
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

BİR FLAVONOİD OLAN HYPEROSIDE'İN GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

Ümmügülsüm Kübra DİLEK

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2020

Ümmügülsüm Kübra DİLEK tarafından hazırlanan "BİR FLAVONOİD OLAN HYPEROSIDE'İN GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ...……

Başkan: Prof. Dr. Fatma ÜNAL

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ……...

Üye: Prof. Dr. Serkan YILMAZ

Sağlık Bilimleri Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. ……...

Tez Savunma Tarihi: 24/07/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

…….…….

Prof. Dr. Cevriye GENCER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ümmügülsüm Kübra DİLEK

24/07/2020

BİR FLAVONOİD OLAN HYPEROSIDE'İN GENOTOKSİK VE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ümmügülsüm Kübra DİLEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2020

ÖZET

Flavonoidler, önemli antioksidan özelliklere sahip sekonder bitki fenolikleri sınıfıdır. İnsan diyetinde, meyve ve sebzelerde fazlaca bulunmaktadırlar. Antioksidan etkilerini; lipit peroksidasyonunu inhibe etme, redoks aktif metalleri şelatlama ve reaktif oksijen türlerini içeren diğer süreçleri zayıflatma şeklinde göstermektedirler. Hyperoside (quercetin-3-O-D-galaktosid), farklı bitkilerden izole edilmiş bir flavonol glikozittir. Antienflamatuar, anti-depresan, nöroprotektif, kardiyo-protektif, anti-diyabetik, anti-kanser, mantar önleyici, radyo-protektif, gastro-protektif ve antioksidan aktiviteler gibi farklı farmakolojik etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada insan periferal kan lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak hyperosidenin *in vitro* genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Lenfositler, hyperosidenin dört farklı konsantrasyonu (7,8; 15,62; 31,25 ve 62,5 µg / mL) ile tek başına ve eş zamanlı olarak 0,20 µg / mL Mitomisin C (MMC) ve 100 µM Hidrojen peroksit (H_2O_2) ile muamele edilmiştir. Hyperoside KA, KKD ve MN testlerinde genotoksik etki göstermemiştir. Ayrıca mitotik indeksi (Mİ) de düşürmemiştir. Diğer yandan hyperoside, MMC ve H_2O_2'in neden olduğu KA, KKD ve MN (MMC uygulaması hariç) frekansında önemli ölçüde azalma sağlamıştır. Hyperosidenin her iki mutajenik ajan ile birlikte 24 saatlik eş zamanlı uygulaması pozitif kontrollere göre mitotik indeksin artmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar hyperosidenin genotoksik etkilerden ziyade antijenotoksik etkiler sergilediğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 20316

Anahtar Kelimeler : Genotoksisite, Antigenotoksisite, Hyperoside, Kromozomal anormallik, Kardeş kromatid değişimi, Mikronükleus

Sayfa Adedi : 118

Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF HYPEROSIDE FLAVONOID

(M. Sc. Thesis)

Ümmügülsüm Kübra DİLEK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

Flavonoids are a class of secondary plant phenolics with significant antioxidant properties. In the human diet, they are most concentrated in fruits and vegetables. Their antioxidant effects stem from the ability to inhibit lipid peroxidation, chelate redox-active metals, and attenuate other processes involving reactive oxygen species. Hyperoside (quercetin-3-O-D-galactoside) is a flavonol glycoside which has been isolated from different plants. It has different pharmacological actions such as anti-inflammatory, anti-depressant, neuro-protective, cardio-protective, anti-diabetic, anti-cancer, anti-fungal, radio-protective, gastro-protective, and antioxidant activities. This study was aimed to investigate *in vitro* genotoxic and antigenotoxic effects of hyperoside using chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), and micronucleus (MN) assays in human peripheral blood lymphocytes. Lymphocytes were incubated with four different concentrations of hyperoside (7.8, 15.62, 31.25 and 62.5 µg/mL) alone and simultaneously with 0.20 µg/mL Mitomycin C (MMC) and 100 µM Hydrogen peroxide (H_20_2). Hyperoside did not show significant genotoxic effects in the CA, SCE and MN assays. In addition, it did not decrease the mitotic index (MI). On the other hand, hyperoside significantly reduced CA, SCE and MN (except for MMC treatment) frequencies induced by MMC and H_2O_2. Simultaneous treatment of Hyperoside with both of mutagenic agents for 24 hour increased mitotic index compared to positive controls. These results demonstrate that hyperoside exhibited antigenotoxic effects rather than genotoxic effects.

Science Code : 20316

Key Words : Genotoxicity, Antigenotoxicity, Hyperoside, Chromosomal abnormality, Sister chromatid change, Micronucleus

Page Number : 118

Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni her konuda destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren ayrıca insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana sabırla ve büyük bir ilgiyle zamanını ayıran, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen laboratuvar doktora öğrencisi Esra ERİKEL'e ve laboratuvardaki tüm Lisans Üstü ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca iş yerimde uzmanlığımı yapmam için beni destekleyen ve izin veren Gıda ve Tarım Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdür Yardımcısı Vekili Sayın Doç. Dr. Veli GÜLYAZ'a ve Şefim Yüksek Kimyager Osman KARA'ya teşekkür ederim. Diğer yandan beni her fırsatta cesaretlendiren ve hep yanımda olan kızı olmaktan herzaman gurur duyduğum babam Serdar ALBAYRAK, annem Yasemin ALBAYRAK ve kardeşlerime, uzmanlığım boyunca manevi desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım Serkan DİLEK'e ve hayatımı anlamlandıran, bakış açımı değiştiren ve benim en değerlim olan kızım Zeynep Mina DİLEK'e varlıklarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Genetik Hasar ve Karsinogenez 5

2.2. Ekzojen Ajanlar/ Kimyasal Ajanlar 7

2.2.1. Alkilleyici ajanlar 8

2.3. Endojen Ajanlar 11

2.3.1. Serbest radikal kaynakları 13

2.3.2. Serbest radikallerin etkileri 15

2.4. Kanser Kemopreventif Ajanları 18

2.5. Antioksidanlar 18

2.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları 19

2.5.2. Antioksidanların sınıflandırması 20

2.6. Fenolik bileşikler (Polifenoller) 23

2.6.1. Flavonoidler 26

2.6.2. Hyperoside 28

Sayfa

2.7. Genotoksisite ve Antigenotoksisite 32

2.7.1. Kromozomal Anormallik (KA) Testi 35

2.7.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi 35

2.7.3. Mikronukleus (MN) testi 37

3. MATERYAL METOD 39

3.1. Materyal 39

3.1.1. Test Materyali 39

3.2. Metod 41

3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ve kültürdeki uygulamalar: 41

3.2.2. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar 42

4. ARAŞTIRMA VE BULGULARI 51

4.1. Kromozomal Anormallik Testi Sonuçları 51

4.2. Mitotiks İndeks 60

4.3. Kardeş Kromatid Değişimi Test Sonuçları 64

4.4. Mikronükleus Testi Sonuçları 69

5. TARTIŞMA 75

KAYNAKLAR 97

ÖZGEÇMİŞ 118

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. ROT kaynakları 12

Çizelge 2.2. RNT kaynakları 12

Çizelge 2.3. Serbest radikal oluşturan kaynaklar 13

Çizelge 2.4. Hyperosidenin aktivite çeşitleri 28

Çizelge 4.1. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 24 saatlik uygulanmasının sonucunda insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları 53

Çizelge 4.2. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 48 saatlik uygulamasının sonucunda insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekanslar 56

Çizelge 4.3. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen Mİ frekansları 61

Çizelge 4.4. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen Mİ frekansları..... 62

Çizelge 4.5. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD ve Rİ frekansları 65

Çizelge 4.6. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD ve Rİ frekansı 67

Çizelge 4.7. Hyperoside, MMC+Hyperoside ve H_2O_2+Hyperoside eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi 70

Çizelge 4.8. Genotoksisite test sonuçları……. 72

Çizelge 4.9. Antigenotoksisite test sonuçları……..…… 73

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Kanser oluşumunda moleküler değişiklikler 5

Şekil 2.2. Oksitatif stres ve karsinogenez arasındaki ilişki..... 6

Şekil 2.3: Alkilleyici ajan grupları ve moleküler yapıları..... 9

Şekil 2.4. Canlı türlerde ROT ve RNT üretiminin şekilsel gösterimi..... 15

Şekil 2.5. Oksitatif stres ve etkileri..... 15

Şekil 2.6. ROT'un DNA'da oluşturduğu hasar çeşitleri..... 17

Şekil 2.7. Oksitatif stresin oluşturduğu DNA lezyonları ve karsinogenez ilişkisi..... 17

Şekil 2.8. Antioksidanların serbest radikalleri nötralize etmesi 19

Şekil 2.9. Antioksidanların sınıflandırılması 20

Şekil 2.10. Doğal antioksidanların etkileri 21

Şekil 2.11. Fenol halkası..... 24

Şekil 2.12. Polifenollerin sınıflandırılması 24

Şekil 2.13. Flavonoidlerin kimyasal yapısı..... 27

Şekil 2.14. Flavonoidlerin sınıflandırılması..... 27

Şekil 2.15. Hyperosidin (Quercetin 3-galactoside) kimyasal yapısı..... 28

Şekil 2.16. Genotoksik ajanların DNA'ya etkileri ve sonuçları 33

Şekil 2.17. BrdU'nun üç metafaz boyunca kromozomdaki renk değişimi..... 36

Şekil 2.18. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN oluşumu.... 38

Şekil 3.1. Hyperosidenin kimyasal formülü 39

Şekil 3.2. Mitomisin-C kimyasal yapısı..... 40

Şekil 3.3. Hidrojen peroksitin yapısal formülü..... 40

Şekil 3.4. Kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi yapılış diyagramı 43

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.5. Mikronukleus testi preparasyon diyagramı 45

Şekil 3.6. Preparasyon diyagramı 47

Şekil 4.1. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 24 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen anormal hücre frekansı 54

Şekil 4.2. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 24 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen hücre başına düşen anormallik sayısı 54

Şekil 4.3. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 48 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen anormal hücre frekansı 57

Şekil 4.4. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 48 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen hücre başına düşen anormallik sayısı 57

Şekil 4.5. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks değerleri 63

Şekil 4.6. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks değerleri…….. 63

Şekil 4.7. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi 66

Şekil 4.8. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi 68

Şekil 4.9. Hyperoside, Hyperoside+MMCve Hyperoside+ H_2O_2 eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde MN frekansı 71

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Hperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H2O2 eş zamanlı uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri..... 58

Resim 4.2. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H2O2 eş zamanlı uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri..... 68

Resim 4.3. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H2O2 eş zamanlı uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen mikronukleuslar... 71

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
g	Gram
Gy	Gray
kg	Kilogram
L	Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
^{o}C	Santigrat derece
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanozin
A549	Akciğer adenokarsinom hücre hattı
AhR	Aril karbon reseptörü
ARE	Antioksidan cevap elementi
BrdU	Bromodeoksiüridin
CAR	Yapısal androstron reseptörü
CAT	Katalaz
CHO	Çin hamster yumurtalık hücre hattı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit

Kısaltmalar	Açıklamalar
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
ECV-04	İnsan endotel hücre hattı
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
H	Hidrojen atomu
H1979	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HepG2	Karaciğer hepatosellüler karsinom hücre hattı
HLE-B3	İnsan mercek epiteli hücre hattı
HOCI	Hipokloröz asit
HPCL	Yüksek performanslı sıvı kromografi
HT-29	İnsan kolon kanseri hücre hattı
K562	İnsan lenfoblast hücre hattı
KA	Kromozomal anormallik
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LD_{50}	Letal doz 50
LX-2	İnsan hepatik hücre hattı
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomosin-C
MN	Mikronukleus
MÖ	Milattan önce
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NF-BK	Nükleer faktör kabba B
Nrf-2	Nükleer eritroid faktör 2
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
OH	Hidroksil
PC-12	**S**ıçan adrenal feokromositoma hücre hattı
PXR	Pregnon X reseptörü
Rİ	Replikasyon indeksi
RNA	Ribo nükleik asit
RNT	Reaktif nitrojen türleri

Kısaltmalar	Açıklamalar
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dimutaz
TBHP	Tert-butil hidroperoksit
Trx	Tioredoksin
U138MG	İnsan glioblastoma hücre hattı
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji, nüfus artışı, kimyasal kullanımındaki artış gibi olaylar çevresel mutajen ve kanserojenlerin artmasına sebep olmaktadır. Hücreler sürekli olarak bu çevresel kanserojenlere maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle hücrenin genomunda genetik değişiklikler ortaya çıkmakta, ancak sıkı kontrol ve tamir mekanizmaları ile genellikle bu tür hasarlar sonraki nesil hücrelere iletilmeden önce onarılmaktadır. Genetik hasarın onarılmayacak kadar büyük olduğu durumlarda ise hücre apoptoza gönderilmektedir. Ancak apoptoza gönderilmeyen kontrolden kaçan hücreler de tümör hücresine dönüşebilmektedir.

Kanser, geçmişi MÖ.3000'li yıllara kadar dayanan ve halen günümüzde insan ve hayvanlarda ölüme neden olacak kadar tehlikeli, gittikçe yaygınlaşan bir hastalıktır. Kanser, dünya çapında en sık görülen ikinci ölüm nedeni olup her yıl 8 milyondan fazla insanı öldürmektedir. Kanser insidansının önümüzdeki on yılda %50'den fazla artması beklenmektedir. Onkogenez, bir organizmadaki hücrelerin anormal şekilde kontrolsüz olarak çoğalması, yayılması ve birikmesi sonucu oluşur. Oluşan kanser hücresi farklı doku ve organlara metastaz yaparak yayılabilir. Kanserin oluştuğu ve metastaz yaptığı yere göre birçok tipi bulunmaktadır. Kanser oluşumu hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlıdır. Bu denli tehlikeli bir hastalıktan korunmak için insanlar yaşam standartlarını değiştirmeye, beslenmelerine dikkat etmeye başlamışlardır. Bunların yanı sıra fitoterapi ile de ilgilenmişlerdir. Kemopreventif ajanlar, kanserin ilerlemesini önlemek, bastırmak veya azaltmak için doğal veya sentetik ajanların kullanımı olarak tanımlanır. Bir antioksidan sınıfı olan fitokimyasallar, tümör başlangıcı ve ilerlemesinin kilit moleküler mekanizmalarını bloke ederek ve premalign aşamayı tersine çevirerek kemopreventif etkilerini sergileyebilmektedirler.

Kanser oluşumuna neden olan etkenler fiziksel ve kimyasal ajanlar olarak ayrılmaktadır. Kimyasal ajanlardan en yaygın çalışılan gruplardan biri alkilleyici ajanlardır. Alkilleyici ajanlar, DNA molekülünün pürin bazlarına bir alkil grubu ekleyerek, çift sarmalın ipliklerinin gerektiği gibi bağlanmasını önleyen bileşiklerdir. Alkile edici ajanların, zincir içi veya zincirler arası çapraz bağlama yoluyla DNA ile doğrudan etkileşime girdiği bildirilmektedir. Alkilleyici ajanlara maruz kalma, hücre bölünmesinde kromozomal anormalliklere yol açmaktadır.

Endojen karsinojenler olarak düşünülen serbest radikaller vücudun metabolik faaliyetleri sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Oluşan serbest radikallerin kalıcı inflamasyonla ilişkili yüksek kanser riskinin bir kısmını oluşturduğu düşünülmektedir. Aşırı miktarda reaktif oksijen türü (ROT) oluşumu oksidatif strese yol açar ve oksidatif DNA hasarı oluşur. Bu hasar kanserin oluşmasına ve ilerlemesine büyük bir etki göstermektedir. Reaktif oksijen türleri bazı endojen ve eksojen kaynaklar tarafından hücrelerde sürekli olarak üretilirler. Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir. Antioksidanlar serbest radikalleri yok ederek hücresel fonksiyonların korunmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca antioksidanlar, oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde de görev almaktadırlar.

Flavonoidler en çok bilinen ve tercih edilen antioksidan sınıfıdır. Bunlar bitki kaynaklı gıdalarda doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir. Bununla birlikte, genellikle toksik olmayıp antialerjik, antienflamatuar, antioksidatif, serbest radikal süpürücü, antimutajenik ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler. Bu nedenle kemopreventif ajanlar olarak görev yapabilmektedirler.

Hyperoside, antioksidanların flavonoid sınıfında yer olan bir fitokimyasaldır. Esas olarak Hypericum (sarı kantaron) ve Crataegus (alıç) cinsi bitkilerde ayrıca çeşitli meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Hyperoside son yıllarda özellikle kanserin önlenmesi ve tedavisi için yapılan çalışmalarda sıkça tercih edilmektedir. Yapılan bilimsel araştırmalarda yumurtalık kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri, cilt kanseri, meme kanseri, servikal kanser gibi birçok kanser tipinde çeşitli hücre içi sinyal yolaklarını, onkogen yolaklarını veya apoptozu indükleyerek koruma veya önleme sağladığı açıklanmıştır. Ayrıca hyperosidenin yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu da ortaya konmuştur.

Genetik toksikoloji, endojen veya ekzojen ajanlara maruziyetin ardından DNA'da oluşan kimyasal ve fiziksel hasarları inceleyen bilim dalıdır. Birçok ajanın genotoksik etkisinin incelendiği çalışmalarda ajanların DNA hasarının ardından tümör oluşumunu (karsinojenez) indüklediği görülmektedir. Bu nedenle, genotoksisite ile kanser arasında

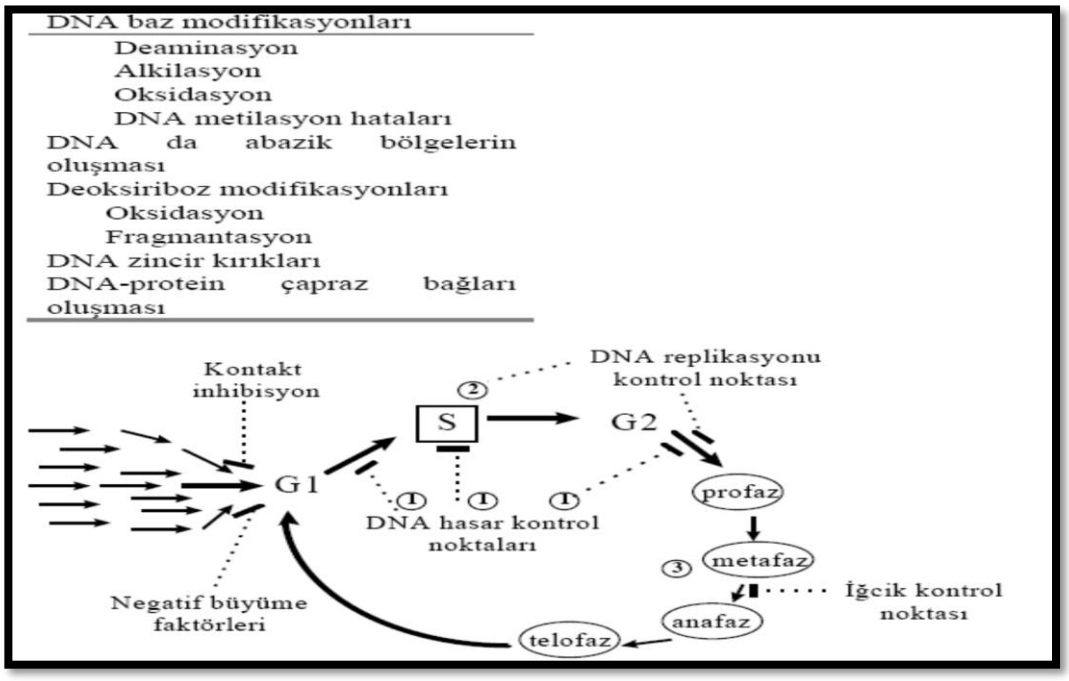
kuvvetli bir ilişki olduğu ve insanlar için karsinojen olan ajanların %90'ının genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir. Farklı genotoksik ajanların DNA'da hasar oluşturma potansiyellerini engelleyebilecek çeşitli maddeler için antigenotoksik terimi kullanılmaktadır. Bu bağlamda özellikle kimyasal maddelerin olası toksik etkilerinin engellenmesi stratejisinin belirlenebilmesinde, maddelerin antigenotoksik etkilerinin tanımlanmasının önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada hyperosidenin genotoksik etkilerinin ve bir alkilleyici ajan olan mitomisin-C ile bir reaktif oksijen türevi olan hidrojen peroksite karşı antigenotoksik etkilerinin *in vitro* insan lenfosit kültüründe kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

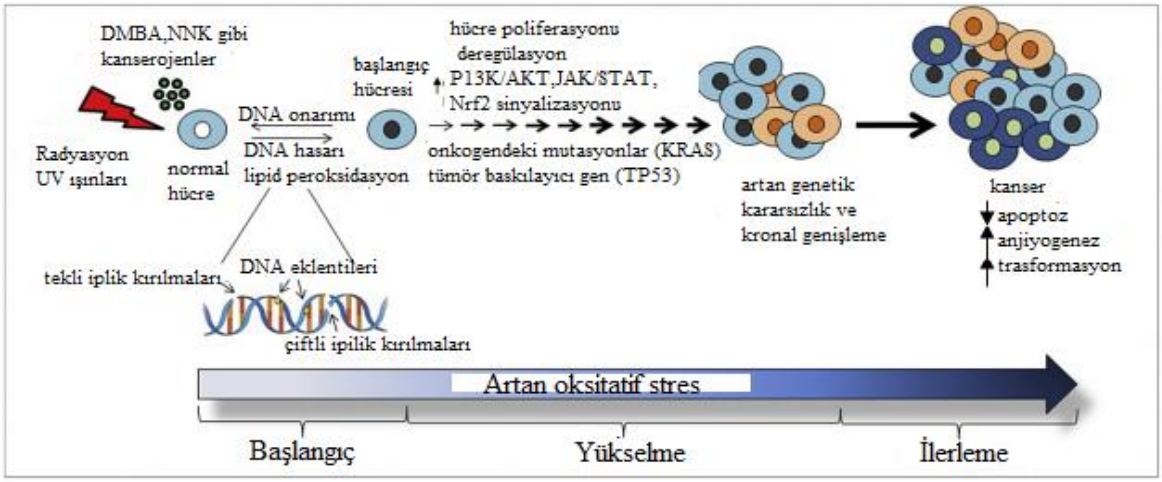
2.1. Genetik Hasar ve Karsinogenez

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde çeşitli faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. Tüm kanserlerin başlangıcı DNA hasarları ile olmaktadır. Kanserlerin %10- 15'inin, kalıtımsal olduğu geriye kalan %85-90'lık kısmın ise DNA'nın mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyondaki hatalardan oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 2.1). Kanser multifaktöryel olup bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna neden olma potansiyeline sahiptir. Çevresel olarak (ekzojen) maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, sigara, alkol, radyasyon, ısı, güneş ışığı ve ilaçlar kansere sebep olabilmektedir. DNA hasarına sebep olan ekzojen ajanlardan biri Alkilleyici ajanlardır. Alkilleyici ajanlar içerdikleri alkil grubuyla DNA ile kovalent bağ oluşturmak üzere reaksiyona giren ve böylece DNA'ya hasar vereren kimyasallardır. DNA'da zincir içi ve zincirler arası yapılan bağlarla sadece DNA transkripsiyonu değil hücre çoğalması da durdurulmuş olur. Lösemi tümörleri gibi yavaş büyüyen kanserlerin tedavisinde alkilleyici ajanlar sıklıkla tercih edilmektedir [1,2].



Şekil 2.1. Kanser oluşumunda moleküler değişiklikler [3]. 1-DNA hasarları, 2- Replikasyon hataları, 3-Kinetokor ve kromozom dizilme hataları

Ekzojen ajanların yanı sıra DNA hasarı üzerine etkisi fazlaca olan endojen ajanlar da bulunmaktadır Endojen ajanlardan olan serbest radikaller DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonlarına ve DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi DNA hasarlarına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününün oluşmasına yol açarlar. Hücrede DNA hasarı oluştuğunda dört önemli yanıt oluşmaktadır. Bunlardan ilki hasarlı bölgenin çıkartılarak yeniden yapılandırılması yani DNA onarım sistemidir. İkincisi DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesidir. Bir diğer yanıt ise transkripsiyonel gen susturulmasıdır. Son olarak onarılamayacak olan hasarların programlanmış hücre ölümü ile sonlandırılmasıdır. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemez ise gende bir mutasyon meydana gelir ve sonuç olarak genomik kararsızlık oluşur. Genomik kararsızlık organizma düzeyinde genetik hastalıklar, yaşlanma veya karsinogenez ile sonuçlanmaktadır [4]. Karsinogenez oluşumunda birçok sistem rol oynamaktadır. Yapılan birçok kanser araştırmasında malignitenin oluşumunda oksitatif stresin büyük rolü olduğu ve oksitatif stresin karsinogenezin teşhisinde güvenilir bir belirleyici olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.2) [5].



Şekil 2.2. Oksitatif stres ve karsinogenez arasındaki ilişki [6]

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi kimyasal kanserojenler ve radyasyon normal hücrede DNA hasarına (tek ve çift zincir kırılmaları ve DNA eklentileri) ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Bu da oksidatif stresin artması ile birlikte hücre çoğalmasının düzensizleşmesine yol açmaktadır. Tümör baskılayıcı gende oluşan mutasyonlar ya da onkogen oluşumları genetik kararsızlık ve klonal hücre büyümesine neden olmaktadır. Kanserleşmiş hücrede apoptoz azalırken, anjiyogenez ve hücre çoğalması artmaktadır [6].

2.2. Ekzojen Ajanlar / Kimyasal Ajanlar

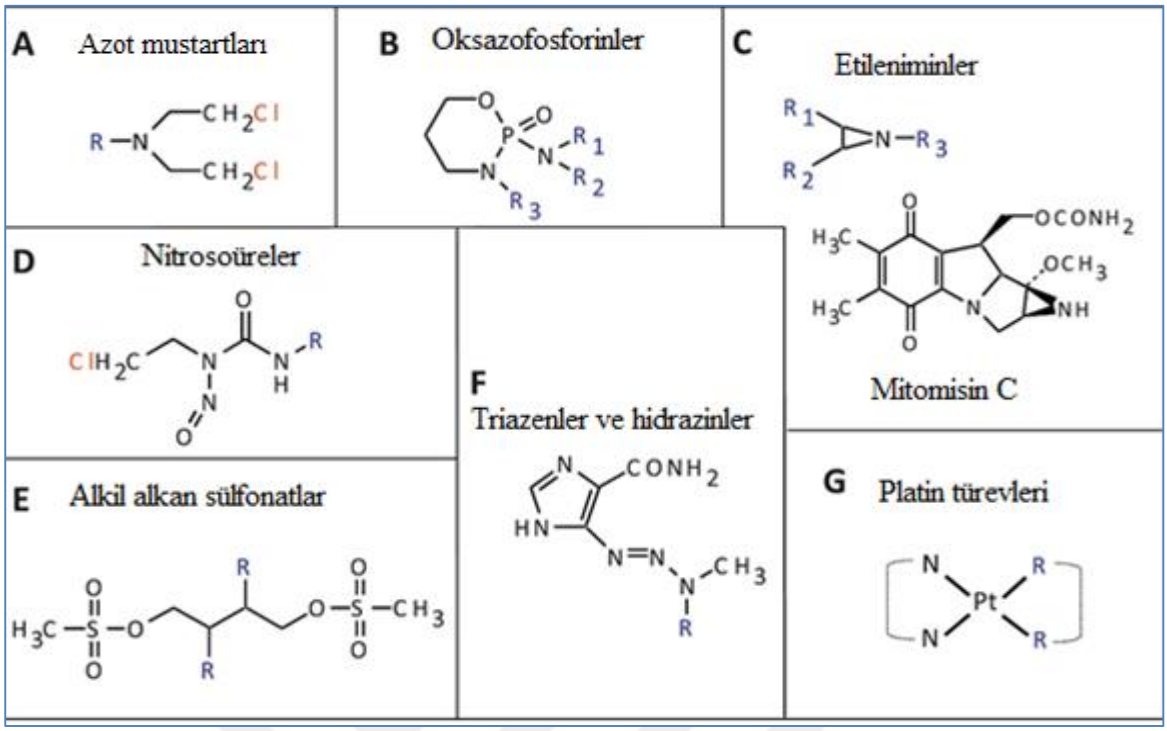
Kanser sürecinde hücrelerde meydana gelen çeşitli anormallikler çeşitli faktörlerin etkisi ile oluşmaktadır. Bunlar; kimyasal, fiziksel ve biyolojik faktörlerdir.

18.yy'da baca temizleyicilerinde skrotum kanserlerinin sık görülmesi ve 19.yy'dan sonra boya endüstrisinde çalışanlarda sıklıkla mesane kanserinin görülmesi ile kimyasal kanserojenler fark edilmiş ve araştırılmaya başlanmıştır. Kimyasal karsinojenler ya doğrudan ya da metabolitleri aracılığıyla toksik etkilerini gösterirler. Doğrudan etkileri yapıları itibariyle elektrofilik olarak (ör. alkilleyici ve açilleyici ajanların bazıları) gösterirken, metabolitleri aracılığıyla karsinojen olan ajanlar reaktif elektrofilik ürünleri ile etkilerini göstermektedirler. Elektrofilik maddeler su ve glutatyon moleküllerini etkileyerek serbest radikal oluşumunu sağlar ve bunların oluşturduğu oksitleme ile DNA'da hasara neden olurlar. Ayrıca bu maddeler doğrudan DNA'ya bağlanıp bazları akilleyerek kanserojenik etki göstermektedirler. Kimyasal kanserojenlerin ilk hedefleri genellikle tümör baskılayıcı genler ve proonkogenlerdir [7,8].

Kimyasal kasrinogenez 4 aşamada [başlama (initiation), geçiş (promotion), dönüşüm (conversion) ve ilerleme (progression) meydana gelmektedir. Başlama aşamasında kenserojenler hücre içerisine girer ve metabolize olarak elektrofilik ürünler oluşturur. Hücre bu ürünleri ortadan kaldırmaya çalışır fakar kaldırılamayanlar DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak hasar meydana getirirler. Oluşan hasar tamir edilebilecek düzeyde ise tamir edilir değil ise hücre apoptoza gönderilir. Fakat tamir edilemeyen ve apoptoza neden olamayan hasarlar (çoğunlukla mutasyonlar) kalıcı hale gelir ve hatalı replikasyona neden olurlar. Böylece başlangıç hücresi meydana gelir. Geçiş aşaması sessiz bir aşama olup çoğunlukla onarılabilir hasarlar meydana gelmektedir. Geçiş aşaması ile dönüşüm aşaması genellikle içiçe aşamalardır. Dönüşüm aşamasında onkogen aktivasyonları ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonları meydana gelmektedir. İlerleme aşamasında ise oluşan tümör yine bir takım genetik değişiklikler sonucunda klinik hale gelir. Bir hücrenin kimyasal bir ajan ile kanser hücresine dönüşmesi için ilk önce başlatıcı ajanlara ardından sık sık promoter ajanlara maruz kalması gerekmektedir. Kimyasal karsinojenler başlatıcı ve promoter veya her iki etkiyide gösterebilen komple karsinojenler olarak etki gösterirler [9-11].

2.2.1. Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyici ajanlar, DNA'ya zarar veren kimyasal ajanların bir grubudur. İçerdikleri alkil grupları ile DNA'da kovalent bağlar oluşturarak hücre ölümüne neden olmaktadırlar. Alkilleyici ajanlar bu etkileri ile uzun zamandır kanser kemoterapisinde sıklıkla tercih edilmektedirler. Bu ajanlar güçlü elektrofillik olarak etki eden ajanlardır. Bu elektrofilikler doğrundan veya karbonyum ara ürünü oluşturarak alkil gruplarını hücresel hedef moleküllere transver edebilmektedirler. Bu reaksiyon; fosfat, amino, hidrolsil ve karboksil gibi grupların nükeofilik bölümlerinin alkillenmesi ile kovalent bağların oluşmasına neden olmaktadır. Alkilleyici ajanlar, zincirler arası ve / veya zincir içinde çapraz bağlar oluşturabilmektedirler. Nükleofılin ve alkilleyici ajanın moleküler yapısına bağlı olarak DNA'da tercih edilen alkilasyon yerleri farklıdır. Genellikle guanin bazı bu reaksiyona yakındır. Pürin bazlarından guaninin 7. azot atomuna alkil grubu eklenmesi depurinizasyona neden olur. Depürinizasyon, pürin bazlarının DNA'dan koparak ayrılmasıdır. Böylece depürinize olmuş iplikcikteki boş kalan yere, replikasyon sırasında herhangi bir baz gelebilmektedir. Bunun sonucunda DNA ipliklerinde çapraz bağlar ve helikste kopmalar meydana gelebilmektedir. Bu ajanların sitotoksik etkisi esas olarak DNA replikasyonu ve / veya transkripsiyon gibi temel DNA işlemlerini bozabilecek DNA bazlarının alkillenmesinden kaynaklanmaktadır. Alkilleyici ajanlar 7 ana sınıfa ayrılmaktadır. Bu gruplar ve moleküler yapıları Şekil 2.3 de gösterilmiştir [12-14].



Şekil 2.3. Alkilleyici ajan grupları ve moleküler yapıları [14]

Azot mustartlar

Bu alkilleyici ajanlar kükürt mustartlardan türetilmiş, lösemi ve lenfoma tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılan ilk ajanlardır. Özellikle aziridinyum iyonunun oluşumuna yol açarlar. Bu elektrofilik oluşum guaninlerin 7. azot molekülü ile kovalent bağlantının kurulmasından sorumludur. Elde edilen mono-alkilasyon ürünleri mutajenik olan baz yanlış eşleşmelerine yol açmaktadır [14,15].

Oksazofosforinler (veya oksazaphorinler)

Bu alkilleyici ajanlar, azot hardallarının stabilitesini arttırmak ve toksisitesini azaltmak için sentezlenmiştir. Klinikte kullanılan başlıca türevleri siklofosfamid ve ifosfamiddir. Bu bileşikler karaciğerde sitokromlar (P450) tarafından bir aktivasyon adımı gerektiren ön-ilaçlardır. Siklofosfamid ilk önce P450 ile oksitlenir ve 4-hidroksisiklofosfamid, akrolein ve bir dikloro ara maddeleri oluşur. Bu ara maddelerin hidrolizi DNA alkilasyonundan ve guanin 7. azot molekülü çapraz bağlantılarının oluşumundan sorumludur [14].

Nitrosoüreler

Bu sınıf alkilleyici ajanlar, çeşitli kanser hücre dizilerine karşı kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Etki mekanizmaları, temel koşullarda diazohidroksidin oluşumuna dayanır. Bu da öncelikle guaninlerde gerçekleşen alkillenmeden sorumlu reaktif bir katyon üretir [14].

Alkil alkan sülfonatlar

DNA çapraz bağları veya protein-DNA çapraz bağlarını indükleyen sülfonillenmiş iki fonksiyonlu alkilleyici bir maddedir. Busulfan bu grubun tek üyesidir. Kronik miyeloid lösemideki hematopoetik kök hücre nakli uygulamasından önce kullanılmaktadır [14].

Triazenler ve hidrazinler

Triazenler, 3 bitişik azot atomunun varlığı ile karakterize edilir. Klinikte, tek başına veya diğer sitotoksik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır. DNA bazlarında guanin timin yanlış eşleşmesine neden olan mutajenik bir etki göstermektedir. Bu mutasyonun onarılmaması sonucunda sekonder iplik kopmaları oluşur ve sitotoksik etki ile sonuçlanmaktadır [14].
Hidrazinler enzimatik dönüşüm ile yüksek derecede reaktif diazonyum iyonu üreten bir ön ilaçtır. Birçok tek işlevli ajan gibi, DNA kopmalarını indükler [14].

Platin türevleri

Platin bileşikleri çeşitli katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş klinik kullanımları nedeniyle, çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur [16].

Etileniminler

Etileniminlerin en çok bilinen üyesi Mitomisin C'dir. *Streptomyces* bakterilerinin fermantasyonundan üretilen bir antibiyotiktir. Mitomisin C metabolik indirgeyici aktivasyona giren ve DNA'nın çapraz bağlanması da dahil olmak üzere hücreler üzerinde çeşitli oksijen gerilimine bağlı sitotoksik etkilere sahip olan bir biyo-indirgeyici

ve alkilleyici ajandır. MMC orijinal yapısında nükleofillere karşı inert bir maddedir, ancak kinon halkasının azaltılmasıyla başlatılan bir dizi reaksiyondan sonra son derece reaktif bir bis-elektrofile dönüştürülür [17,18]. Alkilleyici ajanların tümü, karbonyum iyonu ara maddelerinin oluşumu yoluyla elektrofiliktir. MMC, hücre içinde enzimatik olarak indirgenir veya redoks döngüsü yoluyla oksijen radikalleri üretebilen reaktif türler vererek DNA çapraz bağlanmalara neden olmaktadır. Daha spesifik olarak, MMC sitokrom P450 redüktaz gibi enzimler tarafından aktive edildikten sonra, DNA molekünün adenin ve guanin bazları arasında çapraz bağların oluşmasını sağlar. Böylece DNA sentezini bloke eder ve hücre mitozunu inhibe eder. Bu da hücre döngüsünün durmasına neden olur. DNA çapraz bağları, hücre ölümünün birincil nedeni olarak gösterilmiştir. DNA alkilasyonu, hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında meydana gelebilmesine rağmen, biyolojik sonuçlar hücre siklusunun özellikle geç G_1 ve S fazı sırasında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Mitomisin C'nin ara ürünleri moleküler oksijen ile reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturur ve sonuçta lipit peroksidasyonu, DNA ve protein hasarına neden olur [19,20].

2.3. Endojen Ajanlar / Serbest Radikaller

Serbest radikal, bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan ve bu nedenle kararsız ve yüksek derecede reaktif olan bir atom veya moleküldür. Bir atomun kimyasal davranışı, en dış elektron kabuğundaki elektron sayısı ile belirlenir. En dıştaki elektron kabuğu dolu olduğunda, atom kararlıdır (nano-radikal) ve kimyasal reaksiyonlara girme eğiliminde değildir. Bununla birlikte, en dıştaki elektron kabuğu dolu olmadığında (radikal), atom kararsızdır. En dıştaki elektron kabuğunu doldurmak veya boşaltmak için bir elektron alarak (indirgeyerek) veya kaybederek (oksitliyerek) kendini stabilize etmeye çalışırlar. Ya da dış kabuğunu tamamlamak isteyen başka bir atomla bağlayarak elektronlarını paylaşırlar. Serbest radikal oluştuğu zaman yakınındaki bir molekülden başka bir elektron almaya çalışacak ve bunu başardığında, diğer molekülde eksik bir elektron bırakacaktır. Bu yeni molekülü serbest radikal haline getirmiştir. Yeni oluşan serbest radikal başka bir molekülden elektron almaya çalışacaktır. Sonuç olarak, canlı dokulara hızla zarar veren serbest radikallerin bir zincirleme reaksiyonu oluşur. Sadece iki serbest radikal birleştiğinde bu zincir reaksiyon sonlanabilir. Zincir reaksiyonunun saniyede 6.023×10^{21} molekülü tetikleyebileceği tahmin edilmektedir [21].

Reaktif nitrojen türleri (RNT) ve reaktif oksijen türleri (ROT) serbest radikallerin önemli kaynaklarıdır. Reaktif oksijen türleri, normal fizyolojik işlemler sırasında (endojen) veya hava kirleticileri ve sigara dumanı gibi (ekzojen) çevresel faktörlerin bir sonucu olarak üretilir (Çizelge 2.1, 2.2 ve 2.3) [22].

Çizelge 2.1. ROT kaynakları [23]

RADİKALLER		NANORADİKALLER	
Süperoksit	$O2^{\bullet -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil	$ROO^{\bullet}$	Hipobromöz asit	HOBr
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Singlet oksijen	O_2
Hidroperoksil	$HOO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	$LOO^{\bullet}$		

Çizelge 2.2. RNT kaynakları [23]

RADİKALLER		NANORADİKALLER	
Nitrik oksit	NO.	Nitrik asit	HNO_3
Nitrojen dioksit	NO_2	Nitrosil katyonu	NO^+
Dinitrojen tetroksit	N_2O_4	Dinitrojen trioksid	N_2O_3
		Peroksi nitrit	ONOO
		Peroksinitrit asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NOA^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	ROONO

Çizelge 2.3. Serbest radikal oluşturan kaynaklar [23]

Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
Mitokondri	Sigara dumanı (aktif ve pasif)
İskemi / reperfüzyon hasarı	Çevre kirleticileri
Peroksizomlar	Radyasyon
İltihap	Bazı ilaçlar
Fagositoz	Tarım ilacı
Egzersiz yapmak	Endüstriyel çözücüler
	Ozon ve azot oksit (otomobil ekzoz dumanı)

Oksidan olarak adlandırılan hidrojen peroksit, ozon, oksijen, hipokloroz asit, nitrik asit, peroksi nitrit, dinitrojen tiroksit ve lipit peroksit ise serbest radikal olarak sayılmazlar. Bu tür oksidanlar canlılar tarafından üretilmekte ve serbest radikallerin reaksiyona girmelerine yol açmaktadır [24].

2.3.1. Serbest radikaller

Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$)

Mitokondriyal elektron transfer sisteminde enerji üretimi sırasında doğal oksijen molekülü çevresindeki herhangi bir molekülden bir elektron alması ile süperoksit radikali oluşur. Bu radikaller oksijen merkezli reaktiflerdir ve biyolojik olarak oldukça toksiktir [25].

Hidroksil Radikali ($\bullet OH$) ve Hidroperoksil Radikali ($HOO\bullet$)

Bir elektronu eksik olan oksijen atomu ile bir H atomunun birleşmesi hidroksil radikalini oluşturur. Hidroperoksil radikali ise hidroksil radikalinin bir su molekülü ile tepkimesi sonucu oluşur. Her iki radikal de oksijen merkezlidir. Hidroksil radikali bilinen en reaktif türdür ve neredeyse bütün hücrelere saldırabilme yeteneğine sahiptir [26].

Peroksil (ROO•) ve Alkoksil Radikalleri (RO•)

Peroksil ve alkoksil radikalleri karbon merkezli radikallerdir. Organizmada glikozun oksidasyonu sırasında, tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlarda oluşabilirler [27].

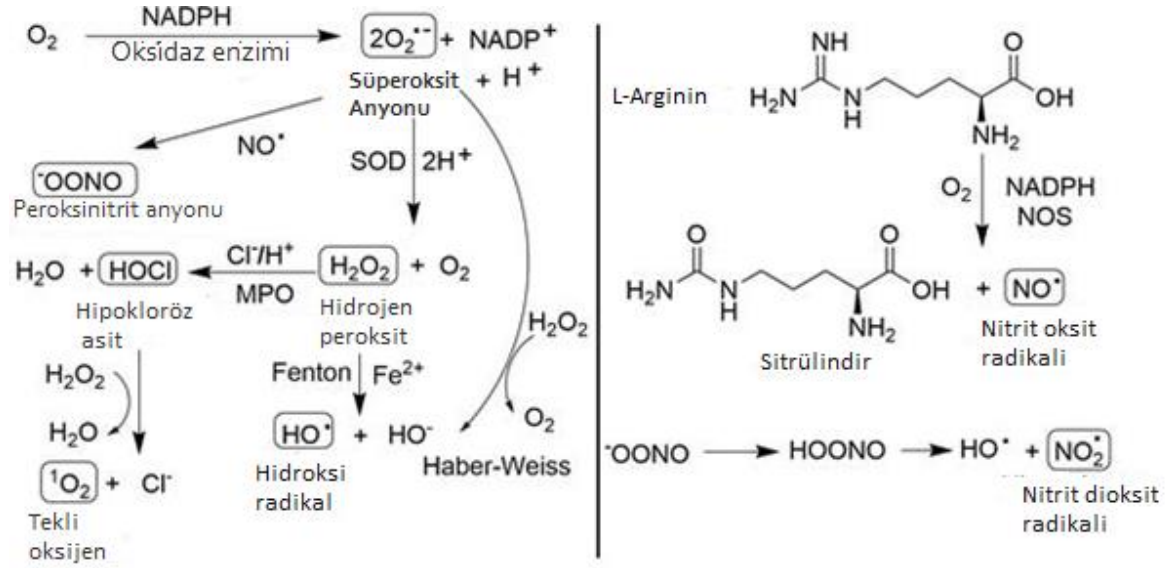
Lipid peroksil ($LOO^{\cdot}$)

Hidroksil radikali gibi son derece reaktif olan radikallerdir, çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak metilen (—CH2—) grubundan bir hidrojen atomu kopmasına ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun başlamasına neden olurlar. Lipid peroksil radikali karbon merkezli serbest radikallerdendir [28].

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden reaktif grupta yer almaz. Buna rağmen biyolojik membranlara nüfuz edebilme yeteneği ile önemli radikaller arasında yer almaktadır. Doğal oksijen molekülünün çevresindeki herhangi bir molekülden iki elektron alması veya süperoksitden 1 elektron alması sonucunda peroksit molekülü (O_2^{2-}) oluşur. Peroksit molekülü $2H^+$ atomu ile birleşmesi ile hidrojen peroksit molekülü oluşur [29-31].

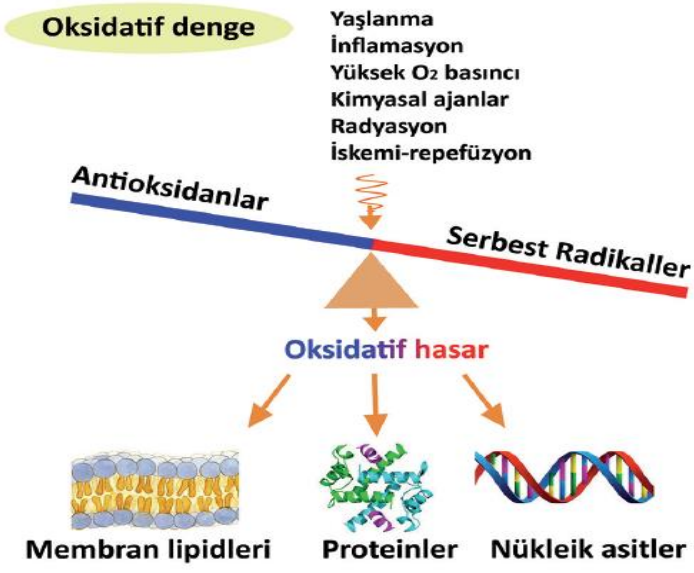
Hidrojen peroksidin çok küçük miktarları bile hücreye zarar verebilir. Çözeltilerde kolayca çözünüp, biyolojik membranlara geçebilir. Hidrojen peroksidin etkileri iki şekilde olabilir. Bunlar okside edici özelliklerinden kaynaklanan direkt aktivite ve daha zararlı maddelerin kaynağı olması sebebiyle indirekt aktivite şeklindedir. H_2O_2'in direkt aktiviteleri arasında proteinden demir iyonu çıkararak yapısını bozmak, enzimleri inaktive etmek, DNA, lipid, -SH grupları ve ketoasitleri okside etmek gibi etkileri bulunmaktadır. İndirekt aktivitesinde hidrojen peroksitin nötrofillerde HOCl' e (Hipokloröz asit) dönüşüp geçiş metallerinin oksidasyon etkisi ile oluşan OH'in, ROT moleküllerin üretilmesine yardımcı olması örnek gösterilebilir (Şekil 2.4) [32,33].



Şekil 2.4. Canlı türlerde ROT ve RNT üretimi [34]

2.3.2. Serbest radikallerin etkileri

Düşük konsantrasyonlarda ROT, hücre içi sinyal ve homeostazı düzenleyerek faydalı etkiler gösterir ancak; yüksek seviyelerde ROT karbonhidratlar, nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi hücre yapılarına zarar verebilir ve işlevlerini değiştirebilir [35]. ROT ile antioksidanlar arasında bir denge vardır. Bu dengenin bozulması durumunda oksitatif stres ortaya çıkar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Oksitatif stres ve etkileri [36]

Serbest radikallerin lipitlere etkisi

Lipidler, hücrelerin yapısını koruyan ve işlevini kontrol eden hücre zarlarının temel bileşenleridir. Serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı en duyarlı biyolojik moleküller lipidlerdir. Lipidler her zaman reaktif oksijen türlerinin ilk hedefleri olmuştur. Hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerler. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Serbest radikallerin oluşturduğu bu hasar hücrenin fonksiyonu için çok zararlıdır. Bunun sebebi; yan ürünlerin, ikinci haberciler gibi davranması ve oluştuğu yerden daha uzak bir yerde etkisini göstermesidir [37-39].

Fosfolipid, glukolipid, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan birçok doymamış yağ asitleri lipid peroksidasyonu sonucunda serbest radikallerin etkisiyle alkol, aldehit, hidroksi asit, etan, pentan, alkol, keton, aldehit ve eter ya da ester gibi zararlı ürünleri oluşturmaktadır [40]. Lipid peroksidasyonu, ateroskleroz, kanser, diyabetin yanı sıra Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklara neden olabilmektedir [41-43].

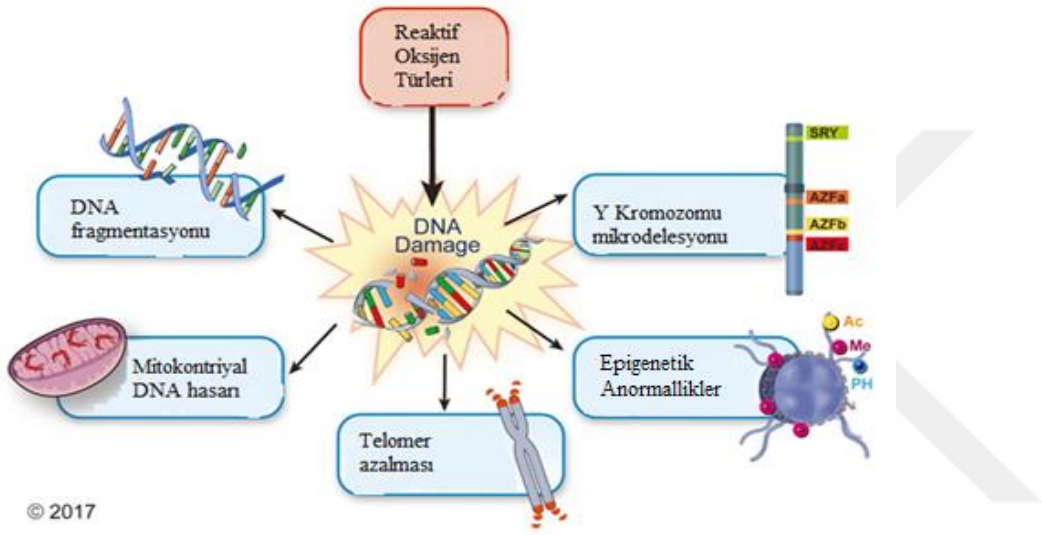
Serbest radikallerin proteinlere etkisi

Proteinler, lipidlere ve çoklu doymamış yağ asitlerine göre daha dayanıklı biyomoleküllerdir. Serbest radikalin proteinlere etkisi, proteinin yapısında bulunan amino asitlerin kompozisyonlarına bağlıdır. Fenil alanin, histidin, tirozin, metionin, triptofan ve sistein amino asitleri, doymamış bağ ve sülfür içerikleri sebebiyle radikaller ile daha hızlı ve kolay bir şekilde reaksiyona girerler. Serbest radikallerin etkileri sonucunda, proteinlerin yapılarında disülfit bağı artar. Böylece tersiyer yapıları bozulur ve işlevlerini büyük ölçüde yitirirler. Protein oksidatif hasarı birçok hastalığın patogenezinde doğrudan rol oynar [23].

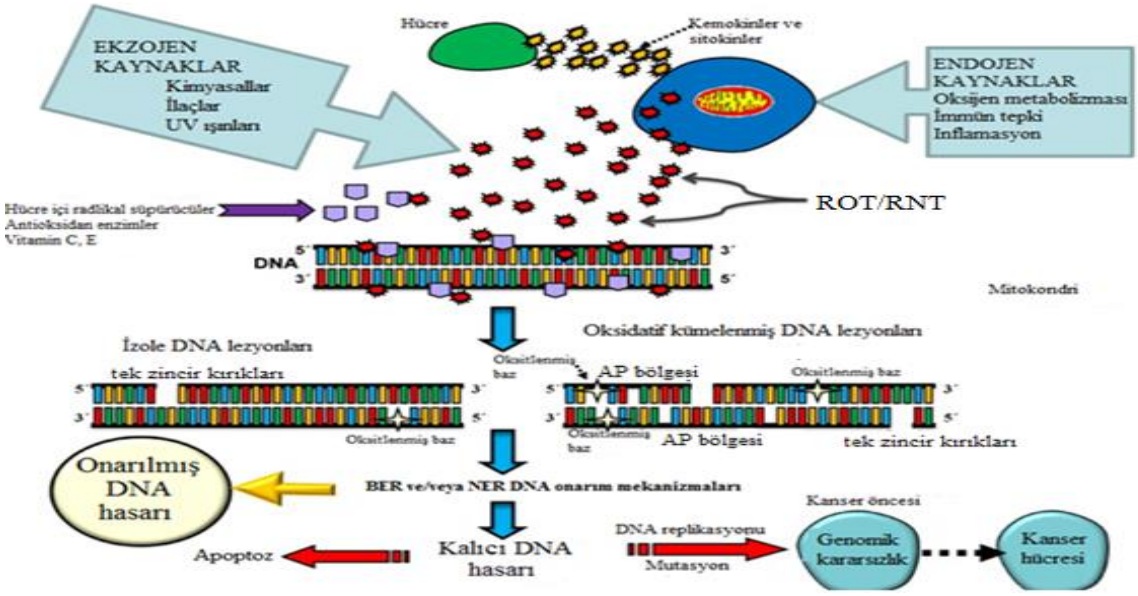
Serbest radikallerin DNA’ya etkisi:

Serbest radikaller DNA’yı kolaylıkla etkileyip zarara uğratabilmektedirler. Bu radikallerden özellikle hidroksil radikali nükleik asit bazlarının modifikasyonuna ve DNA zincir kırılmalarına neden olmaktadır. •OH'ın pürinlerle etkileşimi sonucunda, 8-hidroksi

deoksiguanozin (8-OHdG), 8-hidroksi deoksiadenozin, formamido pirimidinleri ve diğer daha az karakterize edilen pürin oksidatif ürünleri oluşur. 8-OHdG, karsinogenezde rol oynamaktadır ve oksidatif DNA hasarı için güvenilir bir belirteç olarak düşünülmektedir [44]. DNA üzerinde fazlaca zararı olan bir diğer serbest radikal ise hidrojen peroksit radikalidir. Bu radikal hücre duvarından kolaylıkla geçer ve çekirdeğe ulaşır. Bu durum DNA hasarı yaratabileceği gibi, hücrenin ölümüne ve karsinogeneze neden olabilecek boyutta tehlike oluşturabilmektedir (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7) [23,45].



Şekil 2.6. ROT'un DNA'da oluşturduğu hasar çeşitleri [45]



Şekil 2.7. Oksitatif stresin oluşturduğu DNA lezyonları ve karsinogenez ilişkisi [46]

Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

OH gibi serbest radikaller, karbon atomlarından hidrojeni alıp karbon merkezli bir radikal üretip, önemli molekülere zarar verebilmektedir. Bu, hiyalüronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar [44].

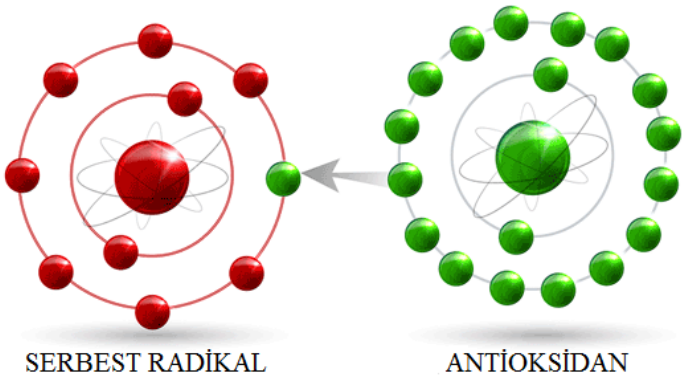
2.4. Kanser Kemopreventif Ajanları

Kanser için tedavi yöntemleri genel olarak kanser hücrelerini öldürebilen ilaçlar, cerrahi operasyon, radyasyon terapisi, immünoterapi, hedefli tedavi ve kemoterapiyi içerir. Bu yöntemlerin yanı sıra kemopreventif ajanlar, kanserin ortaya çıkmasına neden olan neoplastik süreçlerin gelişimini veya ilerlemesini engelleyebilen veya bunları bastırabilen doğal diyet ajanlarının veya toksik olmayan kimyasalların kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca karsinogenez oluşumundaki çok sayıda moleküler yola müdahale edebilme yeteneğine sahiptirler. En iyi kemopreventif aktivite gösteren maddeler antioksidan maddelerdir [47].

2.5. Antioksidanlar

İnsan vücudunda endojen veya ekzojen faktörlerden kaynaklanan birçok reaktif oksijen türü oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri hücre içi sinyallerde görevler üstlenseler de vücut içindeki miktarlarının bir dengede kalması gerekmektedir. ROT oluşumunu ve hasarlarını engelleyebilen bileşiklere "antioksidan" adı verilir. Antioksidan kavramı ile ilgili birçok tanım yapılmıştır. Halliwell ve Gutteridge (1995) antioksidanları ilk önce “yükseltgenebilen substratlara göre düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında bu substratın yükseltgenmesinin önemli oranda geciktiren veya engelleyebilen herhangi bir madde” olarak tanımlamışlardır. Daha sonra Halliwell 2007 yılında antioksidanları “bir hedef molekülüne oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya uzaklaştıran herhangi bir madde” olarak belirtmiştir. Aynı yıl Khlebnikov ve diğerleri “ROT türlerini direkt olarak süpüren veya dolaylı olarak antioksidan savunmasını düzenleyecek ya da ROT üretimini inhibe edecek şekilde hareket eden madde” olarak antioksidan kavramını açıklamışlardır [48-50].

Antioksidanlar, yeterince kararlı moleküllerdir ve vücuttaki fizyolojik faaliyetler ile veya dışardaki besinler yolu ile vücuda geçip, serbest radikale elektron vererek nötralize eder ve serbest radikallerin hücrelere vereceği zararı önlerler (Şekil 2.8) [23].



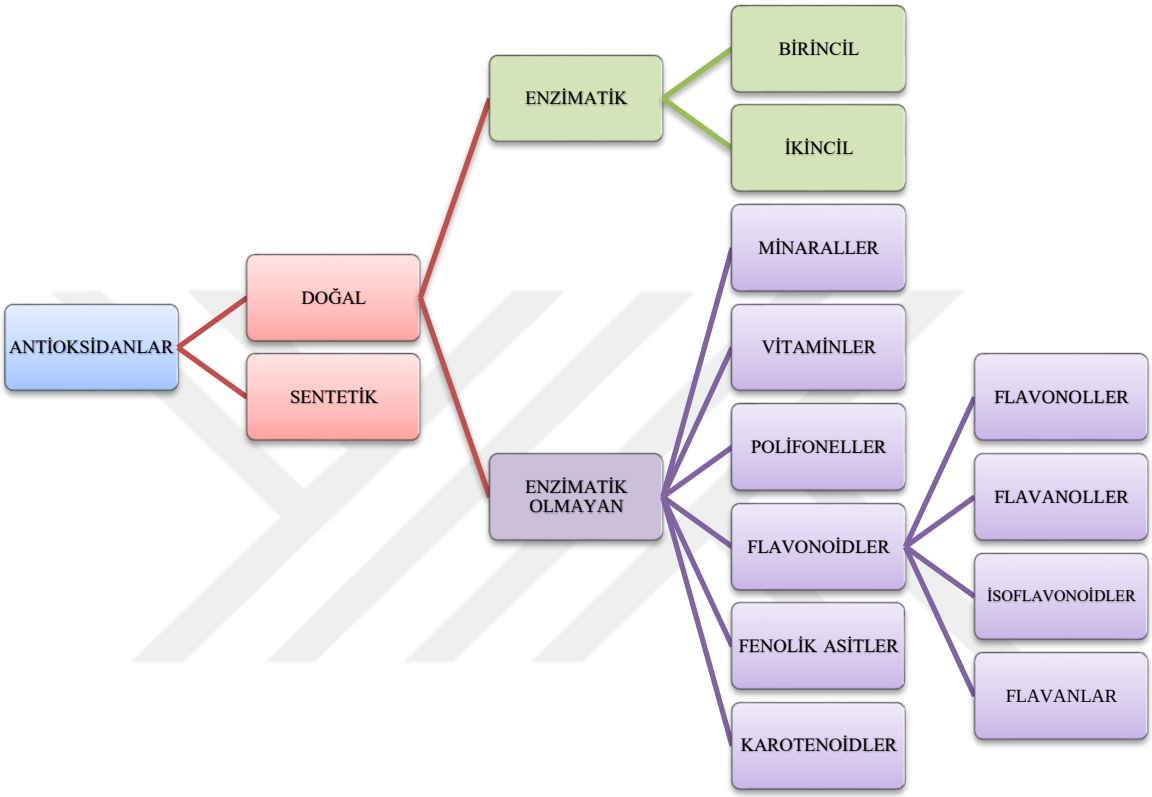
Şekil 2.8. Antioksidanların serbest radikalleri nötralize etmesi [51]

2.5.1. Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidanlar toplayıcı etki, bastırıcı etki, zincir kırıcı etki, onarıcı etki, enzimatik etki olmak üzere beş ayrı şekilde etki göstermektedirler. Antioksidanların serbest oksijen radikallerini tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Reaksiyon hızını azaltarak, serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif hale çevirmesi bastırıcı etki olarak adlandırılır. Bu etki şekline vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve antosiyaninler örnek gösterilebilir. Antioksidanların serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurmasının ardından serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırma ve fonksiyonlarını engelleme etkisine ise zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösteren maddelerdir. Ayrıca lipit, protein ve DNA gibi biyolojik yapılarda oluşan moleküler hasarı yenileme etkisi onarıcı etki olarak ifade edilir. Organizmadaki süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimler yardımı ile non-enzimatik antioksidanların sentezlerini arttırarak gösterdikleri etkiye de enzimatik etki adı verilir [52,53].

2.5.2. Antioksidanların sınıflandırması

Antioksidan savunma sistemleri, genel olarak doğal ve sentetik olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadır. Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 2.9'de gösterilmektedir.



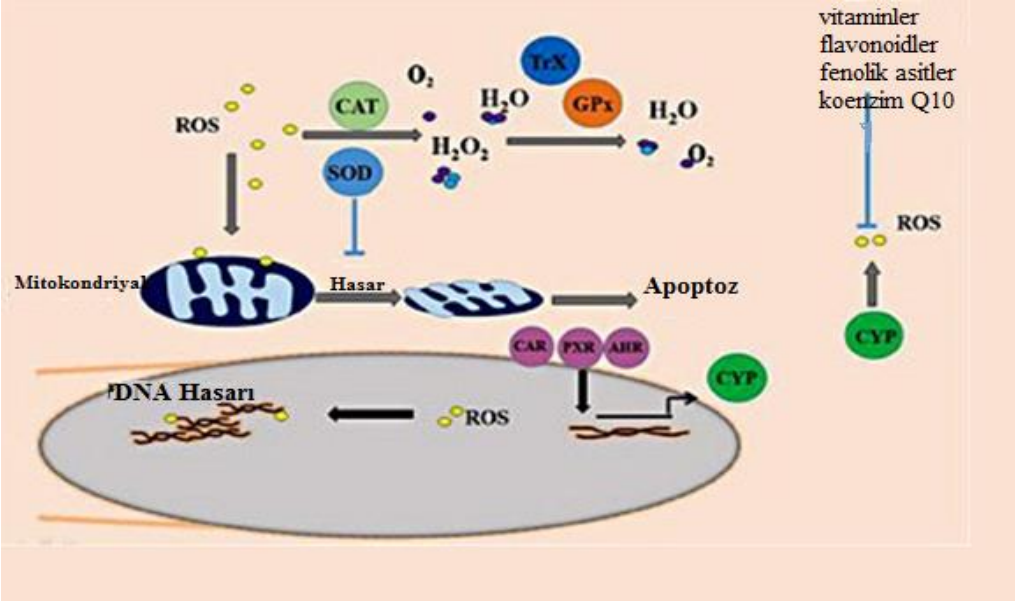
Şekil 2.9. Antioksidanların sınıflandırılması [54]

Sentetik antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar gıda üretiminde ve piyasadaki bazı ürünlerde gıdaların raf ömrünün uzatılması amacı ile kullanılmaktadır. Bunlara bütillenmiş hidroksitoluen, bütillenmiş hidroksianisol ve tersiyer-bütilhidrokinon örnek gösterilebilir [55].

Doğal antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) fazla üretimi mitokondri ve DNA'ya zarar verebilir. Bu zararı azalmak veya önlemek için antioksidan sistemi devreye girmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Doğal antioksidanların etkileri [56]

ROT üretimi, aril hidrokarbon reseptörü (AhR), pregnan X reseptörü (PXR) ve yapısal androstan reseptörünün (CAR) aracılığı ile sitokrom P450 enzimlerinin (CYP) aktivitesine bağlanmaktadır. Antioksidan sistemlerinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve tioredoksin (Trx) gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra enzimatik olmayan vitaminler, flavonoidler, fenolik asitler ve kozenzim Q10 antioksidanlar da bulunur. Enzimatik antioksidanlar, hücreleri korumak için doğrudan veya dolaylı olarak ROT'u katalize edebilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, enzimatik antioksidanın desteklenmesi veya doğrudan oksidatif zincir reaksiyonuna etki etmesi ile oksidatif etkiyi nötralize edebilmektedirler [55].

Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve tioredoksin (Trx) sisteminden oluşur. Bu enzimler birincil enzimatik antioksidanlardır. Glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz6-fosfat dehidrojenaz ise ikincil enzimatik antioksidanlar grubunda yer almaktadır. Görevleri serbest radikal giderici olarak savunma sistemlerinde yer almak ve serbest radikal oluşumunu büyük ölçüde engelleyerek, radikallerin nötralize edilmelerini sağlamaktır. Enzimatik antioksidanlar, endojen olarak

bulunurlar ve ROT'ni parçalama yeteneğinden dolayı tüm oksitatif ataklara karşı etkin bir koruyucu etkiye sahiptirler [55].

SOD ve CAT *in vivo* olarak en iyi ROT süpürücü antioksidanlardandır. İnsanlarda bulunan SOD'lar sitozolik CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı SOD olarak sınıflandırılabilir. SOD bir metal protein olarak serbest radikalle etkileşime girerek süperoksit, hidrojen peroksit ve oksijeni nötralize eder ($H_2O_2 + O_2$ ==(SOD)==> $2O_2^-$+ 2H). SOD, oksijenden türetilmiş serbest radikallere karşı ilk savunma mekanizması gibi görünmektedir ve oksidatif stresin oluştuğu durumlarda hızla indüklenebilir [57].

CAT, dört üniteden oluşan ve her bir ünitesinde Fe^{3+} bulunan bir enzimdir. Genelde böbrek ve karaciğerde aktiftir. Bu enzimatik antioksidan OH öncüsü olan hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya ayrıştırarak ($2H_2O_2$ ==CAT==> $2H_2O + O_2$) nötralize edebilir [58].

Glutatyon peroksidaz (GPx) selenyum içerir ve organik hidrojen peroksitleri suya ya da eş alkollere indirgeyen bir katalizördür. Trx antioksidanları, DNA ve protein onarımında yer almaktadır [55].

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanların büyük çoğunluğu vücutta sentezlenmez bu yüzden dışarıdan beslenme yoluyla vücuda alınması zorunlu olan maddelerdir. Bu maddeler sentezlenemedikleri gibi aynı zamanda depolanamazlar. Özellikle suda çözünenlerinin fazlası idrar yoluyla dışarı atılır. Sebze, meyve ve et gibi gıda kaynaklarında; süt ve süt ürünleri ile bitki çaylarında bol miktarda doğal olarak bulunurlar. Enzimatik olmayan antioksidan sınıfında yer alan vitaminler, karotenoidler ve polifenoller en önemli antioksidanlardır [34,54].

Vitaminler

C (askorbik asit) vitamini ve E (tokoferol) vitamini, vitamin antioksidanlar içerisinde koruması en yüksek gruptur. C vitamini suda, E vitamini ise yağda çözünen vitaminlerdir. C vitamini reaktif oksijen ve azot türlerini, bulundukları bölgelerden süpürerek diğer

substratları oksidatif hasara karşı korur. E vitaminlerinin en önemli özelliği 6 numaralı karbon atomlarındaki –OH grubunun varlığından kaynaklanan antioksidan etkisi ile zincir kırıcı özelliğidir. E vitamininin hücre zarındaki lipid peroksidazını kısmen inhibe ettiği de düşünülmektedir. C vitamini turunçgiller, biber, domates gibi birçok sebze ve meyvede bulunurken; E vitamini fındık, fıstık, ceviz gibi yağlı kuruyemişler, tam tahıllar, kuru baklagiller ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunur [54].

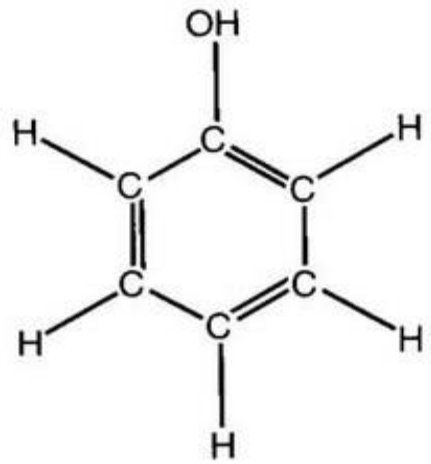
Karotenoidler

Karotenoidler, 40 karbon atomlu çoklu doymamış hidrokarbonlar (karotenler) ve onların oksijenli türevlerinden (ksantofiller) oluşmaktadır. Karotenoidlerin yapılarında konjuge çift bağlar bulunur bu bağ özelliği ile sarı-kırmızı renginde olan birçok sebze ve meyvenin, bitkisel dokularında pigment olarak görev alırlar. Bu bağlar sayesinde yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Tek oksijen serbest radikalini süpürücü etkileri vardır. Birçok meyvede, yumurta sarısı, süt ve süt ürünlerinde, havuç, mısır, domates gibi sebzelerde bol miktarda bulunurlar [57].

2.6. Fenolik bileşikler (Polifenoller)

Bütün bitkilerin metabolizmalarında meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde sekonder metabolit olarak yer alan; yırtıcılara karşı kimyasal savunmada, bitki-bitki etkileşimlerinde ve kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu düşünülen çok sayıda, farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Fenolik bileşikler fitokimyasalların en geniş sınıfı ve bitkilerde en yaygın bulunan sekonder metabolit grubudur [59,60].

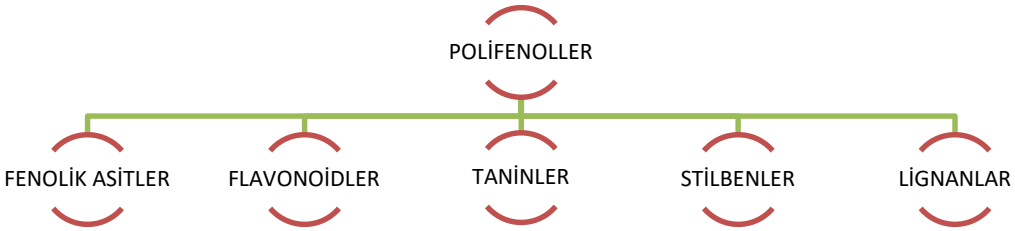
Fenolik maddeler fenol halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin bundan türediği bilinmektedir (Şekil 2.11). Francesca Cutillo ve arkadaşları 500-4.000 Da arası moleküler kütlesine sahip olan ve 12 ila 16 fenolik hidroksil grubu ve 5 ila 7 aromatik halkaya sahip olması ve suda çözünebilmesi gibi özelliklerinden bahsederek fenolik bileşikler (polifenol) teriminin ilk kapsamlı tanımını yapmışlardır [61].



Şekil 2.11. Fenol halkası [62]

Polifenollerin antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral, antitrombotik ve vazodilatör etkileri olduğu ve kanser, kalp problemleri, katarakt, göz bozuklukları, nörodejeneratif hastalıkları, dejeneratif hastalıkları önlemek için antioksidanlar olarak işlev gördüğü bildirilmiştir [63-66]. Polifoneller antioksidan etkilerini bir hidrojen atomunun hidroksil grubundan aktarılmasıyla veya demir ve bakır gibi metal iyonlarını şelatlama şeklinde gösteririler. Ayrıca ortaya çıkan bulgular, bakteriyel replikasyon enzimlerinin inhibisyonu, tümör hücrelerinde apoptozun uyarılması, monositlerin / makrofajların sitokin üretmek için uyarılması ve miyelo peroksidazın uyarılması gibi çeşitli potansiyel etki mekanizmalarını da göstermektedir [60,67].

Polifenoller içerdikleri halka sayısı ve yapısal unsurlara göre farklı isimler alarak alt gruplara ayrılırlar [68]. Polifenoller; flavonoidler, fenolik asitler, taninler, stilbenler (resveratrol) ve lignanlar olmak üzere 5 ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.12) [68,69].



Şekil 2.12. Polifenollerin sınıflandırılması

Fenolik asitler

Fenolik asitler bitkilerin; tohumlarında, yapraklarında, köklerinde ve dallarında besin alımı, enzim aktivitesi, protein sentezi, fotosentez ve hücre iskeleti yapısı gibi çeşitli fizyolojik aktivitelerde yer alan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler genellikle günlük besin alımının önemli bir bölümünü oluşturan bitki kaynaklı gıdalarda bulunabilen ikincil metabolitlerdir. Fenolik asitler antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antikarsinojenik, antienflamatuar ve vazodilatör etkilere sahiptirler [70].

Taninler

Taninler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve gıda endüstrisi tarafından sıkça kullanılan polifenolik bileşiklerdir. Taninler sebzelerde, meyvelerde ve bitki bazlı içeceklerde (çay, kahve, şarap) bulunurlar. Gıda endüstrisi yanı sıra deri üretimi ve madencilik endüstrisinde de kullanılmaktadırlar [71].

Stilbenler

Stilbenler, asma, çilek ve yer fıstığı gibi çeşitli yenilebilir bitkilerde bulunan bir fenolik bileşik sınıfıdır. Stilben yapısı, bir etilen köprüsü ile bağlanan iki aromatik halka tarafından oluşan C6 – C2 – C6 omurgası ile tanımlanmaktadır. Bu ikincil metabolitler bitkilerde patojenlerin etkisine veya UV radyasyonuna maruz kaldıklarında üretildiği ve bu sebeple bitkilerin savunma mekanizmalarında yer aldığı bildirilmiştir. Stilbenler antifungal, antioksidan, antienflamatuar ve antiproliferatif etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedirler [72].

Lignanlar

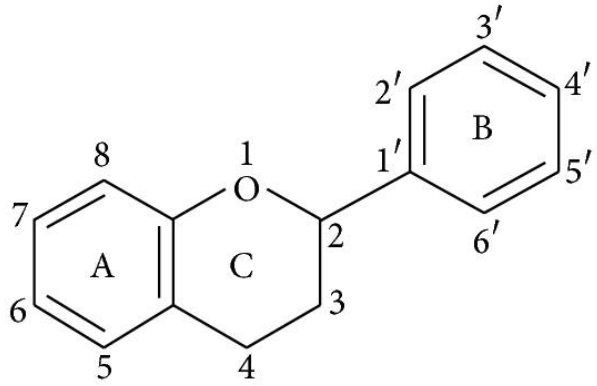
Lignanlar iki veya daha fazla fenilpropanoidin oksidatif dimerizasyonundan türetilen bir sekonder metabolit sınıfı olarak tanımlanır. Ağaçları çürümeye karşı korumak için öz odun bölgesinde bulunurlar. Lignanlar anti-tümör etki, antimitotik etki, anti-viral etki, kardiyovasküler etkiler, antienflamatuar etki, antioksidan etki, karaciğer koruyucu etkiler gibi birçok biyolojik aktivite göstermektedirler [73].

2.6.1. Flavonoidler

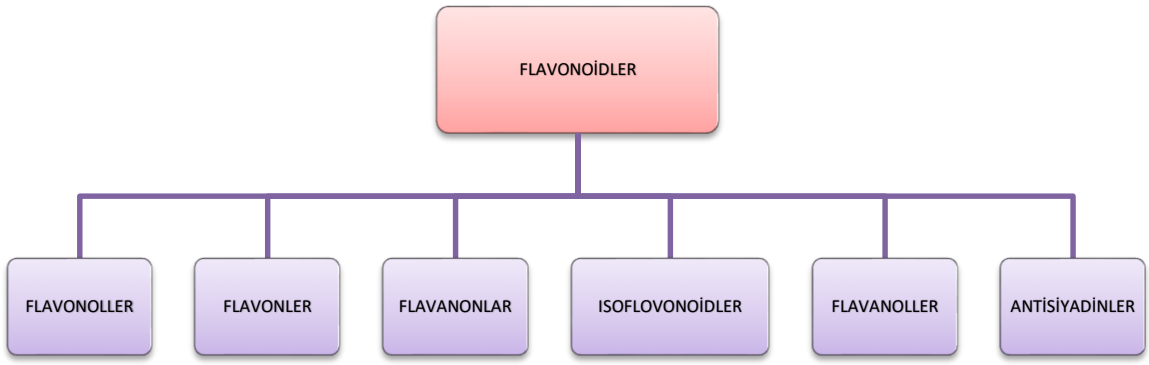
Flavonoidler, birçok meyve, sebze, baklagiller ve özellikle fotosentez yapan bitki hücrelerinde doğal olarak bulunan ve toplam polifenol alımının yaklaşık üçte ikisini oluşturan biyoaktif bileşiklerdir [74-76]. Flavonoid olarak tanımlanan bitkilerdeki pigmentlerin varlığının bilinmesi eski zamanlara dayanmaktadır, ancak kimyasal yapıları 19. yüzyılın sonuna kadar tanımlanmamıştır. 20. yüzyılın ilk yıllarında flavonoidler kimyasal olarak birden fazla bitkide karakterize edilmiş ve laboratuvarda sentezlenmiştir. 1930'lu yıllarda flavonoidlerin vitaminlere eş değer olduğu düşünülerek "Permeabilitäts-Vitamin" veya "P vitamini" terimi kullanılmış fakat 1950 yılında bu iddia tam olarak kanıtlanamadığından bu terimin kullanımı ortadan kalkmıştır. 1952 yılında "Flavonoid" terimi ilk kez Geismann ve Hinreiner tarafından yapısı 2-fenilkroman heterosiklik sistemle ilişkili olan bileşiklerin sınıflandırılması için kullanılmıştır. Bilimsel yayınların sayısı 1980'lerden günümüze kadar sürekli artmış ve ilerleme göstermiştir [60,77].

Önemli epidemiyolojik çalışmalar flavonoidler açısından zengin diyetlerin kardiyovasküler hastalıklar, tip II diyabet, kanserler ve oksidatif stres ile ilişkili çeşitli hastalıklara karşı potansiyel fayda sağlandığını göstermiştir [75,78,79]. Ayrıca bazı çalışmalar da flavonoidlerin kan basıncını yükselten anjiyotensin hormonunun dönüştürücüsü olan enzimi bloke ettiği, prostaglandinleri oluşturan siklooksijenazı inhibe ettiği ve östrojen üreten enzimleri bloke ettiği bildirilmiştir. Bu etki mekanizmaları ile flavonoidlerin trombosit agregasyonunu önleyebileceğini, kalp hastalığını ve trombozu azaltabileceğini ayrıca östrojeni çeşitli dokulardaki reseptörlere bağlanan östrojen sentezini inhibe ederek kanser riskini azaltabileceği gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır [80-82]. Epidemiyolojik çalışmalar, bazı flavonoidlerin alımı ile iskemik kalp hastalığı ve inme riskinde azalma olduğunu göstermiştir [83,84]. Bunlarla birlikte yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi de flavonoidlerin sağlığa yararları arasında yer almaktadır. Flavonoidler ayrıca kemopreventif / kemoterapötik ajanlar olarak da kullanılmaktadır [56]. Yapılan çalışmalar flavonoidlerin alımının veya flavonoidler açısından zengin gıdalarla beslenmenin hastalık insidansı ile mortalitesi arasında ters bir ilişki oluşturduğunu göstermiştir [74]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), bitkilerin etkin ve modern ilaçların bulunmadığı durumlarda değerlendirilmesini de önermektedir [85].

Flavonoidlerin kimyasal yapısı, şekilde A ve B ile gösterilen iki fenil halkası ve C ile gösterilen bir heterosiklik halkasının 4H-piran bağı ile bağlanması sonucunda 15 karbonlu bir iskeletten oluşmaktadır (Şekil 2.13). Temel yapının değişmeden, farklı oksidasyon seviyeleri ve C halkası olan heterosiklin halkasında meydana gelen değişiklikler ile flavonoid alt grupları oluşmaktadır [56,76,86]. Flavonoid alt gruplar arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır [68]. Flavonoidler karbon halkasının yapısının oksidasyon seviyesine bağlı olarak 14 sınıfa ayrılmaktadır. Fakat temel flavonoidler içerdikleri karbon halkasındaki değişimlere göre altı ana gruba, bu gruplar da kendi içlerinde farklı gruplara ayrılmaktadırlar (Şekil 2.164) [56,84].



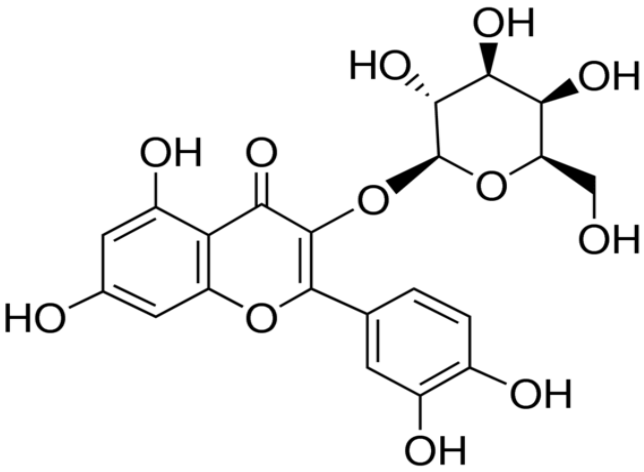
Şekil 2.13. Flavonoidlerin kimyasal yapısı [76]



Şekil 2.14. Flavonoidlerin sınıflandırılması

2.6.2. Hyperoside

Quercetin 3-galactoside olarak da adlandırılan hyperoside, esas olarak Hypericum (Sarı kantaron) ve Crataegus (Alıç) cinsi bitkilerde ayrıca çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan fitokimyasal bir bileşiktir [87,88]. Hyperoside fenolik bileşikler içerisinde yer alan flavonoidlerin bir alt sınıfı olan flavonoller grubunda yer alır [89]. Hyperosidenin kimyasal yapısı Şekil 2.15'de gösterilmiştir. Hyperoside tıbbi terapötik olarak kullanılan önemli aktif bir bileşiktir [90]. Bu fitokimyasalın çeşitli aktiviteleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.15. Hyperosidenin (Quercetin 3-galactoside) kimyasal yapısı [91]

Çizelge 2.4. Hyperosidenin aktivite çeşitleri

Aktivite çeşitleri	Kaynaklar
Anti-enflamatuvar aktivite	[92-96]
Anti-nosiseptif aktivite	[85,93]
Anti-depresan aktivite	[97-100]
Nöro-koruyucu etkiler	[89,101-104]
Beyindeki koruyucu aktivite	[89,105-110]
Kardiyo-koruyucu aktivite	[111-116]
Antidiyabetik aktivite	[95,117-121]
Anti-kanser aktivitesi	[122-125]
Anti-viral aktivite	[63,126-128]
Hepato koruyucu aktivite	[129,130]
Antioksidan aktivite	[87,123,131-135]
Antifungal aktivite	[115]

Çizelge 2.4 de gösterildiği gibi hyperoside ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen insan lenfosit kültüründe gerçekleştirilen herhangi bir genotoksisite veya antigenotoksisite çalışmasına ulaşılmamıştır. Yalnızca hyperosidenin iki farklı hücre hattında comet testi kullanılarak antigenotoksisitesinin incelendiği çalışmalara rastlanılmıştır.

Mei ve arkadaşları (2008) akciğer fibroblast hücrelerinde hidrojen peroksitin neden olduğu DNA hasarına karşı hyperosidenin koruyucu etkisini comet testi ile incelemişlerdir. Kültüre edilmiş akciğer fibroblast hücreleri önce 30 dakika boyunca 5 μM hyperoside ile inkübasyonun ardından 1 mM H_2O_2 ile 15 dakika muamele etmişlerdir. Çalışma sonucunda hyperoside ile muamele edilmiş grupta edilmemiş gruba göre comet kuyruk uzunluğunun daha kısa olduğu ve böylece DNA kırıklarına karşı hyperosidenin akciğer fibroblast hücre hattında koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir [93]. 2008 yılında Li ve arkadaşları ECV-304 (insan endotel hücreleri) hücre hattı kullanılarak Tert-Butil Hidroperoksitin (TBHP) neden olduğu hasara karşı hyperosidenin koruyucu etkisini comet testi ile incelemişlerdir. ECV-304 hücreleri 2 saat 128 μmol /L hyperoside ile ardından da 1 saat boyunca 0.3 mmol /L TBHP ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda hyperosidenin hücrede tek iplik kırıkları ve oksitlenmiş bazların oluşumunu azaltarak TBHP kaynaklı DNA hasarına karşı koruma sağladığı sonucuna ulaşmışlardır [136].

Hyperoside içeren bitki özütleri ile insan lenfositleri veya farklı hücre hatlarında yapılan genotoksisite çalışmaları bulunmaktadır. 2018 yılında araştırmacılar *Rosaceae* familyasına ait olan (*A. eupatoria, A. procera, F. palmata, F. ulmaria ve F. vulgaris)* beş farklı türün özütlerinin genotoksik etkilerini insan lenfositlerinde comet testi ve mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Filipendula cinsi tüm türlerinde hyperoside ana flavonoidlerin içerisinde yer almaktadır. Comet testinde üç sağlıklı donörden elde edilen periferik kan beş farklı bitki özüt konsantrasyonu (50, 100, 150, 200 ve 300 μg/mL) ile muamele edilmiştir. İncelenen bitki özütlerinin tüm comet parametrelerinde genotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Mikronukleus testinde ise iki sağlıklı donörden elde edilen periferik kan lenfositleri bitki özütleri ile muamele edilmiştir. Bitki özüt konsantrasyonlarını *Agrimonia procera* (12.5, 25, 37.5 ve 50 μg/mL) dışındaki tüm türlerde 50, 100, 150, 200 μg/mL olarak belirlenmiştir. Mikronukleus testi sonucunda tüm türlerin nükleer bölünme indeksinde önemli bir düşüşe neden olduğunu ancak genotoksik olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar iki test arasındaki bu farkın, mikronukleus testinde bölünme geçirebilen

hücrelerin kullanılması böylece DNA tamir mekanizmasının devreye girerek anormallikleri onarabildiği şeklinde açıklamışlardır [137] .

Quadros ve arkadaşları (2017) *Crataegus oxyacantha* (alıç) ekstratının genotoksik etkilerini insan lökosit hücreleri ve HepG2 (karaciğer hepatosellüler karsinom) hücre hattında comet ve mikronukleus testleri kullanılanarak incelemişlerdir. Beş farklı konsantrasyon (2.5, 5, 10, 50, ve 100 µg/mL) seçilmiş ve iki test sisteminde de aynı konsantrasyonlar kullanılmıştır. *Crataegus oxyacantha* ekstratının toplam flavonoid içeriğinde dört ana bileşiğin hyperoside, vitexin, isovitexin ve vitexin-2-O-rhamnoside olduğu açıklanmıştır. Her iki test sisteminde de hem lökosit hücrelerinde hem de HepG2 hücre hattında yüksek konsantrasyonların genotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [138]. 2018 yılında araştırmacılar *Crataegus oxyacantha* ekstratının genotoksik etkilerini *in vivo* olarak farelerde incelemişlerdir. Yedi gün boyunca 12 haftalık erkek Swiss albino farelere günlük 50, 100 ve 200 mg / kg konsantrasyonlarda gavaj yoluyla ekstrakt uygulamışlardır. Ötenazi öncesi kuyruk damarından alınan kan örnekleri ve ötenazi sonrası alınan kemik iliği hücrelerinde comet ve mikronukleus testi gerçekleştirilmiştir. Comet testi sonucunda *Crataegus oxyacantha* ekstratının her iki hücre hattında da anlamlı bir genotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Mikronukleus testi sonucunda ise lenfositlerde anlamlı bir genotoksik etki görülmediğini ancak fare kemik iliği hücrelerinde zayıf klastojenik/anojenik etki tespit edildiğini açıklamışlardır [139].

Ana bileşenleri arasında hyperoside bulunan bitki özütleri ile yapılan antigenotoksisite çalışmaları da bulunmaktadır. Hosseinimehr ve arkadaşları (2009) alıç ekstratının insan periferik kan lenfositlerinde gama ışınlamasıyla indüklenen genotoksisiteye karşı koruyucu etkisini mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Çalışmada alıç ekstratı (500 mg) donörlere oral olarak verildikten 1, 2 ve 3 saat sonra toplanan kan örnekleri ile hazırlanan hücre kültürlerine gama ışını kaynağı kolbat-60'ı, 1.5 Gy'lik bir dozda uygulamışlardır. Alıç özütü kolbat-60'ı verildikten sonra 1 saat içinde gama radyasyonuna karşı maksimum koruma sağladığını ve mikronukleus sıklığında önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Alıç özütünün içerdiği fitokimyasalların belirlenmesi amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi gerçekleştirilmiş ve hyperoside, epikateşin ve klorojenik asit olmak üzere üç ana flavonoidin varlığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar radyasyondan kaynaklanan genetik hasarlardan ve yan etkilerinden korunulması için alıç bitkisinin önemli bir besin kaynağı olduğunu bildirmişlerdir [140].

Diğer bir çalışmada araştırmacılar alıç ekstratının insan periferik kan lenfositlerinde bu kez metil metan sülfonatın neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu etkisini mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Donörlere alıç özüt tozunun oral yoldan 1g olarak verilmesinden 1, 2 ve 3 saat sonra kan örnekleri toplanmış ve hücre kültürlerinin 24. saatinde metil metan sülfonat uygulanmıştır. Alıç ekstratının kullanımından 1 saat sonra maksimum koruma sağladığı açıklanmıştır. İnsan lenfositlerinin tehlikeli kimyasallardan kaynaklanan genetik hasarının önlenmesinde alıç bitkisinin önemli bir besin kaynağı olduğu bildirilmiştir [141].

Hosseinimehr ve arkadaşları (2006) fare kemik iliği hücrelerinde gama ışınları ile oluşturulan radyoprotektif etkilerine karşı alıç ekstratının koruma potansiyelini mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Alıç ekstratının gamma ışınlamasından 1 saat önce belirlenen dozlarda (25, 50, 100 ve 200 mg / kg) intraperitonal olarak farelere uygulamışlardır. Alıç özütünün farelerin kemik iliğinde yalnızca gamma radyasyonu verilen grup ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde mikronukleus frekansını azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak alıç özütlerinin (Crataegus) yüksek antioksidan fenolik bileşikler içerdiği ve bu bileşiklerin kemik iliği hücrelerinde gama ışınlaması ile indüklenen stres koşullarını ve genotoksisiteyi azaltabildiği bildirilmiştir [142]. Araştırmacılar bir diğer çalışmalarında fare kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin neden olduğu genotoksisiteye karşı alıç ekstratının koruyucu etkisini mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Farelere ardışık yedi gün boyunca beş farklı dozda (25, 50, 100, 200 ve 400 mg / kg vücut ağırlığı) hazırlanan alıç ekstratı oral olarak verilmiştir. Farelere yedinci günde siklofosfamid (50 mg / kg vücut ağırlığı) intraperitonal olarak enjekte edilmiş ve 24 saat sonra ötenazi uygulanmıştır. Alıç ekstratının, mikronukleus frekansını pozitif kontrol grubuna göre önemli derecede azalttığı gözlenmiştir. Alıç ekstratının, özellikle de antioksidan aktiviteye sahip olan flavonoid bileşenlerinin, fare kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin indüklediği stres koşullarını ve genotoksisiteyi azalttığını bildirmişlerdir [143].

2014 yılında Mustapha ve arkadaşları *Crataegus azarolus'*un (Akdeniz muşmulası olarak bilinen bir alıç türü) sulu özütünün, K562 (insan lenfoblast hücresi) hücre hattında hem genotoksik hem de H_2O_2'e karşı antigenotoksik etkilerini comet testi ile incelenmişlerdir. HPCL analizinde hyperoside (quercetin-3-O-galactoside) ve vitexin-2″-O-rhamnoside varlığının yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Hücreler altı farklı muamele süresinde (2, 4, 6, 12, 24 ve 48 saat) *C. azarolus'*un farklı konsantrasyonlardaki (200, 400

ve 800 µg / mL) sulu ekstraktı ile muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra, hücreler 75 dakika boyunca 75 µM H_2O_2 ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda genotoksisitenin incelendiği grup ile negatif kontrol arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Bunun yanı sıra *C. azarolus'un* sulu ekstraktının, doza bağlı olarak önemli bir antigenotoksik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [144].

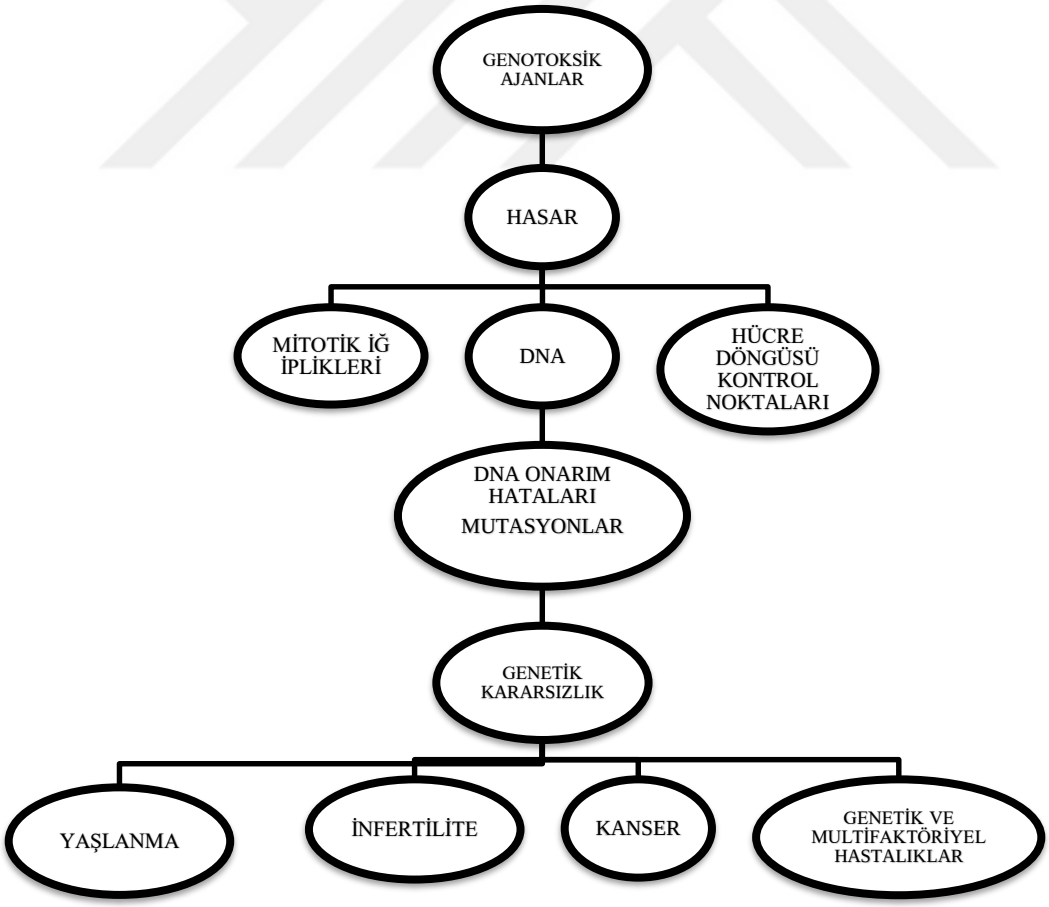
2015 yılında araştırmacılar geleneksel tıpta özellikle yüksek ateş, romatizma ve soğuk algınlığına karşı yaygın olarak kullanılan *Filipendula hexapetala* ve *Filipendula ulmaria* bitki türlerinin kök üstü ve kök altı metanol ekstrelerinin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini incelemişlerdir. Bu iki bitki türünün flavonoid içerikleri incelendiğinde hyperoside ana flavonoidler içerisinde yer almaktadır. Bu çalışmada araştırmacılar bitki ekstrelerinin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini *Drosophila melanogaster* larvalarının ön orta bağırsak hücrelerine comet testi uygulayarak incelemişlerdir. Genotoksik etkisinin değerlendirilmesi için larvalar, farklı konsantrasyonlarda *F. hexapetala* ve *F. ulmaria* ekstreleri (20, 40 ve 80 mg / mL) ile hazırlanan besiyeri ortamına aktarılmış ve 24 saat boyunca bu besiyeri ile beslenmişlerdir. Antigenotoksik etkisinin değerlendirilmesi için *Drosophila* larvaları, 24 saat boyunca *F. hexapetala* ve *F. ulmaria* ekstreleri (80 mg / mL) ile eşzamanlı olarak eklenen 1 mM Etil metan sülfanat ile hazırlanmış besiyeri ile beslenmişlerdir. Larvaların ön midgutlardan (orta bağırsak) elde edilen hücre süspansiyonuna comet testi uygulamışlardır. Çalışma sonucunda *Filipendula hexapetala* ve *Filipendula ulmaria* bitki türlerinin kök üstü ve kök altı metanol ekstrelerinin genotoksik olmadığını ayrıca en yüksek iki dozun antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [145].

2.7. Genotoksisite ve Antigenotoksisite

İnsanların maruz kaldığı mutajenler, hava ve su kirleticilerinin yanı sıra gıda katkıları, ilaçlar, kozmetik ürünleri, pestisitler, ev yapımı ve endüstriyel kimyasallar gibi birçok kimyasal sınıfından oluşmaktadır. Bu mutajenlerin artışı ekosistemi olumsuz etkilemesinin yanı sıra canlılarda DNA ve kromozom düzeyinde anormalliklere sebebiyet vermektedir. Toksikoloji biliminin bir alt dalı olan genotoksisite, DNA ile toksik ajanların etkileşmesi sonucu genomda ortaya çıkan toksisiteyi inceler [146,147]. İlk olarak 1927'de X-ışınlarının *Drosophila*'da mutasyon oranlarını normalden 15.000 kat daha fazla arttırdığını belirleyen Muller'in çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji bugün, gelişen teknoloji ile

artan risk ve analiz yöntemlerine bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir [148,149].

Genotoksik ajanlar, DNA'da, DNA ile ilişkili hücresel faaliyetlerde, genomda, kromozomlarda ya da genlerde hasarlara yol açabilen fiziksel ve kimyasal ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Genotoksik ajanların hem bireyin kendisinde hem de gelecek nesillerinde genetik hasarlar**a** neden olarak insanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceği bilinmektedir (Şekil 2.16). Genotoksisite ile kanser arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ve insanlar için karsinojen olan ajanların %90'ının genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir. Genotoksik etkilerin; tamir mekanizmalarının indüklenmesi, genotoksinleri DNA'ya bağlanmalarını engelleme veya enzim aktivitelerini inhibe ederek metabolizasyonlarını bloke etme gibi çeşitli şekillerde engellenmesi antigenotoksisite ve bu aktiviteleri gösteren moleküller ise antigenotoksik ajan olarak değerlendirilmektedir [150-152].



Şekil 2.16. Genotoksik ajanların DNA'ya etkileri ve sonuçları [153]

Araştırmacılar, meyve sebze tüketimi ve kanser arasındaki ilişki ile ilgili yapılan toplam 156 çalışmayı incelemişler ve bu inceleme sonucunda 128'inde meyve ve sebze tüketimi ile kanser oluşumu arasında ters bir orantı olduğunu bildirmişlerdir [154]. Bu çalışmadan bir süre sonra Dünya Kanser Araştırma Fonu (1997) raporunda, yeterli meyve ve sebze tüketiminin, tüm bilinen kanser tiplerinin insidansını %23 oranında azaltabileceği açıklanmıştır. Benzer şekilde, Avrupa Kanserle Mücadele Yasa'sında (2015); bitkisel gıdaların (meyve, sebze, baklagiller ve kepekli tahıllar) kullanımının, kırmızı et ve ısıl işlem görmüş gıda ürünlerinin, şeker ve tuz tüketiminin azaltılması ile beraber genel kanser riskini azaltabileceği bildirilmiştir [155,156]. Bilim insanlarının, meyve ve sebzelerinin kansere karşı varsayılan koruyucu etkilerinden hangi diyet bileşenlerinin sorumlu olduğunun belirlenmesi için yaptığı çalışmalarda genotoksisite ve anti-genotoksisite çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır [150].

Genotoksisite test sistemleri; ilaçların, endüstriyel kimyasalların, pestisitlerin, biyositlerin, gıda katkı maddelerinin, kozmetik bileşenlerinin, insanın korunmasını amaçlayan uluslararası mevzuat bağlamında değişen her türlü maddenin güvenlik değerlendirmesinde kullanılan önemli test sistemlerindendir. Genel olarak insanlara yönelik genotoksik tehlikenin değerlendirilmesi; temel olarak *in vitro* testler ile başlayıp, bazı durumlarda *in vivo* testler ile adım adım ilerleyen bir yaklaşım izler. Genetoksisite testleri genotoksik ajanları ve onların etki mekanizmalarını belirlemesinin yanısıra antigenotoksik ajanların ve bu ajanların antigenotoksisite mekanizmalarını belirlemek amacıyla da yapılmaktadır. Genotoksisite test sistemlerinin amacı, onarılabilen ve bu nedenle geri döndürülebilen DNA birincil hasarları, mutajenlerin hücrelerde meydana getirdiği kararlı ve geri dönüşümsüz hasarları (yani gen mutasyonları ve kromozom sapmaları) ve genomun bütünlüğünün korunmasında rol oynayan mekanizmalardaki bozulmaları tespit etmektir. Her bir test sistemi genotoksik maddelerin tespiti için yüksek hassasiyetle planlanmıştır [157,158]. Günümüzde, kısa süreli genotoksisite testlerinin kullanımı, ilaçlar gibi kimyasal maddelerin genotoksisite ve karsinojenite potansiyellerinin öngörülmesinde en akılcı yaklaşımdır. Tüm dünyanın geçerliliğini kabul ederek, rutin olarak kullandığı bu testlerin farklı hücre tipleri üzerinde yapılabilen 200'den fazla çeşidi vardır. Genotoksisite testlerinin bir standardının oluşması için OECD tarafından test kılavuzları yayınlanmıştır [152]. Genotoksisite testilerinin her biri farklı DNA hasar tiplerine duyarlıdır. Bu yüzden kimyasalların genotoksik potansiyellerinin tek bir testle belirlenemeyeceği belirtilmekte ve

birbirini tamamlayan birkaç kısa zamanlı genotoksisite testinin bir arada kullanıldığı seri test sistemleriyle değerlendirilmesi önerilmektedir [159].

2.7.1. Kromozomal Anormallik (KA) Testi

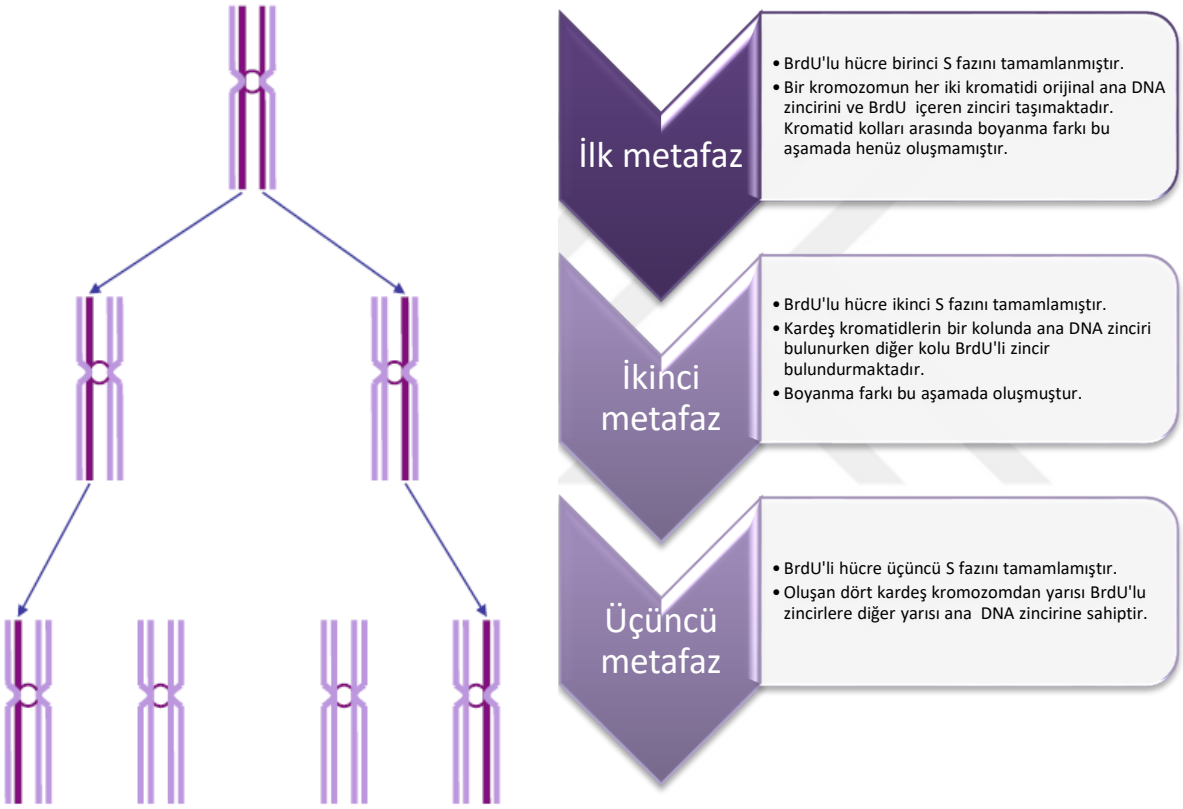
Kromozomal aberasyonlar, hasar görmüş kromozomların tamir edilememesinden, yanlış tamirinden ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanan ve kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişiklerdir. *In vitro* KA testinde; kültüre edilmiş sperm, fibroblast, kemik iliği ya da sıklıkla periferal kan lenfositleri gibi memeli hücreleri kullanılır. *In vitro* KA testinde, hücre kültürleri sonlandırılmadan iki saat önce hücre bölünmesini metafaz safhasında durdurmak için kolşisin uygulanır. Daha sonra, kültürlerden elde edilen metafaz hücrelerinin kromozomlarında ortaya çıkan sayısal ve yapısal anormalliklerin tespiti için mikroskop incelemesi yapılır. İnceleme sonucunda karşılaşılan anormalikler genellikle; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom ve kardeş kromatidlerde birleşme gibi yapısal ve poliploidi gibi sayısal kromozom anormallikleridir [152,153,160].

İnsan hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, periferal kan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik sıklığının, hem genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken tanısında, hem de kansere karşı bireysel duyarlılığı yansıtmasından dolayı insanlarda kanser riskiyle ilgili biyolojik bir gösterge olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmalar, periferal lenfositlerdeki kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar kromozom aberasyonlarının genotoksisitenin değerlendirilmesi için son derece güvenilir test sistemleri olduğunu göstermektedir [146,161,162].

2.7.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimi, genotoksisitenin belirlenmesinde ve hücresel homolog rekombinasyona sebep olan biyokimyasal değişikliklerin tespitinde kullanılan klasik bir genetik toksikoloji testidir. Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinden kırılarak, kırılan parçaların simetrik olarak yer değiştirmesidir.

KKD testinde, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analoğu olan Bromodeoksiüridin (BrdU) eklenmektedir. Böylece replikasyon sırasında timin yerine BrdU geçer (Şekil 2.17) [163]. Böylece ultraviyole lambası ile ışınlanıp ardından boyanan kromozomlarda BrdU bulunan bölgeler açık boyanmış olarak görülmektedir. Mikroskopta gözlenen kromozomlar bu boyama farkı sayesinde; açık boyanmış kromozomlardaki koyu boyanmış bölgelerin ya da koyu boyanmış kromozomlardaki açık boyanmış bölgelerin sayılması ile incelenmektedir [153,160,164].



Şekil 2.17. BrdU'nun üç metafaz boyunca kromozomdaki renk değişimi [165]

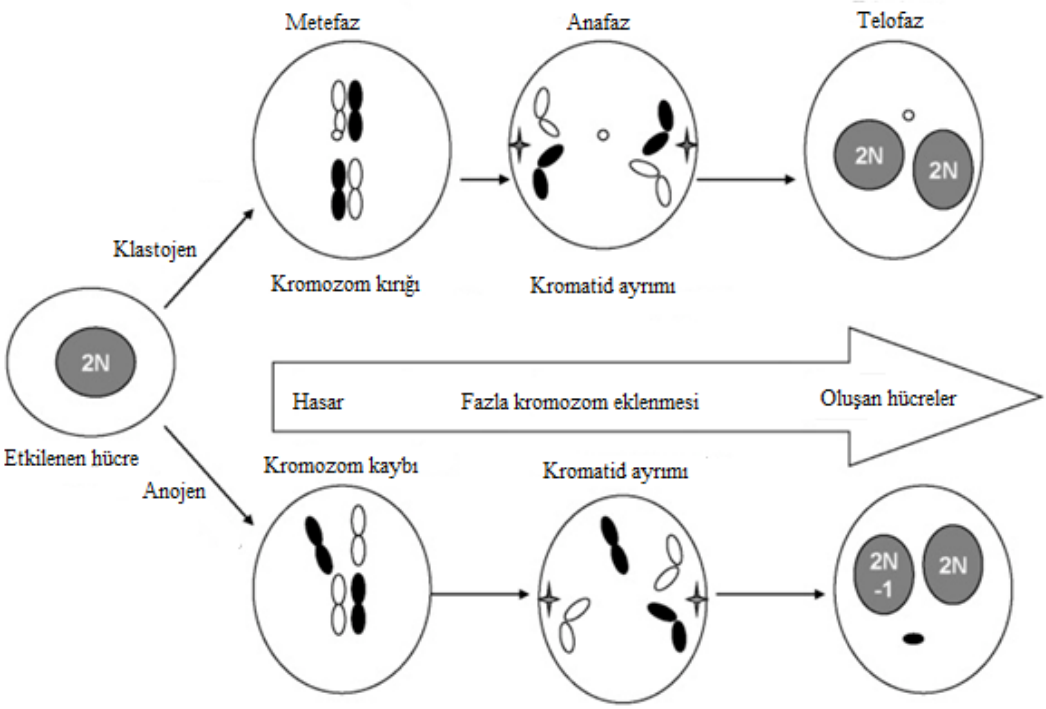
Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle DNA'da meydana gelen ve replikasyon esnasında onarılmayan hatalar KKD'nin ortaya çıkmasına ya da artmasına sebep olmaktadır. Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında önemli bir yere sahiptir. Mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddeler ile yapılan çalışmalarda bu maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom anomalisi ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD frekansının arttığı gösterilmiştir. KKD testi ile özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA

replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptanmaktadır. ‘Memeli Hücrelerinde *in vitro* Kardeş Kromatid Değişimi Testi 2 Nisan 2014 tarihinde OECD test klavuzundan çıkarılmıştır [146,161,166,167].

2.7.3. Mikronukleus (MN) testi

MN testi 1950’lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970’lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra 1976'da Countryman ve Heddle tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır. Mikronükluslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan mikro çekirdekçiklerdir. MN’ler hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN testlerinde kültürlere uygun konsantrasyonda sitokalasin-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler elde edilir (Şekil 2.18). Böylece hücre çekirdek bölünmesi geçirdiği zaman oluşan hasarlar sitoplazma içerisinde çekirdekçik şeklinde görülebilmektedir [165,168-170]. Bu çekirdekçiklerin MN olarak tespit edilmesinde bazı kriterler vardır. Bunlar;

1. Hücreler çift çekirdeğe sahip ve belirgin bir sitoplazması olmalıdır.
2. Çekirdek zarının şekli ve sınırları belli olmalıdır
3. MN çapı ana çekirdeğin boyutunun en fazla 1/3’ü kadar ve en küçük 1/36’sı kadar olmalıdır.
4. MN’ler yuvarlak ve oval şekillerde sınırları belli olmalıdır.
5. MN’ler ana çekirdekten tamamen ayrılmış olmalıdır.
6. Boya tonu ana çekirdek ile aynı olmalıdır.
7. Sadece binükleat hücrelerdeki MN’lerin sayılması esas alınmalıdır [153].



Şekil 2.18. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN oluşumu [170]

MN testi, klastojenik ve anojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite testlerindendir. MN testi mitoz bölünme geçirebilen tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir test sistemidir. Ayrıca, sitogenetik hasarın tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde sıkça tercih edilen bir tekniktir. Çeşitli kimyasalların genotoksik etkilerinin incelendiği ve /veya epidemiyolojik çalışmalar insan periferal lenfositlerinde MN frekansındaki artış ile kanser insidansı arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir [153,165,168].

Bu çalışma ile hyperoside flavonoidinin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkilerini *in vitro* test yöntemleri ile incelenmesini hedeflemektedir.

3. MATERYAL METOD

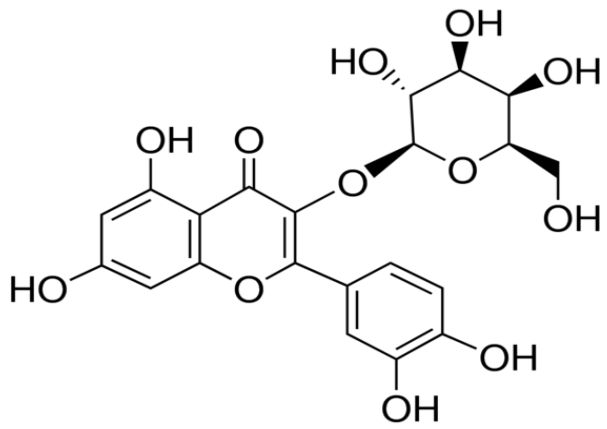
3.1. Materyal

Bu çalışmada hyperoside fitokimyasalının insan periferal lenfositlerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma için sigara, alkol ve ilaç kullanmayan ayrıca herhangi bir hastalığı olmayan 24 yaşında bir kadın ve 26 yaşında bir erkek olmak üzere iki donör kullanılmıştır. Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Mikronukleus testi olmak üzere 3 farklı genotoksisite testi uygulanmıştır. Bu araştırma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun (25.07.2017-435) izniyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Helsinki Bildirgesi kurallarına uyulmuştur.

3.1.1. Test materyali

Hyperoside

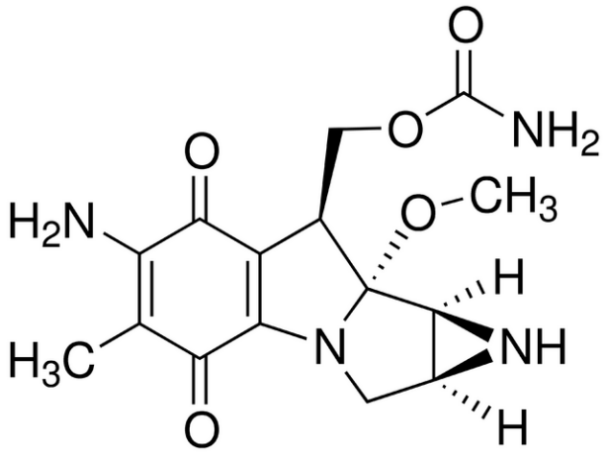
Hyperoside, quercetin 3-galactoside olarak da adlandırılan bir flavonol glikozittir. Bu çalışmada kullanılan hyperoside, Sigma-Aldrich firmasından 00180585 ürün numarası ile satın alınmıştır. CAS-NO: 482-36-0, kimyasal formülü: $C_{21}H_{20}O_{12}$ molekül ağırlığı: 464,38 g/mol'dür. Yapısal formülü Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Hyperosidenin çözülmesinde kullanılan Dimetil Sülfoksitin (DMSO) kültürdeki son konsantrasyonu %0,5'i geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.1: Hyperosidenin kimyasal formülü [91]

Mitomisin-C (MMC)

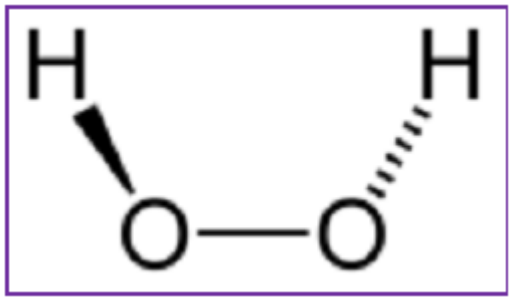
Bu tez çalışmasında mutajen olarak kullanılan Mitomisin-C *Spreptomyces caespitosus'*tan elde edilen antineoplastik ve geniş çerçeveli bir genotoksik alkalleyici kemoterapi ajanıdır. Kimyasal adı: 6-amino-4,7-diokso-8-metoksi-5-metil-1,1,2,8,8,8-hekzahidroazirin pirolo [1, 2] indol-8-metilkarbamat, kimyasal formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$, CAS-NO: 50-07-7, molekül ağırlığı: 334,33 olup kimyasal yapısı Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Mitomisin-C'nin kimyasal yapısı [171]

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit havada çok az miktarlarda doğal olarak oluşabilen, oda sıcaklığında renksiz, tadı sert bir bileşiktir. Oksitleme özelliği olan hidrojen peroksit DNA da ciddi hasarlara neden olmaktadır. Bu çalışmada mutajen olarak kullanılan hidrojen peroksitin kimyasal formülü H_2O_2, CAS-NO:7722-84-1, molekül ağırlığı: 34,01'dir. Yapısal formülü Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Hidrojen peroksitin yapısal formülü [138]

3.2. Metod

3.2.1. Çalışmada kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi ve kültürdeki uygulamalar:

Hyperosidenin hem genotoksik hem de iki farklı mutajene (MMC ve H_2O_2) karşı antigenotoksik etkisi incelenmiştir. Farelerde oral LD_{50} dozunun 5000 mg/kg olduğu belirlenmiş (Guo Ai ve arkadaşları 2012) [172] ve deneme dozları olarak 3,90; 7,81; 15,81; 31,25; 62,50; 125; 250 ve 500 µg/mL seçilmiştir. Ön değerlendirme için hazırlanan preparatlarda mitotik indeks sayımı yapılmıştır. Bu sayım sonucunda en yüksek üç dozun (125; 250 ve 500 µg/mL) mitotik indeks değerlerinin oldukça düşük çıkması sebebi ile 3,90; 7,81; 15,81; 31,25 ve 62,50 µg/mL konsantrasyonları çalışmada uygulanacak konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Çalışmada üç faklı uygulama yapılmıştır:

1-Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla Hyperosidenin belirlenen konsantrasyonları besiyerlerine tek başına 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki farklı muamele süresince uygulanmıştır.

2-Antigenotoksik etkiyi belirlemek amacıyla Hyperosidenin yine aynı konsantrasyonları eş zamanlı olarak 0,20 µg/mL MMC ile birlikte besi ortamına ilave edilmiş, 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki farklı muamele süresince uygulanmıştır.
3-Antigenotoksik etkiyi belirlemek amacıyla Hyperoside'nin yine aynı konsantrasyonları eş zamanlı olarak diğer bir mutajen olan 100 µM, H_2O_2 ile birlikte besi ortamına ilave edilmiş, 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki farklı muamele süresince uygulanmıştır.

Tüm uygulama tiplerinden yalnızca MN testinde 48 saatlik muamele süresi uygulanmıştır. Ayrıca test sisteminde bir negatif kontrol (steril distile su), iki pozitif kontrol (0,20 µg/mL MMC ve 100 µM H_2O_2) ve bir adet çözücü kontrol (%0,5 DMSO) grupları bulundurulmuştur.

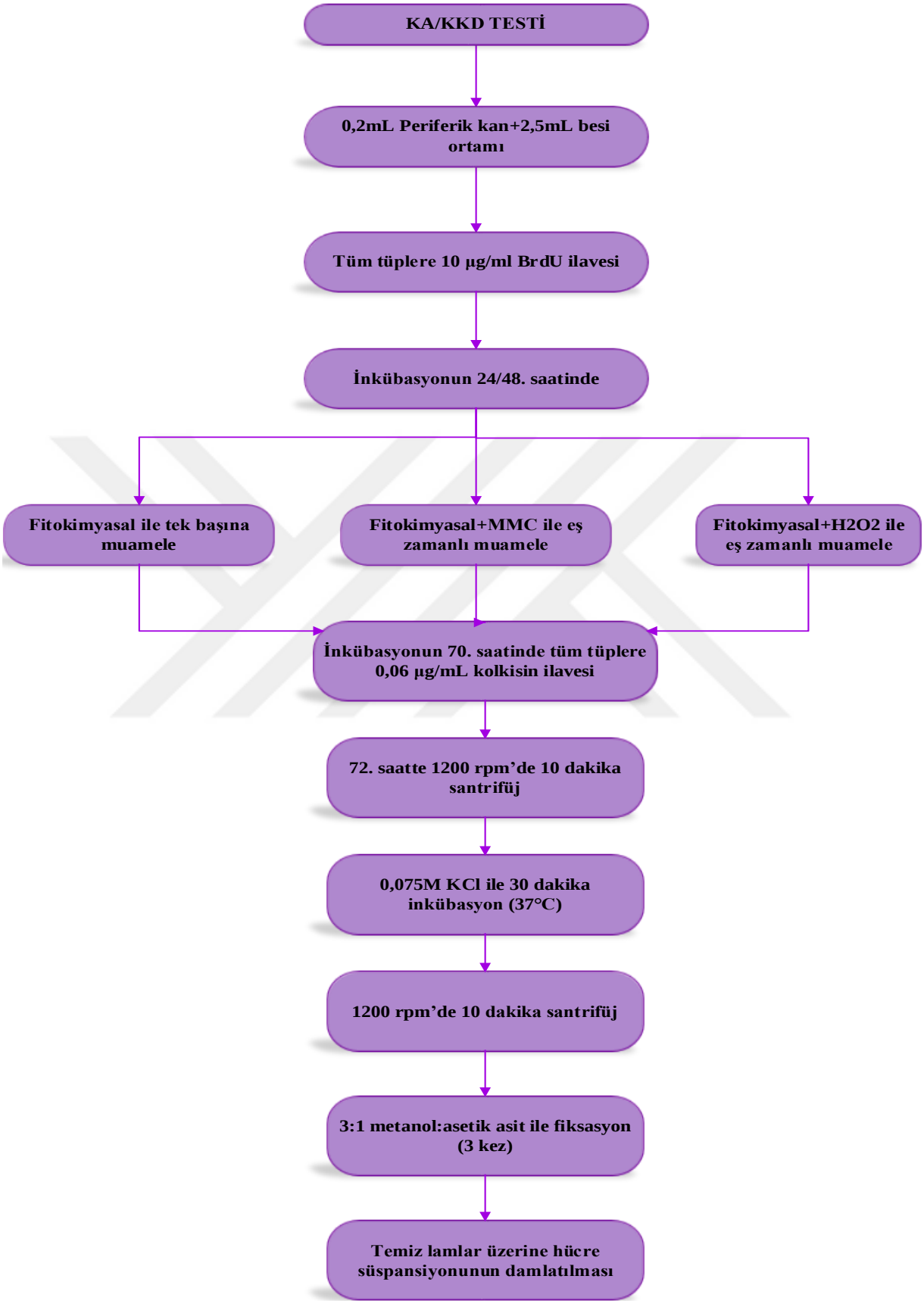
3.2.2. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom anomallik (KA) ve kardeş kromatid (KKD) değişimi testi

İnsan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik Evans (1984) [173] yöntemine göre bazı değişikliklerle (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006) [174], Kardeş Kromatid Değişimi Testi ise Perry ve Wolff'un (1974) [175] yöntemine göre bazı değişikliklerle (Speit ve Haupter, 1985) [176] uygulanmıştır.

Donörlerden 0,2 mL periferik kan örnekleri 1/10 oranında heparinize edilmiş enjektör ile steril şartlarda alınarak 2,5 mL besi ortamına (Chromosome Medium B) eklenmiştir. Ayrıca her tüpe sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5 -Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan 10 µg/mL ilave edilerek sıcaklığı 37°C olarak sabitlenen etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Tüm gruplara kültür sonlandırmadan 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) hücre siklusunu metafaz evresinde durdurabilmek için kolkisin (0,06 µg/mL) eklenmiştir. Kültür sürelerinin 72. saatinde etüvden çıkarılarak sonlandırılma işlemine başlanmıştır. İlk önce 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır. Tüp içerisinde kalan kısma 0,075M KCI çözeltisi vorteks üzerinde eklenmiştir. KCI eklenmiş olan kültür tüpleri 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu kültür tüpleri 1200 rpm' de 10 dakika santrüj edilmiş ve süpernatant kısımları atılmıştır. 3:1 oranında hazırlanan metanol:asetik asit karışımı kültür tüplerinin kalan kısmına ilave edilerek 45 dakika tespit işlemi yapılmıştır. Bu tespit işlemi tüm tüpler için 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son tespit işleminden sonra santrifüj edilen tüplerde süpenatant kısmı atılmış, kültür tüplerinde kalan kısım ise pipetize edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Daha önceden temizlenerek hazırlanmış olan lamlar üzerine hücre süspansiyonu damlatılmış ardından 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Anlatılan tüm aşamalar akış diyagramında şematize edilmiştir (Şekil 3.4).

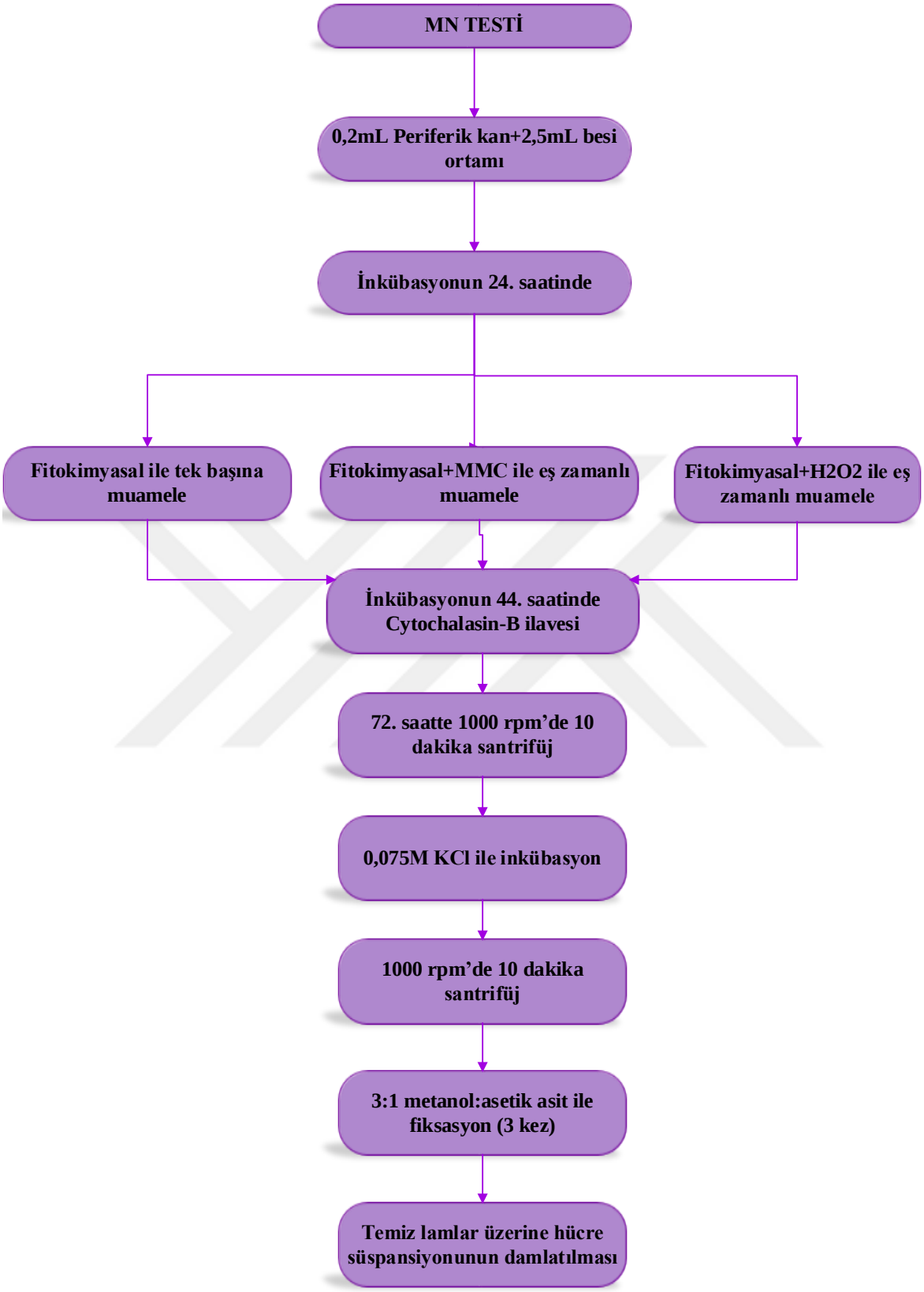


Şekil 3.4. Kromozomal anormallik ve kardeş kromatid değişimi testi yapılış diyagramı [177]

Mikronukleus testi

Mikronukleus testinin uygulanmasında Fenech'in (2000) [178] metodu bazı değişikliklerle (Palus ve diğerleri, 2003) [179] kullanılmıştır. Donörlerden alınan 0,2 mL periferik kan 2,5 mL besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilerek 37°C' ye ayarlanmış etüv içerisine inkübasyona bırakılmıştır. Mikronukleus testinde Hyperosidenin sadece 48 saatlik muamele süresi esas alınarak yine genotoksik ve iki farklı mutajene karşı antigenotoksik etkileri incelenmiştir.

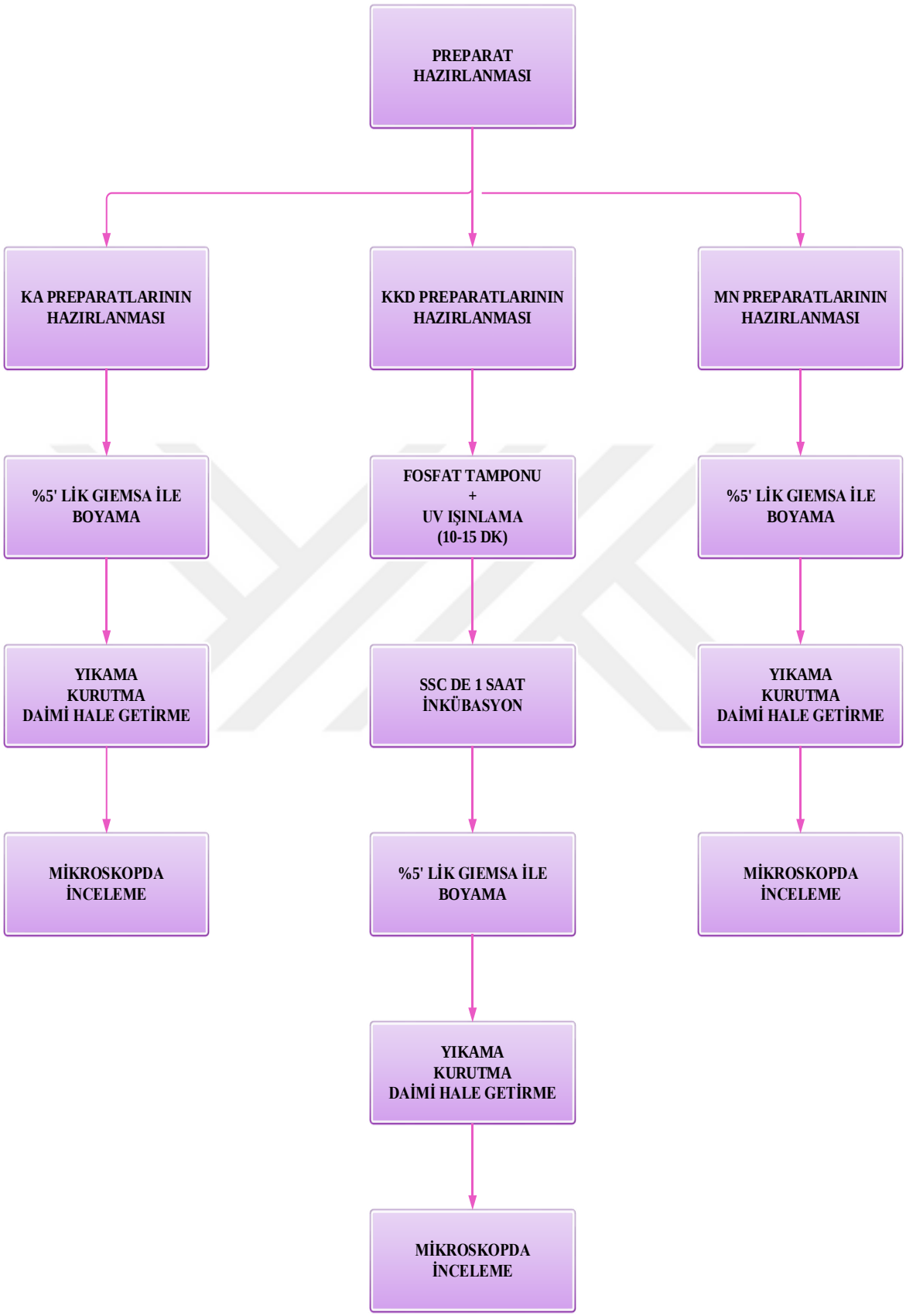
72 saat sürecek olan inkübasyon süresinin 44. saatinde sitokinezi durdurmak için 5,2 µg/mL Cytochalasin-B eklenmiş ve kültür sonlandırılmasına kadar etüvde bekletilmiştir. 72. saatlik inkübasyon süresi tamamlandığında sonlandırma işlemi için tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atılmış geriye kalan kısıma 0,075 M KCl çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantları atılan tüplerin üzerine 3:1 metanol: asetik asit karışımı eklenmiş ve +4°C'de bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. Son fiksasyon işleminde fiksatif içerisine kosantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit eklenmiştir. Üçüncü fiksasyon işleminden sonra tüpler santrifüj edilip süpernatant kısımları atılmıştır. Tüpün içerisinde kalan hücre süspansiyonu pipetize edilerek homojen şekilde karıştırılıp daha önceden temizlenmiş lamlar üzerine yayımı gerçekleştirilmiştir. Anlatılan tüm aşamalar akış diyagramında şematize edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikronukleus testi preparasyon diyagramı [177]

Preparatların boyanması

Test işlemlerinin sonucunda mitotik indeks, kromozomal anormallik, mikronukleus ve nükleer bölünme indeksi incelemelerinin yapılacağı preparatlar kuruma işleminin ardından %5' lik Giemsa boyası ile (pH 6,8 olacak şekilde ayarlanmış) 20-25 dakika boyunca homojen olarak boyanmıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin ve replikasyon indeksinin incelenmesi için hazırlanan preparatlar, Speit ve Haupter'in (1985) [176] geliştirdikleri metoda göre bazı modifikasyonlar ile Floresan+Giemsa tekniği ile boyanmıştır. Bu tekniğe göre preparatlar düz ve şeffaf bir tepsiye konularak üzerleri ince bir tabaka halinde fosfat tamponu (pH 6,8) ile kaplandıktan sonra, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile karanlık ortamda 10-15 dakika ışınlanmıştır. Ardından yıkanan preparatlar 60ºC sıcaklığa getirilen 1xSSC (Sodyum klorür+Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Fosfat tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa ile (pH 6,8) 20-25 dakika boyanmıştır. Distile su içerisinde yıkanan preparatlar, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan preparatlar entellan ile daimi hale getirilerek mikroskobik incelemeye alınmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Preparatların boyanma diyagramı

Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin saptanması

Kromozom anormalliklerin tespitinde her bir uygulama grubu için her donörden iyi dağılmış olan 100 metafaz hücresi (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 200 hücre) incelenmiştir. İncelenen toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı tespit edilmiştir. Ayrıca, mitotik indeksin (Mİ) belirlenmesinde tüm konsantrasyonlar için hazırlanan preparatlardan 1000'er hücre (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 2000 hücre) değerlendirilmiştir.

Kardeş kromatid değişiminin ve replikasyon indeksinin saptanması

Kardeş kromatid değişiminin belirlenebilmesi için test aşamasında kültür içerisine BrdU eklenmiştir. Böylece hücre bölünmesi gerçekleşirken yeni sentezlenen DNA'da komplementer polinükleotid ipliğe timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçmiş olur. BrdU içeren gen bölgeleri UV ışınının ardından yapılan boyamada açık renk boyanırken BrdU içermeyen gen bölgeleri ise koyu renk boyanır. Bu boyama farkı sayesinde DNA'da bulunan kardeş kromatidler arasındaki değişimler tespit edilmektedir. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatitdeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatitdeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili ve üçlü değişimler olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için her bir uygulama grubundaki her donörden metafazı iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 50 adet hücre (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 100 hücre) incelenmiştir.

Replikasyon indeksinin hesaplanmasında ise her bir uygulama grubundaki her donörden 200 (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 400) hücre incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında farklı metefaz evresindeki hücreler yine boyanma farkına göre sayılmış replikasyon indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$(Rİ) = [1x(M1)+ 2x(M2)+ 3x(M3)]/N$$

M1: Bir mitoz geçirmiş metefaz sayısı
M2: İki mitoz geçirmiş metefaz sayısı
M3: Üç mitoz geçirmiş metefaz sayısı
N: İncelenen toplam hücre sayısı

Mikronükleus (MN) frekansının ve nükleer bölünme indeksinin (NBİ) saptanması

Mikronukleus testinde çekirdek bölünmesi gerçekleşmiş fakat sitoplazma bölünmesi gerçekleşmemiş 'binükleat' olarak adlandırılan çift çekirdekli hücreler değerlendirmeye alınmıştır. Bu amaçla test aşamasının 44. saatinde kültür içerisine sitokalasin-B ilave edilerek hücre siklusu sitoplazma bölünmesi gerçekleşmeden durdurulmaktadır. Binükleat hücrelerin tercih edilme sebebi ise test edilen materyalin kültüre ilavesinden sonra bölünen hücreler olmalarıdır. Mikroskobik incelemelerde binükleat hücreler mikronukleus bulunup bulunmamasına, bulunuyor ise kaç adet bulunduğuna (1 mikronükleuslu, 2 mikronükleuslu, 3 mikronükleuslu vb.) göre değerlendirilmiştir. Her bir uygulama grubundaki her bir donörden 1000 binükleat hücre (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 2000 binükleat hücre) incelenmiştir. Hücre başına düşen mikronükleus sayısı aşağıdaki formül ile hesaplanmştır:

$$MN=[1x(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]/N$$

1MN: 1 mikronükleuslu hücre sayısı
2MN: 2 mikronükleuslu hücre sayısı
3MN: 3 mikronükleuslu hücre sayısı
4MN :4 mikronükleuslu hücre sayısı
N: İncelenen toplam hücre sayısı

Nükleer bölünme indeksinde ise hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde sayımı yapılmış ve her bir uygulama grubundaki her bir donörden 500 hücre (bir kadın bir erkek olmak üzere toplam 1000 hücre) incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$NBİ=[\ (1xN_1)+(2xN_2)+(3xN_3)+(4xN_4)]/n$$

1N: 1 nükleuslu hücre sayısı
2N: 2 nükleuslu hücre sayısı
3N: 3 nükleuslu hücre sayısı
4N: 4 nükleuslu hücre sayısı
n: İncelenen toplam hücre sayısı

İstatiksel hesaplamalar

Bu çalışmada üç farklı istatiksel hesaplama kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen hücre başına düşen kromozom anormalliği, anormal hücre frekansları, mikronükleus frekansı, mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) sonuçları Z testi ile analiz edilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarından elde edilen KKD/hücre değerleri T testi ile analiz edilmiştir. Kontrole göre önemli değişim gözlenen uygulama grupları için de konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA VE BULGULARI

4.1. Kromozomal Anormallik Testi Sonuçları

24 saatlik uygulama

Hyperosidenin 24 saatlik tek başına uygulandığı kültürlerde beş farklı yapısal anormallik tipi görülmüştür. Bunlar görülme sıklığına göre sırası ile kromatid kırığı (% 59,45), fragment (%29,72), kardeş kromatidlerde değişim (%5,40), kromozom kırığı (%2,70) ve disentrik kromozom (%2,70) şeklindedir. Hyperosidenin tek başına uygulandığı kültürler negatif kontrol ve çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısını artırmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2, Resim 4.1).

Hyperoside+MMC eş zamanlı muamelesinde altı farklı yapısal anormallik tipi görülmüştür. Bunlar görülme sıklığına göre sırası ile kromatid kırığı (%38,24), fragment (%36,65), kardeş kromatidlerde değişim (%16,33), kromozom kırığı (%5,97), disentrik kromozom (%1,99) olup bunları kardeş kromatidlerde birleşme (%0,79) takip etmektedir. 24 saatlik Hyperoside+MMC uygulamasında tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol (MMC) ile karşılaştırılmış ve 15,62 µg/mL'lik konsantrasyon dışındaki tüm konsantrasyonlar anormal hücre sayısı ve hücre başına düşen anormallik sayısını azaltmıştır. Ancak anormal hücre sayısındaki bu azalma en yüksek iki konsantrasyonda (31,25 µg/mL ve 62,50 µg/mL) istatistiksel olarak anlamlı görünmektedir. KA/hücre sayısı ise yine en yüksek iki konsantrasyon olan 31,25 µg/mL ve 62,50 µg/mL de anlamlı oranda azalmıştır. Ayrıca anormal hücre frekansını ve hücre başına düşen anormalliği en fazla azaltan konsantrasyon en yüksek konsantrasyon olan 62,50 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Bu azalma anormal hücre sayısı ($r= -0,87$) ve KA/hücre sayısın da ($r= -0,88$) konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiştir. Tüm bu sonuçlar Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

Hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı muamelesinde ise beş farklı yapısal anormallik tipi görülmüştür. En sık rastlanan anormallik tipi fragmenttir (%52,08), bunu sırası ile kromatid kırığı (%37,5), kromozom kırığı (%5,72), disentrik kromozom (%3,12) ve kardeş kromatidlerde değişim (%1,56) takip etmektedir. En düşük konsantrasyon (7,81 µg/mL)

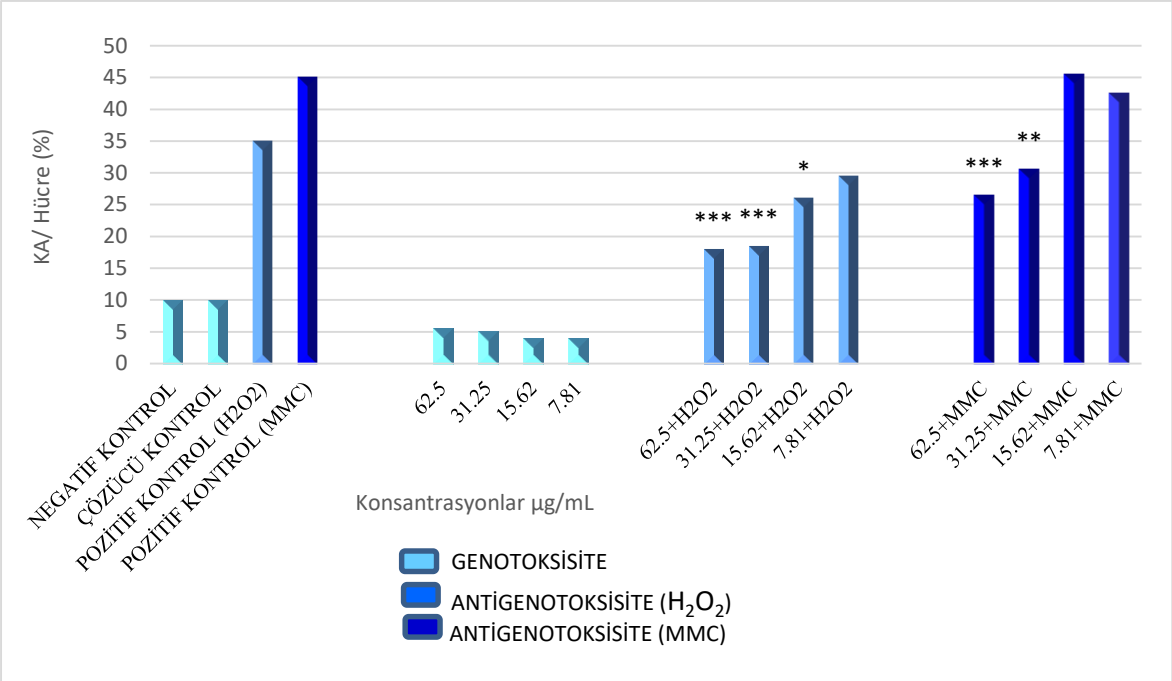
dışındaki tüm konsantrasyonlar hem anormal hücre sayısında hem de KA/hücre sayısında anlamlı düşüşe neden olmuştur. Tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol (H_2O_2) ile karşılaştırıldığında anormal hücre sayısı (r= -0,97) ve KA/hücre sayısını (r= -0,97) konsantrasyona bağlı olarak azaltmıştır. Tüm bu sonuçlar Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı uygulanmasının sonucunda insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları

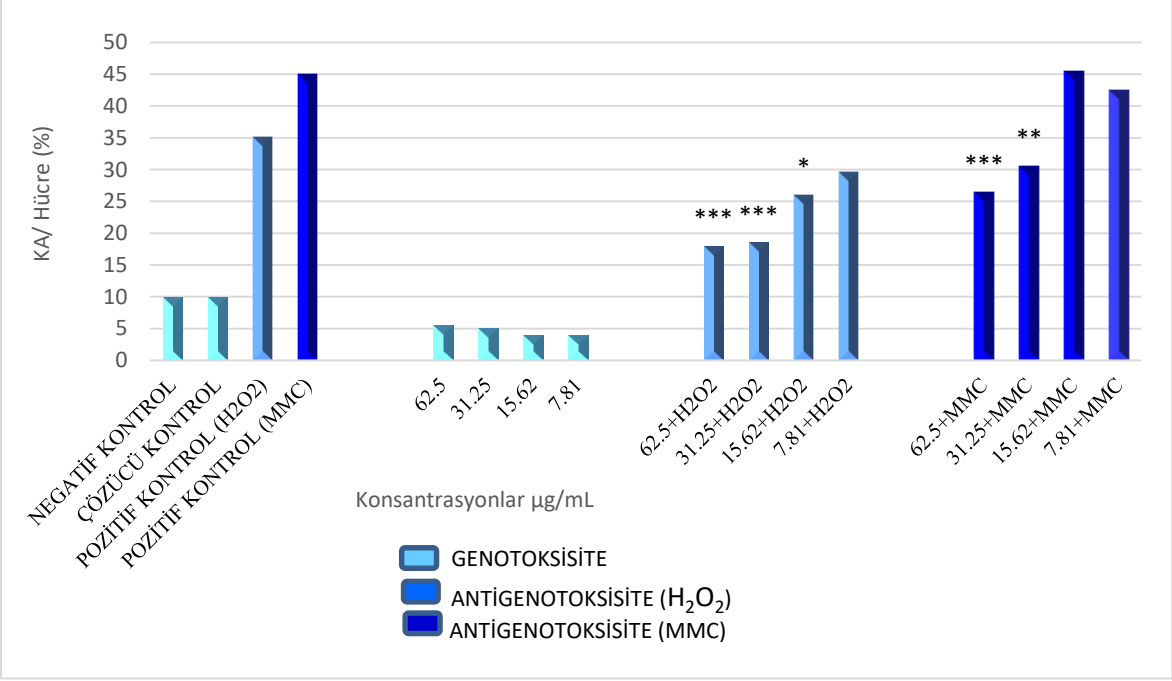
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal hücre ± SE (%)	KA/Hücre ± SE
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	Ktd	ds		
Kontrol	24	0,00	7	5	5			3	10,0±2,12	0,10±0,02
Çözücü Kontrol (DMSO)	24	% 0,5	6		10		4		10,0±2,12	0,10±0,02
Pozitif Kontrol (MMC)	24	0,20	37	5	28	1	18	2	45,0±3,51 **c3**+++	0,45±0,03
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	24	100µM	23	7	27	3	1	5	35,0±3,37 **c3**+++	0,35±0,03
Hyperoside	24	7,81	4	1	3				4,0±1,38	0,040±0,01
		15,62	7					1	4,0±1,38	0,040±0,01
		31,25	6		3		1		5,0±1,53	0,050±0,01
		62,50	5		5		1		5,5±1,60	0,055±0,01
Hyperoside+MMC	24	7,81	38	5	28	2	11		42,0±2,71	0,42±0,02
		15,62	42	4	30		11	4	45,5±3,48	0,45±0,03
		31,25	29	6	17		9		30,5±3,28**	0,30±0,03**
		62,50	25		17		10	1	26,5±3,11***	0,27±0,03***
Hyperoside+H_2O_2	24	7,81	20	4	32			3	29,5±3,22	0,29±0,03
		15,62	22	3	31			1	26,0±3,10 **a**	0,26±0,03 **a**
		31,25	14	2	20		3	1	18,5±2,74 **a3**	0,19±0,02 **a3**
		62,50	16	2	17			1	18,0±2,71 **a3**	0,18±0,02 **a3**

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi
Not: Çözücü kontrol negatif kontrole göre anlamlı değildir.

* Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	**a**Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **a2**Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **a3** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)
+ Negatif kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) ++ Negatif kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) +++ Negatif kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)	**c**Çözücü kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **c2**Çözücü kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **c3** Çözücü kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.1. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 24 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen anormal hücre frekansı



Şekil 4.2. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 24 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen hücre başına düşen anormallik sayısı

48 saatlik uygulama

Hyperosidenin tek başına 48 saatlik muamelesinde kromatid kırığı (%48,78), fragment (%34,14), disentrik kromozom (%7,31), kardeş kromatidlerde değişim (%4,87) ve kromozom kırığı (%4,87) olmak üzere beş yapısal anormallik tipi görülmüştür. Bununla birlikte, uygulanan hiçbir konsantrasyon negatif kontrol ve çözücü kontrole kıyasla hücre başına düşen anormallik ve anormal hücre frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4, Resim 4.1).

Hyperoside+MMC eş zamanlı muamelesinde fragment (%36,70), kromatid kırığı (%30,37), kromozom kırığı (%12,65) kardeş kromatidlerde değişim (%17,08), kardeş kromatidlerde birleşme (%1,26) ve disentrik kromozom (%0,63) olmak üzere altı farklı yapısal kromozomal anormallik şekli görülmüştür. Ayrıca bunlara ek olarak 15,62 µg/mL ve 62,50 µg/mL konsantrasyonlarında birer adet sayısal anormallik tipi olan poliploidi görülmüştür. Hyperoside+MMC uygulamasında da bütün konsantrasyonlar pozitif kontrole (MMC) göre anormal hücre sayısını ve hücre başına düşen anormallik frekansında önemli düşüşe neden olmuştur ($p<0,001$). Anormal hücre sayısı ($r= -0.77$) ve hücre başına düşen anormallik ($r= -0,77$) değerlerindeki değişikliklerin konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir. En yüksek koruma 31,25 µg/mL konsantrasyonunda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

Hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı muamelesinde altı farklı kromozom anormalliği tipi görülmüştür. Bunlar görülme oranına göre fragment (%43,47), kromatid kırığı (%37,68), kromozom kırığı (%11,59) kardeş kromatidlerde değişim (%2,89), disentrik kromozom (%2,89) ve kardeş kromatidlerde birleşme (%1,44) şeklindedir. Bu uygulamada tüm konsantrasyonlar, pozitif kontrol (H_2O_2) ile karşılaştırıldığında hücre başına düşen anormallikte ($r= -0,75$) ve anormal hücre frekansında ($r= -0.75$) konsantrasyona bağlı önemli düşüşe neden olmuştur. Söz konusu düşüş z testine göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Bu uygulama grubunda da yine en etkili konsantrasyonun 31,25 µg/mL olduğu gözlenmektedir. Sözü edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 de gösterilmiştir.

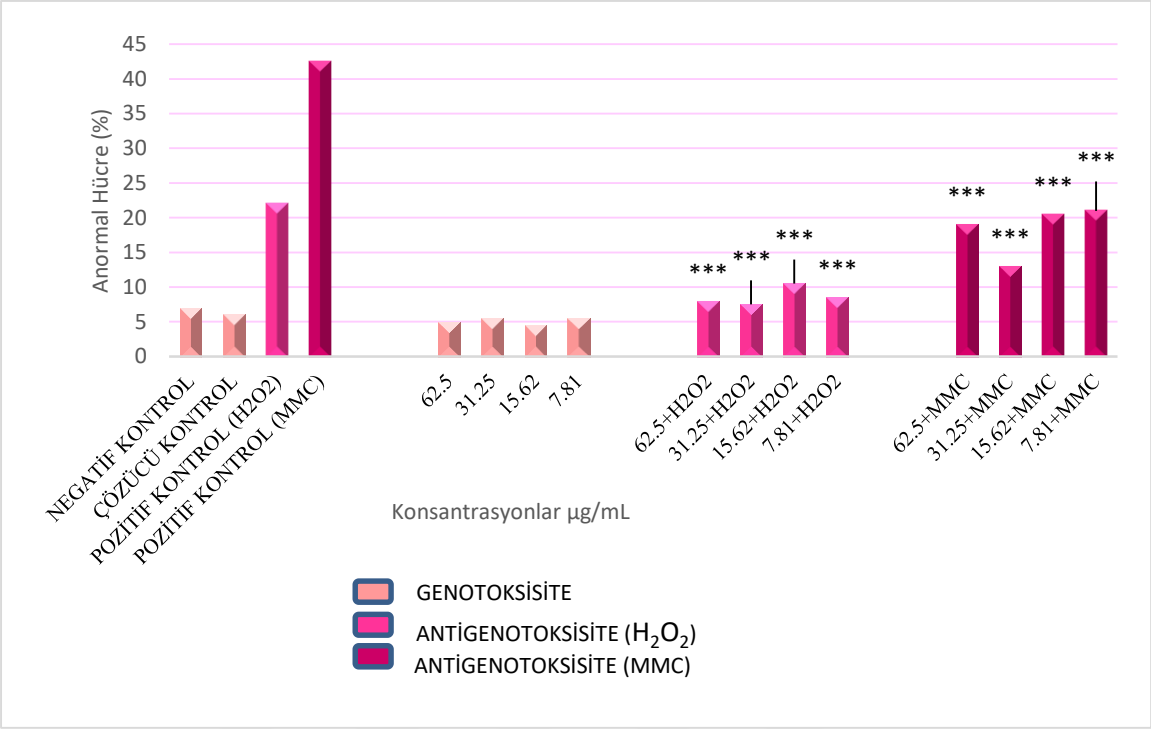
Çizelge 4.2. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı uygulamasının sonucunda insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SE (%)	KA/Hücre ± SE
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ktd	ds	p		
Kontrol	48	0,00	6	2	3		1	2	-	7,0±1,80	0,07±0,01
Çözücü Kontrol (DMSO)	48	%0,5	5	1	5	1				6,0±1,67	0,06±0,01
Pozitif Kontrol (MMC)	48	0,20	26	14	30	1	14		2	42,5±3,49 **c3**+++	0,42±0,03
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	48	100µM	14	5	16		5	2		22,0±2,92 **c3**+++	0,22±0,02
Hyperoside	48	7,81	6		4			1		5,5±1,60	0,055±0,01
		15,62	3		5			1		4,5±1,46	0,045±0,01
		31,25	6		4			1		5,5±1,60	0,055±0,01
		62,50	5	2	1		2			5,0±1,53	0,050±0,01
Hyperoside+MMC	48	7,81	13	5	17	1	6	1		21,0±2,87***	0,21±0,02***
		15,62	13	8	14		6		1	20,5±2,85***	0,21±0,02***
		31,25	9	4	12	1	8			13,0±2,37***	0,13±0,02***
		62,50	13	3	15		7		1	19,0±2,77***	0,19±0,02***
Hyperoside+H_2O_2	48	7,81	6	1	9			1		8,5±1,96 **a3**	0,085±0,01 **a3**
		15,62	9	4	7		1			10,5±2,16 **a3**	0,100±0,02 **a3**
		31,25	4	2	6	1	1	1		7,5±1,86 **a3**	0,080±0,01 **a3**
		62,50	7	1	8					8,0±1,91 **a3**	0,080±0,01 **a3**

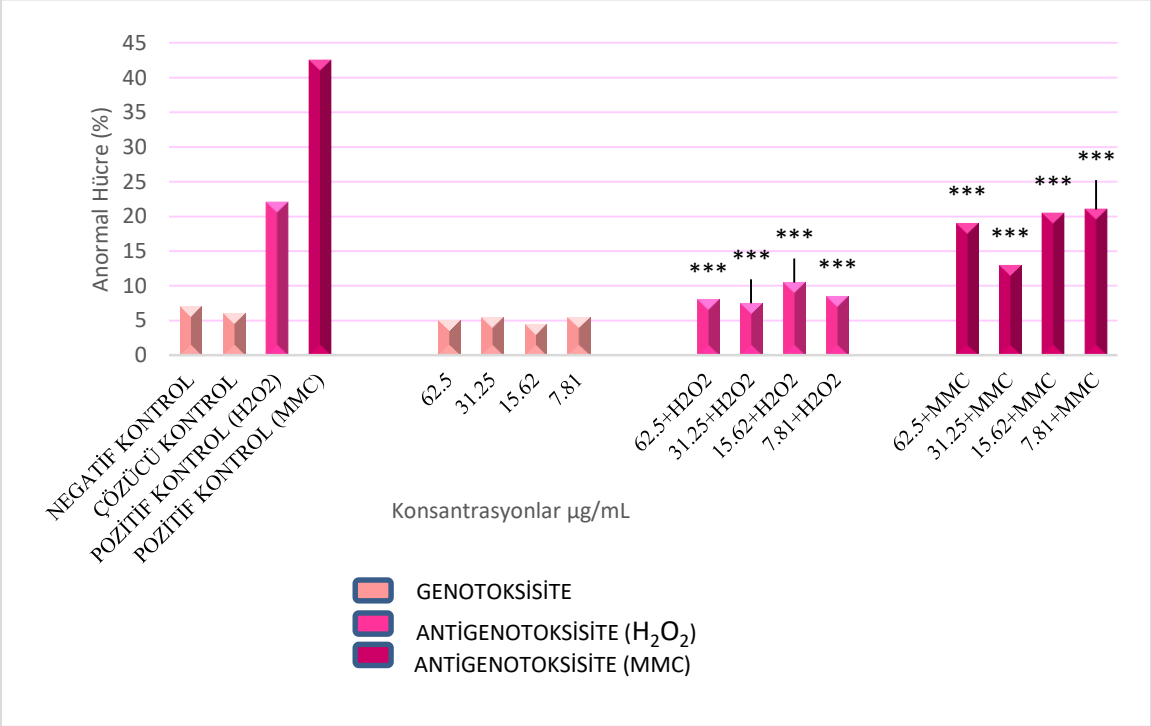
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi

Not: Çözücü kontrol negatif kontrole göre anlamlı değildir.

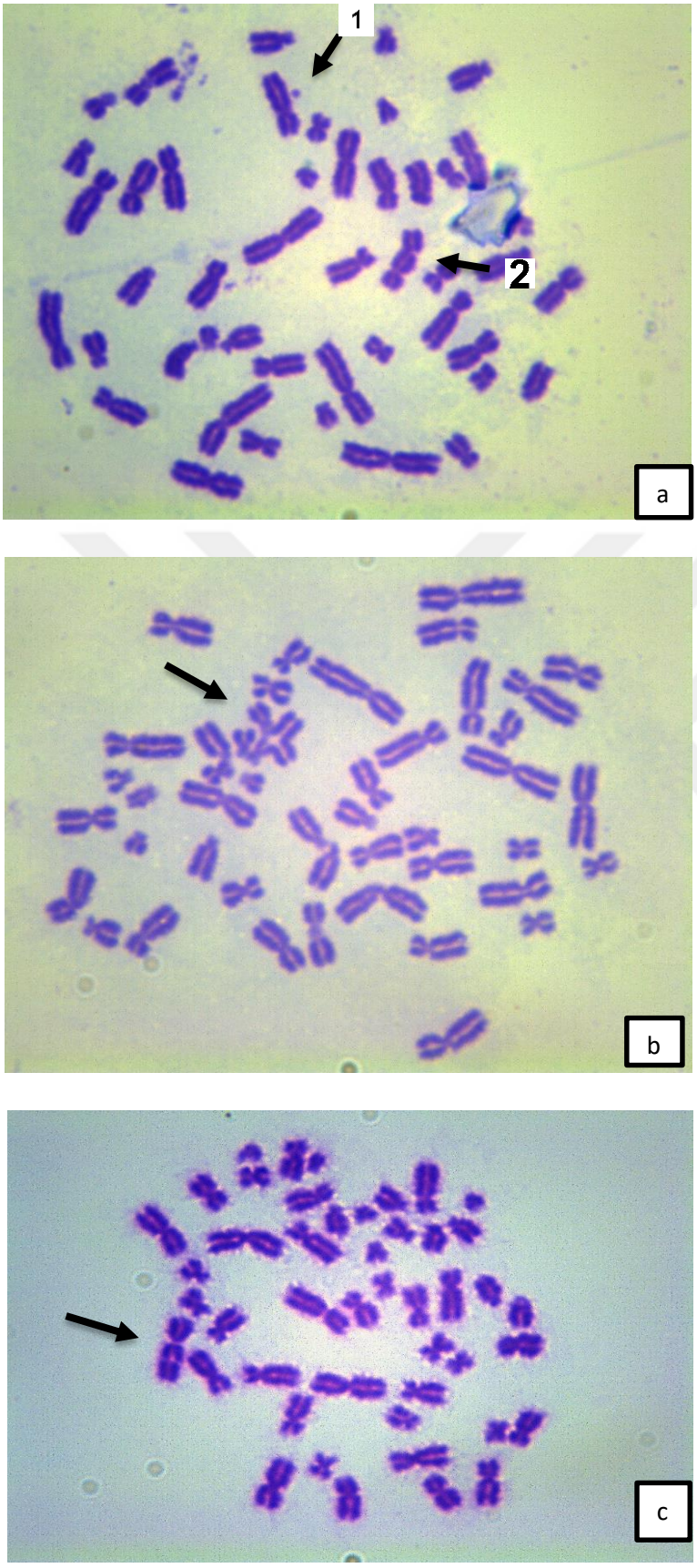
* Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	**a**Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **a2**Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **a3** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)
+ Negatif kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) ++ Negatif kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) +++ Negatif kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)	**c**Çözücü kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **c2**Çözücü kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **c3** Çözücü kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)



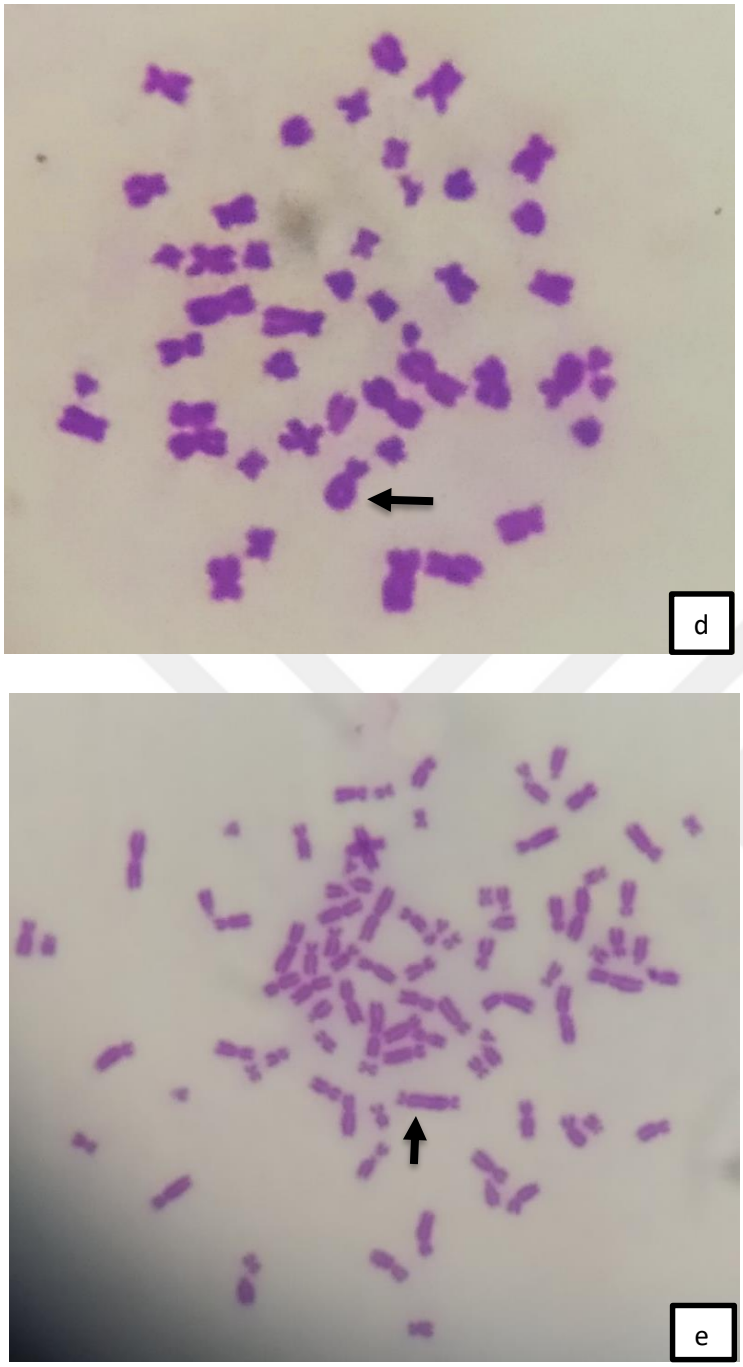
Şekil 4.3. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 48 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen anormal hücre frekansı



Şekil 4.4. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 48 saat eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen hücre başına düşen anormallik sayısı



Resim 4.1. Hperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H2O2 uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri a) 1. Fragment, 2. Kromatid kırığı, b) Kromatid değişimi, c)Kromozom kırığı



Resim 4.1. (devam) Hperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 uygulaması Sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik tipleri d) Kardeş kromatidlerde birleşme, e) Poliploid bir kromozom setinde disentrik kromozom

4.2. Mitotiks İndeks

24 saatlik uygulama

Kontrol ve uygulama gruplarında mitotik indeks parametresi de incelenmiştir. Hyerosidenin tek başına uygulandığı genotoksisite çalışmasında çözücü kontrole göre mitotik indekste bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Negatif kontrole göre ise 15,62 µg/mL ve 62,50 µg/mL konsantrasyonları mitotik indeksde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. MMC ile Hyperosidenin eş zamanlı olarak uygulandığında tüm konsantrasyonlar pozitif kontrole (MMC) göre mitotik indekte zayıf oranda konsantrasyona bağlı artışa neden olmuştur (r=0,64). Bu artış 7,81 µg/mL ve 62,50µg/mL konsantrasyonlarında z testine göre $p<0,01$ düzeyinde, 15,62µg/mL ve 31,25µg/mL konsantrasyonlarında ise yine z testine göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlılık göstermiştir. Hyperoside+H_2O_2 eşzamanlı muamelesinin mitotik indeks değerleri, pozitif kontrol (H_2O_2) ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonların zayıf bir korelasyon (r=0,62) ile mitotik indeksi belli düzeylerde arttırdığı görülmüştür. Mitotiks indeksteki bu artışın 7,81 µg/mL ve 62,50µg/mL konsantrasyonlarında $p<0,01$ düzeyinde, 15,62 µg/mL ve 31,25µg/mL konsantrasyonlarında ise $p<0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu bulunmuştur. Tüm sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5 de gösterilmiştir.

48 saatlik uygulama

Hyperoside uygulamasının negatif kontrole ve çözücü kontrole göre mitotiks indekste değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Yalnızca 7,81 µg/mL konsantrasyonunda negatif kontrole göre anlamlı düşüş olduğu görülmüştür. Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı muamelelerinde tüm konsantrasyonlar kendi pozitif kontrollerine göre ufak değişikliklere neden olmuşlar fakat bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 24 saatlik eş Zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen Mİ değerler

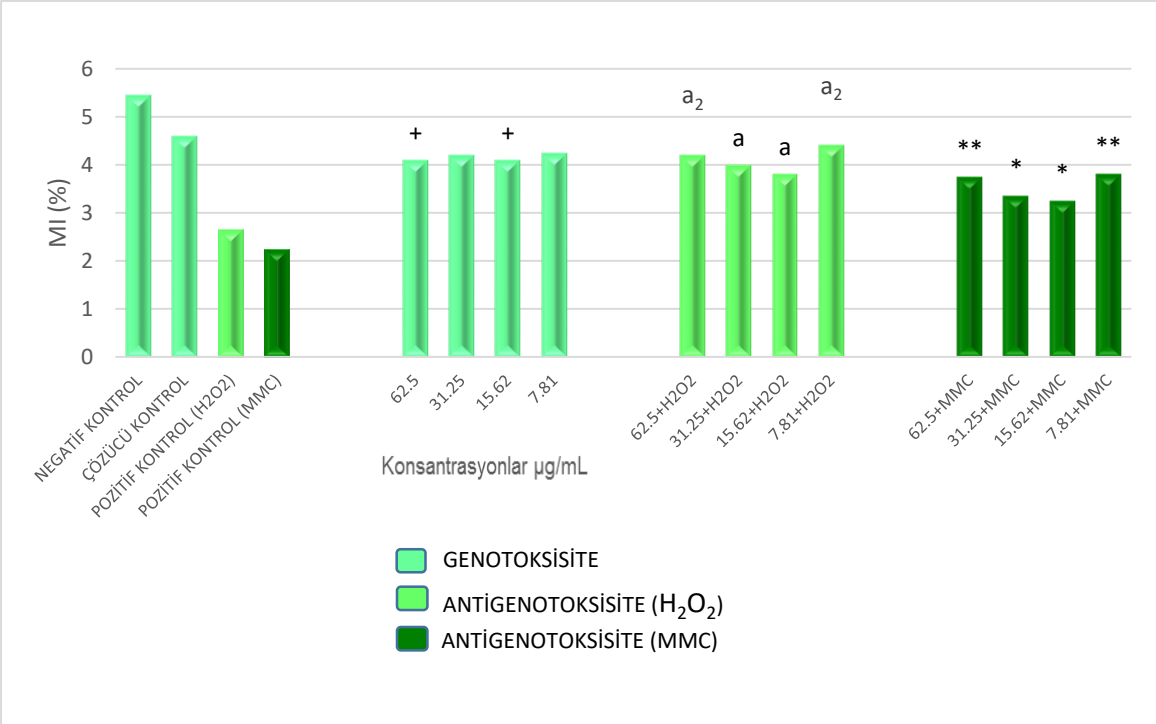
Uygulama grubu	Uygulama		Mİ ± SH
	Konsantrasyon (µg/ml)	Süre (saat)	
Kontrol	0,00	24	5.45±0.5
Çözücü Kontrol (DMSO)	% 0,5	24	4.60±0.4
Pozitif Kontrol (MMC)	0,20	24	2.25±0.3 +++c2
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	100µM	24	2.65±0.3 +++ c2
Hyperoside	7,81	24	4.25±0.4
	15,62		4.10±0.4 +
	31,25		4.20±0.4
	62,50		4.10±0.4 +
Hyperoside+MMC	7,81	24	3.80±0.4 **
	15,62		3.25±0.4 *
	31,25		3.35±0.4 *
	62,50		3.75±0.4 **
Hyperoside+H_2O_2	7,81	24	4.40±0.4 a2
	15,62		3.81±0.4 a
	31,25		4.00±0.4 a
	62,50		4.20±0.4 a2

* Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	**a** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **a2** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **a3** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)
+ Negatif kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) ++ Negatif kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) +++ Negatif kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)	**c** Çözücü kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **c2** Çözücü kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **c3** Çözücü kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)

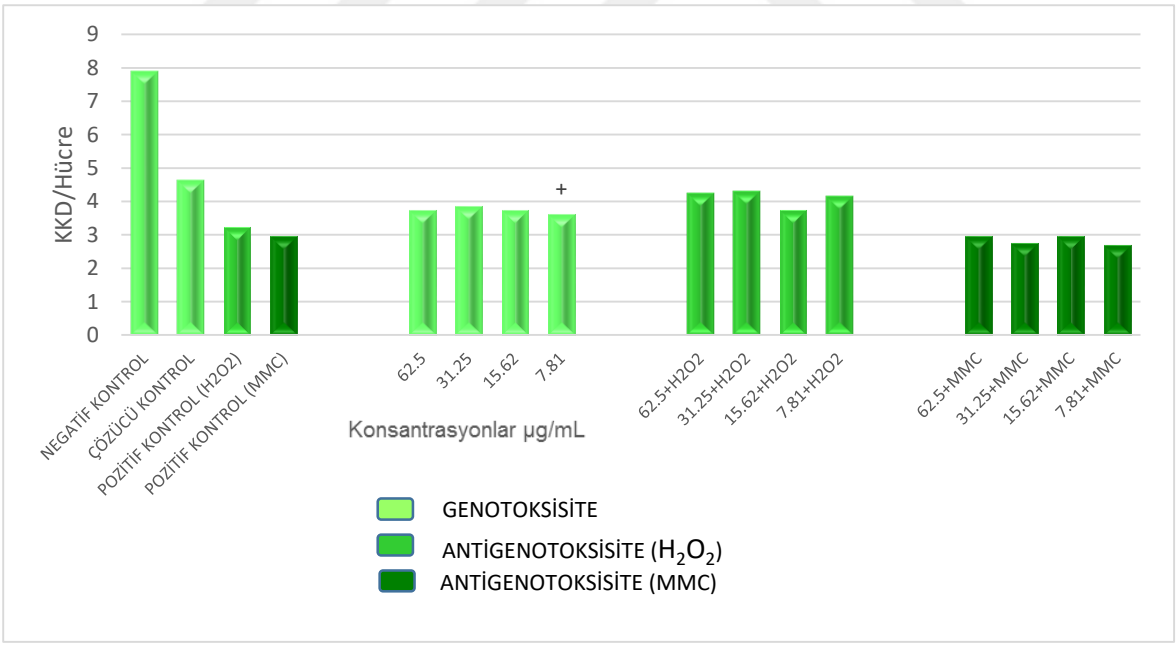
Çizelge 4.4. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen Mİ değerleri

Uygulama grubu	Uygulama		
	Konsantrasyon (µg/ml)	Süre (saat)	Mİ ± SH
Kontrol	0,00	48	4.90±0.4
Çözücü Kontrol (DMSO)	%0,5	48	4.62±0.4
Pozitif Kontrol (MMC)	0,20	48	2.95±0.3 **++c2**
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	100µM	48	3.22±0.4 **++c2**
Hyperoside	7,81	48	3.60±0.4 +
	15,62		3.75±0.4
	31,25		3.85±0.4
	62,50		3.75±0.4
Hyperoside+MMC	7,81	48	2.70±0.3
	15,62		2.95±0.3
	31,25		2.75±0.3
	62,50		2.95±0.3
			4.15±0.4
Hyperoside+H_2O_2	7,81	48	3.75±0.4
	15,62		4.30±0.4
	31,25		4.25±0.4
	62,50		

* Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	**a** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **a2** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **a3** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)
+ Negatif kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) ++ Negatif kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) +++ Negatif kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)	**c** Çözücü kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **c2** Çözücü kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **c3** Çözücü kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.5. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks değerleri



Şekil 4.6. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks değerleri

4.3. Kardeş Kromatid Değişimi Test Sonuçları

Bu test ile kardeş kromatid değişimi (KKD) ve replikasyon indeksi (Rİ) olmak üzere iki farklı parametre incelenmiştir.

24 saatlik uygulama

Hyperosidenin tek başına uygulandığı örneklerde 1-16 arasında KKD görülmüş ve çözücü kontrole göre 15,62 µg/mL ve 31,25 µg/mL konsantrasyonları KKD oranını düşürmüştür. Negatif kontrol ile kıyaslandığında ise tüm konsantrasyonlar kardeş kromatid değişimini arttırmıştır. Bu artış tüm konsantrasyonlar bakımından konsantrasyona bağlıdır (r= -0,74). Bununla birlikte Hyperoside'nin tek başına uygulanması replikasyon indeksinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7, Resim 4.2).

Hyperoside+ MMC eş zamanlı uygulamasında 4-21 arası KKD oluşumu gözlenmiştir. Hyperosidenin tüm konsantrasyonları pozitif kontrole (MMC) göre KKD/hücre değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Fakat bu azalma istatistiksel olarak sadece en düşük konsantrasyonda (7,81 µg/mL) anlamlıdır. Bu uygulama replikasyon indeksinde ufak değişikliklere neden olmuş fakat bu değişiklikler anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7, Resim 4.2).

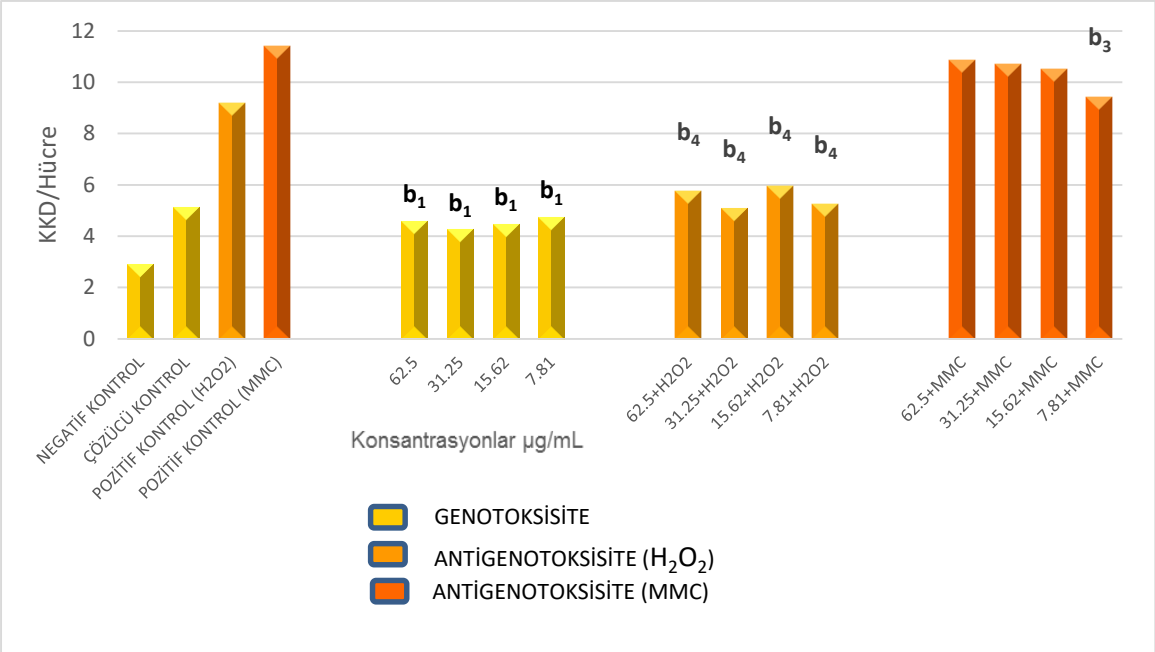
Hyperoside+ H_2O_2 eş zamanlı muamelesinde 1-15 arası KKD oluşumu belirlenmiştir. Bu uygulamada tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol (H_2O_2) ile karşılaştırıldığında KKD frekansında önemli azalmalar olduğu görülmüştür. Bu azalmanın tüm konsantrasyonlarda anlamlı olduğu ve konsantrasyona bağlı olduğu belirlenmiştir (r= -0,66). Replikasyon indeksi açısından ufak değişikliklere neden olsa da bu değişikliklerin anlamlı olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.7, Resim 4.2).

Çizelge 4.5. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 24 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD ve Rİ frekansları

Uygulama grubu	Uygulama		Min-Max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)						
Kontrol	24	0,00	1-8	2.90±0.14	109	141	150	2.10±0.04
Çözücü (DMSO) Kontrol	24	%0,5	2-15	5.13±0.24	125	104	171	2.22±0.04
Pozitif (MMC) Kontrol	24	0,20	7-21	11.4±0.36 **b_1 b_2**	189	100	111	1.80±0.04
Pozitif (H_2O_2) Kontrol	24	100µM	7-22	9.18±0.44 **b_1 b_2**	197	145	58	1.65±0.03
Hyperoside	24	7,81	1-16	4.72±0.27 **b_1**	135	100	165	2.07±0.04
		15,62	2-12	4.47±0.22 **b_1 b_2**	130	100	170	2.13±0.04
		31,25	1-13	4.25±0.18 **b_1b_2**	124	112	164	2.12±0.04
		62,50	1-12	4.59±0.20 **b_1**	140	109	151	2.02±0.04
Hyperoside+MMC	24	7,81	4-18	9.42±0.34**b_3**	151	116	133	1.90±0.04
		15,62	6-21	10.49±0.39	141	127	132	1.92±0.04
		31,25	6-20	10.69±0.30	152	119	129	1.93±0.04
		62,50	7-20	10.86±0.31	135	131	134	2.49±0.05
Hyperoside+H_2O_2	24	7,81	1-11	5.23±0.23 **b_4**	140	149	111	1.93±0.03
		15,62	2-10	5.95±0.56 **b_4**	124	166	110	1.92±0.03
		31,25	2-10	5.08±0.19 **b_4**	131	153	116	1.94±0.03
		62,50	2-15	5.74±0.22 **b_4**	158	129	113	1.88±0.04

Not: Çözücü kontrol negatif kontrole göre anlamlı değildir

b_1 Kontrole göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_2 Çözücü kontrole göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_3 Pozitif kontrole (MMC) göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_4 Pozitif kontrole (H_2O_2) göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı(t testi)



Şekil 4.7. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi

48 saatlik uygulama

Hyperoside flavonoidinin tek başına kullanıldığı kültürlerin 48 saatlik uygulamasında 1-11 arasında KKD oluşumu izlenmiştir. En düşük konsantrasyon dışındaki tüm konsantrasyonlarında KKD frekansındaki artış negatif kontrole göre anlamlı iken, en düşük konsantrasyondaki (7,81µg/mL) KKD frekansındaki artış çözücü kontrole göre anlamlılık göstermiştir. Replikasyon indeksine bakıldığında ise tüm konsantrasyonların neredeyse negatif kontrol ile aynı değerlere neden olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8, Resim 4.2).

Antigenotoksisitenin incelendiği grup olan Hyperoside+MMC eş zamanlı muamelesindeki preparatlarda en az 7 en fazla 36 KKD oluşumuna rastlanmıştır. Bu gruptaki tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol (MMC) ile karşılaştırıldığında KKD frekansının konsantrasyona bağlı olarak (r= -0,51) önemli bir oranda azaldığı gözlenmiştir. Replikasyon indeksi açısından ufak değişikliklere neden olsa da bu değişikliklerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8, Resim 4.2).

Hyperoside+H_2O_2 muamelesinin ise 1-12 aralığında KKD oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Hyperoside'de H_2O_2 tarafından indüklenen KKD frekansını tüm konsantrasyonlarda önemli ölçüde azaltmıştır. Bu azalma konsatrasyona bağlı (r= -0,63)

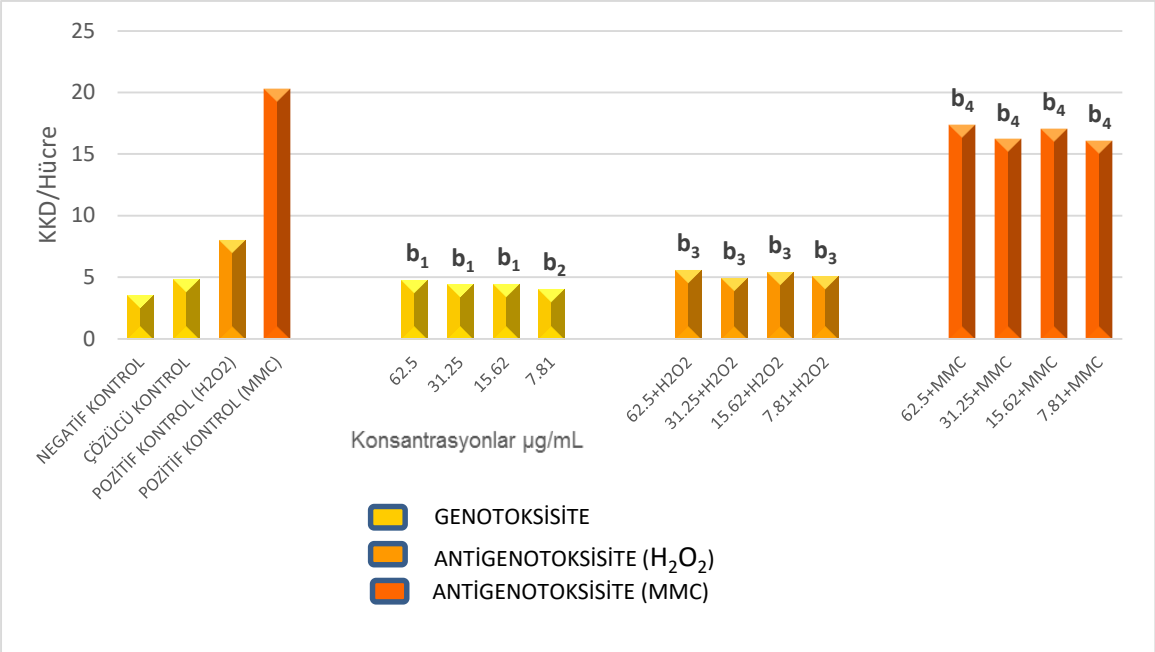
olarak gerçekleşmiştir. Tüm konsantrasyonlar içerisinde KKD frekansını en fazla azaltan konsantrasyonun 31,25 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Replikasyon indeksi açısından değerlendirildiğinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.6, Şekil 4.8 ve Resim 4.2).

Çizelge 4.6. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside + H_2O_2 48 saatlik eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde gözlenen KKD ve Rİ frekansları

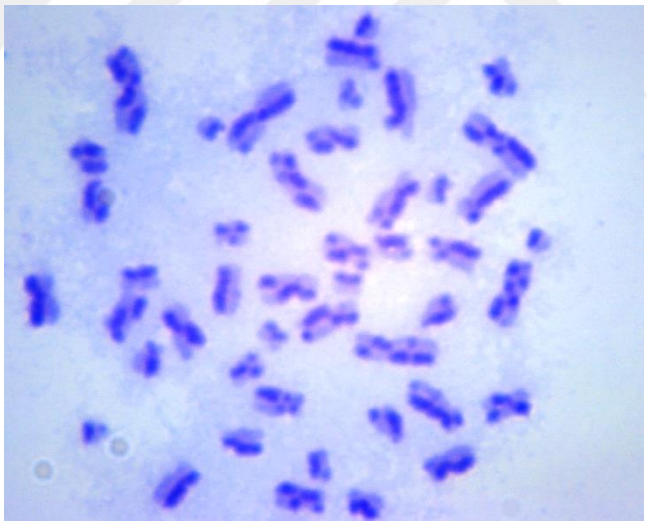
Uygulama grubu	Uygulama		Min-Max KKD	KKD/hücre ± SH	M1	M2	M3	Rİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)						
Kontrol	48	0,00	0-10	3.54±0.21	133	106	161	2.07±0.04
Çözücü (DMSO) Kontrol	48	%0,5	2-10	4.83 ±0.22	118	110	172	2.13±0.04
Pozitif (MMC) Kontrol	48	0,20	10-37	20.21±0.70 **b_1 b_2**	190	125	85	1.74±0.03
Pozitif (H_2O_2) Kontrol	48	100µM	6-18	8.04 ±0.25 **b_1 b_2**	128	146	126	1.91±0.04
Hyperoside	48	7,81	1-10	4.04± 0.21 **b_2**	126	111	163	2.09±0.04
		15,62	1-10	4.44± 0.20 **b_1**	143	103	154	2.02±0.04
		31,25	2-11	4.39±0.20 **b_1**	160	114	126	1.93±0.04
		62,50	1-10	4.75±0.22 **b_1**	118	134	148	2.07±0.04
Hyperoside+MMC	48	7,81	10-25	16.01±0.46**b_3**	190	135	75	1.77±0.03
		15,62	8-31	17.01±0.64**b_3**	182	169	49	1.66±0.03
		31,25	7-35	16.16±0.62 **b_3**	206	144	50	1.61±0.03
		62,50	9-36	17.37±0.64 **b_3**	198	150	52	1.60±0.03
	48	7,81	2-12	5.04±0.23 **b_4**	125	126	149	2.06±0.04
Hyperoside+H_2O_2		15,62	1-11	5.42±0.21 **b_4**	111	181	108	1.94±0.03
		31,25	2-10	4.95±0.24 **b_4**	129	163	108	1.92±0.03
		62,50	2-12	5.54±0.21 **b_4**	143	180	74	1.88±0.03

Not: Çözücü kontrol negatif kontrole göre anlamlı değildir.

b_1 Kontrole göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_2 Çözücü kontrole göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_3 Pozitif kontrole (MMC) göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı (t testi)
b_4 Pozitif kontrole (H_2O_2) göre $p<0,05$düzeyinde anlamlı(t testi)



Şekil 4.8. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2 ve Hyperoside+ MMC 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi



Resim 4.2. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H_2O_2 eş zamanlı uygulaması Sonucunda inşan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri

4.4. Mikronükleus Testi Sonuçları

Hyperosidenin tek başına uygulanarak genotoksisitesinin incelendiği kültürde tüm konsantrasyonlarda negatif kontrol ve çözücü kontrole göre mikronükleus oluşumunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Tüm konsantrasyonlar nükleer bölünme indeksi (NBİ) açısından değerlendirildiğinde de anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Hyperoside+MMC eş zamanlı muamelesi sonucunda elde edilen veriler pozitif kontrol (MMC) ile karşılaştırıldığında mikronükleus frekansı tüm konsantrasyonlarda belli bir azalma göstermiştir. Söz konusu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Nükleer bölünme indeksi üzerinde ise anlamlı bir etki tespit edilmemiştir.

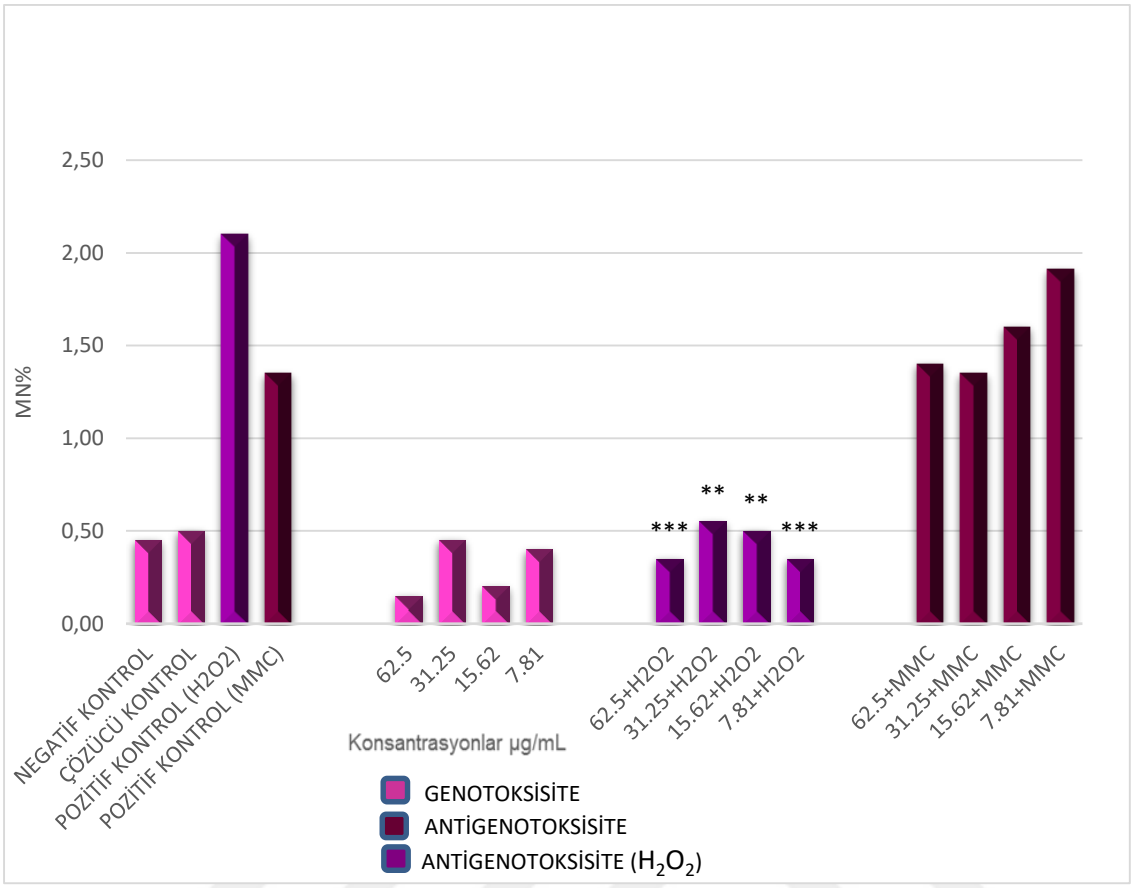
Hyperoside+ H_2O_2 eş zamanlı muamelesinde tüm konsantrasyonlar pozitif kontrole (H_2O_2) göre değerlendirilmiş ve mikronükleus frekansında konsantrasyona bağlı ($r= -0,68$) önemli azalmalar olduğu görülmüştür. Bu azalmalar 7,81 µg/mL ve 62,50 µg/mL konsantrasyonların da z testine göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı, 15,62 µg/mL ve 31,25 µg/mL konsantrasyonları ise z testine göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Nükleer bölünme indeksi üzerinde ise anlamlı bir etki tespit edilmemiştir. Sözü edilen bütün sonuçlar Çizelge 4.7, Şekil 4.9 ve Resim 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Hyperoside, MMC+Hyperoside ve H_2O_2+Hyperoside eş zamanlı uygulaması sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı ve nükleer bölünme indeksi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları		MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)		
Kontrol	48	0,00	2000	9	-	0,45±0,14	1,42±0.31
Çözücü Kontrol (DMSO)	48	%0,5	2000	10	-	0,50±0,15	1,29±0,35
PozitifKontrol (MMC)	48	0,20	2000	42	2	2,10±0,32 **+++c3**	1,40±0,37
PozitifKontrol (H_2O_2)	48	100µM	2000	27	1	1,35±0,25 **++c2**	1,52±0,37
Hyperoside	48	7,81	2000	8	-	0,40±0,14	1,28±0,35
		15,62	2000	4	-	0,20±0,90	1,26±0,35
		31,25	2000	9	-	0,45±0,14	1,25±0,35
		62,50	2000	3	-	0,15±0,08	1,39±0,37
MMC+Hyperoside	48	7,81	2000	38	1	1,91±0,30	1,27±0,35
		15,62	2000	32	-	1,60±0,28	1,26±0,35
		31,25	2000	27	-	1,35±0,25	1,32±0,36
		62,50	2000	28	-	1,40±0,26	1,28±0,35
H_2O_2+Hyperoside	48	7,81	2000	7	-	0,35±0,13 **a3**	1,31±0,35
		15,62	2000	10	-	0,50±0,15 **a2**	1,36±0,36
		31,25	2000	11	-	0,55±0,16 **a2**	1,31±0,35
		62,50	2000	7	-	0,35±0,13 **a3**	1,30±0,35

Not: Çözücü kontrol negatif kontrole göre anlamlı değildir.

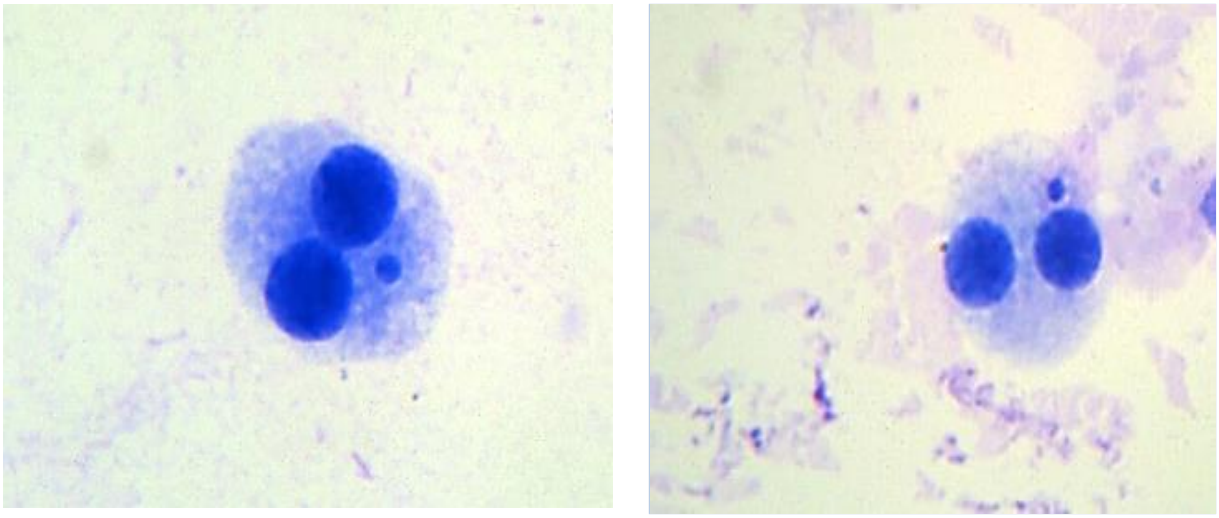
* Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi) ** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi) *** Pozitif Kontrole (MMC) göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)	**a** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **a2** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **a3** Pozitif Kontrole (H_2O_2) göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)
+ Negatif kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) ++ Negatif kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) +++ Negatif kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)	**c** Çözücü kontrole göre P< 0,05düzeyinde anlamlı (z testi) **c2** Çözücü kontrole göre P< 0,01düzeyinde anlamlı (z testi) **c3** Çözücü kontrole göre P< 0,001düzeyinde anlamlı (z testi)



**Pozitif Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Pozitif Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.9. Hyperoside, Hyperoside+ H_2O_2ve Hyperoside+ MMC eş zamanlı muamelesi sonucunda insan periferal lenfositlerinde mikronükleus frekansı



Resim 4.3. Hyperoside, Hyperoside+MMC ve Hyperoside+ H_2O_2 eş zamanlı uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde gözlenen mikronukleuslar

Tüm genotoksisite çalışmalarımızın sonuçları aşağıda verilen Çizelge 4.8'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Genotoksisite test sonuçları

	Hyperoside	***Anormal hücre yüzdesi***	***KA/Hücre***	***Kardeş kromatid değişimi***	***Mitotik indeks***	***Mikronukleus***
24 saat	*7,81*			↑		
	15,62			↑ ↑	↑	
	31,25			↑ ↑		
	62,50			↑	↑	
48 saat	*7,81*			↑	↑	
	15,62			↑		
	31,25			↑		

↑ Çözücü kontrole göre artış ↑ Negatif kontrole göre artış

Antigenotoksisite incelemesi için yapılan tüm testlerin sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Antigenotoksisite test sonuçları



5. TARTIŞMA

Kanserle savaş neredeyse yarım yüzyıldan fazladır devam etmektedir. Kanseri önlemede ve tedavide büyük ilerlemeler olsa da halen birçok şekli tedavi edilemez olup ölümle sonuçlanmaktadır. Bu konuda büyük bir proje olan Kanser Genom Atlası projesi başlatılmış ve kanser başlangıcı ve ilerlemesinin altında yatan mekanizmaların belirlenmesine katkı sağlamıştır [180,181]. Bu projenin temel hedefi; farklı tümör tiplerine aracılık eden yüzlerce klinik örneklerde DNA, RNA, protein ve epigenetik mekanizmalarında meydana gelen bozuklukların moleküler profilini çıkartmak, yorumlamak ve analizlerini yapmaktır. Tümör tiplerine yönelik ne kadar çok veri olursa kanserde meydana gelen moleküler değişimlerin keşfedilmesi daha olası hale gelebilecektir. Bu zengin veri ve her geçen gün daha da artan bilgiler, klinikte kullanılabilecek bireye ve tümöre özgü tedavilerin oluşturulması için bir umut ışığı olmaktadır [182,183].

Karsinogez oluşumunun ilk aşaması normal bir hücrenin genetik kararlılığını sağlamada işlev gören genlerde meydana gelen mutasyonlar olarak açıklanabilir. Bunun sonucunda bir genetik kararsızlık meydana gelir. DNA sentezinde düzeltilmemiş hatalar, bu hücrelerin normal olarak hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi süreçleri kontrol eden mekanizmalardan kaçmasına izin veren mutasyonlara neden olabilmektedir. Kanser hücrelerinin birden fazla mutasyon içerdiği gerçeği, ışık mikroskobu altında incelenen tümör hücrelerinde gözlenen çok sayıda kromozomal anormallikler ile de desteklenmiştir. Sayısal kromozom anormalliklerinden olan anöploidi, birçok kanser tipinde en sık görülen anormalliklerden biridir. Kanser hücrelerinde sıkça rastlanan bir diğer anormallik çeşidi de translokasyon ve delesyonlardır. Translokasyonlar ve delesyonlar, DNA'daki çift zincirli kırıklarının tamiri sırasında veya hasarlı DNA içeren erken mitozun bir sonucu olarak meydana gelebilir. Bu durum kontrol noktalarının başarısız olduğunu gösterir. Birçok kanser türü ardışık olarak gerçekleşen kromozamal anormallikler sonucu ortaya çıkmaktadır [184,185].

Ökaryotik hücrelerin genomu, birçok DNA hasarına yol açan ajanlara (endojen ve ekzojen) sürekli maruz kalmaktadır. Hücre bu hasarların zararlı sonuçlarından kaçınmak için, her biri belirli hasarlara spesifik birden fazla DNA onarım yolu geliştirmiştir. DNA hasarının ekzojen kaynakları arasında ultraviyole ışık, iyonlaştırıcı radyasyon, kimyasallar, toksinler

ve kirleticiler gibi çevresel ajanlar bulunur. DNA hasarına neden olan endojen ajanların ana kaynağı ise normal hücresel metabolizmadan üretilen reaktif oksijen türleridir (ROT) [186,187].

DNA hasarına yol açan ekzojen ajanlardan en fazla hasara neden olanlardan biri de kimyasal ajanlardır. Kimyasal ajanların pek çok çeşidi olup birbirinden farklı mekanizmlar gösterirler. Kimyasal ajanlar genel olarak 3 ana gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; baz anologları (5 broma deoxiuridin, 2 Amino-purine vb.), alkilleyici ajanlar (etil metane sulfonate, metil metane sulfonate, mitomisin-c vb.) ve interkalasyon ajanlardır (Hidroksilamin, nitröz asit). Alkilasyon, bir alkil grubunun (C_nH_{2n+1}) DNA'ya bağlanmasıdır. Oluşturdukları bu etkileşim ile DNA yapısına ve fonksiyonunun etkilenmesine, DNA onarım enzimlerinin inaktivasyonu ve hücre zarı hasarı ile hücre ölümüne neden olabilmektedir. Bu özelliği ile akilleyici ajanlar kanser tedavisinde nükleik asitler, proteinler, amino asitler ve nükleotitler gibi çeşitli duyarlı biyomoleküllere geri döndürülemez şekilde bağlanabilme ve sonucunda hücre ölümüne neden olma özelliği ile antineoplastik ajanlar olarak kullanılmaktadır [13,186,187].

DNA'da hasara sebep olduğu bilinen serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren herhangi bir atom veya moleküldür. ROT, canlı organizmalarda hücresel metabolizmanın yan ürünleri şeklinde sürekli olarak veya hücrelerin çevresel birçok ajana (sigara, UV ışınları vb.) maruziyeti sonucu üretilirler. ROT'lar, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle rastgele reaksiyona girerek hücrede oksidatif strese ve hasara neden olmaktadırlar. Vücudun her hücresinde meydana gelen yoğun günlük DNA hasarının önemli bir kısmına ROT'inden meydana gelmektedir [35,186]. Son çalışmalardan elde edilen bulgular, kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha fazla ROT üretimi olduğunu göstermektedir. ROT'nin neden olduğu biyokimyasal ve moleküler değişikliklerin heterojen bir kanser hücresi populasyonunun gelişmesi, hastalığın ilerlemesi, büyümesi ve metastazına katkı sağladığı açıklanmıştır. Ayrıca tedavi sırasında ilaca karşı dirençli hücrelerin ortaya çıkmasına da neden olabileceği bildirilmiştir. Kanserin başlama aşamasında, ROT kaynaklı DNA mutasyonları kanserli dokularda tamir edilmez ise birikebilirler. Böylece aşırı ROT üretimi, potansiyel olarak kanserin başlamasına katkıda bulunan DNA'nın onkojenik mutasyonuna yol açabilmektedir. Kanser hücrelerinde ROT kaynaklı oksitatif stres, hücre büyüme sinyalini tetikleyerek, tedavilere karşı tümör direncini ve tümörlere kan akışını artırarak metastazı

teşvik edebilmektedir. Ayrıca ROT, apoptoz, hücre proliferasyonu ve transkripsiyon faktörleri ile ilgili genleri modifiye ederek kanserli hücrelerin çoğalmasına yardımcı olabilmektedir [188-190].

ROT'nin zararlı etkilerinden korunmak için devreye giren ilk savunma mekanizması, oksidanları daha az reaktif türlere dönüştüren antioksidanlardır. Antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile serbest radikallerin saldırılarını durdurma yeteneğine sahiptirler. Antioksidanlar vücut içerisinde endojen olarak bulunabilirler veya dışarıdan ekzojen olarak alınabilirler. Keşiflerinden bu yana antioksidanlar birçok araştırmada ana konu olarak yerini almıştır. Bilimsel litaratürdeki kanser çalışmaları antioksidanların iki farklı önemli rolünü ortaya koymuştur. Bunlardan ilki antioksidanların bir tedavi stratejisi olarak kullanılması ikincisi ise kanserli hücrelerdeki ROT üretiminin baskılanması ile karsinogenezin ilerlemesinin önlenmesidir. Birçok antioksidanın ekzojen mutejenler (sigara UV radyasyon vb.) ve endojen mutajenlerin (ROT, RNT vb.) oluşturduğu oksitatif hasara karşı süpürücü olarak işlev gösterdiği ortaya konmuştur. Bu özellikleri ile antioksidanlar birçok kanserin önlenmesi ve ilerlemesinin engellenmesini sağlamışladır. *In vitro* çalışmalar, antioksidanların normal hücreleri korurken apoptoz ile tümör hücrelerini ölümüne neden olduğunu göstermektedir [191-194].

Endojen antioksidanlar, serbest radikallerin ortadan kaldırılması için son derece önemli olmalarına rağmen, yeterli değildirler. Bununla beraber artan mutajenler ve yetersiz kalan endojen antioksidanlar insanları ekzojen antioksidan alımına yönlendirmiştir. Bu ekzojen antioksidanlar, meyve ve sebzelerinin ana kaynakları olan fenolik asitler, flavonoidler, vitaminler, karotenoidler ve minerallerdir [195].

Epidemiyolojik çalışmalar sebze ve meyvelerin tüketimi ile birçok kanser tipi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bitkilerin ikincil metabolitleri olan flavonoidler, serbest radikal süpürücüler olarak etki göstermektedirler. Bu nedenle flavonoidler, doğal antioksidanlar olarak kabul edilmektedir [196]. Flavonoidler, DNA'yı oksidatif hasardan korumak, karsinojen aktivasyonunu inhibe etmek ve kanserojen detoksifikasyon sistemlerini aktive etmek de dahil olmak üzere, malign tümörlerin gelişimine yol açan bir çok mekanizmaya müdahale edebilmektedirler [197-199].

Çevremizdeki çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genetik metaryal üzerindeki mutajenik etkilerinin tespitinde genotoksisite testleri kullanılmaktadır. Genotoksinler kromozomal materyalin hasar görmesine neden olan ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Genotoksisite testleri, genetik materyale çeşitli mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak zarar verebilecek herhangi bir madde veya bileşiği tanımlamak için tasarlanmış çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testler olarak tanımlanmıştır. Genotoksisite testlerinde sıklıkla insan periferal kan lenfositleri kullanılmaktadır. İnsan periferal kan lenfositleri; kolay elde edilebilir olmaları, küçük miktarlarından fazlaca hücre elde edilebilir olması, kan hücreleri olması sebebi ile dolaşım sayesinde tüm vücudu temsil edebilmeleri ve anlık gerçekleşen anomalileri düşük oranda bulundurmaları gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Dolaşımdaki lenfositlerde meydana gelen kromozom anormalliklerinin sıklığı, birçok araştırmacı tarafından mutajenlerin toksik etkisinin belirlenmesinde güvenilir bir gösterge olarak kabul edilir. Bu testler, bileşiklerin genotoksisite ve karsinogeneze neden olma potansiyelinin tahmin edilmesinde önemli bir rol oynar. Bu test sistemleri ile kimyasal bir bileşiğin DNA'da oluşturduğu hasar miktarına göre genotoksik veya başka bir ajan tarafından oluşturulan hasara karşı koyucu ve önleyici etkisine göre antigenotoksik özellikleri belirlenmektedir [152,200].

Bu çalışmada birçok bitki sınıfında bulunan özellikle de alıç bitkisinin ana flavonoidi olarak yüksek antioksidan etkiye sahip olan hyperosidenin genotoksik ve aynı zamanda iki farklı mutajene (MMC, H_2O_2) karşı antigenotoksik etkileri incelenmiştir. Mitomisin C (MMC), *Streptomyces caespitosus'*tan elde edilen antitümör kinolon ailesine ait bir antibiyotikdir. MMC alkilleyici ajan olarak sınıflandırılır ve karbonyum iyonu ara maddelerinin oluşumu nedeniyle elektrofilik özellik göstermektedir. DNA moleküllerinin adenin ve guanin nükleik asitleri arasında çapraz bağların oluşmasına neden olur, böylece DNA sentezini bloke eder. Bu da hücre döngüsünün durmasına neden olur. DNA alkilasyonu hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında olabilir, ancak özellikle geç G_1 fazı ve S fazında görülme oranı oldukça yüksektir. Bu nedenle MMC, bir genotoksik antibiyotik olarak çalışır ve yüksek konsantrasyonlarda, hücresel RNA ve protein sentezlerini baskılamaktadır [201,202].

Hidrojen peroksit ROT kaynaklarında olmasına rağmen yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmamaktadır. Fakat çözeltilerde kolayca çözünüp, biyolojik membranlara geçebilme yeteneği ile önemli radikaller arasında yer almaktadır. Hidrojen peroksitin iki farklı etki

mekanizması vardır bunlar direkt ve indirekt etkileridir. Oksidasyon özelliği, proteinden demir iyonu çıkararak yapısını bozmak, enzimleri inaktive etmek, DNA, lipid ve ketoasitleri okside etmek gibi özellikleri direkt aktivitesinin etkileridir. İndirekt aktvitesine ise geçiş metallerin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan OH'ın serbest radikal üretimine katkı sağlaması örnek gösterilebilir [31,203].

Bu tez çalışmasında kromozomal anormallik testi, kardeş kromatid değişim testi ve mikronukleus testi olmak üzere sıklıkla tercih edilen üç genotoksisite testi kullanılmıştır. Kromozomal anormallik ve mikronukleus testleri OECD kılavuzlarında standartları belirlenmiş ve genotoksisite değerlendirilmelerinde kullanılması önerilen testlerdir. Kardeş kromatid değişimi testi ise OECD kılavuzundan çıkarılmış olmasına rağmen diğer genotoksisite testlerinin sonuçlarını desteklemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir testtir. Kromozomal anormallikler yapısal ve sayısal olmak üzere iki şekilde görülmektedir. Yapısal anormallikler kromatid ya da kromozomda oluşan çift veya tek zincir kırıklarından meydana gelmektedir. Dolaşımdaki lenfositler, mitozun G0 veya G1 fazındadır. Bu aşamada bazı mutajenik etkilere maruz kaldığında, kromozomlar henüz iki kromatitli olmadıklarından hasar tüm kromozomda meydana gelmektedir. Bununla birlikte lenfositler bu ajanlara, hücre döngüsünün S veya G2 aşamalarındayken maruz kalır ise, iki kardeş kromatid birbirinden ayrılmış olarak bulunduğundan hasar tek bir kromatinde meydana gelmiş olur [173,204,205]. Hem yapısal anormallikler hem de sayısal anormallikler insan sağlığı ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle karsinogenezin başlamasına, ilerlemesine ve metastaz aşamasına büyük katkı sağlamaktadırlar [206].

Kromozomal anormallik testi sonuçlarına göre, hyperosidenin tek başına uygulandığı 24 ve 48 saatlik muamele gruplarında negatif ve çözücü kontrollere kıyasla anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısında bir artış gözlenmemiştir. Diğer yandan hyperoside+MMC 24 saatlik uygulamasında tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol (MMC) ile karşılaştırılmış ve en yüksek iki konsantrasyonda (31,25 µg/mL ve 62,50 µg/mL) anormal hücre sayısında ve hücre başına düşen anormallik sayısında anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Hyperoside+MMC 48 saatlik uygulamasında ise tüm konsantrasyonlar anormal hücre sayısı ve hücre başına düşen anormallikte anlamlı bir düşüş sağlamıştır. Hyperosidenin bir diğer mutajen olan hidrojen peroksitin genotoksik etkisine karşı sergilediği antigenotoksik potansiyel de incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen Hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı uygulamasında 24 saatlik uygulamada en düşük

konsantrasyon (7,81 µg/mL) dışındaki tüm konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda hem anormal hücre sayısında hem de hücre başına düşen anormallik sayısında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Her iki antigenotoksisite çalışmasında da en etkili konsantrasyonun 31,25 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak hyperoside tek başına uygulandığı hiçbir uygulama grubunda genotoksik etki göstermemiş ve çoğu konsantrasyonunda mutajenlere karşı koruyucu etki sergilemiştir. Kromozomal anormallik oluşumundaki artış kanser biyobelirteci olarak değerlendirildiği için hyperosidenin *in vitro* koşullarda sergilediği antigenotoksik potansiyel önemli bir kemoprevensiyon ajanı olabileceğini düşündürmektedir.

Literatür araştırmasında hyperosidenin kromozomal anormallik testi ile incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Fakat hyperosidenin (quercetin 3-galactoside) galaktoz konjuge formu olan quercetinin ve aynı flavonoid grubunda yer olan flavonolların kromozomal anormallik testi ile değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır.

Periasamy ve arkadaşları (2016) insan periferal lenfositlerinde okratoksin A'nın neden olduğu toksisiteye karşı quercetinin koruyucu etkisini kromozomal anormallik testi ile değerlendirmişlerdir. Sağlıklı donörlerden elde ettikleri periferal lenfositlerin 24 saat 10 µM quercetin ile ön muamelesinin ardından 24 saat 20 µM okratoksin A ile muamele etmişlerdir. Quercetinin bu çalışma sonucunda genotoksik olmadığı ve okratoksin A'nın neden olduğu kromozomal aberasyonu ve DNA hasarını azalttığı açıklanmıştır. Ayrıca okratoksin A kaynaklı oksidatif strese karşı serbest radikal temizleme aktivitesi ile antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir [207].

2017 yılında Mondal ve arkadaşları insan periferal kan lenfositlerinde hidrojen peroksitin indüklediği hasara karşı quercetinin koruyucu etkisini kromozomal anormallik testi ile incelemişlerdir. Kültüre edilmiş lenfositler 1 saat boyunca 10, 20, 30, 40 ve 50 µM quercetin konsantrasyonları ile ardından 2 saat boyunca 100 µM H_2O_2 ile muamele edilmiştir. Hidrojen peroksit ile muamele ardından hücreler tuz çözeltisi ile yıkanmış ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüm konsantrasyonlar H_2O_2 ile oluşan hasara karşı bir koruma sağlamış en fazla koruma 40 µM konsantrasyonunda gözlenmiştir. Araştırmacılar quercetinin oksitatif stres kaynaklı DNA hasarında koruma sağladığını ortaya koymuşlardır [208].

Bir başka çalışmada araştırmacılar (2019) kromozom anormallik testi ile *in vitro* lenfositlerde iyonlaştırıcı radyasyona karşı quercetinin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Sağlıklı donörlerden elde edilen periferik kan lenfositleri 2,5; 3,5 ve 4,5 Gy dozlarında ışınlanmış ardından kültürlere 37,5 ve 75 µM quercetin eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. Quercetin ile muamele edilmiş uygulama grubu pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anormal hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar quercetin flavonoidinin iyonlaştırıcı radyosyona karşı *in vitro* olarak koruyucu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Radyasyonun etkisinin, G2 / M'de hücre döngüsü durması ile ilişkili olabileceğini ve sonuç olarak hücre çoğalmasını ve metafazların oluşumunu engelleyebileceğini, quercetinin hücre döngüsü kontrol noktalarında hasarlı hücreleri seçen apoptotik süreçleri etkileyerek koruma sağlayabileceği düşüncesine ulaşmışlardır [209]

2012 yılında yapılan bir çalışmada quercetinin *in vivo* fare kemik iliği hücrelerinde genotoksisitesi ve metotreksatın indüklediği toksisiteye karşı antigenotoksisitesi kromozomal anormallik testi ile incelenmiştir. Quercetin farelere 10 gün boyunca 24 saatte bir oral yoldan 50 mg/kg/gün olarak verilmiştir. Ayrıca antigenotoksisite değerlendirmesi için 10 gün boyunca 24 saatte bir oral yoldan 50 mg/kg/gün quercetin verilmiş ve sadece 7, 8, ve 9'uncu günlerde metotreksat kas içine enjekte edilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar quercetinin genotoksik olmadığı aksine metotreksatın oluşturduğu toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir [210].

In vivo koşullarda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada quercetinin fare kemik iliği hücrelerinde 2-butoksietanol kaynaklı hasara karşı koruyucu etkisi kromozomal anormallik testi ile incelenmiştir. Toplam 120 fare kullanılarak 10 farklı uygulama grubu oluşturulmuştur. İlk iki grup negatif kontrol grubu olup farelere 7 gün ve 14 gün boyunca su verilmiştir. Ardından gelen iki gruba ise quercetinin çözücüsü olan mısır yağı 7 ve 14 gün boyunca 0,1 mL'lik dozda verilmiş ve çözücü kontrol grubunu oluşturmuşlardır. Çalışmadaki 5. ve 6. uygulama grubuna ise 7 ve 14 gün boyunca 0,1 mL'lik quercetin verilmiştir. Pozitif kontrol grubu olan 2-butoksietanol 7 gün boyunca 450 µL/kg/gün ve 14 gün boyunca 900 µL/kg/gün olarak uygulanmıştır. Quercetinin koruyuculuğunun incelendiği gruplar ise şu şekilde seçilmiştir. Farelere 7 gün boyunca 0,1 mL quercetin uygulanmış ardından 7 gün boyunca 450 µL/kg/gün 2-butoksietanol uygulanmıştır. Farelere 7 gün boyunca 0,1 mL quercetin uygulanmış ardından 7 gün boyunca 450 µL/kg/gün 2-butoksietanol ile beraber 0,1 mL quercetin uygulamasına devam edilmiştir. Farelere 7 gün boyunca 0,1 mL quercetin uygulanmış ardından 7 gün boyunca 900

µL/kg/gün 2-butoksietanol uygulanmıştır. Farelere 7 gün boyunca 0,1 mL quercetin uygulanmış ardından 7 gün boyunca 900 µL/kg/gün 2-butoksietanol ile beraber 0,1 mL quercetin uygulamasına devam edilmiştir. Çalışma sonucunda quercetinin, anormal hücrelerin yüzdesini azaltarak 2-butoksietanolun etkisine karşı hücreleri koruduğu gözlenmiştir. En yüksek koruma seviyesi 14 gün uygulama grubunda gözlenmiştir. 2-butoksietanol serbest radikal oluşumuna katkı sağlamaktadır. Araştırmacılar quercetinin 2-butoksietanolun oluşturduğu serbest radikallare karşı yüksek bir koruma sağladığını bildirmişleridir [211].

Hücre siklusu süreleri aynı cins hücrelere ait populasyondaki bütün hücrelerde birçok değişik ve karmaşık faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bir hücre populasyonundaki hücrelerin siklusları ile ilgili kantitatif değerler elde edilmesi için çeşitli parametreler incelenmektedir. Bunlardan birisi de, mitoz bölünme yapan hücrelerin sayısının ve bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanmasını sağlayan mitotik indeks parametresidir. Mitotik aktivite, organizma gelişiminin ve büyümesinin temelidir. Mitotik indeks incelemesinde genellikle kromozom morfolojilerinin ve bantlanmalarının ideal olması sebebi ile insan periferal kan hücreleri tercih edilir. Lenfositler sağlıklı bir insanın kanında çok az oranda spontan mitoz gerçekleştirmektedir ve hücre döngüsünün G0 evresinde durmaktadır. Bu yüzden kromozom çalışmaları için lenfositler suni olarak mitoza sokulmaktadır. Böylece insan lenfositleri mitojenler ile muamele edildiğinde, hücrelerde DNA sentezi başlar. Mitoz bölünmede ve hücre sayısındaki değişiklikler de mitojenin etkisinin görülmesine imkan sağlamaktadır [212].

Kanser hücrelerinde mitotik indeks, mitotik ilerlemeyi engelleyebilen veya indükleyebilen bileşikleri incelemek için kullanılır. Özellikle kanser hastalarında hem genel sağ kalımı hem de tedaviye yanıtın incelenmesinde önemli bir prognostik faktördür. Mitotik indeksin azalmasının hücre döngüsünün G_2 safhasının çeşitli sebepler ile engellenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mitotik indeksteki azalmaya paralel olarak büyüme ve gelişme olayları da yavaşlar. Bu özellikleri ile mitotik indeks, ajanların hücreler üzerindeki etki mekanizmaları hakkında fikir verebilmektedir [213,214].

Bu tez çalışmasında mitotik indeks değerleri hyperosidenin tek başına 24 ve 48 saatlik uygulamasında çözücü kontrole göre anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. 24 saatlik uygulamada 15,62 µg/mL ve 62,50 µg/mL, 48 saatlik uygulamada ise 7,81 µg/mL

konsantrasyonları negatif kontrole göre mitotik indekste anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Antigenotoksisite değerlendirmesinde 24 saatlik uygulama oldukça etkili olmuş ve hem mitomisin-C'nin hem de hidrojen peroksitin azalttığı mitotik bölünmeyi anlamlı düzeyde artırmıştır. Bununla birlikte aynı güçlü etki 48 saatlik uygulamada gözlenmemiştir. 48 saatlik uygulamada hyperoside her iki mutajene karşı mitotik indekste anlamlı bir düzelme sağlayamamıştır. Mitotik indeks değerleri hücre bölünme frekansını ve hücrenin büyüme gelişme oranı gibi parametreleri göstermektedir. Sonuç olarak muamele süresinin mitotik aktivite üzerinde önemli bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

2006 yılında araştırmacılar quercetinin insan glioblastoma (U138MG) hücre hattında antipoliferatif etkisini incelemişlerdir. Çalışmada hücre hatları 24, 48 ve 72 saat boyunca her test için ayrı konsantrasyonlarda quercetin (%0,5 DMSO içerisinde çözülmüş) ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı (MTT testi), (quercetin 10, 30, 50 veya 100 μmol / L) hücre döngüsü analizi (quercetin 100 mmol / L) ve mitotik indeks (quercetin 100 μmol/L) değerleri incelenmiştir. Quercetin tüm muamele süreleri ve dozlarında hücre canlılığını azaltmıştır. Hücre döngüsü analizinde ise quercetinin G2 / M fazlarını zamana bağlı bir şekilde indüklediğini gözlemlemişlerdir. Quercetinin uygulandığı grupların kontrol hücrelerine kıyasla mitotik indeksi yaklaşık olarak %57 oranında azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar quercetinin, bu etkisini hücre döngüsünün G2 fazında durdurduğunu ve sonuç olarak mitotik indeksteki azalmayı indüklediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar quercetin'in anafazdaki kontrol noktalarında değil, G2 kontrol noktalarında hücre ilerlemesini bloke ettiğini göstermektedir [215].

Şekeroğlu ve arkadaşları (2011) quercetinin bir alkilleyici ajan olan siklofosfamide karşı koruyucu etkisini fare kemik iliğinde *in vivo* olarak incelemişlerdir. Quercetin 50 mg/kg/gün 10 gün boyunca oral yoldan uygulanmış ardından 8. ve 9. günlerde siklofosfamid 40 mg/kg/gün introperitonal yoldan uygulanmıştır. Mitotik indeks incelendiğinde siklofosfamidin neden olduğu azalmayı quercetinin arttırdığını bildirmişlerdir. Quercetinin bu özelliği ile kemopreventif maddeler arasında değerlendirilebileceğini açıklamışlardır [216].

Genotoksisite çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir diğer test de kardeş kromatid değişimi testidir. Kardeş kromatid değişimi testi, kimyasal ve fiziksel ajanların neden olduğu birincil toksik etkileri değerlendirmek için hızlı ve etkili bir test yöntemidir. KKD,

metafazda kromozomlarının kardeş kromatidleri arasındaki DNA segmentlerinin simetrik değişimlerini temsil eder. Hücrenin replikasyon sırasında S fazında fiziksel ve kimyasal herhangi bir genotoksik maddeye maruziyeti KKD oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Kırılan bölgenin, kardeş kromatidlerin özdeş lokusları ile onarılması KKD oluşumu ile kanser arasındaki bağlantıyı zayıflatmaktadır [167,217]. Alkileyici ajanlar (MMC vb.) DNA çift zincir ipliklerinin gerektiği gibi bağlanmasını önleyerek çapraz bağlara neden olurlar. Bu çapraz bağlanmalar DNA tamir sisteminde homolog kromozom onarım sistemi ile tamir edilmektedir. KKD testinin prensibi, BrdU'nun eklenmesi ile DNA'da meydana gelen homolog kromozom değişimlerini tespit etmektir. Bu nedenle DNA çapraz bağları oluşturan ajanların (MMC gibi) güçlü KKD indükleyici oldukları ortaya konmuştur [218,219].

Bu tez çalışmasında hyperosidenin 24 saatlik tek başına uygulanması ile 15,62 µg/mL ve 31,25 µg/mL'lik konsantrasyonlar çözücü kontrole göre KKD oranında anlamlı azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte tüm konsatrasyonlar negatif kontrole göre KKD frekansında artışa neden olmuştur. 48 saatlik muamelede ise en düşük konsantrasyon olan 7,81µg/mL çözücü kontrole göre KKD oranında azalmaya sebep olurken diğer üç konsantrasyon ise (15,62, 31,25 ve 62,50 µg/mL) negatif kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur. Antigenotoksisitenin değerlendirildiği 24 saatlik hyperoside+MMC eş zamanlı uygulamasında sadece en düşük konsantrasyon olan 7,81 µg/mL, KKD oluşumunda pozitif kontrole göre anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. 48 saatlik uygulama gruplarındaki tüm konsantrasyonların KKD oluşumunu pozitif kontrollerine göre azalttığı tespit edilmiştir. Hiçbir uygulama grubunda replikasyon indeklerinde anlamlı değişiklik bulunmamıştır. Bir diğer mutajen olan hidrojen peroksitin genotoksik etkisine karşı hyperosidenin antigenotoksik potansiyeli de KKD testi ile değerlendirilmiştir. Hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı 24 ve 48 saatlik uygulamasında tüm konsantrasyonlar KKD oluşumunda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Replikasyon indeksinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuç olarak hyperoside kardeş kromatit değişimi oranında azalmaya sebep olarak alkilleyici ajanın ve oksitatif stresin oluşturuduğu hasarına karşı koruyucu etki sergilemiştir.

Hyperosidenin genotoksik/antigenotoksik etkilerinin KKD testi ile incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak hyperosidenin yapısal türevlerinin ve hyperosidenin ana

flovonoid olarak yer aldığı bitki özütlerinin KKD testi ile değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur.

Araştırmacılar *in vitro* insan periferal lenfositlerinde alıç meyve özütlerinin, berilyum klorürün genotoksik etkilerine karşı koruyucu etkisini KKD testi ile incelemişlerdir. Kültüre edilmiş lenfositler 48 saat boyunca berilyum klorür (120 mg/L) ile muamele edilmiş ardından alıç özütleri üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 mg/L) eklenmiştir. Kültürler 72. saatte sonlandırılmıştır. Tüm konsantrasyonların KKD/hücre oranında bir düşüş sağladığı görülmüştür. Araştırmacılar alıç özütlerinin berilyum klorür kaynaklı KKD oluşumunu azaltabileceğini bildirmişlerdir [220].

2017 yılında Erikel ve arkadaşları luteolin flovonoidinin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkisini kardeş kromatid değişimi testi ile incelemişlerdir. Lenfositleri, çeşitli konsantrasyonlarda luteolin (0,39; 0,78; 1,56; 3,12 ve 6,25 µg/mL) ile tek başına ve eş zamanlı olarak MMC (0.20 µg/mL) ile 24 ve 48 saat süreyle inkübe etmişlerdir. Luteolinin tek başına negatif ve çözücü kontrollerine kıyasla tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde (24 saat ve 48 saat) KKD/hücre sayısını artırmadığını açıklamışlardır. Ayrıca luteolin ve MMC'nin eşzamanlı uygulamasının, pozitif kontrole kıyasla her iki uygulama periyodunda da en yüksek üç konsantrasyonda (1,56; 3,25 ve 6,25 µg/mL) KKD/hücre sayısını azaltarak antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Luteolinin göstermiş olduğu bu etkiyi flavonoidin yapısal özelliklerinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir [221].

Araştırmacılar (2015) quercetin ve sentetik glikozitlerinin (izoquersetin, maltooligosil izoquersetin, rutin, monoglucosyl rutin ve maltooligosil rutin) KKD testi ile CHO (Çin hamster yumurtalık) hücrelerinde genotoksisitesini incelemişlerdir. Konsantrasyonlar tümünde 10^{-1}, 10^{0}, $10^{1}10^{-1}$, 10^{2} ve 10^{3} µM olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak rutinin 10 µM ve monoglucosyl rutinin 1mM konsantrasyonları dışındaki tüm uygulamalar KKD frekansını arttırmamıştır. Araştırmacılar flavonoidlerin neden olduğu KKD frekansına göre şu şekilde sıralamışlardır; quercetin > isoquercetin, maltooligosyl isoquercetin, rutin > monoglucosyl rutin > maltooligosyl rutin. Sonuçlar doğrultusunda araştırmacılar doğal flavonoidlerin, sentetik flavonoidlerden daha fazla sitotoksik ve genotoksik etki sergilediğini göstermiştir. Sitogenetik etkilerin her flavonoidin glikosilasyon seviyesi ile yakından ilgili olduğu ve sentetik flavonoidlerin glikoz konjugasyonu

yoluyla artan hidrofilikliğin hücre içine emilimini engellediği ve biyoyararlanımı azaltabildiğini böylece sitotoksik ve genotoksik etkileri azalttığını bildirmişlerdir [222].

2020 yılında araştırmacılar Türkiye'de bulunan *Crataegus monogyna subsp. Monogyna* (alıç) türünün insan lenfositlerinde KKD testi ile aflatoksin B_1'e karşı angenotoksisitesini incelemişlerdir. Alıç konsantrasyonları 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL olarak kullanılmış ve bunlara eş zamanlı olarak aflatoksin B_1 (5 µg/mL) eklenmiştir. Alıç ekstratları farklı çözücüler kullanılarak (etanol, metanol, aseton ve su) kültürlere eklenmiştir. Her çözücünün antigenotoksisite üzerine etkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak 40-80 µg/mL alıç dozları diğer dozlardan daha etkili bir koruma sağlamıştır. Çözücüler arasında ise aseton ve metanol ekstraktları, diğer ekstraktlardan daha iyi bir sonuç vermiştir. Araştırmacılar bu antigenotoksik etkiyi alıcın antioksidan makanizmaları ile sağlayabileceğini bildirmişlerdir [223].

Bir başka çalışmada (2007) araştırmacılar kırmızı ve beyaz üzüm meyvelerinin sulu ve metanol ekstratlarının ve bunların içerisinde bulunan polifenollerin (caffeic acid, ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, catechin, epicatechin, quercetin, rutin hydrate, ve *trans*-resveratrol) MMC'nin indüklediği hasara karşı koruyucu etkisini insan periferal kan lenfositlerinde KKD testi ile incelemişlerdir. Periferal lenfositler kültüre edildikten sonra 24. saatte 20 µg/mL MMC ardından üzüm sulu ekstraktları 75, 150 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında, metanol ekstratları 5, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında, bitki polifenolleri 100 µg/mL konsantrasyonda ayrı ayrı eklenmiştir. 72. saatte kültür sonlandırılmıştır. Sonuçta sulu ekstratlar antigenotoksik etki gösterirken metanol ekstratlar KKD oluşumunda bir değişikliğe neden olmamıştır. Bitki polifenollerinden ise sadece quercetin antigenotoksik etki göstermiştir. Araştırmacılar sulu ekstratların antioksidan etki mekanizması ile serbest radikal süpürücü olarak antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Quercetinin ise metal-şelatlayıcı özelliği ile DNA zincir kırıklarını inhibe ettiği bildirilmiştir [224].

Genotoksik etkilerin incelenmesinde sıklıkla tercih edilen bir diğer test yöntemi mikronükleus testidir. Mikronükleus testi genotoksik ajanlara maruz kalan populasyonlarda, moleküler epidemiyolojide ve sitogenetik hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir *in vivo* ve *in vitro* test sistemidir. Mikronükleuslar hücre siklusunda nükleer bölünme sırasında çoğunlukla hücre döngüsünü denetleyen genlerin

eksikliğinden, mitotik ipliklerdeki hatalardan, kinetokor ve mitotik mekanizmanın diğer parçalarından veya kromozomal dejenerasyonlardan oluşmaktadır. Mikronukleuslar hücre döngüsünün anafaz safhasında bazı etkilerden kutuplara çekilemeyen sentromersiz (asentrik) kromozom parçacıkları veya bütün kromozomlardan oluşabilmektedir. DNA'daki tek zincir kırıkları tamir mekanizmalarında oluşan sorunlar nedeni ile çift zincir kırıklarına dönüşebilir ve kopan parça mikronükleus oluşturabilir. Daha sonra bu parçalar, telofaz evresinde nükleoplazma ile kaplanır ve oluşan binükleat hücrede zarla çevrilmiş küçük çekirdekcikler şeklinde görülebilmektedir. Ayrıca radyasyon gibi ajanlar, DNA üzerinde direkt olarak çift zincir kırığına neden olur. Böylece ortaya çıkabilecek disentrik kromozomun sentromerlerinin farklı kutuplara çekilmesi sonucu mikronükleusun oluşumu gözlenebilir. İğ ipliklerindeki bozulmalar, sentromer ve sentrozomların yapısındaki değişiklikler ile birlikte mitoz kontrol noktalarındaki sorunlar ve anormal sentrozom artışı gibi etmenler ise tam bir kromozomun, kromozomlar kutuplara doğru çekilirken herhangi bir kutba gidemeyip mikronükleus oluşturmasına neden olabilir. Mikronukleusların yaklaşan tümörojenezin bir belirteci olduğu bildirilmiştir. Kanserli hücrelerdeki mikronukleus frekansı normal hücrelerdeki mikronukleus frekansı ile karşılaştırıldığında her zaman daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. Ayrıca nükleer bölünme indeksi hücrelerin nekroz veya apoptoz geçirme oranının belirlenmesinde ve incelenen ajanın toksisite değerlendirmesi ile ilgili sitostatik ve sitotoksik özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır [225-228].

Bu tez çalışmasında hyperosidenin tek başına uygulandığı grupta mikronukleus frekansında bir değişiklik meydana gelmemiştir. Dolayısıyla genotoksik bir etki sergilememiştir. Antigenotoksik potansiyelinin incelendiği gruplardan Mitomisin-C ile birlikte uygulandığı grupta etkili olmadığı gözlenmektedir. Fakat hyperoside+H_2O_2 eş zamanlı uygulamasında tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole kıyasla mikronükleus oluşumunda önemli azalmalar görülmüş ve mikronükleus frekansındaki bu azalmalar istatiksel olarak tüm konsantrasyonlarda anlamlı bulunmuştur. Tüm uygulamalar nükleer bölünme indeksi açısından değerlendirildiğinde ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Artan MN frekansı ile kanser hücreleri arasında bir korelasyon olduğu farklı çalışmalarla kanıtlanmıştır [229-231]. Hyperosidenin özellikle oksitatif stres kaynaklı MN oluşumuna karşı bir koruma sağladığı düşünülmektedir.

Yapılan litaratür taramalarında hyperosidenin MN testi kullanılarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak hyperosidenin yapısal türevlerinin incelendiği çalışmaların yanısıra hyperosidenin ana flavonoid olarak bulunduğunun açıklandığı alıç bitki türleri ile yapılan çalışmalara rastlanmıştır.

2018 yılında yapılan bir çalışmada alıç ekstratının genotoksik etkileri *in vivo* olarak farelerde mikronukleus testi ile incelenmiştir. Yedi gün boyunca 12 haftalık erkek Swiss albino farelere günlük 50, 100 ve 200 mg/kg konsantrasyonlarda gavaj yoluyla alıç ekstraktı uygulanmıştır. Ötenazi öncesi kuyruk damarından alınan kan örnekleri ve ötenazi sonrası alınan kemik iliği hücreleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda periferik kan lenfositlerinde anlamlı bir genotoksik etki görülmediğini ancak fare kemik iliği hücrelerinde zayıf klastojenik/anojenik etki tespit edildiğini bildirmişlerdir [139].

Başka bir çalışmada (2017) yine alıç ekstratının genotoksik etkileri insan lökosit hücreleri ve HepG2 (karaciğer hepatosellüler karsinom) hücre hattında mikronukleus testi kullanarak incelenmiştir. İki hücre hattında da 2,5; 5; 10; 50 ve 100 µg/mL alıç akstrat konsantrasyonları kullanılmıştır. Her iki test sisteminde de hem lökosit hücrelerinde hem de HepG2 hücre hattında sadece yüksek konsantrasyonların genotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [232].

2018 yılında araştırmacılar alıç ile aynı familyaya ait olan (*A. eupatoria, A. procera, F. Palmata, F. ulmaria ve F. Vulgaris)* beş farklı türün özütlerinin genotoksik etkilerini insan lenfositlerinde mikronukleus testi ile incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan tüm bitki türlerinde hyperoside ana flavonoid olarak yer almaktadır. Mikronukleus testinde iki sağlıklı donörden elde edilen periferik kan lenfositlerine *Agrimonia procera* 12,5; 25; 37,5 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında diğer tüm türler ise 50, 100, 150, 200 µg/mL konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Mikronukleus testi sonucunda tüm türlerin nükleer bölünme indeksinde bir düşüşe neden olmasına rağmen genotoksik olmadığını bildirmişlerdir [232].

Hossemıer ve arkadaşları alıç özütlerinin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin mikronukleus testi kullanarak 4 farklı çalışma ile incelemişlerdir. Bu çalışmalardan iki tanesi insan periferal kan lenfositlerinde uygulanmıştır. Araştırmalarında MN testi kullanarak metil metan sülfonatın (2009) ve gama ışınlamasının indüklediği (2011)

genotoksisiteye karşı alıç özütlerinin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Alıç ekstratı (500 mg) donörlere oral olarak verildikten 1, 2 ve 3 saat sonra toplanan kan örnekleri ile hazırlanan hücre kültürlerine gama ışını kaynağı kolbat-60 kullanılarak 1.5 Gy'lik bir dozda uygulanmıştır. Diğer çalışmada ise alıç özüt tozunun oral yoldan 1g olarak verilmesinden 1, 2 ve 3 saat sonra kan örnekleri toplanmış ve hücre kültürlerinin 24. saatinde metil metan sülfanat uygulanmıştır. Her iki çalışmada da genotoksik ajanların oluşturduğu hasara karşı alıç özütleri koruyucu bir etki göstermiştir. Araştırmacılar alıcın hem radyasyon kaynaklı hasarlara hem de tehlikeli kimyasallara karşı önemli bir besin kaynağı olduğunu vurgulamışlardır [140,141].

Aynı araştırmacıların diğer iki çalışmalarında ise fare kemik iliği hücrelerini kullanılmıştır. Genotoksik ajan olarak gama ışınları (2006) ve siklofosfamid (2008) kullanılmış ve alıç özütlerinin koruyucu etkisi MN testi ile incelenmiştir. İlk çalışmada gamma ışınlamasından 1 saat önce alıç ekstratı belirlenen dozlarda (25, 50, 100 ve 200 mg/kg) intraperitonal olarak farelere uygulamışlardır. Diğer uygulama ise farelere ardışık yedi gün boyunca beş farklı dozda (25, 50, 100, 200 ve 400 mg/kg vücut ağırlığı) hazırlanan alıç ekstratı oral olarak verilmiş ve farelere yedinci günde siklofosfamid (50 mg/kg vücut ağırlığı) intraperitonal olarak enjekte edilmiş, 24 saat sonra ötenazi uygulanmıştır. Her iki çalışmada da alıç özütleri koruyucu etki göstermiştir. Araştırmacılar alıç flavonoidlerinin her iki genotoksik ajana karşı antigenotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir [142,143].

Bir başka bitki türü olan *Humulus lupulus L.* (şerbetçiotu)'dan elde edilen polifenollerin fare kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkisi MN testi ile incelenmiştir. HPLC analizi yapılan şerbetçi otunda flavonoid olarak en fazla rutin bulunurken onu hyperoside takip etmektedir. Farelere 15 gün boyunca 20, 40, 80 mg/kg/vücut ağırlığı polifenol karışımı uygulanmıştır. 15. günün sonunda 40 mg/kg/vücut ağırlığı siklofosfamid 1 saat buyunca uygulanmış ve 24 saat sonra bu işlem tekrarlanmıştır. Farelere, ikinci siklofosfamid uygulamasından 6 saat sonra ötenazi yapılmıştır. Araştırmacılar, mikronükleus sıklığının önemli ölçüde ve doza bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir [233].

Hyperosidenin yapısal türevlerinden olan rutin ve quercetin insan periferal lenfositlerinde radyasyona bağlı oluşan genetik hasara karşı koruyucu etkisi MN testi ile incelenmiştir. Araştırmacılar, iki farklı uygulama planlamışlardır. İlkinde 10, 15, 20, 25 µg/mL rutin ve

quercetinin ayrı ayrı uygulamasından 1 saat sonra 2 Gy dozunda radyasyon uygulamışlardır. İkinci uygulamada ise 25 µg/mL rutin ve quercetinin ayrı ayrı uygulamasından 1 saat sonra 0, 1, 2, 3, 4 Gy dozlarında radyasyon uygulamışlardır. Araştırmacılar tüm uygulamalarda rutin ve quercetin ROT süpürücü etkisi ile MN frekansını pozitif kontrollere göre önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşladır [234].

Quercetin ile yapılmış bir başka çalışmada araştırmacılar (2017) insan periferal kan lenfositlerinde hidrojen peroksitin indüklediği hasara karşı quercetinin koruyucu etkisini MN testi ile incelemişlerdir. Lenfositler 24 saat kültüre edildikten sonra 1 saat boyunca 10, 20, 30, 40 ve 50 µM quercetin konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Ardından 100 µM H_2O_2 eklenmiş ve kültürler 37ºC'de 48 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Tüm konsantrasyonların yüzde mikronukleus oranını azalttığı bulunmuştur. Araştırmacılar en yüksek korumanın 40 µM konsantrasyonda görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca quercetinin hidrojen peroksitin oluşturduğu oksitatif strese karşı antigenotoksik özellik gösterdiği bildirilmiştir [208].

Antikanser çalışmalarında son yıllarda flovonoidler sıklıkla tercih edilmektedir. Antioksidan aktiviteleri ve bazı sinyal yolakları üzerine etki ederek apoptozu ve otofajiyi indüklemeleri flovonoidlerin tercih sebepleri arasında yer almaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan hyperoside flavonoidi özellikle son yıllarda antikanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [125,126,235-247]. Hyperoside ile yapılan çalışmalarda antioksidan aktivite gösterdiği ve bazı sinyal yolaklarını aktif veya inaktif ederek apoptozu ve otofajiyi indüklediği en çok açıklanan mekanizmalardır.

2016 yılında yapılan bir araştırmada insan akciğer adenokarsinom hücre hattı olan A549 kullanarak hyperosidenin otofajinin indüklenmesindeki sinyal yolaklarına olan etkisini western blot yöntemi ile incelemişlerdir. Hücrelerde p62 sinyal yolağı ekspresyon seviyeleri otofajik aktivite ile ters orantılı olduğu ve hyperosidenin p62 ekspresyon seviyesini konsatrasyona bağlı olarak (0.1, 0.5, 1 ve 2 mmol/L) azalttığı bildirmiştir. Ayrıca otofaji ve hücre proliferasyonunda kritik rol oynayan, tümör oluşumu ile ilişkili olan ve çok sayıda tümörde aktive edilen PI3K, Akt, mTOR, ERK1/2 sinyal yolları western blot testi ile incelenmiştir. Hyperosidenin tüm bu sinyal yollarına etki ederek otofajinin başlatılmasını sağladığı bildirilmiştir. Araştırmacılar otofaji ile beraber hyperosidenin apoptozu indükleyebilme yeteneğini de incelemişlerdir. Kaspaz-3 ve

bölünmüş PARP proteinleri apoptotik sürecin biyokimyasal aktivitesinde yer almaktadır. Hyperosidenin konsantrasyona bağlı olarak (0.5, 1 ve 2 mmol/L) parçalanmış kaspaz-3 ve parçalanmış PARP seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ve böylece apoptoza neden olduğunu ortaya koymuşladır [243]. 2017 yılında yapılmış diğer bir çalışmada araştırmacılar yine ayni hücre hattını kullanarak hyperosidenin akciğer kanserindeki antikanser aktivitesi altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Hyperosidenin MTT test sonuçlarına göre A549 hücrelerinin zamana (12, 24 ve 48 saat) ve doza bağlı (10, 50 ve 100 μM) bir şekilde yaşayabilirliğini önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Mitokondriye bağlı apoptozun ana temeli, mitokondriyal sitokrom *c* ve AIF'nin salınmasıdır. Bu nedenle, araştırmacılar bu iki parametreyi western blot analizi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Hücre kontrol grubunda sitokrom *c* ve AIF'nin düşük olan seviyeleri 12 saat boyunca hyperosidenin farklı konsantrasyonları (0, 10, 50 ve 100 μm) ile muamele edilmiş gruplarda artış göstermiştir. Aynı zamanda 12 saat boyunca farklı konsantrasyonlardaki (0, 10, 50 ve 100 μm) hyperosie ile muamele edilmiş gruplarda apoptoz efektörü olan kaspaz-3, kaspaz-9 veya kaspaz-8 enzimlerinin de ekspresyon seviyelerinin doza bağlı bir şekilde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan p21 ve p53 moleküler sinyalizasyonlarının hyperosidenin etkisi ile arttığı açıklanmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar hyperosidenin akciğer kanserine karşı faydalı olabilecek doğal bir ajan olduğunu vurgulamışlardır [236].

Diğer bir çalışmada hyperosidenin akciğer kanseri hücre hatlarındaki antikanser aktivitesi incelenmiştir. İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549) ve insan akciğer kanser hücre hattı (H1975) kullanılarak MTT ve western blot testleri uygulanmıştır. Hyperoside, MTT testinde hücre hatlarına 0, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde 40, 60 ve 80 μg/mL konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Hücre canlılığının 24 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar kaspaz-3 enziminin apoptozu düzenleyen ana enzim olduğunu ve western blot analizinde hyperosidenin kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda hyperosidenin akciğer kanser hücresi poliferasyonu üzerine etkisini de TUNEL testi ile incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda hyperosidenin hücre döngüsünde S fazını durdurduğunu bildirmişlerdir [247].

Başka bir çalışmada insan kolon kanser hücre hattında (HT-29) hyperoside ve rutinin antikanser etkisi araştırılmıştır. Hücre canlılığı testi ile incelenen flovonoidler 0, 100, 200

μM konsantrasyonlarında 24 saat uygulanmıştır. Hyperosidenin %25.6, rutinin %37.1 oranında büyüme inhibisyonunu indüklediği gözlenmiştir. HT-29 hücrelerinde hyperoside ve rutinin apoptoz üzerindeki etkilerini incelemek için apoptoz düzenleyici proteini olan Bcl-2 ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Bcl-2, mitokondriyal plazma membranı ile etkileşmekte ve apoptoz sırasında mitokondriyal membran gözeneklerinin açılmasını önleyerek apoptotik faaliyet sinyallerini bloke etmektedir. Araştırmacılar hyperoside ve rutinin doza bağlı bir şekilde Bcl-2 ekpresyon oranını azalttığını gözlemişlerdir. Böylece bu flovonoidlerin mitokondriyal apoptozu indükleyebildiklerini açıklamışlardır [239].

Gıda kaynaklı antioksidanların hücresel savunma enzimlerinin seviyelerini artırarak oksidatif stres kaynaklı hasarı azaltabileceğine dair çok fazla çalışma vardır. Araştırmacılar LX-2 insan hepatik hücre hattında hyperosidenin antioksidan aktivitesi ve apoptoz indükleme moleküler mekanizmasını incelemişlerdir. Bu çalışmada hyperosidenin bir DNA transkripsiyon faktörü olan NF-KB (Nükleer Faktör Kabba B) yolağını bloke ederek apoptozu indüklediğini gözlemişlerdir. Ayrıca LX-2 hücre içi ROT seviyelerini ölçmüşler ve hyperosidenin kontrol grubuna göre hücre içi ROT üretimini büyük ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Hücre içi ROT üretimi NF-KB'nın en önemli aktifleştiricileri arasında yer almaktadır. İnsan hepatik hücrelerinde kollajen gen indüksiyonunu uyararak karaciğer fibrozunun patogenezine katkıda bulunmaktadır. Bu çalışma NF- KB ve ROT arasında karşılıklı bir geri besleme döngüsü olduğunu ortaya koymuştur. Deneysel sonuçlar hyperosidenin hücre içi ROT üretimini antioksidanların yapı-aktivite ilişkileri ile azalttığı ve ROT'ların azalması ile NF-KB aktivasyonun da azaldığını göstermiştir [248].

Flovanodiler antioksidan mekanizmalarını ROT süpürücü etki olarak göstermelerinin yanı sıra endojen antioksidan sistemlerinin aktivasyonlarını arttırarak da göstermektedirler. Bununla ilgili Park ve arkadaşları (2016) insan mercek epitel hücrelerinde (HLE-B3) hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı hyperosidenin koruyucu özelliğini, enzimatik antioksidan savunma sistemlerinden hem oksijenaz-1 (HO-1) üzerine etkisini incelemişlerdir. Yapılan MTT testi sonucunda hyperosidenin konrol grubuna göre hücre canlılığını artırdığı görülmüştür. Western blot ve PCR testi sonuçlarına göre hyperoside HO-1'in indüksiyonunun düzenlenmesinde yer alan NF-KB ve Nrf2 (nükleer eritroid faktörü 2) hücre içi sinyal molekülerinin aktivasyonunu indüklediğini açıklamışlardır. Ayrıca hyperoside, ERK (hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz) fosforilasyonunu ve Nrf2-ARE (nükleer eritroid faktörü 2 - Antioksidan response element) bağlanması gibi Nrf2

aktivasyon basamaklarını da önemli ölçüde indüklemiştir. Bu çalışmada, HO-1'in mRNA'sının ve protein ekspresyonunun, hyperoside ile muamele edilen hücrelerde artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar hücrenin oksidatif stres kaynaklı hücre hasarına karşı korunmasında hyperosidenin önemli katkılar sağladığını bildirmişlerdir [91]. Hyperosidenin HO-1 enzimatik antioksidan sistemini indüklediği gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [245,249,250].

Meyve ve sebzelerde yer alan flavonoidlerin insan sağlığı üzerine etkileri son zamanlarda popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Araştırmacılar bu ikincil bitki metabolitlerinin koruyucu etkilerini moleküler yapı-aktivite ilişkisi ile bağdaştırmışlardır. Flavonoidlerdeki fonksiyonel olan hidroksil grupları, serbest radikalleri uzaklaştırarak ve/veya metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan etkilerini göstermektedirler. Flovonoidlerde bulunan halkalı hidroksil konfigürasyonu, ROT'un inaktifleştirilmesini sağlayan en önemli yapıdır. Çünkü hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron bağlayarak, stabilize eder ve nispeten kararlı bir flavonoid radikalini oluşturur [85]. Hidroksil gruplarının sayısı, pozisyonları ve glikosilasyon dereceleri flavonoid halkalarının biyolojik aktivitelerini etkilediği bildirilmiştir [251]. Hyperoside, C-3 pozisyonundaki bir hidroksil grubuna ve B-halkasında bir katekol grubuna sahip quercetin-3-O-galaktosit bileşiğidir. Flovonoidlerdeki B halkasındaki 3′, 4′-katekol yapısı, lipit peroksidasyonunun inhibisyonunu arttırmaktadır [248]. Araştırmacılar hyperosidenin incelendiği çeşitli hücre hatlarında lipid peroksidasyonuna etki etiğini ve bu şekilde koruma sağlayabildiğini göstermişlerdir [135,136]. Hyperosidenin yapısal olarak gösterebileceği yüksek antioksidan aktivite ile sonuçlarımız arasında doğrusal bir korelasyon bulunmaktadır.

Hyperosidenin ön ve eş muamelesi ile PC12 (**S**ıçan adrenal feokromositoma hücre hattı) hücrelerinde H_2O_2 ve *t* -BuOOH- neden olduğu sitotoksisiteyi önemli ölçüde önlediği görülmüştür. Hücre dışı lipit peroksidasyonu seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca hyperosidenin hücre zarına nüfuz ederek serbest radikal oluşumunu engelleyebildiğini ve hücre içinde geçiş metali iyonu şelatlama ile serbest radikal reaksiyonlarını önleyerek H_2O_2 karşı etkili bir koruma sağladığını bildirmişlerdir [135]. Çalışmamız sonuçlarında da hyperosidenin genel olarak tüm uygulama gruplarında H_2O_2 kaynaklı hasarlara karşı koruma sağlamıştır. Hyperoside oksitatif stres kaynaklı hasarları önemli ölçüde azaltabilmektedir. Bir başka çalışmada hyperosidenin yapısal yakın türevi olan quercetinin

ön muamele ile lenfositlerde gama ışınının neden olduğu MN ve disentrik kromozom frekansında azalma sağladığını bildirmişlerdir. Quercetinin antiklastojenik potansiyeli sayesinde genetik hasarı azaltmış olabileceğini ön görmüşlerdir. Antiklastojenik etkisinin kesin mekanizması bilinmemekle beraber bu etkinin muhtemelen quercetinin üçüncü pozisyonundaki hidroksi grubunun serbest radikallerle reaksiyona girerek DNA'ya saldırmasını engellemiş olabileceğini ya da quercetinin DNA ile bağlanma potansiyeli göz önüne alındığında DNA'nın reaktif bölgesine bağlanarak serbest radikallerin DNA ile reaksiyona girmesini önleyebileceğini bildirmişlerdir [252].

Flavonoidlerin çeşitli mutajenler ile meydana gelen hasarlara karşı koruyucu özelliklerinin reaktif oksijen türlerine etkili mekanizmaları yoluyla olabileceği gibi direk DNA'ya ya da tamir mekanizmalarına olan etkileri ile de oluşabileceği gösterilmiştir. Hyperosidenin yapısal yakın türevi olan quercetinin ön muamelesi ile insan periferal lenfositlerinde kadmiyumun indüklediği hasara karşı koruma gösterdiği görülmüştür. Araştırmacılar bu korumanın quercetin'in lenfositlerde DNA tamirinde görev alan enzimleri uyarması ile sağladığını bildirmişlerdir [253]. Bir başka çalışmada fare kemik iliği hücrelerinde hyperosidenin MMC'nin neden olduğu MN ve KA frekansında azalma sağladığını ve bu etkiyi antioksidan aktivite ve/veya DNA onarım işleminin uyarılması gibi mekanizmalar ile olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Flavonoidlerin enzimatik (SOD, CAT ve GPx) antioksidan mekanizmalarına etki ederek çeşitli hücre hatlarında koruma sağladığı çalışmalarda gösterilmiştir [245,249,250]. Bir çalışmada insan periferal lenfositlerinde quercetinin enzimatik antioksidan mekanizmalarının aktifleşmesine katkıda bulunduğu ayrıca ara peroksil, alkoksil radikaleri ve şelatlayıcı özelliği ile demir iyonlarını uzaklaştırarak lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı bir inhibitör olarak davrandığını bildirilmiştir [252]. Flovanoidlerin antioksidan mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber araştırmacılar bazı mekanizmalar önermişlerdir. Bazı flavonoidlerin konsantrasyon ve serbest radikal kaynağına bağlı olarak hem antioksidan hem de pro-oksidan olarak davranabileceğini bildirmişlerdir. Flavonoidler serbest radikallere karşı antioksidan olarak davranabildikleri gibi bir geçiş metali varlığında pro-oksidan aktivite gösterebilmektedirler. Fenolik bileşikler; metalleri hidroperoksitlerin parçalanmasını katalizlemede daha aktif oldukları düşük yüke indirgeme (örneğin; Fe+3 Fe+2 veya Cu+2 Cu+) özelliğine sahiptirler. Ayrıca polar antioksidanlar su fazındaki demir ile daha etkili interaksiyona girer ve fenoliklerin metal indirgeme güçleri

artan pro-oksidan aktivitelerini açıklayabilmektedir [254,255]. Yapılan bir araştırmada hyperosidenin A549 hücre hattında hücresel demir seviyesinin artmasıyla pro-oksidan gibi davranarak hücre hasarına yol açtığını bildirmişlerdir [245].

Hyperosidenin genotoksik ve antigenotoksik etkisinin incelendiği bu çalışmada MMC'ye karşı daha düşük H_2O_2 karşı ise yüksek antigenotoksik etkileri olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. S fazına olan etkiler hakkında bilgi veren KKD testi sonuçları da hyperosidenin S fazını etkileyebileceğini göstermektedir. Hyperosidenin muamele süresi ile konsantrasyonların antigenotoksik etkisi arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. İncelenen çalışmalarda hyperosidenin kanser oluşumunu; antioksidan aktivitesi ile pek çok sinyal yolakları ve enzim aktivitelerini indüklemesi veya bloke etmesi ile önlediği görülmüştür. Sonuçlar hyperosidenin kemoprevantif potansiyeli olduğunu düşündürmektedir. Pek çok çalışmada hyperosidenin iyi bir ROT süpürücü ve metal şelatlayıcı olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada da özellikle hidrojen peroksite karşı göstermiş olduğu yüksek koruyucu etkisi ROT süpürücü özelliği ile antioksidan olarak davrandığını desteklemektedir. Bu etkiler hyperosidenin yapısında bulunan C-3 pozisyonundaki hidroksil grubu ve B-halkasında katekol grubu ile bağlantılı olduğu söylenebilir. Ayrıca hyperoside desmutajen gibi davranarak DNA' ya direk etki etmesi ile serbest radikallerin etkilerini önleyebileceği ön görülmektedir. Ayrıca hyperoside biyoantimutajen olarak mutajenlerin daha hücre içine girmeden müdahele ederek inaktifleştirebileceği çalışmalarca gösterilmiş ve sonuçlarımızda bu etkiyi desteklemektedir. Birçok fitokimyasal DNA ve hücresel hedeflere hasara neden olabilecek mutajenleri inaktifleştirme ya da DNA tamir mekanizmalarını aktifleştirme yeteneğine sahiptir. Çalışmamızda kullanılan *in vitro* genotoksisite testlerinde diğer birçok çalışmayı destekleyici sonuçlara ulaşılmıştır. Sonuçlarımız hyperosidenin hasarları onarabilme ve önleyebilme potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir. Hyperosidenin pro-oksidan ve antioksidan etki mekanizmalarının iyi şekilde anlaşılması için farklı hücrelerde ve test sistemleri ile araştırılmasına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Corrie, P. G. (2008). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 36(1), 24-28.

2. Jones, R., and Ocen, J. (2020). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 48(2), 97-102.

3. Akbulut, H. Karsinogenez ve metestaz biyolojisi. URL:https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/55301/mod_resource/content/0/Karsinogenez%20ve%20Metastaz%20Biyolojisi.pdf, Son erişim tarihi: 11.05.2020

4. León-Mejía, G., Quintana-Sosa, M., de Moya Hernandez, Y., Rodríguez, I. L., Trindade, C., Romero, M. A., and Valencia, K. F. (2020). DNA repair and metabolic gene polymorphisms affect genetic damage due to diesel engine exhaust exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

5. Klaunig, J. E., and Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121.

6. Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., and Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.

7. McCreery, M. Q., and Balmain, A. (2017). Chemical Carcinogenesis Models of Cancer: Back to the Future. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 295-312.

8. Niranjan, R., and Thakur, A. K. (2017). The toxicological mechanisms of environmental soot (black carbon) and carbon black: focus on oxidative stress and inflammatory pathways. *Frontiers in immunology*, 8, 763.

9. Blagosklonny, M. (2005). Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. *Cell Death and Differentiation*, 12(6), 592-602.

10. Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., and Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 334-339.

11. Trosko, J., and Chang, C. (2019). Chemical carcinogenesis as a consequence of alterations ın the structure and functıon of DNA. *Chemical Carcinogens and DNA*, (2),144-149.

12. Fu, D., Calvo, J. A., and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104-120.

13. Lajous, H., Lelièvre, B., Vauléon, E., Lecomte, P., and Garcion, E. (2019). Rethinking Alkylating (-Like) Agents for Solid Tumor Management. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(5), 342-357.

14. Puyo, S., Montaudon, D., and Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 43-61.

15. Singh, R. K., Kumar, S., Prasad, D., and Bhardwaj, T. (2018). Therapeutic journery of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 401-433.

16. Ewertz, M., Qvortrup, C., and Eckhoff, L. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients treated with taxanes and platinum derivatives. *Acta Oncologica*, 54(5), 587-591.

17. Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L.-Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S., and Tomasz, M. (2002). Relative Toxicities of DNA Cross-Links and Monoadducts: New Insights from Studies of Decarbamoyl Mitomycin C and Mitomycin C. *Chemical Research in Toxicology*, 15(11), 1398-1406.

18. Paz, M. M., Zhang, X., Lu, J., and Holmgren, A. (2012). A New Mechanism of Action for the Anticancer Drug Mitomycin C: Mechanism-Based Inhibition of Thioredoxin Reductase. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1502-1511.

19. Abraham, L. M., Selva, D., Casson, R., and Leibovitch, I. (2006). Mitomycin. *Drugs*, 66(3), 321-340.

20. Santhiago, M. R., Netto, M. V., and Wilson, S. E. (2012). Mitomycin C: Biological Effects and Use in Refractive Surgery. *Cornea*, 31(3), 311-321.

21. Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., and Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592-607.

22. Güleç, D. (2017). Reaktif Oksijen Türlerinin Üretiminde Süksinat Dehidrogenaz Enziminin Rolü. *Türkiye Klinikleri İç Hastalıkları Dergisi*, *2*(2), 57-63.

23. Alkadi, H. (2020). A review on free radicals and antioxidants. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 20(1), 16-26.

24. Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89.

25. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.

26. Treml, J., and Šmejkal, K. (2016). Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 720-738.

27. Kusio, J., Sitkowska, K., Konopko, A., and Litwinienko, G. (2020). Hydroxycinnamyl Derived BODIPY as a Lipophilic Fluorescence Probe for Peroxyl Radicals. *Antioxidants*, 9(1), 88.

28. Greene, L. E., Lincoln, R., and Cosa, G. (2017). Rate of lipid peroxyl radical production during cellular homeostasis unraveled via fluorescence imaging. *Journal of the American Chemical Society,* 139(44), 15801-15811.

29. Flora, S. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology,* 53(1), 1-2.

30. Ratnam, D. V., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release,* 113(3), 189-207.

31. Antunes, F., and Brito, P. M. (2017). Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox Biology,* 13, 1-7.

32. Kohen, R., and Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology,* 30(6), 620-650.

33. Smirnoff, N., and Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist,* 221(3), 1197-1214.

34. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., and Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.

35. Prasad, S., Gupta, S. C., and Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters,* 387, 95-105.

36. Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., and Yönden, Z. (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations,* 6(3), 331-336.

37. Betül, Y., ve Sami, A. (2000). Oksidatif Stress ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,* 9(1), 49-53.

38. Özenç, B. (2011). Fumaria Officinalis'un Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi (Doktora tezi). *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye*.

39. Gaschler, M. M., and Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 482(3), 419-425.

40. Stinefelt, B., Leonard, S. S., Blemings, K. P., Shi, X., and Klandorf, H. (2005). Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 35(1), 37-45.

41. Yin, H., Xu, L., and Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews,* 111(10), 5944-5972.

42. Wu, R. P., Hayashi, T., Cottam, H. B., Jin, G., Yao, S., Wu, C. C., Rosenbach, M. D., Corr, M., Schwab, R. B., and Carson, D. A. (2010). Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7479-7484.

43. Yang, L., Latchoumycandane, C., McMullen, M. R., Pratt, B. T., Zhang, R., Papouchado, B. G., Nagy, L. E., Feldstein, A. E., and McIntyre, T. M. (2010). Chronic alcohol exposure increases circulating bioactive oxidized phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22211-22220.

44. Devasagayam, T., Tilak, J., Boloor, K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., and Lele, R. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52(794804), 4.

45. Nissanka, N., and Moraes, C. T. (2018). Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Letters*, 592(5), 728-742.

46. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., and Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 193-201.

47. Kotecha, R., Takami, A., and Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, 7(32), 52517.

48. Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126.

49. Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.

50. Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., and Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749-1770.

51. Why meditation is the best antioxidant? what is a free radical? Retrieved from URL: https://eocinstitute.org/meditation/meditation-reduces-free-radicals-in-the-body/

52. Galano, A., Mazzone, G., Alvarez-Diduk, R., Marino, T., Alvarez-Idaboy, J. R., and Russo, N. (2016). Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), 335-352.

53. Arman, A. (2017). Antioksidan maddelerin modifiye elektrot kullanılarak elektrokimyasal tayini (Yüksek Lisans Tezi) *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.*

54. Seyidoglu, N., and Aydin, C. (2020). In *The Health Benefits of Foods-Current Knowledge and Further Development.* Washington: CRC Press, 3-19

55. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry,* 44(2), 532-553.

56. Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M. V., Plescia, F., and Daidone, G. (2017). Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 142, 213-228.

57. Atta, E. M., Mohamed, N. H., and Abdelgawad, A. A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin,* 6, 365-375.

58. Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., and Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4), 2-7.

59. Nizamlıoğlu, N., ve Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi,* 5(1), 20-35.

60. Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., and Pollio, A. (2011). Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.

61. Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., and Zarrelli, A. (2006). Terpenoids and phenol derivatives from Malva silvestris. *Phytochemistry,* 67(5), 481-485.

62. Kirkus, M., Simokaitiene, J., Grazulevicius, J. V., and Jankauskas, V. (2010). Phenyl-, carbazolyl-and fluorenyl-substituted derivatives of indolo [3, 2-b] carbazole as hole-transporting glass forming materials. *Synthetic metals*, 160(7-8), 750-755.

63. Ben-Shabat, S., Yarmolinsky, L., Porat, D., and Dahan, A. (2019). Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Delivery and Translational Research*, 1-14.

64. Lagoa, R., Silva, J., Rodrigues, J. R., and Bishayee, A. (2020). Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity. *Biotechnology Advances*, *38*, 107382.

65. Fernando, W., Rupasinghe, H. V., and Hoskin, D. W. (2019). Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? *Cancer Letters*, 452, 168-177.

66. Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., and Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457-1474.

67. Dariya, B., Rajitha, B., Alam, A., and Nagaraju, G. P. (2020). In Theranostics Approaches to Gastric and Colon Cancer. *Singapure*, 1-28.

68. Kolaç, T., Gürbüz, P., ve Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 5(1), 26-42.

69. Hu, B., Liu, X., Zhang, C., and Zeng, X. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 3-15.

70. Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., Wang, M., Song, H., Liu, X., and Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276, 538-546.

71. Li, J., Zhang, A., Zhang, S., Gao, Q., Zhang, W., and Li, J. (2019). Larch tannin-based rigid phenolic foam with high compressive strength, low friability, and low thermal conductivity reinforced by cork powder. *Composites Part B: Engineering*, 156, 368-377.

72. El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T., and Krisa, S. (2018). A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1007-1029.

73. Liu, Y., Yang, Y., Tasneem, S., Hussain, N., Daniyal, M., Yuan, H., and Li, B. (2018). Lignans from Tujia ethnomedicine Heilaohu: chemical characterization and evaluation of their cytotoxicity and antioxidant activities. *Molecules*, 23(9), 2147.

74. Sebastian, R. S., Wilkinson Enns, C., Goldman, J. D., Steinfeldt, L. C., Martin, C. L., Clemens, J. C., Murayi, T., and Moshfegh, A. J. (2017). New, publicly available flavonoid data products: Valuable resources for emerging science. *Journal of Food Composition and Analysis*, 64, 68-72.

75. Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., and Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196, 44-68.

76. Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.

77. Perez-Vizcaino, F., and Fraga, C. G. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 646, 107-112.

78. Lu, M.-F., Xiao, Z.-T., and Zhang, H.-Y. (2013). Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(4), 701-704.

79. Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y., and Nakabayashi, R. (2019). The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 943.

80. Dillard, C. J., and German, J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744-1756.

81. Kim, H. L., Kim, W. K., and Ha, A. W. (2019). Effects of Phytochemicals on Blood Pressure and Neuroprotection Mediated Via Brain Renin-Angiotensin System. *Nutrients*, 11(11), 2761.

82. Jahan, N., and Ali, S. (2019). Effect of Herbal Mixture as Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor in Angiotensin-II Dependent Hypertension. *Pakistan Veterinary Journal*, 39(1).

83. Van Horn, L., Archer, S., Thedford, K., and Baltes, A. M. Y. (2001). Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. San Diego: Academic Press, 291-302.

84. Komici, K., Conti, V., Davinelli, S., Bencivenga, L., Rengo, G., Filippelli, A., Ferrara, N., and Corbi, G. (2020). Cardioprotective Effects of Dietary Phytochemicals on Oxidative Stress in Heart Failure by a Sex-Gender-Oriented Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020*.

85. Ku, S.-K., Kwak, S., Kwon, O. J., and Bae, J.-S. (2014). Hyperoside Inhibits High-Glucose-Induced Vascular Inflammation *In Vitro* and *In Vivo*. *Inflammation*, 37(5), 1389-1400.

86. Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., and Büsselberg, D. (2019). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28.

87. Gao, Y., Fang, L., Wang, X., Lan, R., Wang, M., Du, G., Guan, W., Liu, J., Brennan, M., and Guo, H. (2019). Antioxidant activity evaluation of dietary flavonoid hyperoside using saccharomyces cerevisiae as a model. *Molecules*, 24(4), 788.

88. Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J., and Ouyang, Z. (2017). Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2), 483-489.

89. Liu, R. L., Xiong, Q. J., Shu, Q., Wu, W. N., Cheng, J., Fu, H., Wang, F., Chen, J. G., and Hu, Z.-L. (2012). Hyperoside protects cortical neurons from oxygen–glucose deprivation–reperfusion induced injury via nitric oxide signal pathway. *Brain Research*, 1469, 164-173.

90. Yang, J., Qian, D., Guo, J., Jiang, S., Shang, E. X., Duan, J. A., and Xu, J. (2013). Identification of the major metabolites of hyperoside produced by the human intestinal bacteria using the ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(1), 174-179.

91. Park, J. Y., Han, X., Piao, M. J., Oh, M. C., Fernando, P. M. D. J., Kang, K. A., Ryu, Y. S., Jung, U., Kim, I. G., and Hyun, J. W. (2016). Hyperoside induces endogenous antioxidant system to alleviate oxidative stress. *Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 41.

92. Ku, S.-K., Kim, T. H., Lee, S., Kim, S. M., and Bae, J.-S. (2013). Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. *Food and Chemical Toxicology,* 53, 197-204.

93. Piao, M. J., Kang, K. A., Zhang, R., Ko, D. O., Wang, Z. H., You, H. J., Kim, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., and Hyun, J. W. (2008). Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,* 1780(12), 1448-1457.

94. Lee, S. J., Son, K. H., Chang, H. W., Do, J. C., Jung, K. Y., Kang, S. S., and Kim, H. P. (1993). Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Archives of Pharmacal Research,* 16(1), 25.

95. Erdemoglu, N., Akkol, E. K., Yesilada, E., and Calış, I. (2008). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, Rhododendron ponticum L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology,* 119(1), 172-178.

96. Soberón, J., Sgariglia, M., Sampietro, D., Quiroga, E., and Vattuone, M. (2010). Study of antiinflammatory activity of metabolites isolated from Tripodanthus acutifolius. *Molecular Medicine and Medicinal Chemistry*, 21, 90.

97. Kim, S. J., Um, J. Y., Hong, S. H., and Lee, J. Y. (2011). Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-KB activation in mouse peritoneal macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine,* 39(01), 171-181.

98. Chen, Z., Ma, C., and Xu, S. (1989). Mechanism of analgesic action of hyperin. *Acta Pharmaceutica Sinica,* 24(5), 326-330.

99. Zheng, M., Liu, C., Pan, F., Shi, D., and Zhang, Y. (2012). Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from Apocynum venetum leaves: possible cellular mechanisms. *Phytomedicine,* 19(2), 145-149.

100. Z Orzelska-Górka, J., Szewczyk, K., Gawrońska-Grzywacz, M., Kędzierska, E., Głowacka, E., Herbet, M., and Biała, G. (2019). Monoaminergic system is implicated in the antidepressant-like effect of hyperoside and protocatechuic acid isolated from Impatiens glandulifera Royle in mice. *Neurochemistry international*, *128*, 206-214.

101. Zheng, M., Liu, C., Fan, Y., and Shi, D. (2012). Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of hyperoside from Apocynum venetum leaves. *Latin American Journal of Pharmacy, 31*.

102. Haas, J. S., Stolz, E. D., Betti, A. H., Stein, A. C., Schripsema, J., von Poser, G. L., and Rates, S. M. K. (2011). The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Medica*, 77(04), 334-339.

103. Zhang, L., Cheng, X.-R., Juan-Juan, H., Lan, S., and Guan-Hua, D. (2011). Neuroprotective effects of hyperoside on sodium azide-induced apoptosis in PC12 cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(6), 450-455.

104. Zeng, K.-W., Wang, X.-M., Ko, H., Kwon, H. C., Cha, J. W., and Yang, H. O. (2011). Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β-protein via the PI3K/Akt/Bad/BclXL-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *European Journal of Pharmacology*, 672(1-3), 45-55.

105. Zhang, X.-N., Li, J.-M., Yang, Q., Feng, B., Liu, S.-b., Xu, Z.-H., Guo, Y.-Y., and Zhao, M.-G. (2010). Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors. *Pharmacological Reports*, 62(5), 949-955.

106. Zhou, X., and Chen, Z. (2010). Action mechanism of hyperin on neonatal rat's neuron with anoxia-reoxygenation. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 26(1), 83-86.

107. Peng, G., Wei, E., Ge, Q., and Li, X. (2005). Effects of hyperin on brain injury induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion invitro. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 40, 434-437.

108. Chen, H., Wang, J., Ren, Z., and Yang, X. (2006). Protective effect of hyperin on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 4(5), 526-529.

109. Hong-Yan, C., Jian-Hua, W., Xin-Bo, Y., Miao, G., Zheng-Ming, H., and Wen-Bin, C. (2007). Effects of Hyperin Preconditioning on Focal Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Via Ameliorating Oxidative Stress In Rats [J]. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2.

110. Liu, C.-Y., Bai, K., Liu, X.-H., Zhang, L.-M., and Yu, G.-R. (2018). Hyperoside protects the blood-brain barrier from neurotoxicity of amyloid beta 1–42. *Neural Regeneration Research*, 13(11), 1974.

111. Fu, Q., Qi, Z., and Yang, R. (2008). Inflammatory mechanism of hyperin on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 11, 22.

112. Yiqing, Z., Haigui, N., Fuqing, Z., Bin, W., Shuzhen, Z., and Xiaoming, D. (2009). Effect of hyperin preconditioning on neuroethology after global cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 12.

113. Li, Q., Chou, G., Chen, Z., and Ma, C. (2002). Inhibitory mechanism of Hyperin on the apoptosis in myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 37(11), 849-852.

114. Li, Q., Chou, G., Chen, Z., and Ma, C. (2002). Protective effects of hyperin against ischemia/reperfusion injury in rats. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 37(11), 829-832.

115. Li, S., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M., and Taylor, J. (2005). Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from Camptotheca acuminata. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 32-37.

116. Guo, X., Zhang, Y., Lu, C., Qu, F., and Jiang, X. (2020). Protective effect of hyperoside on heart failure rats via attenuating myocardial apoptosis and inducing autophagy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(4), 714-724.

117. Li, Z.-l., Hu, J., Li, Y.-l., Xue, F., Zhang, L., Xie, J.-q., Liu, Z.-h., Li, H., Yi, D.-h., and Liu, J.-c. (2013). The effect of hyperoside on the functional recovery of the ischemic/reperfused isolated rat heart: potential involvement of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 57, 132-140.

118. Huo, Y., Yi, B., Chen, M., Wang, N., Chen, P., Guo, C., and Sun, J. (2014). Induction of Nur77 by hyperoside inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Biochemical Pharmacology, 92*(4), 590-598.

119. Verma, N., Amresh, G., Sahu, P. K., Mishra, N., Rao, C., and Singh, A. P. (2013). Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. *Indian journal of experimental biology*, *51*(1), 65–72.

120. Chowdhury, S., Islam, M., Jung, H., and Choi, J. (2014). *In vitro* antidiabetic potential of the fruits of Crataegus pinnatifida. *Research in pharmaceutical sciences*, 9(1), 11.

121. Huang, K., Yang, X., and Huang, Z. (2009). Research progress in pharmacological activities of hyperoside. *Herald of Medicine*, 28, 1046-1048.

122. Islam, M. N., Jung, H. A., Sohn, H. S., Kim, H. M., and Choi, J. S. (2013). Potent α-glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from Artemisia capillaris. *Archives of Pharmacal Research*, 36(5), 542-552.

123. Makheswari, M. U., and Sudarsanam, D. D. (2013). Interaction of hyperoside and β-sitosterol with alanine transaminase using molecular docking. *Intjin Pharmacologi Reearch*, 2(17), *24*.

124. Zhang, N., Ying, M.-D., Wu, Y.-P., Zhou, Z.-H., Ye, Z.-M., Li, H., and Lin, D.-S. (2014). Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. *Plos One*, 9(7).

125. Kong, Y., Sun, W., and Wu, P. (2020). Hyperoside exerts potent anticancer activity in skin cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 25, 463-479.

126. Li, W., Liu, M., Xu, Y.-F., Feng, Y., Che, J.-P., Wang, G.-C., and Zheng, J.-H. (2014). Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncology Reports*, 31(1), 117-124.

127. Geng, M., Wang, J., Chen, H., Yang, X., and Huang, Z. (2009). Effects of hyperin on the cccDNA of duck hepatitis B virus and its immunological regulation. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44(12), 1440-1444.

128. Mahomoodally, M. F., Gurib-Fakim, A., and Subratty, A. H. (2005). Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*, 43(3), 237-242.

129. Shi, Y., Shi, R., Liu, B., and Lu, Y. (2001). Studies on antiviral flavonoids in yinqiaosan powder. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 26(5), 320-323.

130. Guo, X., Zhu, C., Liu, X., Ge, Y., Jiang, X., and Zhao, W. (2019). Hyperoside protects against heart failure-induced liver fibrosis in rats. *Acta Histochemica*, 121(7), 804-811.

131. Weizhong, Z., Zhiwu, C., and Biwei, S. (1999). The protective effect of hyperin on gastric mucosal injury in mice and its mechanism [J]. *Acta Universitis Medicinalis Nahui*, *3*.

132. Zhu, W., Xu, Y. F., Feng, Y., Peng, B., Che, J. P., Liu, M., and Zheng, J. H. (2014). Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urolithiasis*, 42(6), 519-526.

133. Yan, Y., Feng, Y., Li, W., Che, J.-P., Wang, G.-C., Liu, M., and Zheng, J.-H. (2014). Protective effects of quercetin and hyperoside on renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(3), 727-730.

134. Romagnolo, D. F., and Selmin, O. I. (2012). Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 31(3), 206-238.

135. Liu, Z., Tao, X., Zhang, C., Lu, Y., and Wei, D. (2005). Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59(9), 481-490.

136. Li, H. B., Yi, X., Gao, J. M., Ying, X. X., Guan, H. Q., and Li, J. C. (2008). The Mechanism of Hyperoside Protection of ECV-304 Cells against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Injury. *Pharmacology*, 82(2), 105-113.

137. Pukalskienė, M., Slapšytė, G., Dedonytė, V., Lazutka, J. R., Mierauskienė, J., and Venskutonis, P. R. (2018). Genotoxicity and antioxidant activity of five Agrimonia and Filipendula species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames Salmonella/microsome test. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 303-313.

138. Dişlen, E. (2007) Hidrojen Peroksitin Stabilizasyonunun İncelenmesi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana,* 1-3.

139. Yonekubo, B. T., Alves, H. d. M. C., de Souza Marques, E., Perazzo, F. F., Rosa, P. C. P., Gaivão, I. O. N. d. M., and Maistro, E. L. (2018). The genotoxic effects of fruit extract of Crataegus oxyacantha (hawthorn) in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A,* 81(19), 974-982.

140. Hosseinimehr, S. J., Mahmoudzadeh, A., Azadbakht, M., and Akhlaghpoor, S. (2009). Radioprotective effects of Hawthorn against genotoxicity induced by gamma irradiation in human blood lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics,* 48(1), 95.

141. Hosseinimehr, S. J., Azadbakht, M., Tanha, M., Mahmodzadeh, A., and Mohammadifar, S. (2011). Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by methyl methanesulfonate in human lymphocytes. *Toxicology and İndustrial Health,* 27(4), 363-369.

142. Hosseinimehr, S. J., Azadbakht, M., Mousavi, S. M., Mahmoudzadeh, A., and Akhlaghpoor, S. (2006). Radioprotective effects of hawthorn fruit extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *Journal of radiation research*, 48(1), 63–68.

143. Hosseinimehr, S. J., Azadbakht, M., and Abadi, A. J. (2008). Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mouse bone marrow cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 25*(1), 51-56.

144. Mustapha, N., Bouhlel, I., Chaabane, F., Bzéouich, I. M., Ghedira, K., Hennebelle, T., and Chekir-Ghedira, L. (2014). Aqueous Extract of Crataegus azarolus Protects Against DNA Damage in Human Lymphoblast Cell K562 and Enhances Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 172(4), 2266-2275.

145. Matić, S., Katanić, J., Stanić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, V., and Boroja, T. (2015). *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology,* 174, 287-292.

146. Akyıl, D., ve Özkara, A. Bitkilerde genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan parametreler ve uygulanan test sistemleri. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 8(2), 223-247.

147. Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., and Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology,* 49(4), 763-769.

148. Muller, H. J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science,* 66(1699), 84-87

149. Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., and Coşkun, M. (2012). *In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γH2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology,* 104(3), 212-217.

150. Makhuvele, R., Matshoga, R. G., Antonissen, R., Pieters, L., Verschaeve, L., and Elgorashi, E. E. (2018). Genotoxicity and Antigenotoxicity of selected South African indigenous plants. *South African Journal of Botany,* 114, 89-99.

151. Güner, U. (2014). Toksikoloji. *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, 2*, 186-189.

152. Şen, S., Beceren, A., and Aksoy, H. (2018). The importance of genotoxicity tests in new drug development process. *Journal of Human Sciences, 15(*3), 1634-1649.

153. Şekeroğlu, Z. A., ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi, 4(3*), 221-229.

154. Block, G., Patterson, B., and Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer, 18(*1), 1-29.

155. Norat, T., Scoccianti, C., Boutron-Ruault, M. C., Anderson, A., Berrino, F., Cecchini, M., Espina, C., Key, T., Leitzmann, M., and Powers, H. (2015). European code against cancer 4th edition: diet and cancer. *Cancer Epidemiology, 39,* S56-S66.

156. Russo, G. L., Tedesco, I., Spagnuolo, C., and Russo, M. (2017). Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Seminars in Cancer Biology, 46,* 1-13.

157. Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing–Can the performance be enhanced? *Food and chemical toxicology,* 106, 600-608.

158. Dertinger, S. D., Totsuka, Y., Bielas, J. H., Doherty, A. T., Kleinjans, J., Honma, M., Marchetti, F., Schuler, M. J., Thybaud, V., White, P., and Yauk, C. L. (2019). High information content assays for genetic toxicology testing: A report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 847, 403022.

159. Kirkland, D., Uno, Y., Luijten, M., Beevers, C., van Benthem, J., Burlinson, B., Dertinger, S., Douglas, G. R., Hamada, S., Horibata, K., Lovell, D. P., Manjanatha, M., Martus, H.-J., Mei, N., Morita, T., Ohyama, W., and Williams, A. (2019). In vivo genotoxicity testing strategies: Report from the 7th International workshop on genotoxicity testing (IWGT). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 847, 403035.

160. Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., and Ünal, F. (2016). Genotoxicity of monosodium glutamate. *Food and Chemical Toxicology,* 91, 8-18.

161. Mamur, S., Ünal, F., Yılmaz, S., Erikel, E., and Yüzbaşıoğlu, D. (2020). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug and Chemical Toxicology,* 43(2), 149-157.

162. Toropov, A. A., Toropova, A. P., Raitano, G., and Benfenati, E. (2019). CORAL: Building up QSAR models for the chromosome aberration test. *Saudi Journal of Biological Sciences,* 26(6), 1101-1106.

163. Grzesiakowska, A., Klott, A., Kuchta-Gładysz, M., Niedbała, P., Otwinowska-Mindur, A., and Szeleszczuk, O. (2017). Evaluation of BrdU Influence on Sister Chromatid Exchange in Arctic and Silver Fox. *Folia Biologica,* 65(2), 117-126.

164. Stults, D. M., Killen, M. W., Marco-Casanova, P., and Pierce, A. J. (2020). In Molecular Toxicology Protocols. *New York,* 441-457.

165. Bolognesi, C., and Fenech, M. (2019). In Genotoxicity Assessment. *New York,* 147-163.

166. Mourelatos, D. (2016). Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 803-804*, 1-12.

167. Sunada, S., Haskins, J. S., and Kato, T. A. (2019). In Radiation Cytogenetics. *New York,* 61-68.

168. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr, M., Kirchner, S., Lorge, E., and Morita, T. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 540(2), 153-163.

169. Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment,* 38(1), 18.

170. Ren, N., Atyah, M., Chen, W. Y., and Zhou, C. H. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. *Journal of translational medicine,* 15(1), 110.

171. Crotti, S., Posocco, B., Marangon, E., Nitti, D., Toffoli, G., and Agostini, M. (2017). Mass spectrometry in the pharmacokinetic studies of anticancer natural products. *Mass Spectrometry Reviews,* 36(2), 213-251.

172. Ai, G., Huang, Z., Wang, D., and Liu, Z. (2012). Study on toxicity of hyperoside in rat embryo-fetal development. *China journal of Chinese materia medica,* 37(16), 2452-2455.

173. Evans, H. J. (1984). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam, Elsevier Sciences, 405–427.

174. Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1), *53-59.*

175. Perry, P., Wolff, S. (1974). New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251 (5471*), 156-158.*

176. Speit, G., and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential Giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Human Genetics*, 70(2), 126-129.

177. Erikel, E. (2014). *In vitro* test sistemlerinde cynarin ve luteolin'in genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye*.

178. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* 455*(1), 81-95.*

179. Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. T. and Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research,* 540*, 19–28.*

180. Jayasinghe, R. G., Cao, S., Gao, Q., Wendl, M. C., Vo, N. S., Reynolds, S. M., Zhao, Y., Climente-González, H., Chai, S., Wang, F., Varghese, R., Huang, M., Liang, W.-W., Wyczalkowski, M. A., Sengupta, S., Li, Z., Payne, S. H., Fenyö, D., Miner, J. H., Walter, M. J., Caesar-Johnson, S. J., Demchok, J. A., Felau, I., Kasapi, M., Ferguson, M. L., Hutter, C. M., Sofia, H. J., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., Zenklusen, J. C., and Zhang, J. (2018). Systematic Analysis of Splice-Site-Creating Mutations in Cancer. *Cell Reports, 23*(1), 270-281.e273.

181. Ding, L., Bailey, M. H., Porta-Pardo, E., Thorsson, V., Colaprico, A., Bertrand, D., Gibbs, D. L., Weerasinghe, A., Huang, K.-l., Tokheim, C., Cortés-Ciriano, I., Jayasinghe, R., Chen, F., Yu, L., Sun, S., Olsen, C., Kim, J., Taylor, A. M., Cherniack, A. D., Akbani, R., Suphavilai, C., Nagarajan, N., Stuart, J. M., Mills, G. B., Wyczalkowski, M. A., Vincent, B. G., and Hutter, C. M. (2018). Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell*, 173(2), 305-320.e310.

182. Hutter, C., and Zenklusen, J. C. (2018). The Cancer Genome Atlas: Creating Lasting Value beyond Its Data. *Cell, 173*(2), 283-285.

183. Rau, A., Flister, M., Rui, H., and Auer, P. L. (2019). Exploring drivers of gene expression in the Cancer Genome Atlas. *Bioinformatics, 35*(1), 62-68.

184. Jackson, A. L., and Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* 477(1), 7-21.

185. Hosoya, N., and Miyagawa, K. (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Science*, 105(4), 370-388.

186. Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C., and Bohr, V. A. (2008). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30(1), 2-10.

187. Mittler R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Science*, 22(1):11-19.

188. Moloney, J. N., and Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50-64.

189. Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97-110.

190. Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C.-C., Kandaswamy, E., Zhou, T., and Zuo, L. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9(477), 488.

191. Das, A., Dey, N., Ghosh, A., Das, S., Chattopadhyay, D. J., and Chatterjee, I. B. (2012). Molecular and cellular mechanisms of cigarette smoke-induced myocardial injury: prevention by vitamin C. *Plos One*, 7(9), 68.

192. Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., and Anuradha, G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1111-1116.

193. Nazarewicz, R. R., Dikalova, A., Bikineyeva, A., Ivanov, S., Kirilyuk, I. A., Grigor'ev, I. A., and Dikalov, S. I. (2013). Does scavenging of mitochondrial superoxide attenuate cancer prosurvival signaling pathways?. *Antioxidants & redox signaling*, 19(4), 344–349

194. Borek, C. (2017). Dietary antioxidants and human cancer. *Journal of Restorative Medicine*, 6(1), 53-61.

195. Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 107-120.

196. Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., Camp, J. v., Alasalvar, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Charalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., and Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471-475.

197. Galati, G., and O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.

198. Galati, G., Teng, S., Moridani, M. Y., Chan, T. S., and O'Brien, P. J. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17(1-4), 311-350.

199. George, V. C., Dellaire, G., and Rupasinghe, H. P. V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, 1-14.

200. Umbuzeiro, G. A., Heringa, M., & Zeiger, E. (2017). In Vitro Genotoxicity Testing: Significance and Use in Environmental Monitoring. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 157, 59–80.

201. Santhiago, M. R., Netto, M. V., and Wilson, S. E. (2012). Mitomycin C: Biological Effects and Use in Refractive Surgery. *Cornea,* 31(3), 311-321.

202. Feng, Y., Chen, Y., Ren, Y., Zhang, H., and Cao, S. (2020). Synthesis and Crystal Structure Studies of Mitomycin C Dihydrate. *Crystal Structure Theory and Applications,* 9(02), 13.

203. Moller, M. N., Orrico, F., Lopez, A. C., Denicola, A., and Thomson, L. (2020). Permeability of Human Red Blood Cell Membranes to Hydrogen Peroxide. *Biophysical Journal,* 118(3), 230a.

204. Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., De Boeck, M., and Decordier, I. (2002). Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 137-148.

205. Unal, F., Taner, G., Yuzbasioglu, D., and Yilmaz, S. (2013). Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 65(4), 553-565.

206. Durante, M., Bedford, J. S., Chen, D. J., Conrad, S., Cornforth, M. N., Natarajan, A. T., van Gent, D. C., and Obe, G. (2013). From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756(1), 5-13.

207. Periasamy, R., Kalal, I. G., Krishnaswamy, R., and Viswanadha, V. (2016). Quercetin protects human peripheral blood mononuclear cells from OTA-induced oxidative stress, genotoxicity, and inflammation. *Environmental Toxicology*, 31(7), 855-865.

208. Mondal, T., Pal, S., and Dey, S. K. (2017). Quercetin Mediated Inhibition of Hydrogen Peroxide-induced Genomic DNA Damage and Toxicity. *Journal of Biologically Active Products from Nature,* 7(3), 200-213.

209. de Siqueira, W. N., dos Santos, F. T. J., de Souza, T. F., de Vasconcelos Lima, M., Silva, H. A. M. F., de Oliveira, P. S. S., da Rocha Pitta, M. G., Bezerra, M. B. C. F., e Fernandes, T. d. S., and de França, E. J. (2019). Study of the Potential Radiomitigator Effect of Quercetin on Human Lymphocytes. *Inflammation,* 42(1), 124-134.

210. Şekeroğlu, Z. A., and Şekeroğlu, V. (2012). Effects of Viscum album L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 746(1), 56-59.

211. Hanafy, Z. E. M., Eldawy, H. A. E. s., Mahrous, K. F., and Mohamed, A. K. (2016). Role of Quercetin against 2-Butoxyethanol Induced Micronucleus and Chromosome Aberrations in Mice. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 64(1), 311-318.

212. Kosti, O., Byrne, C., Cocilovo, C., Willey, S. C., and Zheng, Y.-L. (2010). Phytohemagglutinin-Induced Mitotic Index in Blood Lymphocytes: A Potential Biomarker for Breast Cancer Risk. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research,* 4, 6307.

213. Choi, J.-A., Kim, J.-Y., Lee, J.-Y., Kang, C.-M., Kwon, H.-J., Yoo, Y.-D., Kim, T.-W., Lee, Y.-S., and Lee, S.-J. (2001). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *International journal of oncology,* 19(4), 837-844.

214. Hussein, S. I., Saihood, Y. D., Majeed, A. M., Hassan, H. F., and AL-Malkey, M. K. (2017). Mitotic activity of cultured human lymphocytes treated with gold nanoparticles. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics,* 10(2), 212-215.

215. Braganhol, E., Zamin, L. L., Canedo, A. D., Horn, F., Tamajusuku, A. S., Wink, M. R., Salbego, C., and Battastini, A. M. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anti-cancer Drugs*, 17(6), 663-671.

216. Sekeroğlu, V., Aydin, B., and Sekeroğlu, Z. (2011). Viscum album L. extract and quercetin reduce cyclophosphamide-induced cardiotoxicity, urotoxicity and genotoxicity in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 12(11), 2925-2931.

217. Gajski, G., and Garaj-Vrhovac, V. (2010). Increased frequency of sister chromatid exchanges and decrease in cell viability and proliferation kinetics in human peripheral blood lymphocytes after *in vitro* exposure to whole bee venom. *Journal of Environmental Science and Health, Part A,* 45(12), 1654-1659.

218. Wilson, D. M., and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* 616(1), 11-23.

219. Michalková, R., Šiviková, K., and Galdíková, M. (2018). Analysis of Sister Chromatid Exchanges and Proliferation of Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed to Epoxiconazole. *Folia Veterinaria,* 62(3), 41-47.

220. Dirican, E., and Türkez, H. (2012). Genotoxic effect of beryllium chloride and protective role of Crataegus oxyacantha L. (Hawthorn) fruit extract *in vitro*. *Fresenius Environmental Bulletin,* 21(6a), 1578-1582.

221. Erikel, E., Yüzbaşioğlu, D., and Ünal, F. (2017). Assesment of Luteolin Genotoxicity and Antigenotoxicity Using Sister Chromatid Exchage Assay in vitro, *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity Minsk – Belarus.*

222. Engen, A., Maeda, J., Wozniak, D. E., Brents, C. A., Bell, J. J., Uesaka, M., Aizawa, Y., and Kato, T. A. (2015). Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 784, 15-22.

223. Ceker, S., Capik, O., Sengül, M., Jaberi, R., and Agar, G. (2020) The antıoxıdant and antımutagenıc propertıes of dıfferent extracts of Crataegus monogyna subsp. monogyna collected from the Eastern Anatolıa regıon of Turkey. *Bulgarian Chemical Communications,* 52,(1), 14-17.

224. Stagos, D., Spanou, C., Margariti, M., Stathopoulos, C., Mamuris, Z., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., and Kouretas, D. (2007). Cytogenetic Effects of Grape Extracts (Vitis vinifera) and Polyphenols on Mitomycin C-Induced Sister Chromatid Exchanges (SCEs) in Human Blood Lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55(13), 5246-5252.

225. Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., de Carvalho, R. F., de Souza, E. B., and de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy,* 72, 74-82.

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

227. Lepage, C. C., Thompson, L. L., Larson, B., and McManus, K. J. (2020). An automated, single cell quantitative imaging microscopy approach to assess micronucleus formation, genotoxicity and chromosome instability. *Cells,* 9(2), 344.

228. Sommer, S., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences,* 21(4), 1534.

229. Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., and Barale, R. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis,* 28(3), 625-631.

230. Pardini, B., Viberti, C., Naccarati, A., Allione, A., Oderda, M., Critelli, R., Preto, M., Zijno, A., Cucchiarale, G., and Gontero, P. (2017). Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. *British Journal of Cancer,* 116(2), 202-210.

231. Bochtler, T., Kartal-Kaess, M., Granzow, M., Hielscher, T., Cosenza, M. R., Herold-Mende, C., Jauch, A., and Krämer, A. (2019). Micronucleus formation in human cancer cells is biased by chromosome size. *Genes, Chromosomes and Cancer,* 58(6), 392-395.

232. de Quadros, A. P. O., Mazzeo, D. E. C., Marin-Morales, M. A., Perazzo, F. F., Rosa, P. C. P., and Maistro, E. L. (2017). Fruit extract of the medicinal plant Crataegus oxyacantha exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A,* 80(3), 161-170.

233. Wang, X., Yang, L., Yang, X., and Tian, Y. (2014). In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (Humulus lupulus L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1693-1700.

234. Patil, S. L., Swaroop, K., Kakde, N., and Somashekarappa, H. M. (2017). *In vitro* Protective Effect of Rutin and Quercetin against Radiation-induced Genetic Damage in Human Lymphocytes. *Indian Journal of Nuclear Medicine : IJNM : the Official Journal of the Society of Nuclear Medicine, India,* 32(4), 289-295.

235. Guo, W., Yu, H., Zhang, L., Chen, X., Liu, Y., Wang, Y., and Zhang, Y. (2019). Effect of hyperoside on cervical cancer cells and transcriptome analysis of differentially expressed genes. *Cancer Cell International,* 19(1), 235.

236. Yang, Y., Tantai, J., Sun, Y., Zhong, C., and Li, Z. (2017). Effect of hyperoside on the apoptosis of A549 human non-small cell lung cancer cells and the underlying mechanism. *Molecular Medicine Reports,* 16(5), 6483-6488.

237. Xue, C., Zhou, Y., Tao, X., Lyu, X., Zheng, L., and Zhou, Z. (2018). Enhancement effects of hyperoside on killing activity of human NK cells against pancreatic cancer PANC1 cells. *Chinese Journal of Pancreatology,* 18(5), 324-327.

238. Li, J. P., Liao, X. H., Xiang, Y., Yao, A., Song, R.-H., Zhang, Z. J., Huang, F., Dai, Z. T., and Zhang, T. C. (2018). Hyperoside and let-7a-5p synergistically inhibits lung cancer cell proliferation via inducing G1/S phase arrest. *Gene,* 679, 232-240.

239. Guon, T. E., and Chung, H. S. (2016). Hyperoside and rutin of Nelumbo nucifera induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. *Oncology letters,* 11(4), 2463-2470.

240. Zhang, F., Zhu, F.-B., Li, J.-J., Zhang, P.-P., and Zhu, J.-F. (2015). Hyperoside enhances the suppressive effects of arsenic trioxide on acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine,* 8(9), 15290-15295.

241. Hu, Z., Zhao, P., and Xu, H. (2020). Hyperoside exhibits anticancer activity in non-small cell lung cancer cells with T790M mutations by upregulating FoxO1 via CCAT1. *Oncology reports,* 43(2), 617-624.

242. Li, Y., Wang, Y., Li, L., Kong, R., Pan, S., Ji, L., Liu, H., Chen, H., and Sun, B. (2016). Hyperoside induces apoptosis and inhibits growth in pancreatic cancer via Bcl-2 family and NF-κB signaling pathway both in vitro and *in vivo*. *Tumor Biology,* 37(6), 7345-7355.

243. Fu, T., Wang, L., Jin, X.-n., Sui, H.-j., Liu, Z., and Jin, Y. (2016). Hyperoside induces both autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(4), 505-518.

244. Qiu, J., Zhang, T., Zhu, X., Yang, C., Wang, Y., Zhou, N., Ju, B., Zhou, T., Deng, G., and Qiu, C. (2020). Hyperoside Induces Breast Cancer Cells Apoptosis via ROS-Mediated NF-KB Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences,* 21(1), 131.

245. Chen, D., Wu, Y. X., Qiu, Y. B., Wan, B. B., Liu, G., Chen, J. L., Lu, M. D., and Pang, Q. F. (2020). Hyperoside suppresses hypoxia-induced A549 survival and proliferation through ferrous accumulation via AMPK/HO-1 axis. *Phytomedicine,* 67, 153138.

246. Zhu, X., Ji, M., Han, Y., Guo, Y., Zhu, W., Gao, F., Yang, X., and Zhang, C. (2017). PGRMC1-dependent autophagy by hyperoside induces apoptosis and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin treatment. *International Journal of Oncology,* 50(3), 835-846.

247. Liu, Y. H., Liu, G.H., Mei, J.J., and Wang, J. (2016). The preventive effects of hyperoside on lung cancer in vitro by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through Caspase-3 and P53 signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy,* 83, 381-391.

248. Wang, L., Yue, Z., Guo, M., Fang, L., Bai, L., Li, X., Tao, Y., Wang, S., Liu, Q., Zhi, D., and Zhao, H. (2016). Dietary Flavonoid Hyperoside Induces Apoptosis of Activated Human LX-2 Hepatic Stellate Cell by Suppressing Canonical NF-KB Signaling. *BioMed Research International,* 2016, 1068528.

249. Kwon, S.-H., Lee, S. R., Park, Y. J., Ra, M., Lee, Y., Pang, C., and Kim, K. H. (2019). Suppression of 6-Hydroxydopamine-Induced Oxidative Stress by Hyperoside Via Activation of Nrf2/HO-1 Signaling in Dopaminergic Neurons. *International Journal of Molecular Sciences,* 20(23), 5832.

250. Ye, P., Yang, X.-l., Chen, X., and Shi, C. (2017). Hyperoside attenuates OVA-induced allergic airway inflammation by activating Nrf2. *International Immunopharmacology,* 44, 168-173.

251. Ahn, H., and Lee, G.-S. (2017). Isorhamnetin and hyperoside derived from water dropwort inhibits inflammasome activation. *Phytomedicine,* 24, 77-86.

252. Devipriya, N., Sudheer, A. R., Srinivasan, M., and Menon, V. P. (2008). Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* 654(1), 1-7.

253. Blasiak, J. (2001). DNA-damaging effect of cadmium and protective action of quercetin. *Polish Journal of Environmental Studies,* 10(6), 437-442.

254. Büyükgök, E. B., ve Ötleş, S. (2008). Metaller ve Zeytinyağının Etkileşimi. *Zeytin Bilimi, 2*(2), 75-82.

255. Çimen, M. B. Y. (1999). Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences,* 19(5), 296-304.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DİLEK, Ümmügülsüm Kübra

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 29.09.1993, Kırıkkale

Medeni hali : Evli

Telefon : 05442574651

e-mail : ummugulsum.kubra.dilek@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2015
Lise	Yunus Büyükkuşçuoğlu Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-Halen	Tarım ve Orman Bakanlığı/ Şap Enstitüsü	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Dilek, Ü. K., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal F. (2020). "Investigation of genotoxic and antigenotoxic effect of hyperoside using micronucleus test on human lymphocytes" *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemica l Sciences*, Ankara, Turkey, 643 March.

Hobiler

Gezi yapmak, Doğa yürüyüşü, Kitap Okumak



GAZİ GELECEKTİR...