştur. Mevcut durumdaki farklılıkların nedeni, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar arasındaki farklardan kaynaklanmış olabilir.

Tiyol/disülfid homeostazında, ortamda oksidatif stres arttığında, tiyol molekülleri bu stresi tolere etmek için disülfid bağları oluştururlar ve denge disülfid bağlarının yoğunlaşmasına doğru kayar. Çalışmamızda, KYE verilen hiçbir grupta çözücü kontrole göre anlamlı fark oluşmamıştır. Negatif kontrol grubuna göre bazı dozlarda anlamlı farklar gözlenirse de test maddesinin gerçek etkisi çözücü kontrol kıyaslaması ile ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, KYE'nin sağlıklı donörlerden alınan kan örneklerinde tiyol/disülfid homeostazına ciddi bir etkisi olmadığı görülmektedir. Bunun yanında, KYE'nin tiyol/disülfid homeostazında, MMC'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı koruyuculuğunun analiz edildiği sonuçlara bakıldığında, 48 saatlik uygulamada, 125 ve 250 µg/mL'lik dozlarda pozitif kontrole karşı anlamlı düşüş görülmektedir. Bu bağlamda, KYE uygulaması ile MMC'nin oluşturduğu oksidatif strese karşı bir koruyuculuğunun olduğu ve bunun üzerinde tiyol molekülün disülfid bağı yönünde daha az kaydığı sonucuna varılabilir. Yapılan bir tiyol/disülfid homeostazı çalışmasında, sıçanlara egzersiz yaptırılarak ve L-trozin uygulaması ile vücutlarındaki oksidatif stres düşürülmüştür. Daha sonra kandan alınan örnek ile tiyol/disülfid dengesine bakıldığında, oksidatif stresin düşük olması beklenen grupta disülfid bağ oluşumunun da anlamlı bir düşüşe geçtiği görülmüştür. Sonuç olarak, oksidatif stres düştüğünde disülfid bağının azalması sonucu bilinmektedir (Kayacan ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda 48 saatlik uygulamada belirlenen oksidatif stresin KYE tarafından tolere edilmesine dair sonuç bu çalışmaya paralel bir sonuçtur.

Karayemiş meyvesinin antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı hem literatürdeki diğer çalışmalar hem de mevcut çalışmamızdaki enzim analiz sonuçları ile ortaya çıkmıştır. Bu enzim aktivitesinin artışının enzim düzeyinde veya moleküler düzeyde olma ihtimali mevcuttur. Bir enzimin artışı, sentezinin gerçekleştiği RNA molekülüne bağlı olabileceği gibi, aynı zamanda enzimlerin allosterik inhibisyonu/aktivasyonu ile de değişebilir. Çalışmamızdaki genotoksisite ve antigenotoksisite deney sonuçlarında, KYE'nin kromozom anormalliklerini ve mikronükleus sayısını azaltarak DNA molekülü üzerindeki olumlu etkisi açıkça görülmüştür. Bu durum hem antigenotoksik hem de antioksidan etkisi olan bu önemli tıbbi bitkinin, antioksidan etkisinin moleküler düzeyde olabileceği düşüncesine sürüklemiştir. Çalışmamızda, iki önemli antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin artışının moleküler düzeyde olup olmadığını araştırmak için, lenfosit kültüründen izole edilen RNA'lardan bu enzimlere özgü mRNA miktarı analiz edilmiştir. Yapılan kültürde elde edilen RNA'dan cDNA sentezi yapılarak, SOD ve GPx'e özgü primerler ile cDNA'daki ilgili bölge real time PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. GPx için yeterli ışımaya elde edilememiştir. Bunun sebebi teorikte tam kan kültürü ile yeterli miktarda RNA elde edilememiş olması ihtimalidir. Benzer şekilde, SOD enziminin mRNA miktarı için yapılan analizde de ışımaya elde edilmiş ancak sınır düzeydedir. Bu iki enzimin mRNA'larını çalışmak için kan kültürü yerine karaciğer kanser hattı ile çalışılması veya *in vivo* bir deney düzeneği kullanılması daha yüksek verim elde edilmesini sağlayabilir. Buna rağmen, kontrol geni olarak çalıştığımız beta aktin geninin yeterli ışımaya vermesi, çalışılacak düzeyde bir RNA izole edilebildiğini göstermiştir. SOD enzimi mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilirken önceki deneyde kullanılan ve anlamlı olan ve aradaki farkı gözlemlemek için en düşük doz olan 125 µg/mL seçilmiştir. SOD analizinde, 48 saatlik KYE uygulamasında 500 µg/mL'lik doz çözücü kontrole göre anlamlı yüksek ve PK+500 µg/mL dozu da pozitif kontrole göre anlamlı yüksek çıktığı için, moleküler çalışmada bu iki doz seçilmiş ve 48 saatlik muamele yapılmıştır. Sonuçta, hiçbir dozda çözücü kontrol ve pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. Sonuç olarak, KYE'nin SOD mRNA ekspresyonunu artırma ya da azaltma gibi bir etkisinin olmadığı yönündedir. Bu bağlamda, antioksidan enzim aktivitesinin artıyor olması, ya hücre

de var olan mRNA'dan daha hızlı ve daha çok miktarda translasyon ile enzim üretildiğinin ya da var olan enzimlerin allosterik bir aktivasyona maruz kalarak daha çok çalıştığının göstergesidir.

Çalışmanın sonucunda, özellikle ülkemizde Karadeniz Bölgesi'nde tüketilen ve şifalı olduğuna inanılan karayemiş meyvesinin genotoksik ve antigenotoksik profili *in vitro* insan lenfosit hücreleri üzerinde incelenmiş, genotoksik bir etkiye neden olmadığı ve MMC'nin toksik etkisine karşı antigenotoksik özellik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca belli doz ve periyot uygulamalarında SOD ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak yapılan mRNA ekspresyonu analizi ile enzim aktivitesinin artışının moleküler düzeyde olmadığı kanısına varılmıştır. Bu çalışma ile karayemiş gibi ülkemizde kolaylıkla yetişebilen şifalı bir meyvenin antigenotoksik özelliğinin ortaya çıkarılması ileride yapılacak diğer farklı çalışmalar için önemli katkı sunacaktır. Karayemişin antigenotoksik özelliği ile insan kromozom yapısını ve DNA hasarını *in vitro* şartlarda olumlu yönde etkilediğinin belirlenmesi, antioksidan sistemlerdeki farklılığın mRNA sentezinde artış ya da azalışla bağlantılı olmadığına ortaya çıkarılması hem moleküler tıp hem de genetik bilimi açısından önem arz etmektedir. *In vitro* şartlarda elde edilen bu sonuçların, farklı hayvan gruplarında *in vivo* çalışmalarla test edilmesi karayemiş ekstraktının etkinliğinin tam olarak ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2020. www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU., Erişim Tarihi: 23. 11.2020
- Ahmad, S., Hoda, A. and Afzal, M., 2002. Additive action of vitamins C and E against hydrocortisone-induced genotoxicity in human lymphocyte chromosomes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72, 204–209.
- Akkol, E. K., Kırmızıbekmez, H., K  kboyacı, N., G ren, A. C., Yesilada, E. 2012. Isolation of active constituents from cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 527-532.
- Akkuş İ. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya
- Alaşalvar, C.A.M., Shadidi, F. 2005. Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez. *Journal of Food Science*, 70(1), 47-52.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
- Albertini, R.J. 2004. Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. IARC Scientific Publications, 157: 153-177.
- Alpınar, K., Yazıcıoğlu, E. 1991. Taflan (*Laurocerasus officinalis* Roemer) Meyvaları  zerinde farmas tik botanik y n nden bir araştırma. *Proceedings of the 9th symposium on plant drugs, Eskisehir, Türkiye*, 275-281.
- Anşın, R., Özkan, Z.C. 1993. Tohumlu bitkiler (Spermatophyta). Odunsu taksonlar. K.T. . Orman Fakültesi Genel Yayın No: 167, Fakültesi Yayın No: 19, Trabzon, 512s.
- Armstrong, D. A. 1998. *Methods in molecular biology*. Toronto, Humana Press, 108.

- Avani, G., Rao, M.V. 2007. Genotoxic effects in human lymphocytes exposed to arsenic and vitamin A. *Toxicology In Vitro*, 21, 626-631.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A., Reunanen, M., Var, M. 1997b. Phenolic acid and fatty acid composition in the fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its cultivars. *Journal of Food Composition and Analyses*, 10, 350-357
- Ayaz, F. A. Kadioğlu, A. Reunanen, M, Var, M. 1997a. Sugar composition in fruits of *Laurocerasus officinalis* Roem. and its three cultivars. *Journal of Food Composition and Analyses*, 10, 82-86.
- Aydın, A., Erenler, R., Yılmaz, B., Tekin, Ş. 2016. Antiproliferative effect of cherry laurel. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A. Chemistry*, 3(3), 217-228.
- Badr, F.M., El-Habit, O.H., Hamdy, M., Hassan, G.A. 1998. The mutagenic versus protective role of vitamin A on the induction of chromosomal aberration in human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 414, 157-63.
- Baytop, T. 2001. *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*, 1st ed.; Istanbul University: Istanbul, Turkey, pp 178-249.
- Baytop, T. 1989. *Türkiye’de zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri*; Yayın 3560; Istanbul Üniversitesi Yayınları: Istanbul, Turkey.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B. Ş., Alvr, M. 2004. DNA hasarı analizinde μ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3): 97-103.
- Berber, A.A., Sönmez, F., Berber, N., Demir, T., Doğancı, M. A. 2017. Genoprotective potential of total anthocyanin extracted from *Prunus avium*. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(6), 1201-1209.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1): 93-100.
- Bostan, S. Z., İslam, A., 1996. Ümitvar bir meyve: karayemiş. *Ziraat Mühendisliği Dergisi*, 291:21.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13: 1145 -1155.
- Brusick, D. 1987. *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press, New York, 155-170.

- Bukan, N., 1999. Glibenklamidin streptozotosin-diabetik ratlarda kalp dokusu süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimlerine etkisi. Uzmanlık Tezi. Ankara Gazi Üniversitesi.
- Büyükbalci, A., El, S.N. 2008. Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas, *Plant Foods for Human Nutrition*, 63: 27-33.
- Choy, W. N. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment, Marcel Dekker, New York, 29-187.
- Circu, M.L., Aw, T.Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6):749-62.
- Cremers, C.M., Jakob, U. 2013. Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37):26489-96.
- Croy, R. 1998. Molecular genetics II- genetic engineering course içinde: Supplementary notes. Durham University durham. ac. uk.
- Çubukçu, B. 1989. Türkiye’de imal edilen bitkisel ilaçlar, 14. Ciba-Geigy ilaç ve Kimya Ürünleri Sanayi ve Ticaret A.S. (Açı Tasarım), İstanbul.
- Dawn, B.M., Allan, D.M., Colleen, M.S. 1996. Basic medical biochemistry a clinical approach. Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland.
- Demir, T., Sönmez, F., Bilen, C., Gencer, N. 2013. Extraction and biological activity of total anthocyanins from sweet cherry cultivars as polyphenol oxidase inhibitors. *International Journal of Food Agriculture Environment*, 11, 572-75.
- Dirican, N., Dirican, A., Sen, O., Aynali, A., Atalay, S. 2016. Thiol/disulfide homeostasis: a prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer?. *Redox Report*, 21(5), 197-203.
- Doğu, İ. 2014. Tip 2 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Prunus laurocerasus* (karayemiş)’ un oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.
- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A. L., Volot, F. 1997. A comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*, 12: 227-31.
- Eken, A., Endirlik, B. Ü., Bakir, E. 2017. Effect of *Laurocerasus officinalis* Roem.(cherry Laurel) fruit on dimethoate induced hepatotoxicity in rats. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 23(5), 779-787.
- Engin, M.S. 2007. Taflan (*Laurocerasus Officinalis* Roem.) bitkisinin meyve, çekirdek ve yapraklarının mevsim değişikliğine göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Tokat.

- Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yeşilada, E. 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 123-129.
- Erel, O., Neselioglu S. 2014. A novel and automated essay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical Biochemistry*, 47(18) 326-332.
- Erkus, M.E., Altıparmak, I.H., Akyuz, A.R., Demirbag, R., Sezen, Y. 2015. The association between plasma thiol levels and left ventricular diastolic dysfunction in patient with hypertension. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75(8), 667-673.
- Esterbauer, H., Cheesemani K.H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186:407- 421.
- Evans, H.J. 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 405–427.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(suppl 3), 101-107.
- Flachenecker, P., Bihler, I., Weber, F., Gottschalk, M., Toyka, K. V. 2004. Cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. *Multiple Sclerosis Journal*, 10(2), 165-169.
- Ford, C.E., Hamerton, J.L.A. 1956. Colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 3: 247–51.
- Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S. 2008. Real- time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, (1), 10-3.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Difference*, 16, 1093-1107
- Galvano La, F., Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A. 2004. Galvano, Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutrition Biochemistry*, vol. 15, pp. 2-11.
- Genç, N. 2009. Taflan çekirdeğinde (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fonksiyonel bileşik analizi ve antioksidan kapasitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., 2006. Protective effect of sodium selenite against the genotoxicity of aflatoxin B1 in human whole blood cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 393–398.

- Ghosh, D., McGhie, T.K., Zhang, J., Adaim, A., Skinner, M. 2006. Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells, *Journal Science Food Agriculture*, vol. 86, pp. 678-86.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Reserach*; 6:995- 1001.
- Güven, K.C., Geçgil, T.H. 1961. Taflan suyu hazırlanması. *Eczane Bülteni*, 3,117-119.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G., Meckling, K. 2004. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast Cancer Reserach Treatment*, vol. 85, pp. 65-79.
- Halilova, H., Ercisli, S. 2010. Several physico-chemical characteristics of cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits. *Biotechnol and Biotechnology*, 24(3), 1970-1973.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4), 569–605.
- Hasegawa, Y., Takano, T., Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Yoshida, H. 2002. Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Letters*, 182(1), 69-74.
- He J., Giusti, M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review and Food Science Technology*, vol. 1, pp. 163- 187.
- Heo, M.Y., Kim, S.H., Yang, H.E., Lee, S.H., Jo, B.K. 2001. Protection against ultraviolet B-and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1-2), 47-59.
- Hosseinimehr, S.J., Mahmoudzadeh, A., Azadbakht, M., Akhlaghpoor, S. 2009. Radioprotective effects of Hawthorn against genotoxicity induced by gamma irradiation in human blood lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics*, 48(1), 95.
- Huang, H.S., Akbarian, S. 2007. GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PloS one*, 2(8).
- İslam, A 2005. Karayemiş yetiştiriciliği ve önemi. *Ege Karadeniz Dergisi*, Yıl: 2, Sayı: 4.
- İslam, A., 2002. "Kiraz" cherry laurel (*Prunus laurocerasus*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30: 301-302.
- Jansson, M. D., Lund, A. H. 2012. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 590-610.

- Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G.M. 2001. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *American Journal of Industrial Medicine*, 39(1): 92-99.
- Jones, D.P., Liang, Y. 2009. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radical Biology Medicine*, 47(10):1329-38.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik A.M., 1998. *Biyokimya Kitabı.1.Baskı*, Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi Ünitesi. Konya
- Kalyoncu, İ.H., Ersoy, N., Elidemir, A.Y., Dolek, C. 2013. Mineral and some physico-chemical composition of 'Karayemiş' (*Prunus laurocerasus* L.) fruits grown in Northeast Turkey. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 7(6), 11-14.
- Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Review and Food Science Nutrition*, 25:317-364.
- Karabegović, I. T., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Todorović, Z.B., Nikolić, N.Č. 2014. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142-148.
- Karadeniz, F., Koca, N., Burdurlu, H.S. 2004. Karadeniz Bölgesine özgü bir meyve, karayemiş. *Geleneksel Gıdalar Sempozyumu (23-24 Eylül 2004, Van) kitabı*, 284-287.
- Karaman, A., Keskinler, F. 2009. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar, *Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, 29 (6): 1392-97.
- Kayacan, Y., Yazar, H., Kısa, E. C., Ghojbeigloo, B. E. 2017. A novel biomarker explaining the role of oxidative stress in exercise and l-tyrosine supplementation: thiol/disulphide homeostasis. *Archives of Physiology and Biochemistry* 124.3 (2018): 232-236.
- Keleş, Y. 2015. Antosiyanin Pigmentlerin Biyokimyası ve Analizi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1): 19-25, 2015.
- Kılmanoğlu, S. 2010. Kızılıçık ve karayemişin fenolik madde içeriği ve antimikrobiyel aktiviteleri üzerine bir çalışma. *Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141: 63-74.
- Kocayığit Bayezit, B. 2014. Biyolojik Bilimlerde RNA izolasyonu konusunda deneysel rehber material hazırlanması. *Gazi Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Öğretmenliği Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.

- Kolayli, S., Küçük, M., Duran, C., Candan, F., Dinçer, B. 2003. Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem.(cherry laurel) fruit grown in the Black Sea region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7489-7494.
- Komurcu Bayrak, E., Erginel Ünaltuna, N. 2011. Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 28-35.
- Kotan, E., Alpsoy, L., Anar, M., Aslan, A., Agar, G. 2011. Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB1 in human lymphocytes in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 27(7), 599-605.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:95-125.
- Kundi, H., Ates, I., Kiziltunc, E., Cetin, M., Cicekcioglu, H. 2015. A novel oxidative stress marker in acute myocardial infarction; thiol/disulphide homeostasis. *The American Journal of Emergency Medicine*, 33(11), 1567-1571.
- Kuru, M., Ergene, S. 2011. *Genetik*, Palme yayıncılık, 246-266.
- Lazze, M.C., Pizzala, R., Savio, M., Stivala, L. A., Prosperi, E. 2003. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535(1), 103-115.
- Lee, B.B., Cha, M.R., Kim, S.Y., Park, E., Park, H. R. 2007. Antioxidative and anticancer activity of extracts of cherry (*Prunus serrulata* var. spontanea) blossoms, *Plant Foods Human Nutrition*, vol. 62, pp. 79-84.
- Lindley, M.G. 1998. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Science Technology*, 19: 336-340.
- Litwack, G. 2018. *Human biochemistry, içinde: Nucleic Acids and Molecular Genetics*
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F., Alasalvar, C. 2006. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chemistry*, 99(1), 121-128.
- Löntz, W., Sirsjö, A., Liu, W., Lindberg, M., Rollman, O. 1995. Increased mRNA expression of manganese superoxide dismutase in psoriasis skin lesions and in cultured human keratinocytes exposed to IL-1 β and TNF- α . *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 349-355.
- Lu, M., Zhang, Q., Deng, M., Miao, J., Guo, Y., Gao, W., Cui, Q. 2008. An analysis of human microRNA and disease associations. *PloS one*, 3(10), e3420.

- Marchand, L.L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids-A. Review, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 296-301.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I. 2006. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
- Matteucci, E., Giampietro, O. 2010. Thiol signalling network with an eye to diabetes. *Molecules*; 15(12):8890-903.
- Milan, S.P.A. 1984. *The Macdonald encyclopedia of medicinal plants*; Macdonald: London, U.K; p 252.
- Mulder, G.J., Dencker, L. 2013. *Farmasotik toksikoloji*. Nobel Tıp Kitapevleri.
- Nagai, Y., Ueno, S., Saeki, Y., Soga, F., Hirano, M. 1996. Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 46(3), 791-795.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L. Hagmar, L., Strömberg, U. 2006. Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, 600 (1-2): 37-45.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95(2): 351-358.
- Özbek, S., 1978. Genel meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No:31, Adana, 386 s.
- Özbek, S. 1952. Karayemis (*Prunus laurocerasus* L.) Ankara Üniv. Zir.Fak. Yıll., 2, 309-314.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Perry, P., Evans, H.J., Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., 1996. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer, *Mutation Reserach*, 349: 43-50.
- Paglia, D.E., and Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70(1): 158 169.
- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V. 1981. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the US EPA's Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 87(2), 143-188.

- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 157-165.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Robert, E., Farrell, Jr. 2005. RNA methodologies. The cellular biochemistry revisited chapter1 why study RNA, USA: Elsevier Academic Press
- Sen, C.K., Packer, L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *The American journal of clinical nutrition*. 72(2): p. 653S-669S.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 2017. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16(2017) 144.
- Sroka, Z., Cisowski, W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. *Food Chemistry Toxicology* 41, 753-758.
- Stoper, H., Müller, O.S. 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro*, 11: 661-67.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3):497-500.
- Şenaylı, A., Şahin, A., Şenaylı, Y., Elmastaş, M. 2012. Evaluation the anti-diabetic activity of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis*). *The Open Conference Proceedings Journal*, 3: 8-12.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. 2010. Sitogenetik. Nobel Yayınevi, Ankara.
- Topcuoglu, C., Bakirhan, A., Yilmaz, F.M., Neselioglu, S., Erel, O. 2017. Thiol/disulfide homeostasis in untreated schizophrenia patients. *Psychiatry Reserach*, 251: 212-216.
- Turan, M. I., Turkoglu, M., Dundar, C., Celik, N., Suleyman, H. 2013. Investigating the effect of *Prunus laurocerasus* fruit extract in type II diabetes induced rats. *International Journal of Pharmacology*, 9(6), 373-378.
- Van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
- Van Schothorst, E.M., Bunschoten, A., Hoevenaars, F.P., Van der Stelt, I., Janovska, P. (2014). Direct comparison of health effects by dietary polyphenols at

- equimolar doses in wildtype moderate high-fat fed C57BL/6J0laHsd mice. Food Research International, 65, 95-102.
- Yazıcı, K., Çakır, B., Kazaz, S. 2011. An important genetic resource for Turkey, cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roemer). Acta Horticulturae, 890, 261-265.
- Yeşilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takashi, Y., Takeda, Y. 1999. Traditional medicine in Turkey IX. Folk medicine in North-West Anatolia. Journal of Ethnopharmacology, 64 (3), 195–210.
- Yılmaz, G. 2014. Sıçanlarda methotrexate kaynaklı testis hasarına karşı *Laurocerasus officinalis* roem. (karayemiş)' in antiapoptotik ve antioksidan etkileri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- Young, R. R. 2002. Genetic toxicology. Toxicology, 173, 103-21.
- Yuksel, M., Ates, I., Kaplan, M., Alışık, M., Erel, Ö. 2016. The dynamic thiol/disulphide homeostasis in inflammatory bowel disease and its relation with disease activity and pathogenesis. International Journal of Colorectal Disease, 31(6), 1229-1231.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H. 2006. Clastogenicity of fungicide afugan in cultured human lymphocytes. Mutation Research, 604(1): 53–59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F. 2014. Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. GIDA, 39(3): 179-186.
- Zeiger, E. 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 28: 85-95.
- Zeybek, N., 1960. Türkiye'nin tıbbi bitkileri. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Tuylu B.A., Turk, A., Barutca, B. 2004. The antimutagenic and antimutagenic properties of the extract of the lichen *Cetraria aculeata*. Toxicology Application Pharmacology, 197:641.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra YILDIZ

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Doktora	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyokimya	2014
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyolojik Bilimler Bölümü/ Biyoloji	2011
Lise	Selahattin Akbilek Lisesi	2006

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2013-Halen	Sakarya Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER (makale, bildiri, proje vb.)

1. Bilgin Esra, Can Demirdögen Birsen, Özçelik Aysun, Demirkaya Şeref, Adalı Orhan (2019). Association analysis of Glutathione S-transferase omega-1 and omega-2 genetic polymorphisms and ischemic stroke risk in a Turkish population. *Neurol Res*, 41(2), 118-124., Doi: 10.1080/01616412.2018.1544385 (Yayın No: 5892968)

2. Yazar Hayrullah, Bilgin Esra, İnci Mustafa Baran, Özbek Betül (2017). Plasma thiol/disulphide homeostasis in adult patients with stable angina diagnosis. Clin Chem Lab Med, 55(51), Doi: 10.1515/cclm-2017-5020 (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet) (Yayın No: 3530096)
3. Bilgin Esra, Can Demirdögen Birsen, Demirkaya Şeref, Adalı Orhan (2016). Analysis of Glutathione S-transferase 1 (GSTO1) ALA140ASP genetic polymorphism in Turkish Population. International Conference on Biochemistry and Molecular Biology 2016 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4505367).
4. Bilgin Esra, Öner Tuğçe, Can Demirdögen Birsen, Adalı Orhan (2015). Association Analysis of CYP24A1 rs927650 polymorphism and ischemic stroke risk in Turkish population. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (ICONSETE) (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4505348)
5. Can Demirdögen Birsen, Bilgin Esra, Özçelik Aysun, Demirkaya Şeref, Adalı Orhan (2014). Association analysis of GSTO2 Asn142Asp genetic polymorphism and ischemic stroke risk in Turkish population. Federation of European Biochemical Societies, 65(783), 100-100. (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4522531)
6. Bilgin Esra, Can Demirdögen Birsen, Özçelik Aysun, Adalı Orhan, Demirkaya Şeref (2013). GST 1 ALA140ASP polimorfizmi ile Türk populasyonunda iskemik inme riski ilişkisinin incelenmesi. XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 38(1) (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4502354)
7. Laurocerasus Officinalis Roem. (Karayemis) Ekstraktının Muhtemel Genotoksik/Antigenotoksik Etkilerinin Arastırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü:AKSOY HÜSEYİN, Araştırmacı: BİLGİN ESRA, 20/03/2019 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
8. Plasma Thiol/Disulphide Homeostasis In Patitents With Stable Angine (UIF), Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: ÇAKAR MEHMET AKİF, Araştırmacı: İNCİ MUSTAFA BARAN, Yürütücü: YAZAR HAYRULLAH, Araştırmacı: BİLGİN ESRA, 15/05/2017 - 01/01/2018 (ULUSAL)

HOBİLER

Doğa yürüyüşü yapmak, yüzmek ve kitap okumak.