

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORİLAGİNİN GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif TURAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ŞUBAT 2021

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORİLAGİNİN GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Elif TURAN
(171083104)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER

ŞUBAT 2021

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 171083104 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Elif TURAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "KORİLAGİNİN GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Aycan ÇINAR**
Bursa Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Deniz ÖZKAN VARDAR
Lokman Hekim Üniversitesi

Teslim Tarihi : 1 Mart 2021
Savunma Tarihi : 17 Şubat 2021



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 190Y013 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elif TURAN

İmzası :

X



Anneme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim dönemim boyunca önemli fikir ve deneyimlerini benimle paylaşan, ders, deney ve tez sürecimde hiçbir konuda desteğini esirgemeyen çok kıymetli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deney çalışmalarım sırasında yanımda olan ve bana destek olan tüm doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, bu yolda benden desteğini esirgemeyen aileme ve değerli patronum Sayın Yener ÇELİK'e saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Şubat 2021

Elif Turan

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatür Araştırması	2
1.1.1 Antigenotoksik ajanlar	2
1.1.1.1 Antigenotoksik ajanların etki mekanizmaları.....	3
1.1.1.2. Hücre dışındaki etkileri	3
1.1.1.3. Hücre içindeki etkileri	3
1.1.2 Serbest radikaller.....	3
1.1.2.1 Serbest radikallerin neden olduğu hasarlar:	5
1.1.2.2 Serbest radikal kaynakları	5
1.1.3 Oksidatif stres	6
1.1.4 Antioksidanlar	8
1.1.4.1 Antioksidanların etki mekanizmaları	8
1.1.4.2 Antioksidanların sınıflandırılması.....	9
1.1.4.3 Doğal antioksidanlar	10
1.1.5 Korilagin	16
1.1.5.1 Korilagin yapısı ve genel özellikleri	16
1.1.5.2 Korilagin biyoaktivitesi.....	18
2. MATERYAL VE METOT	25
2.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
2.2 Hazırlanan Çözeltiler.....	25
2.3 Mikroçekerdek (MÇ) Yöntemi	26
2.4 Kromozom Anormallikleri (KA) Testi.....	29
3. BULGULAR	33
3.1 Korilagin MÇ Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerin Belirlenmesine Yönelik Bulgular	33
3.2 Korilagin KA Testi ile Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Bulgular	34
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	43
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ.....	54

KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
KA	: Kromozom anormallikleri
KKD	: Kardeş kromatit değişimi
MÇ	: Mikroçekirdek
MDA	: Malondialdehit
MMC	: Mitomisin-C
PARP	: Poly ADP riboz polymeraz
PARPi	: PARP inhibitörü
RNA	: Ribonükleik asit
ROP	: Reaktif oksijen partikülleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 : Reaktif oksijen türleri.....	4
Çizelge 1.2 : Reaktif azot türleri.....	4
Çizelge 1.3 : Serbest radikal kaynakları	6
Çizelge 1.4 : Antioksidanların sınıflandırılması	9
Çizelge 1.5 : İnsan vücudunda sentezlenebilen doğal antioksidanlar.....	10
Çizelge 1.6 : Korilagin bulunduran bazı bitkiler ve organları	17
Çizelge 3.1 : Korilagin ve korilagin ile birlikte MMC uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları.....	33
Çizelge 3.2 : Korilagin ve MMC uygulanan insan periferik lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre sayısı.....	35
Çizelge 3.3 : Korilagin ve MMC uygulanan insan periferik lenfositlerinde anormal hücre frekansı ve KA/hücre sayısı	35

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Oksidatif hücre hasarının mekanizmaları.....	7
Şekil 1.2 : Antioksidanların hücredeki etkileri	9
Şekil 1.3 : Polifenollerin sınıflandırılması.....	15
Şekil 1.4 : Korilagin yapısı	16
Şekil 2.1 : Mikroçekirdek oluşumu.	27
Şekil 2.2 : Lenfositlerde mikroçekirdeklerin mikroskop görüntüsü.	29
Şekil 2.3 : Kromozom anormallikleri	30

KORILAGİNİN GENOTOKSİK VE MİTOMİSİN-C'YE KARŞI ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve gibi organlarında organik yapılı çok sayıda ikincil metabolit çeşidi bulunur. Bu bileşiklerin, serbest radikallerin oluşturduğu genetik hasara karşı koruyucu ve önleyici etkileri olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir ve bu doğal bileşiklerin antioksidan etkileri üzerine çalışmalar hala devam etmektedir. Bu alanda özellikle polifenoller üzerinde yoğun oranda araştırma yapılmaktadır ve in vitro çalışmalarda yaygın olarak insan periferik lenfosit hücreleri kullanılmaktadır. Polifenolik bileşikler grubundan bir tanen olan korilagin; sütleğengiller (*Euphorbiaceae*), turnagagasıgiller (*Geraniaceae*) ve kınagiller (*Lythraceae*) gibi bitki familyalarına ait birçok bitki türünde bulunan ve çok çeşitli farmakolojik etkilere sahip olan bir bileşiktir. Bu tez çalışmasında, korilaginın insan periferik kan lenfosit hücrelerinde genotoksik ve mitomisin-C (MMC)'ye karşı antijenotoksik etkisi araştırılmıştır. Korilaginın sitotoksik etki göstermeyen dozlarda hem genotoksik etkileri, hem de oksidatif hasara neden olan ve genotoksik etkisi olduğu bilinen MMC'ye karşı antijenotoksik etkileri mikroçekirdek (MÇ) ve kromozom anormallikleri (KA) yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışma, 3 farklı donörden alınan kan örnekleriyle tekrarlı olarak yapılmıştır. Test maddeleri bulunmayan bir negatif kontrol grubu ile 0,2 µg/ml MMC bulunan bir pozitif kontrol grubu kullanılmıştır. Uygulama gruplarında 10, 25, 50, 100 µg/ml korilagin tek başına ve 0,2 µg/ml MMC ile eş zamanlı olarak eklenmiştir. Deneyler ve yapılan sayımlar sonucunda, korilaginın 10, 25, 50 µg/ml konsantrasyonlarında uygulandığı gruplarda MÇ ve KA frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadığı ve MMC uygulaması ile artan MÇ frekansında ve kromozom anormalliklerinde istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonda ise hasarın arttığı ve prooksidan etki gösterdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, korilaginın, MMC tarafından oluşturulan genetik hasar üzerinde doza bağlı antijenotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: korilagin, antioksidan, antijenotoksik etki, MMC, mikroçekirdek, kromozom anormallikleri

EVALUATION OF THE GENOTOXIC AND ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF CORILAGIN AGAINST MITOMYCIN-C

SUMMARY

There are many secondary metabolite types with organic structure in the organs of plants such as roots, stems, leaves and fruits. It has been reported in many studies that these compounds have protective and preventive effects against genetic damage caused by free radicals, and studies on the antioxidant effects of these natural compounds are still ongoing. In this area, intensive research is carried out especially on polyphenols and mostly human peripheral lymphocyte cells are used for in vitro studies. Corilagin, a tannin from the group of polyphenolic compounds, was chosen for use in this study. Korilagin is a compound that has a wide variety of pharmacological effects and is found in many species of plant families such as *Euphorbiaceae*, *Geraniaceae* and *Lythracea*. In this thesis study, the genotoxic and antigenotoxic effects of corilagin against mitomycin-C (MMC) in human peripheral blood lymphocyte cells were investigated. Both genotoxic effects and antigenotoxic effects of corilagin against MMC, which causes oxidative damage and is known to have genotoxic effects, at doses that do not show cytotoxic effects, were evaluated by micronucleus (MN) and chromosome aberration test methods.

This study was conducted repeatedly with blood samples taken from 3 different donors. A negative control group without test substances and a positive control group with 0.2 µg/ml MMC were used. In the treatment groups, 10, 25, 50, 100 µg/ml corilagin was added alone and simultaneously with 0.2 µg/ml MMC. Two slides were prepared from each sample and the results were examined by applying the micronucleus test protocol and chromosome aberration test protocol. As a result of the experiments and counts, it was determined that corilagine did not cause a statistically significant increase in the MN and CA frequency in the groups treated with 10, 25, 50 µg/ml concentrations, and it was also determined statistically significant decrease in the MN frequency and chromosome abnormalities caused by MMC treatment. At a concentration of 100 µg/ml, it was observed that the damage increased and the prooxidant effect was observed. The results show that corilagine has a dose dependent antigenotoxic effect on genetic damage caused by MMC.

Keywords: corilagin, antioxidant, antigenotoxic, MMC, micronucleus, chromosome aberration

1. GİRİŞ

İnsanları DNA hasarından ve sonuçlarından koruyabilecek bileşikleri belirlemek için uzun yıllardır birçok çalışma yürütülmektedir. En etkili antigenotoksik maddeleri bulabilmek adına özellikle doğal ürünler, tıbbi bitkiler ve yenilebilir bitkiler üzerinde çalışılmaktadır.

Hücrede metabolik reaksiyonlar sonucu sürekli serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Serbest radikaller birçok endojen ve eksojen kaynaktan üretilmekte ve hücrede bulunan organik bileşiklere hasar verebilmektedir. Üretilen serbest radikallerin zararları olduğu gibi yararları da vardır. Düşük yoğunlukta olduklarında enfeksiyonlara karşı savunma, kanserli hücrelerin öldürülmesi, büyüme faktörlerinin aktivasyonu, tirozin amino asidini fosfatlama, intrasellüler depolardan kalsiyum salınımı gibi olaylarda rol oynamaktadırlar (Karabulut ve Gülay, 2016a). Serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde vücutta üretilen ya da dışarıdan hazır olarak alınan antioksidanlar görev yapmaktadır.

Serbest radikaller ve antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar, sağlığın korunması ve hastalıkların yönetimi açısından yeni bir çağ vadetmektedir. Gıdalarda, ilaçlarda ve kozmetiklerde oksidatif reaksiyonların önlenmesi sayesinde yaşlanma ve kanser, otoimmün, inflamatuvar, kardiyovasküler, nörodejeneratif, kronik dejeneratif hastalıklarda reaktif oksijen türlerinin (ROT) rolü ve antioksidanların bu durumlar üzerindeki etkileri araştırılmakta ve büyük oranda olumlu sonuçlar alınmaktadır (Arouma, 2003).

Antioksidan maddelerin antigenotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda çoğunlukla fenolik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin önemli bir grubunu insan diyetinin önemli bir parçası olan ve doğada özellikle bitkisel ürünlerde yaygın olarak bulunan tanenler oluşturmaktadır.

Tanenler bitkilerin meyve, tohum, yaprak, kök gibi çeşitli organlarında bulunabilen ve bitki gelişiminde rolü olan fenolik bileşiklerdir. Tanenlerin, antioksidan ve anti-radikal aktivitelerine dayalı antiinflamatuvar, antikarsinojen, antiviral, antibakteriyel ve antiparaziter etkileri vardır (Aydın ve Üstün, 2007).

Tanen ailesinin bir üyesi olan korilagin, *Phyllanthus urinaria L.*, *Lumnitzera racemose*, *Canarium album L.*, *Phyllanthus reticulatus* gibi çeşitli şifalı bitkilerde bulunmuştur. Yapılan çalışmalar korilagin antioksidatif, antihipertansif, anti-inflamatuar, antiaterojenik, antitümör, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Ding ve diğ, 2017; Wang ve diğ, 2014; Liu ve diğ, 2017; Ahang ve diğ, 2017).

Bu tez çalışmasında korilagin genotoksik ve ayrıca kemoterapötik bir ajan olan mitomisin-C (MMC) tarafından oluşturulan genetik hasar üzerine olası antigenotoksik etkileri incelenmiştir. Korilagin genotoksik ve antigenotoksik etkileri insan periferik kan hücrelerinde mikroçekirdek ve kromozom aberasyon testi kullanılarak araştırılmıştır.

1.1 Literatür Araştırması

1.1.1 Antigenotoksik ajanlar

"Mutajen" terimi, bir organizmanın genetik materyalinde değişiklikleri indükleyebilen kimyasal veya fiziksel maddeleri ifade etmektedir. Antimutajenler, potansiyel olarak zararlı kimyasalların mutajenik etkilerini azaltabilen veya ortadan kaldıracak maddelerdir. Novick ve Szilard (1952), "antimutajen" terimini ilk olarak indüklenmiş veya kendiliğinden oluşan mutasyonların oranını veya sıklığını azaltma yeteneğine sahip ajanlar için kullanmışlardır. Bu ajan grubu, hem doğal hem de sentetik bileşikler içerir (Słoczyńska ve diğ, 2014). Antioksidan, antimutajen ve antikarsinojenik maddelerin biyolojik kaynakları bitkilerdir.

Antimutajenler; desmutajenler ve biyoantimutajenler (gerçek antimutajenler) olarak ikiye ayrılır. Hücre dışında işlev gören desmutajenler, mutajenik ajanları DNA'ya ulaşmadan önce inaktive edebilirken, biyoantimutajenler hücre içinde hareket eder ve DNA hasarından sonra mutasyon baskılamasına katılır. Bu bileşikler genom onarımını ve replikasyonunu etkileyebilir (Kada ve Shimoï, 1987).

Genotoksisite, çeşitli ajanların genetik materyale zarar verme yeteneğidir. Genetik materyalde indüklenen hasar sadece DNA'yı değil, aynı zamanda hücre içinde kromozomların işlevselliği ve davranışıyla ilgili tüm hücresel bileşenleri de içerir. Genotoksik ajanlar etkilerine veya etki tarzlarına göre mutajenler, karsinojenler veya teratojenler olarak sınıflandırılabilir ve bu da üç tür işlemle sonuçlanır: mutajenez, karsinogenez ve teratojenite (Izquierdo-Vega ve diğ, 2017). "Genotoksisite" terimi,

mutajeniteden daha geniş bir kavramdır ve bileşiklerin DNA yapısını veya hücresel aparatı ve genom bütünlüğünden sorumlu olan topoizomerazları etkileme kapasitesini tanımlar. DNA üzerindeki genotoksik etkiler her zaman mutasyonlarla ilgili değildir (Słoczyńska ve diğ, 2014). Antigenotoksik ajanlar, genotoksik ajanların hücrede neden olacağı hasarı önleyen ya da hasar oluştuktan sonra ortadan kaldıran bileşiklerdir. Antigenotoksik ajanlar sayesinde sağlıklı bir bireyi mutasyondan korumak ve kanserin oluşumunu önlemek için; hücre içi ve hücre dışı koruma mekanizmaları harekete geçirilebilir. Tümörün büyümesi önlenir.

Antigenotoksik ajanların etki mekanizmaları

Hücre dışındaki etkileri

- Mutajen alımını engelleme
- Bağırsak florasının modifikasyonu
- Devre dışı bırakma
- Koruyucu maddelerin emilimini artırma

Hücre içindeki etkileri

- Engelleme ve koruma
- Hedef olmayan hücrelerde yakalama ve detoksifikasyonun uyarılması
- Zardan madde geçişinin düzenlenmesi
- Detoksifikasyon metabolizmasının düzenlenmesi
- DNA metabolizmasının modülasyonu ve onarımı
- Sinyal yollarının düzenlenmesi
- Apoptozun uyarılması
- Genomik stabilitenin sürdürülmesi

1.1.2 Serbest radikaller

Serbest radikaller, çiftlenmemiş elektron içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Hücrede başka moleküllerle elektron alışverişine girebilen bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP)" de denilmektedir (Çavdar ve diğ, 1997; Halliwell 1991). Oldukça reaktif bir yapıya sahip olan serbest radikaller, elektron açıklarını kapamak için, diğer moleküllerle tepkimeye girerek daha kararlı yapılar oluştururlar (Reilly ve diğ, 1991).

Organizmada farklı türlerde reaktif oksijen partikülleri oluşabilir (Çizelge 1.1). En sık oluşanlar lipid radikalleridir. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen eksilirse lipid radikali oluşur. Oluşan bu lipid radikali oksijen ile tepkimeye girer ve lipid peroksi radikalini meydana getirir. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonlarına girer ve lipid hidroperoksitler oluşur. Lipid radikaller, malondialdehit (MDA) gibi sitotoksik ürünlere de dönüşebilir (Kaur ve Perkins, 1991).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) hücreler üzerinde bazı olumsuz fizyolojik etkiler gösterebilir fakat yapısında çiftlenmemiş elektronu olmadığından radikal olarak isimlendirilemez. "Reaktif oksijen partikülleri", radikaller ve H_2O_2 gibi radikal olmayan moleküller için ortak olarak kullanılan bir terimdir (Mccord, 1993). Düşük miktarda hidrojen peroksit, hücre döngüsünün düzenlenmesi, karbonhidrat metabolizması, mitokondri faaliyetleri, trombosit aktivasyonu gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar (Karabulut ve Gülay, 2016b). Yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit; ortamda Fe^{+2} , Cu^+ gibi geçiş metalleri bulunduğu Fenton reaksiyonu ile ve süperoksit radikalleri bulunduğu Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikalini ($OH\cdot$) oluşturur.

Çizelge 1.1 : Reaktif oksijen türleri (Cheeseman ve Slater, 1993; Darley-Usmar ve Halliwell, 1996; Karabulut ve Gülay, 2016b; Üzümlüoğlu, 2008).

Radikaller	Nonradikaller
Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($OH\cdot$)	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksil ($HO_2\cdot$)	Hipokloroz asit (HOCl)
Alkoksil ($LO\cdot$)	Singlet oksijen (1O_2)
Peroksil ($ROO\cdot$)	Ozon (O_3)
Tiyil radikali ($LS\cdot$)	Hipobromöz asit (HOBr)
Nitrik oksit (NO)	
Lipid peroksil ($LOO\cdot$)	

Nitrik Oksit (NO), suda çözünürlüğü düşük olan lipofilik, renksiz, kokusuz toksik bir gazdır. Moleküler oksijen, süperoksit radikalleri ve Fe, Cu, Co gibi transizyon metalleri ile kolayca reaksiyona girer. Çizelge 1.2'de gösterildiği gibi oksijen varlığında bir dizi nitrojen oksit oluşabilir (Clansy ve Abramson, 1995; Henrotin ve diğ., 2003; Jang ve Murrell, 1998).

Çizelge 1.2 : Reaktif azot türleri (Karabulut ve Gülay, 2016b).

Radikaller	Nonradikaller
Nitrik oksit (NO \cdot)	Nitrik asit (HNO $_2$)
Nitrojen dioksit (NO $_2\cdot$)	Nitroksil katyonu (NO $^+$)
	Nitroksil anyonu (NO $^-$)
	Dinitrojen tetraoksit (N $_2$ O $_4$)
	Dinitrojen trioksit (N $_2$ O $_3$)
	Peroksinitrit (ONOO $^-$)
	Peroksinitrik asit (ONOOH)
	Nitronyum katyonu (NO $_2^+$)
	Nitril klorid (NO $_2$ Cl)
	Alkil peroksinitrit (ROONO)

1.1.2.1 Serbest radikallerin neden olduğu hasarlar:

- * DNA tahribi,
- * Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,
- * Enzim aktivitelerinde değişiklikler,
- * Lipit peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- * Protein ve lipitle kovalent bağlanmaların meydana gelmesi,
- * Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- * Protein denatürasyonu ve turnover artışı,
- * Zar proteinlerinin ve buna bağlı olarak taşıma sistemlerinin bozulması,
- * Seroid ve yaş pigmenti gibi maddelerin birikimi (Cross ve diğerleri, 1987).

1.1.2.2 Serbest radikal kaynakları

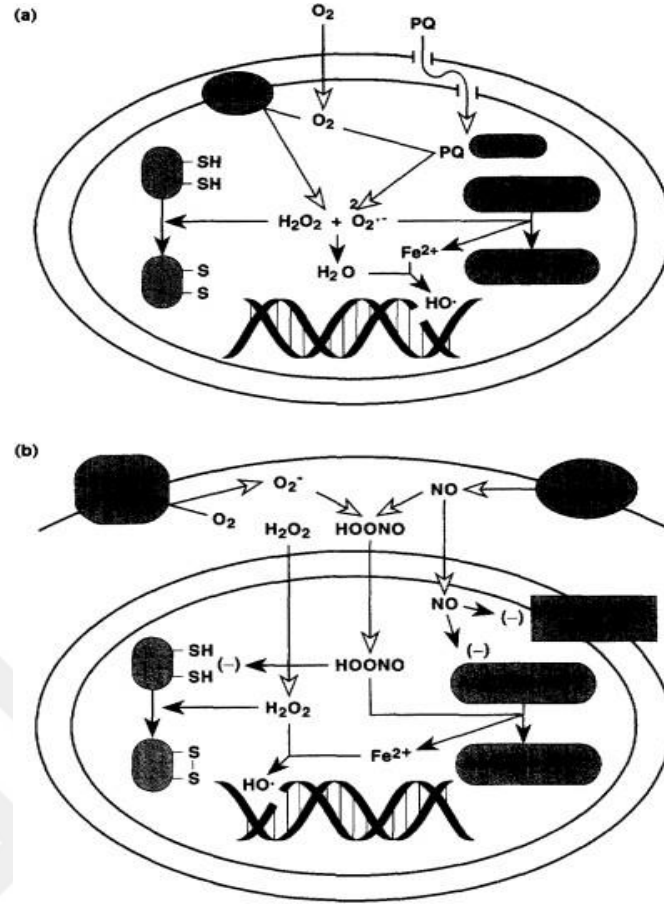
Serbest radikaller endojen ya da ekzojen kaynaklıdır (Çizelge 1.3). Başlıca endojen kaynak mitokondride katalizlenen oksijendir. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. İlaçlar, ağır metaller, radyasyon, endüstriyel kimyasallar ise ekzojen kaynaklardır (Karabulut ve Gülay, 2016b).

Çizelge 1.3 : Serbest radikal kaynakları (Karabulut ve Gülay, 2016b).

Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
1. Mitokondride katalizlenen oksijen	1. UV ışınlar, X ışınları, gama ve mikrodalga ışınları
2. Nötrofiller ve makrofajlar	2. Pişirme sırasında organik bileşiklerin yakılması
3. Lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi kaynaklar	3. Orman yangınları, volkanik faaliyetler
4. Düz kas hücreleri, trombositler ve araşidonik asit metabolizması	4. Asbest, benzen, karbonmonoksit, ozon gibi çeşitli hava kirletici maddeler
5. Endoplazmik retikulumda sitokrom sisteminde meydana gelen elektron kaçakları	5. Temizlik malzemeleri, boya, tiner, parfüm ve böcek ilaçları gibi çeşitli kimyasallar
6. Stres	6. Kloroform ve benzeri su kirletici kimyasal maddeler
7. İmmun sistem hücreleri	7. Alkol ve sigara kullanımı, sigara ve egzoz dumanı

1.1.3 Oksidatif stres

Dengelenmemiş serbest radikal saldırısı ve buna bağlı olarak hücre zarının tahrip olması, oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres; proteinlere, nükleik asitlere ve hücre zarına zarar verebilen süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), peroksil (ROO^{\cdot}), hidroksil (HO^{\cdot}), alkoksil radikali (LO^{\cdot}) gibi reaktif oksijen türlerine maruz kalmadan kaynaklanır (Şekil 1.1). Oksidatif stres, aerobik yaşam tarzının kaçınılmaz bir yan ürünüdür çünkü moleküler oksijen elektron taşıyıcılarını kimyasal olarak oksitlediğinde $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşur. Oksidatif stres; hücrelerde metabolik bozukluklara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilen reaktif oksijen ve azot türlerinin çok fazla üretilmesiyle tetiklenir. Yapılan araştırmalar, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu kümülatif hasarın çok sayıda hastalığa katkıda bulunduğunu göstermektedir (Çelik, 2009; Storz ve Imlay, 1999).



Şekil 1.1 : Oksidatif hücre hasarının mekanizmaları.

Şekil 1.1'de (a) endojen oksidanlar tarafından hücre hasarı sürecini göstermektedir. Moleküler oksijen pasif olarak hücrelere yayılır ve NADH dehidrojenaz II dahil olmak üzere flavoproteinlerin doğrudan oksidasyonu ile O₂⁻ ve H₂O₂'ye dönüştürülür. Paraquat (Pq) dahil olmak üzere redoks döngü ilaçları, elektronların sülfid redüktaz (SiRase) gibi redoks enzimlerinden oksijene transferini katalize ederek bu oksijen türlerinin oluşumunu hızlandırır. O₂⁻ demir-kükürt kümelerini oksidatif olarak yok eder. Serbest kalan demir, H₂O₂ ile reaksiyona girerek hidroksil radikali HO[•] oluşturabilir ve bu da DNA'ya doğrudan zarar verir. (b) reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin fagositoz sırasında hücre hasarına katkısını göstermektedir. O₂⁻ ve NO[•] fagositozomal membranda sırasıyla NADPH oksidaz ve NO[•] sentaz tarafından üretilir. NO[•], akonitaz (Acn) ve sitokrom oksidazın fonksiyonunu inhibe ettiği hücreye pasif olarak yayılır. HOONO, O₂⁻ ve NO[•]'nin hücre dışı reaksiyonu ile oluşur. Hücreye yayılır ve sisteinil kalıntılara ve demir sülfür kümelerine saldırır. Sistein kalıntılarını ve serbest demir ile birlikte DNA'yı okside eder. Beyaz ok uçları, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kaynaklarını, siyah ok uçları ise nedensel hasarı gösterir (Storz ve Imlayt, 1999).

1.1.4 Antioksidanlar

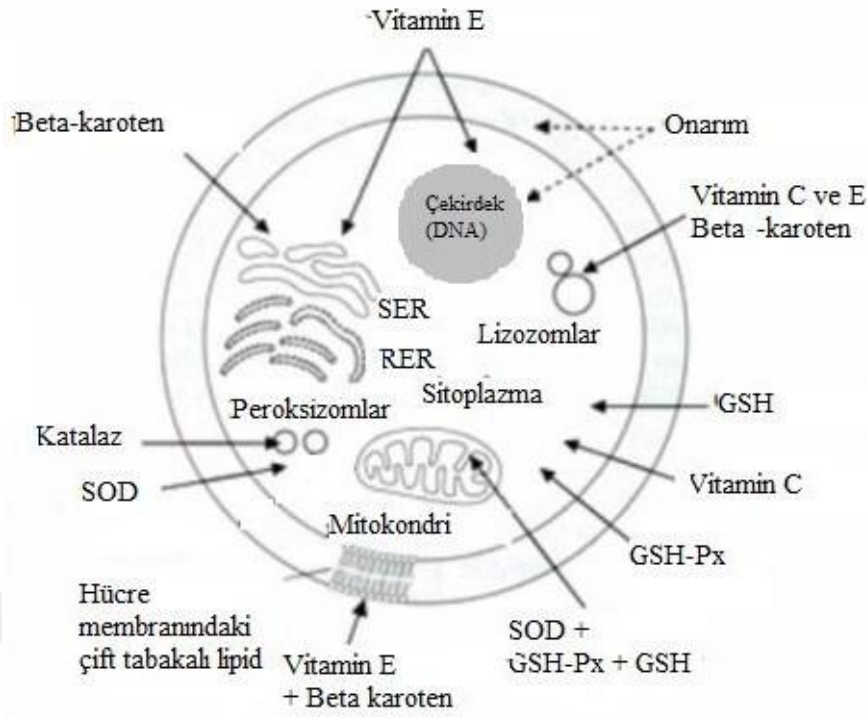
Serbest radikallerden kaynaklanan oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve etkisiz hale getirme özelliğine sahip maddelere antioksidanlar adı verilir (Eliot, 1999). Vücutta serbest radikal türlerinin oluşmasını engelleyen, bu maddelerden kaynaklanan hasarları önleyen ve detoksifikasyonu sağlayan savunma sistemlerine ise antioksidan savunma sistemleri denilmektedir. Antioksidan maddeler, serbest radikal oluşumunu engelleyerek ya da var olan radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini önleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyonel gruplar bulunan moleküllerdir (Kahkönen ve diğ, 1999).

Antioksidanlar; serbest radikallerle bağ kurarak bu moleküllerin hücrelere zarar vermelerini önler. Yağların oksidasyonunu önler veya yavaşlatırlar. Otooksidasyon ya da peroksidasyonun ilerlemesini önlerler.

1.1.4.1 Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidanlar 4 farklı şekilde etki göstermektedirler (Şekil 1.2) (Akkuş, 1995; Valko ve diğ, 2007).

- 1- Toplayıcı etki: Antioksidanların serbest serbest radikalleri tutarak yeni ve daha zayıf moleküllere dönüştürmesi toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki göstermektedir.
- 2- Baskılayıcı etki: Antioksidanların serbest radikaller ile reaksiyona girerek onlara hidrojen aktarması ve bu yolla serbest radikallerin etkilerini azaltması veya etkisiz hale getirmesidir. Vitaminler, antosiyaninler ve flavanoidler bu şekilde etki gösteren antioksidan çeşitlerindedir.
- 3- Zincir kırıcı etki: Antioksidanların serbest radikalleri kendilerine bağlaması ve zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engellemesidir. Mineraller, hemoglobin ve seruloplazmin bu şekilde etki göstermektedir.
- 4- Onarıcı etki: Serbest radikallerin DNA, lipit, protein gibi yapılarda meydana getirdiği hasarın antioksidanlar tarafından onarılmasıdır.



Şekil 1.2 : Antioksidanların hücredeki etkileri (Engin, 2007).

1.1.4.2 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4 : Antioksidanların sınıflandırılması (Akkuş, 1995; Bayram ve diğ., 2019).

Sentetik antioksidanlar	Doğal antioksidanlar	
	İnsan vücudunda sentezlenenler	İnsan vücudunda sentezlenmeyenler
BHA (Bütillenmiş hidroksianizol)	Enzimatik antioksidanlar	Karotenoidler
BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)	Enzimatik olmayan antioksidanlar	Antioksidan vitaminler
TBHQ (Tersiyer bütül hidrokinon)		Antioksidan mineraller
NDGA (Nordihidroguayaretik asit)		Polifenoller
PG (Propil Gallat)		

Sentetik antioksidanlar

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılmasının ardından oksidasyonu önlemek amacıyla doğal antioksidanların çeşitli form ve türevleri ile doğal yapıyla ilgisi olmayan yapay antioksidanlar laboratuvarında üretilmeye başlamıştır. 1940'lı yıllardan beri çok sayıda yapay antioksidan çeşidi sentezlenmiş olmasına rağmen günümüzde bunların yalnızca bir kısmı kullanılmaktadır. Gıdalarda en yaygın kullanılan sentetik antioksidan çeşitleri; Butillenmiş hidroksi anisol (BHA), Butillenmiş hidroksi toluen (BHT), Propil gallat (PG) ve Tersiyer butil hidrokinon (TBHQ)'dur (Yeşilbağ, 2009).

Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, organizmada sentezlenen (endojen) ya da dışarıdan besinlerle alınan (ekzojen) moleküllerdir. Organizmada antioksidan sentezi yaş ilerledikçe azalır. Bu azalmayla meydana gelen açığın, bitkisel antioksidanlarla kapatılabileceği düşünülmektedir (Taner, 2005). Doğal antioksidanlar bitkinin bütün kısımlarında bulunabilen fenolik ve polifenolik bileşiklerdir (Bayram ve diğ, 2019).

Doğal antioksidanlar insan vücudunda sentezlenme durumuna göre sınıflandırılır. İnsan vücudunda sentezlenebilenler; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlardır (Çizelge 1.5). İnsan vücudunda sentezlenemeyenler ise bitkisel bazı organik bileşikler ve bazı minerallerdir.

Çizelge 1.5 : İnsan vücudunda sentezlenebilen doğal antioksidanlar.

Enzimatik antioksidanlar	Enzimatik olmayan antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	Ürik asit
Glutasyon peroksidaz	Glutasyon
Glutasyon-S-Transferaz	Transferrin
Glutasyon redüktaz	Seruloplazmin
Katalaz	Melatonin
	Albumin
	Bilirubin
	Koenzim Q10
	α -Lipoik Asit

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD): SOD, ROT ve süperoksit anyon radikallerine karşı en etkili antioksidan moleküldür. SOD, süperoksit radikallerinin O₂ molekülüne yükseltgenmesini ve hidrojen peroksit molekülüne indirgenmesini katalizler (Aslankoç ve diğ, 2019).

Glutasyon Peroksidaz (GPx): Glutasyon peroksidaz, mitokondri ve sitozolde hidrojen peroksidi suya parçalayan önemli bir antioksidandır. Lipit peroksidasyonunun kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır (Aslankoç ve diğ, 2019; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Glutasyon peroksidaz, selenyum bulunduran dört protein alt ünitesinden meydana gelir. Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu (GSH) kullanarak H₂O₂'yi ve lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler gibi organik hidroperoksitleri metabolize eder (Karabulut ve Gülay, 2016a).

Glutasyon-S-Transferaz (GST): Elektrofilik ve hidrofobik moleküllerin glutasyon ile konjugasyonunu katalizleyerek, daha kolay atılabilen ve daha az toksik moleküllere dönüşümünü sağlayan antioksidan bir enzimdir. Merkaptürik asit biyosentezi reaksiyonlarına aracılık ederler (Tozkoparan ve Aytaç, 2007; Orhan ve Şahin, 1995).

Glutasyon Redüktaz (GR): Hücre içi glutasyon (GSH) seviyesinin korunmasını sağlayarak oksidatif hasarın önlenmesinde rol oynamaktadır. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksitin hücredeki düzeyini azaltmaktan sorumludur (Meister, 1994).

Katalaz (CAT): Katalaz, dört protein alt ünitesinden oluşur. Alt ünitelerin her biri, bir hem grubu ve bir NADPH molekülü bulundurur. Mitokondri, peroksisom ve endoplazmik retikulumda katalaz bulunurken, kloroplastta bulunmaz. Hidrojen peroksit molekülünün, H₂O ve O₂'ye dönüşümünü katalize eder. Hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumunu engelleyerek antioksidan etki gösterir. Katalaz; eritrositlerde, karaciğerde, iskelet kası hücrelerinde, kalp ve beyinde bulunmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016a; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Enzimatik olmayan antioksidanlar

Ürik Asit: Metabolik bir atık olan ürik asit, yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu kristalize olarak, böbrek taşları ve gut artrisine neden olabilir. Ürik asit, düşük konsantrasyonlarda bulunduğu kanın toplam antioksidan kapasitesinin yaklaşık yarısını oluşturur. Ürik asit; hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi birçok serbest

radikali etkisiz hale getirir ve geçiş metalleri elatlar. Lipit peroksidasyonunu engelleyerek de koruyucu görev yapar (Karabulut ve Gülay, 2016a).

Glutasyon (GSH): Glutasyon; kataliz ve taşınma dahil birçok biyolojik süreçte görev alan, suda çözünebilen bir tripeptiddir (Bannai, S., & Tateishi, N. 1986). Endojen bir antioksidan olan GSH, serbest radikalleri nötralize ederek vücudu korur. Ksenobiyotiklere çok sık maruz kalan karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi organlarda yüksek yoğunluklarda bulunur. Glutasyonun yaklaşık %85-90'ı sitoplazmada ve geri kalanı mitokondri, çekirdek, peroksizom ve endoplazmik retikulumda bulunur. Glutasyonun sentezi sırasında ilk olarak glutamin-sistein ligaz tarafından glutamin ve sistein bağlanarak -glutamilsistein oluşturulur. Ardından glutasyon sentetaz (GSS) tarafından, -glutamilsisteine glisin bağlanarak GSH molekülü meydana getirilir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

Transferrin: Transferrin serumda yüksek yoğunlukta, diğer vücut sıvılarında düşük yoğunlukta bulunur. oğalmakta olan hücrelere demir taşımaktan sorumludur (Loeffler ve ark, 1995). Demir iyonları, fenton reaksiyonlarıyla hidrojen peroksitin hidroksil radikallerine dönüşümünü katalizlediğinden, oksidatif stresin artışına neden olur. Transferrin, serbest demir konsantrasyonunu düşürerek oksidatif stresi azaltır ve bu Şekilde antioksidan etki gösterir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

Seruloplazmin: Seruloplazmin, vücutta çeşitli organ ve dokularda sentezlenen önemli bir antioksidan proteindir. Seruloplazmin, oksidaz aktivitesi sayesinde demir metabolizmasında önemli rol oynar. Seruloplazmin bakıra geri dönüşümlü bağlanarak kandaki bakırın %95'ini taşır ve bakır metabolizmasında önemli rol oynar. Ayrıca eritrositlerde bulunan doymamış yağ asitlerini oksijen radikallerine karşı korur (Demir ve diğ, 2002; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

Melatonin: Melatonin; epifiz bezinden, kemik iliği hücrelerinden ve gastrointestinal sistemden salgılanarak uyku, üreme gibi çeşitli biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde rol alan bir hormondur. Melatonin; serbest radikalleri detoksifiye eder, proteinleri, lipitleri, ekirdek DNA'sını ve mitokondriyel DNA'yı serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur (Yazıcı ve Köse, 2004; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

Albumin: Albumin vücut içerisinde sıvı dağılımında ve ozmotik basıncın düzenlenmesinde görev alan bir protein olduğu için birçok fizyolojik ve farmakolojik öneme sahiptir. Albumin plazmada en çok bulunan proteindir ve serbest radikalleri tutma özelliği sayesinde güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a). Albüminin birçok antioksidan aktivitesi, ligand bağlama kapasitesinden kaynaklanır. Albümin; metal iyonları, yağ asitleri, ilaçlar ve ayrıca hormonlar gibi molekülleri bağlama kabiliyetiyle bilinir. Albümin yapısının esnekliği, ligandlara kolayca uyum sağlar (Roche ve diğ, 2008).

Bilirubin: Bilirubin, ömrünü dolduran alyuvarların parçalanması sırasında hemoglobinin yıkımı sonucunda açığa çıkar. Kan yoluyla karaciğere gelir ve burada safranin yapısına katılır, ardından dışkı ve idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Bilirubin, peroksil radikalleri üzerinde gösterdiği zincir kırıcı etki sayesinde güçlü bir antioksidandır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

Koenzim Q10: Koenzim Q10; solunumda elektron taşıma zincirinde görev alan elemanlardan biridir ve mikrozom, mitokondri gibi organellerin ve hücre membranlarının bileşeni olan lipofilik bir antioksidandır. Koenzim Q10 molekülünün kandaki derişimi yaşlanma, stres ve çevresel faktörlere bağlı olarak azalma gösterir. Koenzim Q10, mitokondri iç zarında bulunarak elektron taşıma sistemine katılır ve serbest radikal oksidasyonunu önleyerek oksidatif stresi azaltıcı etki gösterir (Gürkan ve Bozdağ-Dündar, 2005). Koenzim Q10 serbest radikalleri süpürücü, lipit ve protein peroksidasyonunu baskılayıcı olarak antioksidan etki gösterir. İndirgenmiş formu olan ubikinol (CoQH₂), elektron taşıma sisteminde elektron ile proton taşır ve lipofilik bir antioksidan olarak görev yapar. Ubikinol, oksidanları elektron vererek oksidanları nötralize eder, H₂O₂ ve O₂^{·-} gibi toksik moleküllere karşı etkin bir koruma sağlayarak çok güçlü bir antioksidan etki gösterir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a).

α-Lipoik Asit (LA): Bu molekül, Krebs döngüsünde görev yapan dehidrogenaz enziminin kofaktörüdür (Trattner ve ark, 2007). Diyetle kolay emilebilen lipoik asit ve indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asit (DHA), metalleri şelatlayarak onların olumsuz etkilerini azaltır ve serbest radikallere hem sulu hem de yağlı ortamda müdahale eder (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). α-Lipoik asit (LA); serbest radikalleri süpürerek antioksidan etki gösterir (Karabulut ve Gülay, 2016a).

İnsan vücudunda sentezlenmeyen antioksidanlar

Karotenoidler: Karotenoidler bitkilerde sarı, turuncu ve kırmızı renklerin oluşmasını sağlayan, suda erimeyen, genel olarak bitkisel yağlarda eriyen pigmentlerdir (Cemeroğlu ve Acar, 1986). Doğada en yaygın bulunan pigmentlerdir ve isimlerini ilk kez izole edildikleri *Dautus carrota* (havuç)'dan almışlardır. Günümüzde yaklaşık 600 çeşidi bilinen karotenoidler; metillenmiş, konjuge çift bağlar bulduran, doymamış alifatik zincir yapısında moleküllerdir (Çalımlı, 2003). Karotenoidler, lipoprotein molekülleri ile taşınırlar ve kalp hastalığı riskinin azaltılmasında önemli fizyolojik etkiye sahiptirler (Palace ve ark, 1999). Antioksidan kapasitesi en yüksek olan karotenoidler; likopen, lutein ve β -karotendir.

Antioksidan vitaminler: E vitamininin, immünokompetans, membran ve DNA onarımına katkısı ve oksidatif DNA hasarını azaltmasıyla karsinogenezin çeşitli evrelerinde önemli rol oynayan zincir kırıcı önemli bir antioksidan olduğu düşünülmektedir (Kimmick ve diğ., 1997). Suda çözünür antioksidanlardan biri olan C vitamininin, reaktif oksijen türlerini nötralize ettiği ve oksidatif DNA hasarını ve dolayısıyla genetik mutasyonları azalttığı bildirilmiştir. Üçüncü doğal antioksidan vitamin olan A vitamini, düşük kısmi oksijen basıncında dokularda peroksil radikallerinin yakalanmasında rol oynar (Frei, 1994).

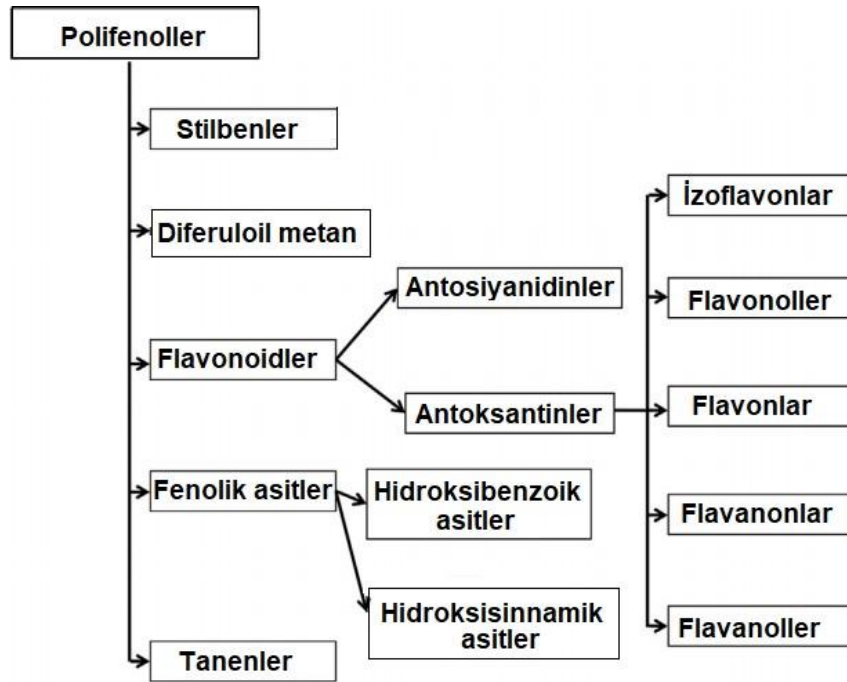
Antioksidan mineraller: Çinko, bakır, selenyum, manganez gibi minerallerin toksik etkileri olduğu gibi, düşük dozlarda alındıklarında antioksidan savunma sistemini destekleyici ve antioksidan olarak etki yaptıkları gözlenmiştir (Prasad ve diğ., 2004; Gaetke ve Chow, 2003; Burk, 2002; Coassin ve diğ., 1992).

Polifenoller: Polifenoller, diyetle en bol bulunan antioksidanlardır. Toplam diyet alımları 1 g/gün kadar yüksek olabilir ki bu, diğer tüm fitokimyasal sınıflarından ve bilinen diyet antioksidanlarından çok daha yüksektir. C vitamini alımından 10 kat, E vitamini ve karotenoid alımından 100 kat daha fazladır. Temel kaynakları; meyveler ve meyve suları, çay, kahve ve kırmızı şarap gibi bitki kaynaklı içeceklerdir. Sebzeler, tahıllar, çikolata ve kuru baklagiller de toplam polifenol alımına katkıda bulunur (Scalbert, Johnson ve Saltmarsh, 2005). Mevcut kanıtlar, polifenollerin kardiyovasküler hastalıkların, kanserlerin ve osteoporozun önlenmesine olan katkısını güçlü bir şekilde desteklemekte ve nörodejeneratif hastalıkların ve diabetes mellitusun önlenmesinde önemli rol oynadıklarını göstermektedir (Scalbert ve diğ., 2005). Polifenollerin yapısında bir ya da daha fazla benzen halkası ve bunlara

bağlanmış birden fazla OH grubu bulunur. Polifenoller genellikle serbest halde değildir ve ester ya da glikozit formda bulunurlar (Çimen ve diğ, 2020). Polifenoller stilbenler, flavonoidler, diferuloil metan, fenolik asitler ve tanenler olmak üzere beş grupta incelenir (Şekil 1.3).

Tanenler kestane, meşe, nar, üzüm, sumak gibi bitkilerde bol miktarda bulunan, kimyasal yapıları oldukça farklılık gösteren ve suda çözünebilir polifenollerdir. Bitkilerin kök, meyve, yaprak, tohum ve kabuklarında bulunan gevşek yapıları buruk tatta bileşiklerdir. Tanenler; kompleks tanenler, gallotanenler, kondense tanenler ve elajitanenler olmak üzere dört grupta incelenirler (Ergezer ve Çam, 2008). Tanenler, hidrolize olabilen ve hidrolize olmayan tanenler şeklinde yapılarına göre de gruplandırılabilirler (Aydın ve Üstün, 2006).

Elajitanenler yüksek moleküler ağırlıklı suda çözünür bileşiklerdir. Hekzahidroksifenik asit ve bir poliolün esterleridir. Asitler veya bazlara maruz kaldıklarında ester bağları kopar ve heksahidroksidifenik asit suda çözünmeyen elajik asite dönüşür (Clifford ve Scalbert, 2000). Ellajitanenler; nar, ahududu, çilek, ceviz, fındık, badem gibi meyveler ve kuruyemişlerde bulunan biyoaktif polifenol ailesidir (Heber, 2011).



Şekil 1.3 : Polifenollerin sınıflandırılması (Pandareesh ve diğ, 2015).

Çizelge 1.6 : Korilagin bulunduran bazı bitkiler ve organları (Li ve diğ, 2018).

Familya	Bitki	Organ
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn.	Yaprak
	<i>P. tenellus</i> Roxb.	Tüm bitki
	<i>P. emblica</i> L.	Meyve
	<i>P. muellerianus</i> (Kuntze) Exell.	Yaprak
	<i>P. niruri</i> L.	Yaprak
	<i>P. urinaria</i> L.	Yaprak
	<i>P. ussuriensis</i> Rupr. et Maxim.	Toprak üstü organlar
	<i>P. wightianus</i> Müll.Arg.	Tüm bitki
	<i>Euphorbia longana</i> Lam.	Tohum kabuğu
	<i>E. pekinensis</i> Rupr.	Toprak üstü organlar
	<i>E. prostrata</i> Aiton	Tüm bitki
	<i>Acalypha hispida</i> Burm.f.	Yaprak
	<i>A. wilkesiana</i> Müll.Arg.	Yaprak
	<i>Alchornea glandulosa</i> Poepp.	Yaprak
	<i>Excoecaria agallocha</i> L.	Tüm bitki
	<i>Macaranga tanarius</i> Müll.Arg.	Yaprak
	<i>Mallotus japonicus</i> Müll.Arg.	Yaprak
	<i>Jatropha curcas</i> L.	Yaprak
	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth.ex Hook.f.	Yaprak
	Geraniaceae	<i>Geranium bellum</i> Rose
<i>G. carolinianum</i> L.		Toprak üstü organlar
<i>G. pyrenaicum</i> Burm.f.		Toprak üstü organlar
<i>G. potentillifolium</i> DC.		Toprak üstü organlar
<i>G. sibiricum</i> L.		Toprak üstü organlar
<i>G. thunbergii</i> Siebold ex Lindl. & Paxton		Tüm bitki
<i>G. wilfordii</i> Maxim.		Tüm bitki
<i>Erodium cicutarium</i> L'Hér. ex Aiton		Toprak üstü organlar
<i>E. stephanianum</i> Willd. Aerial part		Toprak üstü organlar
<i>Pelargonium reniforme</i> Spreng.		Toprak üstü organlar
Combretaceae	<i>Terminalia arjuna</i> (Roxb. ex DC.) Wight & Arn.	Meyve kabuğu
	<i>T. bellirica</i> (Gaertn.) Roxb.	Meyve
	<i>T. catappa</i> L.	Yaprak
	<i>T. chebula</i> Retz.	Meyve kabuğu
	<i>T. citrina</i> (Gaertn.) Roxb.	Meyve kabuğu
	<i>T. macroptera</i> Guill. & Perr.	Yaprak
	<i>Lumnitzera racemosa</i> Willd.	Yaprak
Aceraceae	<i>Acer amoenum</i> Carrière	Yaprak
	<i>A. nikoense</i> (Miq.) Maxim.	Yaprak
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i> Lour.	Meyve kabuğu
	<i>Nephelium lappaceum</i> L.	Meyve kabuğu
Asclepiadaceae	<i>Cynanchum paniculatum</i> (bunge) kitagawa	Tüm bitki
Burseraceae	<i>Canarium album</i> L.	Meyve
Cunoniaceae	<i>Cunonia macrophylla</i> Brongn. & Gris	Yaprak
Leguminosae	<i>Caesalpinia coriaria</i> (Jacq.) Willd.	Tüm bitki
Ericaceae	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	Tomurcuk
Guttiferae	<i>Caraipa densifolia</i> Mart.	Meyve
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea stellata</i> Willd.	Çiçek
Polygonaceae	<i>Polygonum chinense</i> L.	Toprak üstü organlar
Rutaceae	<i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) DC.	Meyve
Saururaceae	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Bail.	Toprak üstü organlar

1.1.5.2 Korilagin biyoaktivitesi

Korilagin bulunan ilk biyoaktivitesi, RNA tümör virüslerinin ters transkriptaz aktivitesini inhibe etmesidir. Daha sonra yapılan çalışmalarda korilagin antitümör, antihipertansif, antimikrobiyal, antioksidan, hepatoprotektif, antiinflamatuvar aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikleri olduğu ve tip II diyabet hastalığının kontrol altına alınmasında etkili olduğu gözlemlenmiştir (Li ve diğ., 2018).

Elajitanenlerden biri olan korilagin, glikoz içeren doğal bir üründür (Yamada ve diğ., 2008). *P. amarus*, *P. urinaria* L., *L. racemose*, *C. album* L., *P. reticulatus* ve *G. carolinianum*'dan ekstrakte edilen bir polifenol olan korilagin, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikler gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahiptir. Yapılan çalışmalar, korilagin proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu engellediğini ve ROT üretimini, serbest radikal oluşumunu ve in vitro lipid peroksidasyonunu azalttığını ortaya koymuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, anti-hiperaljezi, anti-fibroz, antiviral, antihipertansif, anti-enflamatuar, hepatoprotektif, antioksidan ve anti-tümör aktiviteleri gibi korilagin çeşitli farmakolojik aktiviteleri de rapor edilmiştir. Korilagin in vivo ilaç metabolizması sadece zayıf farmakokinetik modellere yol açmakla kalmaz, aynı zamanda bileşiklerin etkinliğine ve güvenliğine de büyük katkı sağlar. Ayrıca metabolit profili, ilaçların etkinliğini, güvenliğini ve daha da geliştirilmesini açıklamada önemli bir rol oynamaktadır (Lv ve diğ., 2019; Yisimayili ve diğ., 2019).

Özellikle son yıllarda korilagin biyolojik aktivitesi ile ilgili çok çeşitli araştırmalar olduğu dikkat çekmektedir.

Liu ve diğ. (2020), yaptıkları bir çalışmada, insan laringeal karsinoma hücre hatları Hep-2, TU212 ve HBE ile 4-5 haftalık atimik çıplak fareler kullanmışlar ve korilagin laringeal kanser hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Öncelikle farelere Hep-2 hücrelerini enjekte edip tümör oluşumunu sağlamış, ardından fareleri 3 gruba ayırıp üç günde bir 0, 15 ve 30 mg/kg korilagin uygulamışlar ve 3 günde bir tümörlerin hacmini ölçmüşlerdir. Çalışmalarından elde ettikleri bulgulardan yola çıkarak korilagin, mitokondriyal apoptotik ve endoplazmik retikulum stres sinyal yollarını aktive ederek, ayrıca Akt ve STAT3

yollarını inhibe ederek insanda gırtlak kanserini önleme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Luan ve diğ. (2019), korilaginın PARP inhibitör direnci üzerindeki etkisini incelemek için PARPi duyarlı ve dirençli bir çift hücre hattı kullanmışlardır. Elde ettikleri bulgularla korilaginın DNA onarım fonksiyonu olmadığı ve PARPi ile birlikte uygulandığında yumurtalık kanseri hücre modelinde sinerjist sitotoksik etki yarattığı sonucuna ulaşmışlardır. Korilagin normal hücreler üzerinde çok az toksik etkiye sahip olduğu için, PARPi ile birlikte yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Zhou ve diğ. (2019), korilaginın miR-21 düzenlemeli hepatik fibröz sinyal yolu üzerindeki etkisini incelemek için, insan hepatik stellat hücre hattı LX2 ve 30 tane 180-220 g ağırlığında erkek Sprague–Dawley sıçan kullanmışlardır. Hücre hatlarına 25, 50 ve 100 µg/ml ve sıçanlara 15 mg/kg, 30 mg/kg ve 60 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Elde ettikleri bulgulardan, korilaginın TGF-β1/Smad sinyal yoluna müdahale ederek antifibrojenik özelliklere sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Lv ve diğ. (2019), korilaginın asetaminofen kaynaklı hepatoksisite üzerindeki etkisini incelemek amacıyla HepG2 hücre hatlarına 6 saat süreyle 7.5, 15 ve 30 mM, 6-8 haftalık 18-22 g ağırlığında erkek yabani tip farelere 15, 30 ve 60 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda asetaminofen nedeniyle oluşan karaciğer hasarına karşı korilaginın koruyucu etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Xu ve diğ. (2019), korilaginın mide kanser hücreleri üzerindeki etkisini incelemek için SGC7901 ve BGC823 insan mide kanser hücresi hatlarına 24 saat süreyle 10, 20, 30, 40 ve 50 µM korilagin uygulamışlardır. Çalışmalarından elde ettikleri bulgulardan yola çıkarak, korilaginın mide kanser hücreleri üzerinde otofaji etkisi olduğunu ve bu etkisiyle beraber hücrelerde büyümeyi baskıladığı sonucuna ulaşmışlardır.

Li ve diğ. (2019), korilaginın *Herpes simplex* ensefalitine karşı bağışıklık tepkisi üzerindeki etkisini incelemek için 3 haftalık 11-13 g ağırlığındaki Balb/c farelerine günlük 40 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda korilaginın, TLR3 sinyal yolunu inhibe ederek ve inflamatuvar sitokinlerin salımını azaltılarak inflamatuvar yanıtı hafifletebildiği sonucuna ulaşmışlardır.

Nandini ve diğ. (2019) korilaginın hiperglisemi, hiperlipidemi ve oksidatif stres üzerindeki etkisini incelemek için streptozotosin aracılığı ile diyabet oluşturulan 180-210 g ağırlığında Wistar sıçanlara 10 ve 20 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Korilagin tedavisinin, diyabetik sıçanlarda hiperglisemi, hiperlipidemi ve oksidatif stresi iyileştirdiği ve bu bileşiğin antidiyabetik aktivitesinin, β -hücresi stimülasyonuna ek olarak iskelet kası tarafından artan periferik glikoz kullanımından kaynaklanabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Yisimayli ve diğ. (2019), yaptıkları bir çalışmada korilaginın metabolik profilini analiz etmişlerdir. Bu amaçla, sıçan karaciğer mikrozomları ve 36 tane 220 gram ağırlığında erkek Sprague-Dawley sıçan kullanmışlardır. Sıçanlara 250 mg/kg, mikrozomlara 100 μ M korilagin uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda, korilaginın sıçanlarda sadece metabolizmaya maruz kalmadığını, aynı zamanda EA, GA, M3 metabolitlerini ve ayrıca in vitro sıçan bağırsak mikroflorası ve karaciğer mikrozomlarını oluşturmak için hidrolize maruz kaldığını gözlemlemişlerdir. Korilaginın metabolik yollarının hidroliz, indirgeme, metilasyon, glikozilasyon, glukuronidasyon ve sülfatlamayı içerdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Zhang ve diğ. (2019), korilaginın alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla AML12 hepatositlere 24, 48 ve 72 saat süreyle 2.5, 5, 10, 20 ve 40 mM; altı haftalık erkek C57BL6 farelere 48 saat aralıkla günde 20 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda korilaginın oksidatif stresi azaltarak, otofajik akıyı geri yükleyerek ve mitokondriyal fonksiyonu iyileştirerek lipid birikimini hafifletme etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tong ve diğ. (2018) tümörsüz meme epiteli ve meme kanseri hücre hatları (MCF-7, SK-BR 3 ve MDA-MB-231) kullanmış ve 40, 60, 80 μ mol/L korilagin uygulamışlardır. Çalışma sonucunda korilaginın, reaktif oksijen türlerine bağlı apoptoz ve otofaji yoluyla meme kanseri büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Zhao ve diğ. (2018), RAW264.7 hücre hattı ve altı haftalık spesifik patojensiz Balb / c erkek fareler (18-22 g) ile yaptıkları çalışmada, korilaginın şistozom yumurtasından kaynaklanan hepatik fibrozis üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları testler sonucunda 100 μ g/ml korilagin uygulanan hücrelerin canlılığının yaklaşık % 80 olduğunu görmüş ve RAW264.7 hücre hattına 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, ve 100 μ g/ml

korilagin uygulamışlardır. Farelere üç hafta boyunca günde 20, 40, ve 80 mg/kg korilagin vermiş ve korilagin, hepatik makrofajlarda IL4/IL13/Stat6 sinyal yolu vasıtasıyla şistozom yumurtasından kaynaklanan karaciğer fibrozisini inhibe ettiğini gözlemişlerdir.

Deng ve diğ. (2018), korilagin hepatosellüler karsinoma hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkisini araştırmak için üç farklı HCC hücre hattı (SMMC-7721, Bel-17402 ve MHCC97-H) kullanmışlardır. Hücrelere uyguladıkları korilagin dozları; 6.25, 12.5, 25, 50, 75 ve 100 µM şeklindedir ve çalışma sonucunda korilagin, HCC hücre hatlarında apoptozu mitokondriyal apoptotik yolla ve reseptörler aracılığıyla indüklediğini gözlemişlerdir.

Yu ve diğ. (2018), korilagin kronik epilepsi üzerindeki etkisini araştırmak için 200-250 g ağırlığındaki altı haftalık erkek Wistar sıçanları kullanmış ve sıçanlara 10 mg/kg ve 20 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, korilagin sıçanlarda nöbet sıklığını azalttığını ve bilişsel fonksiyonu geliştirdiğini gözlemişlerdir.

Zhou ve diğ. (2018), korilagin anti-alerjik etkisini araştırmak için 12 Dunkin Hartley kobay faresi (320-400 g), 12 İsviçre albino faresi (20-25 g), 12 Sprague Dawley sıçanı (180-200 g) kullanmış ve deney hayvanlarını 6 gruba ayırıp oral yolla 10, 20 ve 40 mg/kg korilagin uygulamışlardır. Çalışma sonucunda korilagin mast hücrelerinin degranülasyonunu inhibe ederek alerji ve anafilaktik reaksiyonu azalttığını gözlemişlerdir.

Ding ve diğ. (2017), sıçan serebral iskemisinde korilagin antioksidan ve pro-anjiyojenik etkilerini incelemek için 280-320 g ağırlığındaki Sprague-Dawley sıçanlarına 10, 30 and 70 mg/kg korilagin uygulamış ve korilagin beyin iskemik hasarına karşı nöroprotektif etkilere sahip olduğunu gözlemişlerdir.

Attar ve diğ. (2017), korilagin SKOV3 yumurtalık kanseri hücre hattında apoptotik ve genomik etkisini incelemek için HTB77 hücre kültürlerine 5, 10, 25, 50 ve 100 µM korilagin uygulamış ve çalışma sonucunda, korilagin epitelyal over kanseri için yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılacak potansiyele sahip olabileceğini gözlemişlerdir.

Reddy ve diğ. (2018), HCV replikonu bulunan hepatom hücre hattı (Rep2a) ve Huh7.5 hücre hattıyla yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine 10, 20, 30, 50, 100, 150

ve 200 μ M korilagin uygulamış ve korilagin HCV replikasyonunu bloke ettiğini ve ayrıca oksidatif stresi modüle ettiğini gözlemlemişlerdir.

Guo ve diğ. (2017), erkek Sprague-Dawley sıçanlar (250–300g) ile yaptıkları çalışmada korilagin akut akciğer hasarı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla sıçanlara 20 ve 40 mg/ml korilagin uygulamış ve çalışma sonucunda korilagin oksidatif stresi ve anti-apoptotik aktiviteyi azaltarak akciğer hasarını azalttığını gözlemlemişlerdir.

Gu ve diğ. (2016), sekiz haftalık atimik çıplak fareler ve QBC9939, MZ-Cha-1 kanser hattıyla yaptıkları çalışmada, farelere intraperitoneal yolla 20 mg/kg, hücre kültürlerine ise 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 μ mol korilagin uygulamış ve çalışma sonucunda korilagin Notch sinyal yolu yoluyla kolanjiokarsinom ilerlemesini baskıladığını gözlemlemişlerdir.

Muresan ve diğ. (2015), Calu-3 hücre hattına 10 μ M korilagin uygulayarak yaptıkları çalışma sonucunda sigara dumanının neden olduğu akciğer epitel hücrelerindeki hücresel bağlantı kaybının korilagin tarafından zayıflatıldığını gözlemlemişlerdir.

Jia ve diğ. (2013), insan yumurtalık kanseri hücre hatları SKOv3ip ve Hey ile yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine 20 ve 40 μ M korilagin uygulamış ve çalışma sonucunda korilagin yumurtalık kanseri hücrelerinin büyümesine karşı etkili bir terapötik madde olduğunu gözlemlemişlerdir.

Rencüzoğulları (2018), A549 Hücre hattı ile yaptığı çalışmada, hücrelere 5, 10, 25 ve 50 μ M korilagin uygulamış ve korilagin akciğer kanser hücreleri üzerinde antitümöral etkiye sahip olduğunu gözlemlemiştir.

Hwang ve diğ. (2020), yaptıkları bir çalışmada insan kolon karsinomu SNU-C2A hücreleri, prostat karsinomu DU145 hücreleri, göğüs karsinomu MCF-7 hücreleri, normal prostat RWPE-1 hücreleri ve normal göğüs MCF-10A hücrelerine 5, 10, 20, 30 ve 50 μ m korilagin uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda korilagin Wnt/- katenin sinyal yolu ve TGF β ile indüklenen EMT süreci üzerinde potansiyel etkileri olduğunu belirlemişlerdir. Korilagin mezenkimal belirteçlerin düzeylerini azalttığını ve epitelyal belirteçlerin düzeylerini artırdığını, ayrıca EMT güdümlü sinyallerin bloke olmasına neden olarak hücre istilasını ve metastazı inhibe ettiğini, TGF β ile uyarılan tümör hücrelerinde Wnt/- katenin sinyal zincirini iptal ettiğini

gözlemişlerdir. Korilaginın anti-metastatik potansiyelini uygun klinik öncesi modellerde değerlendirmek için ek deneyler gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Li ve diğ. (2020), yaptıkları bir çalışmada kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücrelere 0.25 ve 0.50 mM dozlarında korilagin uygulamış ve ferroptoz üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Korilaginın, taşıdığı kovalent köprüler sayesinde kök hücrelerdeki demir şelasyonunu, doğrudan etki ya da radikal süpürücü etkisiyle önleyebildiği ve bu hususta 1,3,6-tri-O-galoil-β-D-glikopiranoz molekülünden daha üstün olduğunu gözlemişlerdir.

Liu ve diğ. (2020), C57BL/6 farelere 1, 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarında korilagin uygulamış ve asetaminofenin oluşturduğu hepatotoksisiteye karşı etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri bulgular sonucunda, korilaginın ERK / JNK MAPK ve NF-κB sinyal yollarını baskılayarak antiinflamatuvar ve antioksidasyon aktiviteleri sayesinde asetaminofen kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Liu ve diğ. (2020), yaptıkları bir diğer çalışmada C57BL/6 farelerden izole ettikleri kemik iliği makrofaj hücrelerine 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 5 µmol/L dozlarında, MC3T3-E1 hücrelerine 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 µmol/L dozlarında, yirmi sekiz haftalık dişi C57BL/6 farelere 4 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında korilagin uygulamışlar ve RANKL kaynaklı osteoklastogenez ve NF-κB ve PI3K/AKT sinyal yolları yoluyla östrojen eksikliğine bağlı kemik kaybı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri bulgular, korilaginın NF - κB ve PI3K /AKT yollarını bozarak RANKL ile indüklenen osteoklastogenezini inhibe ettiği, in vivo osteoporotik kemik kaybını önlediği ve korilaginın osteoporoz tedavisi için umut vaat ettiğini göstermiştir.

Kinoshita ve diğ. (2007), korilaginın antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini incelemek için erkek Sprague – Dawley sıçanlarına (300–350 g) 1 mg/kg korilagin uygulamışlar ve korilaginın, oksidatif stres ve apoptozu baskılayarak karaciğer hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Tüm bu veriler doğrultusunda korilaginın pek çok biyolojik aktivitesinin olduğu görülmüş, bu tez çalışmasında da korilaginın insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik ve antitümoral bir ajan olan, hücrelerde genetik hasara yol açtığı bilinen

mitomisin-C'ye karşı antigenotoksik bir etki gösterip göstermeyeceğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1 DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

DeneYlerde kullanılan kimyasal maddeler; asetik asit (Glasiyel, %99) (Sigma), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), etil alkol (etanol) (Sigma), formaldehit (Tekkim), giemsa boyası (Merck), kromozom besiyeri (Merck), metil alkol (Metanol) (%99) (Sigma), nitrik asit (HNO_3) (VWR), potasyum klorür (KCl) (İsolab), sitokalsin B (Sigma), kolkisin (Sigma), dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck) ve korilagin (Sigma).

Korilagin

Literatürdeki veriler doğrultusunda, hücre canlılığı ve biyolojik aktivite açısından, korilagin hücre kültüründe artan konsantrasyonlarda 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kadar kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir. 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ korilagin konsantrasyonları etanol- steril distile su (1:4) karışımında hazırlanmış insan lenfosit kültürlerine uygulanarak hem genotoksik hem de MMC'ye karşı antijenotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla mikroçekirdek testi ve kromozom anormallikleri testi protokolleri takip edilmiştir.

2.2 Hazırlanan Çözeltiler

Sitokalsin-B çözeltisi 5 mg'lık toz halindeki stoktan DMSO içinde çözülerek hazırlanmış ve -20°C 'de saklanmıştır. Bu stoktan 50 μl besi ortamına ekilerek son hacminin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olması sağlanmıştır.

Mitomisin-C çözeltisi için toz halindeki MMC distile su içinde çözülerek 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ana stok hazırlanmıştır. Bu ana stoktan 1/10 oranında seyreltilerek 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ara stok hazırlanmış ve kültürlere eklenen miktar ile son konsantrasyonun 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olması sağlanmıştır.

Nitrik asit (HNO_3) çözeltisi için % 65'lik nitrik asitten 68,75 ml alınmış, son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 1N çözelti hazırlanmıştır. Koyu renk şişede, oda sıcaklığında saklanmıştır.

Hipotonik potasyum klorür (KCl) çözeltisi; 1,397 g potasyum klorür 250 ml distile suda çözülerek hazırlanmış, 4°C'de (buzdolabında) saklanmıştır.

Fiksasyonda kullanılmak üzere 3:1 oranında metanol-glasiyel asetik asit karışımı taze olarak hazırlanmıştır.

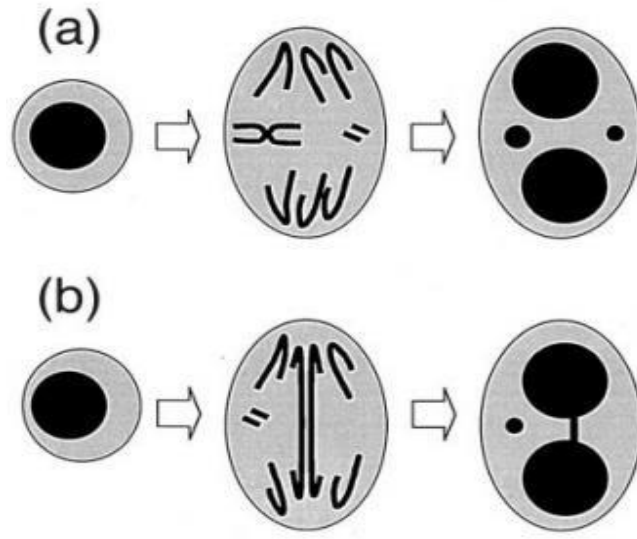
Giemsa boyası için 11,34 g mono potasyum fosfat (KH_2PO_4) 250 ml distile suda çözülerek tampon A (pH:4,8) ve 7,37 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile suda çözülerek tampon B hazırlanmıştır (pH:9.3). 10 ml tampon A, 10 ml tampon B, 10 ml giemsa boyası ve 170 ml distile su karıştırılarak % 5'lik 200 ml Giemsa boyası hazırlanmıştır. Çözeltinin pH değeri 6,8'e ayarlanmıştır. Boyamalar sırasında whatmann no 1 filtre kağıdından süzülerek kullanılmıştır.

Korilagin 250 µl etanol ve 1750 µl distile suda çözülerek 0,0058 g/2 ml çözelti hazırlanmıştır. 100 µg/ml için 100 µl besiyerine ekilmiştir.

2.3 Mikroçekirdek Yöntemi

Mikroçekirdekler, bir asırdan daha uzun bir süre önce eritrositlerin sitoplazmasında tanımlanmış ve 1800'lerin sonlarında ve 1900'lerin başlarında Howell tarafından "nükleer materyalin parçası" olarak adlandırılmıştır. Bu yapılar hematologlar tarafından "Howell-Jolly cisimleri" olarak bilinir. Benzer yapılar diğer hücre türlerinde de tanımlanmış ve "çekirdek parçacıkları" veya "mikronüklei" olarak adlandırılmıştır. Bu mikroçekirdekler, hücrelerin radyasyona maruz kalmasından sonra tutarlı bir şekilde bulunmuş ve bunların, mitozun geç aşamalarında iki yavru çekirdekten kopmuş parçalardan kaynaklandığı varsayılmıştır (Kirsch-Volders ve diğ, 2003).

Mikroçekirdekler, bölünmekte olan hücrelerde sentromerlerden yoksun kromozom kırılmaları (merkezi parçalar) ve/veya mitoz sırasında kutuplara çekilemeyen tam kromozomlar içeren parçacıklardır. Telofazda, kromozomların ve parçacıkların etrafında bir nükleer zarf oluşur. Daha sonra, hücredeki ana çekirdeklerden daha küçük olan ve çekirdeğin interfazdaki haline benzeyen mikroçekirdekler oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 : Mikroçekirdek oluşumu a) Anafazdaki tam kromozomlardan ve kromozom parçacıklarından mikroçekirdek oluşumu b) Nükleoplazmik bir köprünün oluşumu (Fenech, 2000).

Korilagin DNA hasarı üzerindeki etkisinin mikroçekirdek yöntemiyle incelenmesi amacıyla insan periferik kan lenfosit kültürleri hazırlanmıştır. Lenfosit kültürlerinin hazırlaması için kullanılacak kan örnekleri; sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 3 donörden temin edilmiştir. Kan örnekleri sağlıklı gönüllülerden biyolojik materyal elde etmek amacıyla kullanılmıştır ve herhangi bir girişimsel klinik uygulama söz konusu değildir. Bu aşama için tez projesi hazırlanırken Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kuruluna başvuru yapılmış, etik kurul izin belgesi (2019-11/17) alınmıştır (Ek A). Kan örnekleri Bursa Teknik Üniversitesi Sağlık Kültür Daire Başkanlığı revirinde heparinli tüpler içerisine alınarak laboratuvara getirilmiştir.

Donörlerden heparinli tüpler içerisine alınan periferik kanın 0,25 ml'si, biyolojik emniyet kabini içerisinde steril şartlarda, 2,5 ml'lik kromozom ortamı bulunan tüplere ekilmiştir. Daha sonra tüpler 37°C'deki etüve 45° eğik olacak şekilde yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Kültürdeki hücrelerin toplam inkübasyon süresi 72 saat (3 hücre bölünmesi) olacak şekilde takip edilmiştir.

Korilagin ve MMC kültür başlangıcından 24 saat sonra besiyerine eklenerek kültür ortamında 48 saat kalması sağlanmıştır. Kültür süresince tüpler sabah akşam yavaşça altüst edilerek çalkalanmıştır.

Kültürün 44. saatinde sitokinezi bloke etmek için tüm tüplere 50 µl sitokalasin-B eklenmiştir. Ardından tüpler folyo ile sarılarak ışık alması engellenmiştir. 72. saatin sonunda kültür sonlandırılmıştır. Tüpler 10 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilip, üstte kalan süpernatant bir pastör pipeti yardımıyla dip kısımdaki hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek atılmıştır. Tüplerde kalan 0,5-0,7 ml'lik kısım vorteks kullanılarak homojenize edilmiş ve ardından tüplere buzdolabında bekletilmiş olan 0,075 M KCl hipotonik çözeltisinden 5 ml yavaş bir şekilde, damla damla vortekste karıştırılarak eklenmiş, sonra 5 dakika süreyle buzdolabında bekletilmiştir.

Tüpler buzdolabından çıkarılmış, 10 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atıldıktan sonra, 1. fiksatif aşamasına geçilmiştir. Tüplere, 3:1 metanol:asetik asitten hazırlanmış soğuk fiksatiften 5'er ml ilave edilmiş ve buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 defa uygulanmıştır. Birinci fiksatifin ardından aynı işlem iki kez daha uygulanmış ve her fiksatiften sonra tüpler 5 dakika buzdolabında bekletilmiştir. 3. fiksatife son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir.

Son santrifüj işleminin ardından tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılmış, kalan hücre çözeltisi pipetle yavaş yavaş homojenize edilmiştir. 1N HNO₃'te temizlendikten sonra buzdolabında %70 etil alkolde bekletilmiş ve ardından kurularak hazırlanmış lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara hücre çözeltisinden birer damla damlatılarak yayılması sağlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, kuruması için 24 saat oda sıcaklığında toz olmayacak bir yerde bırakılmıştır.

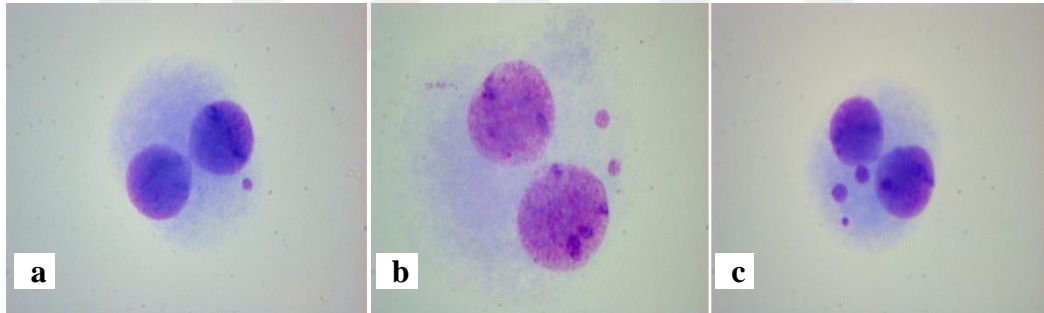
Kurumuş olan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanan 'lik Giemsa (pH=6,8) boyası ile 15 dakika boyanmıştır. Boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın uzaklaştırılması için üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek yıkanmış ve dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

Bu işlemler 3 farklı donörden alınan kan örnekleriyle tekrarlı olarak yapılmıştır. Negatif kontrol grubunda MMC ya da korilagin bulunmazken, pozitif kontrol grubuna 0,2 µg/ml MMC eklenmiştir. 4 farklı örneğe 10, 25, 50, 100 µg/ml korilagin eklenmiş, kalan 4 örneğe de 0,2 µg/ml MMC ve 10, 25, 50, 100 µg/ml korilagin eş zamanlı olarak eklenmiştir. Her örnekten 2 adet preparat hazırlanmış ve her donörden 1000, toplam 3000 binükleat hücre mikroçekirdek frekansını belirlemek üzere ışık mikroskobunda sayılmıştır.

Mikroçekirdek frekansının hesaplanabilmesi için sitokinezi blok metodu kullanılmıştır. Bu metotta, mitoz geçirmekte olan hücrelerde, sitokalsin-B kullanılarak sitokinez durdurulur. Böylece karyokinezi tamamlamış, ancak sitokinezi gerçekleştirilmemiş iki çekirdekli hücreler elde edilir. MÇ incelemesi sırasında bu çift çekirdekli hücreler sayılır. Çünkü bu hücreler, etkisi incelenen kimyasal maddeler eklendikten sonra bölünen hücrelerdir. Tek çekirdekli hücrelerde gözlenen mikroçekirdekler, test maddesi ilavesinden kaynaklanmayan, başlangıçta o hücrelerde mevcut olan mikroçekirdeklerdir. Her bir preparatta 1000 tane çift çekirdekli hücre, mikroçekirdek bulunup bulunmamasına göre incelenir.

Hedde ve Countryman'ın kriterlerine göre; mikroçekirdek boyutu hücre çekirdeğinin %20'sinden fazla, %5'inden az olmamalıdır, MÇ'lerin boyanma yoğunluğu ana çekirdek ile aynı olmalıdır, sadece sitoplazma bölünmesi engellenmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MÇ'ler sayılmalıdır (Şekil 2.2).

MÇ frekansı $1x(1MÇ)+2x(2MÇ)+3x(3MÇ+4MÇ)/N$ (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hücre başına düşen MÇ sayısı (MÇ/hücre) olarak belirlenir.

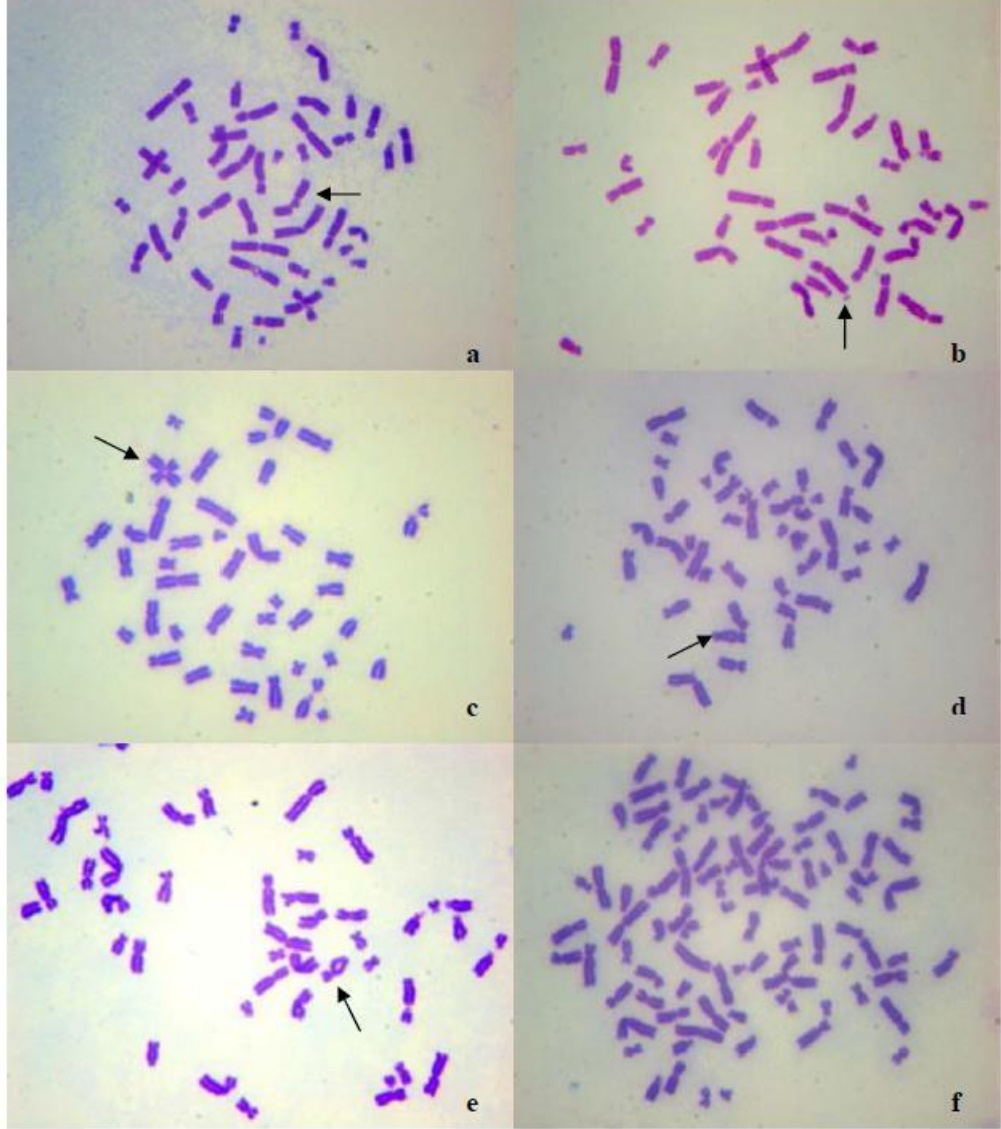


Şekil 2.2 : Lenfositlerde mikroçekirdeklerin mikroskop görüntüsü a) 1 mikroçekirdek b) 2 mikroçekirdek c) 3 mikroçekirdek (Taner, 2015).

2.4 Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozom anormallikleri, genomdaki hasarlar sonucu meydana gelen sayısal veya yapısal değişimlerdir. Kromozom ve kromatid kırıkları DNA'daki onarılmamış çift ve tek zincir kırıklarından, anormal yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki kırıkların yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Kromozom anormallikleri uzun zamandır insanların iyonlaştırıcı radyasyona ve genotoksik kimyasallara olan maruziyetinin önemli bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. Hem yapısal hem de sayısal anormallikler, iç ve dış faktörlere bağlı

olarak ortaya çıkmaktadırlar (Natarajan, 2002). Onarılmamış veya yanlış onarılmış DNA çift sarmal kırılmaları kromozom anormalliklerinin oluşumuna yol açar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Kromozomal anormallikler a) kromatit kırığı b) kromozom kırığı, c) kromatit değişimi d) disentrik kromozom e) kardeş kromatitlerde birleşme f) poliploidi (Taner ve diğ, 2007).

Ökaryotik hücrelerin genomunda DNA çift sarmal kırılmaları oksidatif metabolizma ile ilişkili endojen süreçler, DNA replikasyonu sırasındaki hatalar ve bölgeye özgü DNA rekombinasyonunun çeşitli biçimleri ve ayrıca iyonlaştırıcı radyasyon ve kimyasallar genomun bütünlüğünü bozar ve onarılmazsa veya yanlış eşleşirse, genomik dengesizliğe ve kansere, mutasyonlara veya hücre ölümüne neden olabilir

(Iliakis ve diğ, 2004). Kromozom anormalliklerini belirlemek amacıyla insan lenfosit kültürleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Kromozom anormalliklerini incelemek amacıyla hücre kültürlerinin hazırlanması için; mikroçekirdek yönteminde anlatıldığı şekilde sağlıklı, sigara içmeyen, herhangi bir sağlık sorunu ya da mutajene maruz kalma öyküsü olmayan donörlerden heparinli tüplere alınan periferik kanın 0,25 ml'si steril koşullarda 2,5 ml'lik kromozom ortamı bulunan tüplere ekilmiştir.

Kültür başlangıcından 24 saat sonra besiyerine korilagin ve MMC eklenerek 48 saat süresince kültür ortamında kalması sağlanmıştır. Kültür süresince tüpler sabah akşam yavaşça altüst edilerek çalkalanmıştır.

Kültürün 70. saatinde tüplere saf su içinde hazırlanmış kolşisin çözeltisinden (kültürün her ml'sinde 0,06 µg olacak şekilde) eklenmiştir ve tüpler hafifçe sallanarak karışmaları sağlanmıştır. Daha sonra hücreler 2 saat süreyle 37°C'deki inkübatörde bekletilmiştir.

Kültür süresi bitiminde tüpler 10 dakika süreyle 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan süpernatant atılmıştır. Tüpün dibindeki 0,5-0,7 ml'lik kısım vortekste karıştırılarak, kalan sıvı homojen hale getirilmiştir. Sonrasında bu tüplere, önceden 37°C'ye getirilmiş 0,075M KCl hipotonik çözeltisinden 5'er ml, vortekste damla damla eklenerek karışmaları sağlanmıştır. Tüpler kapatılarak, 37°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 1200 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, tüplere buzdolabında bekletilmiş soğuk fiksatiften (3:1 metanol:asetik asit) 5'er ml, vortekste yavaş yavaş eklenmiştir.

İlk fiksatifin eklenmesinden sonra tüpler 1 saat süreyle +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Fiksatif işlemi iki kez daha tekrar edilerek tüpte kalan içeriğin tamamen berraklaşması sağlanmıştır. Her fiksatif işleminin ardından tüpler santrifüj edilmiş, son fiksatif uygulamasından sonra dipte 0,5-0,7 ml kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Süpernatant atıldıktan sonra tüpte kalan içerik, pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu çözelti, önceden 1N HNO₃'te bekletilerek temizlenmiş ve buzdolabında etil alkol içerisinde bekletilmiş lamlar üzerine hücre çözeltisinden, 15-20 cm yükseklikten, farklı alanlara damlatılarak yayılması sağlanmış ve hazırlanan preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kromozom anormalliklerinin tespiti için her bir grupta 100'er metafaz incelenmiştir. Anormal hücrelerin, İncelenen toplam hücre sayısı içindeki yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısı hesaplanmıştır. Antioksidanın etkisiyle kromozom anormalliklerinde oluşan değişimlerin pozitif kontrolle kıyaslandığında önemli olup olmadıklarının tespiti için z-testi uygulanmıştır.



3. BULGULAR

3.1 Korilagin MÇ Yöntemi ile Genotoksik ve Antigenoksik Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Korilagin tek başına ve MMC ile birlikte uygulandığı insan lenfosit kültürlerindeki 3 tekrarlı çalışmadan elde edilen toplam mikroçekirdek (MÇ) sayısı ve %MÇ frekansı değerleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Korilagin ve korilagin ile birlikte MMC uygulanan insan lenfosit kültürlerindeki MÇ frekansları.

Uygulama Grupları	Sayılan hücre sayısı	MÇ sayısına göre hücrelerin dağılımı			MÇ	%MÇ frekansı
		(1)	(2)	(3)		
(-) Kontrol	3000	11	-	-	11	0,37 ± 0,11
MMC (0,2 µg/ml)	3000	201	7	-	215	7,17 ± 0,47 a
10 µg/ml Korilagin	3000	7	1	-	9	0,30 ± 0,10 b
25 µg/ml Korilagin	3000	12	-	-	12	0,40 ± 0,11 b
50 µg/ml Korilagin	3000	14	-	-	14	0,47 ± 0,12 b
100 µg/ml Korilagin	3000	17	-	-	17	0,57 ± 0,14 b
10 µg/ml Korilagin+ 0,2 µg/ml MMC	3000	127	6	-	139	4,63 ± 0,38 a,b
25 µg/ml Korilagin+ 0,2 µg/ml MMC	3000	150	6	-	162	5,40 ± 0,41 a,b
50 µg/ml Korilagin+ 0,2 µg/ml MMC	3000	163	2	2	173	5,77 ± 0,43 a,b
100 µg/ml Korilagin+ 0,2 µg/ml MMC	3000	186	21	1	231	7,70 ± 0,49 a

a negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z test),

b pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z test)

Korilagin konsantrasyonlarının uygulandığı gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında uygulama konsantrasyonlarının (10-100 µg/ml) hiçbirinde MÇ oluşumunda istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir. 0,2 µg/ml MMC’nin uygulandığı grupta % MÇ frekansı kontrole göre önemli derece (p<0.05) bir artış göstermiştir. MMC ile birlikte korilagin eş zamanlı uygulandığı gruplar incelendiğinde, korilagin 10, 25, 50 µg/ml konsantrasyonlarının

uygulandığı gruplarda tek başına MMC uygulanan gruba kıyasla % MÇ frekansında istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. MMC ile birlikte korilagin en yüksek konsantrasyonunun (100 µg/ml) uygulandığı grupta ise % MÇ frekansının sadece MMC uygulanan gruba göre azalmadığı hatta artış gösterdiği görülmüştür. Bu durumun güçlü antioksidan maddelerin birçoğunda gözlemlenen yüksek konsantrasyonlarındaki prooksidan aktiviteleri ve additif etkileri sonucunda olabileceği düşünülmektedir. Birçok çalışmada korilagin düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğu görülmüştür. Diğer yandan literatür taramalarında korilagin ile ilgili çalışmaların birçoğunun deney hayvanlarında yürütülen in vivo deneylere dayandığı görülmektedir.

3.2 Korilagin KA Testi ile Genotoksik ve Antigenoksik Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

10, 25, 50, 100 µg/ml korilagin tek başına ve 0,2 µg/ml MMC ile birlikte uygulandığı insan lenfosit kültürlerindeki yapısal ve sayısal anormallikler, toplam anormallik sayısı ve toplam anormal hücre sayısı Çizelge 3.2’de, anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozomal anormallik (KA/hücre) değerleri ise Çizelge 3.3’de gösterilmiştir. Korilagin uygulanan gruplar negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında tek başına uygulandığı konsantrasyonlarında (10-100 µg/ml) kromozom anormallikleri oluşumunda istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmadığı yani araştırma konsantrasyonlarında genotoksik etkisi olmadığı belirlenmiştir. MMC ile birlikte korilagin eş zamanlı uygulandığı gruplar incelendiğinde, korilagin 10, 25, 50 µg/ml konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda tek başına MMC uygulanan gruba kıyasla anormal hücre frekansında ve KA/hücre değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. MMC ile birlikte korilagin en yüksek konsantrasyonunun (100 µg/ml) uygulandığı grupta ise sadece MMC uygulanan gruba göre DNA hasarında bir azalma oluşturmadığı hatta artış gösterdiği görülmüştür. Bu durumun güçlü antioksidan maddelerin birçoğunda gözlemlenen yüksek konsantrasyonlarındaki prooksidan aktiviteleri ve additif etkileri sonucunda olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda uygulanan mikroçekirdek ve kromozomal anormallik testi sonuçlarının birbiriyle uyumlu ve benzer sonuçlara neden olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.2 : Korilagin ve MMC uygulanan insan periferel lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri ve anormal hücre sayısı.

Uygulama Grubu	İncelenen Topalm Hücre	Kromozomal Anormallikler							Toplam	Anormal hücre
		KTK	KZK	F	KKB	DK	KD	P		
(-) Kontrol	300	8	-	1	-	-	-	-	9	9
MMC (0,2 µg/ml)	300	45	9	4	4	3	20	-	85	81
10 µg/ml Korilagin	300	7	-	-	-	-	-	1	8	8
25 µg/ml Korilagin	300	9	-	-	-	-	-	-	9	9
50 µg/ml Korilagin	300	8	2	1	-	-	-	-	11	11
100 µg/ml Korilagin	300	9	3	-	-	-	-	1	13	13
10 µg/ml Korilagin+ MMC	300	42	7	2	1	1	18	-	71	69
25 µg/ml Korilagin+ MMC	300	38	9	1	-	-	12	-	60	58
50 µg/ml Korilagin+ MMC	300	33	11	1	1	-	9	1	56	56
100 µg/ml Korilagin+ MMC	300	55	13	2	-	1	22	-	93	89

Ktk: Kromatid kırığı, Kzk: Kromozom kırığı, F: Fragment, Kkb: Kardeş kromatidlerde birleşme, Dk: Disentrik kromozom, Kd: Kromatid değişimi, P : Poliploidi

Çizelge 3.3 : Korilagin ve MMC uygulanan insan periferel lenfositlerinde anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen anormallik sayısı.

Uygulama Grubu	İncelenen Hücre	Anormal hücre ± SH (%)	KA/ Hücre ± SH
(-) Kontrol	300	3,00 ± 0,985 b	0,030 ± 0,010 b
MMC (0,2 µg/ml)	300	27,00 ± 2,563 a	0,283 ± 0,026 a
10 µg/ml Korilagin	300	2,67 ± 0,93 b	0,027 ± 0,009 b
25 µg/ml Korilagin	300	3,00 ± 0,985 b	0,030 ± 0,010 b
50 µg/ml Korilagin	300	3,67 ± 1,086 b	0,037 ± 0,011 b
100 µg/ml Korilagin	300	4,33 ± 1,175 b	0,043 ± 0,012 b
10 µg/ml Korilagin+ MMC	300	23,00 ± 2,429 a,b	0,237 ± 0,025 a,b
25 µg/ml Korilagin+ MMC	300	19,33 ± 2,279 a,b	0,200 ± 0,023 a, b
50 µg/ml Korilagin+ MMC	300	18,67 ± 2,250 a,b	0,187 ± 0,023 a, b
100 µg/ml Korilagin+ MMC	300	29,67 ± 2,637 a	0,310 ± 0,027 a

a negatif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z test),

b pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z test)

4. TARTIŞMA

Genotoksisite olarak bilinen DNA hasarları kendiliğinden oluşabildikleri gibi genotoksinler tarafından da indüklenebilir. DNA hasarı gen mutasyonlarına, kromozomal anormalliklere ve translokasyon, delesyon, inversiyon yoluyla kromozomların yeniden düzenlenmesine yol açabilmektedir. Mutajenite olarak bilinen bu süreç, karsinogenezde çok önemli bir rol oynar ve insanlarda endişe verici bir oranda artan farklı kanser türlerine ve genetik hastalıklara yol açabilir. Küresel olarak kanser, önde gelen hastalıklardan biridir (Makhuvele ve diğ., 2018).

Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenite oranlarının belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyelleri hakkında tahmin yürütülebilmesi için kullanılmaktadır. Bu testler; hem günlük hayatımızda yüksek oranda maruz kaldığımız kimyasal maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin incelenmesini sağlamakta hem de antigenotoksisite çalışmalarında bu hasarın hangi şartlar altında, hangi oranda azaltılabileceğini ve tamir edilebileceğini belirlemeye çalışmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011; Romero-Jiménez ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında fenolik bir bileşik ve güçlü bir antioksidan olan korilagin DNA hasarı üzerindeki genotoksik etkileri ve kemoterapötik bir ajan olan ve DNA hasarına neden olan MMC'ye karşı antigenotoksik etkileri araştırılmıştır.

Mitomisin-C (MMC), 1958'de *Streptomyces caespitosus*'tan izole edilmiş, antitümöral ajan olarak kullanılan bir antibiyotiktir. MMC izolasyonundan önce, diğer iki fraksiyon, mitomisin A ve B izole edilmiş ve hem antibakteriyel hem de antineoplastik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. MMC'nin en etkili fraksiyon olduğu, transplante tümörlere karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu, ancak bazı spontan tümörlere karşı bir şekilde daha az aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Crooke ve Bradner, 1976). DNA alkilleyici kemoterapötik bir ajan olan MMC; anal, meme ve mesane kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanıldığı gibi, oftalmoloji ve üroloji gibi çeşitli alanlarda da

kullanılmaktadır. Kesin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, topikal olarak kullanıldığında, fibroblast ve skar dokusunun üretimini azaltarak fibrovasküler büyümeye müdahale ettiği gösterilmiştir (Amer ve diğ, 2020; Nakayama ve diğ, 2020). Bununla birlikte, kemik iliği ve diğer dokulara uzun süreli hasar dahil olmak üzere toksisite profili nedeniyle klinik etkisi sınırlı kalmıştır (Gabizon ve diğ, 2020).

MMC memeli hücrelerinde replikasyon ve transkripsiyonun durdurulmasına neden olur ve apoptoza yol açan kritik DNA hasarını indükler. Moleküler düzeyde, MMC'nin indirgeyici aktivasyonu, 7-N-guanin nükleotid kalıntıları ile N-alkilasyon yoluyla reaksiyona giren bir mitozenin (mitozen, indolekinonların iki halkalı çekirdeği ile ilgili kinon içeren üç halka yapısına dayanan bir organik kimyasallar sınıfıdır) oluşmasına yol açar ve DNA'nın 5'-CpG-3' sekansında çapraz bağlanmalara neden olur. Su içindeki iyi çözünürlüğü ve stabil sitogenetik aktivitesi nedeniyle MMC, in vitro çalışmalar için bir model mutajen olarak kullanılmaktadır (Sinitsky ve diğ, 2020). MMC'nin sağlıklı hücrelerde neden olduğu DNA hasarını önleyebilecek maddeleri bulabilmek için çok sayıda doğal ürünle çalışma yapılmaktadır.

Krisin (5,7-dihidroksiflavon); bal, propolis ve çeşitli bitkilerde bulunan flavonoidlerin flavon grubuna aittir. 6-8 haftalık erkek Balb/C farelere 6 mg/kg MMC ve 40 mg/vücut ağırlığı dozunda krisin enjekte edilerek yapılan çalışmada, krisinin, MMC'nin genotoksik hasarını azaltacak, lipid peroksidasyonu gibi oksidatif strese karşı koruyacak ve katalaz, SOD, GPx, GST, GSH aktivitelerindeki artış yoluyla antioksidan savunma sisteminin aktivasyonunu tetikleyecek kadar güçlü olduğu gözlenmiştir (Sassi ve diğ, 2020).

Bu tez çalışmasında nar ve diğer birçok bitkide bulunan bir fenolik bileşik olarak korilagin araştırılmıştır. Geleneksel tıp alanında yara iyileştirici, kan durdurucu, ishal inhibitörü olarak ve deri enfeksiyonları ile viral hastalıklar için kullanılan nar (*Punica granatum L.*) kabukları ayrıca antimikrobiyal, antitümöral, antiinflamatuvar ve ülser önleyici gibi çeşitli ilaçların bileşimlerinde de kullanılmaktadır. Narın fenolik bileşikler açısından zengin olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. 8 haftalık ve 25 ± 5 g. ağırlığında 48 *Mus musculus* dişi albino fareye 2 mg/kg MMC ve 150 mg/kg nar kabuğu ekstraktı verilerek yapılan çalışmada; nar kabuğunun mikroçekirdek, mitotik indeks ve kromozomal aberasyon testleri sonucunda

antimutajenik ve antijenotoksik etkiler gösterdiği gözlenmiştir (Uluman ve Kilicle, 2020).

Drosophila melanogaster, neredeyse yüz yıldır genetik ve gelişimsel biyolojide çalışma konusu olmuştur. *Drosophila melanogaster*' in somatik hücrelerinde bir hidroksikalkon ve yeni bir kumarin kalkon hibridinin mitomisin-C kaynaklı genotoksositeye karşı etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, *Drosophila* larvalarına (E)-1-(2-hidroksifenil)-3-(4-metilfenil)-prop2-en-1-on (2HMC) ve yeni kumarin-kalkon hibrid 7-metoksi-3-(E)-3-(3,4,5-trimetoksifenil) akrilol-2H-kromen-2-on(4MET) verilmiş ve ardından 0.05 mM MMC eklenmiştir. Çalışma sonucunda iki bileşenin de *Drosophila*'nın somatik hücrelerini MMC'nin neden olduğu genotoksik etkiden koruduğu gözlemlenmiştir (Véras ve diğ, 2020). Literatürde, çok sayıda ekzojen antioksidanın MMC'nin neden olduğu genetik hasarı önleyici ya da azaltıcı etkisi üzerine in vivo ve in vitro çalışmalar mevcuttur.

Nar meyvesinde bulunan ellajitanenler çok güçlü antioksidanlardır ve nar suyu, diğer yaygın ticari meyve sularından daha güçlü in vitro antioksidan etkiye sahiptir (Heber, 2011). Korilagin, nar dahil olmak üzere birçok bitki türünde farklı organ ve dokularda bulunan bir elajitanen olup antigenotoksik ve antikarsinojen aktivitesi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Dassprakash ve diğ. (2012), *Punica granatum L.* bitkisinin yapraklarından izole ettikleri ekstratı kullanarak in vitro ve in vivo çalışma yapmış, içeriğindeki bileşenlerin oksidatif stres ve genomik hasar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda *Punica granatum L.* bitkisinin, bulundurduğu apigenin, luteolin, gallitaninler ve punikalın, punikalagin, korilagin ve punikafolin gibi ellajitanenlerin antioksidan etkileri sayesinde önemli bir kemoprotektif ajan olduğunu bildirmişlerdir.

Hau ve diğ. (2010), Hep3B hepatoselüler karsinoma hücre hattı ve atimik çıplak fare ksenografı modeli üzerinde korilaginın in vivo ortamda antitümöral etkisini incelemişlerdir. 7 gün boyunca 15 mg/kg⁻¹ dozda uygulandığında, korilaginın, ksenografı Hep3B hepatoselüler karsinomun büyümesini geciktirmek için etkili olabileceğini ve bu süreçte karaciğer dokuları üzerinde hiçbir yan etki göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Li ve diğ. (2017); 6-8 haftalık ve 19-25 g 30 tane erkek Balb / c faresi ve RAW264.7 hücre hattı ile yaptıkları bir çalışmada korilaginın, sepsiste aşırı enflamatuvar durumu iyileştirmek için TLR4 sinyal moleküllerini düzenleyerek anti-enflamatuvar etkiler gösterdiğini belirlemişlerdir.

Milani ve diğ. (2018); korilaginın hücre büyümesini inhibe edici ve pro-apoptotik aktiviteler uygulayıp uygulamadığını araştırmak için, insan U251 ve T98G glioma hücre hatlarıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarından üç önemli sonuç elde etmişlerdir: Korilagin apoptotik yolun aktivasyonu ile U251 glioma hücrelerinin büyümesini engellemiş, temozolomide dirençli T98G glioma hücreleri üzerinde etki göstermiş, T98G glioma hücreleri üzerinde temozolomid ile birlikte kullanıldığında daha yüksek düzeyde pro-apoptotik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir.

Phyllanthus emblica L. bitkisinden izole edilen korilaginın özofagus kanseri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, özofagus kanser hücre hatları (ECA109, KYSE150) ve normal özofagus epidermis hücre hattı (HEEPIC) kullanılmıştır. Hücrelere 0, 5, 10, 20, 40 ve 60 µM dozlarda korilagin uygulanmış ve korilaginın mitokondriyal apoptoz ve endoplazmik retikulum stres sinyal yollarını aktive ederek antitümör etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Wu ve diğ, 2021).

Zhang ve diğ. (2019) korilaginın yağsız karaciğer hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada, korilaginın oksidatif stresi azalttığını, Tong ve diğ. (2018) meme kanseri hücre hatlarıyla yaptıkları çalışmada korilaginın kanser büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Guo ve diğ. (2017) yaptıkları in vivo çalışmada korilaginın oksidatif stresi ve anti-apoptotik aktiviteyi baskılayarak akciğer hasarını azalttığını, Li ve diğ. (2020) mezenşimal kök hücrelerle yaptıkları çalışmada korilaginın radikal süpürücü etkisiyle ferroptozu önlediğini, Kinoshita ve diğ. (2007) yaptıkları in vivo çalışmada korilaginın oksidatif stres ve apoptozu baskılayarak karaciğer hasarına karşı koruyucu etki yaptığını gözlemlemişlerdir. Literatürde, korilaginın genotoksik moleküller ve kanser hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini incelemek amacıyla yapılmış in vivo ve in vitro birçok çalışma mevcuttur.

Diğer yandan son yıllarda farklı fenolik bileşiklerin antienotoksik etkilerini araştıran çok sayıda araştırma da yapılmaktadır. Soltani ve diğ. (2008) bir kumarin çeşidi olan umbelliprenin molekülünün insan periferik lenfositlerinde H₂O₂'den

kaynaklanan genetik hasar üzerindeki olası antigenotoksik etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, umbellipreninin kromozom hasarını önlediğini gözlemlemişlerdir.

Zorić ve diğ. (2021) zeytinyağında bulunan fenolik bileşiklerden olan oleuropein ve hidroksitirosol moleküllerinin H₂O₂'den kaynaklanan DNA hasarı üzerindeki olası antigenotoksik etkisini incelemek amacıyla yaptıkları in vitro çalışmada, insan periferel lenfositleri kullanmış ve bu iki bileşiğin serbest radikal süpürücü özellikleri sayesinde yüksek antioksidan etki gösterdiklerini gözlemlemişlerdir.

Erikel ve diğ. (2020) amigdalinin genotoksik ve H₂O₂'nin neden olduğu DNA hasarına karşı antigenotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferel lenfosit hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, amigdalinin genotoksik etkisi olmadığını ve DNA'yı hasardan koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Ruiz-Ruiz ve diğ. (2020) gümüş nanopartiküllerin insan periferel lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini mikroçekirdek testi ile incelemiş ve bu moleküllerin, kullanılan 0.012'den 12 µg/mL'ye kadar olan dozlarda sitotoksik ya da genotoksik etkilerinin olmadığı sonucuna varmıştır.

Literatürde, çeşitli moleküllerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla insan periferel lenfositlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Lenfositler çoğunlukla proliferatif durumda olmasa da hücre döngüsüne girmek için mitojenler tarafından uyarılabilen, kolayca erişilebilir bir somatik hücre kaynağıdır. İn vitro olarak lenfositleri uyararak, kromozomal anormallikler, kardeş-kromatid değişimleri veya gen mutasyonları şeklinde ortaya çıkan in vivo genetik hasarları tespit etmek mümkündür. Bu nedenle genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir hücre çeşididir.

Literatürdeki veriler doğrultusunda, hücre canlılığı ve biyolojik aktivite açısından, korilagin hücre kültüründe 100 µg/ml'ye kadar kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir. 10, 25, 50, 100 µg/ml korilagin konsantrasyonu insan lenfosit kültürlerine uygulanarak hem genotoksik hem de MMC'ye karşı antigenotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla mikroçekirdek testi ve kromozom anormallikleri testi protokolü takip edilmiştir. Literatürdeki antigenotoksisite çalışmaları ile benzer şekilde korilagin güçlü antioksidan aktivitesi sayesinde MMC tarafından oluşturulan hasarı doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genotoksik etkiyi önlemek ya da ortadan kaldırmak için doğal bileşikler ile yapılan çalışmalar büyük oranda olumlu sonuçlar vermektedir. Bu amaçla bitkilerin çeşitli organlarında bulunan ikincil metabolitler üzerinde araştırmalar yapılmakta ve özellikle polifenolik bileşikler kullanılmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, bitkilerde bulunan polifenollerin çeşitli antioksidan ve antikarsinojen etkileri araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, nar dahil olmak üzere birçok bitki türünün fenolik bileşiklerinden biri olan ve doğal antioksidan olarak kabul edilen korilagin, alkilliyici bir ajan olan ve DNA'da hasara neden olan MMC'nin insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşturduğu genotoksik etki üzerindeki olası antigenotoksik etkisi ve genotoksik etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular sonucunda, korilagin düşük dozlarda (10, 25, 50 µg/ml) kullanıldığında MMC'nin oluşturduğu hasarı azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde farklı mutajenlerin genotoksik hasarları üzerinde korilagin etkisiyle ilgili yapılan diğer çalışmalarda ortaya konulduğu gibi, korilagin düşük dozlarda kullanıldığında antigenotoksik etki göstermektedir. Korilagin çalışma konsantrasyonlarının sağlıklı insan periferik lenfosit hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığı da gözlenmiştir. Korilagin sağlıklı hücrelerde genotoksik etki göstermemiş olması ve MMC'nin neden olduğu hasara karşı antigenotoksik etki göstermesi, onun mutajenlere karşı koruyucu ve mutajenlerin neden olduğu hasarı gidermede tedavi edici bir ilaç olarak kullanılma potansiyeli taşıdığını işaret etmektedir.

Bu tez çalışmasında DNA hasarının tespitine yönelik olarak MÇ ve KA testleri *in vitro* şartlarda hücre kültüründe gerçekleştirilmiştir. *In vivo* çalışmalar ile kıyaslandığında hem etik sorunları ortadan kaldıran hem de ucuz, kolay ve hızlı değerlendirme olanağı sağlayan *in vitro* yöntemler ön gösterge çalışmaları olarak

önemli veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Ancak birçok araştırmacıya göre hücre kültürlerinden ve hayvan modellerinden elde edilen veriler, insanlardaki etkiyi tam olarak ortaya koyamayabilmektedir. Bu amaçla ilk basamak olarak kabul edilen bu çalışmaların devamı olarak in vivo çalışmaların ve epidemiyolojik çalışmaların da yapılması önerilmektedir.

Epidemiyolojik veriler, sebze ve meyvelerin tüketiminin kanser insidansını değiştirebileceği genel fikrini vermektedir. Şifalı bitkiler bu etkilerini ayrı ayrı veya sinerjik yollarla uygulayabilen binlerce bileşenin karmaşık karışımlarını içermektedirler. Bu açıdan farklı bileşenlerin etkilerini ortaya koyan genomik yaklaşım, şifalı bitkilerin farmako-toksikolojik aktivitelerini tanımlamak ve tahmin etmek için güçlü bir araç olarak sunulabilir.



KAYNAKLAR

- Akkuş, İ.** (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya, 1.*
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş., & Yılmaz, B.** (2019). Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü-Süperoksit Dismutaz (Sod), Katalaz (Cat) Ve Glutasyon Peroksidaz (GPx), *Medical Journal of Suleyman Demirel University, 26(3).*
- Attar, R., Cincin, Z. B., Bireller, E. S., & Cakmakoglu, B.** (2017). Apoptotic and genomic effects of corilagin on SKOV3 ovarian cancer cell line, *OncoTargets and therapy, 10,* 1941.
- Aydın, S., & Üstün, F.** (2007). Tanenler: Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 33(1),* 21-31.
- Bannai, S., & Tateishi, N.** (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals, *The Journal of membrane biology, 89(1),* 1-8.
- Bayram, Y., Torlak, Y., & Sağdıç, O.** (2019). Üvez meyvesinin antioksidan aktivitesi, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 16,* 933-939.
- Burk, R. F.** (2002). Selenium, an antioxidant nutrient, *Nutrition in clinical Care, 5(2),* 75-79.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F.** (1993). An introduction to free radical biochemistry, *British medical bulletin, 49(3),* 481-493.
- Clancy, R. M., & Abramson, S. B.** (1995). Nitric oxide: a novel mediator of inflammation, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 210(2),* 93-101.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A.** (2000). Ellagitannins–nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7),* 1118-1125.
- Coassin, M., Ursini, F., & Bindoli, A.** (1992). Antioxidant effect of manganese, *Archives of biochemistry and biophysics, 299(2),* 330-333.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord J. M., & Harman, D.** (1987). Oxygen Radicals And Human Disease, *Annals Of Internal Medicine, 107(4),* 526-545.
- Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T.** (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 3(4),* 92-95.

- Çelik, F.** (2009). *Kızılciğın (Cornus mas L.) ekstraksiyonu ve antioksidan bileşenlerinin belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Çimen, F., Polat, H., & Ekici, L.** (2020). Polifenollerin Bağırsak Mikrobiyota Kompozisyonunu Düzenleyici ve Nöroprotektif Etkileri, *Akademik Gıda*, 18(2), 190-208.
- Darley-USmar, V., & Halliwell, B.** (1996). Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system, *Pharmaceutical research*, 13(5), 649-662.
- Demir, K., Karaca, Ç., Kaymakoğlu, S., Özdil, S., Dinçer, D., Durakoğlu, Z., Beşışık, F., Çakaloğlu, Y., & Ökten, A.** (2002). Serum Seruloplazmin Düzeyi: Wilson Hastalığında Selatör Tedaviden etkileniyor mu? Aile taramasında değeri nedir?, *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 1(2), 86-91.
- Deng, Y., Li, X., Li, X., Zheng, Z., Huang, W., Chen, L., Tong, Q., & Ming, Y.** (2018). Corilagin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the mitochondrial apoptotic and death receptor pathways, *Oncology reports*, 39(6), 2545-2552.
- Ding, Y., Ren, D., Xu, H., Liu, W., Liu, T., Li, L., Li, J., Li, Y., & Wen, A.** (2017). Antioxidant and pro-angiogenic effects of corilagin in rat cerebral ischemia via Nrf2 activation, *Oncotarget*, 8(70), 114816.
- Elliott, J. G.** (1999). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages: Developing nutraceuticals for the new millenium, *Food technology (Chicago)*, 53(2), 46-48.
- Engin, M. S.** (2007). *Taflan (Laurocerasus officinalis Roem.) bitkisinin meyve, çekirdek ve yapraklarının mevsim değişikliğine göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini*. (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Erikel, E., Yuzbasioglu, D., & Unal, F.** (2020). Genotoxic and antigenotoxic potential of amygdalin on isolated human lymphocytes by the comet assay, *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13436.
- Ergezer, H., & Çam, M.** (2008). Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, (pp.229-232). Erzurum, Turkey, May 21-23.
- Fattman, C. L., Schaefer, L. M., & Oury, T. D.** (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), 236-256.
- Fenech, M.** (2000). The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Frei, B.** (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action, *The American journal of medicine*, 97(3), S5-S13.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K.** (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology*, 189(1-2), 147-163.

- Gu, Y., Xiao, L., Ming, Y., Zheng, Z., & Li, W.** (2016). Corilagin suppresses cholangiocarcinoma progression through Notch signaling pathway in vitro and in vivo, *International Journal of Oncology*, 48(5), 1868-1876.
- Guo, S., Fu, Y., Xiong, S., & Lv, J.** (2017). Corilagin protects the acute lung injury by ameliorating the apoptosis pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1743-1748.
- Gürkan A. S., Dündar Oya, B .** (2005). Coenzyme Q10, *Journal Of Faculty Of Pharmacy Of Ankara University*, 34 (2) , 129-155 .
- Halliwell, B.** (1991). Drug antioxidant effects, *Drugs*, 42(4), 569-605.
- Heber, D.** (2011). Pomegranate ellagitannins. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593938/>
- Henrotin, Y. E., Bruckner, P., & Pujol, J. P.** (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage, *Osteoarthritis and cartilage*, 11(10), 747-755.
- Hwang, S. T., Yang, M. H., Kumar, A. P., Sethi, G., & Ahn, K. S.** (2020). Corilagin Represses Epithelial to Mesenchymal Transition Process Through Modulating Wnt/ β -Catenin Signaling Cascade, *Biomolecules*, 10(10), 1406.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu W., Guan J., Terzoudi G. & Pantelias, G.** (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenetic and genome research*, 104(1-4), 14-20.
- Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., SánchezGutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S. M., Sumaya-Martínez, MT., Morales-González, A., Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., & Madrigal-Santillán, E.** (2017). Evidence of some natural products with antigenotoxic effects, Part 1: fruits and polysaccharides. *Nutrients*, 9(2), 102.
- Jang, D., & Murrell, G. A.** (1998). Nitric oxide in arthritis, *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1511-1519.
- Jia, L., Jin, H., Zhou, J., Chen, L., Lu, Y., Ming, Y., & Yu, Y.** (2013). A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF- β signaling pathways, *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1-11.
- Kada, T., & Shimoi, K.** (1987). Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action, *Bioessays*, 7(3), 113-116.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M.** (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş.** (2016). Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.

- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş.** (2016). Serbest radikaller, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Kasnak, C., & Palamutoğlu, R.** (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226-234.
- Kaur, H., & Perkins, J.** (1991). The free radical chemistry of food additives. In O. I. Aruoma, Halliwell B. (Eds), *Free radicals and food additives* (pp.17–35). London : Taylor & Francis Ltd.
- Kimmick, G. G., Bell, R. A., & Bostick, R. M.** (1997). Vitamin E and breast cancer: a review, *Nutrition and cancer*, 27(2), 109-117.
- Kinoshita, S., Inoue, Y., Nakama, S., Ichiba, T., & Aniya, Y.** (2007). Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin, *Phytomedicine*, 14(11), 755-762.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., & Norppa, H.** (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163.
- Li, L. J., Zhang, S. J., Liu, P., Wang, Y. Q., Chen, Z. L., Wang, Y. J., Guo, Y. J., & Zhao, L.** (2019). Corilagin Interferes With Toll-Like Receptor 3-Mediated Immune Response in Herpes Simplex Encephalitis, *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 83.
- Li, X., Deng, Y., Zheng, Z., Huang, W., Chen, L., Tong, Q., & Ming, Y.** (2018). Corilagin, a promising medicinal herbal agent, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 43-50.
- Li, X., Liu, J., Chen, B., Chen, Y., Dai, W., Li, Y., & Zhu, M.** (2020). Covalent Bridging of Corilagin Improves Antiferroptosis Activity: Comparison with 1, 3, 6-Tri-O-galloyl-β-d-glucopyranose, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(11), 2232-2237.
- Liu, C., Liu, H., Huang, H., Hao, J., Lv, Y., Zhang, J., Ma, Y., Wu, C., Qin, R., & Yang, X.** (2020). Corilagin induces laryngeal cancer antiproliferation and inhibits growth factor and cytokine signaling pathways in vitro and in vivo, *Journal of Functional Foods*, 69, 103947.
- Liu, F. C., Chaudry, I. H., & Yu, H. P.** (2017). Hepatoprotective effects of corilagin following hemorrhagic shock are through akt-dependent pathway, *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(3), 346.
- Liu, F. C., Yu, H. P., Chou, A. H., Lee, H. C., & Liao, C. C.** (2020). Corilagin reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through MAPK and NF-κB signaling pathway in a mouse model, *American Journal of Translational Research*, 12(9), 5597.
- Lu, J., Ye, C., Huang, Y., Huang, D., Tang, L., Hou, W., Kaung, Z., Chen, Y., Xiao, S., Yishake, M., & He, R.** (2020). Corilagin suppresses

RANKL-induced osteoclastogenesis and inhibits oestrogen deficiency-induced bone loss via the NF- κ B and PI3K/AKT signalling pathways, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(18), 10444-10457.

- Luan, B., Zhao, H., Bast, R. C., Lu, Z., & Yu, Y.** (2019). Corilagin could help to overcome PARP inhibitor resistance by inhibiting ERK signaling pathways. Retrieved from <https://cancerres.aacrjournals.org>
- Lv, H., Hong, L., Tian, Y., Yin, C., Zhu, C., & Feng, H.** (2019). Corilagin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via enhancing the AMPK/GSK3 β -Nrf2 signaling pathway, *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1-15.
- Lv, H., Hong, L., Tian, Y., Yin, C., Zhu, C., & Feng, H.** (2019). Corilagin alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via enhancing the AMPK/GSK3 β -Nrf2 signaling pathway, *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1-15.
- Mccord, J. M.** (1993). Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance, *Clinical biochemistry*, 26(5), 351-357.
- Meister, A.** (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals, *Journal of Biological Chemistry*, 269(13), 9397-9400.
- Muresan, X. M., Cervellati, F., Sticozzi, C., Belmonte, G., Chui, C. H., Lampronti, I., Borgatti, M., Gambari, R., & Valacchi, G.** (2015). The loss of cellular junctions in epithelial lung cells induced by cigarette smoke is attenuated by corilagin, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 631758.
- Nandini, H. S., & Naik, P. R.** (2019). Action of corilagin on hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *Chemico-biological interactions*, 299, 186-193.
- Natarajan, A. T.** (2002). Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3-16.
- Orhan, E. H., & Şahin, G.** (1995). Glutathion S-Transferazların Klinik Ve Toksikolojik Önemi, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 15(5), 303-315.
- Öztürk, Ş., Palanduz, Ş., Çefle, K., Tutkan, G., Uçur, A., Dinçol, G., Nalçacı, M., Aktan, M., Yavuz, S., & Küçükaya, R. D.** (2005). Genotoxicity and sister chromatid exchange in patients with myelodysplastic disorders, *Cancer genetics and cytogenetics*, 159(2), 148-150.
- Pandareesh, M. D., Mythri, R. B., & Bharath, M. S.** (2015). Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases, *Neurochemistry international*, 89, 198-208.
- Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F. W., Kucuk, O., & Sarkar, F. H.** (2004). Antioxidant effect of zinc in humans, *Free Radical Biology and Medicine*, 37(8), 1182-1190.
- Reddy, B. U., Mullick, R., Kumar, A., Sharma, G., Bag, P., Roy, C. L., Sudha, G., Tandon, H., Dave, P., Shukla, A., Nandhitha, M., Srinivasan,**

- N., Das, S., & Srinivasan, P. (2018). A natural small molecule inhibitor corilagin blocks HCV replication and modulates oxidative stress to reduce liver damage, *Antiviral research*, 150, 47-59.
- Reilly, P. M., Schiller, H. J., & Bulkley, G. B. (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites, *The american journal of surgery*, 161(4), 488-503.
- Rencüzoğulları, Ç. (2018). *Korilagin'in olası antikarsinojenik etkilerinin akciğer kanser hücre soyunda araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., & Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS letters*, 582(13), 1783-1787.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1-2), 147-155.
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Vazquez-Gomez, R. L., Pestryakov, A., Garcia-Ramos, J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-block micronucleus assay using human lymphocytes as a sensitive tool for cytotoxicity/genotoxicity evaluation of AgNPs, *ACS omega*, 5(21), 12005-12015.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond, *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, *Journal of applied genetics*, 55(2), 273-285.
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghghi, F., & Behravan, J. (2009). Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress, *Cell biology and toxicology*, 25(3), 291-296.
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress, *Current opinion in microbiology*, 2(2), 188-194.
- Şekeroğlu, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Taner, G. (2005). Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma, *Bilim Teknik, Ağustos*, 113, 453.
- Taner, G., (2007). *Lipoik asit ve ferulik asitin insan lenfosit kültüründe mitomisin-c'ye karşı antijenotoksik etkileri*. (Yüksek lisans tezi). Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Taner, G.** (2015). *Doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerin genotoksik ve antigenotoksik etkileri.* (Doktora tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tong, Y., Zhang, G., Li, Y., Xu, J., Yuan, J., Zhang, B., Hu, T., & Song, G.** (2018). Corilagin inhibits breast cancer growth via reactive oxygen species-dependent apoptosis and autophagy, *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(8), 3795-3807.
- Tozkoparan, B., & Aytaç, S. P.** (2007). Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutasyon s-transferazlar, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, (2), 139-164.
- Üzümlüoğlu Coşkun, M.** (2008). *Şizofreni Etiyopatogenezinde Oksidatif Stresin Rolü.* (Uzmanlık tezi). Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Wang, Z., Guo, Q. Y., Zhang, X. J., Li, X., Li, W. T., Ma, X. T., & Ma, L. J.** (2014). Corilagin attenuates aerosol bleomycin-induced experimental lung injury, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9762-9779.
- Wu, C., Huang, H., Choi, H. Y., Ma, Y., Zhou, T., Peng, Y., Pang, K., Shu, G., & Yang, X.** (2021). Anti-esophageal Cancer Effect of Corilagin Extracted from Phyllanthi Fructus via the Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways, *Journal of Ethnopharmacology*, 269, 113700.
- Xu, J., Zhang, G., Tong, Y., Yuan, J., Li, Y., & Song, G.** (2019). Corilagin induces apoptosis, autophagy and ROS generation in gastric cancer cells in vitro, *International journal of molecular medicine*, 43(2), 967-979.
- Yamada, H., Nagao, K., Dokei, K., Kasai, Y., & Michihata, N.** (2008). Total synthesis of Corilagin, *Journal of the American Chemical Society*, 130(24), 7566-7567.
- Yazici, C., & Köse, K.** (2004). Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 56-65.
- Yeşilbağ, D.** (2009). Kanatlı Beslenmesinde Doğal ve Sentetik Antioksidanların Kullanımı, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(2), 55-60.
- Yisimayili, Z., Guo, X., Liu, H., Xu, Z., Abdulla, R., Aisa, H. A., & Huang, C.** (2019). Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 165, 251-260.
- Yu, X., Zhou, T., Yu, H., Chang, L. Y., & Wei, L. L.** (2018). Corilagin reduces the frequency of seizures and improves cognitive function in a rat model

of chronic epilepsy, *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 2832.

- Zhang, H. X., Liu, F. W., Ren, F., Zhang, Y. L., & Nie, Z.** (2017). Neuroprotective effect corilagin in spinal cord injury rat model by inhibiting nuclear factor-kB, inflammation and apoptosis, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(5), 41-48.
- Zhang, R., Chu, K., Zhao, N., Wu, J., Ma, L., Zhu, C., Chen, X., Wei, G. & Liao, M.** (2019). Corilagin Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High-Fat Diet-Induced C57BL/6 Mice by Ameliorating Oxidative Stress and Restoring Autophagic Flux, *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1693.
- Zhao, L., Du, P., Ma, Q., Xiong, J., Wang, Y., Yang, F., ... & Zhou, X.** (2018). Corilagin controls post-parasiticide schistosome egg-induced liver fibrosis by inhibiting Stat6 signalling pathway, *bioRxiv*, 340299.
- Zhou, J., Ci'an Zhang, Y. S., Wang, L., Zhang, J., Li, F., & Mao, W.** (2018). Corilagin attenuates allergy and anaphylactic reaction by inhibiting degranulation of mast cells, *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 891.
- Zhou, X., Xiong, J., Lu, S., Luo, L., Chen, Z. L., Yang, F., ... & Wang, Y. J.** (2019). Inhibitory Effect of Corilagin on miR-21-Regulated Hepatic Fibrosis Signaling Pathway, *The American journal of Chinese medicine*, 47(07), 1541-1569.
- Zorić, N., Kopjar, N., Rodriguez, J. V., Tomić, S., & Kosalec, I.** (2021). Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes, *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 131-141.

EKLER

EK A: Etik kurul belgesi



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 2011-KAEK-26/314
Konu : Etik Kurul kararı

01/07/2019

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız ve sorumlu araştırmacısı olduğunuz "*Korilagin'in genotoksik ve mitomisin-C'ye karşı antijenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi*" başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 26.06.2019 tarih, 2019-11/17 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Gereği için bilgilerinize sunulur.



EKLER:
1-Karar (2 adet)
2-BGO formu (1 adet)

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Korilaginin Genotoksik ve Mitomisin-C'ye Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi
------------------------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	TELEFON	0.224. 295 00 20
	FAKS	0.224. 295 00 29
	E-POSTA	uskaek@uludag.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Gökçe Taner			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	Yüksek Lisans öğrencisi Elif İnan			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bursa Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji AD			
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	20.08.2019 / 12 ay			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	3			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Dili
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	19.06.2019	Türkçe
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (Sağlıklı kontrol grubu)	07.05.2019	Türkçe

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 09.05.2019
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 09.05.2019
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 09.05.2019
	IKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 09.05.2019
	SONUÇ ÖZET RAPORU	<input type="checkbox"/>
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/> Araştırma ilk başvuru (düzeltilme) ön yazısı (19.06.2019), ilgili bölüm izin yazısı, araştırmacı özgeçmiş, araştırmacılar tarafından imzalanmış Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi, literatür	

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Korilaginin Genotoksik ve Mitomisin-C'ye Karşı Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi
------------------------------	--

Karar No: 2019-11/17	Tarih: 26 Haziran 2019
-----------------------------	-------------------------------

KARAR BİLGİLERİ

Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirildi.

- 1-Araştırmanın yapılmasının uygun olduğuna,
- 2- Araştırmanın yürütülmesi sırasında Etik kurul kaşesi bulunan "Onam" formlarının kullanılması ve bu formun çalışmaya katılan gönüllülere çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulmasına,
- 3-Araştırmanın başlama tarihinin bildirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesine,
- 4-Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırmacılara iletilmesine toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
----------------------	--

BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU
-----------------------------------	--

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Erfe BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehmet ÇANSEV Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Alpistan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Pınar YURAL Üye	Pediyatri	U.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Rah Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAB Kardiyoloji Kliniği	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAB Biyokimya	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Selma MİGAL Üye	Sağlık mesleği namına olmayan üye	Serbest Meslek	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*Toplamda Bulunma

